



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

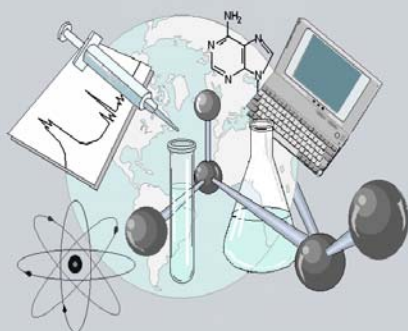
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

“Estudo químico e avaliação de atividades biológicas da planta

Cenchrus echinatus L. (Poaceae)”

Dissertação apresentada por
Adriano Antonio Silva ao Programa
de Pós-Graduação em Química do
Departamento de Química do Centro
de Ciências Exatas da Universidade
Estadual de Maringá como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Mestre em Química

CEE



Centro de
Ciências Exatas

MARINGÁ, JULHO/2008

ADRIANO ANTONIO SILVA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DA PLANTA *CENCHRUS ECHINATUS* L.
(POACEAE)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em
Química da Universidade Estadual de Maringá,
como requisito parcial para o título de Mestre em
Química.

Área de Concentração: Química dos Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Gentil José Vidotti

Maringá – PR
Universidade Estadual de Maringá – UEM
2008



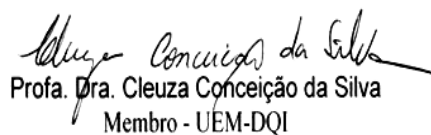
Universidade Estadual de Maringá
Centro de Ciências Exatas
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

Este é o exemplar definitivo da Dissertação apresentada por Adriano Antonio Silva, perante a Comissão Julgadora do Programa de Pós-Graduação em Química em 07 de julho de 2008.

COMISSÃO JULGADORA:



Prof. Dr. Cláudio Celestino de Oliveira
Presidente - UEM-DQI



Profa. Dra. Cleuza Conceição da Silva
Membro - UEM-DQI



Prof. Dr. César Cornélio Andrei
Membro - UEL

*“A sabedoria da vida não está em fazer aquilo que se gosta,
mas em gostar daquilo que se faz”.*

(Leonardo da Vinci)

*Aos meus sogros, Codi e Eva, pelo apoio, compreensão e confiança.
Ao meu porto seguro e amada esposa Shirani,
por compartilhar e participar da minha vida
em todos os momentos!!!!*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida, família e amigos.

À minha mãe, meus sogros, meus avós e à tia Silvia pelo amor, carinho e apoio de sempre.

À minha esposa Shirani pelo amor, amizade, carinho, dedicação, paciência e principalmente, por ser minha base forte em todos os momentos em que necessitei de amparo.

Ao prof. Dr. Gentil José Vidotti pelos conhecimentos transmitidos, pela orientação, conselhos, paciência e, sobretudo, pela sincera amizade e auxílio em momentos difíceis que surgiram durante todo o processo de execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Helena Sarragioto pelas valiosas sugestões, as quais foram de grande importância a este trabalho.

À Profa. Dra. Cleuza Conceição da Silva pelo auxílio, atenção e sugestões que foram cruciais para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Adley Forti Rubira, pela amizade, reconhecimento, conselhos e, principalmente, o estímulo para buscar sempre o melhor de si.

Aos meus eternos amigos, “Crespo”, “Marcão”, “Marcola”, “Rafa”, “Rafão”, “Raíssa” e Thelma, pela sincera amizade, alegria, companherismo, força, apoio e carinho.

É claro que não poderia deixar de agradecer, especialmente, a melhor aluna de iniciação científica com a qual já trabalhei, minha querida amiga Thelma. Muito obrigado pelo empenho, dedicação, compreensão e, principalmente, pela tão grande vontade de aprender.

Enfim, agradeço a todos os colegas de laboratório pela amizade e as contribuições a este trabalho.

À CAPES e à UEM pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Química da UEM, pela disponibilidade de concretização deste trabalho.

Aos membros da Secretaria de Pós-Graduação Claudemir e Cristina, pela disponibilidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura e à aluna Karine do Departamento de Análises Clínicas da UEM pelas análises da atividade antiproliferativa.

A Profa. Dr^a. Maria Lucília Zamuner do Departamento de Farmácia da UEM pelo auxílio no teste moluscicida.

A Profa. Dr^a. Ciomar Basani e à aluna Juliana Oliveira do Departamento de Farmácia da UEM pelas análises das atividades antiinflamatória e antimicrobiana.

Ao Prof. Dr. Jesui Vergílio e à aluna Ana Carolina do Departamento de Química da UEM pelas análises de Teor de Ácidos Graxos e Análise Centesimal.

À Ivânia pela amizade, ajuda e realização dos espectros de RMN, que foi uma das partes mais importantes e mais difíceis do meu trabalho.

Aos professores membros da banca: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Sarragiotto, Cleuza Conceição da Silva, Ernani Abicht Basso, César Cornélio Andrei e Terezinha de Jesus Faria, pela disponibilidade.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABELAS	v
ANEXO - ÍNDICES DE ESPECTROS	vi
ANEXO - ÍNDICE DE TABELAS DE COMPARAÇÃO	x
LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS	xi
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Química de produtos naturais	1
1.2. Produtos naturais no Brasil	3
1.3. Produtos naturais e interações com meio ambiente	3
1.4. Ácidos graxos em plantas	4
1.5. Proteínas e minerais	6
1.6. Atividades biológicas	7
1.6.1. Atividade antiinflamatória	7
1.6.2. Atividade antimicrobiana	7
1.6.3. Atividade antiproliferativa	8
1.6.4. Atividade antioxidante	8
1.6.5. Atividade moluscicida	9
1.6.6. Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	9
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1. Gramíneas e <i>Cenchrus echinatus</i>	10
3. PARTE EXPERIMENTAL	13
3.1. Instrumentação e material cromatográfico	13
3.2. Solventes utilizados	14
3.3. Coleta e secagem da planta	14

3.4. Preparação e particionamento do extrato bruto das sementes	14
3.5. Preparação e particionamento do extrato bruto das raízes	15
3.6. Preparação e particionamento do extrato bruto das folhas e caules	15
3.7. Preparação e fracionamento do extrato alcaloídico das sementes	15
3.8. Elaboração do perfil cromatográfico dos extratos	16
3.9. Avaliação da atividade antiinflamatória dos extratos brutos e partições das sementes e raízes	16
3.10. Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e partições das sementes e raízes	17
3.11. Avaliação da atividade antiproliferativa	17
3.11.1. Cultura das células	17
3.11.2. Atividade antiproliferativa	18
3.12. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos e partições	19
3.13. Avaliação da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> L.	19
3.14. Avaliação da atividade moluscicida	20
3.15. Teor de ácidos graxos das sementes, folhas e caules	20
3.16. Análise centesimal das sementes e folhas	21
3.16.1. Teor de umidade e cinzas	21
3.16.2. Proteína bruta	21
3.17. Isolamento de CE-01 e CE-02	22
3.18. Isolamento de CE-03 e CE-04	22
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
4.1. Extratos e perfis cromatográficos	24
4.2. Avaliação da atividade antiinflamatória	24
4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana	27
4.4. Composição de ácidos graxos e análise centesimal	27
4.5. Avaliação da atividade antioxidante	29
4.6. Avaliação da atividade contra <i>Artemia Salina</i> L.	30
4.7. Avaliação da atividade antiproliferativa	31
4.8. Avaliação da atividade moluscicida	32
4.9. Identificação de CE-01	32
4.10. Identificação de CE-02	39

4.11. Identificação de CE-03	47
4.12. Identificação de CE-04	50
5. CONCLUSÕES	53
6. PRINCIPAIS REFERÊNCIAS	54
ANEXO - EXPECTROS	57
ANEXO - TABELAS DE COMPARAÇÃO	86

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Efeito dos extratos da raiz (EMR) e da semente (EMS) de <i>Cenchrus echinatus</i> sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC). Animais que receberam apenas veículo acetona/água (V)	25
Figura 2. Efeito antiinflamatório tópico das frações de <i>Cenchrus echinatus</i> L.	26
Figura 3. (-) Palidol	34
Figura 4. Expansão dos hidrogênios dos anéis <i>para</i> e <i>meta</i> substituídos.	34
Figura 5. Expansão dos hidrogênios de carbonos saturados.	35
Figura 6. Espectro de ^1H de CE-01	35
Figura 7: Espectro de RMN de ^{13}C para CE-01	36
Figura 8. Mapa de contornos NOESY para CE-01	36
Figura 9. Correlação através de NOE entre os hidrogênios dos anéis ciclopenteno	37
Figura 10. Algumas correlações de HMBC dos carbonos de junção de anel	37
Figura 11. Mapa de contornos HMBC para CE-01	38
Figura 12. Espectro de ESI – MS/MS para CE-01	38
Figura 13. Estrutura molecular de CE - 02	39
Figura 14. Espectro de RMN de ^1H para CE - 02	41
Figura 15. Espectro de ^{13}C para CE - 02	41
Figura 16. Espectro de ^{13}C para CE - 02	42
Figura 17. Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C para CE - 02	42
Figura 18. Correlações de HMBC do grupo furano com as demais partes da molécula de CE-02	43
Figura 19. Correlações de HMBC do grupo furano com as demais partes da molécula de CE-02	44
Figura 20. Leachianol D à esquerda e Lechianiol E à direita.	45
Figura 21. Principais correlações de NOESY para CE-02	46
Figura 22. Espectro de RMN de ^1H da mistura de CE-01 e CE-03	47
Figura 23. Espectro de RMN de ^1H , em CD_3OD , da mistura de CE-01 e CE-03	47
Figura 24. Mapa de Contornos COSY, em CD_3OD , da mistura de CE-01 e CE-03	48
Figura 25. Isômero CE-03 à esquerda, Palidol (CE-01) à direita	49
Figura 26. Nepalensinol B	49
Figura 27. Espectro de ESI – MS/MS para o íon de CE-04 Dicarregado	51
Figura 28. Espectro de ESI – MS/MS para o íon de CE-04 Monocarregado	52

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Porcentagem de inibição do edema de orelha induzido pelo óleo de Cróton (200 µg)	25
Tabela 2. Composição e somatórios de ácidos graxos na semente de <i>Cenchrus echinatus</i> L.	28
Tabela 3. Composição e somatórios de ácidos graxos na folha de <i>Cenchrus echinatus</i> L.	28
Tabela 4. Comparação da composição de alguns ácidos graxos de <i>Cenchrus echinatus</i> com outras oleaginosas ²⁴ .	29
Tabela 5: Resultados da Análise Centesimal do <i>C. echinatus</i> .	29
Tabela 6. Resultados para a atividade antioxidante (IC ₅₀).	30
Tabela 7. Resultados para toxicidade frente à <i>A. salina</i> (DL ₅₀).	30
Tabela 8. Resultados para o teste antiproliferativo.	31
Tabela 9. Resultados para o teste antiproliferativo em tempos determinados.	32
Tabela 10. Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C/DEPT, HMQC, HMBC, COSY e NOESY (300,06MHz para ¹ H e 75,45MHz para ¹³ C, CD ₃ OD/TMS) para o composto CE-01.	33
Tabela 11. Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C/DEPT, HMQC, HMBC, COSY e NOESY (300,06MHz para ¹ H e 75,45MHz para ¹³ C, CD ₃ OD/TMS) para o composto CE-02.	40
Tabela 12. Dados de RMN de ¹ H, ¹³ C/DEPT, HMQC, HMBC, COSY e NOESY (300,06MHz para ¹ H e 75,45MHz para ¹³ C, (CD ₃) ₂ CO/TMS) para o composto CE-04.	50

ANEXO - ÍNDICES DE ESPECTROS

Espectros de RMN de ^1H

E R ^1H-1. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	57
E R ^1H-1 - Expansão 1. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	57
E R ^1H-1 - Expansão 2. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	58
E R ^1H-2. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	66
E R ^1H-2 - Expansão 1. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	66
E R ^1H-2 - Expansão 2. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	67
E R ^1H-2 - Expansão 3. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	67
E R ^1H-3. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	76
E R ^1H-3 - Expansão 1. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	76
E R ^1H-3 - Expansão 2. Espectro de RMN de ^1H (300,06MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	77

Espectros de RMN de ^{13}C

E R ^{13}C-1. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE - 01.	58
E R ^{13}C-1 - Expansão 1. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	58
E R ^{13}C-1 - Expansão 2. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	59
E R ^{13}C-1 - Expansão 3. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	59
E R ^{13}C-1 - Expansão 4. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE - 01.	59
E R ^{13}C-2. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	68

E R ^{13}C-3. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE - 04.	77
E R ^{13}C-3 - Expansão 1. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	77
E R ^{13}C-3 - Expansão 2. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	78
E R ^{13}C-3 - Expansão 3. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	78

Espectros de RMN de DEPT

E R DEPT-1. Espectro de RMN de DEPT (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE - 01.	60
E R DEPT-2. Espectro de RMN de DEPT (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE - 02.	68
E R DEPT-3. Espectro de RMN de DEPT (75,45MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE - 04.	78

Espectros de RMN de HMQC

E R HMQC-1. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	60
E R HMQC-2. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	69
E R HMQC-2 - Expansão 1. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	69
E R HMQC-2 - Expansão 2. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	70
E R HMQC-3. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	79
E R HMQC-3 - Expansão 1. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	79
E R HMQC-3 - Expansão 2. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	80

Espectros de RMN de HMBC

E R HMBC-1. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	61
E R HMBC-1 - Expansão 1. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	61
E R HMBC-1 - Expansão 2. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	62
E R HMBC-1 - Expansão 3. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	62
E R HMBC-2 Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	70
E R HMBC-2 - Expansão 1. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	71
E R HMBC-2 - Expansão 2. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	71
E R HMBC-2 - Expansão 3. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	72
E R HMBC-3. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	80
E R HMBC-3 - Expansão 1. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	81
E R HMBC-3 - Expansão 2. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	81
E R HMBC-3 - Expansão 3 Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.	82

Espectros de RMN de COSY

E R COSY-1. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-01.	63
E R COSY-2. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE-02.	72

E R COSY-2 - Expansão 1. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, CD ₃ OD/TMS) do composto CE-02.	73
E R COSY-2 - Expansão 2. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, CD ₃ OD/TMS) do composto CE-02.	73
E R COSY-3. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, (CD ₃) ₂ CO/TMS) do composto CE-04.	82
E R COSY-3 - Expansão 1. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, (CD ₃) ₂ CO/TMS) do composto CE-04.	83
E R COSY-3 - Expansão 2. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, (CD ₃) ₂ CO/TMS) do composto CE-04.	83

Espectros de RMN de NOESY

E R NOESY-1. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD ₃ OD/TMS) do composto CE-01.	63
E R NOESY-1 - Expansão 1. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD ₃ OD/TMS) do composto CE-01.	64
E R NOESY-1 - Expansão 2. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD ₃ OD/TMS) do composto CE-01.	64
E R NOESY-2. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD ₃ OD/TMS) do composto CE-02.	74
E R NOESY-2 - Expansão 1. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD ₃ OD/TMS) do composto CE-02.	75
E R NOESY-2 - Expansão 2. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD ₃ OD/TMS) do composto CE-02.	75
E R NOESY-3. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, (CD ₃) ₂ CO/TMS) do composto CE-04.	84
E R NOESY-3 - Expansão. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, (CD ₃) ₂ CO/TMS) do composto CE-04.	84

Espectros de Massas

E M-1. Espectro de massas (ESI-MS/MS) do composto CE-01.	65
---	----

E M-2 - Monocarregado. Espectro de massas monocarregado (ESI-MS/MS) do composto CE-04. 85

E M-2 - Dicarregado. Espectro de massas dicarregado (ESI-MS/MS) do composto CE-04. 85

ANEXO - ÍNDICE DE TABELAS DE COMPARAÇÃO

Tabela 1 - Anexo. Comparação dos dados de RMN de ^1H , e ^{13}C (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ e $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) de CE-01 e (-) palidol. 86

Tabela 2 - Anexo. Comparação dos dados de RMN de ^1H , e ^{13}C (300,06 e 400 MHz para ^1H ; 75,45 e 100 MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) de CE-04 e Nepalensinol B. 86

LISTA DE ABREVIACOES E SÍMBOLOS

AA	Atividade Antioxidante
Abs	Absorbância
AGMI	cido Graxos Monoinsaturados
AGPI	cidos Graxos Poliinsaturados
AGS	cido Graxo Saturados
¹³ C	Carbono-13
CCD	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
(CD₃)₂CO	Acetona Deuterada
CD₃OD	Metanol Deuterado
CE	<i>Cenchrus echinatus</i>
CE-01	Substância 01 isolada
CE-02	Substância 02 isolada
CE-03	Substância 03 isolada
CE-04	Substância 04 isolada
CE-EASC₂	Extrato Aquoso das Sementes particionado com Clorofórmio em pH 2
CE-EASC₇	Extrato Aquoso das Sementes particionado com Clorofórmio em pH 7
CE-EASC₁₀	Extrato Aquoso das Sementes particionado com Clorofórmio em pH 10
CE-EASB₁₀	Extrato Aquoso das Sementes particionado com Butanol em pH 10
CE-EHS	Extrato bruto Hexânico das Sementes
CE-EMF	Extrato bruto Metanólico das Folhas
CE-EMFA	Extrato bruto Metanólico das Folhas particionado com Acetato de Etila
CE-EMFAq	Fração Aquosa residual das Folhas após as parties
CE-EMFB	Extrato bruto Metanólico das Folhas particionado com Butanol
CE-EMFH	Extrato bruto Metanólico das Folhas particionado com Hexano
CE-EMR	Extrato bruto Metanólico das Raízes
CE-EMRA	Extrato bruto Metanólico das Raízes particionado com Acetato de Etila
CE-EMRAq	Fração Aquosa residual das Raízes após as parties
CE-EMRB	Extrato bruto Metanólico das Raízes particionado com Butanol
CE-EMRD	Extrato bruto Metanólico das Raízes particionado com Diclorometano
CE-EMS	Extrato bruto Metanólico das Sementes
CE-EMSA	Extrato bruto Metanólico das Sementes particionado com Acetato de Etila
CE-EMSAq	Fração Aquosa residual das Sementes após as parties

CE-EMSB	Extrato bruto Metanólico das Sementes particionado com Butanol
CE-EMSD	Extrato bruto Metanólico das Sementes particionado com Diclorometano
CMI	Concentração Mínima Inibitória
COSY	Correlation Spectroscopy (^1H - ^1H), Espectroscopia de Correlação ou Correlação Homonuclear (^1H - ^1H)
d	Dubleto
Da	Dalton – Unidade de Massa
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer, Incremento sem Distorção por Transferência de Polarização
DL₅₀	Concentração requerida para morte de 50% da população
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d₆	Dimetilsulfóxido Deuterado
DP	Desvio Padrão
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
E	Espectro
ESI - MS/MS	Espectrometria de Massa/Massa de Ionização por Eletro-Spray
^1H	Próton
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence, Correlação Heteronuclear a Múltiplas Ligações
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence, Correlação Heteronuclear de Quantum-Múltiplo
Hz	hertz
IC₅₀	Concentração requerida para 50% de Inibição
J	Constante de Acoplamento
m/z	Relação massa/carga
MHz	megahertz
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy, Espectroscopia de Amplificação Nuclear de Overhauser ou Efeito Overhauser Nuclear (NOE) a Duas Dimensões
OC	Óleo de Cróton
ppm	Partes Por Milhão
Rf	Fator de Retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singleto
sl	Singleto Largo
t	Tripleto

TMS	Tetrametilsilano
TR	Tempo de Retenção
UV-Vis	Ultra-violeta - Visível
δ	Deslocamento Químico
δC	Deslocamento Químico de Carbono-13
δH	Deslocamento Químico de Próton

RESUMO

A espécie *Cenchrus echinatus* L., conhecida popularmente como capim-carrapicho, é uma das ervas daninhas que mais dificulta o cultivo de diversas espécies, como trigo, algodão, soja e etc., devido aos seus frutos possuírem espinhos e pelo fato de se alastrar rapidamente em diversos tipos de solos, mesmo em más condições.

Não existem muitos estudos sobre o isolamento e caracterização de substâncias produzidas por essa espécie, assim como não há estudos sobre atividades biológicas que essa planta possa apresentar. Contudo, existem diversos estudos que visam o controle e/ou eliminação dessa espécie, com o intuito de melhorar a produtividades das lavouras das quais o *C. echinatus* é infestante. Dessa forma, no presente trabalho, foi feito o estudo fitoquímico da espécie *Cenchrus echinatus* L., a fim de avaliar o potencial biológico da mesma, bem como isolar os compostos biologicamente ativos ou que possam enriquecer o que se conhece até o momento em substâncias produzidas por esta espécie.

Foram obtidos os extratos hexânico, metanólico e aquoso ácido das sementes, bem como o extrato metanólico das raízes e folhas da espécie *C. equinatus*. Os perfis cromatográficos dos extratos foram averiguados via CCD e foram realizados os testes antiinflamatórios oral e tópico, microbiológico (fungos e bactérias), antiproliferativo, moluscicida, toxicidade frente à artemia salina e antioxidante. Também foi determinado o teor de ácidos graxos e foram isoladas substâncias polifenólicas da classe dos estilbenóides.

Alguns dos extratos e partições apresentaram atividade antiinflamatória, antiproliferativa, antioxidante e toxicidade frente à artemia salina. Com a análise do perfil de ácidos graxos da planta foi constatado a presença de ácidos graxos essenciais, como ômega-3 e ômega-6, dentre outros. Foram isoladas três substâncias, o Palidol (CE-01), o Carasiphenol C (CE-02) e o Nepalensinol B (CE-04).

PALAVRAS-CHAVES: Poaceae; atividades biológicas, estilbenóides, *Cenchrus echinatus*.

ABSTRACT

The specie *Cenchrus echinatus* L., popularly known as “capim-carrapicho”, is one of the weeds that hinder the agronomical cultivation of several species, as wheat, cotton, soy, etc., due to its fruit’s thorns and for the fact that this species quickly invades, even in bad conditions, several types of soils.

There aren’t many studies on the isolation and characterization of substances produced by this species, as well as no studies on biological activities of this plant. However, there are several studies that seek the control and/or elimination of this species, with the intention of getting better farming productivity where *C. echinatus* is a weed. For this, in the present work, it was done the phytochemical study of the species *Cenchrus echinatus* L., in order to evaluate the biological potential, as well as to isolate biologically active compounds or to enrich the knowledge on substances produced by this plant.

There were obtained hexanic, methanolic and acid aqueous extracts of the seeds, as well as methanolic extract of the roots and leaves of *C. echinatus*. The chromatographic profiles of the extracts were analyzed through TLC and many tests were accomplished, like: oral and topical anti-inflammatory effect, antimicrobial (yeasts and bacteria), antiproliferative, moluscicidal, toxicity against *Artemia salina* and antioxidant activity. It was also determined the fat acids presence and it was also isolated polyphenolics substances of stilbenoids class.

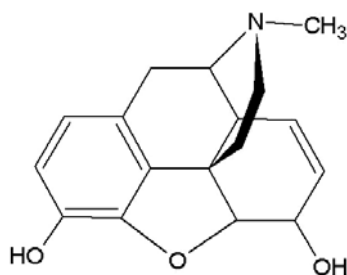
Some of the extracts and partitions presented anti-inflammatory activity, antiproliferative effect, toxicity to *A. salina* and antioxidant effect. With the analysis of the profile of fat acids in this plant, it was verified the presence of essential fat acids, like omega-3 and omega-6, and others. Three substances were isolated, the pallidol (CE-01), Carasiphenol C (CE-02) and Nepalensinol B (CE-04).

1. INTRODUÇÃO

1.1. Química de produtos naturais

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers que foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Este papiro traduzido em 1890, por H. Joachin, enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal¹.

No que antecedeu à era cristã, conhecido como civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural como: Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, e Teofrasto (372 aC), discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas, é seu o registro da utilização da espécie botânica *Papaver somniferum*, planta cujo princípio ativo é a morfina (1)¹.



01

A civilização árabe contribuiu muito para a medicina natural, como no emprego dos purgativos vegetais e o conhecimento do sabor doce da urina dos diabéticos. No século X, o médico islâmico Avicena (Abu Ali al Hussin ibn Abdallah ibn Sina), estudioso botânico, criador de um tratado sobre medicamentos cardíacos teve sua obra mais importante, “Canon”, que foi durante muito tempo o texto médico mais popular da Europa¹.

A Paracelso (1493-1541) deve-se todo o empirismo mágico-feiticeiro da arte de curar ao longo da história da humanidade. É sua a criação da teoria da “assinatura dos corpos” onde a “atividade farmacológica” de uma planta estaria relacionada com o seu aspecto físico. Assim, por exemplo, a serpentária, erva da família das aráceas cuja haste lembra o corpo de uma serpente, serviria para a cura de picadas de cobra¹.

As grandes navegações e excursões marítimas levaram a ser descobertos novos continentes e, com isso, novos arsenais terapêuticos naturais, destacando os das culturas

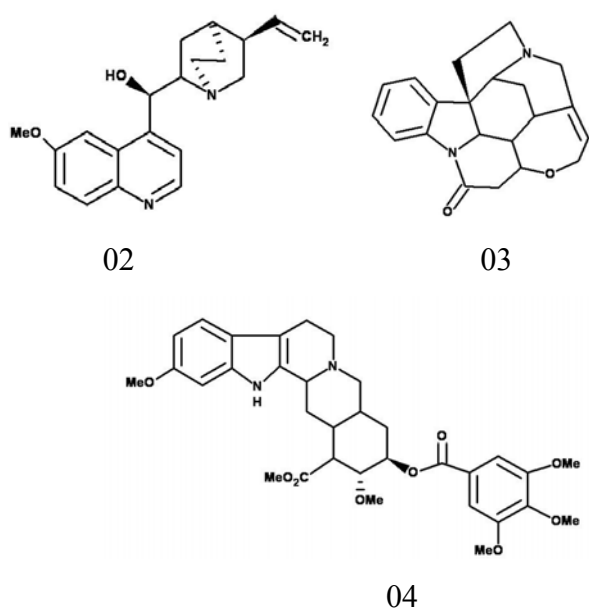
Inca, Asteca, Maya, Olmeca e Tolteca que disponibilizaram à civilização moderna a quina, a ipecacuanha, a coca e muitas outras drogas de valor terapêutico¹.

Após a metade do século XVIII, com a destruição da teoria do flogístico por Lavoisier (1743-1794), foram criadas as bases da química moderna ao estabelecer a natureza da combustão, o que permitiu, desse modo, a determinação da composição centesimal das substâncias orgânicas¹.

Em meados do século XIX surgiram os primeiros resultados sobre os trabalhos de degradação química, o que culminou, em 1873, com a síntese da alizarina. No ano seguinte ao desta síntese, Van't Hoff e Le Bel, ao mesmo tempo e isoladamente, propõem a estrutura tetraédrica do carbono, lançando as bases fundamentais da estereoquímica¹.

Em 1916, quando G. N. Lewis propôs a ligação covalente, já se conheciam várias estruturas de substâncias orgânicas naturais, resultado de laboriosos estudos de degradação química e de síntese orgânica. Esse período representa o apogeu da síntese dos corantes¹.

Entre as décadas de 1920-1930 um grande número de trabalhos sobre o isolamento e identificação de substâncias de natureza esteroideal foram publicados, e o colesterol teve sua estrutura determinada. Nos anos seguintes, Woodward sintetizou a cortisona. Além disso, a genialidade deste químico, pode ser avaliada através de suas sínteses dos alcalóides quinina (2) (1945), estriquinina (3) (1954) e reserpina (4) (1958)¹.



1.2. Produtos naturais no Brasil

O Brasil com toda sua extensão territorial, desde a costa até as florestas, é detentor de um grande potencial para estudo sobre produtos naturais. A Química de Produtos Naturais é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores. Os primeiros médicos que vieram ao Brasil perceberam muito cedo a importância da utilização da medicina indígena, baseada na utilização de plantas¹.

Na comitiva que acompanhou a Princesa Leopoldina da Áustria, noiva de D. Pedro I, veio o médico português Bernardino António Gomes, que no Laboratório Chimico da Casa da Moeda, em Lisboa, isolou a cinchonina, primeiro alcalóide natural sob a forma de base pura, das cascas da quina¹.

Theodoro Peckolt veio para o Brasil em 1847 para estudar a flora brasileira e contribuiu muito no estudo químico de plantas do Brasil. Este farmacêutico pode ser considerado, pelo seu trabalho fantástico, o pai da fitoquímica brasileira. Entre os muitos trabalhos de Peckolt se destacam o isolamento da substância de *Plumeria lancifolia*, que ele denominou de agoniadina¹. Este foi o primeiro iridóide a ser isolado da natureza em forma pura, porém só 88 anos depois do seu isolamento teve sua estrutura química determinada.

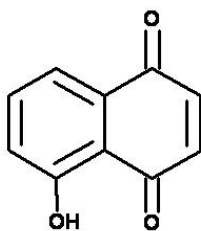
Uma das instituições pioneiras de grande importância para a química dos produtos naturais foi a Faculdade de Medicina do Rio de Janeiro. Nessa escola, dentre os que se dedicaram ao estudo químico de plantas, destaca-se o nome de Domingos José Freire Júnior (1842-1899), que foi catedrático da cadeira de Química Orgânica e Biológica (1874-1895). Além de suas obras didáticas, deixou uma série de publicações científicas, algumas dessas na área de fitoquímica. Descreveu, por exemplo, a grandiflorina isolada da fruta do lobo (*Solanum grandiflora*), que hoje é conhecido pelo nome de solasonina.

1.3. Produtos naturais e Interações com Meio Ambiente

Em 1976, realizou-se na cidade do Vaticano, a semana de estudos “Produtos Naturais e a Proteção de Plantas”, onde foram discutidos o papel de determinados metabólitos secundários na proteção da planta, contra diversos predadores naturais¹. A

importância deste tema pode ser avaliada pela destruição cada vez maior dos cultivares de cereais pelo ataque de pragas, que chega a causar a perda de 1/3 da produção mundial de cereais. Este problema vem sendo agravado pela prática cada vez mais freqüente de monoculturas e pela resistência dos predadores aos inseticidas sintéticos.

Devido aos efeitos desagradáveis causado por inseticidas sintéticos, busca-se, até hoje, meios de utilizar metabólitos de defesa da própria planta, para o controle natural das pragas. Estas defesas são de natureza química e, normalmente, envolvem substâncias do metabolismo secundário, as quais podem ser chamadas de fitotoxinas ou aleloquímicos¹. Esse fenômeno é conhecido como alelopatia. A primeira interação planta-planta foi descrita pelo naturalista romano Plínio, que observou que sob a copa das nojeiras não crescem outros vegetais¹. Hoje, sabe-se que a fitotoxina responsável por este fenômeno é a juglona (**5**), um poderoso inibidor de germinação, presente na forma de glicosídeo nas folhas, que sofre hidrólise e oxidação à quinona no solo¹.



05

A definição mais recente de alelopatia, que é aceita pela Sociedade Internacional de Alelopatia, é muito abrangente e diz que: “É a ciência que estuda qualquer processo envolvendo, principalmente, metabólitos secundários produzidos por plantas, algas, bactérias e fungos que influenciam o crescimento de sistemas biológicos com efeitos positivos e negativos”¹.

1.4. Ácidos graxos em plantas

Ácidos graxos são ácidos carboxílicos alifáticos de cadeias longas, encontrados em gorduras e óleos naturais, que podem ou não apresentar ligações duplas entre as moléculas de carbono, sendo classificados como saturados (nenhuma ligação dupla) ou insaturados (com ligações duplas)². Os ácidos graxos insaturados podem ser monoinsaturados (apenas uma ligação dupla) ou poliinsaturados (mais de uma ligação dupla).

Ácidos graxos saturados: São os mais comuns em nossa dieta. São encontrados principalmente em alimentos de origem animal, tais como carne, ovos e gordura animal, e em óleos de plantas tropicais (palma e côco). Dietas ricas em gordura saturada são associadas com altos riscos de doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. O óleo de soja é considerado um dos mais bem balanceados óleos vegetais, com baixo conteúdo de gordura saturada (em torno de 15%)². Os ácidos graxos saturados da soja são o ácido palmítico e o ácido esteárico. Ácidos graxos saturados aumentam o ponto de fusão das gorduras. Por este motivo, gordura animal (rica em ácidos graxos saturados) é sólida, e gordura vegetal (pobre em ácidos graxos saturados) é líquida a temperatura ambiente².

Ácidos graxos monoinsaturados: São ácidos graxos insaturados onde a cadeia de átomos de carbono perdeu dois átomos de hidrogênio, gerando uma ligação dupla entre os dois átomos de carbono. São encontrados em óleos vegetais, tais como soja, oliva, canola, amendoim. Quando substituem ácidos graxos saturados na dieta, ajudam a baixar o colesterol LDL (mau colesterol) sem alterar o HDL (bom colesterol). Como possuem grande estabilidade, óleos ricos em ácidos graxos monoinsaturados são utilizados em frituras. O óleo de soja contém cerca de 25% de ácidos graxos monoinsaturados (ácido oléico). Quando substituem os ácidos graxos saturados na dieta, ajudam a baixar o colesterol LDL (mau colesterol) sem alterar o HDL (bom colesterol)².

Ácidos graxos poliinsaturados: São ácidos graxos insaturados, cujas cadeias de átomos de carbono perderam quatro ou mais átomos de hidrogênio. São encontrados em amêndoas e óleos vegetais (soja, milho, girassol, oliva, canola) e óleo de peixe. Quando substituem os ácidos graxos saturados na dieta, ajudam a baixar o colesterol LDL (mau colesterol) sem alterar o HDL (bom colesterol). O ácido linolênico e o ácido linoléico (ácidos graxos poliinsaturados da soja) são dois dos ácidos graxos essenciais a dieta humana. Ácidos graxos essenciais são aqueles que necessitam fazer parte da dieta (não são sintetizados pelo organismo). A Organização Mundial da Saúde recomenda que 25% das calorias ingeridas na dieta sejam ácidos graxos essenciais. O óleo de soja possui cerca de 61% de ácidos graxos poliinsaturados (ácido linoléico e ácido linolênico)².

Ácido palmítico (16:0): É um ácido graxo com 16 átomos de carbono na cadeia e nenhuma ligação dupla. Corresponde a cerca de 11% da composição de ácidos graxos do óleo de soja. Por ser o ácido graxo saturado mais abundante no óleo de soja, os

programas de melhoramento de soja que objetivam produzir variedades com óleo de melhor qualidade procuram obter variedades com menor conteúdo de ácido palmítico².

Ácido esteárico (18:0): É um ácido graxo com 18 átomos de carbono na cadeia e nenhuma ligação dupla. Corresponde a cerca de 4% da composição de ácidos graxos do óleo de soja. É importante para a fabricação de margarinas (aumenta o ponto de fusão)².

Ácido olêico (18:1): É um ácido graxo com 18 átomos de carbono na cadeia e uma ligação dupla. Corresponde a cerca de 25% da composição de ácidos graxos da soja. Confere maior estabilidade ao óleo, do que os ácidos graxos poliinsaturados. Por resistir a rancificação, um óleo rico em ácido linolênico confere maior "vida de prateleira" ao óleo², também é conhecido com ômega-9.

