



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS - GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

GEORGE EWERTON DA SILVA

Caracterização fitoquímica e atividade biológica da parte aérea e raiz de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae)

Recife, 2016

GEORGE EWERTON DA SILVA

Caracterização fitoquímica e atividade biológica da parte aérea e raiz de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler(Cyperaceae)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Ciências biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Biologia Química para saúde

Orientador: Prof. Dr. Sebastião José de Melo

Recife,2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, George Ewerton da

Caracterização fitoquímica e atividade biológica da parte aérea e raiz de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae) / George Ewerton da Silva - Recife: O Autor, 2016.

71 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Sebastião José de Melo

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2016.

Inclui referências

1. Plantas medicinais 2. Fitoquímicos 3. Cyperaceae I. Melo, Sebastião José de (orient.) II. Título

581.634

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017- 420

Caracterização fitoquímica e atividade biológica da parte aérea e raiz de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, do Centro de Ciências biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de mestre.

Data de aprovação: 22 / 02 / 2016

Banca Examinadora:

PRESIDENTE E PRIMEIRO EXAMINADOR INTERNO: Prof^o. Dr. Sebastião José de Melo
(**Depto. Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco**)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof^a. Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima
(**Depto. Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco**)

Assinatura: _____

PRIMEIRO EXAMINADOR EXTERNO: Prof^o. Dr. Silene Carneiro Nascimento
(**Depto. Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco**)

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Após dois anos de lutas, desafios, frustrações e conquistas, venho agradecer à vida que trilhei até aqui e principalmente às pessoas que fazem parte dessa minha história.

À **Universidade Federal de Pernambuco**, ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas** e à **FACEPE** pela oportunidade.

Agradeço a minha mãe, meu pai, minha irmã e minha avó, por serem sempre minha base firme e meu porto seguro.

Agradeço aos meus amigos Residentes: Feipe Ribeiro, Giovana Meimberg, Gêssica Price, Maria Walquiria, Robélia Cristine e Andreza Porfirio; vocês me sustentaram muito, e sempre me deram forças quando eu mais precisei, dividimos nossas vidas e sempre que tive medo e vontade de parar vocês me mostravam o quanto era importante tudo que eu estava fazendo. Jamais esquecerei dos nossos momentos juntos e sempre serei muito grato por fazerem parte da minha vida.

Agradeço a Dona Maria de Pirituba por compartilhar comigo seus conhecimentos fitoterápicos.

Agradeço a meus irmãos do coração: Romulo Sampaio, Douglas Rodrigues e Luiz Vencerlau; pela parceria desde os tempos de faculdade e pela força que sempre me deram e por sempre me apoiarem.

Agradeço a Gustavo Dimech, José Antonio Junior e Gibson por me inspirarem a seguir uma carreira acadêmica.

Agradeço às professoras Dr^a Glaucia Manoella UFPEDA e Dr^a Daniella DQF por fazer parte dessa história trilhada através da parceria em seu laboratório com grande paciência e dedicação.

Agradeço aos meus amigos de Laboratório: Zenaide e mais uma vez Romulo Sampaio, vocês fazem parte dessa história muito obrigado.

Agradeço às amigas do laboratório do DQF Camila, Patrícia e Beatriz pela disponibilidade da parceria firmada e dedicação que cada uma teve com esse trabalho.

A professora Dr^a Elba Lúcia por fazer parte de minha história acadêmica. Me ensinando, sendo sempre muito atenciosa, companheira e por fazer parte, sem dúvida alguma, dos melhores momentos desta jornada.

Agradeço ao Meu orientador, Sebastiao José, pela paciência, confiança, credibilidade e todo seu esforço vindo do seu imensurável conhecimento científico e humano.

Agradeço ao Professor e amigo Haroudo Sátiro, pela oportunidade que me deu em seu laboratório quando eu ainda era um graduando, observar seu trabalho foi enriquecedor, e uma honra estar ao seu lado numa bancada de laboratório.

Agradeço aos meus animais: Jhonny, Lucy e Galego Silva; vocês são e sempre serão minha válvula de escape. Incrível como vocês me entendem apenas com o olhar.

Agradeço aos meus dois mais novos amigos, que foram parte muito importante nessa história Anne Costa e Sollon. Vocês me dão o apoio emocional que eu sempre preciso e me mantem com a chama acesa sempre, nunca deixando eu baixar a cabeça e sempre alegram meu dia, que bom que encontrei vocês.

E por fim e o mais importante: agradeço a DEUS, por ser tão presente em minha vida e por colocar em minha vida pessoas tão maravilhosas.

“Se avexe não
Toda caminhada começa
No primeiro passo
A natureza não tem pressa
Segue seu compasso
Inexoravelmente chega lá”

(Flavio José)

RESUMO

Rynchospora nervosa, monocotiledônea, pertencente a família Cyperaceae encontrada em áreas tropicais e subtropical. No Brasil os representantes deste grupo são utilizados por possuírem algumas atividades biológicas, como por exemplo a atividade hipoglicemiante, e bactericida. De acordo com a literatura espécie utilizada, também conhecida popularmente como capim estrela, não possui estudos anteriores. Desse modo, o mesmo contribui para a elucidação dos compostos presentes na planta bem como para o conhecimento das atividades microbiológicas e farmacológicas testadas. No trabalho foi realizado um estudo fitoquímico onde foram investigados e identificados os componentes químicos da raiz e da parte aérea da planta, através do método de cromatografia em camada delgada. Foram identificados flavonoides, taninos, triterpenos e esteroides, e proantocianidinas. A atividade antimicrobiana foi realizada com o extrato bruto e com os extratos particionados através do grau de polaridade dos solventes de extração. Confirmando atividade antibacteriana para os extratos oriundos de solventes apolares: hexano, clorofórmio e dicloro metano. Também foi realizado o teste de citotoxicidade utilizando, se linhagens específicas de células tumorais. Foi realizado também a extração dos óleos essenciais da parte aérea e raiz da planta, e posteriormente foi identificado alguns compostos existentes através do CGMS.

Palavras-chave: monocotilédones, extrato, óleo essencial, elucidada.

ABSTRACT

Rhynchospora nervosa, monocot, also known colloquially as star grass, belongs to the Cyperaceae family. It is found in tropical and subtropical areas. In Brazil, representatives of this group are used as they possess a number of biological activities, such as hypoglycemic activity, and as a bactericide. According to the literature, this species has not been previously studied. Thus, a study of it contributes to the elucidation of the compounds present in the plant as well as furthering knowledge of the microbiological and pharmacological activities tested. Phytochemical studies investigated and identified the chemical components of the plant root and shoot using the chromatographic method in thin layers. The following were identified: flavonoids, tannins, triterpenes and steroids, as well as proanthocyanidins. The antimicrobial activity was performed using crude extract and with extracts *differentiated by* the degree of polarity of solvent extraction. Antibacterial activity for extracts derived from non-polar solvents was confirmed for the following: hexane, chloroform and dichloromethane. A cytotoxicity test was applied to identify specific strains of tumor cells. Essential oils from the shoot and root of the plant were extracted and some CGMS compounds were identified.

Keywords: monocots, extract, essential oil, clarified.

LISTA DE SIMBOLO E ABREVIATURAS

µg - micrograma

µg/mL – micrograma por mililitro

µL – microlitro

µm – microméetro

ATCC – American Type Culture Colection

CCD – Cromatografia em camada delgada

CIM – Concentração inibitória mínima

cm – centímetro

CpqAM – Centro de pesquisa Ageu Magalhães

EBA – Extrato bruto aquoso

EBM – Extrato bruto metanólico

EBHF- Extrato bruto hexânico da folha

EBCF- Extrato bruto clorofórmico da Folha

EBDF- Extrato bruto diclorometânico da Folha

EBAF- Extrato bruto em acetato de etila da Folha

FAA – formol, ácido acético, álcool etílico 50%

FDA – Food and Drug Administration

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

IPA - Instituto Pernambucano de Pesquisa Agropecuária

mg - miligrama

mL –mililitro

°C – graus celsius

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVO GERAL	16
3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
4. CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA	18
4.1 Produtos Naturais.....	19
4.2 Família Cyperaceae	21
4.3 Gênero Rhynchospora	22
4.4 Rhynchospora Nervosa (Vahl) Boeck.....	22
4.5 Óleo Essencial.....	24
4.6 Agentes Antimicrobianos	25
4.7 Atividade Antibacteriana	26
4.8 Atividade Citotóxica	27
4.10 Xantofilina.....	30
4.11 Isolamentos Da Substância	31
5. CAPÍTULO II : ARTIGO	33
INTRODUÇÃO	35
MATERIAL E MÉTODOS	37
ATIVIDADES BIOLÓGICAS	38
MÉTODO DE ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO DA MOLÉCULA	41
ANÁLISE DOS CRISTAIS	41
PURIFICAÇÃO DOS CRISTAIS	41
IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA	41
RESULTADOS	42
CONCLUSÃO	46
REFERÊNCIAS	47
LISTA DE TABELAS	57
LISTA DE FIGURAS	64

1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais por populações rurais, é orientada por uma série de conhecimentos acumulados mediante a relação direta dos seus membros com o meio ambiente (MARQUES , 200) e da difusão de uma série de informações tendo como influência o uso tradicional transmitido oralmente entre diferentes gerações. Essa utilização de plantas medicinais como forma alternativa de cura à enfermidades tem como facilitadores a grande diversidade vegetal e o baixo custo associado à terapêutica, proporcionando a sua utilização para os mais variados fins terapêuticos, desde o combate aos diversos tipos de neoplasias até patogenicidades causadas por microrganismos (VIEGAS *et al.*, 2006).