Ácido linoléico (18:2): É um ácido graxo com 18 átomos de carbono na cadeia, e duas ligações duplas. É um dos ácidos graxos essenciais, também conhecido com ácido ômega-6. Corresponde a cerca de 54% da composição de ácidos graxos da soja. O consumo de ácidos graxos poliinsaturados pode diminuir os níveis de lipídios no sangue, e então diminuir o colesterol².

Ácido linolênico (18:3): É um ácido graxo com 18 átomos de carbono na cadeia, e três ligações duplas. É um dos ácidos graxos essenciais também conhecido com ácido ômega-3. Corresponde a cerca de 7% da composição de ácidos graxos da soja. A soja é um dos poucos vegetais com quantidades nutricionalmente significativas de ômega-3².

1.5. Proteínas e Minerais

A determinação das cinzas fornece uma indicação da riqueza da amostra em elementos minerais³. Por meio de aquecimento, em temperatura elevada, todas as substâncias voláteis que se decompõem pelo calor serão eliminadas e a matéria orgânica é toda transformada em CO₂ e H₂O, etc. As cinzas, no alimento e em plantas, contêm, principalmente, os seguintes cátions: cálcio, potássio, sódio, magnésio, ferro, cobre, cobalto, alumínio e, os seguintes ânions: sulfato, cloreto, silicato, fosfato, etc³.

As proteínas são os maiores constituintes de toda a célula viva, e cada uma delas de acordo com sua estrutura molecular, tem uma função biológica associada às atividades vitais. A determinação do teor de proteína é baseada, no fato, de elas se

apresentarem uma porcentagem de nitrogênio quase constante, em torno de 16%. O método mais utilizado é o semi-micro Kjeldahl, onde se determina o nitrogênio protéico propriamente dito e outros compostos nitrogenados não protéicos. Tais como, aminas, amidas, lecitinas, nitrilas e aminoácidos. Nesse caso o resultado será dado em termos de proteína bruta³.

1.6. Atividades biológicas

1.6.1. Atividade antiinflamatória

São utilizados vários testes *in vivo* para avaliar a atividade antiinflamatória de uma substância pura ou de um extrato de planta. Um dos testes utilizados para avaliar a atividade antiinflamatória oral de uma substância ou extrato é o teste da pleurisia, onde a pleura de um animal, geralmente camundongo, é induzida a um processo inflamatório causada por um indutor, comumente a carragenina. O substrato é administrado oralmente e, em seguida, é feita a indução de inflamação da pleura. O substrato que possui atividade antiinflamatória inibe a evolução da inflamação⁴.

Para avaliar a atividade antiinflamatória tópica, o substrato é utilizado topicamente sobre a pata ou orelha do camundongo e, em seguida, é induzida a inflamação da mesma parte utilizando um indutor inflamatório, comumente o óleo de cróton. Da mesma forma se o substrato possuir atividade antiinflamatória, este inibirá a evolução da inflamação⁴.

1.6.2. Atividade antimicrobiana

O crescente interesse em plantas medicinais com propriedades antimicrobianas vem ressurgindo devido ao fato de bactérias consideradas como já controladas, estarem reemergindo e apresentando multirresistência aos antimicrobianos utilizados na rotina clínica⁵. O teste é realizado *in vitro*, com vários tipos de fungos e bactérias e a atividade antimicrobiana é positiva se o substrato inibir o crescimento das colônias desses microorganismos.

1.6.3. Atividade antiproliferativa

A importância do estudo da atividade antiproliferativa de plantas medicinais está relacionada com o fato do câncer ser um dos maiores problemas de saúde pública no Brasil e no mundo⁶. A cada ano, segundo dados da OMS, o câncer atinge 9 milhões de pessoas, levando a óbito 5 milhões de pacientes. No Brasil, o número de casos de câncer aumenta a cada ano e no Sudeste brasileiro, os tumores malignos representam a segunda maior causa de óbitos, sendo superadas apenas por doenças cardiovasculares⁶.

Nos testes são utilizadas linhagens de células cancerígenas e o teste, *in vitro*, visa a inibição do crescimento dessas células para que o substrato seja considerado ativo.

1.6.4. Atividade antioxidante

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz constantemente radicais livres. Estas moléculas geradas, *in vivo*, reagem com DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e a instalação de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose, artrite reumática, entre outras⁴.

Os compostos fenólicos, constituintes de um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, são produtos secundários do metabolismo vegetal que apresentam em sua estrutura um anel aromático com uma ou mais hidroxilas, o que possibilita atuarem como agentes redutores, exercendo proteção ao organismo contra o “*stress*” oxidativo. E, em função da grande diversidade química existente, particularmente, entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras⁷.

Dentre os diferentes métodos existentes destacam-se o ensaio do DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)⁸, neste ensaio o antioxidante reage com o radical DPPH, convertendo-o em sua forma reduzida (1,1-difenil-2-picrilhidrazina). Nesta reação, a solução metanólica de DPPH, inicialmente de coloração violeta, torna-se amarelada e o grau deste descoloramento indica a habilidade do antioxidante em sequestrar o radical livre.

1.6.5. Atividade moluscicida

As substâncias moluscicidas são um fator crucial para o controle da esquistossomose. No presente momento apenas uma substância sintética, a niclosamida, é recomendada pela OMS como moluscicida⁹. Em países do Terceiro Mundo o uso de moluscicidas sintéticos tem causado problemas de toxicidade, contaminação do meio ambiente e a resistência dos caramujos (*Biomphalaria glabrata*) transmissores da esquistossomose. Em contraste, o uso de plantas com atividade moluscicida pode representar uma alternativa barata, além de não poluir o meio ambiente^{10,11}.

1.6.6. Toxicidade Frente à *Artemia salina* Leach

O ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*, por ser um ensaio biológico rápido, de baixo custo e simples, tem sido amplamente utilizado e demonstrado uma boa correlação com a atividade antitumoral, sendo então um indicativo de atividade na avaliação preliminar de extratos vegetais e compostos puros¹².

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Gramíneas e *Cenchrus echinatus*

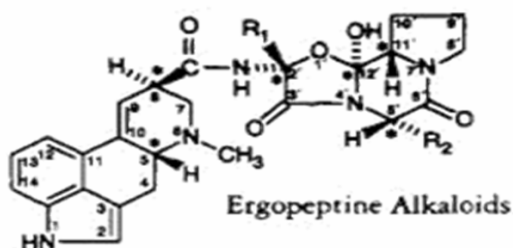
As gramíneas (também conhecidas como gramas, relvas ou capins) são plantas monocotiledôneas (classe Liliopsida) da família Poaceae (anteriormente Graminae). Há 700 gêneros e talvez 12.000 espécies de gramas. Estima-se que pastos e savanas compreendem 20% da vegetação que cobre a terra¹⁴.

A espécie *Cenchrus echinatus* L. é conhecida popularmente, em nossa região, por *capim-carrapicho* e se apresenta como um tipo de gramínea, (inicialmente), que evolui para uma planta com haste longa cujos frutos são cariopses cobertos por espinhos. Essa planta é da mesma família de algumas das espécies mais conhecidas, como: milho (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), arroz (*Oryza sativa*) e cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), por isso são semelhantes em algumas das suas características¹⁴.

A espécie *Cenchrus echinatus* L é uma gramínea altamente competitiva com as culturas em água, nutrientes e luz. É uma espécie infestante em culturas anuais e perenes, além de terrenos baldios e beira de estradas. Também, é uma planta infestante daquelas que mais dificultam as colheitas pelo fato de seus frutos serem espinescentes. Invadem culturas de algodão, amendoim, arroz de sequeiro, café, cana-de-açúcar, feijão, frutíferas, fumo, mandioca, milho, pastagem, soja e sorgo¹⁴. Esta espécie surge também em pastagens onde o pisoteio foi intenso em época adversa e indica campos agrícolas muito decaídos, erodidos e adensados.

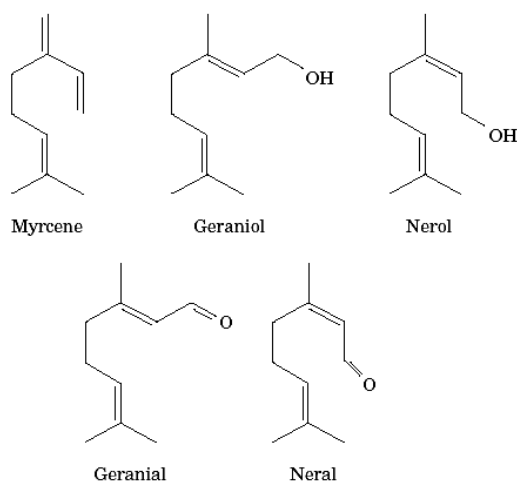
Na medicina Zulu (África), é muito utilizada uma espécie do mesmo gênero (*Cenchrus ciliaris*)¹⁵, para o tratamento de distúrbios menstruais e infecções, principalmente urinária.

Em um estudo das sementes de *Cenchrus echinatus* L. infectada pelo fungo *Balansia Obsecta*, foram isolados novos tipos de alcalóides Ergot¹⁶, cuja estrutura é encontrada abaixo.

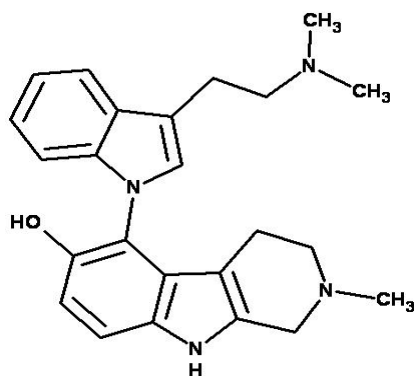


Possivelmente, esses metabólitos foram produzidos em resposta à infecção, porém não se sabe da presença ou não desses metabólitos em plantas não infectadas. Já no estudo das raízes de *Cenchrus echinatus L.*, observou-se que o extrato diclorometânico apresenta grande atividade inibitória na germinação e crescimento da espécie *Panicum maximum* (capim-colonião), evidenciando o efeito alelopático do *Cenchrus* sobre essa espécie¹⁷. Nesse extrato foram identificados, via CG-EM, diversos terpenóides como linalol, trans-geraniol, *trans*- α -bergamoteno, dentre outros¹⁷.

Dentro da família existem diversos relatos de isolamento de várias classes de compostos, onde podemos citar algumas substâncias:

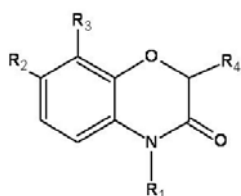


Terpenos isolados da espécie *Cymbopogon citratus*¹⁸.

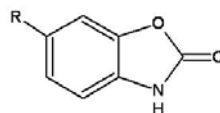


Arundarina, alcalóide bis-indólico, isolado da espécie *Arundo donax L.*¹⁹

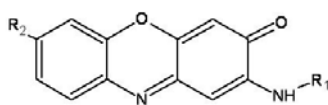
Compostos isolados contendo esqueletos: Benzoxazinona (06), Benzoxazolinona (07), Aminofenoxazina (08), Ácido Malonâmico (09), são responsáveis por atividade alelopática de diversas espécies de gramíneas²⁰.



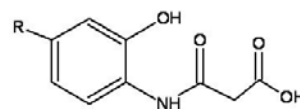
06



07



08



09

Pesquisas de diversas espécies da família Poaceae¹⁴ demonstraram vários tipos de atividades como anti-HIV, antitumoral, antihipertensivo, antiinflamatório e bactericida, dentre outros.

Como não há estudos biológicos e fitoquímico da espécie *Cenchrus echinatus* L., têm-se como objetivos:

- Avaliar o potencial biológico dos extratos brutos, partições e substâncias isoladas do *C. echinatus*.
- Estudar fitoquimicamente a espécie com o intuito de isolar e identificar os compostos bioativos e/ou majoritários da planta.
- Realizar os ensaios que se façam relevantes durante a execução do trabalho.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Instrumentação e material cromatográfico

Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C foram obtidos em um espectrômetro VARIAN, modelo Mercury Plus, operando a 300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C tendo como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram dados em ppm e os solventes utilizados foram CD_3OD , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ e $\text{DMSO-}d_6$. A interpretação dos dados foi auxiliada pelas técnicas de DEPT 135 e 90, HMBC, HMQC, COSY e NOESY.

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados utilizando um cromatógrafo gasoso 14-A (Shimadzu, Japão), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida CP-Sil-88 (100 m, 0,25 mm e 0,25 μm).

A identificação de ácidos graxos foi feita comparando os tempos de retenção relativo dos picos de (EMAG) de amostras com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma), por co-eluição (“spiking”) de padrões juntamente com as amostras. As áreas de picos foram determinadas pelo Integrador-Processador CG-300.

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos em um espectrômetro Q-ToF ESI/MS e ESI-MS/MS utilizando mistura de água/metanol 50% v/v e hidróxido de amônia 0,01% até concentração de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, com vazão de 10 $\mu\text{L/}$ minuto. Os espectros foram adquiridos no modo de íons negativos. O experimento foi realizado no Laboratório Thomson da UNICAMP, sob a responsabilidade do Prof, Dr. Marcos Eberlin.

As cromatografias de exclusão por tamanho, empregadas na separação das substâncias, foram preparadas utilizando colunas de vidro e Sephadex LH20 como fase estacionária.

Para o acompanhamento das cromatografias de exclusão por tamanho foram realizadas cromatografias em camada delgada analítica (CCD), em placas de vidro de 5,0 x 20, 0 cm com espessura da camada de sílica-gel (sílica-gel 60G e 60GF₂₅₄ – 1:1, Merck) de aproximadamente 0,25 mm.

As revelações destas foram obtidas por irradiação com lâmpada de ultravioleta em 254 e 366nm, utilização de solução de $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{MeOH}$ (1:1) e/ou do revelador para terpenos (anisaldeído, MeOH, H_2SO_4 , 1:1:1).

Para o isolamento das substâncias foram realizadas cromatografias em camada delgada preparativa (CCDP), em placas de vidro de 20,0 x 20,0cm com espessura da camada de sílica-gel (sílica-gel 60G e 60GF₂₅₄ – 1:1, Merck) de aproximadamente 0,50 mm. As revelações destas foram obtidas por irradiação com lâmpada de ultravioleta em 254 e 366nm.

3.2. Solventes utilizados

Os solventes utilizados foram hexano P.A. (Chemco), diclorometano P.A.-A.C.S. (Dinâmica, 99,5%), acetato de etila P.A.-A.C.S. (Dinâmica), clorofórmio P.A.-A.C.S. estabilizado com amileno (Nuclear, 99,8%), álcool etílico P.A.-A.C.S. (Dinâmica, 95%), álcool metílico P.A.-A.C.S. (Nuclear, 99,8%), álcool (n) butílico P.A.-A.C.S. (Labsynth, 99,4%) e acetona P.A.-A.C.S. (Labsynth, 99,5%). Estes foram empregados após terem sido previamente evaporados sob pressão reduzida e destilados.

3.3. Coleta e secagem da planta

O material (sementes, raízes, folhas e caules) foi coletado na Fazenda Experimental de Iguatemi, no município de Iguatemi, Paraná. Uma exsicata encontra-se depositado no Herbário NUPÉLIA sob o número HUEM 14425. As sementes e raízes foram secas em estufa de ar circulante à 40° C. Posteriormente, foram moídas, rendendo 1,20 kg de sementes e 0,24 kg de raízes.

As folhas e caules (0,15 kg) foram utilizados *in natura*, sendo os mesmos agrupados como um só material.

3.4. Preparação e particionamento do extrato bruto das sementes

O material seco e moído (1,2 kg de sementes) foi submetido à extração com hexano à frio por maceração – remaceração, resultando, após evaporação, em 10,0 g de extrato bruto hexânico.

Em seguida o mesmo material foi também macerado com metanol, resultando após evaporação em 36,0 g de extrato bruto metanólico das sementes de coloração avermelhada.

O extrato bruto metanólico das sementes foi dissolvido em água e então particionado com 3 X 150 mL de diclorometano, acetato de etila, butanol e o resíduo da partição foi denominado fração aquosa das sementes.

Obteve-se após evaporação 1,1 g da fração diclorometano das sementes, 1,2 g da fração acetato de etila das sementes, 5,5 g da fração butanólica das sementes e 7,2 g da fração aquosa das sementes.

3.5. Preparação e particionamento do extrato bruto das raízes

O material seco e moído (244,0 g de raízes) foi submetido à extração com metanol à frio por maceração – remaceração, resultando, após evaporação, em 2,00 g de extrato bruto metanólico das raízes de coloração avermelhada. O extrato bruto metanólico das raízes foi dissolvido em água e então particionado com 3 X 150 mL de diclorometano, acetato de etila, butanol e o resíduo da partição foi denominado de fração aquosa das raízes.

Obteve-se após evaporação 210,0 mg da fração diclorometano das raízes, 340,0 mg da fração acetato de etila das raízes, 250 mg da fração butanólica das raízes e 350 mg da fração aquosa das raízes.

3.6. Preparação e particionamento do extrato bruto das folhas e caules

O material *in natura* (150,0 g) foi submetido a turbo cisalhamento com metanol à frio, resultando, após evaporação, em 2,00 g de extrato bruto metanólico das folhas e caules. O extrato bruto metanólico das folhas e caules foi dissolvido em água e então particionado com 3 X 100 mL de hexano, acetato de etila, butanol e o resíduo da partição foi denominado fração aquosa das folhas e caules.

3.7. Preparação e fracionamento do extrato alcaloídico das sementes

As sementes moídas (150 g) foram maceradas com solução de ácido cítrico 5% por 48 horas.

O extrato aquoso em pH 2 foi então particionado com 3 X 150 mL de clorofórmio. A fração aquosa foi levada à pH 7 com solução de bicarbonato de sódio 10% sendo novamente particionada com 3 X 150 mL de clorofórmio. Novamente a fração aquosa foi basificada à pH 10 e extraída com 3 X 150 mL de clorofórmio, seguida de 3 X 150 mL de n-butanol.

A partição com clorofórmio em pH 2 (CE-EASC₂) resultou em 71,9 mg de extrato, em pH 7 (CE-EASC₇) 61,7 mg e em pH 10 (CE-EASC₁₀) 61,2 mg de extrato.

A partição com n-butanol em pH 10 (CE-EASB₁₀) resultou em 1 g de extrato.

3.8. Elaboração do perfil cromatográfico dos extratos

Foram averiguados os perfis cromatográficos dos extratos obtidos, utilizando diferentes combinações de solventes por cromatografia em camada delgada. Foi possível constatar a presença de diferentes classes de substâncias nos extratos obtidos utilizando reveladores específicos, como Dragendorff, Anisaldeído 10%, Cloreto férrico, Ácido Sulfúrico/Metanol 1% e luz UV nos comprimentos de onda de 364 e 254 nm. .

3.9. Avaliação da atividade antiinflamatória dos extratos brutos e partições das sementes e raízes

A avaliação das atividades antiinflamatória oral e tópica foi realizada no Departamento de Farmácia e Farmacologia da UEM sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Ciomar A. Bersani Amado.

Para a avaliação da atividade oral, a pleurisia foi induzida em ratos Wistar pela injeção intrapleural de 0,5 mL de uma suspensão de carragenina 1% em solução salina estéril. Grupos de seis ratos foram tratados com os extratos hexânico e metanólico, das sementes e raízes (solubilizados em solução Tween 80, 1/1, V/V), nas doses de 100 e 200 mg/kg e ainda, indometacina (branco) na dose de 10 mg/kg, uma hora antes da

aplicação do agente indutor. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram anestesiados e sacrificados. O exsudato pleural foi coletado, transferido a um tubo cônico de centrífuga, o volume foi determinado e comparado ao volume do exsudato do branco.

Para avaliação da atividade antiinflamatória tópica, os animais (n=9), camundongos Swiss, foram tratados topicamente com os extratos brutos, nas doses de 2,5 (raízes) e 5,0 mg (sementes), e partições na dose de 5,0 mg (solubilizados em acetona/água 1/1, V/V), imediatamente após a aplicação do óleo de cróton (200 mg) na orelha esquerda. A indometacina (Indo), 1 mg, foi utilizada como antiinflamatório de referência (controle positivo) na orelha direita de cada animal. Após 6h os animais foram anestesiados e sacrificados. As massas das orelhas foram determinadas e a porcentagem de inibição calculada.

3.10. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Brutos e Partições das Sementes e Raízes

Os testes antimicrobianos foram realizados no Departamento de Análises Clínicas da UEM, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, de acordo com os procedimentos padrões de microdiluição. Foram testadas as espécies *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*.

3.11. Avaliação da atividade antiproliferativa³¹

3.11.1. Cultura das células

A Avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada no Departamento de Análises Clínicas da UEM, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura.

Células Caco-2 (células de adenocarcinoma intestinal) provenientes do Instituto Nacional de Câncer – RJ (INCa), foram utilizadas para a realização dos experimentos. Elas foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium - Gibco[®]) suplementado com 10% de SFB (soro fetal bovino - Gibco[®]) e 50 µg/ml de

gentamicina. A cultura foi mantida em garrafas plásticas com tampa-rosca e dispositivo para entrada de CO₂ e incubadas a 37°C em estufa úmida com tensão de 5% de CO₂ (Fischer Scientific[®], modelo Isotemp). As células foram observadas em microscópio invertido (Zeiss[®], modelo Axiovert 25), diariamente, e o meio trocado quando o pH apresentou-se ácido.

A fim de promover a manutenção das células de linhagem contínua, estas foram renovadas sempre que houve a formação de uma monocamada de células confluentes. Para isto foi retirado o meio antigo e adicionado PBS - Phosphate Buffered Saline- estéril para “lavar” o tapete celular, removendo assim restos de soro e metabólitos celulares. Foi adicionado solução de tripsina (Gibco[®]) a 37°C por 4 minutos, após o qual foi imediatamente removida. O aspecto das células foi observado em microscópio invertido. Após o descolamento da camada celular, estas foram ressuspensas em DMEM, sendo que 1/6 desta suspensão foi incubada nas mesmas condições iniciais.

3.11.2. Atividade Antiproliferativa³¹

A avaliação da atividade antiproliferativa foi realizada pelo método da Sulforodamina B. Células Caco-2 foram cultivadas em placas de 96 poços, conforme descrito no item anterior. Após a formação da monocamada confluyente, o meio foi retirado e 100 µL das várias concentrações dos extratos foram adicionados em triplicata. Inicialmente foram testados as concentrações de 1000, 500, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 µg/mL.. Também foi realizado o controle de células, onde, não houve adição dos extratos.

A placa foi incubada em estufa úmida a 37°C com tensão de 5% de CO₂ durante 48 h. Em seguida, o meio dos poços foi removido, o tapete lavado com PBS e fixado com ácido tricloroacético à 10% (SYNTH[®]) no volume de 50 µL/poço por 1h sob refrigeração e ao abrigo de luz. A placa foi lavada quatro vezes em água corrente e mantida em temperatura ambiente até secar.

A atividade antiproliferativa foi avaliada pelo método colorimétrico da sulforodamina B em placa de 96 poços, que baseia-se na afinidade do corante sulforodamina B pelas proteínas celulares propiciando uma avaliação colorimétrica diretamente proporcional ao número de células viáveis. Em cada poço foram

adicionados 50 µL de uma solução 4% de sulforodamina B (Sigma®) em ácido acético 1%, a placa foi então incubada novamente por 30 min sob refrigeração e ao abrigo da luz. O corante foi retirado e a placa lavada quatro vezes com ácido acético glacial à 1% para remoção do corante em excesso. O corante ligado às células viáveis foi dissolvido em 150 µL de solução Tris-base 10mM. A absorbância foi determinada em leitor de ELISA (Bio-Tek®, modelo Power Wave XS) em 530 nm.

Posterior a leitura, foi realizado cálculos para determinar as concentrações dos extratos capazes de destruir 50% da monocamada celular (IC₅₀).

3.12. Avaliação da atividade antioxidante dos extratos brutos e partições

Uma alíquota dos extratos e partições, foi solubilizada em metanol obtendo-se uma solução estoque de concentração final de 2,0 mg/mL. Diferentes volumes da solução estoque (25 uL à 1000uL), foram acondicionadas com 2 mL de solução de DPPH (0,03 mM) gerando diferentes concentrações (25-1000 µg/mL). Após o tempo de reação de 30 min a absorbância foi lida em 515,5 nm e convertida em porcentagem da atividade antioxidante (AA) usando a seguinte fórmula:

$$AA\% = 100 - \{[(Abs_{amostra} - Abs_{controle}) \times 100] / Abs_{controle}\}$$

Um controle foi feito com 2 mL de DPPH (controle negativo). Os testes foram feitos em triplicata. Os valores das IC₅₀ foram calculados por regressão linear e plotados em gráfico onde a abscissa representa a concentração do extrato testado e a ordenada à proporção da porcentagem da atividade antioxidante.

Análise estatística: Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (DP).

3.13. Avaliação da toxicidade frente à *Artemia salina*

Uma alíquota dos extratos foi solubilizada em 2 mL de metanol obtendo uma solução estoque de concentração final de 10,0 mg/mL. Diferentes volumes da solução estoque (20, 100, 500 uL) foram evaporadas e diluídas em 5 mL de água e 50 µL de

DMSO, gerando concentrações de 40, 200 e 1000 ug/mL.

Após a eclosão dos ovos de *Artemia* (48 horas), acerca de 15 espécimes foram introduzidas nas soluções que, posteriormente, ficaram em repouso por 24 horas até a contagem de indivíduos mortos. Foi realizado o branco nas mesmas condições. Os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (DP) da porcentagem de mortos. Os valores das IC₅₀ foram calculados por regressão linear e plotados em gráfico onde a abscissa representa a concentração do extrato testado e a ordenada à proporção da porcentagem de indivíduos mortos.

Não foi realizado esse ensaio para os extratos das folhas e caules por falta de substrato.

3.14. Avaliação da atividade moluscicida

O ensaio de avaliação de atividade moluscicida foi realizado sob a responsabilidade do Pro^a. Dr^a. Maria Lucília Zamuner, do Departamento de Farmácia da Universidade Estadual de Maringá.

Uma alíquota do extrato bruto metanólico das sementes e das frações diclorometano, acetato de etila, butanólica e aquosa das sementes, foi dissolvida em água do próprio aquário, gerando concentrações de 500 e 1000 ppm. Foram utilizados 5 caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* com diâmetro da concha entre 15 e 20 mm para cada ensaio. Os caramujos foram colocados em contatos com as soluções por 24 e 48 horas. Após cada período fez-se a leitura dos batimentos cardíacos dos caramujos para evidenciar ou não a morte dos espécimes.

3.15. Teor de ácidos graxos das sementes, folhas e caules

Foi realizada análise de lipídios totais pelo método Bligh e Dyer²¹. Os ácidos graxos foram esterificados com metanol segundo o procedimento de Hartman & Lago²². A amostra esterificada foi mantida em repouso na geladeira até a separação das fases. O sobrenadante foi recolhido e transferido para frasco de âmbar, armazenados a 18°C até a posterior análise cromatográfica.

Os ésteres de ácidos graxos foram analisados utilizando um cromatógrafo gasoso 14-A (Shimadzu, Japão), equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar de sílica fundida CP-Sil-88 (100 m, 0.25 mm e 0,25 μm). Foi programada temperatura de coluna a $2^\circ\text{C}/\text{min}$ de 180°C a 240°C , enquanto que a temperatura do injetor e do detector foi mantido a 220°C e 245°C , respectivamente. Os fluxos dos gases, foram de $1,4\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o gás de arraste (H_2); $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o make-up (N_2) e $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $300\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ para o H_2 e para o ar sintético da chama, respectivamente. A razão de divisão da amostra (split) foi de 1/100. A identificação de ácidos graxos foi feita comparando os tempos de retenção relativo dos picos das amostras com padrões de ésteres metílicos de ácidos graxos (Sigma), por co-eluição dos padrões juntamente com as amostras.

3.16. Análise centesimal das sementes e folhas¹⁰

3.16.1. Teor de umidade e cinzas¹⁰

Foram pesados, aproximadamente 2,0g de amostra, em cadinho de porcelana previamente tarados em mufla. O teor de umidade foi determinado em estufa a 105°C por 4 horas. Após este tempo, os cadinhos foram transferidos para um dessecador e resfriados a temperatura ambiente, esta operação foi repetida até peso constante; a umidade foi determinada por gravimetria. Em seguida, os cadinhos foram colocados em uma mufla a 600°C por 6 horas. Após, foram colocados em dessecador e resfriados à temperatura ambiente. Fez-se a pesagem e, por gravimetria, o teor de cinza foi determinado nas amostras.

3.16.2. Proteína bruta¹⁰

A análise do teor de proteína bruta foi realizada pelo processo semi micro Kjeldahl. Este método consiste das seguintes etapas: digestão das amostras (nitrogênio total é transformado em amônia e os componentes orgânicos são convertidos em gás carbônico e água), neutralização/destilação (amônia é separada e recolhida em uma solução receptora) e a titulação (determinação quantitativa da amônia contida na

solução receptora). Foram pesados 0,2g de amostra e transferidos para tubos de digestão, foram adicionados aproximadamente 2,0g de mistura catalítica composta por Na₂SO₄ anidro + CuSO₄.5H₂O + Se metálico em pó (100:1:0,8, respectivamente) e 10,0 mL de H₂SO₄ (conc). Em seguida, os tubos foram levados ao bloco digestor para digestão da amostra. Em seguida realizou-se a destilação em destilador semi-automático através da reação com hidróxido de sódio 40%, todo nitrogênio contido na amostra foi convertido em amônia, que foi coletada em erlenmeyer contendo solução de ácido bórico 4% e indicador (mistura de verde de bromocresol e vermelho de metila). A solução resultante foi titulada com ácido clorídrico 0,1 mol.L⁻¹ padrão. A quantidade de nitrogênio total da amostra foi obtida através da seguinte equação:

$$\%N = \frac{V.Mol / L.f.14.100}{m}$$

onde:

$\%N$ = porcentagem de nitrogênio total da amostra;

V = Volume de HCl gasto na titulação ;

Mol/L = concentração da solução padrão de HCl;

f = Fator de correção do padrão;

m = massa da amostra (mg).

O fator de conversão de nitrogênio total para proteína bruta foi 6,25 e o teor de proteína bruta na amostra foi obtido pela seguinte equação:

$$\%PB = \%N \times FE$$

onde: $\%PB$ = porcentagem de proteína bruta contida na amostra;

FE = Fator específico (6,25).

3.17. Isolamento de CE-01 e CE-02

Uma alíquota (35,0 mg) da fração acetato de etila das raízes foi solubilizada em metanol e submetida à CCDP por três vezes seguidas em diclorometano/acetato de etila

40%. Foram coletadas duas faixas com o auxílio de luz ultravioleta. Verificou-se que haviam outras faixas, mas não foi possível efetuar a coleta destas devido à proximidade das mesmas. A substância CE-01 (6,0 mg), na forma sólida de coloração marrom avermelhada foi coletada em Rf de 0,6 e a substância CE-02 (5,7 mg), na forma sólida também de coloração marrom avermelhada, foi coletada em Rf de 0,38 sendo as duas desorvidas com metanol. O Rf considerado foi em relação à última corrida cromatográfica. As substâncias isoladas foram enviadas para análises de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

3.18. Isolamento de CE-03 e CE-04

Uma alíquota (200,0 mg) da fração acetato de etila da sementes foi solubilizada em metanol e submetida à filtração em coluna Sefadex – LH 20, utilizando metanol como solvente. Foram coletadas 40 frações de 25 mL cada, que foram agrupadas depois de análise por CCD em acetato de etila puro. As frações agrupadas de 20 – 40 foram submetidas à CCDP por três vezes seguidas em diclorometano/acetato de etila 40%. Foram coletadas quatro faixas com o auxílio de luz ultravioleta. Foi observado que haviam outras faixas, mas não foi possível efetuar a coleta destas devido à proximidade das mesmas. A substância CE-03 (3,0 mg) foi coletada em Rf de 0,52 e a substância CE-04 (10,0 mg) foi coletada em Rf de 0,2 sendo as duas desorvidas com metanol. Ambas as substâncias apresentavam-se na forma sólida de coloração marrom avermelhado. As outras duas frações também foram coletadas, mas não estavam puras e não foi possível realizar outra separação devido à pequena massa encontrada. O Rf considerado foi em relação à última corrida cromatográfica. As substâncias isoladas foram enviadas para análises de RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extratos e perfis cromatográficos

Os extratos foram preparados e foi observada uma coloração vermelho intenso para os extratos metanólico das raízes e sementes. Essa coloração pode ser devido à presença de antocianinas, que são responsáveis pela coloração rosa, laranja, escarlate, violeta e azul em flores, frutos, folhas e raízes de algumas plantas²³. Essa coloração também pode ser devido à presença de estilbenóides, como ocorre mais frequentemente em algumas espécies de uvas. As substâncias isoladas do *C. echinatus* apresentaram coloração marrom avermelhada, e foram identificadas como estilbenóides derivados do resveratrol, também isoladas das espécies *Vitis amurensis* e *Kobresia nepalensis*^{27,30}.

No caso do *C. echinatus*, essa coloração é observada na folhas e nos cariopses. Dependendo do grau de maturação da planta, há maior produção desses compostos, que têm importante papel na proteção e polinização de algumas espécies. As antocianinas e os estilbenóides também são responsáveis pela atividade inibidora do crescimento de larvas de alguns insetos²³. As aplicações para esses compostos vão desde aditivos eficazes e seguros na indústria alimentar, como conservantes, até utilização como fármaco, resultante de suas atividades antiinflamatórias e antiedematogênicas²³.

Os perfis cromatográficos dos extratos foram averiguados através de técnicas de CCD, resultando em misturas de solventes como hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Os compostos que anteriormente eram revelados com o reagente de Dragendorff e anisaldeído 10%, eram misturas de ácidos graxos em quantidade significativa, por isso foi realizado o ensaio de teor de ácidos graxos das sementes. Com isso, o ensaio de obtenção de alcalóides através do extrato alcaloídico não forneceu resultado positivo.

4.2. Avaliação da atividade antiinflamatória

A avaliação de atividade antiinflamatória via oral demonstrou que os extratos não são ativos. Já o ensaio de atividade antiinflamatório tópico indica que os extratos das raízes e das sementes possuem boa atividade quando comparado ao controle com

indometacina, que é um antiinflamatório potente, isso pode ser visto na **Figura 1** e **Tabela 1**.

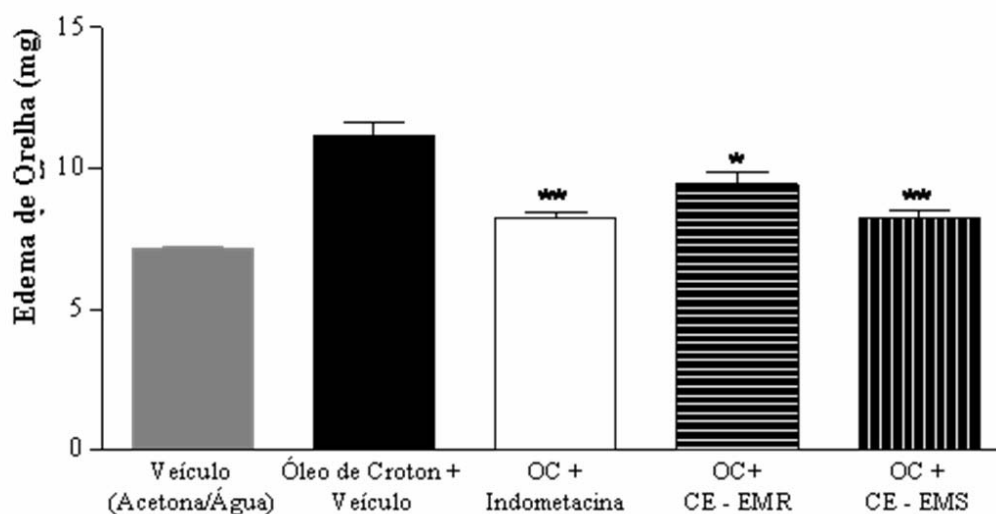
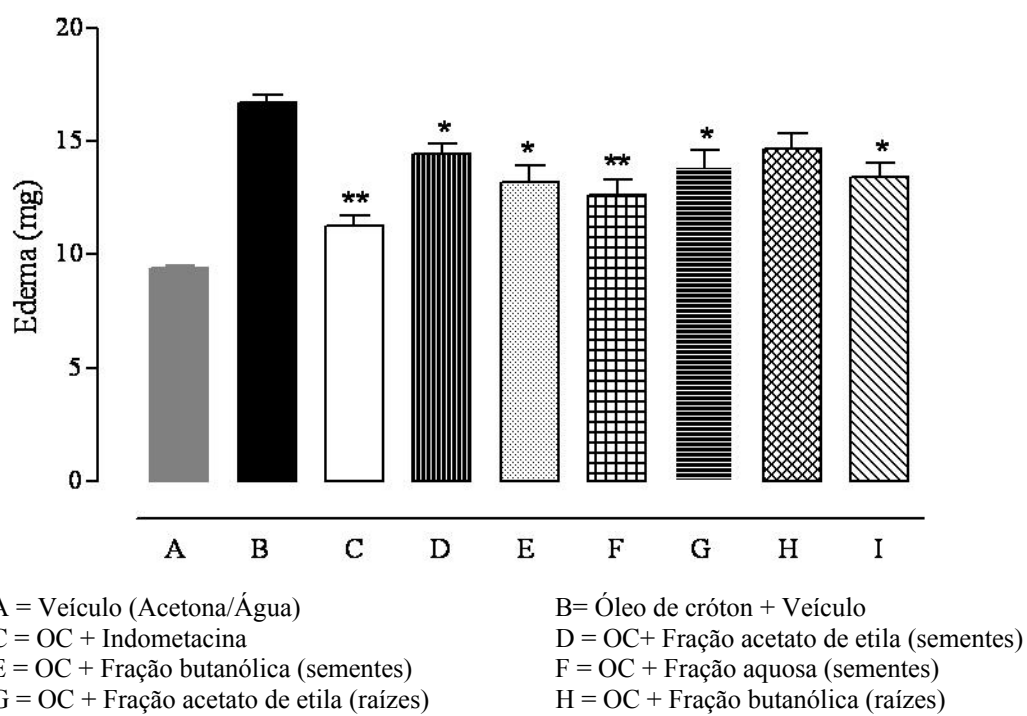


Figura 1. Efeito dos extratos brutos metanólico das raízes (CE-EMR) e das sementes (CE-EMS) de *Cenchrus echinatus* sobre o edema de orelha induzido pelo óleo de cróton (OC). Animais que receberam apenas veículo acetona/água (V).

Tabela 1. Porcentagem de inibição do edema de orelha induzido pelo óleo de Cróton (OC) (200 µg)

Extratos/Frações	Dose (mg/orelha)	Inibição (%)
OC	-	-
OC+ Indometacina	1,0	74
OC + Extrato bruto metanólico (raízes)	2,5	46
OC + Fração acetato de etila (raízes)		39
OC + Fração Butanólica (raízes)	5,0	30
OC + Fração aquosa (raízes)		45
OC + Extrato bruto metanólico (sementes)		74
OC + Fração acetato de etila (sementes)		25
OC + Fração Butanólica (sementes)	5,0	48
OC + Fração aquosa (sementes)		55

Com base nos resultados obtidos todas as frações reduziram significativamente a evolução da inflamação (**Figura 2** e **Tabela 1**).



A = Veículo (Acetona/Água)
 B = Óleo de cróton + Veículo
 C = OC + Indometacina
 D = OC + Fração acetato de etila (sementes)
 E = OC + Fração butanólica (sementes)
 F = OC + Fração aquosa (sementes)
 G = OC + Fração acetato de etila (raízes)
 H = OC + Fração butanólica (raízes)
 I = OC + Fração aquosa raízes
 * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$, comparado com o grupo controle (ANOVA, Tukey's test).

Figura 2. Efeito antiinflamatório tópico das frações de *Cenchrus echinatus L.*

Os extratos brutos das sementes e raízes de *C. echinatus* possuem atividade antiinflamatória significativa, sendo que o extrato bruto das sementes, na dose testada, teve a mesma atividade que o controle indometacina, evidenciando o seu alto poder antiinflamatório. Para o extrato bruto das raízes, não foi possível realizar o teste utilizando 5,0 mg do extrato, uma vez que este não foi totalmente solúvel no solvente utilizado por este modelo experimental, mesmo assim a atividade desse extrato foi significativa.

Após o fracionamento dos extratos brutos pôde-se perceber que há uma diminuição da atividade, quando comparados aos extratos de onde estes provêm, isso pode ser devido ao efeito sinérgico, onde se têm várias substâncias agindo em conjunto, isso eleva o potencial biológico do extrato bruto. Quando o extrato bruto foi fracionado a atividade antiinflamatória diminuiu, porém, mesmo com a diminuição da atividade, todas as frações se mantiveram significativamente ativas, e apresentaram atividades estatisticamente equivalentes.

Quando comparamos as atividades das frações acetato de etila das raízes e sementes, e ainda, as frações butanólica das raízes e sementes, percebemos que há uma inversão de potencial antiinflamatório. Isso pode estar relacionado às diferentes

concentrações de substâncias ativas nessas partes da planta, que pode ser influenciada pela época de coleta da mesma. Dependendo da estação do ano em que a planta é coletada pode-se ter diferença na biossíntese dessas substâncias que poderiam estar em estágios diferentes de formação e agindo de maneira diferente para proteção ou crescimento da planta.

4.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os extratos não apresentaram atividade contra as espécies testadas com exceção à *Bacillus subtilis*, onde o extrato hexânico apresentou uma leve atividade com CMI (concentração mínima inibitória) de 500 µg/mL. Os demais extratos apresentaram CMI maiores que 1000 µg/mL.

4.4. Composição de Ácidos Graxos e Análise Centesimal

As **Tabelas 02 e 03** indicam a composição dos ácidos graxos presentes nas sementes e folhas de *C. echinatus*. De acordo com os resultados obtidos e a comparação com os valores descritos na literatura²⁴, percebe-se que, mesmo não sendo uma semente com característica oleaginosa, existe uma boa correlação quando comparamos os teores de ácidos graxos obtidos com as das principais sementes utilizadas para obtenção de óleos (**Tabela 04**). Apesar de apresentar apenas 3% de gordura total em relação ao peso das sementes (300 mg de gordura em 10 g de sementes), o teor de ácidos graxos presentes na mesma são significativos. Pela comparação entre as **Tabelas 2 e 3** percebemos que existem ácidos graxos em comum entre as sementes e folhas. A quantidade de ácido graxo ômega 3 nas folhas é maior do que na semente, isso faz com que a razão ômega 6 / ômega 3 para as folhas seja bem menor. A análise dos somatórios obtidos mostra uma boa razão entre ácidos graxos poliinsaturados / saturados (AGPI/AGS), tanto nas sementes como nas folhas, evidenciando a existência de quantidades significativas de ácidos poliinsaturados em ambas as partes da planta.

Tabela 2. Composição e somatórios de ácidos graxos na semente de *Cenchrus echinatus L.*

Ácidos Graxos	média±dp (%)	Ácidos Graxos	média±dp (%)
14:0	0,159±0,01	22:0	0,631±0,15
14:1n-2	0,102±0,00	Y	0,202±0,04
15:1n-7	0,178±0,04	24:0	1,117±0,31
16:0	19,158±0,85	Z	0,994±0,24
16:1n-7	1,158±0,05	W	0,422±0,14
17:0	0,143±0,00	Somatórios e Razões	média±dp (%)
17:1n-9	0,103±0,01	AGPI	44,960±0,09
18:0	2,062±0,04	AGMI	29,073±0,22
18:1n-9	27,533±0,14	AGS	24,079±0,33
18:2n-6	42,814±0,06	Ni	1,889±0,43
18:3n-6	0,110±0,01	n-6	42,923±0,06
20:0	0,809±0,06	n-3	2,036±0,04
18:3n-3	2,036±0,04	AGPI/AGS	1,867±0,03
X	0,270±0,04	n-6/n-3	21,083±0,38

Tabela 3. Composição e somatórios de ácidos graxos na folha de *Cenchrus echinatus L.*

Ácidos Graxos	Média ± dp (%)	Ácidos Graxos	Média ± dp (%)
10:00	1,43 ± 0,45	22:00	1,82 ± 0,30
11:00	2,30 ± 0,14	24:00	2,48 ± 0,45
12:00	3,51 ± 0,13		
14:01	2,27 ± 0,27	Somatório e Razões	
15:00	2,91 ± 0,44	AGPI	42,00 ± 0,98
15:01	4,32 ± 0,27	AGS	45,32 ± 0,20
16:00	26,98 ± 1,21	AGMI	12,61 ± 1,07
18:00	3,99 ± 0,67	n-3	28,19 ± 0,62
18:1n-9	5,49 ± 0,45	n-6	13,82 ± 0,92
18:2n-6	14,33 ± 0,24	AGPI/AGS	0,93 ± 0,09
18:3n-3	28,17 ± 0,88	n-6/n-3	0,49 ± 0,44

Os valores são médias ± dp (desvio padrão) de análises em triplicatas. As somatórias são de ácidos graxos: AGS (saturados); AGMI (monoinsaturados) AGPI (poliinsaturados); n-3 (ômega-3); n-6 (ômega-6); Ni (ácidos graxos não identificados). As razões são entre as somatórias dos grupos: ômega-6/ômega-3 (n-6/n-3) e ácidos graxos poliinsaturados/saturados (AGPI/AGS).

Tabela 4. Comparação da composição de alguns ácidos graxos de *Cenchrus echinatus* com outras oleaginosas²⁴.

	16:1	18:0	20:0	22:0	24:0	18:1	22:1	18:2	18:3
Milho	11,67	1,85	0,24	0,00	0,00	25,16	0,00	60,60	0,48
Algodão	28,33	0,89	0,00	0,00	0,00	13,27	0,00	57,51	0,00
Amendoim	11,38	2,39	1,32	2,52	1,23	48,28	0,00	31,95	0,93
Crambe	20,7	0,70	2,09	1,12	18,86	58,51	9,00	6,85	0,36
Canola	3,49	0,85	0,00	0,00	0,00	64,4	0,00	22,30	8,23
Soja	11,75	3,15	0,00	0,00	0,00	23,26	0,00	55,53	6,31
Girassol	6,08	3,26	0,00	0,00	0,00	16,93	0,00	73,73	0,00
Cenchrus Sementes	1,158	2,062	0,809	0,631	1,117	27,533	0,00	42,814	2,036
Cenchrus Folhas	0,00	3,99	0,00	1,82	2,48	5,49	0,00	14,33	28,17

*Valores em %.

Observando os resultados da análise centesimal (**Tabela 5**) temos que as sementes de *C. echinatus* apresentaram uma quantidade relativamente pequena de proteína bruta e uma grande quantidade de cinzas, o que indica alta concentração de minerais. Em contrapartida, as folhas e caules de *C. echinatus* apresentaram grande quantidade de cinzas e de proteína bruta. O teor mínimo de proteína bruta necessário para a manutenção de bovinos adultos¹³ é de 8,60 %, dessa forma, as folhas e caules de *C. echinatus* possuem quantidade de proteína acima da média para uma planta forrageira e, se utilizada adequadamente pode ser promissora na alimentação de bovinos e caprinos.

Tabela 5: Resultados da Análise Centesimal do *C. echinatus*

	Composição Centesimal			
	semente		Folhas e caules	
	Média (%)	Desvio (%)	Média (%)	Desvio (%)
Umidade	9,10	0,13	14,69	0,38
Cinzas	11,75	0,12	8,84	0,4
Proteínas	3,22	0,25	21,78	1,47

4.5. Avaliação da atividade antioxidante

Na **Tabela 6** encontram-se os valores de IC₅₀ para os ensaios de atividade antioxidante.

Tabela 6. Resultados para a atividade antioxidante (IC₅₀).

Extratos	IC ₅₀ (ppm)
Extrato bruto metanólico (raízes)	150,7 ± 3,4
Fração butanólica (raízes)	94,5 ± 1,7
Fração aquosa (raízes)	>500
Extrato bruto metanólico (folhas)	489,7 ± 6,2
Fração acetato de etila (folhas)	151,8 ± 5,1
Fração butanólica (folhas)	206,2 ± 3,1
Fração aquosa (folhas)	279,5 ± 7,5
Extrato bruto metanólico (sementes)	207,2 ± 5,5
Extrato bruto hexânico (sementes)	> 1000
Fração diclorometano (sementes)	49,3 ± 1,3
Fração acetato de etila (sementes)	53,6 ± 2,1
Fração butanólica (sementes)	49,8 ± 2,2
Fração aquosa (sementes)	105,0 ± 1,7

*IC₅₀. Concentração inibitória mínima

* Não foi realizado o teste para a fração acetato das raízes por falta de substrato.

Com base nos resultados obtidos para o ensaio de atividade antioxidante percebe-se que essa espécie possui atividade significativa, quando comparado ao controle positivo BHT, cujo IC₅₀ encontrado foi de 16 ppm. As frações de média polaridade, Diclorometano, acetato de etila e butanólica das sementes, apresentaram maiores potenciais antioxidantes.

4.6. Avaliação da Atividade contra *Artemia salina*

Na **Tabela 7** encontram-se os valores de DL₅₀, para o ensaio de toxicidade frente à *Artemia salina*.

Tabela 7. Resultados para toxicidade frente à *A. salina* (DL₅₀).

Extratos	DL ₅₀ (ppm) ± D. Padrão
Hexânico Sementes	26,7 ± 0
Metanólico Sementes	30 ± 0
Diclorometano Sementes	25,8 ± 6,3
Acetato de Etila Sementes	25,6 ± 1,4
Butanólica Sementes	25,3 ± 4,8
Hexânico das Raízes	26,66 ± 5,3
Metanólico das Raízes	28,22 ± 3,8

*DL₅₀. Concentração mínima que causa a morte de 50 % dos náuplios

Pelos dados obtidos observamos que os extratos e partições possuem alta toxicidade frente à *Artemia salina*, devido aos baixos valores de DL₅₀, uma vez que são considerados ativos extratos que apresentam DL₅₀ < 1000 ppm¹².

O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* vem sendo correlacionado com algumas atividades biológicas importantes, como a atividade antiproliferativa por exemplo¹². Quando um extrato tem alta toxicidade (baixo DL₅₀), maiores são as chances de este possuir atividades específicas¹².

4.7. Avaliação da atividade antiproliferativa

Pela análise dos resultados obtidos para o teste antiproliferativo, que compõem a **Tabela 8**, percebemos que a fração acetato de etila e as substâncias CE-02 e CE-04 apresentaram IC₅₀ próximas, indicando atividades parecidas. A substância CE-01 também possui atividade, porém menor que os outros substratos testados, enquanto que a fração butanólica não exerceu qualquer atividade dentro das concentrações testadas.

Tabela 8. Resultados para o teste antiproliferativo

Substratos	IC ₅₀ (µg/mL) ±DP
Fração Butanólica	> 800 ± 0
Fração Acetato de Etila	123,4 ± 32,2
CE-01	306,0 ± 79,8
CE-02	147,7 ± 32,6
CE-04	172,0 ± 0

Mesmo com os resultados positivos para alguns dos substratos testados, a atividade demonstrada é relativamente baixa, uma vez que são considerados ativos, extratos que exibem IC₅₀ < 100 µg/mL^{25,31}. Contudo, devemos lembrar que os substratos utilizados não foram ativos eficazmente contra as células testadas, mas isso não pode ser estendido para os outros tipos de células, uma vez que o mecanismo de ação depende da tipagem celular utilizada²⁵. Com os resultados obtidos percebemos que os substratos possuem atividade citotóxica, o que condiz com o resultado positivo para o teste contra a *A. salina*, uma vez que estes dois ensaios vêm sendo correlacionados¹².

As soluções estoques preparadas para a realização do ensaio foram reservadas em congelador, e após determinado tempo a atividade antiproliferativa foi reavaliada, e os resultados são encontrados na **Tabela 9**.

Tabela 9. Resultados para o teste antiproliferativo em tempos determinados.

Substratos	Dias	IC ₅₀ (µg/mL)			
		0	20	35	60
Fração Butanólica		> 800 ± 0	>1000	>1000	>1000
Fração Acetato de Etila			331,3	Não foi realizado	Não foi realizado
CE-01		123,4 ± 32,2	750	1000	>1000
CE-02		306,0 ± 79,8	212	300	Não foi realizado
CE-04		147,7 ± 32,6	850	>1000	>1000
		172,0 ± 0			

Conforme visualizado na **Tabela 9** percebemos que os extratos, assim como as substâncias puras, perdem a atividade quando armazenadas em solução, mesmo que congeladas, mas quando armazenados secos e em geladeira, a atividade se mantém. Então, além do processo de degradação natural dos compostos, o armazenamento na solução requerida para esse experimento, acelera o processo e, conseqüentemente, os compostos perdem a atividade.

4.8. Avaliação da atividade moluscicida

A avaliação de atividade contra a espécie *Biomphalaria glabrata* demonstrou que os extratos não possuem atividade, uma vez que não houve mortes dos caramujos nem diminuição dos batimentos cardíacos.

4.9. Identificação de CE-01

A estrutura de CE-01 foi elucidada com base nos dados espectroscópicos uni e bidimensionais de ¹H e ¹³C, **Tabela 10**, e dados de espectrometria de massas.

Tabela 10. Dados de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, HMQC, HMBC, COSY e NOESY (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) para o composto CE-01.

	δ_{C} (DEPT)	HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ H: δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$, nº de H)	HMBC - $^2\text{J}_{\text{H-C}}$ e $^3\text{J}_{\text{H-C}}$	COSY - $^1\text{J}_{\text{H-H}}$	NOESY
1,1'	150,8 (C)	-	-	-	-
2,2'	103,3 (CH)	6,52 (d, 1,8; 2H)	3, 4, 6, 7	4	7, 8, 10
3,3'	159,3 (C)	-	-	-	-
4,4'	102,5(CH)	6,10 (d, 1,8; 2H)	2, 3, 6	2	-
5,5'	155,3 (C)	-	-	-	-
6,6'	123,8 (C)	-	-	-	-
7,7'	61,0 (CH)	3,72 (s, 2H)	1, 2, 6, 9	8	2, 10
8,8'	54,7 (CH)	4,46 (s, 2H)	1, 6, 7, 9, 10, 14	7	10, 2
9,9'	138,4 (C)	-	-	-	-
10,10',14,14'	129,2 (CH)	6,92 (d, 8,7; 4H)	8, 12, 14	11	8, 7, 2
11,11',13,13'	116,0 (CH)	6,64 (d, 8,7; 4H)	9, 12, 13	10	-
12,12'	156,3 (C)	-	-	-	-
OH	-	-	-	-	-

Pela comparação com dados da literatura^{26,27} a substância CE-01 foi identificada como palidol de formula molecular $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{O}_6$, cuja estrutura encontra-se na **Figura 3**.

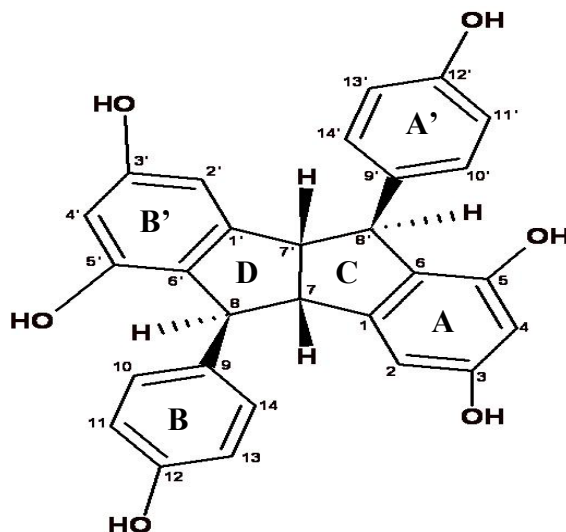


Figura 3. Palidol

No espectro de hidrogênio, se observa dois dubletos em δ_{H} 6,92 e 6,64, respectivamente, com $J = 8,7 \text{ Hz}$, relativos aos 8 hidrogênios 11, 13, 10, 14, 11', 13', 10' e 14' dos anéis A' e B (**Figura 4**). Observa-se ainda dois dubletos em δ_{H} 6,52 e

6,10, respectivamente, com $J = 1,8$ Hz, relativos aos 4 hidrogênios 2, 4, 2', 4' dos anéis A e B' (**Figura 4**).

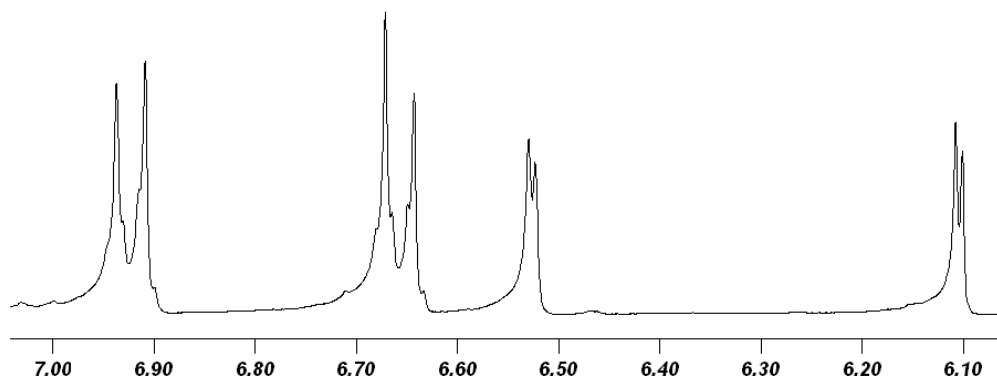


Figura 4. Expansão dos hidrogênios dos anéis A, A' e B, B'.

Os hidrogênios dos carbonos saturados 8, 8' e 7, 7' foram observados na forma de singletos largos com deslocamentos químico de δ_H 4,46 e 3,72, respectivamente, (**Figura 5**). Não foi observado o acoplamento efetivo entre os hidrogênios 7, 8 ou 7', 8'. A explicação para esse fato é devido ao ângulo entre eles ser próximo a 90° , com isso o acoplamento é muito pequeno e não foi observado, essa é uma das características da estrutura do palidol^{26,27}, que é um estilbenóide com duas unidades do resveratrol.

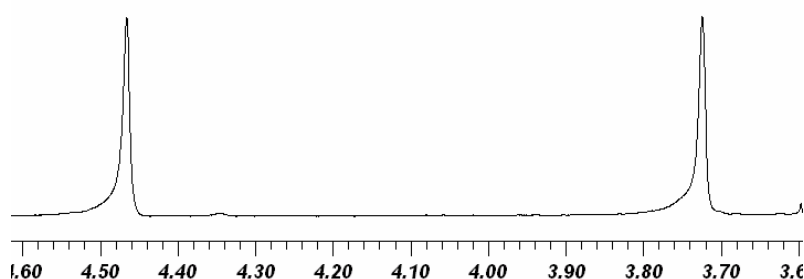


Figura 5. Expansão dos hidrogênios dos carbonos saturados.

A substância isolada possui simetria, portanto aparece apenas um sinal para os hidrogênios e carbonos quimicamente equivalentes e a razão dos valores das integrações dos sinais no espectro de hidrogênio é 4 para 2, isso pode ser visualizado na **Figura 6**.

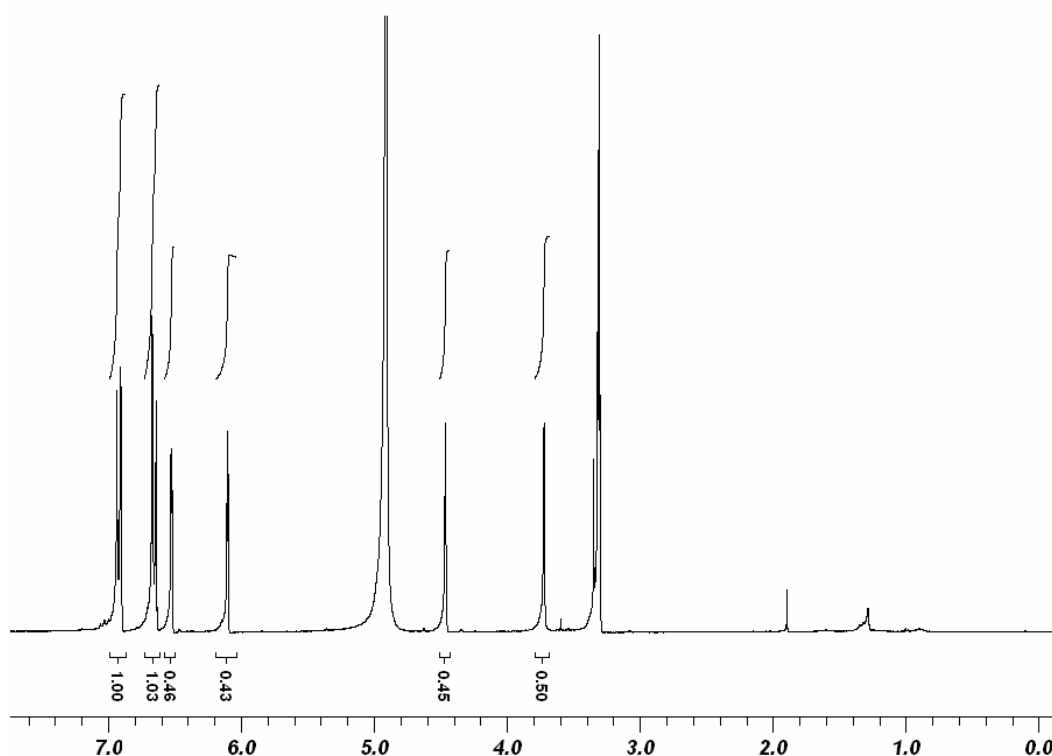


Figura 6. Espectro de RMN de ^1H de CE-01.

No espectro de ^{13}C foram observados os sinais de carbonos monohidrogenados insaturados entre δ_{C} 100 e 130, característicos dos anéis aromáticos, os sinais entre δ_{C} 150 e 160 dos carbonos não hidrogenados substituídos pelas hidroxilas, e os carbonos monohidrogenados saturados entre δ_{C} 54 e 62, que formam a junção dos anéis ciclopenteno aos anéis aromáticos substituídos, provenientes das duas unidades do resveratrol (**Figura 7**).

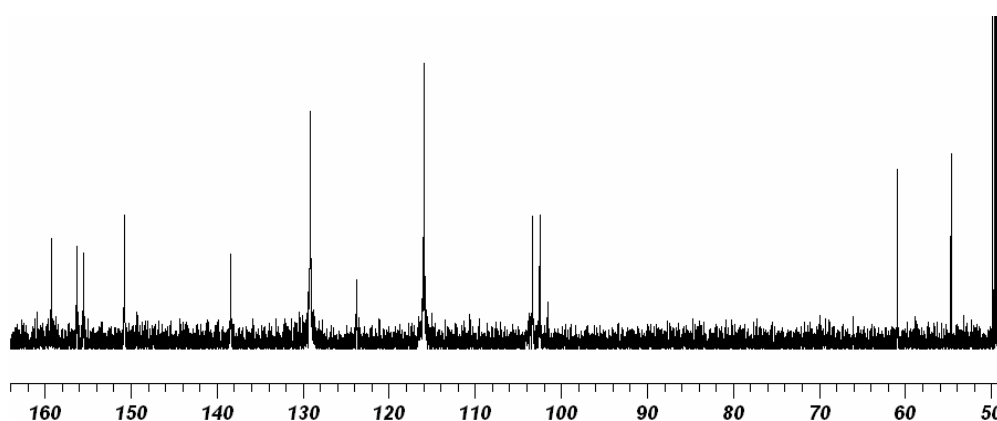


Figura 7: Espectro de RMN de ^{13}C para CE-01.

Através dos dados de DEPT de CE-01, **E R DEPT-1 - Anexo**, confirmamos a presença de apenas carbonos mono e não hidrogenados na molécula.

Pelo mapa de contornos NOESY, **E R NOESY-1 - Anexo** e **Figura 8**, foi observado que os hidrogênios 7 e 7' estão no mesmo plano dos anéis aromáticos *para-substituídos* (anéis A' e B), comprovado pela correlação entre os hidrogênios 7, 7' com os hidrogênios 10, 10' e 14, 14'. Dessa forma há a junção dos anéis ciclopenteno (C e D) onde os hidrogênios idênticos 7 e 7' estão na configuração cis (**Figura 9**), confirmando que a substância isolada é palidol.

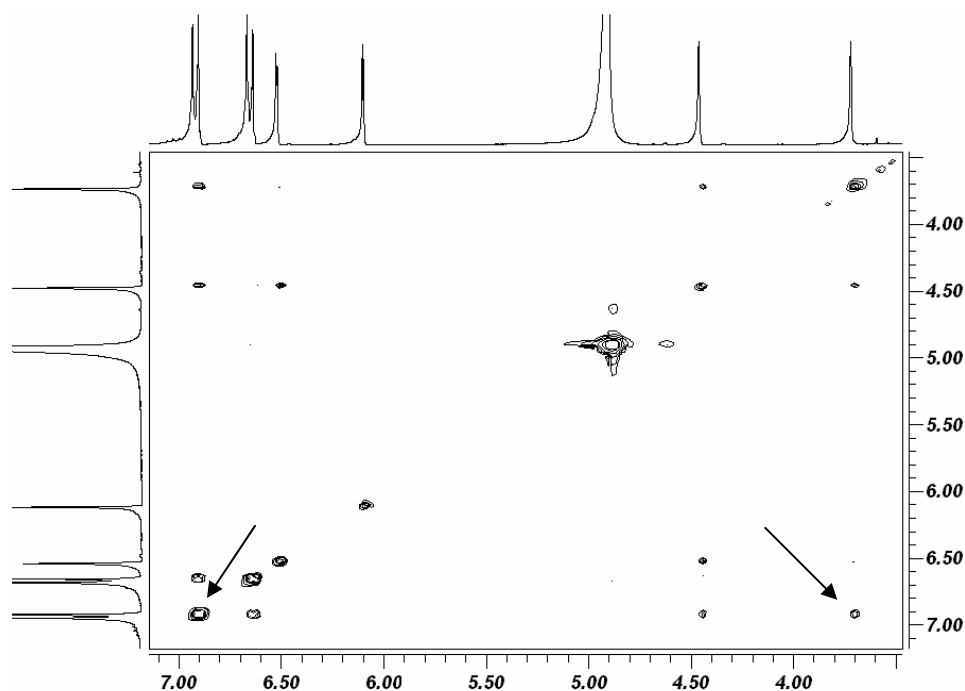


Figura 8. Mapa de contornos NOESY para CE-01

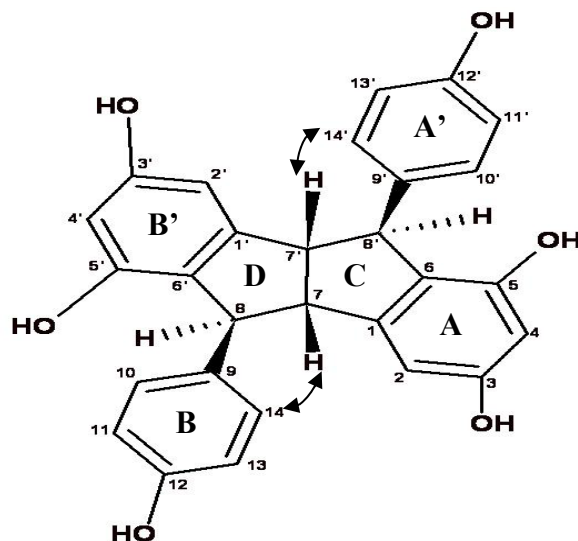


Figura 9. Correlação através de NOE entre os hidrogênios dos anéis ciclopenteno.

Os dados do mapa de contornos HMBC, **E R HMBC-1 - Anexo**, também condizem com a estrutura proposta, principalmente pelas correlações dos hidrogênios 7, 7' e 8, 8'. Algumas correlações podem ser visualizadas nas **Figuras 10 e 11**.

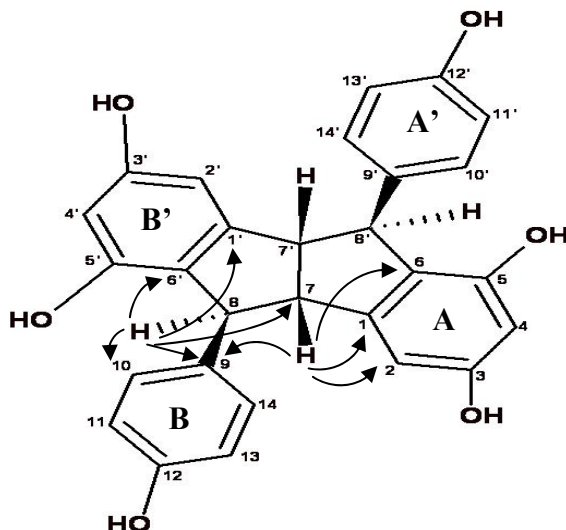


Figura 10. Algumas correlações de HMBC dos hidrogênios de junção de anel

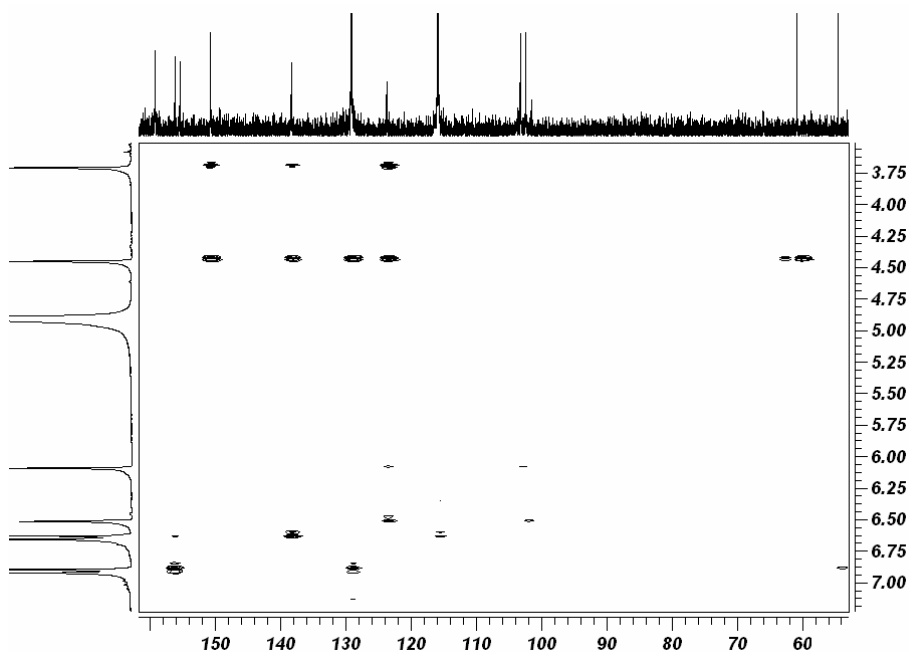


Figura 11. Mapa de contornos HMBC para CE-01

Mesmo de posse de todas as informações espectroscópicas, a determinação da estrutura da molécula foi dificultada devido à impossibilidade de perceber a simetria da mesma. A estrutura molecular de CE-01 só pôde ser elucidada depois da obtenção dos

dados espectrométricos, pois sabendo a massa molecular de CE-01, pôde-se perceber a simetria existente e, conseqüentemente, a estrutura molecular da mesma.