Antes do século XIX, a maioria dos recursos terapêuticos existentes eram constituídos por plantas e extratos, sendo estes a parte qualitativamente mais importante da terapêutica na época (SCHENKEL *et al.*, 2001). Com o aumento progressivo do setor industrial após a segunda guerra mundial, os “remédios vegetais” foram gradativamente substituídos nas farmácias por medicamentos com substâncias ativas extraídas ou derivadas sinteticamente de plantas (LAPA *et al.*, 2001). Segundo Calixto e rates, 2001, cerca de 50% dos medicamentos utilizados eram de origem sintética e 25% eram de origem vegetal, isolados diretamente ou sintetizados a partir de um precursor vegetal.

A transmissão desse conhecimento, bem como pesquisas acerca dos usos terapêuticos de vegetais, vem como reforço contra a ameaça de extinção de inúmeras espécies, muitas destas ainda desconhecidas pela ciência (AGRA, 1994). A convicção da importância dos recursos naturais vem de longa data, fazendo parte da vida do homem desde seus primórdios e sua importância nos diversos estágios de desenvolvimento da sociedade é inegável (SIMÕES, 2010).

Apesar do considerável aumento do número de medicamentos sintéticos, nas últimas décadas, de acordo com BAGATINI;SILVA; TEDESCO (2007) o aumento no interesse popular no uso de plantas medicinais para fins terapêuticos tem sido bastante significativo. Esse fato se deve a alguns fatores como o interesse sobre os estudos da biodiversidade, bem como o difícil acesso da população, principalmente dos países subdesenvolvidos, aos medicamentos sintéticos (FILHO E YUNES, 1998; CALIXTO, 200; TAYLOR E SATDEN, 2001).

Considerando a ineficácia do sistema oficial de saúde pública e a condição econômica da maioria da população, não é tão surpreendente a sobrevivência do conhecimento tradicional sobre plantas medicinais, mediante às mudanças e catástrofes ocorridas com os índios, inicialmente considerados seus proprietários originais 9 no decorrer dos tempos.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, 80% da humanidade não têm acesso ao atendimento primário de saúde, por estarem muito distantes dos centros de saúde ou por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos prescritos. Para essas populações, as terapias alternativas são as principais formas de tratamento, e as plantas medicinais, os principais medicamentos (VEIGA JUNIOR, 2008).

Apesar de toda a importância atribuída às plantas, o seu potencial é ainda pouco explorado (BARROS, 2008), pois apenas recentemente estas se tornaram objeto de estudo científico. O conhecimento a respeito das propriedades terapêuticas das plantas é um requisito essencial para a transformação da planta medicinal em um produto fitoterápico. Sendo assim, pesquisa com plantas medicinais tem sido e continua a ser considerada uma alternativa importante na busca de novas drogas com propriedades terapêuticas. Logo, a ampliação da produção científica referente à plantas medicinais é de grande importância, pois desta forma poderá ser criada uma base científica para a prescrição de drogas vegetais (CALIXTO, 2000) e que a eficácia e a toxicidade possam ser previstas e posteriormente avaliadas, além da implantação de avaliações farmacológicas e metodologias para o controle de qualidade.

O Brasil é reconhecido por sua biodiversidade. Essa riqueza biológica torna-se ainda mais importante porque está aliada a uma sócio diversidade que envolve vários povos e comunidades, com visões, saberes e práticas culturais próprias. Na questão do uso terapêutico das plantas, esses saberes e práticas estão intrinsecamente relacionados aos territórios e seus recursos naturais, como parte integrante da reprodução sociocultural e econômica desses povos e comunidades. Neste sentido, é imprescindível promover o resgate, o reconhecimento e a valorização das práticas tradicionais e populares de uso de plantas medicinais e remédios caseiros, como elementos para a promoção da saúde, conforme preconiza a Organização Mundial da Saúde (BRASIL, 2009).

A avaliação da eficiência, potencial terapêutico e a segurança de medicamentos a base de produtos naturais não é bem expressa pois ainda existe uma escassez de artigos

científicos sobre a atividade biológica dos extratos brutos das plantas e sua relação com os diferentes constituintes químicos (DVORSKÁ. 2007).

A localização de metabólitos nos tecidos e/ou determinadas células vegetais é muito importante, pois ajuda na indicação da melhor parte do vegetal a ser utilizada nas terapias. Dizer qual parte e procedimento adequado viabiliza a validação do produto, indicando a sua qualidade e demonstrando que é cientificamente confiável para o uso farmacoterapêutico. Os estudos de validação das propriedades medicinais dos vegetais constituem uma exigência da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC), N^o 48, de 16 de março de 2004, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, a qual normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos como parte essencial das boas práticas de fabricação, garantindo a qualidade de um medicamento (BRASIL, 2009). A definição de critérios de qualidade para insumos farmacêuticos de origem vegetal é de suma importância para garantir a manutenção da eficácia do produto final, especialmente devido à complexidade de composição destas matérias-primas e às variações ligadas às condições de cultivo e coleta do vegetal, assim como de tratamentos empregados para promover sua estabilidade (SONAGLIO, 2003)

Os compostos produzidos pelos vegetais são agrupados em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos ; e os metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais e alcalóides entre outros. São esses compostos os responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas, e eles apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores, ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (BALADRIN *et al.*, 1985; Di STASI, 1995).

Entre todas as novas espécies químicas aprovadas como fármacos (1184) entre 1981-2006, 5% correspondem a produtos naturais, 47% correspondem a derivados semi-sintéticos de produtos naturais, derivados de produtos naturais e produtos sintetizados com grupos farmacofóricos baseados em produtos naturais, 18% são produtos biológicos e vacinas e 30% são produtos totalmente sintéticos, planejados a partir de conhecimentos adquiridos sobre produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007).

GANESAN (2008) reavaliou os dados de NEWMAN e CRAGG (2007), através de aplicação de filtros para analisar as contribuições realmente originais de produtos naturais

na terapêutica. Foram excluídos: os fármacos inspirados em produtos naturais descobertos antes de 1970, os derivados semi-sintéticos quando o produto natural só é usado como matéria prima e não contribuiu para a descoberta da atividade biológica (como por exemplo, os hormônios esteroidais), os fármacos resultantes de produtos naturais (baseados em ligantes endógenos), e, somente um fármaco foi considerado no caso de existirem dois ou mais produtos naturais de estruturas parecidas. Este estudo resultou num conjunto de 24 fármacos inovadores derivados de produtos naturais após 1970, com aprovação no período de 1981- 2006. Destes, 19 foram isolados de microrganismos (13 de actinobactérias, 2 de bactérias e 4 de fungos) e 5 de plantas. Os fármacos derivados de metabólitos secundários de plantas foram taxol (antitumoral), arglabina (antitumoral), artemisinina (antimalárico), forskolina (bronco- e vasodilatador) e plaunotol (anti-úlceras) (Figura 1.1) (GANESAN, 2008).

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas envolvem diversos campos do conhecimento e vários métodos de análise. Eles geralmente têm início com um botânico, um etnobotânico ou um ecólogo que coleta e identifica a planta. Essa coleta geralmente é realizada para plantas que podem ter algum composto ativo, pois estão relacionadas taxonomicamente às espécies com compostos ativos já conhecidos ou que são utilizadas na medicina popular de uma região. Os fitoquímicos preparam os extratos dessa planta e submetem esse material à triagem biológica em ensaios farmacológicos. A presença de efeito farmacológico direciona o processo de isolamento do princípio ativo através do bio-monitoramento pelos testes de atividade. Para a descoberta do mecanismo de ação desses compostos a biologia molecular disponibiliza ferramentas que permitem determinar os sítios celulares e ou fisiológicos envolvidos nesse processo. Isso demonstra que esse trabalho é necessariamente multidisciplinar e abrange alguns campos (BALUNAS e KINGHORN, 2005), como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002).

O processo para se chegar à obtenção de constituintes farmacologicamente ativos é longo e tedioso, e requer uma colaboração multidisciplinar de botânicos, farmacognosistas, químicos e farmacólogos, envolvendo uma série de etapas preliminares, como: - identificação botânica, coleta e secagem do material vegetal - preparação dos extratos apropriados e análise cromatográfica preliminar - testes farmacológicos ou biológicos do extrato bruto e extratos semi purificados, - várias etapas

consecutivas de separação cromatográfica, onde cada fração obtida deve ser testada, no sentido de " guiar " o isolamento do(s) constituinte(s) ativo(s). - verificação da pureza dos constituintes isolados, - elucidação estrutural, - síntese parcial ou total, - preparação dos análogos ou derivados para investigar a relação estrutura-atividade, - isolamento em grande escala para posterior teste farmacológico e toxicológico.

Para autorização de e comercialização e produção de produtos fitoterápicos, a ANVISA, exige a documentação de todas as ações direta ou indiretamente relacionadas à sua produção (BRASIL, 2004). Para tanto, a existência de especificações oficiais de matérias-primas farmacêuticas, oriundas de plantas medicinais, representa um passo importante para o estabelecimento de critérios mínimos para aceitação da qualidade.

Devido a carência de estudos das espécies do gênero *Rhynchospora*, o presente trabalho busca contribuir para o conhecimento de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck, popularmente conhecida como capim estrela, planta usada na medicina popular no agreste pernambucano, principalmente nos municípios de Vitória de Santo Antão. Até o presente estudo não foram encontrados relatos da presença de xantofilina em *Rhynchospora nervosa*, tampouco na família Cyperaceae.

2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho contribui na produção de dados acerca de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck, uma espécie ainda pouco estudada quimicamente e não estudada biologicamente, contribuindo com o potencial farmacológico deste gênero.

Realizar estudos farmacocômicos e atividades biológicas das folhas e raízes de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck. bem como, avaliar o perfil químico do óleo essencial e isolar um metabolito secundário, elucidando sua estrutura química.

3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair, e caracterizar quimicamente o óleo essencial das folhas por cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck.
- Identificar metabólitos secundários a partir do extrato metanólico e extração particionada das folhas e raízes de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck., Realizar elucidação da estrutura química por RMN de ^1H / ^{13}C e por espectrometria de massas.

- Identificar metabólitos secundários oriundos do óleo essencial das folhas e raízes de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck,
- Avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial e dos extratos particionados através do grau de polaridade dos solventes das folhas de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck.
- Determinar o potencial antioxidante dos extratos das folhas de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck.
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos extratos brutos de baixa e média polaridade das folhas de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck.
- Escolher o melhor método de separação de metabólitos secundários.
- Isolar um metabólito secundário
- Elucidar a estrutura química do metabólito isolado

4. CAPÍTULO I: REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Produtos Naturais

A história das plantas medicinais mostra que a evolução humana trilhou seu caminho em paralelo com os produtos naturais oriundo das plantas. As antigas civilizações tem suas próprias referências históricas acerca das plantas medicinais e, muito antes de aparecer qualquer forma de escrita, o homem já utilizava as plantas, e entre estas, algumas como alimentos e outras como remédios.

Em registros históricos escritos, o estudo de plantas medicinais remota desde 2.600 A.C. com os sumerianos e babilônios. A “Taubinha Sumeriana”, uma coleção de textos históricos em tabletas de argila, contém registros dos primeiros sintomas de doenças e a prescrição para cada enfermidade, sendo considerado o mais antigo tratado de medicina (PARKY, 1966, TEIXERA, 1994)

A cultura chinês a, desde a dinastia Xia (2.100 A.C. a 1.600 A.C.), devido ao trabalho do lendário imperador Shennong, considerado o fundador patrono da farmácia chinesa e cujo nome significa “ divino fazendeiro “, produziu a primeira farmacopeia chinês , com 365 plantas medicinais e seus usos, citando plantas como ginseng, cinamomo, ruibarbo pedofilo e efedra (PARKY, 1966).

Os egípcios(1. 500 A.C.) relatam a utilização de azeite, figo, cebola, alho, funcho, açafraão, ópio, hortelã e pimenta. O “PapyrusErbes”, coleção egípcia contendo 811 prescrições, menciona 700 drogas vegetais, minerais e animais, incluindo salgueiro, acácia e sedativos extraídos de *Ephedra* (TAVARES, 1996).

Intuitivamente, o homem primitivo buscou soluções para suas necessidades básicas como nutrição, reprodução e proteção. Através de suas experiências e observações, sofreu um processo biológico evolutivo, descobrindo nas plantas tratamentos de injúrias ou doenças. Além das plantas benéficas, foram descobertas as nocivas capazes de matar e produzir alucinações. Poderes naturais foram atribuídos aos primitivos que detinham esses conhecimentos, passando a serem considerados mágicos, curandeiros ou feiticeiros (TEIXEIRA, 1994).

O processo de evolução da “arte da cura” se deu de forma empírica, em processos de descobertas por tentativas, de erros e acertos (MORS, 1982). Neste processo os povos primitivos propiciaram a identificação de espécies e de gêneros vegetais que se

adequavam ao uso medicinal, o reconhecimento do habitat e a época da colheita (LEVI-STRAUSS, 1989).

O Brasil, com a grandeza de seu litoral, de sua flora e, sendo o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta, não pode abdicar de sua vocação para os 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.(PINTO, *et al.*2002).

A variedade e variabilidade entre organismos vivos fornecem uma gama de produtos de importância econômica, sendo as plantas uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem novas alternativas para cura de diversas enfermidades do mundo moderno. Há vários caminhos para estes estudos e o Brasil, país que coincidentemente tem seu nome derivado a partir de uma planta, é um país propício e produtivo à pesquisa científica que envolve a aplicação de conhecimentos locais sobre o uso em especial de plantas medicinais (OLIVEIRA, 2013).

São considerados compostos bioativos, que podem originar fármacos, principalmente os metabólitos secundários e seus derivados, por exemplo, flavonóides, saponinas, quininas, terpenos, esteróides, alcalóides, quinóides, fenilpropanóides, iridóides entre outros (CHOUDHURY *et al.*, 2011).

A produção de fármacos a partir de planta pode ser dividida em três períodos distintos, entre 1800 e 1900, onde se destacam as descobertas de fármacos importantes até hoje, como a efedrina, a partir de *Ephedrasinica*; a morfina, a partir de *Papaversomniferum*; quinina, a partir de *Cinchona calisaya*, dentre outros. O segundo período, situado entre 1901 e 1970/80, foi marcado pela descoberta e produção de antibióticos de origem microbiana. O terceiro e atual período, iniciado a partir da década de 1980, é marcado pela retomada a busca de drogas vegetais, com a descoberta de moléculas bioativas que se tornaram fármacos, como exemplo o paclitaxel (taxol), obtido a partir de *Taxusbrevifolia*, que apresenta atividade anticancerígena (YUNES *et al.*, 2001; NEWMAN, 2007).

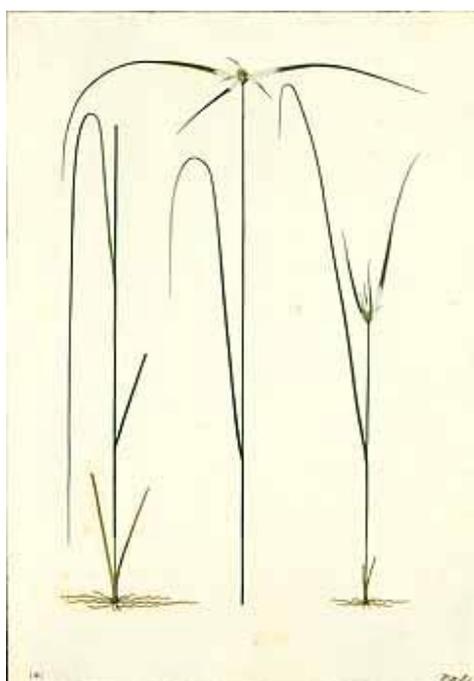
4.2 Família Cyperaceae

A família Cyperaceae, constituída por aproximadamente 4.000 espécies agrupadas em 70 gêneros, tem distribuição cosmopolita, ocorrendo em regiões temperadas, tropicais e desertos frios (KOYAMA & MAGUIRE 1965; CRONQUIST 1981; CHOWDHERY & RAO 1990).

No Brasil, ocorrem de 500 a 600 espécies de Cyperaceae distribuídas em 44 gêneros (LUCENÑO & ALVES 1997). São encontradas em habitats diversos como matas, campos de altitude, brejos, cerrados, áreas arenosas e lagoas (BARREIROS 1970; MUNIZ & SHEPHERD 1987; COSTA ET AL. 1988; BARROS 1998).

Em Cyperaceae, a morfologia do aquênio é um caráter de extrema importância na identificação de espécies. A forma, o tamanho, a cor e a ornamentação do fruto são características relevantes e freqüentemente presentes em chaves dicotômicas, nos níveis genérico e específico. OLIVEIRA (1980) analisou a morfologia do aquênio de 31 gêneros de Cyperaceae com o uso de estereomicroscópio, agrupando-os de acordo com a presença ou ausência de estruturas associadas, como estilopódios, cerdas e utrículos.

Figura 1: Excicata de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeck,



Fonte: Mutis, J.C., Drawings of the Royal Botanical Expedition to the new Kingdom of Granada, t. 201 (1783-1816) encontrado em <<http://plantillustrations.org/epithet.php?epithet=nervosus,-a,-um>>

4.3 Gênero *Rhynchospora*

Apesar da riqueza de espécies, o gênero *Rhynchospora* quase não foi estudado químicamente e farmacologicamente. Algumas relatos na literatura indicam a utilização da planta na terapia do diabetes (ação hipoglicemiante) e também na terapia de inflamações (MOREIRA, *et al.* 2002).