Na **Figura 12** temos o espectro de ESI - MS/MS para CE-01.

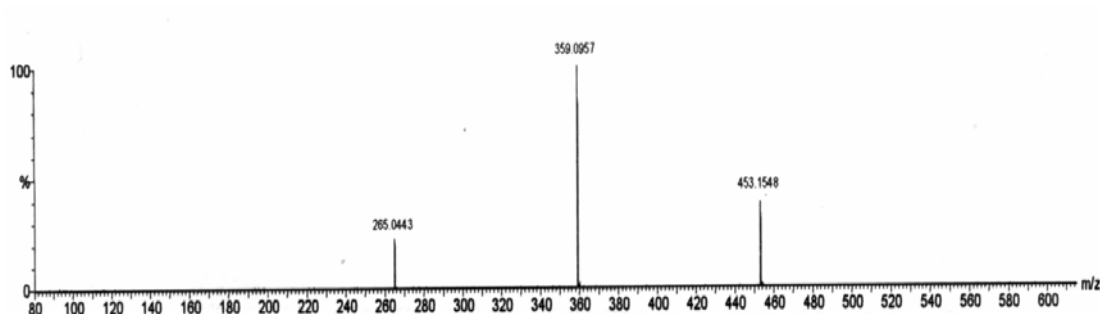


Figura 12. Espectro de ESI – MS/MS para CE-01

A dissociação foi realizada através de colisão com nitrogênio, onde o íon de m/z 453 fragmenta-se por perdas neutras consecutivas de unidades fenólicas, formando os íons de m/z 359 (- 94 Da) e m/z 265 (- 188 Da), que são as duas unidades presentes na estrutura do palidol.

De posse dessas informações podemos dizer com certeza que a substância isolada é realmente o estilbenóide palidol^{26,27}, um dímero derivado do estilbeno resveratrol..

As comparações entre os dados espectroscópicos para CE-01 e o palidol podem ser encontrados em **Anexo**.

4.10. Identificação de CE-02

A estrutura de CE-02 foi elucidada com base nos dados espectroscópicos uni e bidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C , **Tabela 11**.

Pela comparação com dados da substância CE-01 percebe-se que substância CE-02 possui sinais comuns a essa, e as correlações entre os hidrogênios e carbonos desta molécula permitem deduzir que ela contém parte da estrutura de CE-01 acrescido de mais uma unidade do resveratrol, formando um anel extra diidrofurânico **Figura 13**. Esse composto, já foi isolado anteriormente da espécie *Caragana sinica*, e é conhecido como Carasiphenol C.²⁸

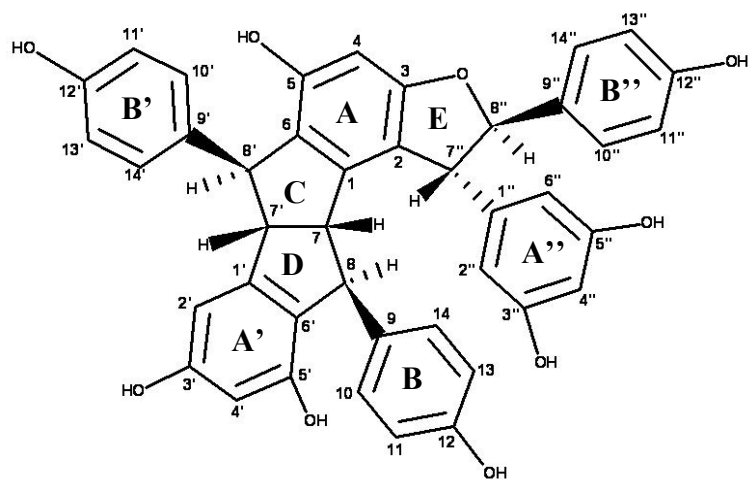


Figura 13. Estrutura molecular de CE - 02

Tabela 11. Dados de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, HMQC, HMBC, COSY e NOESY (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) para o composto CE-02.

	δ_{C} (DEPT)	HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ H: δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$, n° de H)	HMBC - $^2\text{J}_{\text{HC}}$ e $^3\text{J}_{\text{HC}}$	COSY - $^1\text{J}_{\text{HH}}$	NOESY
1	150,0(C)	-	-	-	-
2	116,4(C)	-	-	-	-
3	163,7(C)	-	-	-	-
4	97,0(CH)	6,28 (s, 1H)	2, 3, 5, 6	-	-
5	156,0(C)	-	-	-	-
6	126,3(C)	-	-	-	-
7	60,8(CH)	3,80 (d, 6,6; 1H)	1, 1', 6', 9	7'	7'', 10(14), 10'(14')
8	50,1(CH)	4,17 (s, 1H)	1, 9, 10(14), 1', 6', 7',	-	7'', 2''(6''), 10(14)
9	138,8(C)	-	-	-	-
10(14)	129,3(CH)	6,67 (d, 8,7; 2H)	8, 10(14), 12	11(13)	7, 7', 8, 7''
11(13)	115,7(CH)	6,53 (d, 8,4; 2H)	9, 11(13), 12	10(14)	-
12	155,9(C)	-	-	-	-
1'	145,8(C)	-	-	-	-
2'	102,6(CH)	6,46 (d, 1,8; 1H)	3', 4', 6'	4'	7', 8'
3'	158,9(C)	-	-	-	-
4'	102,2(CH)	6,00 (d, 1,8; 1H)	2', 6'	2'	-
5'	155,6(C)	-	-	-	-
6'	124,6(C)	-	-	-	-
7'	61,1(CH)	3,73 (d, 6,6; 1H)	1, 6, 8, 1', 9'	7	2', 10(14), 10'(14')
8'	54,6(CH)	4,52 (s, 1H)	1, 6, 7, 1', 9', 10'(14')	-	10'(14'), 2'
9'	138,7(C)	-	-	-	-
10'(14')	129,1(CH)	6,88 (d, 8,4; 2H)	8', 10'(14'), 12'	11'(13')	7, 7', 8'
11'(13')	116,0(CH)	6,66 (d, 8,4; 2H)	9', 11'(13'), 12'	10'(14')	-
12'	156,3(C)	-	-	-	-
1''	149,1(C)	-	-	-	-
2''(6'')	106,8(CH)	6,14 (sl, 2H)	7'', 4''	4''	8, 7'', 8''
3''(5'')	160,3(C)	-	-	-	-
4''	102,3(CH)	6,19 (t, 1,8; 1H)	2''(6''), 3''(5''),	2''(6'')	-
7''	57,6(CH)	4,34 (d, 1,8; 1H)	2, 1'', 2''(6''), 9'', 3,	8''	8, 2''(6''), 10''(14''), 7
8''	94,5(CH)	5,30 (d, 1,8; 1H)	2, 1'', 10''(14''), 3	7''	2''(6''), 10''(14'')
9''	135,1(C)	-	-	-	-
10''(14'')	127,5(CH)	7,15 (d, 8,7; 2H)	8'', 10''(14''), 12''	11''(13'')	7'', 8''
11''(13'')	116,3(CH)	6,76 (d, 8,7; 2H)	9'', 11''(13''), 12''	10''(14'')	-
12''	158,3(C)	-	-	-	-
OH	-	-	-	-	-

Como houve perda de simetria devido às substituições na estrutura base de CE-01, no espectro de RMN de ^1H , **E R ^1H -2 - Anexo e Figura 14**, os sinais que antes se sobrepunham na região de δ_{H} 5,20 - 7,30 e na região entre δ_{H} 3,70 e 4,70, no espectro de hidrogênio, agora aparecem em deslocamentos químicos diferentes, ou seja, separados (**Figura 14**).

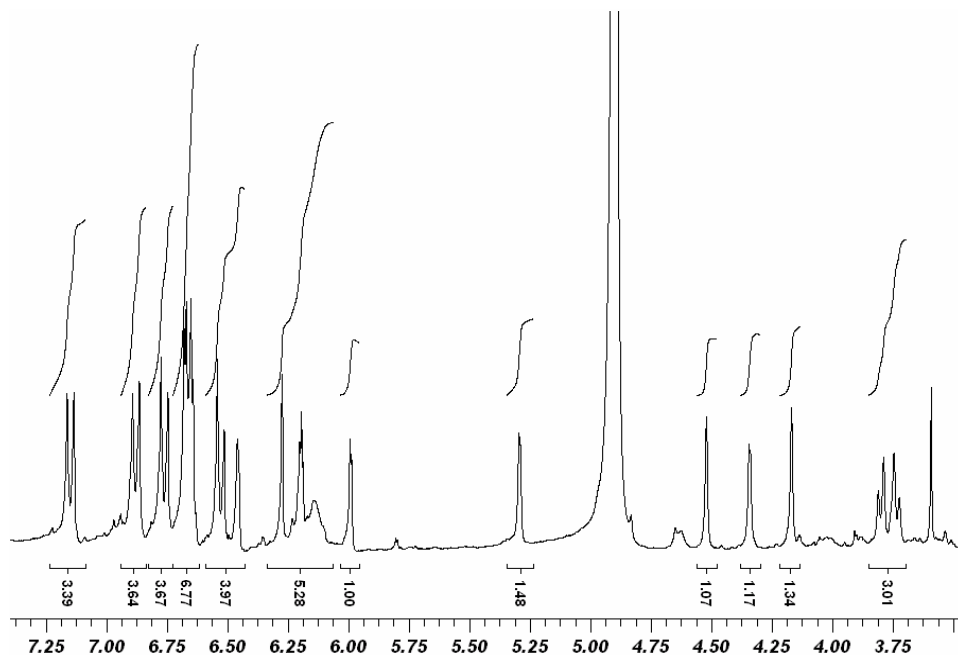


Figura 14. Espectro de RMN de ^1H para CE - 02

O mesmo ocorre para o espectro de carbono, **E R ^{13}C -2 - Anexo**, onde há a separação dos sinais nas regiões entre δ_{C} 100,0 -165,0 e δ_{C} 50,0 - 65,0, que na estrutura de CE-01 apareciam sobrepostos (**Figuras 15 e 16**).

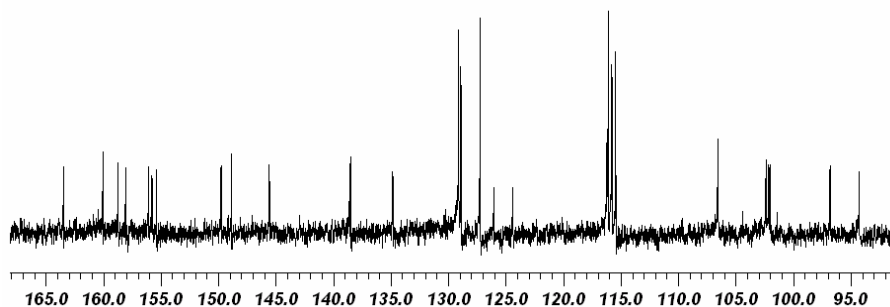


Figura 15. Espectro de RMN de ^{13}C para CE - 02

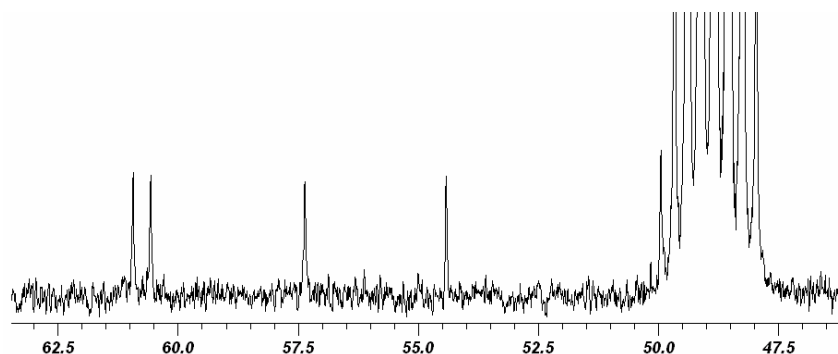


Figura 16. Espectro de RMN de ^{13}C para CE - 02

Além dos sinais relativos à estrutura de CE-01, temos o aparecimento dos sinais do carbono 8'' em δ_{C} 94,5, ligado ao oxigênio do anel aromático pertencente a CE-01 (anéis A e E). O carbono 8'' ainda está ligado ao carbono 9'' do grupo fenólico da nova estrutura (anel B''), isso explica o alto valor do seu deslocamento químico. O carbono 2 de CE-02 (também carbono 2 em CE-01), agora não é hidrogenado e apresenta deslocamento químico de δ_{C} 116,4 (103,3 em CE-01). Houve também o aparecimento do sinal em δ_{C} 57, 6, relativo ao carbono 7'' de CE -02, que é mono hidrogenado ligado ao outro grupamento aromático (anel A''), inserido na molécula de CE-01, que gerou a estrutura de CE-02 (**Figura 17**).

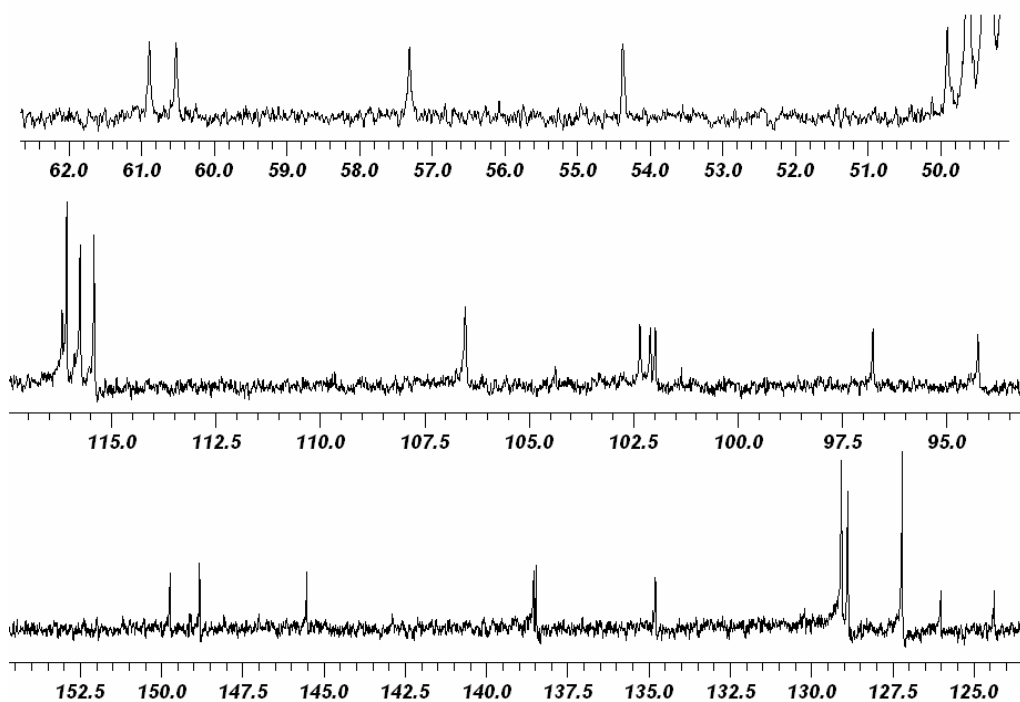


Figura 17. Expansão do Espectro de RMN de ^{13}C para CE - 02

Através dos dados de RMN de DEPT, **E R DEPT-2 - Anexo**, confirmamos a presença de apenas carbonos mono e não hidrogenados na molécula.

O mapa de contornos HMBC, **E R HMBC-2 - Anexo**, se repete como na estrutura de CE-01, contudo há o aparecimento das correlações da estrutura base da molécula de CE-01 com os novos grupos químicos que compõem a molécula de CE-02. As correlações de maior importância são aquelas entre o anel diidrofurano (anel E) com a estrutura base de CE-01, e com os novos anéis aromáticos inseridos na molécula, que comprovam as conexões propostas pela estrutura citada na **Figura 13**. Essas correlações podem ser visualizadas nas **Figuras 18 e 19**.

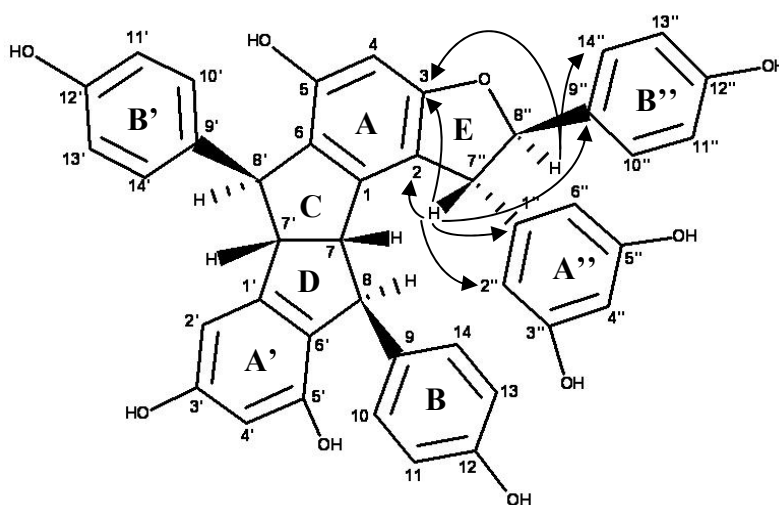


Figura 18. Correlações de HMBC do grupo diidrofurano (anel E), com as demais partes da molécula de CE-02

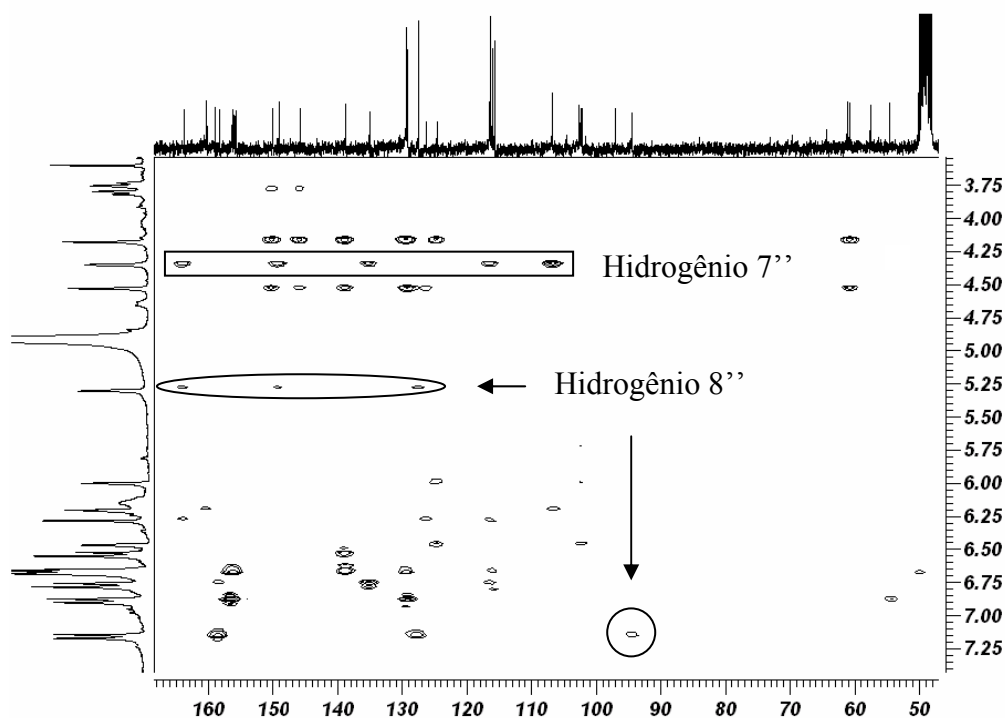


Figura 19. Correlações de HMBC do grupo furano com as demais partes da molécula de CE-02.

Sendo assim, temos as correlações para a molécula de CE-02 que confirmam as disposições dos átomos na estrutura proposta.

A origem biossintética de CE-02 pode ser sugerida a partir de CE-01 com a inclusão de mais uma unidade do resveratrol ligando-se ao carbono 2 e OH fenólico em 3, gerando assim um anel diidrofurânico E. Na estrutura proposta para CE-02 o fechamento ocorre no carbono 2 de CE-01, porém há a possibilidade da união da nova unidade do resveratrol no carbono 4 com formação do anel diidrofurânico junto as hidroxilas 3 ou cinco, o que resultaria nos isômeros Leachianol D e E²⁹, como na **Figura 20**.

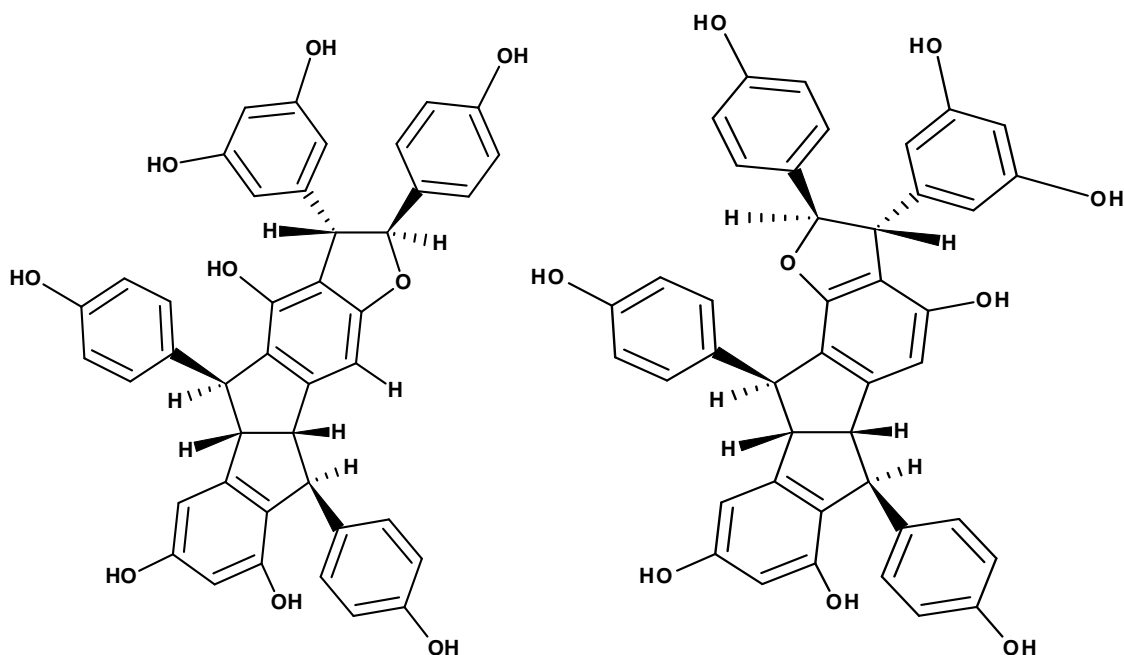


Figura 20. Lechianol D à esquerda e Lechianiol E à direita.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos não devem mudar consideravelmente, uma vez que o ambiente químico e as conexões pouco foram alteradas. Porém, para o Lechianiol D, não há a correlação de HMBC necessária entre o carbono 20 e o hidrogênio 19, que são vizinhos na estrutura proposta para CE-02. Já para o Lechianiol E, todas as correlações são observadas, então não há diferença significativa nas conexões entre a estrutura de CE-02 e seu isômero Lechianiol E.

As correlações de NOESY da molécula de CE-01 também foram visualizadas para CE-02, então essa parte da molécula é mantida, contudo os outros dados de NOESY para CE-02, **E R NOESY-2 - Anexo**, foram de suma importância para determinação da estrutura correta, uma vez que são observadas as correlações entre os hidrogênios 7 – 7'', 8' - 4 e 8 – 2''(6''). Essas correlações não são possíveis para os isômeros Lechianiol D e E, já que o sentido do fechamento do anel didrofurânico faz com que haja um distanciamento espacial entre os hidrogênios em questão, impossibilitando tais correlações. Dessa forma, a estrutura que se adequa aos dados espectroscópicos obtidos experimentalmente para CE-02, de fórmula molecular $C_{42}H_{32}O_9$, é a apresentada na **Figura 13**.

As disposições espaciais para os anéis ligados ao anel diidrofurânico foram propostas seguindo os dados do mapa de contornos NOESY onde observamos as correlações entre os hidrogênios 7'' – 10''(14'') e 8 – 2''(6''), com isso esses hidrogênios devem estar no mesmo plano dos anéis B'' e A'', respectivamente, assim

como o hidrogênio 8'' tem correlação com os hidrogênios 2''(6''), dessa forma esse hidrogênio também está no mesmo plano do anel A'', como na **Figura 21**.

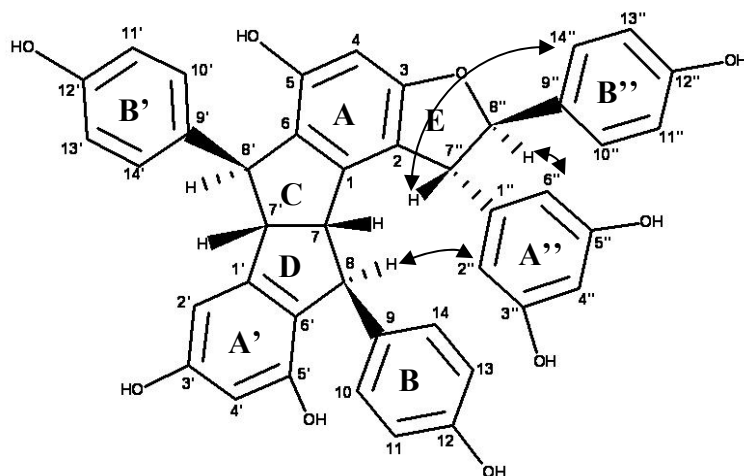
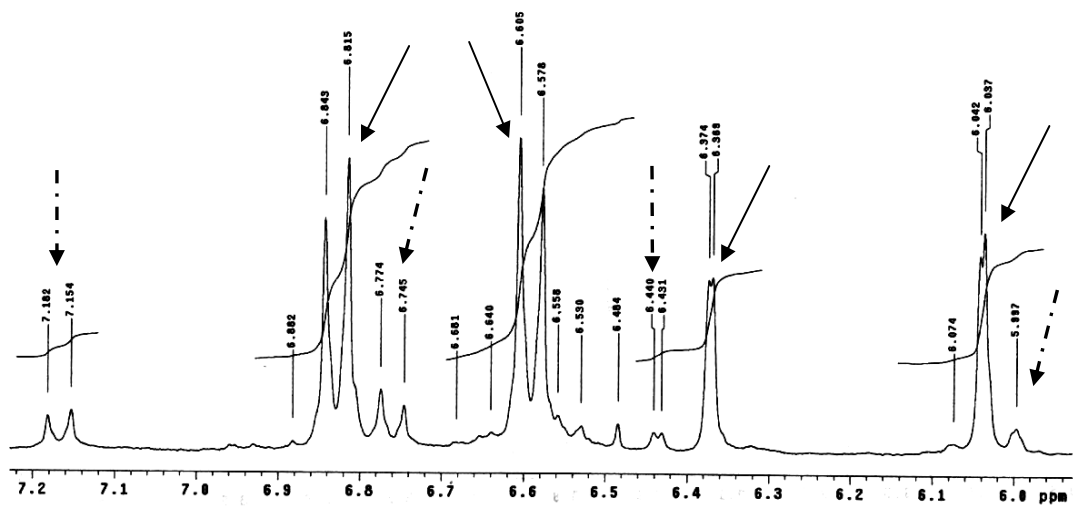


Figura 21. Principais correlações de NOESY para CE-02.

Com base nos dados da literatura, a substância CE-02 isolada é com certeza o Carasiphenol C²⁸.

4.11. Identificação de CE-03

A substância CE-03 trata-se na verdade da mistura de CE-01 com seu possível isômero que possui os hidrogênio 7', 8' e 7, 8 com ângulo diferente de 90°, então o acoplamento que anteriormente não era observado por ser pequeno, agora passa a ter 4,8 Hz (**Figuras 22 e 23**).



—————▶ Palidol (CE-01)

- - - - -▶ Isômero CE-03

Figura 22. Expansão 1 do espectro de RMN de ^1H da mistura de CE-01 e CE-03

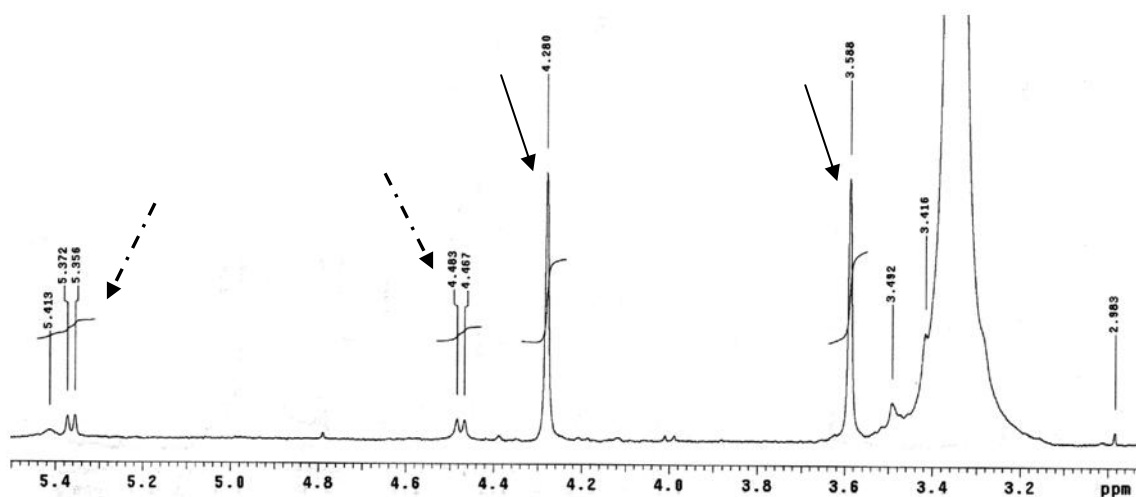


Figura 23. Expansão 2 do espectro de RMN de ^1H da mistura de CE-01 e CE-03

No mapa de contornos COSY (**Figura 24**), também é possível visualizar as correlações entre os hidrogênios que compõem a molécula de CE-03. Os dados são muito parecidos, variando apenas nos valores dos deslocamentos químicos, como percebemos no espectro de hidrogênio acima.

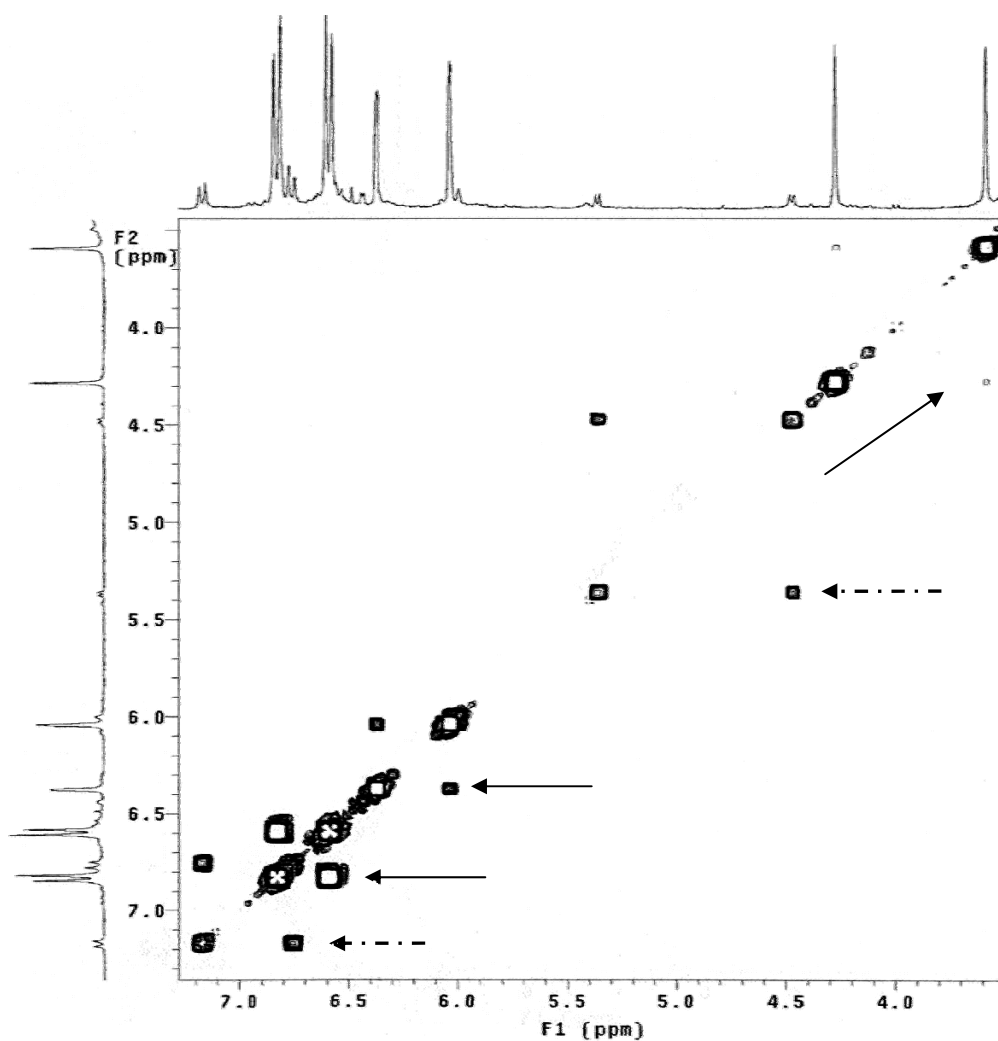


Figura 24. Mapa de Contornos COSY, em CD_3OD , da mistura de CE-01 e CE-03

Devido à pequena massa da mistura, não foi possível realizar a purificação e isolamento de CE-03. Também não foi possível obter os espectros de ^{13}C , DEPT, HMQC e HMBC, uma vez que a quantidade de CE-03 é cerca de 6 vezes menor que a concentração de CE-01 na mistura, isso pode ser observado pela integração no espectro de RMN de ^1H . Sendo assim, fica a hipótese de a substância CE-03 ser um isômero do CE-01 ou outra molécula muito parecida, como mostrado na **figura 25**.