4.4 *Rhynchospora Nervosa* (Vahl) Boeck

Segundo Missouri Botanical Garden (2014), a espécie está taxonomicamente enquadrada da seguinte forma:

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Liliopsida

Ordem : Poales

Família: Cyperaceae

Gênero: *Rhynchospora* (Vahl)

Espécie: *nervosa*

A Família Cyperaceae tem grande destaque pela presença intensiva em muitas regiões e pelo grande número de espécies, inclusive caracterizando ecossistemas aquáticos (Gil & Bove, 2007). São bio indicadoras de áreas naturais, ou então associadas. Segundo Novo (2004), apresentam plantas daninhas invasoras de culturas de importância econômica (milho, tomate, cana de açúcar, feijão, algodão, etc.). A Família Cyperaceae compreende plantas herbáceas, monocotiledôneas de caule geralmente triangular (Joly, 1993) as raízes são fasciculares ou substituídas por uma espécie de rizoma (Schultz, 1990). As folhas são lineares lanceoladas com bainhas bem desenvolvidas, completamente fechadas e sem lígula (Joly, 1993). As flores são hermafroditas reunidas em espiguetas, estas, em espigas ou panículas (Schultz, 1990).

A planta *Rhysophora nervosa* (Vahl) se apresenta com caule do tipo rizoma curto e parte aérea representada pelo escapo pouco trígono. Suas folhas da base possuem bainhas abertas, folhas da base do escapo, trísticas e com bainha fechada, folha da porção mediana do escapo também com bainha fechada e mais longa que o escapo. Folhas involucrais em número de 6 e com tamanhos diferentes, as maiores apresentando uma mancha branca na base e as menores quase que totalmente brancas o que caracteriza o nome popular de capim estrela. Inflorescência do tipo espiga, assentada diretamente sobre as brácteas. Espigas sésseis constituídas por flores hermafroditas desprovidas de perianto, o qual é substituído por brácteas de coloração parda ou ferrugínea. Assemelha-se com *R. consanguinea*, a qual apresenta brácteas involucrais com base larga e esbranquiçada em ambas as faces e que a partir desta região tornam-se esverdeadas e longamente acuminadas. Propaga-se por meio de sementes e por fragmentação do rizoma. (MOREIRA & BRAGANÇA, 2011)

Figura 2: Espécime em estudo, bem caracterizada pela inflorescência esbranquiçada que se destaca no ápice da planta.



FONTE: MEIKE PLEPENBRING Encontrado em

<<http://herbario.up.ac.pa/Herbario/herb/vasculares/view/species/6600>>

4.5 Óleo Essencial

Os óleos essenciais são líquidos, voláteis, límpidos, raramente coloridos, lipossolúveis, solúveis em solventes orgânicos e geralmente são menos densos que a água. As substâncias odoríferas em plantas possuem funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras (BAKKALI et al., 2008).

Quanto à composição os óleos essenciais compreendem misturas de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpênicos, aldeídos cetonas, peróxidos, ésteres, fenóis, éteres, óxidos, lactonas, cumarinas, ácidos orgânicos, sendo os terpenos, que são formados a partir da condensação de unidades de cinco carbonos, o isopreno (C5), é considerado como principal componente, sendo os mesmos classificados em: monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15), porém pode-se encontrar os hemiterpenos (C5), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e raramente tetraterpenos (C40) (SIMÕES, 2010). Porém, vários fatores interferem na composição dos óleos essenciais, como a natureza do organismo, a sazonalidade, o estágio de maturidade do organismo, pois diferentes rotas e enzimas ativas em diferentes estágios de maturidade, resultam em diferentes composições de compostos voláteis (ZANG, WU; LI, 2008; BENDAOU et al., 2009).

As técnicas usadas na obtenção de óleos essenciais levam em conta o tipo de material biológico, os órgãos, a quantidade produzida, para garantir a estabilidade do óleo. Simões e Schenkel (2010), relatam as técnicas mais empregadas para obtenção de óleos essenciais:

A) Hidrodestilação ou arraste por vapor de água: como os óleos voláteis possuem tensão de vapor mais elevada que a da água, podem ser arrastados pelo vapor de água durante uma destilação. Quando em pequena escala o material acrescido de duas a três vezes o seu peso com água é aquecido, empregando-se o aparelho de Clenvenger. Após a obtenção, o óleo deve ser seco empregando-se sulfato de sódio anidro e armazenado a baixa temperatura, ao abrigo da luz e do ar.

B) Hidrodifusão: é um método em que o vapor a pressão atmosférica (<0-1 bar) atravessa o material a partir do topo da câmara de extração saturando o mesmo, resultando num óleo que retém o aroma original.

C) Enfloração (enfleurage): Este processo é aplicável às flores, que possuem baixo teor de óleo essencial de alto valor comercial. As pétalas são depositadas em bandejas a temperatura ambiente, sobre uma camada de gordura animal ou vegetal que irá adsorver o óleo essencial durante um período de tempo. Em seguida, as pétalas esgotadas são substituídas por novas até ocorrer a saturação da gordura, que é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, o álcool é destilado a baixa temperatura.

D) Extração com solventes orgânicos: Os óleos voláteis são extraídos com solventes apolares (éter etílico, éter de petróleo, benzeno, acetona, clorofórmio ou diclorometano) de acordo com o material, por exemplo, a extração a partir de folhas ou frutos podem ser realizadas com benzeno, com ou sem a adição de acetona ou éter, a temperatura ambiente ou na temperatura de ebulição, enquanto a extração a partir de flores é realizada com éter. Nesse processo, os solventes acabam extraíndo outras substâncias apolares além dos óleos voláteis. O solvente é removido por evaporação sob pressão reduzida, sendo o material residual extraído com etanol absoluto, que é resfriado a baixas temperaturas para precipitação das ceras, sendo em seguida filtrado. O álcool, então é evaporado sob pressão reduzida e obtém-se o óleo essencial.

E) Extração por micro-ondas: Faz-se uso de micro-ondas para excitar as moléculas de água do material biológico, fazendo com que as células se rompam e liberem o óleo essencial. A técnica garante um bom rendimento e reduz o tempo de extração.

F) Extração por CO₂ super crítico: Nesta técnica o material é depositado num extrator onde ocorre a elevação da pressão e da temperatura, fazendo com que o dióxido de carbono atinja um quarto estado no qual sua viscosidade é análoga a de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Quando a pressão é diminuída, o dióxido de carbono retorna para o estado gasoso, sem deixar nenhum resíduo

4.6 Agentes Antimicrobianos

Os antibióticos são definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de micro-organismos. Quando causam a morte das bactérias são chamados bactericidas e, quando promovem a inibição do crescimento microbiano, bacteriostáticos (CHAMBERGS, 2003; GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).). O termo antibiótico foi proposto por Waksman em 1942 e utilizado para definir substâncias produzidas por seres vivos microscópicos, capazes de agir em pequenas

concentrações sobre micro-organismos patogênicos (CLARDY; FISCHBACH; CURRIE, 2009; TAVARES, 2001).

A palavra “antibiótico” deriva do termo antibiosis, que literalmente significa “contra a vida” (anti = contra; bios = vida). O conceito formal mais aceito por cientistas especializados define o antibiótico como uma substância química que é produzida por um microrganismo e que, em baixa concentração, tem a capacidade de inibir ou matar, seletivamente, outros microrganismos. A definição formal exclui os compostos sintéticos, que, no entanto, juntamente com outros compostos naturais e seus derivados, são incluídos na categoria de “antimicrobianos”, que também pode ser subdividida segundo o tipo específico de microrganismo que deve ser inibido, como por exemplo, antifúngicos, antibacterianos, entre outros (ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997).

Os antimicrobianos diferem de acordo com seu mecanismo de ação, sendo classificados de acordo com seu local de atuação. Logo existem antimicrobianos que atuam: na parede celular, na síntese de DNA, na síntese protéica celular e os que afetam a atividade enzimática intracelular (MOREIRA, 2004).

As propriedades antimicrobianas de metabólitos secundários de plantas tem sido reconhecidas empiricamente durante séculos, mas foram confirmadas cientificamente apenas recentemente (JANSEN, SCHEFFER, BAERHEIM, 1987). Tendo em vista a resistência das bactérias a múltiplos antimicrobianos, o conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas e a busca por substâncias derivadas de plantas teve um grande impulso nos últimos anos (COELHO ET. AL., 2004).

Apesar dos diferentes mecanismos de ação, todos os antimicrobianos devem possuir as seguintes propriedades comuns: possuir amplo espectro de ação, apresentar toxicidade seletiva e possuir mecanismo de ação específico, atuando de forma diferente nas células-alvo (MURRAY, et. al., 2002).

4.7 Atividade Antibacteriana

Singh e Shukla (1984) relatam as diferenças entre antimicrobianos produzidos por microrganismos e por plantas. Destacando que os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresentará grandes diferenças estruturais em relação aos antibióticos derivados de microrganismos, onde os agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores geralmente agem como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas. Afetando diretamente uma síntese enzimática seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo

alterando estruturas de membranas. Com isso as plantas destacam-se como grande manancial de novas moléculas bioativas.