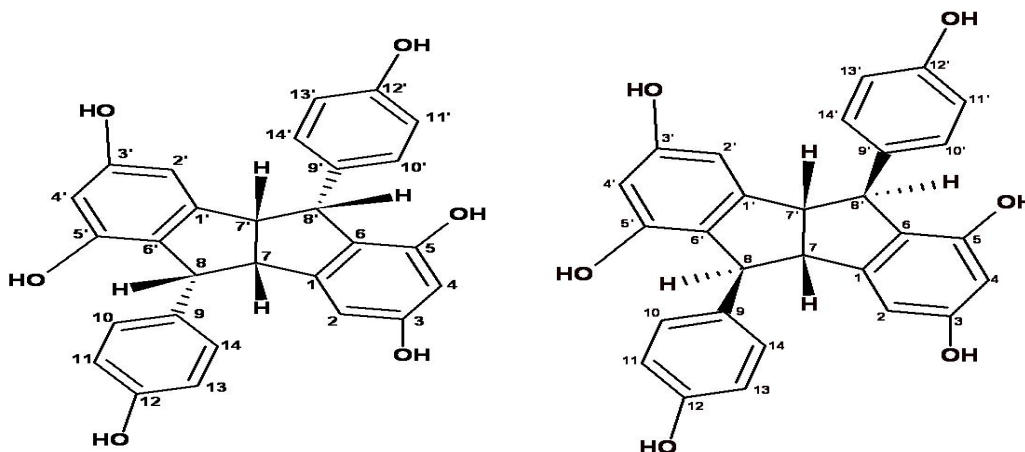


Figura 25. Isômero CE-03 à esquerda, Palidol (CE-01) à direita.

4.12. Identificação de CE-04

A estrutura de CE-04 foi elucidada com base nos dados espectroscópicos uni e bidimensionais de RMN de ^1H e ^{13}C , Tabela 12, além dos dados de espectrometria de massas.

Pela comparação dos dados da substância CE-04 percebe-se que essa molécula possui sinais comuns à CE-02, e as correlações entre os hidrogênios e carbonos desta molécula permitem deduzir que ela contém parte da estrutura de CE-02 acrescido de mais um grupamento diidrofuranofurano substituído por anéis aromáticos, tornando a molécula simétrica. Pela comparação com dados da literatura³⁰ temos que a substância isolada trata-se do Nepalensinol B, cuja estrutura pode ser observada na Figura 27.

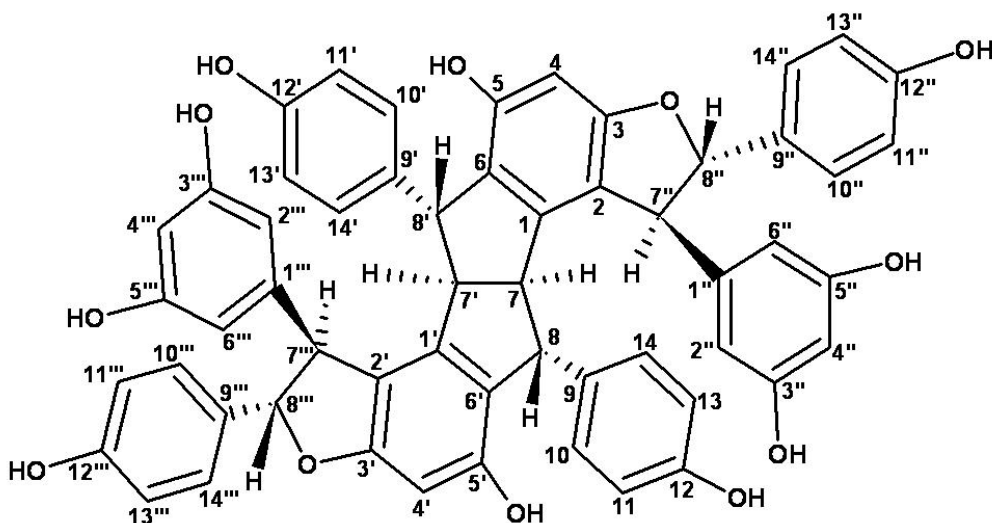


Figura 26. Nepalensinol B

Tabela 12. Dados de RMN de ^1H , $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$, HMQC, HMBC, COSY e NOESY (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) para o composto CE-04.

	δ_{C} (DEPT)	HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ H: δ_{H} (mult., $J =$ Hz, n° de H)	HMBC - $^2\text{J}_{\text{HC}}$ e $^3\text{J}_{\text{HC}}$	COSY - $^1\text{J}_{\text{HH}}$	NOESY
7, 7'	60,6 (CH)	3,96 (s, 2H)	1, 1', 6, 6', 8, 8', 9, 9'	8, 8'	7'', 7''', 10, 10'(14, 14')
1, 1'	144,6 (C)	-	-	-	-
2, 2'	116,2 (C)	-	-	-	-
7'', 7'''	57,2 (CH)	4,31 (d, 1,8; 2H)	2, 2', 3, 3', 1'', 1''', 2'', 2''', (6'', 6'''), 8'', 8''', 9'', 9'''	8'', 8'''	7, 7', 10'', 10'''(14'', 14'''), 2'', 2'''(6'', 6'''), 8, 8'
1'', 1'''	148,7 (C)	-	-	-	-
2'', 2''' (6'', 6''')	106,7 (CH)	6,28 (sl, 4H)	3'', 3''', 4'', 4''', 7'', 7'''	4''	10, 10'(14, 14'), 8'', 8''', 7'', 7'''
3'', 3''' (5'', 5''')	160,2 (C)	-	-	-	-
4'', 4'''	102,3 (CH)	6,31 (t, 2,1; 2H)	2'', 2''', (6'', 6'''), 3'', 3'''(5'', 5''')	2'', 2''' (6'', 6''')	-
8'', 8'''	93,9 (CH)	5,30 (d, 1,8; 2H)	2, 2', 3, 3', 1'', 1''', 7'', 7''', 10'', 10'''(14'', 14''')	7'', 7'''	10'', 10'''(14'', 14'''), 2'', 2'''(6'', 6''')
9'', 9'''	134,8 (C)	-	-	-	-
10'', 10''' (14'', 14''')	127,3 (CH)	7,11 (d, 8,4; 4H)	10'', 10'''(14'', 14'''), 8'', 8''', 12'', 12'''	11'', 11'''(13'', 13''')	8'', 8''', 7'', 7''', 4, 4'
11'', 11''' (13'', 13''')	116,1 (CH)	6,75 (d, 8,4; 4H)	9'', 9''', 11'', 11'''(13'', 13'''), 12'', 12'''	10'', 10'''(14'', 14''')	-
12'', 12'''	158,0 (C)	-	-	-	-
3, 3'	163,3 (C)	-	-	-	-
4, 4'	96,8 (CH)	6,20 (s, 2H)	2, 2', 5, 5', 6, 6'	-	10'', 10'''(14'', 14''')
5, 5'	155,6 (C)	-	-	-	-
6, 6'	126,6 (C)	-	-	-	-
8, 8'	50,3 (CH)	4,29 (s, 2H)	1, 1', 5, 5', 9, 9', 10, 10' (14, 14'), 7, 7'	7, 7'	7'', 7''', 10, 10' (14, 14')
9, 9'	138,6 (C)	-	-	-	-
10, 10' (14, 14')	129,3 (CH)	6,75 (d, 8,4; 4H)	10, 10'(14, 14'), 8, 8', 12, 12'	11, 11'(13, 13')	7, 7', 8, 8', 2'', 2'''(6'', 6''')
11, 11' (13, 13')	115,5 (CH)	6,56 (d, 8,4; 4H)	9, 9', 11, 11'(13, 13'), 12, 12'	10, 10'(14, 14')	-
12, 12'	156,1 (C)	-	-	-	-
OH	-	7,40 - 8,40 (10H)	-	-	-

A geometria espacial da molécula de CE-04 se mantém a mesma da molécula de CE-02, uma vez que as correlações por HMBC e NOESY, **E R HMBC-3** e **E R NOESY-3 - Anexo**, se mantiveram entre os hidrogênios 7, 7' – 7'', 7''', que são as principais correlações na definição de conectividade e da geometria espacial. No mapa de contornos NOESY é possível visualizar essas correlações e ainda a correlação entre os hidrogênios 10, 10'(14, 14') com 2'', 2'''(6'', 6'''), dos anéis aromáticos, o que comprova que estes estão próximos no espaço, confirmando a geometria espacial da molécula proposta na **Figura 26**. Da mesma forma percebemos que o fechamento do anel diidrofurano ocorre de maneira idêntica ao proposto para CE-02.

As mesmas dificuldades encontradas em resolver a estrutura de CE-01 também estavam presentes na elucidação estrutural de CE-04, devido à alta simetria da molécula. Dessa forma, os dados espectrométricos foram cruciais para resolução dos problemas encontrados, pois com a massa molecular de CE-04 pôde-se perceber a simetria da molécula e determinar a sua estrutura. Sendo assim, temos que CE-04 possui a estrutura base de CE-01, acrescido de duas unidades do resveratrol, o que caracteriza a sua simetria.

Nas **Figuras 27 e 28** temos os espectros de ESI - MS/MS para CE-04.

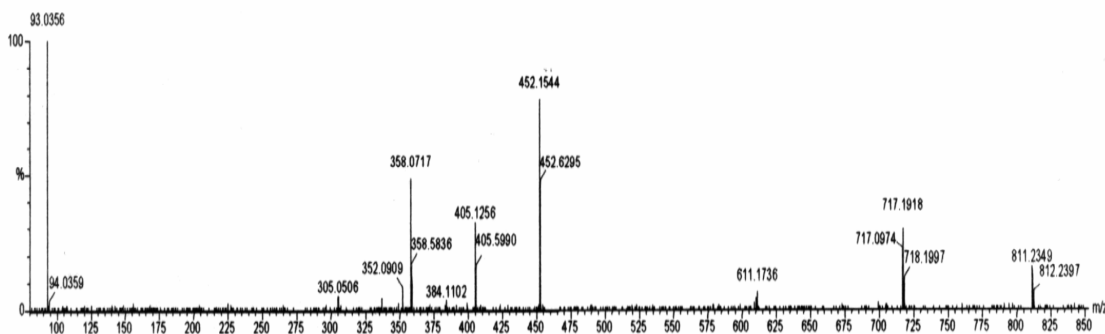


Figura 27. Espectro de ESI – MS/MS para o íon de CE-04 Dicarregado.

A dissociação foi realizada através de colisão com nitrogênio, onde o íon dicarregado de m/z 452,6 (906 Da) fragmenta-se por perda neutra de fenol (-94 Da), formando o íon monocarregado de m/z 811,2 e íon dicarregado de m/z 405,5 (- 47 m/z , 94 Da). O íon de m/z 811,2 fragmenta-se perdendo um fenol (-94 Da) formando o íon de m/z 717. O íon dicarregado de m/z 405,5 fragmenta-se perdendo um fenol (- m/z 47, 94 Da), formando o íon dicarregado de m/z 358,5 (717 Da).

Na **Figura 28** observa-se que o íon monocarregado de m/z 905 (906 Da), fragmenta-se por duas perdas neutras consecutivas de fenóis, formando os íons de m/z 811 (-94 Da) e m/z 717 (-188 Da).

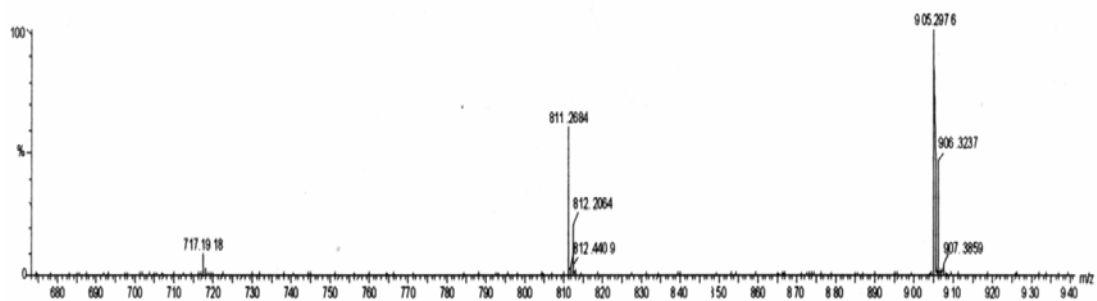


Figura 28. Espectro de ESI – MS/MS para o íon de CE-04 Monocarregado.

De posse dessas informações podemos dizer com certeza que a substância isolada é realmente o estilbenóide Nepalensinol B cuja fórmula molecular é $C_{56}H_{42}O_{12}$.

5. CONCLUSÕES

Os objetivos propostos no início do projeto foram alcançados com êxito dentro das possibilidades encontradas e criadas durante a execução do trabalho. Foram avaliadas as atividades biológicas, tanto daquelas com metodologia simples, até as mais complexas.

As atividades biológicas mais importantes que renderam resultados satisfatórios e, de certa forma, inesperadas foram: atividade antiinflamatória tópica, atividade antioxidante e antiproliferativa. Apesar das atividades biológicas demonstradas pela planta não serem altas, elas são consideráveis e possibilitam a utilização da planta como matéria prima na produção de fármacos, uma vez que sejam isoladas as substâncias ativas.

Os estudos que foram realizados nesse trabalho e que, geralmente, não são feitos em estudos fitoquímicos, foram àqueles pertencentes à análise centesimal, que são comumente realizados em trabalhos sobre química de alimentos. Os resultados obtidos para esses testes foram importantes, pois demonstram que a espécie estudada possui uma quantidade relativamente grande de ácidos graxos, sendo alguns deles de suma importância na alimentação, seja de animais, seja de seres humanos. Outro dado importante é o alto teor de proteína bruta, principalmente das folhas. Esses resultados indicam que a espécie estudada apresenta um grande potencial alimentício, e poderia ser utilizada no enriquecimento de rações para bovinos, caprinos etc.

Foram isoladas 3 substâncias conhecidas como o palidol (dímero do resveratrol), o carasiphenol C (trímero do resveratrol) e o nepalensinol B (tetramero do resveratrol), que são estilbenóides encontrados, principalmente em espécies de uvas.

O resveratrol é um composto pertencente à classe dos estilbenos, isolado em 1974 pela primeira vez de uma leguminosa Peruviana, a *Cássia quinquagulata*. Os estilbenos são comuns em Gnetaceae, Dipterocarpaceae e Vitaceae²⁶. O resveratrol é encontrado em várias plantas, contudo espécies de uvas e produtos relacionados são consideradas as fontes mais importantes e o teor dessas substâncias estão relacionados com as espécies e a maneira de cultivo das mesmas³². O resveratrol também é precursor de viniferinas, fitoalexinas produzidas em folhas de *Vitis vinifera* L. e é um componente com atividade antifúngica em *Vitis vinifera* (Vitaceae), funcionando como fitoalexina, após uma infecção por patógenos como *Botrytis cinerea* e *Plasmopara viticola*. O resveratrol tem atividade contra dermatófitos e bactérias da pele em humanos, sugerindo

que o resveratrol poderia ser utilizado como agente terapêutico no combate a algumas infecções fúngicas³².

Dessa forma alguns dos atrativos da planta para produção de fármacos ou complemento nutricional para ração animal, por exemplo, é a quantidade de matéria prima que pode ser produzida facilmente e sem necessidade de controles especiais, por se tratar de uma erva daninha.

6. PRINCIPAIS REFERÊNCIAS

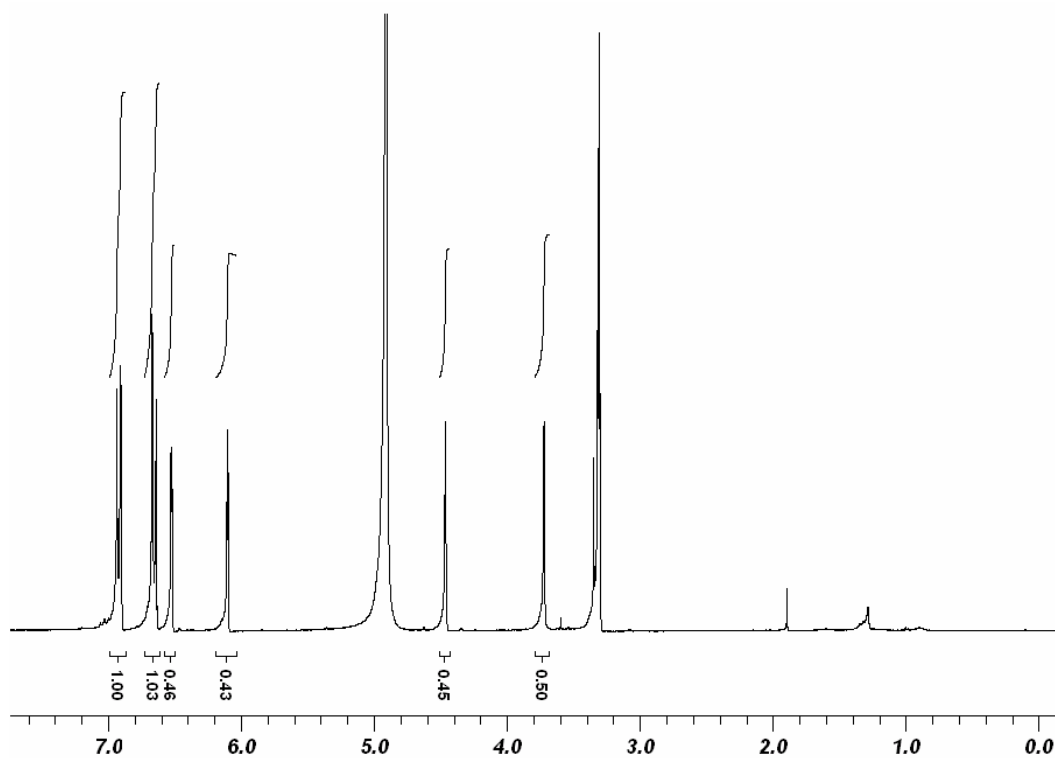
1. Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. *Quim. Nova*, **2002**, 25(1), 45-61.
2. http://www.coodetec.com.br/sojasaude/acidos_graxos.htm, visitado em 26/05/2008.
3. Material Pedagógico da Disciplina de Química e Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Maringá, 2004.
4. Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1962**, 111: 544-547.
5. http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf, visitado em 26/05/2008.
6. Mendonça, G.A.S. *Rev. Bras. Cancerol.* **1992**, 38, 167-176.
7. Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Leal, F. L. L.; Caetano, A. C. S.; Nascimento, R. L. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, 26(3): 639-644.
8. El Massry, K. F.; El Ghorab, A. H.; Farouk, A. *Food Chem.* **2002**, 79, 331-336.
9. D'Arcy, P.; Harron, D. W. G. *Pharm. Int.* **1983**, 4, 16.
10. Frézard, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demicheli, C. *Quím. Nova*, **2005**, 28(3), 511-518.
11. Marston, A.; Hostettmann, K.; *Phytochem.* **1985**, 24, 639.
12. De Siqueira, J. M.; Garcez, W. S.; Boaventura, M. A. D. *Quím. Nova*, **1998**, 21(5).

13. Postiglioni, S. R. IAPAR, 1983. Circular, 36.
14. United States Department of Agriculture, USDA. Online Database. *Cenchrus Biflorus* and *Cenchrus Echinatus*.
15. Light, M.E.; McGaw, L.J.; Sparg, S.G.; Jäger, A.K.; Van Staden, J. *South African J. of Bot.* **2002**, 68, 411–413.
16. Clay, K.; Leuchtman, A. *J. of Nat. Prod.* **1990**, 53(5), 1272-1279.
17. Santos D. S.; Morais, S. A. L.; Terrones, M. G.; Nascimento, E. A.; Chang R. *30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, **2007**.
18. Vendruscolo, G. S.; Rates, S. M. K.; Mentzl, L. A. *Braz. Journal of Pharmacognosy*, **2005**, 15(4), 361-372.
19. Khuzhaev, V. U; Zhalolov, I. Zh.; Levkovich, M. G.; Aripova, S. F.; Shashkovc, A. S. *Russian Chemical Bull.* **2004**, 53(8), 1765 – 1767.
20. Macías, F. A.; Marín, D.; Bastidas, A. O.; Chinchilla D.; Simonet, A. M.; Molinillo, J. M. G. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, 54, 991-1000.
21. Bligh, E.G; Dyer, W.J. *Can. J. Biochem.* **1959**, 37, 911.
22. Hartman, L.; Lago, R.C.A. *Lab. Practice*, **1973**, 22, 475-476, 494.
23. Simões, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 1ª Edição. Ed. Da UFSC, **1999**, 495 – 496.
24. Marchetti, J.M.; Miguel, V.U.; Errazu, A. F. *Renew. and Sust. Ener. Rev.* **2007**, 11, 1300–1311

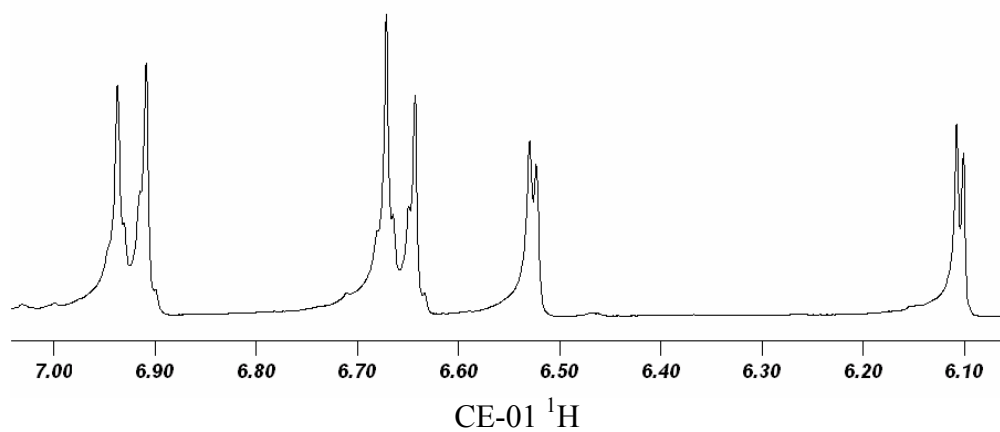
25. Ohyama, M.; Tanaka, T.; Ito, T.; Iinuma, M.; Bastow, K. F.; Lee, K. H. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.* **1999**, 9, 3057-3060.
26. Khan, M.A.; Nabi, S.G.; Prakash, S.; Zaman, A. *Phytochem.* **1986**, 25, 1945–1948.
27. Kulesh, N. I.; Veselova, M. V.; Fedoreev, S. A.; Denisenko, V. A. *Chem. of Nat Comp.* **2006**, 42,(2).
28. Wang, S., Ma, D., Hu, C. *Helv. Chim. Acta*, **2005**, 88(8), 2315-2321.
29. Ohyama, M.; Tanaka, T.; Iinuma, M. *Phytochem.* **1995**, 38(3), 733-740.
30. Yamada, M.; Hayashi, K.; Hayashi, H.; Ikeda, S.; Hoshino, T.; Tsutsui, K.; Tsutsui, K.; Iinuma, M.; Nozaki, H. *Phytochem.* **2006**, 67, 307–313.
31. Skehan, P.; Storeng, R.; Scudeiro, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R.. *J. of the Nat. Cancer Inst.*, Bethesda, **1990**, v. 82, p. 1107-1112.
32. Da Silva, L., Oniki, G. H., Agripino D. G., Moreno, P. R. H., Young, M. C. M., Mayworm, M. A. S., Ladeira, A. M. *Braz. J. of Pharm.* **2007**, 17(3): 361-367.

ANEXO

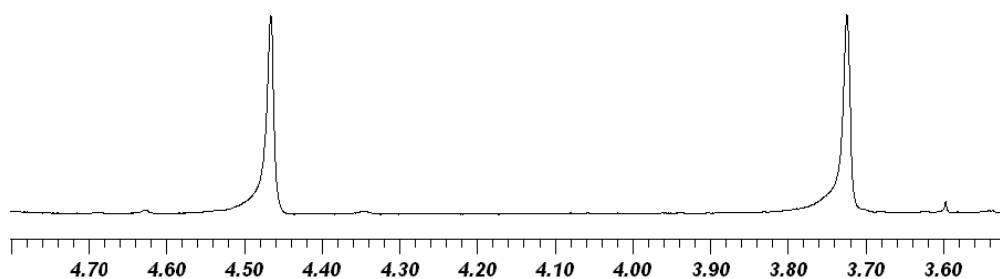
ESPECTROS



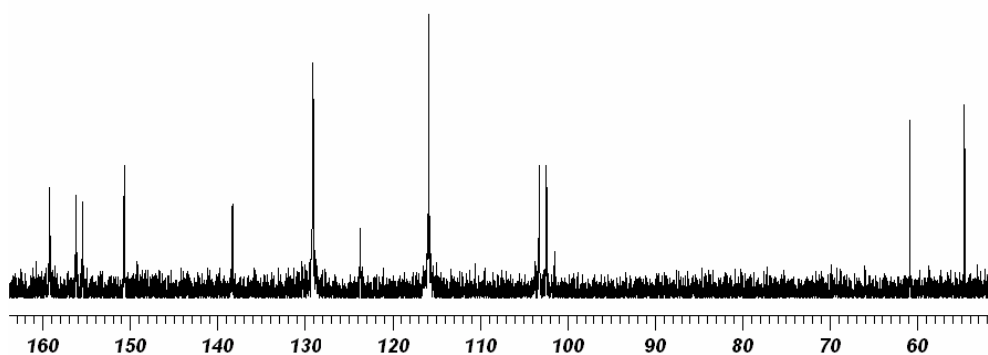
E R ¹H-1. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



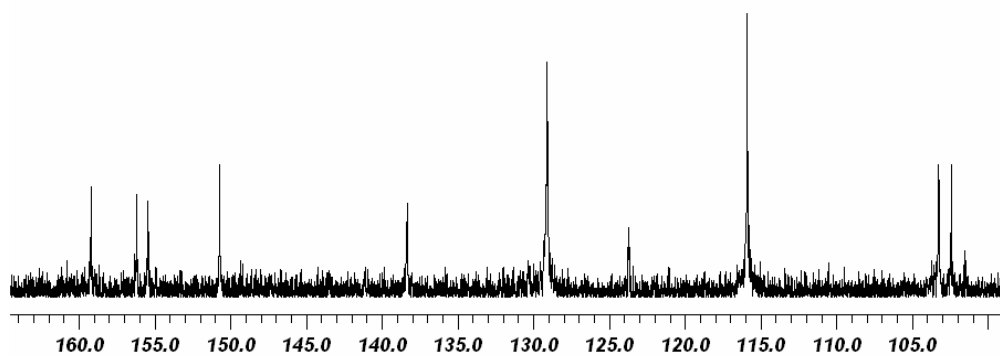
E R ¹H-1 - Expansão 1. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



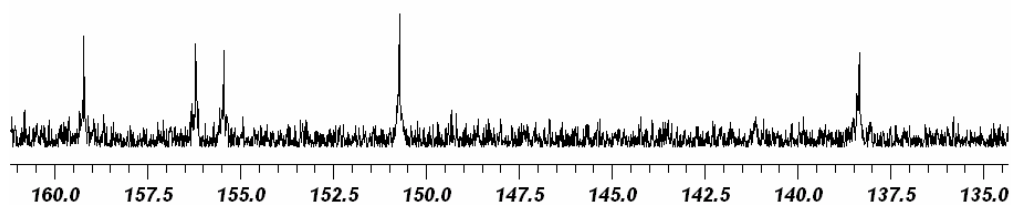
E R ¹H-1 - Expansão 2. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



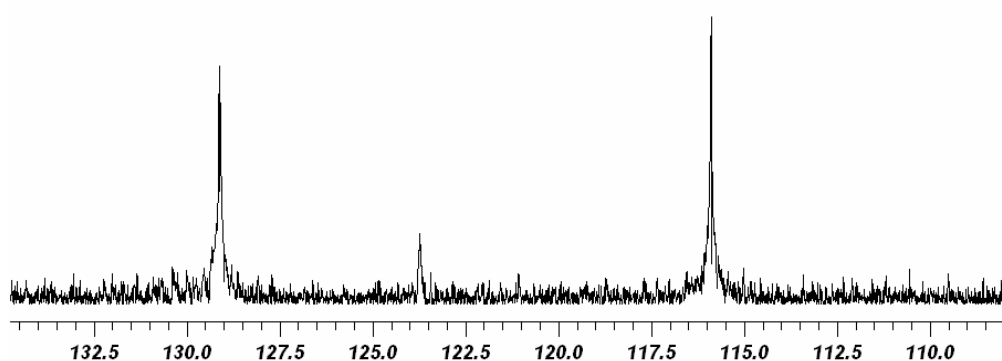
E R ¹³C-1. Espectro de RMN de ¹³C (75,45MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



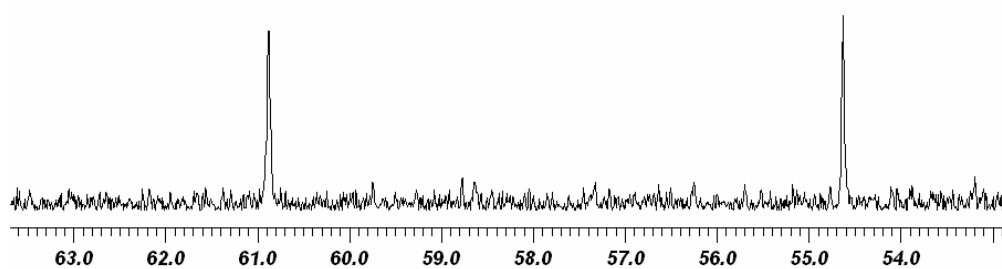
E R ¹³C-1 - Expansão 1. Espectro de RMN de ¹³C (75,45MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



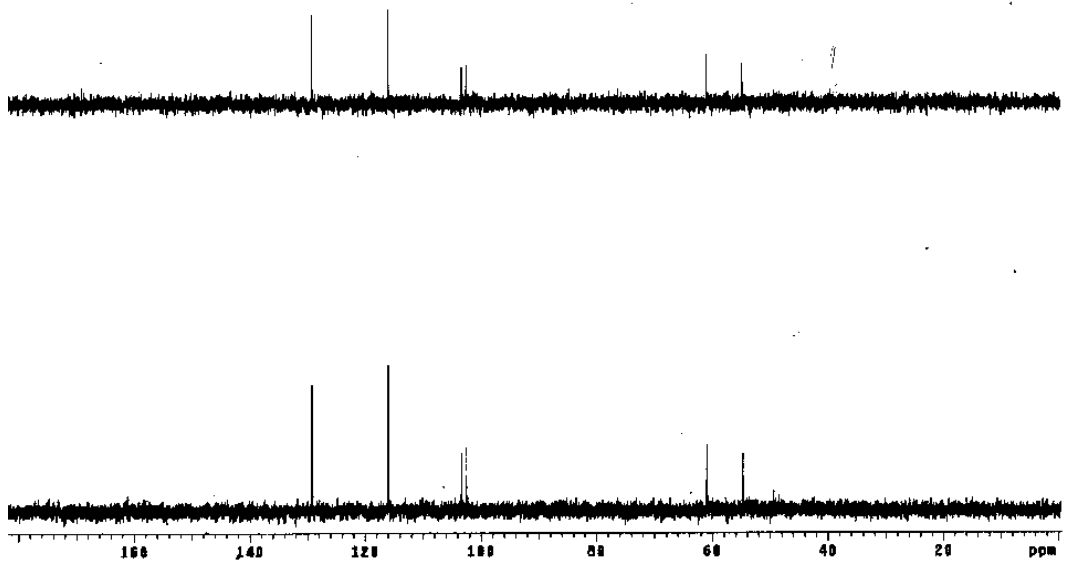
E R ¹³C-1 - Expansão 2. Espectro de RMN de ¹³C (75,45MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



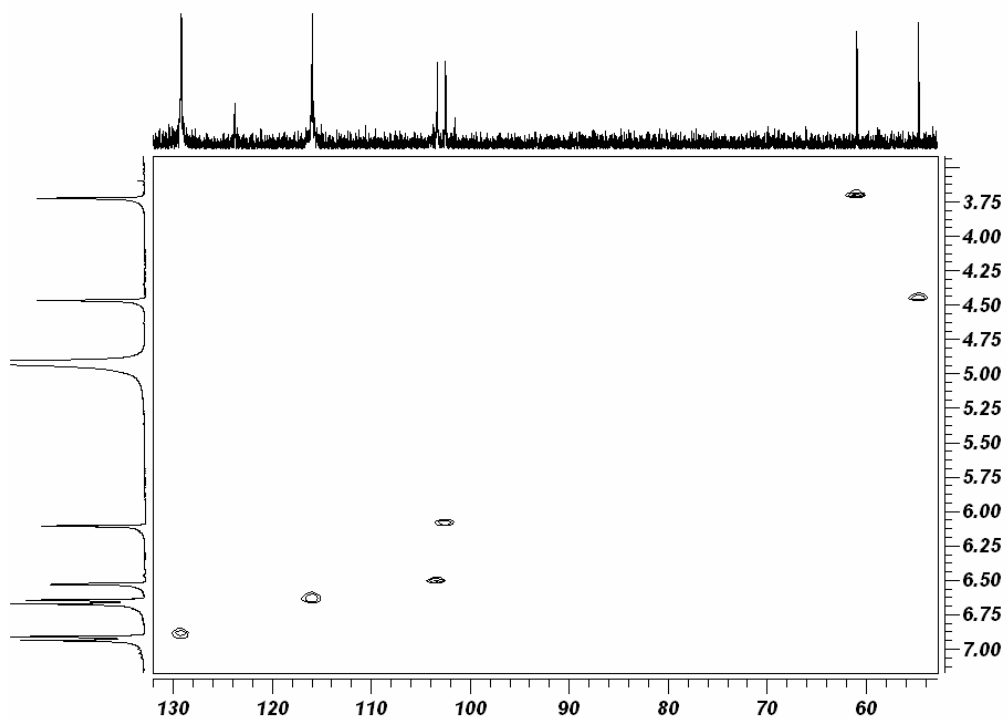
E R ¹³C-1 - Expansão 3. Espectro de RMN de ¹³C (75,45MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



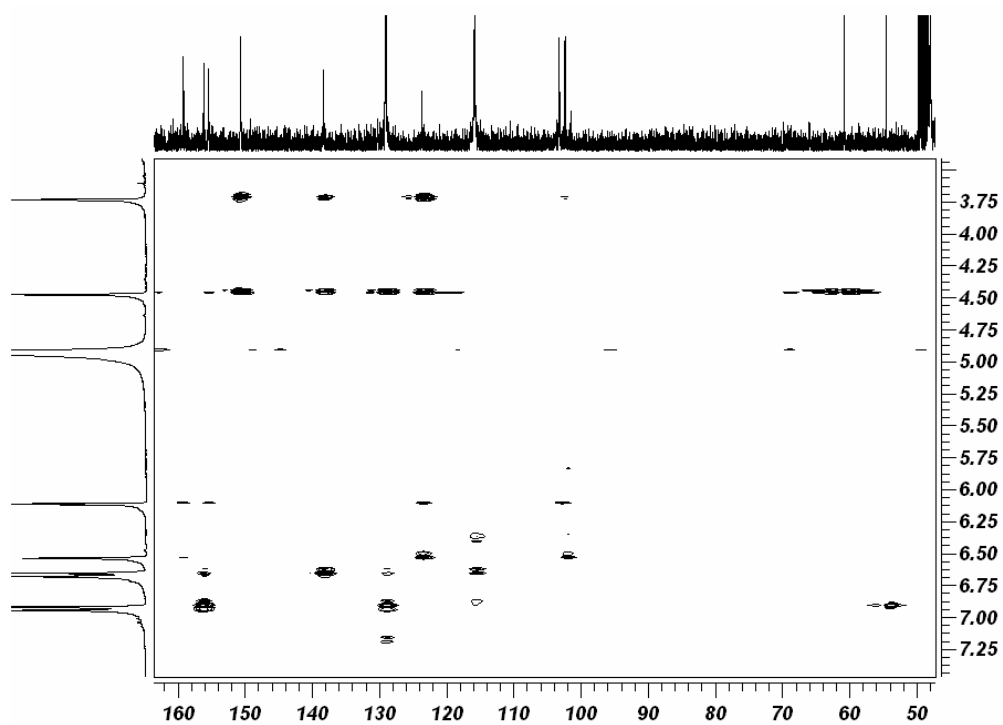
E R ¹³C-1 - Expansão 4. Espectro de RMN de ¹³C (75,45MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



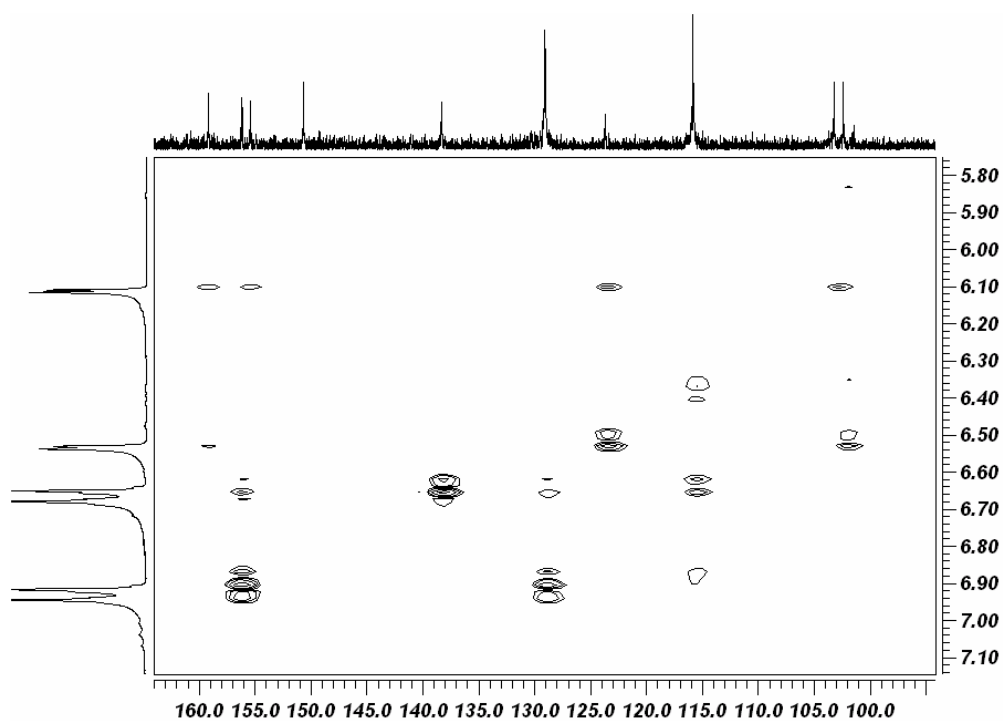
E R DEPT-1. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-01.



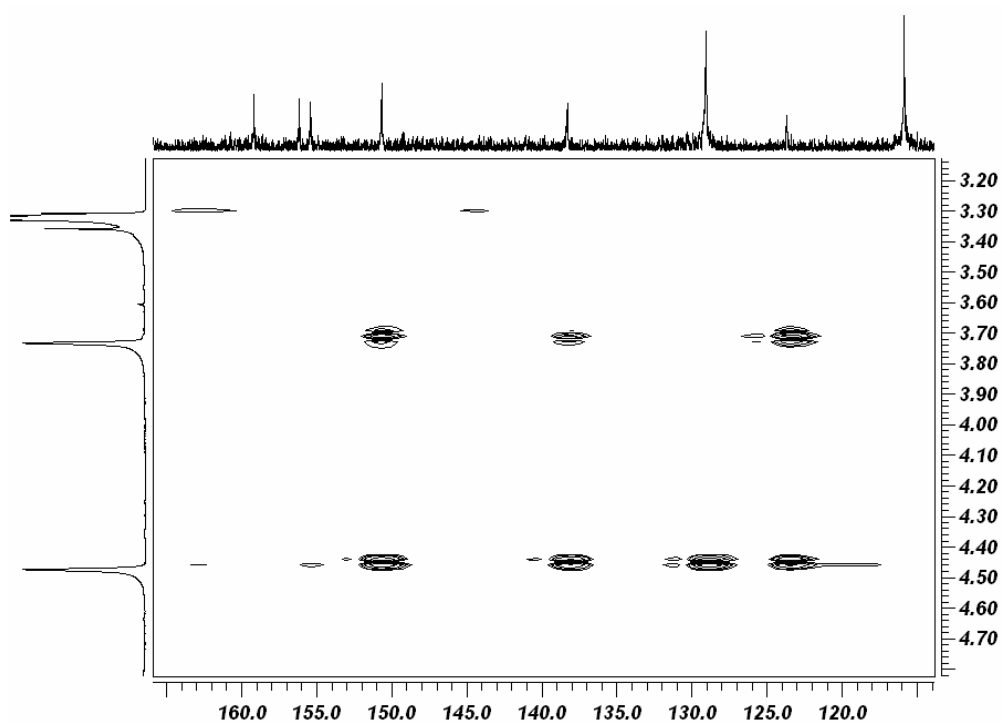
E R HMQC-1. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-01.



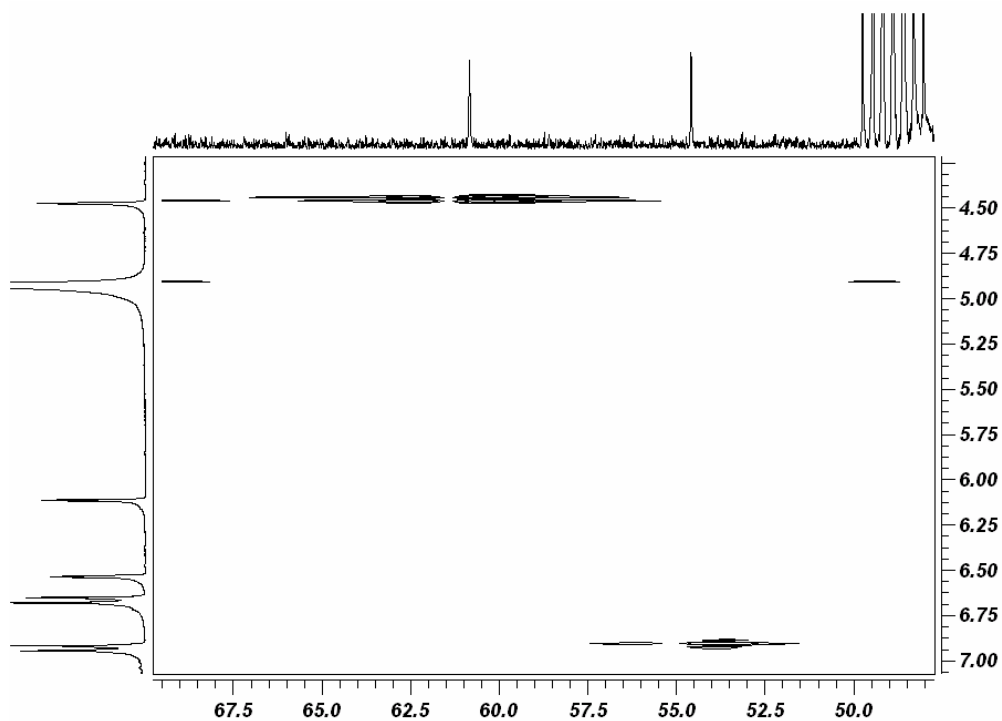
E R HMBC-1. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-01.



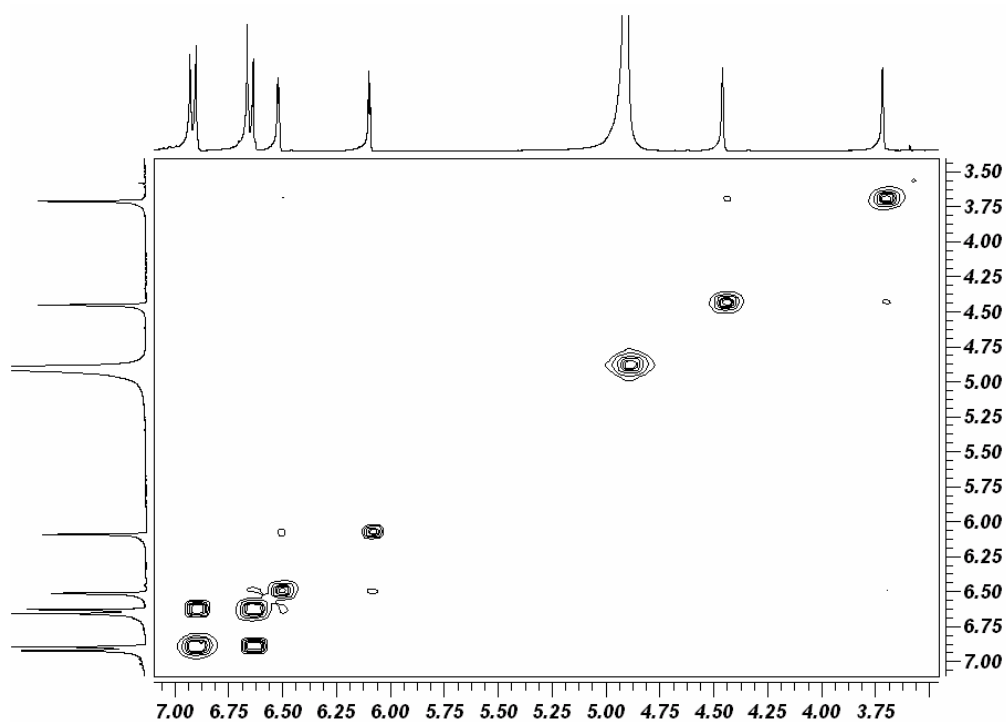
E R HMBC-1 - Expansão 1. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-01.



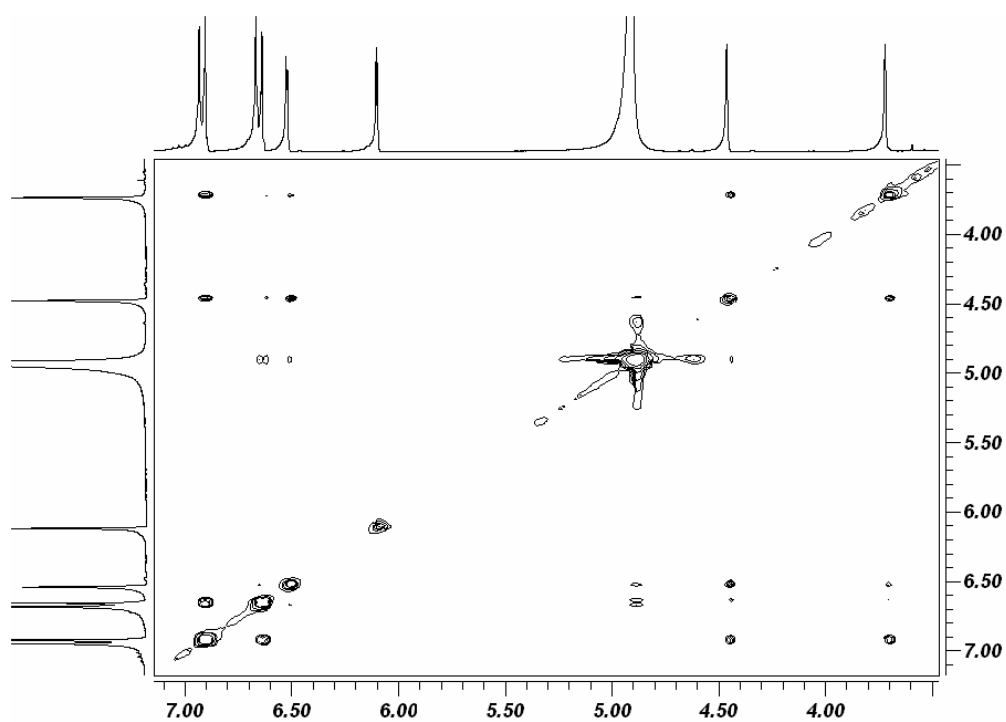
E R HMBC-1 - Expansão 2. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-01.



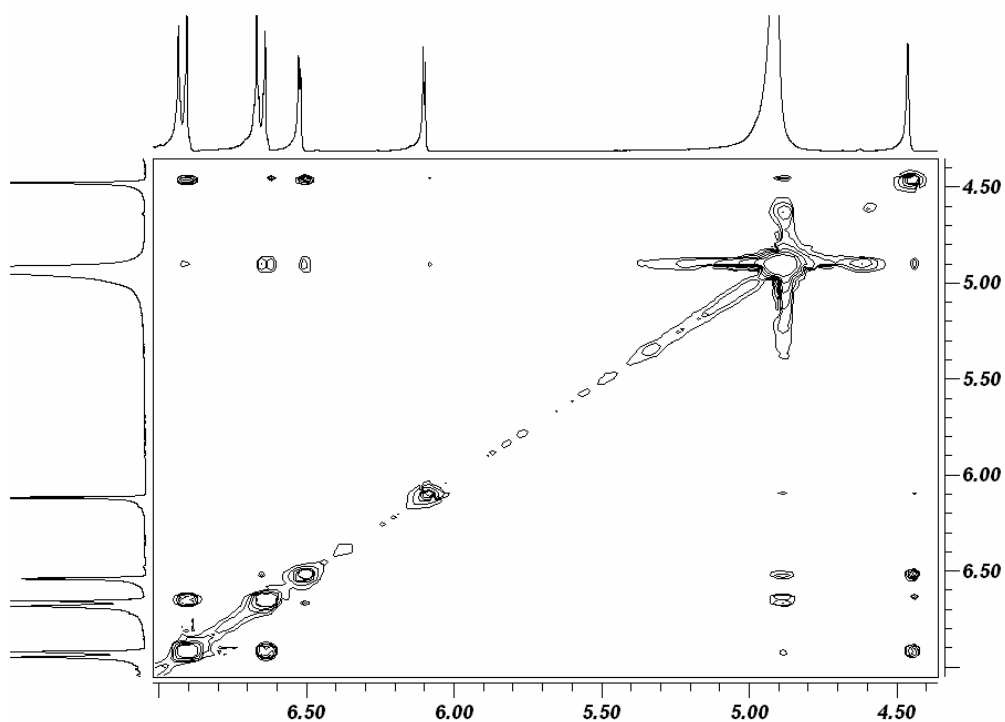
E R HMBC-1 - Expansão 3. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-01.



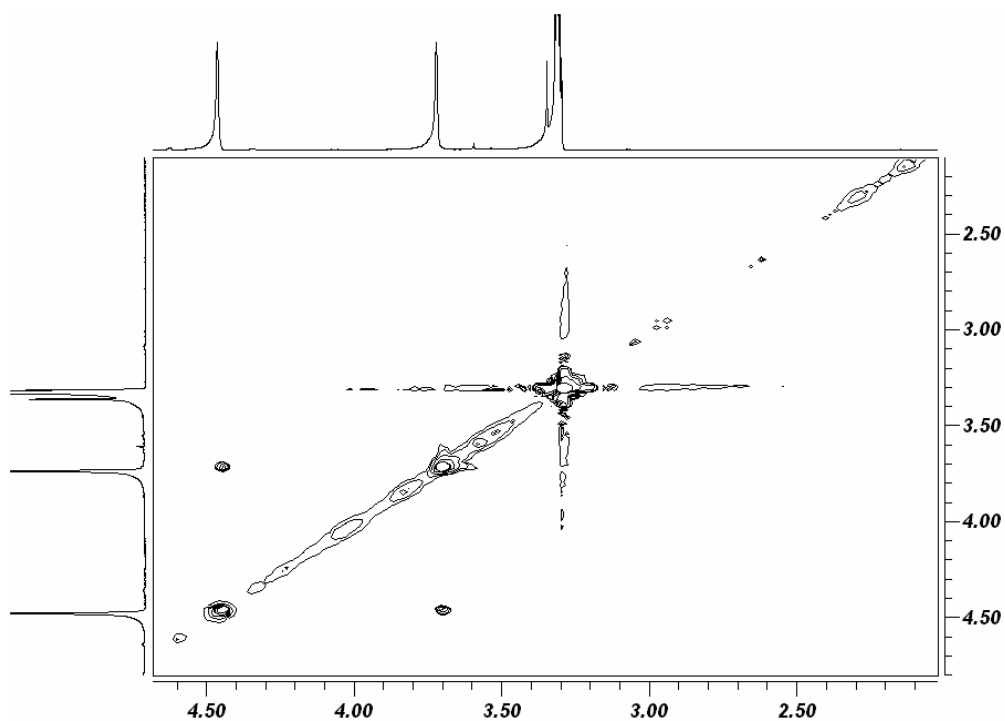
ER COSY-1. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



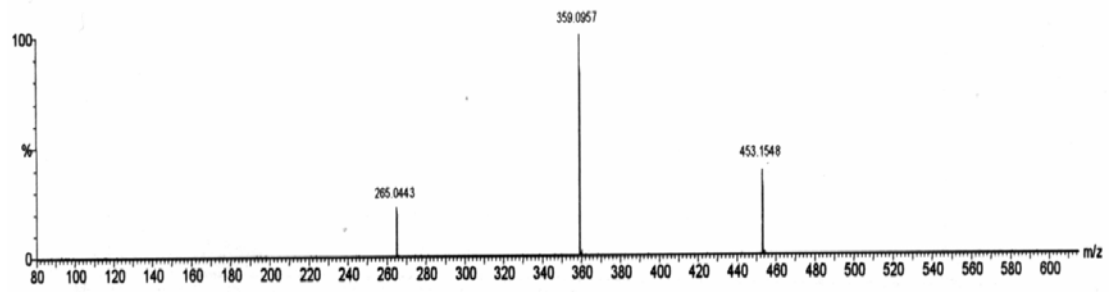
ER NOESY-1. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



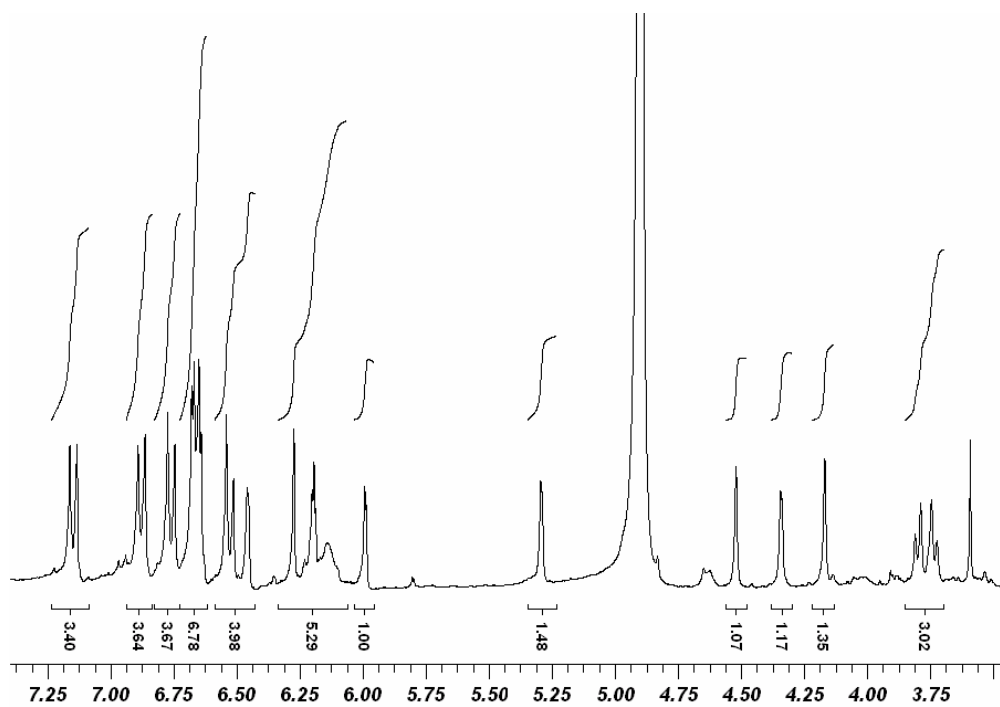
E R NOESY-1 - Expansão 1. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



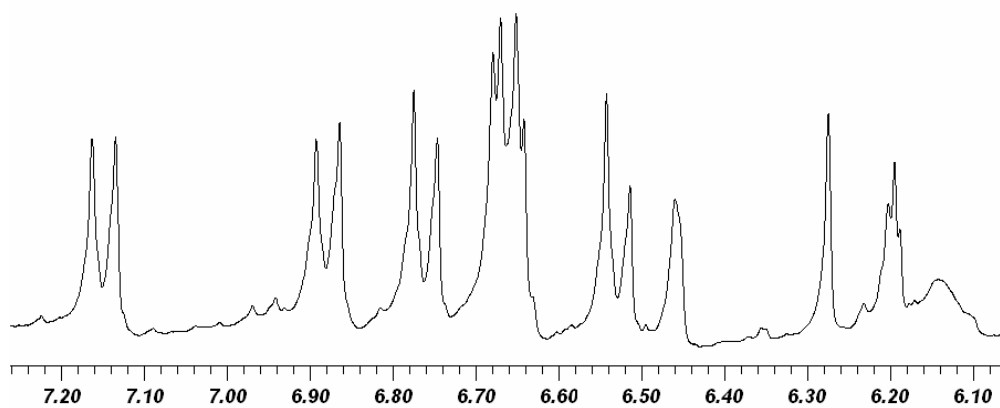
E R NOESY-1 - Expansão 2. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-01.



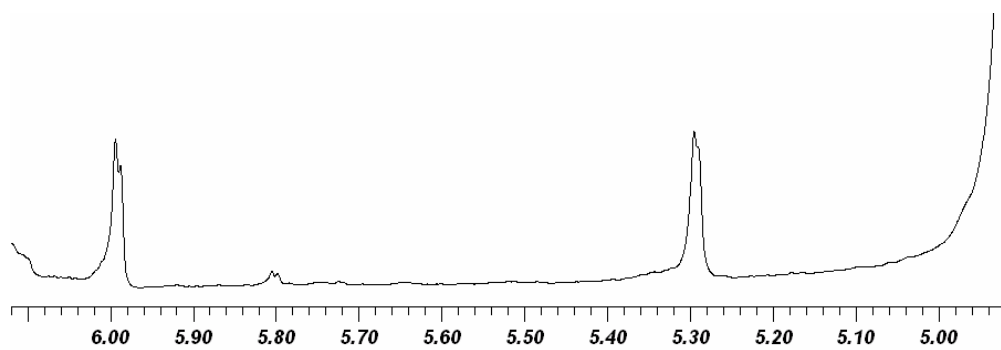
E M-1. Espectro de massas ESI-MS/MS do composto CE-01.



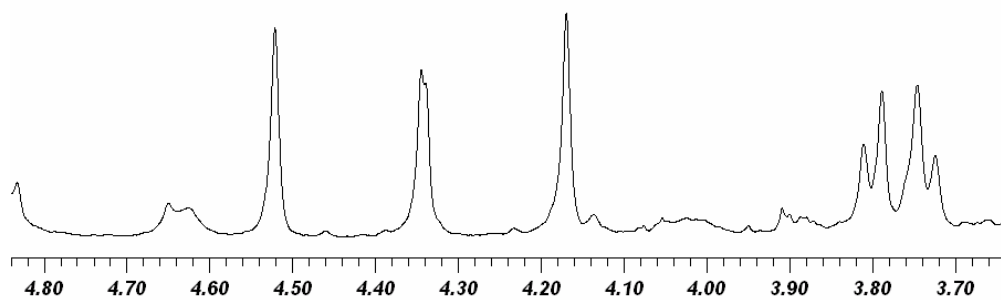
E R ¹H-2. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



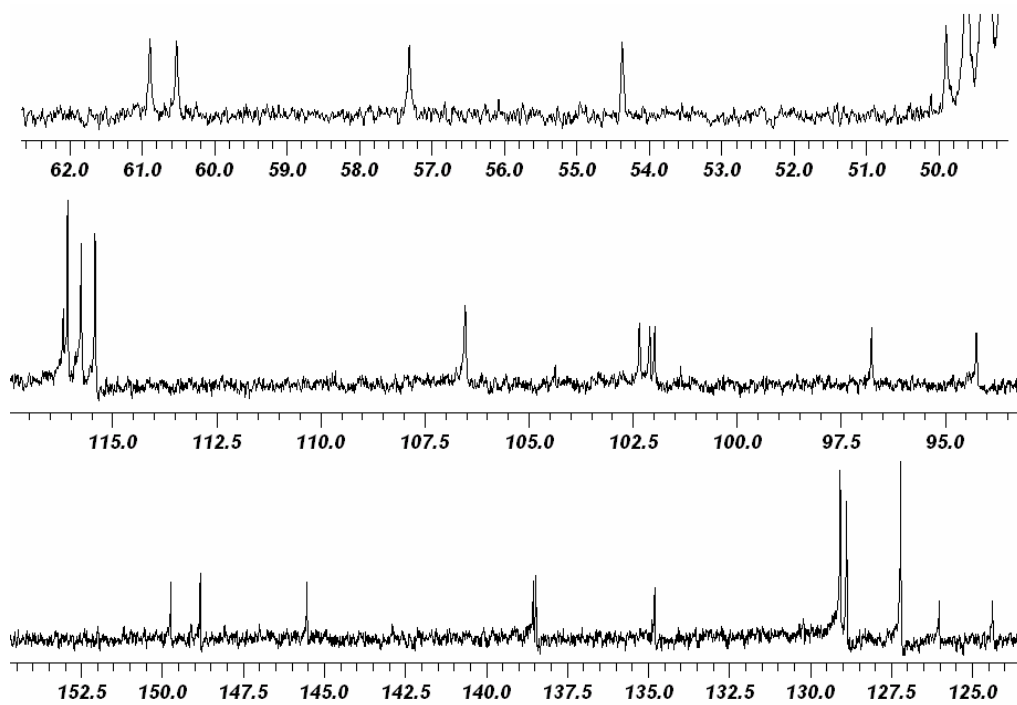
E R ¹H-2 - Expansão 1. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



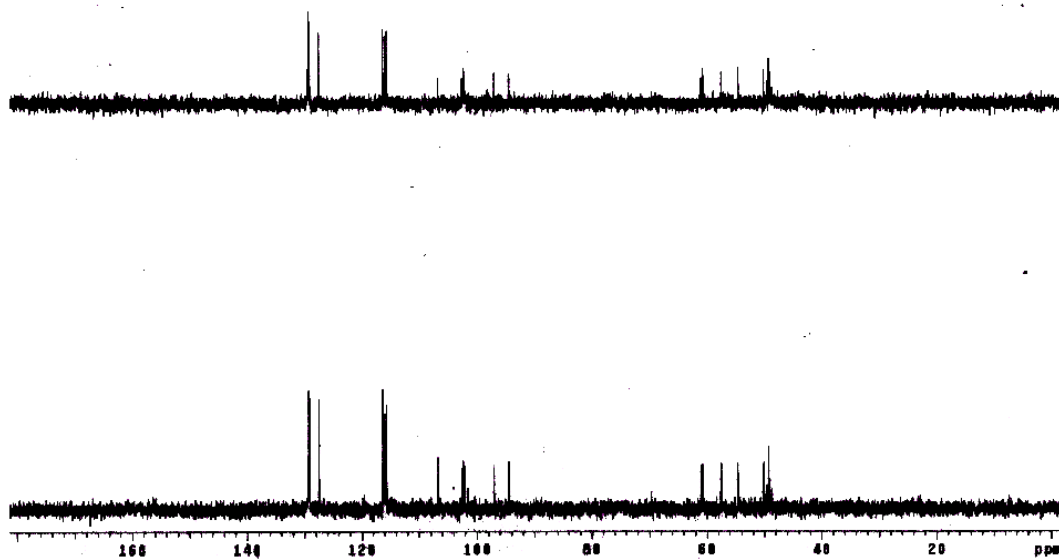
E R ¹H-2 - Expansão 2. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



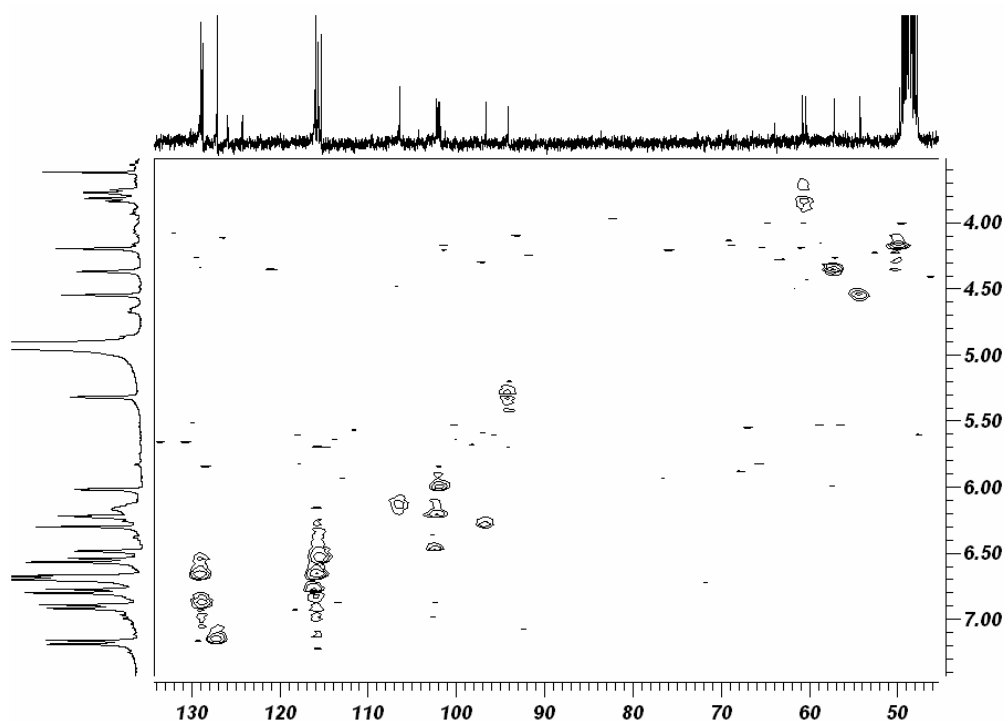
E R ¹H-2 - Expansão 3. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



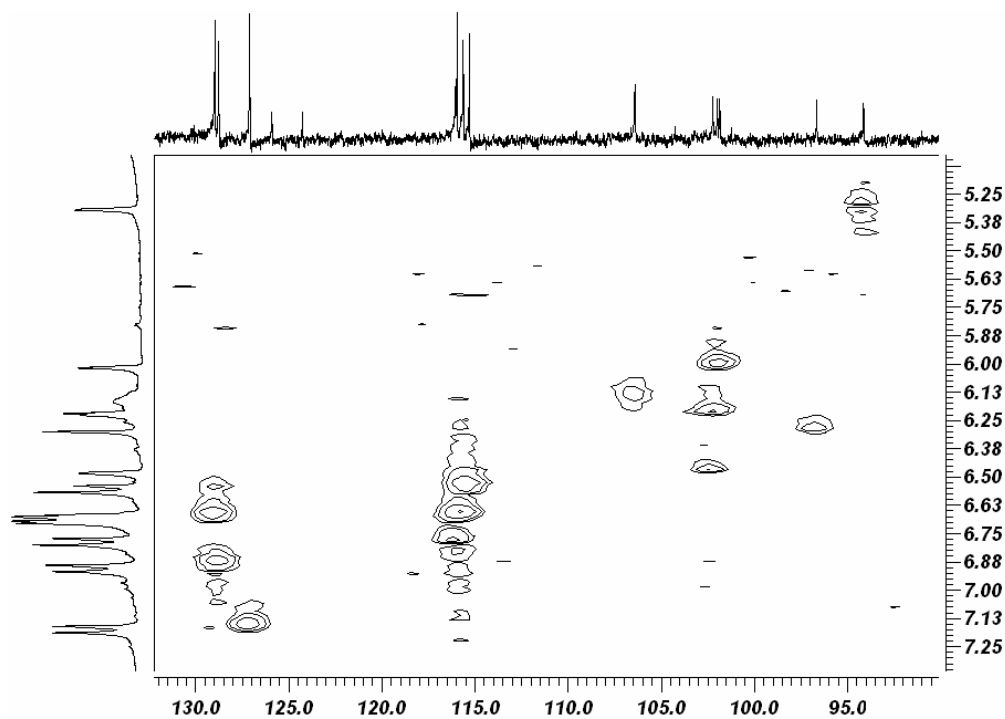
E R ^{13}C -2. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE - 02.



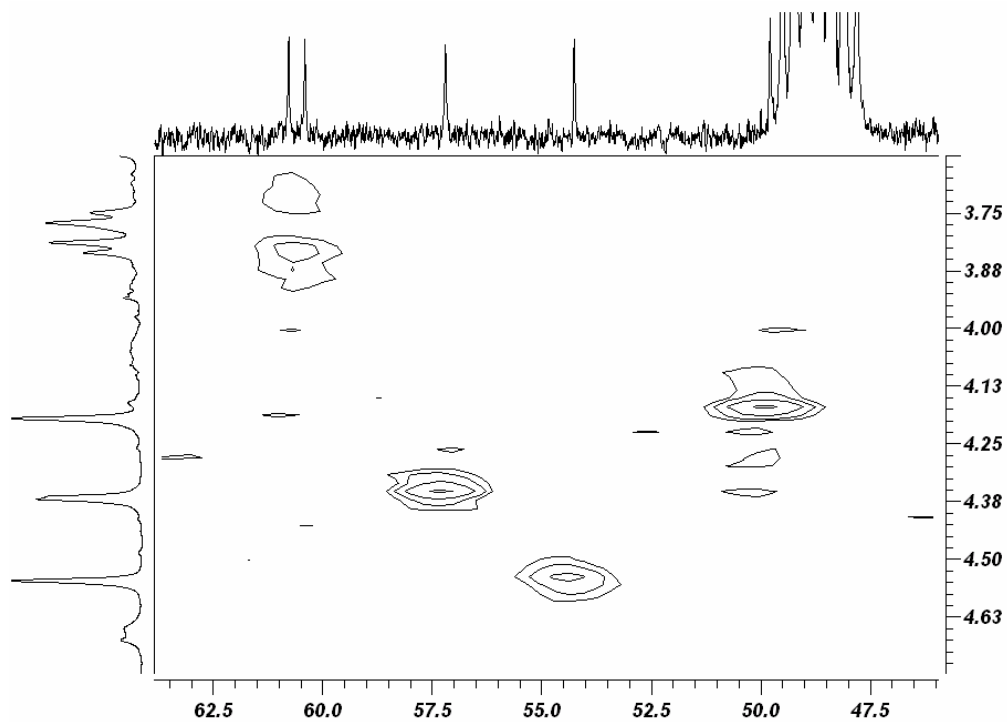
E R DEPT-2. Espectro de RMN de DEPT (75,45MHz, $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$) do composto CE - 02.