Os alcaloides e as substâncias fenólicas, como fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas e flavonas são os principais grupos de compostos extraídos de plantas com propriedades antimicrobianas (Singh et al., 2002, Hatano et al., 2005; Esquenazi et al., 2002). Essas propriedades podem ser detectadas, principalmente, por meio da observação de sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismo (Souza et al., 2000)

Vários métodos são utilizados para se avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica de extratos vegetais. Atualmente, o mais utilizado é o método da micro diluição. Neste ensaio, desenvolvido por Eloff em 1998, pode-se fazer a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é a concentração mínima que um extrato ativo de planta pode ter para inibir a proliferação de microrganismos. Algumas variáveis referentes à determinação da CIM podem ser atribuídas a fatores como: origem da planta e época da sua coleta, condições da planta para a preparação do extrato, microrganismo utilizado no ensaio, entre outras. Por este motivo, não há um padrão que expresse os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais (FENNEL, et. al., 2004).

Não existem testes realizados com a planta em estudo

4.8 Atividade Citotóxica

De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization) ISO 10993, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso em dispositivos biomédicos e depois de comprovada sua não toxicidade é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO et al., 2003). O teste de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células tumorais tem se tornado importante para a avaliação de agentes anticâncer, sendo também muito utilizado como método alternativo aos testes farmacológicos em órgãos isolados, e tem, pelo menos durante a fase de *screening* para avaliação de agentes anticânceres, reduzindo a experimentação *in vivo* em animais (HAMBURGUER; HOSTETTMANN, 1991; CINGI et al., 1991).

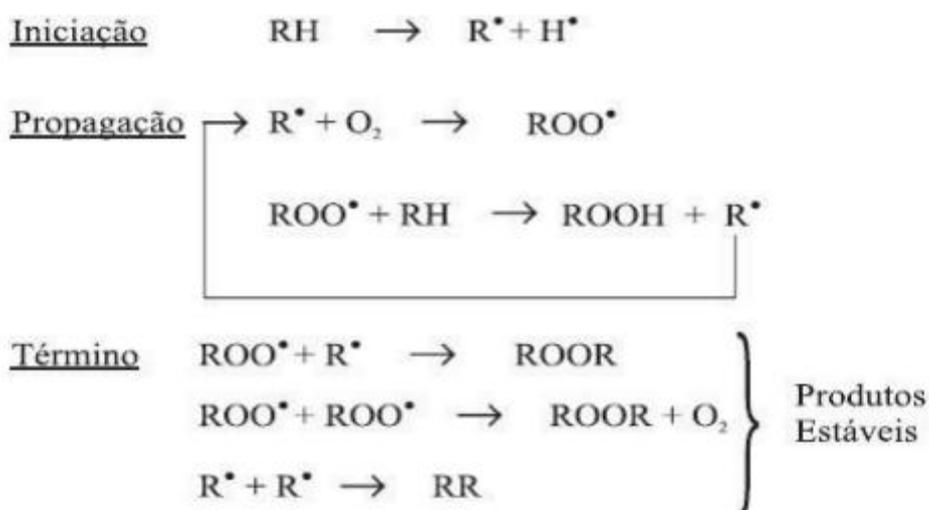
Vários métodos *in vitro*, para avaliar a toxicidade de biomateriais, foram padronizados utilizando-se culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o material direta ou indiretamente em contato com uma cultura de células de

mamíferos, verificando-se as alterações celulares por diferentes mecanismos, entre os quais a incorporação de corantes vitais ou a inibição da formação de colônias celulares (CRUZ et al., 1987; ROGERO et al., 2000).

4.9 Antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, presentes em baixas concentrações, quando comparada a um substrato oxidável, atrasam ou inibem a oxidação desse substrato de maneira eficaz (HARVEY, 2008). O principal mecanismo de oxidação dos óleos e gorduras está associada à reação do oxigênio com ácidos graxos insaturados, ocorrendo em três etapas: iniciação, onde acontece a retirada de um hidrogênio do carbono alílico na molécula do ácido graxo e a consequente formação de radicais livres, em condições favorecidas por luz e calor, propagação, na qual ocorre a conversão dos radicais livres susceptíveis ao ataque do oxigênio a outros radicais (peróxidos e hidroperóxidos), que são produtos primários da oxidação lipídica e cuja estrutura depende da natureza dos ácidos graxos presentes. Esse processo é auto catalítico, uma vez que os radicais formados atuam como propagadores da reação. Por fim ocorre a etapa do término, na qual dois radicais se combinam formando produtos estáveis (produtos secundários da reação), obtidos por cisão e rearranjo dos peróxidos (RAMALHO; JORGE, 2006). A figura 4, mostra o esquema geral da oxidação lipídica.

Figura 3. Esquema geral do mecanismo da oxidação lipídica, onde RH- ácido graxo insaturado; R- radical livre; ROO- radical peróxido e ROOH –hidroperóxido

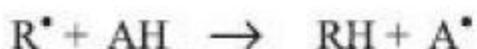


Fonte: Ramalho e Jorge (2006)

Algumas propriedades são desejáveis em antioxidantes, dentre elas estão a eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%), ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor, além de seus produtos não poderem ser tóxicos. Os antioxidantes podem ser classificados em primários e secundários, sendo que alguns apresentam mais de um mecanismo de atividade e são referidos como antioxidante de múltipla função (BAILEY; NISSEN; SKIBSTED, 1996).

Os antioxidantes primários ou inibidores da reação são aceptores de radicais livres e atuam atrasando ou inibindo a iniciação ou interrompendo a propagação da auto oxidação, seu principal mecanismo de ação é o seqüestro de radicais livres. A figura 5 representa o mecanismo de ação dos antioxidantes primários

Figura 4 – Mecanismo de ação para os antioxidantes primários, onde ROO e R - radicais livres; AH – antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A radical inerte.



Fonte: (FRANKEL 1980)

Os antioxidantes primários mais comumente utilizados em alimentos são compostos sintéticos. Como por exemplos: BHA (butilhidroxianisol), BHT (butilhidroxitolueno) PG (galato de propila) e TBHQ (*terc*-butilhidroquinona). No entanto, alguns componentes naturais dos alimentos também agem como antioxidantes primários e são comumente adicionados em alimentos. Tocoferóis são os antioxidantes primários mais utilizados. Os caratenóides são outro grupo de compostos naturais que agem como antioxidantes primários, porém, por meio de mecanismos diferentes (TAKEMOTO FILHO; GOPO, 2009).

Os antioxidantes secundários ou preventivos agem por meio de vários possíveis mecanismos, diminuem a taxa de oxidação por diferentes formas, mas não convertem radicais livres em produtos mais estáveis. Podem quelar metais pró-oxidantes e desativá-los, repor hidrogênio para antioxidantes primários, decompor hidroperóxidos a espécies não radicais, absorver radiação ultravioleta ou agir como sequestrante de oxigênio. Ainda podem ser classificados como sinergistas, pelo fato de promoverem a atividade dos antioxidantes primários, pode-se citar o ácido cítrico, ácido ascórbico e ácido tartárico como bons exemplos de sinergistas (RICEEVANS *et al*,1997)

A vitamina E faz parte da composição dos óleos vegetais e encontra-se na natureza de quatro formas diferentes: α , β , γ , δ -tocoferol, sendo α -tocoferol o antioxidante mais abundante e distribuído nos tecidos e no plasma (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A atividade antioxidante dos tocoferóis deve-se principalmente ao fato de doarem seus hidrogênios aos radicais lipídicos, interrompendo a propagação em cadeia (RAMALHO, 2006).

Nos últimos anos com os antioxidantes naturais, os compostos fenólicos presentes nos vegetais têm recebido grande importância. Quimicamente, os fenóis vegetais constituem um grupo heterogêneo, com aproximadamente 10.000 compostos, apresentando grande variedade de funções nos vegetais, como: suporte mecânico, atrativo de polinizadores ou dispersores de frutos e na proteção contra a radiação ultravioleta (TABANCA, 2007). De acordo com TIVERON(2010) outros tipos de compostos presentes nos vegetais têm recebido grande importância nos últimos anos. Os fenóis vegetais assim como os antioxidantes naturais, apresentam grande variedade de função vegetal, tem como função proteção contra radiação ultravioleta, atrativo de polinizadores ou suporte mecânico.

4.10 Xantofilina

O composto 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, é um produto natural, também conhecido por xantoxilina (1), encontrado abundantemente nas partes aéreas da espécie vegetal *Sebastianiaschottiana* (Euphorbiaceae). *Sebastianiaschottiana*, conhecida popularmente como “sarandi”, “branquilha” ou “branquicho”, é uma planta que ocorre abundantemente no sul do país, sendo amplamente utilizada na medicina popular em forma de chás contra afecções renais. Estudos realizados com os extratos desta planta revelaram que os mesmos exercem consideráveis efeitos antiespasmódicos quando

avaliados em distintos órgãos isolados contraídos por diferentes neurotransmissores [Calixto et. al., 1986 e 1990].