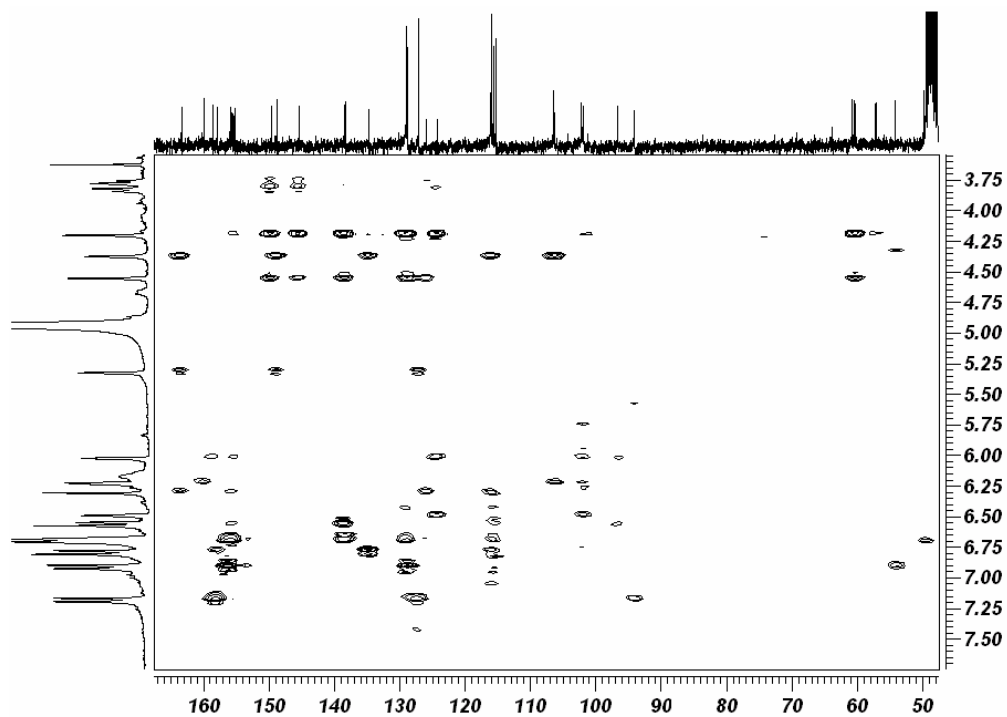
E R HMQC-2. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-02.



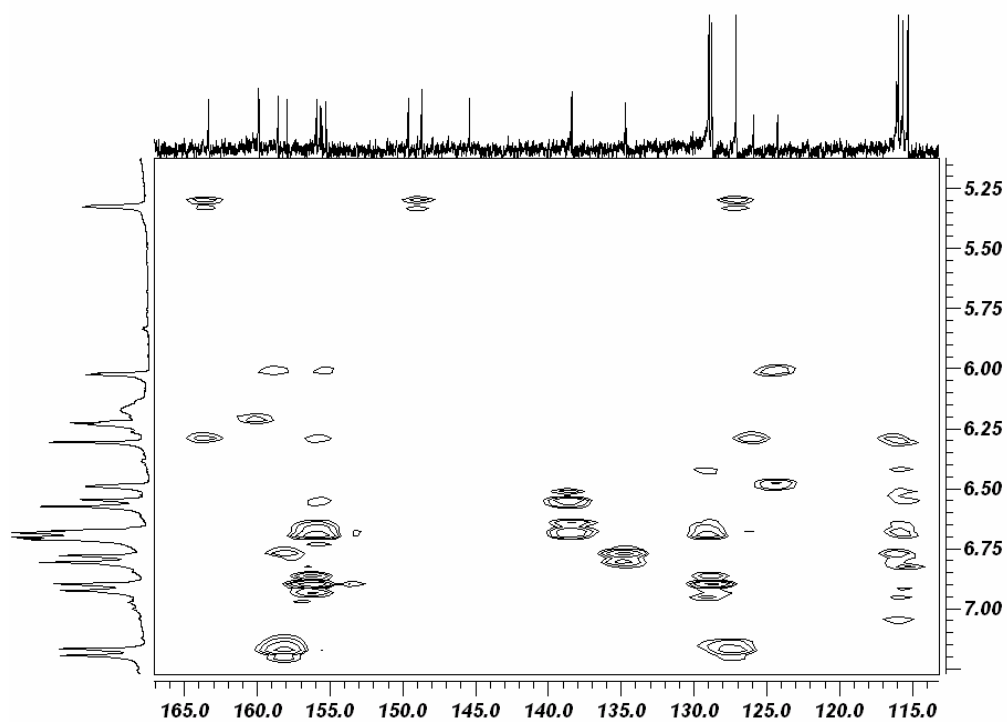
E R HMQC-2 - Expansão 1. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-02.



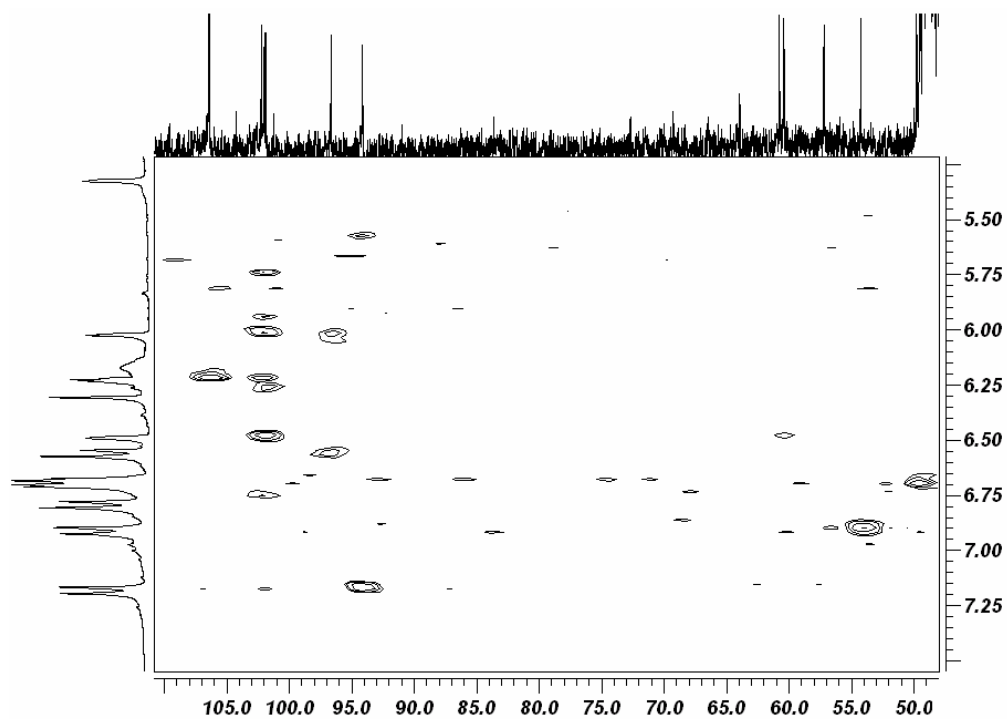
E R HMQC-2 - Expansão 2. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-02.



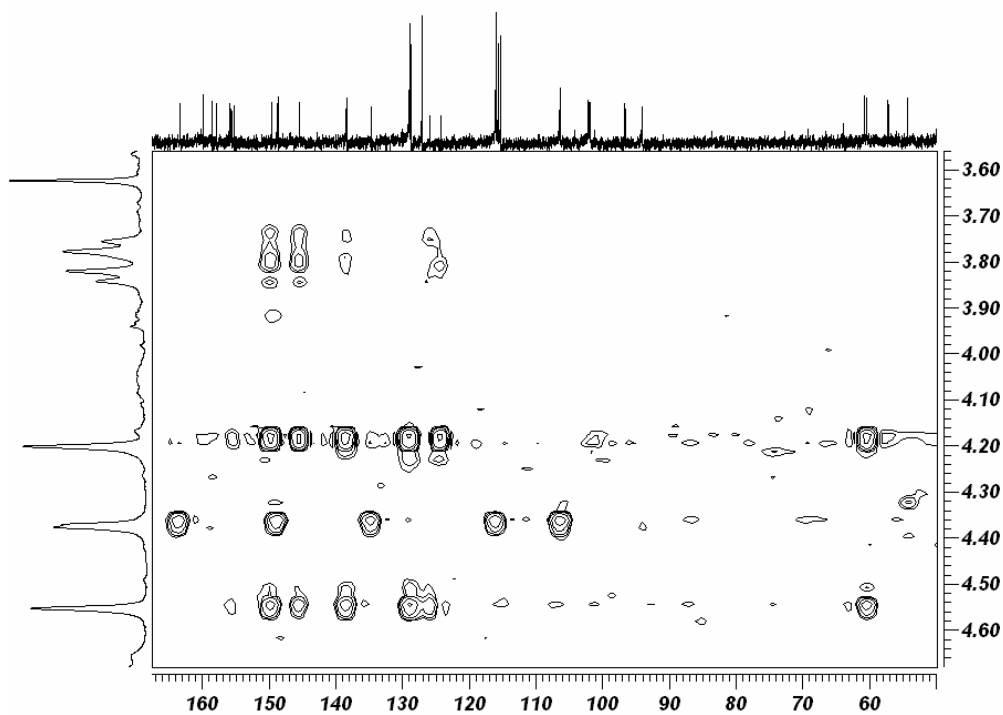
E R HMBC-2 Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-02.



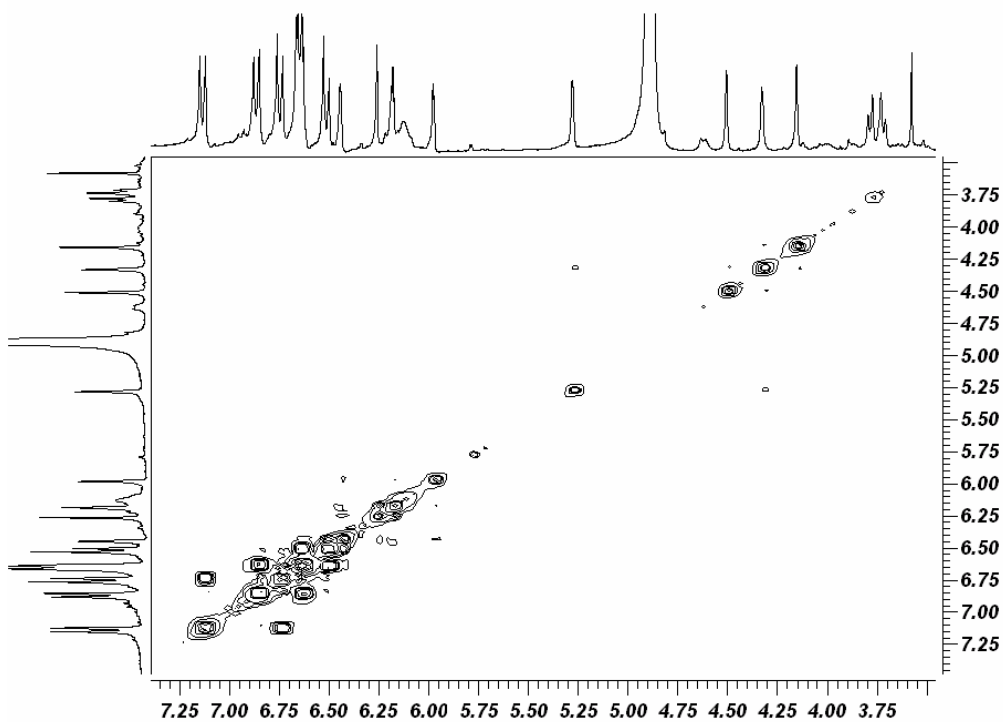
E R HMBC-2 - Expansão 1. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-02.



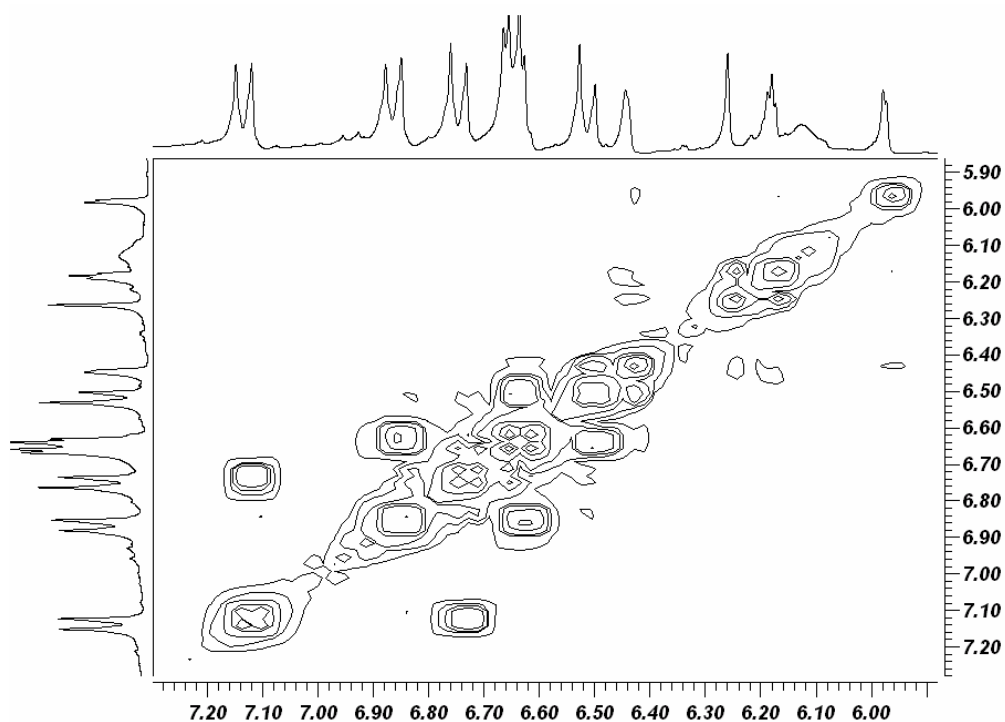
E R HMBC-2 - Expansão 2. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-02.



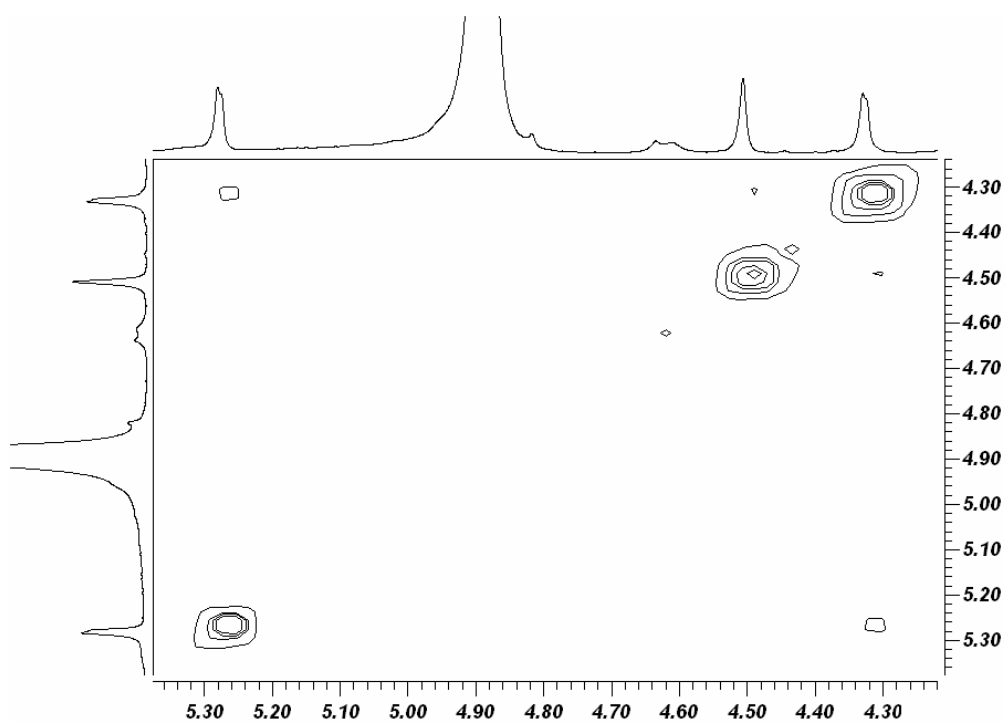
E R HMBC-2 - Expansão 3. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-02.



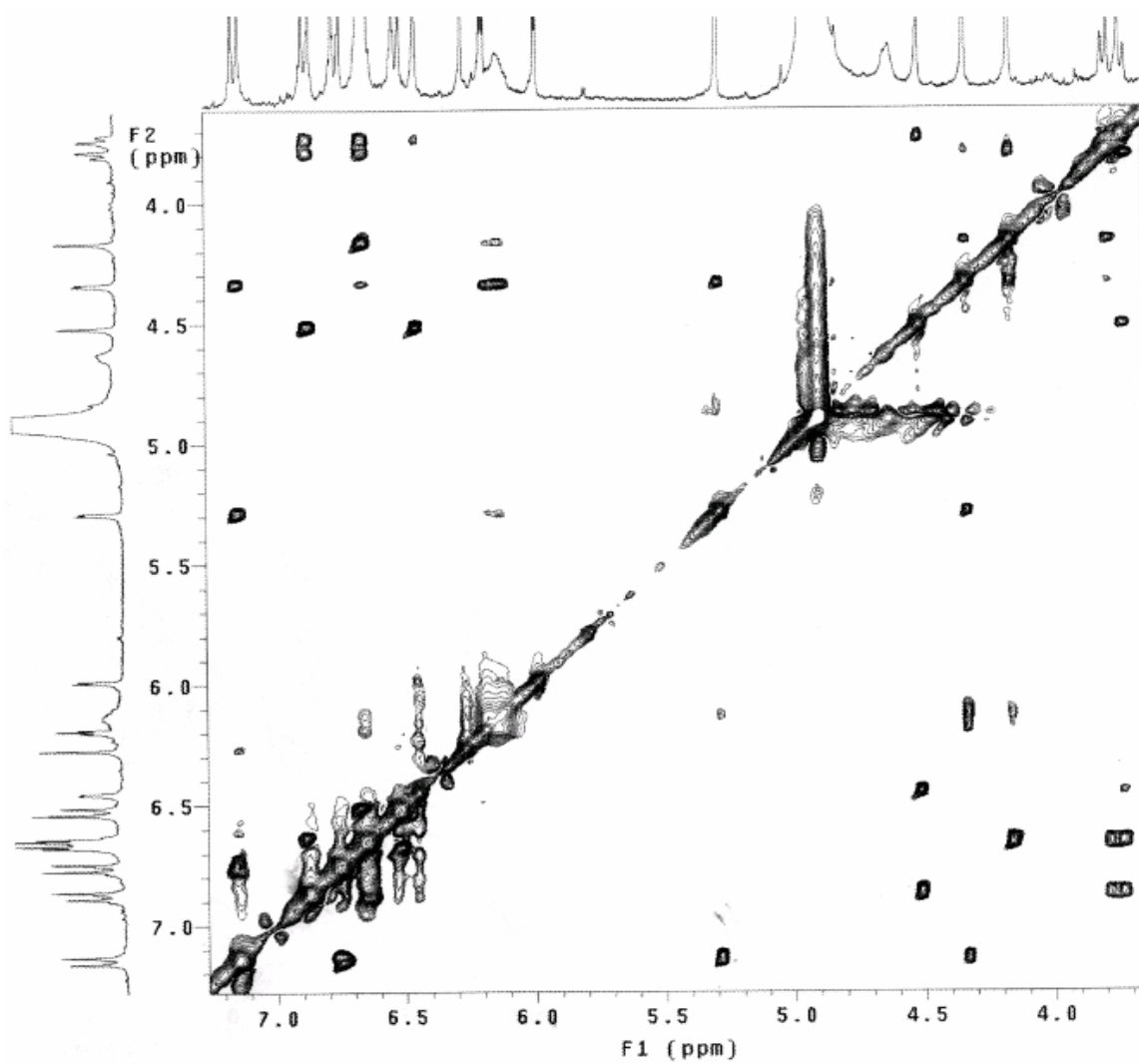
E R COSY-2. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-02.



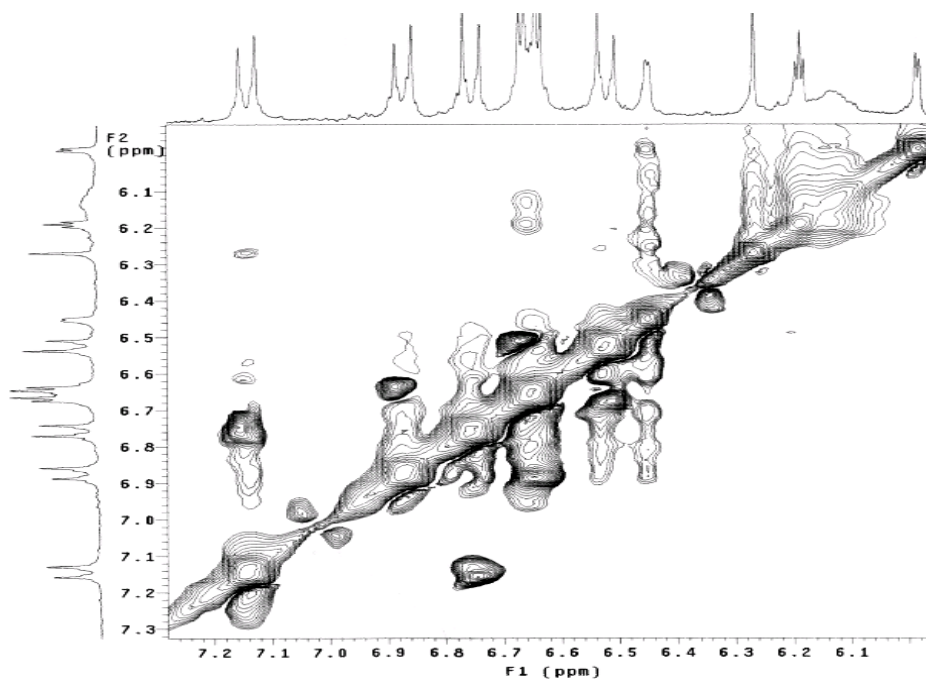
E R COSY-2 - Expansão 1. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



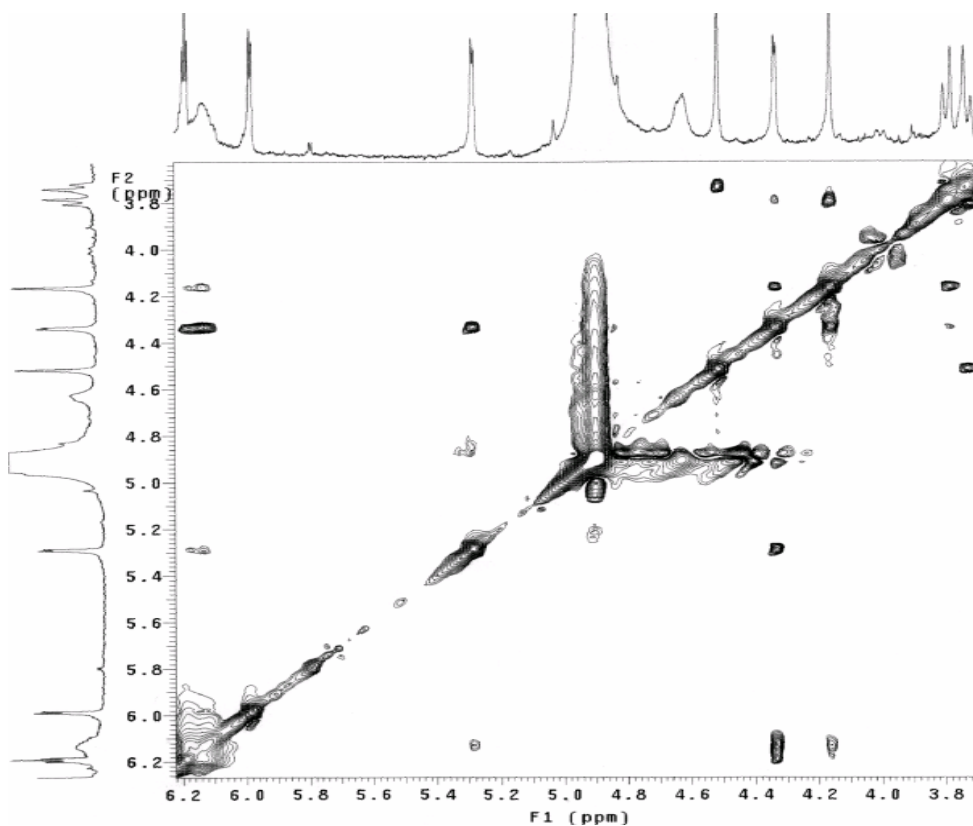
E R COSY-2 - Expansão 2. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



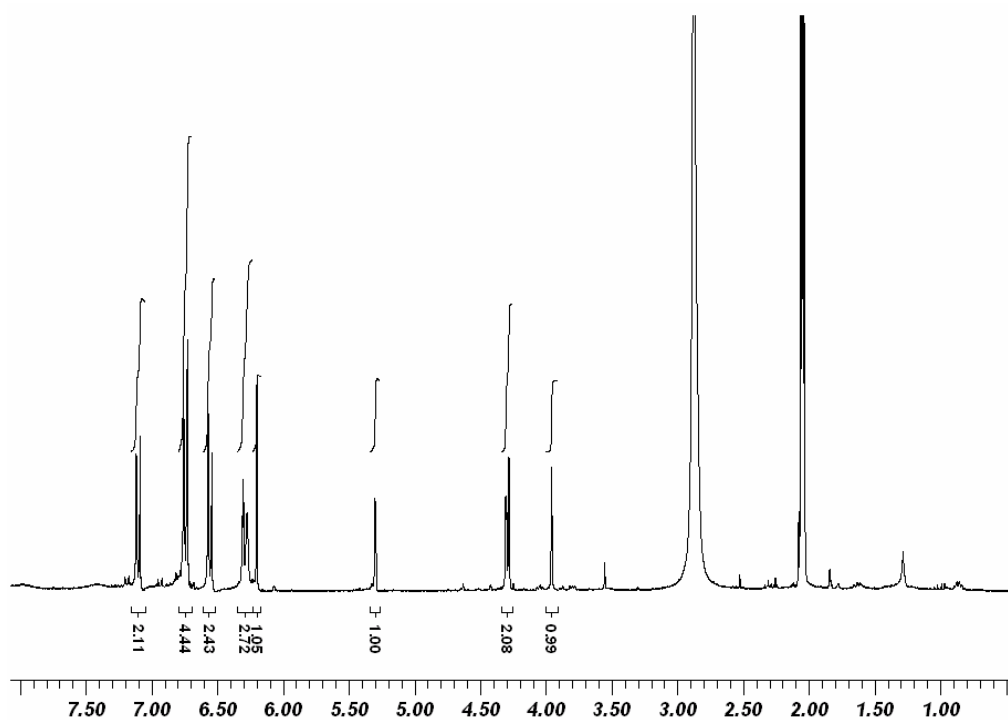
E R NOESY-2. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



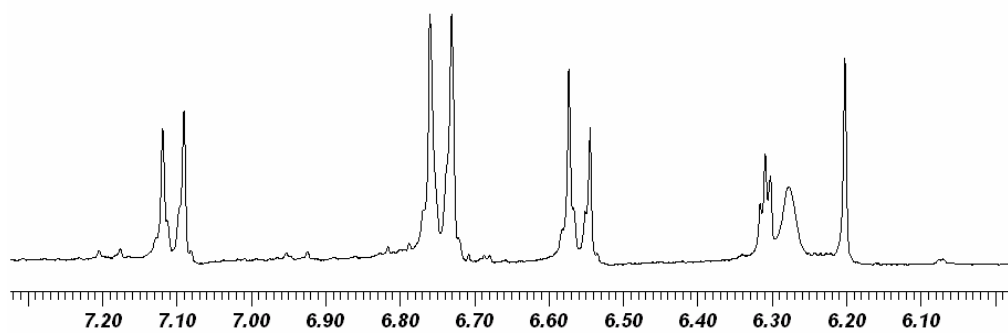
E R NOESY-2 - Expansão 1. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



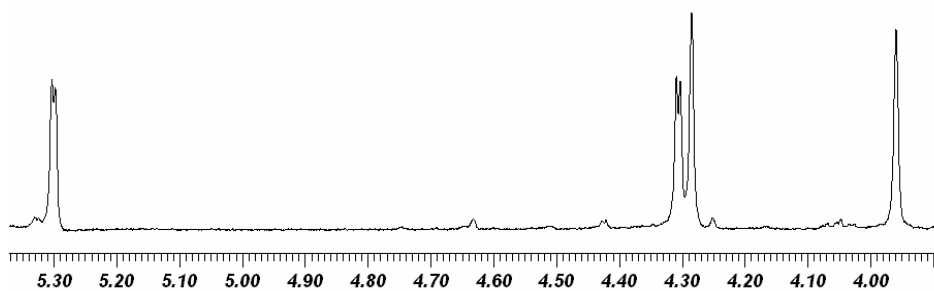
E R NOESY-2 - Expansão 2. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-02.



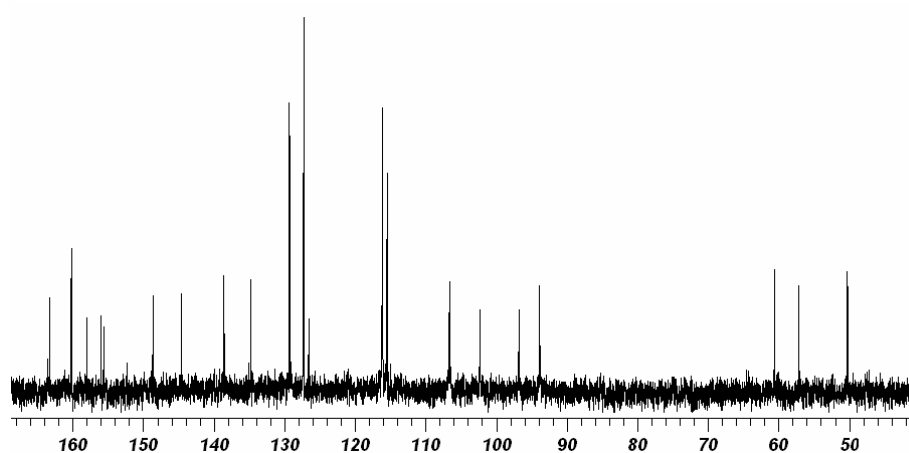
E R ¹H-3. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, (CD₃)₂CO/TMS) do composto CE-04.



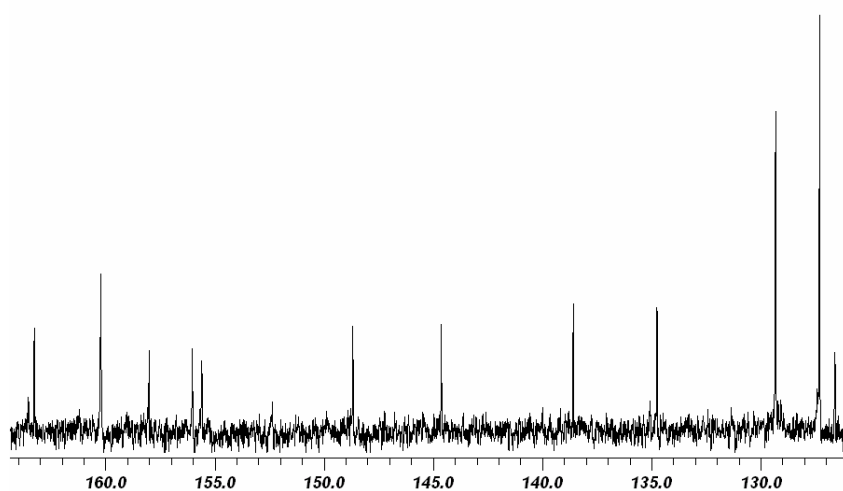
E R ¹H-3 - Expansão 1. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, (CD₃)₂CO/TMS) do composto CE-04.



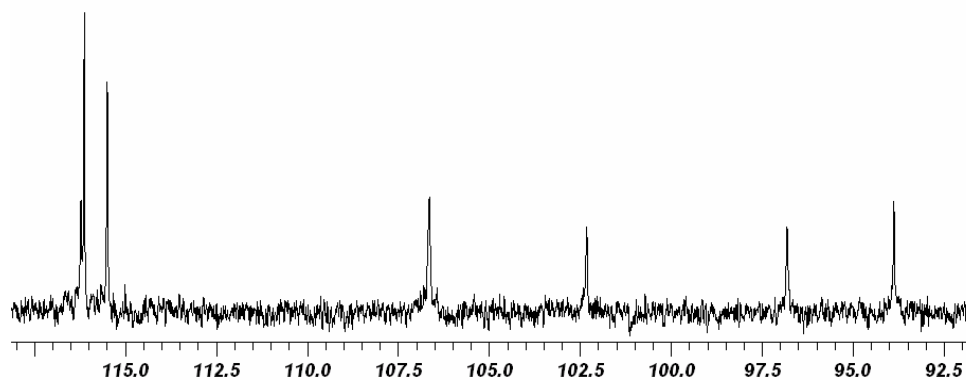
E R ¹H-3 - Expansão 2. Espectro de RMN de ¹H (300,06MHz, (CD₃)₂CO/TMS) do composto CE-04.



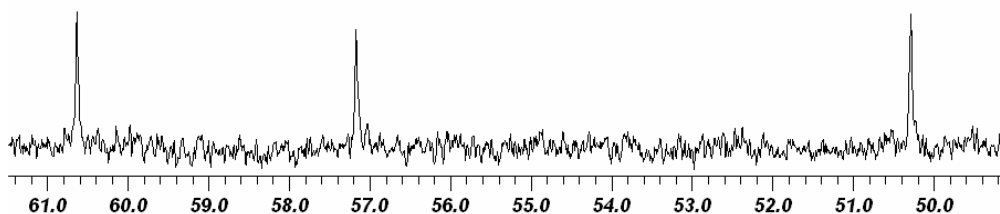
E R ¹³C-3. Espectro de RMN de ¹³C (75,45MHz, (CD₃)₂CO/TMS) do composto CE - 04.



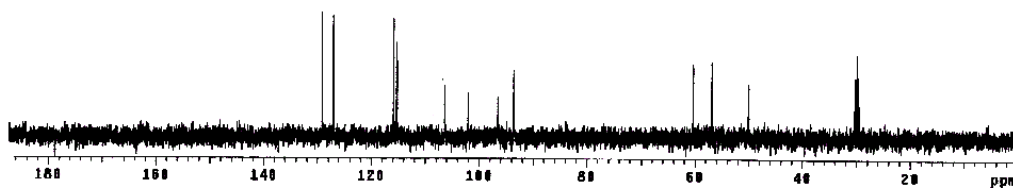
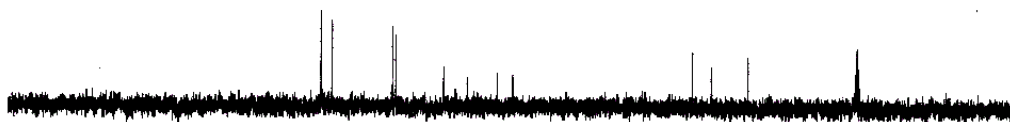
E R ¹³C-3 - Expansão 1. Espectro de RMN de ¹³C (75,45MHz, (CD₃)₂CO/TMS) do composto CE - 04.