O principal constituinte ativo presente no extrato hexânico foi identificado como sendo a 2-hidróxi-4,6 dimetóxiacetofenona, também conhecida como xantoxilina (II) e obtida com rendimento de 0,25 % a partir das folhas e ramos jovens [Miguel, 1987; Calixto et al., 1990 b].

Este composto também mostrou efeito antibacteriano contra bactérias frequentemente encontradas no Trato urinário [Godoy et al, 1991], além de ação fungicida contra vários fungos leveduriformes e filamentosos patogênicos aos seres humanos [Lima et al.,1994]. A xantoxilina foi também isolada de outras plantas, como *Hipponamemancinella* [Shaeffer et al, 1954], *Eucalyptusmichaeliana* (Myrtaceae) [Courtney et al.,1983], *Pulicaria undulata* (Compositae) [Ayoub&Elassam, 1981], *Sapiumsebiferum* (Euphorbiaceae) [Kouno et al.,1983]. Vários derivados da xantoxilina foram sintetizados em laboratórios e testados no íleo, isolado de cobaia, contraído pela acetilcolina, cujos resultados indicaram que a carbonila e os dois grupos metoxilas são importantes para a atividade antiespasmódica. A introdução de grupos benzilas substituídos e a formação de chalconas resultaram em compostos com maior potência antiespasmódica [Cechinel Filho et al.1991,1993; 1995a],

Posteriormente, foi determinado que a xantoxilina é o principal constituinte ativo da planta, sendo isolada com rendimento de aproximadamente 0,25% [Miguel, 1987]. Este composto, além de ações antiespasmódicas, apresenta atividade antibacteriana [Godoy et. al., 1991] e antifúngica [Lima et. al., 1994; Cechinel Filho et. al., 1996a] contra vários microrganismos causadores de infecções em seres humanos.

Outros estudos desenvolvidos na UFSC com a xantoxilina, utilizada como protótipo possibilitou a obtenção de novos derivados farmacologicamente ativos tais como os benzofurânicos, que apresentaram promissores efeitos analgésicos, antiedematogênicos e antialérgicos [Cechinel Filho, 1995b; Cechinel Filho et. al., 1996b; Vaz et. al., 1996], sendo mais potentes do que vários fármacos usados na clínica como aspirina, acetaminofeno, indometacina e ibuprofeno.

4.11 Isolamentos Da Substância

De acordo com PINHEIRO, T. R. 2004; xantoxilina foi isolada utilizando-se técnicas de cromatografia em coluna, sendo monitorada sua pureza por cromatografia em camada

delgada. As partes aéreas de *Sebastianiaschottiana* (Euphorbiaceae) foram coletadas no município de Apiúna-SC, sendo estas moídas e submetidas à dessecação em estufa sob 40°C. O material foi pesado e macerado com metanol comercial durante 15 dias. A obtenção do extrato metanólico bruto se deu através da concentração a 1/3 do seu volume. Este extrato foi particionado sucessivamente com hexano para a obtenção do extrato hexânico, o qual foi cromatografado em coluna de sílica gel eluída com hexano 100%. As primeiras frações foram desprezadas até a detecção da xantoxilina, sendo a mesma recristalizada com hexano, com aproximadamente 0,25% de rendimento.

A xantoxilina, sob a mesma metodologia anteriormente exposta, foi também isolada de outras plantas, como *Hipponamemancinella* [Shaeffer et al, 1954], *Eucalyptusmichaeliana* (Myrtaceae) [Courtney et al.,1983], *Pulicaria undulata* (Compositae) [Ayoub&Elassam, 1981], *Sapiumsebiferum* (Euphorbiaceae) [Kouno et al.,1983].

Até o presente estudo não foram encontrados relatos da presença de xantofilina em *Rinchospora nervosa*, tampouco na família Cyperaceae.

5. CAÍTULO II : ARTIGO**A SER SUBMETIDO: REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA**

Atividades biológicas, perfil fitoquímico, análise de óleos essenciais de
Rhynchospora nervosa (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae) e elucidação da estrutura
química de um de seus componentes

George E. Silva^{1*}, Gláucia M. S. Lima¹, Elba L. C. Amorim², Rômulo C. S. P. Filho¹, Daniela
M. A. F. Navarro³, Raimundo B. Filho⁴, Sebastião J. Melo¹

¹Departamento de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901 - Recife – Brasil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, 50670-901, Recife, PE, Brasil,

³Departamento de Química Fundamental, Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-901 Recife – PE, Brazil.

⁴Sector of Natural Products Chemistry, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Brazil

RESUMO: *Rhynchospora nervosa*, monocotiledônea, pertencente a família Cyperaceae encontrada em áreas tropicais e subtropical. No Brasil os representantes deste grupo são utilizados por possuírem algumas atividades biológicas, como por exemplo a atividade hipoglicemiante, e bactericida. De acordo com a literatura espécie utilizada, também conhecida popularmente como capim estrela, não possui estudos anteriores. Desse modo, o mesmo contribui para a elucidação dos compostos presentes na planta bem como para o conhecimento das atividades microbiológicas e farmacológicas testadas. No trabalho foi realizado um estudo fitoquímico onde foram investigados e identificados os componentes químicos da raiz e da parte aérea da planta, através do método de cromatografia em camada delgada. Foram identificados flavonoides, taninos, triterpenos e esteroides, e proantocianidinas. A atividade antimicrobiana foi realizada com o extrato bruto e com os extratos particionados através do grau de polaridade dos solventes de extração. Confirmando atividade antibacteriana para os extratos oriundos de solventes apolares: hexano, clorofórmio e dicloro metano. Também foi realizado o teste de citotoxicidade utilizando, se linhagens específicas de células tumorais. Foi realizado

também a extração dos óleos essenciais da parte aérea e raiz da planta, e posteriormente foi identificado alguns compostos existentes através do CGMS.

Palavras-chave: monocotilédones, extrato, óleo essencial, elucidada.

ABSTRACT: *Rhynchospora nervosa*, monocot, also known colloquially as star grass, belongs to the Cyperaceae family. It is found in tropical and subtropical areas. In Brazil, representatives of this group are used as they possess a number of biological activities, such as hypoglycemic activity, and as a bactericide. According to the literature, this species has not been previously studied. Thus, a study of it contributes to the elucidation of the compounds present in the plant as well as futhering knowledge of the microbiological and pharmacological activities tested. Phytochemical studies investigated and identified the chemical components of the plant root and shoot using the chromatographic method in thin layers. The following were identified: flavonoids, tannins, triterpenes and steroids, as well as proanthocyanidins. The antimicrobial activity was performed using crude extract and with extracts *differentiated by* the degree of polarity of solvent extraction. Antibacterial activity for extracts derived from non-polar solvents was confirmed for the following: hexane, chloroform and dichloromethane. A cytotoxicity test was applied to identify specific strains of tumor cells. Essential oils from the shoot and root of the plant were extracted and some CGMS compounds were identified.

Keywords: monocots, extract, essential oil, clarified.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais por populações rurais é orientada por uma série de conhecimentos acumulados mediante a relação direta dos seus membros com o meio ambiente (MARQUES, 200) e da difusão de uma série de informações tendo como influência o uso tradicional transmitido oralmente entre diferentes gerações. Essa utilização de plantas medicinais como forma alternativa de cura a enfermidades tem como facilitadores a grande diversidade vegetal e o baixo custo associado à terapêutica, proporcionando a sua utilização para os mais variados fins terapêuticos, desde o combate

aos diversos tipos de neoplasias até patogenidades causadas por microrganismos (VIEGAS et al., 2006).

Os compostos produzidos pelos vegetais são agrupados em dois grupos: os metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos e lipídeos; e os metabólitos secundários que são compostos elaborados a partir da síntese dos metabólitos primários, tais como compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais, alcalóides, entre outros. São esses compostos os responsáveis pelos efeitos medicinais, ou tóxicos, das plantas, e eles apresentam grande importância ecológica, uma vez que podem atuar na atração de polinizadores ou representar uma defesa química contra estresse ambiental (BALADRIN et al., 1985; Di STASI, 1995).

Para autorização, comercialização e produção de produtos fitoterápicos, a ANVISA, exige a documentação de todas as ações direta ou indiretamente relacionadas à sua produção (BRASIL, 2004). Para tanto, a existência de especificações oficiais de matérias-primas farmacêuticas, oriundas de plantas medicinais, representa um passo importante para o estabelecimento de critérios mínimos para aceitação da qualidade.

A família Cyperaceae, constituída por aproximadamente 4.000 espécies agrupadas em 70 gêneros, tem distribuição cosmopolita, ocorrendo em regiões temperadas, tropicais e desertos frios (KOYAMA & MAGUIRE 1965; CRONQUIST 1981; CHOWDHERY & RAO 1990).

No Brasil, ocorrem de 500 a 600 espécies de Cyperaceae distribuídas em 44 gêneros (LUCENÑO & ALVES 1997). São encontradas em habitats diversos como matas, campos de altitude, brejos, cerrados, áreas arenosas e lagoas (BARREIROS 1970; MUNIZ & SHEPHERD 1987; COSTA ET AL. 1988; BARROS 1998).