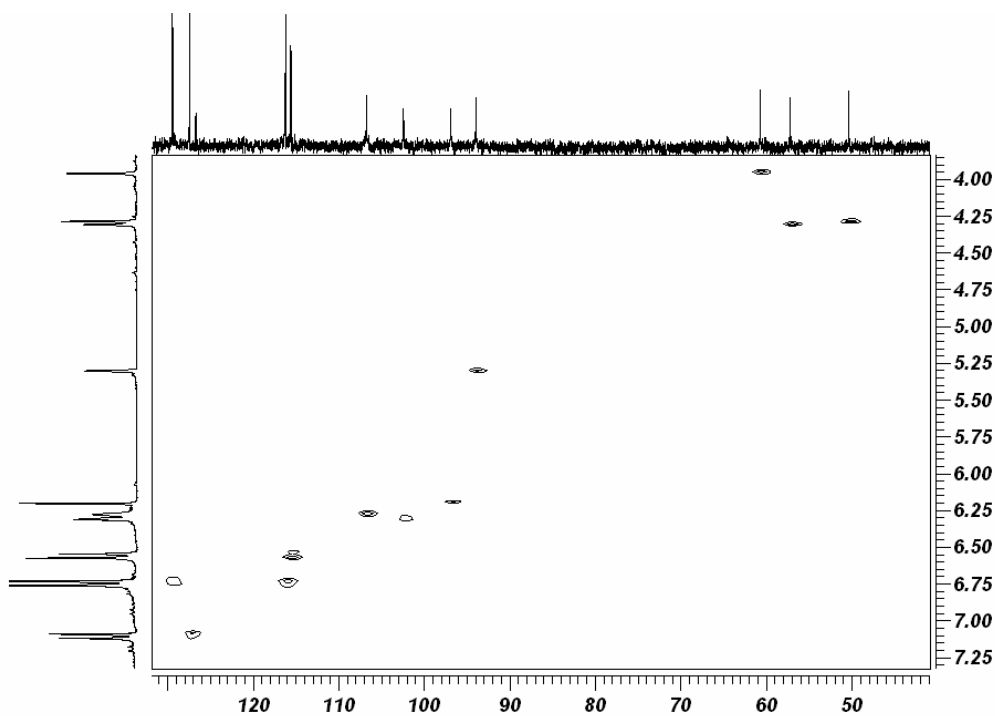
E R ^{13}C -3 - Expansão 2. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE - 04.



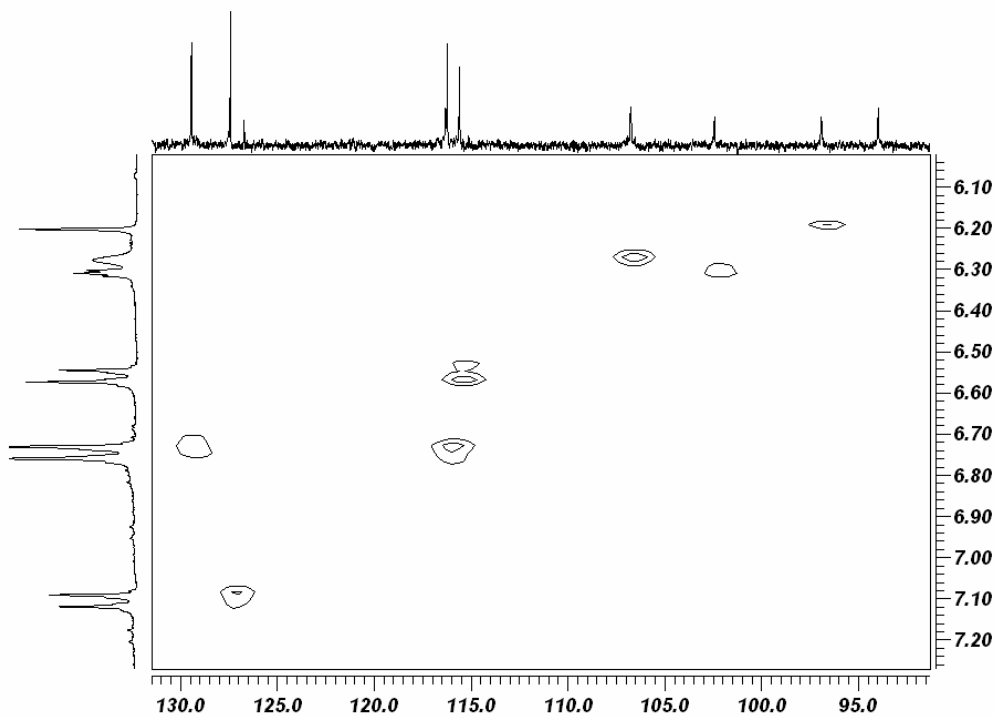
E R ^{13}C -3 - Expansão 3. Espectro de RMN de ^{13}C (75,45MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE - 04.



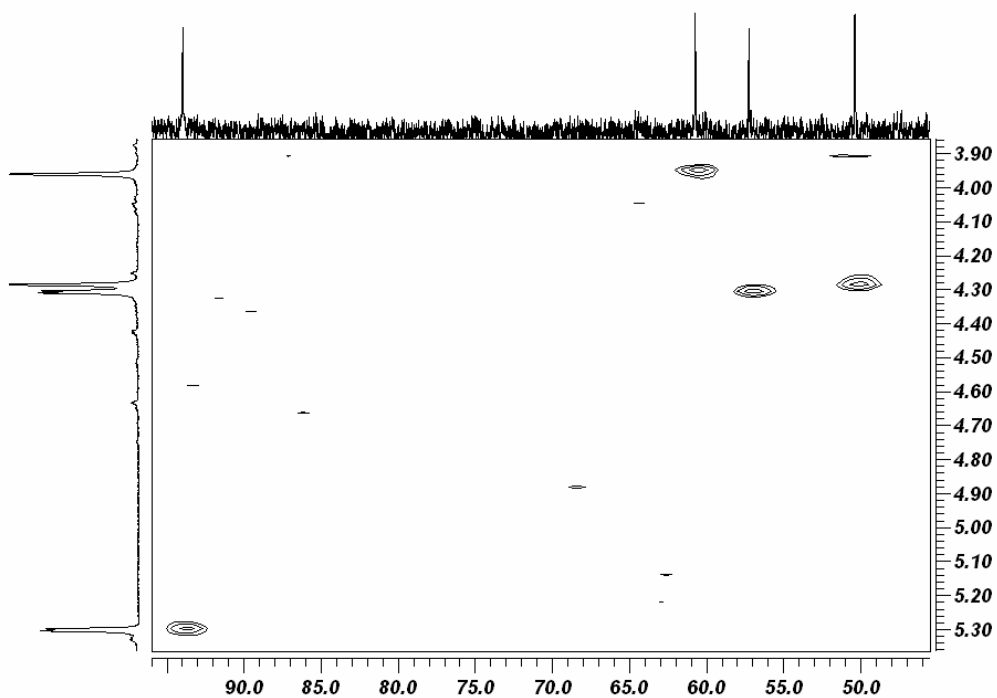
E R DEPT-3. Espectro de RMN de DEPT (75,45MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE - 04.



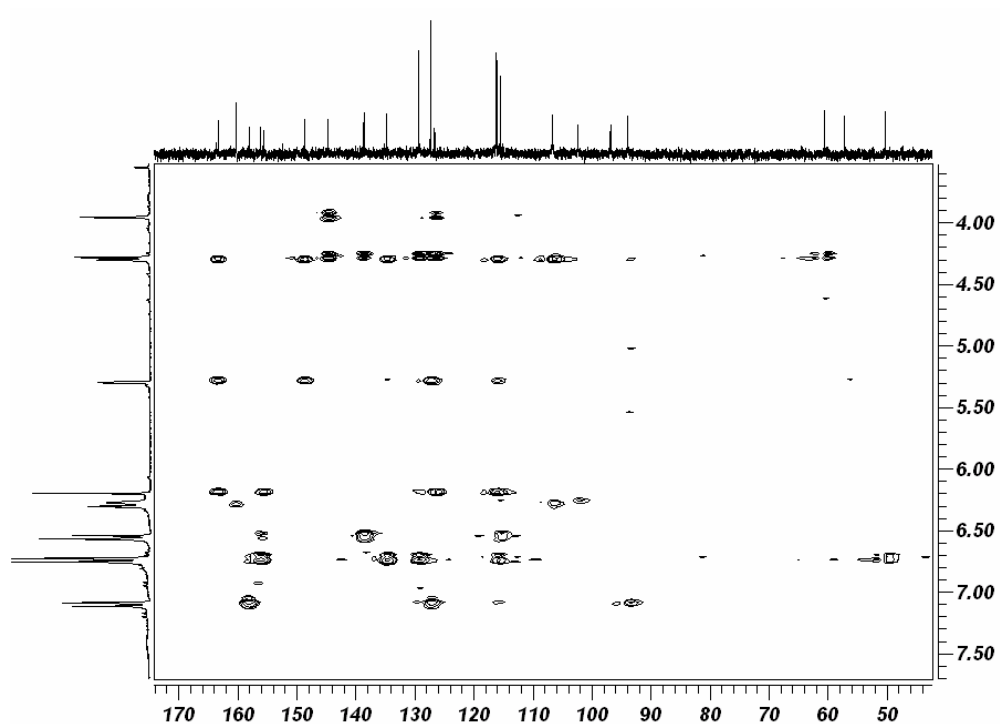
E R HMQC-3. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.



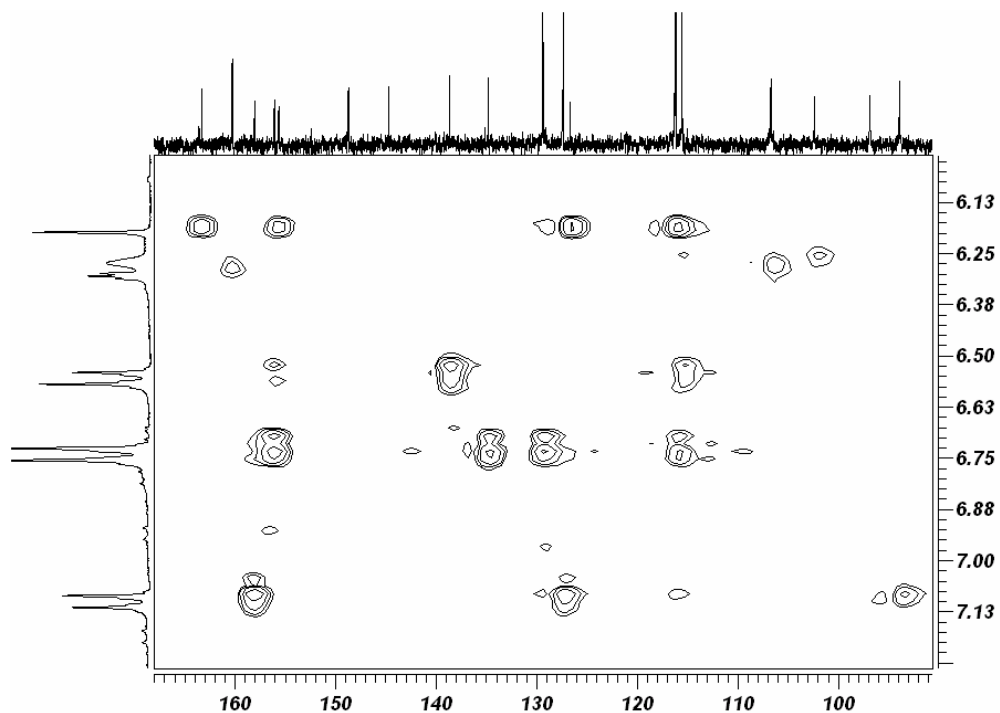
E R HMQC-3 - Expansão 1. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) do composto CE-04.



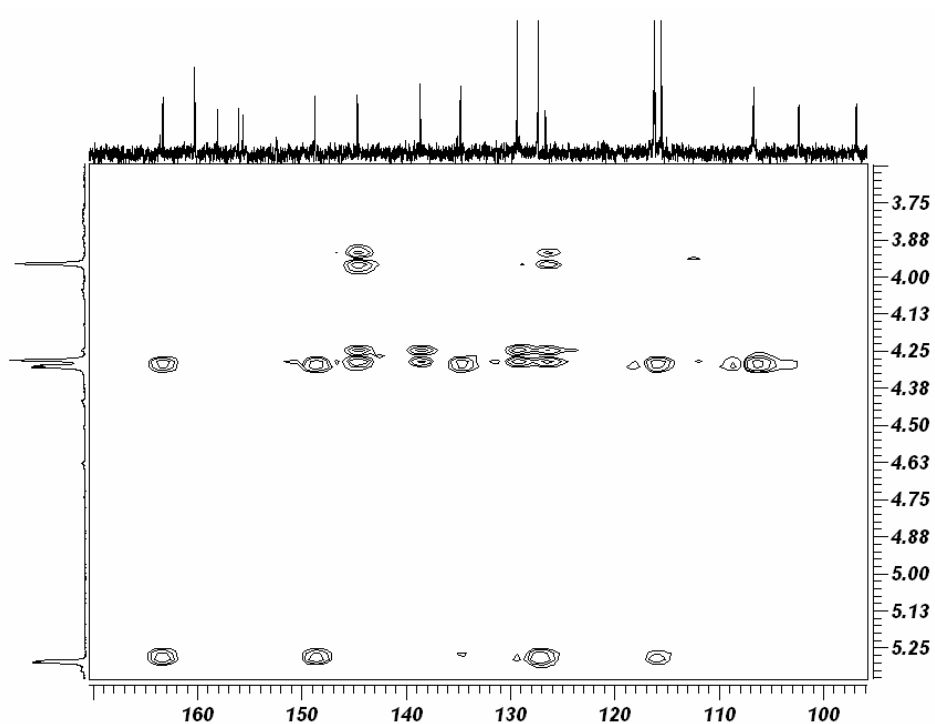
E R HMQC-3 - Expansão 2. Mapa de contornos HMQC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE-04.



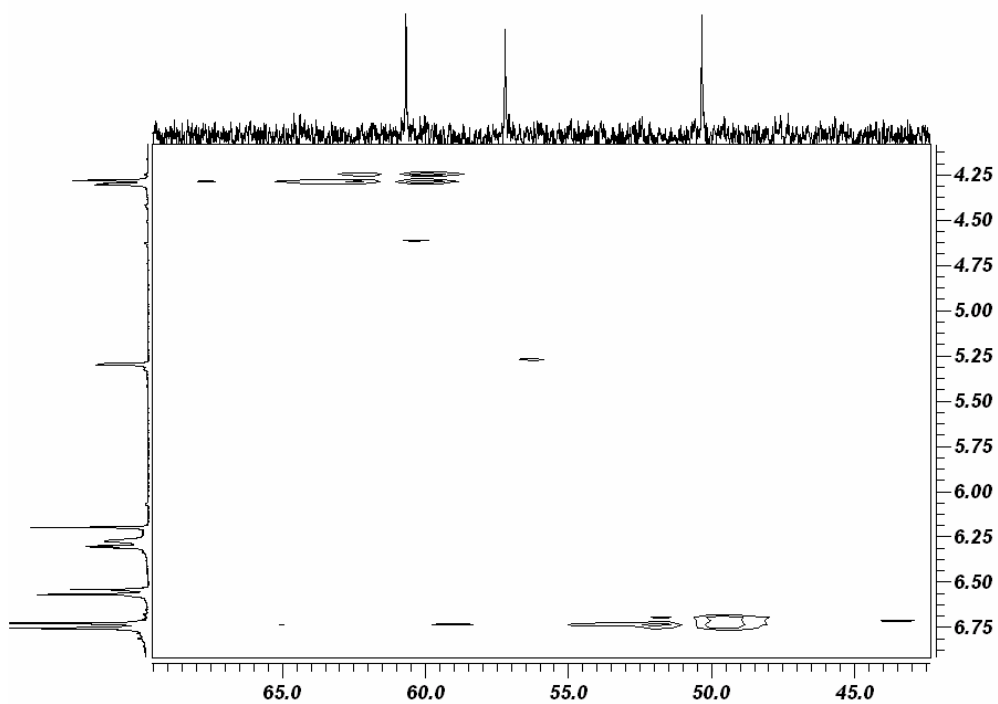
E R HMBC-3. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE-04.



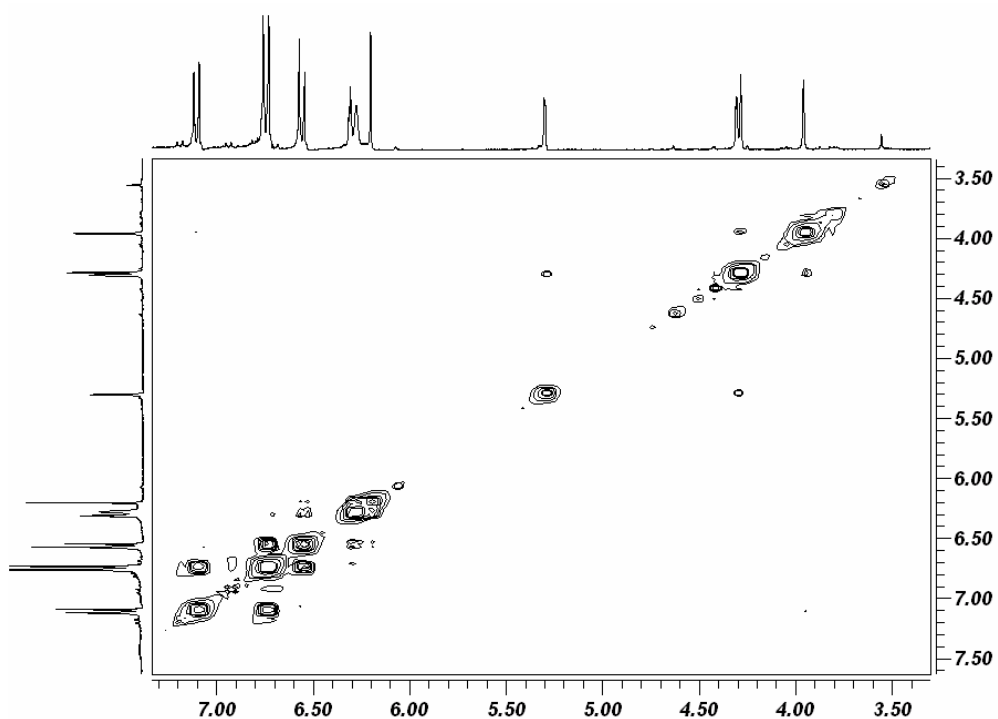
E R HMBC-3 - Expansão 1. Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE-04.



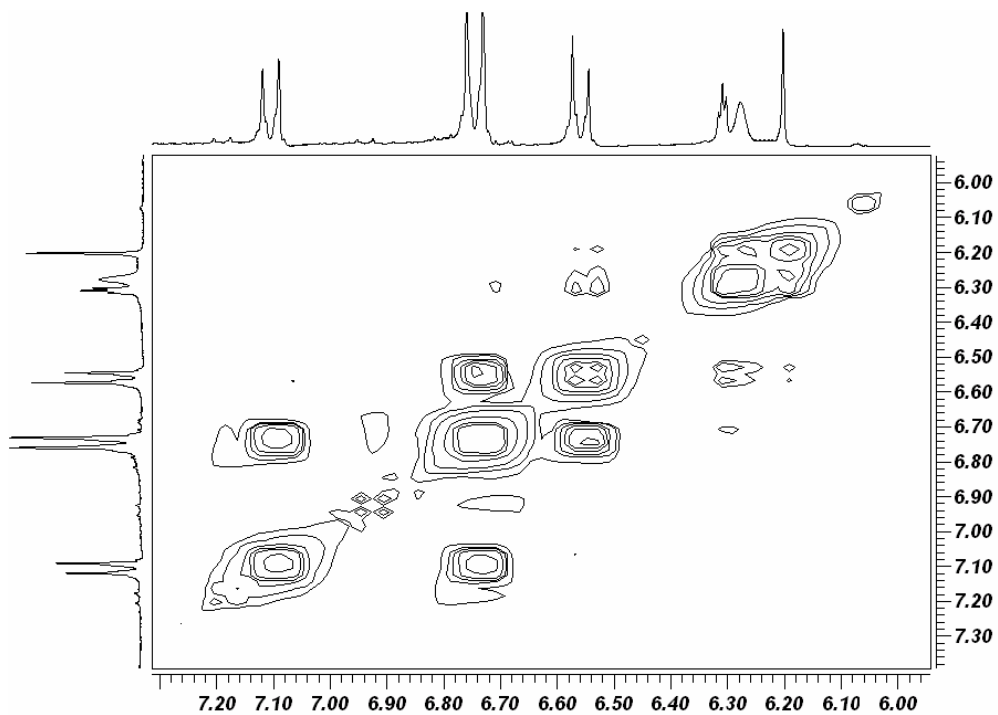
E R HMBC-3 - Expansão 2 Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE-04.



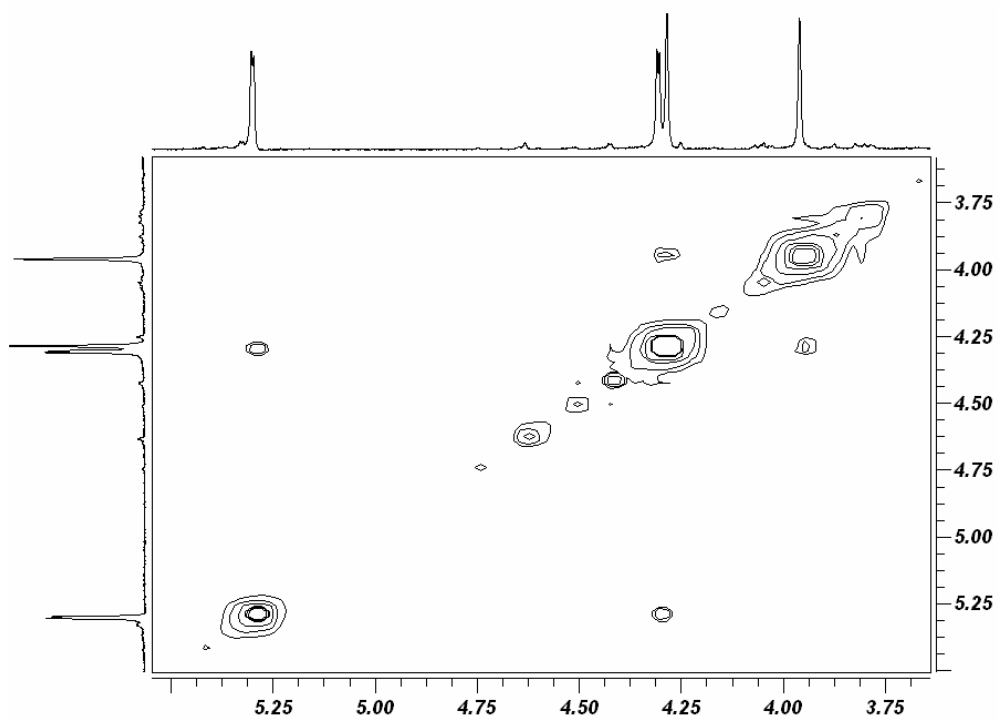
E R HMBC-3 - Expansão 3 Mapa de contornos HMBC (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE-04.



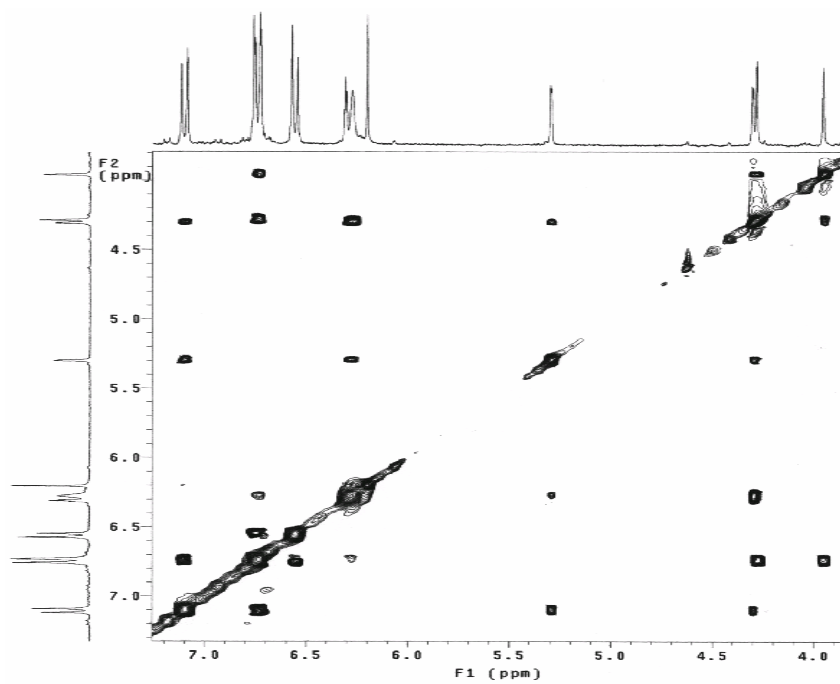
E R COSY-3. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, $\text{CD}_3\text{OD}/\text{TMS}$) do composto CE-03.



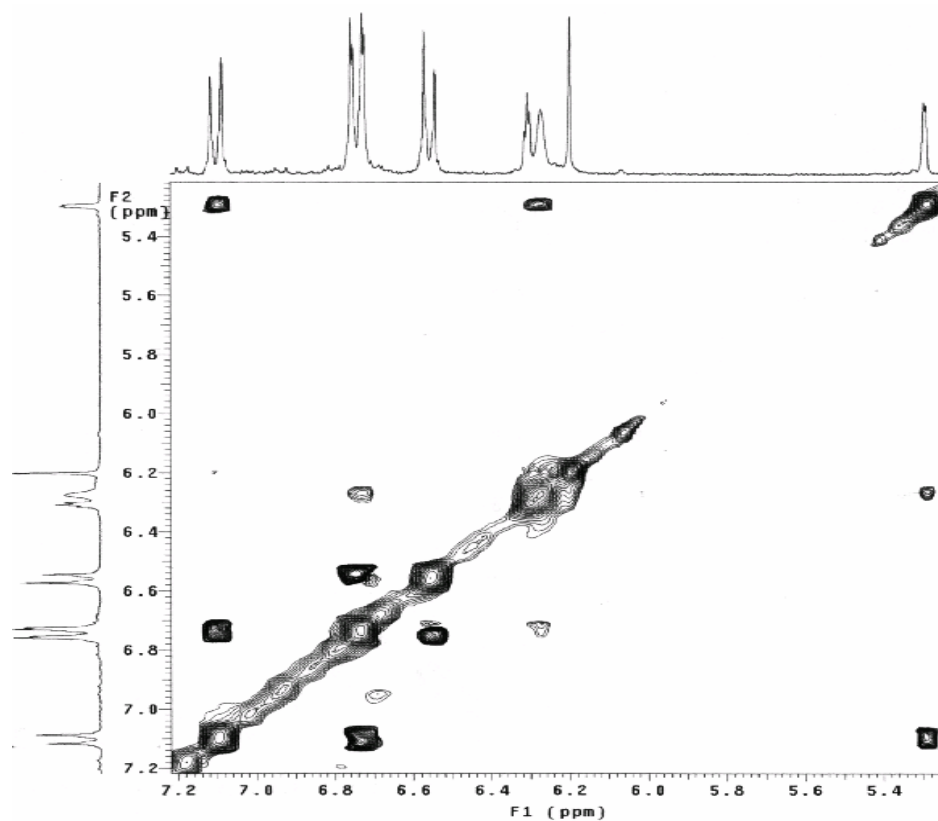
E R COSY-3. Expansão 1. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, CD₃OD/TMS) do composto CE-03.



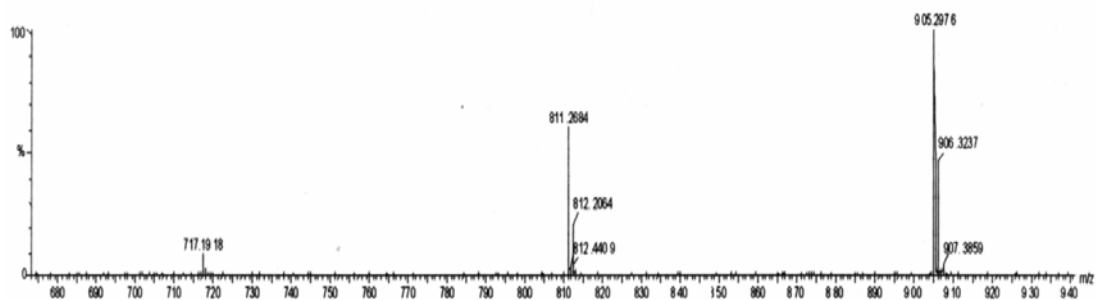
E R COSY-3 - Expansão 2. Mapa de contornos COSY (300,06MHz, (CD₃)₂CO/TMS) do composto CE-04.



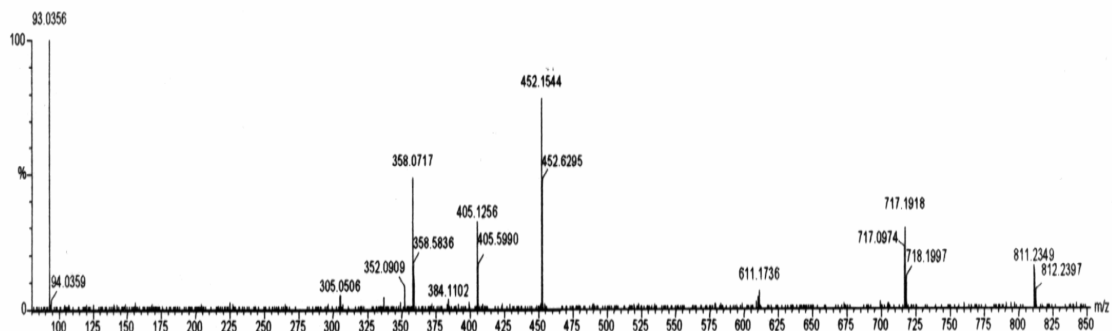
E R NOESY-3. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}/\text{TMS}$) do composto CE-04.



E R NOESY-3 - Expansão 1. Mapa de contornos de NOESY (300,06MHz,
(CD₃)₂CO/TMS) do composto CE-04.



E M-2 - Monocarregado. Espectro de massas do íon monocarregado (ESI-MS/MS) do
composto CE-04.



E M-2 - Dicarregado. Espectro de massas do íon dicarregado (ESI-MS/MS) do
composto CE-04.

TABELAS DE COMPARAÇÃO

Tabela 13. Comparação dos dados de RMN de ^1H , e ^{13}C (300,06MHz para ^1H e 75,45MHz para ^{13}C , $\text{CD}_3\text{OD/TMS}$ e $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) de CE-01 e (-) palidol.

	CE-01		(-) Palidol^{26,27}	
	δ_{C} (DEPT)	HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ H: δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$, nº de H)	δ_{C} (DEPT)	HMQC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ H: δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$, nº de H)
1,1'	150,8 (2C)	-	150,4 (2C)	-
2,2'	103,3 (2CH)	6,52 (d, 1,8; 2H)	103,5 (2CH)	6,18 (t, 2,1; 2H)
3,3'	159,3 (2C)	-	159,5 (2C)	-
4,4'	102,5(2CH)	6,10 (d, 1,8; 2H)	102,7(2CH)	6,05 (d, 2,4; 2H)
5,5'	155,3 (2C)	-	155,4 (2C)	-
6,6'	123,8 (2C)	-	123,4 (2C)	-
7,7'	61,0 (2CH)	3,72 (s, 2H)	60,6 (2CH)	3,75 (s, 2H)
8,8'	54,7 (2CH)	4,46 (s, 2H)	54,2 (2CH)	3,95 (s, 2H)
9, 9'	138,4 (2C)	-	137,9 (2C)	-
10, 10'(14, 14')	129,2 (4CH)	6,92 (d, 8,7; 4H)	129,2 (2CH); 129,5 (2CH)	7,05 (d, 8,5; 4H)
11, 11'(13, 13')	116,0 (4CH)	6,64 (d, 8,7; 4H)	115,9 (4CH)	6,79 (d, 8,5; 4H)
12, 12'	156,3 (2C)	-	156,5 (2C)	-
OH	-	-	-	8,05 - 8,37 (6H)

Tabela 14. Comparação dos dados de RMN de ^1H , e ^{13}C (300,06 e 400 MHz para ^1H ; 75,45 e 100 MHz para ^{13}C , $(\text{CD}_3)_2\text{CO/TMS}$) de CE-04 e Nepalensinol B.

	CE-04		Nepalensinol B ³⁰	
	δ_{C} (DEPT)	HMOC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ H: δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$, n° de H)	δ_{C} (DEPT)	HMOC - $^1\text{J}_{\text{CH}}$ H: δ_{H} (mult., $J = \text{Hz}$, n° de H)
1, 1'	144,6(2C)	-	143,9(2C)	-
2, 2'	116,2(2C)	-	115,6(2C)	-
3, 3'	163,3(2C)	-	162,6(2C)	-
4, 4'	96,8(2CH)	6,20 (s, 2H)	96,1(2CH)	6,20 (s, 2H)
5, 5'	155,6(2C)	-	154,9(2C)	-
6, 6'	126,6(2C)	-	125,9(2C)	-
7, 7'	60,6(2CH)	3,96 (s, 2H)	59,9(2CH)	3,97 (s, 2H)
8, 8'	50,3(2CH)	4,29 (s, 2H)	49,6(2CH)	4,29 (s, 2H)
9, 9'	138,6(2C)	-	137,9(2C)	-
10, 10'	129,3(4CH)	6,75 (d, 8,4; 4H)	128,6(4CH)	6,75 (d, 8,5; 4H)
(14, 14')				
11, 11'	115,5(4CH)	6,56 (d, 8,4; 4H)	114,8(4CH)	6,56 (d, 8,5; 4H)
(13, 13')				
12, 12'	156,1(2C)	-	155,3(2C)	-
1'', 1'''	148,7(2C)	-	148,0(2C)	-
2'', 2'''	106,7(4CH)	6,28 (sl, 4H)	106,0(4CH)	6,29 (sl, 4H)
(6'', 6''')				
3'', 3'''	160,2(4C)	-	159,5(4C)	-
(5'', 5''')				
4'', 4'''	102,3(2CH)	6,31 (t, 2,1; 2H)	101,6(2CH)	6,31 (t, 2,0; 2H)
7'', 7'''	57,2(2CH)	4,31 (d, 1,8; 2H)	56,4(2CH)	4,31 (d, 1,7; 2H)
8'', 8'''	93,9(2CH)	5,30 (d, 1,8; 2H)	93,2(2CH)	5,31 (d, 1,7; 2H)
9'', 9'''	134,8(2C)	-	134,0(2C)	-
10'', 10'''	127,3(4CH)	7,11 (d, 8,4; 4H)	126,6(4CH)	7,11 (d, 8,5; 4H)
(14'', 14''')				
11'', 11'''	116,1(4CH)	6,75 (d, 8,4; 4H)	115,4(4CH)	6,75 (d, 8,5; 4H)
(13'', 13''')				
12'', 12'''	158,0(2C)	-	157,3(2C)	-
OH	-	7,40 - 8,40 (10H)	-	7,94 - 8,70 (10H)