A Família Cyperaceae compreende plantas herbáceas, monocotiledôneas de caule geralmente triangular (Joly, 1993) as raízes são fasciculares ou substituídas por uma espécie de rizoma (Schultz, 1990). As folhas são lineares lanceoladas com bainhas bem desenvolvidas, completamente fechadas e sem lígula (Joly, 1993). As flores são hermafroditas reunidas em espiguetas, estas, em espigas ou panículas (Schultz, 1990).

Rhynchospora nervosa (Vahl) compreende um exemplar desse gênero, pouco estudada, conhecida como uma erva daninha e também como “mata-pasto”, é utilizada popularmente como hipoglicemiante, sem qualquer constatação na literatura.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BOTÂNICO

As raízes e partes aéreas de *Rhynchospora nervosa*(Vahl) Boeckeler, foram coletadas no mês de novembro de 2014 em Recife, Pernambuco dentro do campus da Universidade Federal de Pernambuco BR101, 8°03'09.0"S 34°57'15.5"W – Pernambuco, Brasil, com auxílio de enxada para a retirada de toda a planta. Uma parte do material coletado foi destinada para identificação pela Dr^a Rita de Cássia e o material testemunho foi depositado no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Pernambucana de Pesquisa Agropecuária (IPA) de acordo com a numeração N° 4765542.

PREPARAÇÃO DO EXTRATO BRUTO

A extração foi realizada com as partes vegetativas frescas (2g), utilizando a técnica decocção na proporção de 100g da droga vegetal (raiz e parte aérea) para cada um litro de solvente (metanol). Em seguida foi eliminado todo solvente para obtenção do material seco, como auxílio de evaporador rotativo (Buchii-re) a 40°C.

ANÁLISE FITOQUÍMICA QUALITATIVA

O extrato bruto foi submetido a vários testes químicos qualitativos utilizando métodos descritos para determinar a presença ou ausência de metabolitos secundários: alcalóides, esteróides, terpenoides e compostos fenólicos, Saponosídeos, entre outros. (BOUCHARDT, MAYER, 1982; HARBONE, 1982; WAGNER, 1984).

PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS POR GRAU DE POLARIDADE

A extração foi realizada a fresco, por maceração estática durante sete dias, utilizando diferentes solventes: metanol (100g/L), etanol, acetona (100g/L), acetato de etila (100g/L), clorofórmio (100g/L), dicloro metano (100g/L) e Hexano (100g/L). Em seguida os solventes foram eliminados à pressão reduzida em evaporador rotativo (BUCHII-RE) a 40°C e o material obtido correspondendo ao respectivo extrato. Deu-se então a obtenção de sete extratos em diferentes graus de polaridades.

OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DA RAIZ E PARTE AÉREA DA PLANTA

Para obtenção do óleo essencial (OE) foram utilizados 500g de folhas frescas, as quais foram trituradas juntamente com 1750 mL de água destilada. Posteriormente o

material vegetal foi transferido para um balão de fundo redondo de 5 litros, adicionando-se mais água destilada, perfazendo um volume final de 2500 mL. O balão volumétrico foi transferido para uma manta aquecedora (160 °C – 170 °C), acoplada à um aparato de Clevenger modificado e um condensador durante um período de 3h. Em seguida, o óleo foi coletado e tratado com sulfato de sódio anidro para retirada da água remanescente. O óleo obtido foi mantido sob refrigeração (-24 °C) até o uso nos experimentos (CONFORTI et al., 2008).

ATIVIDADES BIOLÓGICAS

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Alíquotas de 1 a 5 mL do extrato (0,25 mg/mL) foram transferidos para tubos de ensaio, aferindo-se o volume final para 5 mL com metanol. As concentrações finais do extrato foram de 50-250µg/mL. Resumidamente, 1 mL das concentrações do extrato diluído em metanol foram adicionados 3 mL da solução de DPPH a 50 µg/mL em cada tubo e 3 mL de metanol para fazer o branco. As soluções foram agitadas cuidadosamente e deixadas em repouso por 30 minutos no escuro a temperatura ambiente. A absorbância da mistura será medida a 517 nm, zerando o espectrofotômetro com metanol. A solução do controle negativo consiste na utilização da solução de DPPH a 50 µg/MI (SOBRINHO, et al., 2011)

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Coleção de MicroorganismosUFPEDA– Departamento de Antibióticos da UFPE.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A realização da atividade antibacteriana a partir dos extratos secos(EBP= extrato bruto da Planta) de *Rhynchospora nervosa*(Vahl) Boeckeler foi avaliada e obtida por maceração em grau crescente de polaridade e o extrato bruto

Os extratos secos avaliados foram analiticamente pesados (10mg) e solubilizados em um sistema composto por metanol, obtendo assim uma solução estoque padronizada de concentração igual a 1000 µg/mL., enquanto que os agentes antimicrobianos usados como padrão foram solubilizados em água. As soluções de estoque foram esterilizadas por filtração através de uma membrana Millipore, com uma porosidade de 0,22 µm.

AGENTE ANTIMICROBIANO

O antibiótico gentamicina produzido pelo laboratório Eurofarma, foi utilizado para avaliar a resistência ou sensibilidade das bactérias, de acordo com os critérios estabelecidos pelo Clinical Laboratory standard Institute (2012). Este fármaco pertence à classe dos aminoglicosídeos, cujo mecanismo de ação, é a inibição da síntese protéica bacteriana. A resistência foi definida para gentamicina (GENTA, MIC =0,5µg/mL).

MICROORGANISMOS E PADRONIZAÇÃO DOS INÓCULOS

Foram utilizadas cinco cepas bacterianas obtidas das culturas do estoque do laboratório de coleção de microorganismos UFPEDA, distribuídas em três gram negativas e duas gram positivas – LFBM - UFPE. Para este foram selecionadas cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de amostras clínicas, depositadas no LFBM com os seguintes registros: *Staphylococcus aureus* UFPEDA02; *Bacillus subtilis* UFPEDA86; *Pseudomonas aeruginosa* UFPEDA416; *Salmonella enteritidis* UFPEDA414; Ainda sim foi utilizado para teste sob atuação do extrato em fungos *Candida albicans* UFPEDA1007.

Esses microrganismos foram cultivados em ágar Mueller Hinton (MHA) (Acumedia Manufacturers, Baltimore, USA) e incubados a 37°C por 18 horas. Algumas colônias foram inoculadas em caldo Mueller Hinton (Acumedia Manufacturers, Baltimore, USA) para comparação da turbidez com padrões 0,5 da escala McFarland os quais são equivalentes a contagem de aproximadamente 10^8 UFC / mL

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CMB).

A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição, em multiplacas com 96 poços, conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Foram distribuídos 100 µL de meio de cultura líquido (BHI, para *E. faecalis* e *M. smegmatis*; MH, demais bactérias; e SAB, leveduras e fungos filamentosos) nos poços das placas, exceto os poços da coluna 2 que receberam 50 µL do meio de cultura e 50 µL do veículo de diluição da amostra (controle do agente de solubilização) (Figura 12). Em seguida, foram adicionados 100 µL de cada amostra nos poços da coluna 3 e realizado o processo de microdiluição seriada, da linha A coluna 3 para coluna 4 e assim sucessivamente até a coluna 11 obtendo-se concentrações decrescentes que variaram de

3,9 a 1000 µg/mL, quando preciso esses produtos foram diluídos ainda mais. Após a diluição das amostras, foi adicionado aos poços 10 µL dos inócuos microbianos padronizados, exceto nos poços da coluna 1 (controle de esterilidade do meio). A coluna 12 (controle positivo do inoculo) só recebeu 100 µL de meio de cultura e 10 µL do inoculo. As microplacas foram cultivadas a 37 °C por 18-24 horas para bactérias e 30 °C por 48-72 horas para leveduras e fungos filamentosos.

A CMI foi realizada através da técnica de microdiluição, em multiplacas com 96 poços, conforme o Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008; CLSI, 2010). Foram distribuídos 100 µL de meio de cultura líquido (BHI, para *E. faecalis* e *M. smegmatis*; MH, demais bactérias; e SAB, leveduras e fungos filamentosos) nos poços das placas, exceto os poços da coluna 2 que receberam 50 µL do meio de cultura e 50 µL do veículo de diluição da amostra (controle do agente de solubilização) (Figura 12). Em seguida, foram adicionados 100 µL de cada amostra nos poços da coluna 3 e realizado o processo de microdiluição seriada, da linha A coluna 3 para coluna 4 e assim sucessivamente até a coluna 11 obtendo-se concentrações decrescentes que variaram de 3,9 a 1000 µg/mL, quando preciso esses produtos foram diluídos ainda mais. Após a diluição das amostras, foi adicionado aos poços 10 µL dos inócuos microbianos padronizados, exceto nos poços da coluna 1 (controle de esterilidade do meio). A coluna 12 (controle positivo do inoculo) só recebeu 100 µL de meio de cultura e 10 µL do inoculo. As microplacas foram cultivadas a 37 °C por 18-24 horas para bactérias e 30 °C por 48-72 horas para leveduras e fungos filamentosos.

AVALIAÇÃO CITOTÓXICA

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983).

As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), HEp-2 (carcinoma de laringe humana) e HT-29 (adenocarcinoma de colón humano) mantidas em meio de cultura DMEM. Os meios foram suplementados com 10 % de soro fetal bovino e 1 % de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂.

As células NCI-H292, HEp-2 e HT-29 (10⁵ células/mL) foram plaqueadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h. Em seguida as amostras dissolvidas em DMSO (1%)

foram adicionadas aos poços em concentração final de 50 µg/mL. O fármaco doxorubicina (5 µg/mL) foi utilizada como padrão. Após 72 h de reincubação foi adicionado 25 µL de MTT (5 mg/mL) e depois de 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foram aspirados e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço. A absorbância foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

Os experimentos foram realizados em quadruplicata e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPadPrism 5.0*.

MÉTODO DE ISOLAMENTO E ELUCIDAÇÃO DA MOLÉCULA

A fração hexânica das folhas de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler, foi concentrada sob evaporação em rota vapor, em seguida armazenada em dessecador à vácuo para total retirada do solvente. Foi observado, que a fração concentrada, após um dia em dessecador, começou a formar cristais, de tamanhos e formatos diferentes após três dias já é possível observar cristais em formato de agulha bem definidos.

ANÁLISE DOS CRISTAIS

Ao analisar em cromatografia, eluída pelo sistema tolueno acetato de etila (90:10) foi observado 3 bandas bem definidas. Porém chamou atenção para uma mancha escurecida no topo da migração da placa eluída.

PURIFICAÇÃO DOS CRISTAIS

Após recristalização em água/metanol observou que os cristais com coloração amarelada dissolveram na solução em brando aquecimento, porém notou-se também que existia uma substância de coloração esbranquiçada que se agrupou e formou cristais em formato de agulha. Após 5 horas em repouso, os cristais brancos já estavam totalmente formados. Os mesmos foram devidamente retirados e transportados para um tubo adequado previamente tarado. Em seguida os cristais foram recristalizados em metanol por mais duas vezes e o restante do solvente evaporado naturalmente. A partir de 100g do material botânico foram obtidos 11mg da substância pura.

IDENTIFICAÇÃO DA ESTRUTURA QUÍMICA

A substância teve sua estrutura química determinada por dados de RMN de ^1H e ^{13}C . Além dos métodos unidimensionais, utilizaram-se também experiências 2D: HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) baseada no acoplamento spin-spin de carbono-13-hidrogênio ligado diretamente [^{13}C - ^1H -COSY- $^1\text{J}_{\text{CH}}$] e HMBC (Heteronuclear

Multiple Bond Correlation) baseado no acoplamento spin-spin de carbono-13-hidrogênio a longa distância , [^{13}C - ^1H -COSY- $^n\text{J}_{\text{CH}}$ (n= 2 e 3)].

RESULTADOS

SCREENING FITOQUÍMICO

A prospecção Fitoquímica (Tabela 1) identificou a presença de flavonóides; cumarinas; Leucoantocianidinas e proantocianidinas; triterpenos e esteróides como metabolitos secundários majoritários que podem ser usados como marcadores químicos (MILES E CHANG, 1997; SMÂNIA et al., 2003; ZJAWIONY, 2004; FAN et al., 2006).

ATIVIDADE CITOTÓXICA

Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras com atividade (90 a 100 % de inibição), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 90%) e fraca atividade (inibição de crescimento menor que 50%) (RODRIGUES et al., 2014).

O extrato bruto e suas partições apresentaram atividades discretas nas concentrações testadas frente às linhagens utilizadas (tabela 2), porém a partição clorofórmica mostrou uma atividade maior que a droga padrão positiva (doxirrubicina) frente a linhagem celular tumoral de colón humana HT-29. Considerando que o extrato bruto só pode ser considerado citotóxico, quando os parâmetros que incluem alteração do metabolismo e ou morte celular são observados (FRESHNEY, 1994; KEAWPRADUB et al., 1999). Considerando os resultados promissores no presente estudos, são necessários investigações minuciosas para testar frações enriquecidas e substâncias isoladas em diferentes linhagens de células tumorais.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Segundo Borguini (2006), o método (DPPH) é um recurso fácil e preciso para avaliar atividade antioxidante, in vitro, também é amplamente usado por requerer tempo relativamente curto, em relação a outros métodos. O efeito dos antioxidantes sobre o sequestro do radical (DPPH) é atribuído à habilidade destes compostos de doar hidrogênio. Esta atividade deve estar associada a substâncias fenólicas, quimicamente caracterizadas como boas doadoras de elétrons (H^+), favorecendo atividade

sequestradora de radicais livres, quando o radical (DPPH) é estabilizado por ação de um Hidrogênio.

A tabela (3) demonstra o potencial antioxidante de *Rhynchospora nervosa* demonstrando a concentração eficiente (CEA₅₀) , que é a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de (DDPH) em 50% dos extratos avaliados. Quando o radical DPPH é estabilizado por ação de um H[·], a absorvância do mesmo em λ_{máx}, 516 nm não mais é observada, de forma que quanto menor a concentração desse radical em solução, menor a absorvância da solução. Da mesma forma pode-se dizer que quanto maior a concentração de fenóis numa solução, maior a estabilização de radicais DPPH e, portanto, maior a atividade antioxidante da mesma (YAMASAKI et al., 1994; RICIEVANS et al., 1997).

OLEO ESSENCIAL

O cromatograma do óleo essencial das folhas de *Rhynchospora nervosa* evidenciou 26 picos correspondente aos 26 compostos químicos listados na Tabela (4). Evidenciando como composto com maior área foi o ácido hexadecano, com 46,37% e tempo de retenção 41,738 minutos.

Os ácidos palmíticos (PA) e palmítoleico (PO), além de serem sintetizados pelos mamíferos, também são obtidos na dieta (NETTLETON, 1995). Em relação aos ácidos graxos totais, a porcentagem de PA no plasma é de 26,7% em homens e 27,8% em mulheres na faixa etária de 20 a 25 anos de idade. O PO é um ácido graxo mono-insaturado e apresenta 4,5% da porcentagem plasmática de ácidos graxos em homens e 4,1 % em mulheres (LENTNER, 1984). Os efeitos do PA sobre o metabolismo de glicose foram abundantemente estudados, devido a sua alta concentração plasmática em condições fisiológicas e patológicas. O tratamento do músculo esquelético com PA por períodos prolongados está implicado no dessecamento da resistência à ação da insulina (HIRABARA; CURI; MAECHLHER, 2010; TSUCHIYA et al ., 2010; WANG et al.; 2010). Por outro lado, a exposição aguda a esse ácido graxo pode induzir aumento na captação e oxidação de glicose, além elevação na síntese de glicogênio (HIRABARA et al., 2006; PU et., 2011). Os ácidos graxos essenciais promovem quimiotaxia (atração de leucócitos) e angiogênese (formação de novos vasos sanguíneos), mantêm o meio úmido, aceleram o processo de granulação tecidual, facilitam a entrada de fatores de crescimento, promovem mitose e proliferação celular, atuam sobre a membrana celular, aumentando a

sua permeabilidade, auxiliam o debridamento autolítico e são bactericidas para *S. aureus* (MANDELBAUM et al. 2003). O ácido linoléico é importante no transporte de gorduras, manutenção da função e integridade das membranas celulares e age como imunógeno local (DANTAS, 2005).

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Os microorganismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, aflorando cada vez mais a busca por substâncias biologicamente ativas, características que as plantas apresentam a partir de seu metabolismo secundário que vem sendo reconhecido empiricamente durante séculos, mais foram confirmadas cientificamente apenas recentemente. Estudo originário de diversas regiões do mundo orientados pelo uso popular das espécies nativas é um dos casos mais bem documentados da evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento.

Estudos realizados por Araújo (2011), mostraram atividade antimicrobiana em integrantes da família Cyperaceae, o extrato vegetal das folhas apresentou atividade antimicrobiana em relação à *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Candida albicans*. Das espécies do gênero *Rhynchospora*, poucas foram amplamente estudadas do ponto de vista farmacológico, a exemplo da *Rhynchospora corymbosa*. Para a qual foram relatadas atividade antibacteriana, contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas putida* (OUSSALAH et al., 2007).

Os extratos testados de *Rhynchospora nervosa* que apresentaram atividade positiva tanto para bactérias Gram positivas quanto para Gram negativas (Tabela 5), foram submetidos a novos ensaios biológicos para determinação da concentração inibitória mínima (tabela 6). Para *Candida Albicans* todos os extratos também foram testados, o resultado positivo ocorreu apenas para os extratos: Hexânico, Dicloro Metano e Clorofórmio.

Comparando os nossos resultados com os encontrados por Duarte *et al.* (2006), para a família Cyperaceae onde obtive resultados correlacionando a atividade antimicrobiana podemos dizer que os resultados encontrados para *Rhynchospora nervosa*, usando-se extrato hexânico e diclorometano foram bem mais significantes, obtendo-se valores de CIM < 100 µg/mL (tabela 6).

De acordo com Holetz *et al.* (2002), a atividade antimicrobiana pode ser classificada de acordo com a CIM em: Inativa (CIM > 1000 µg/mL); atividade fraca (500 < CIM < 1000 µg/mL); atividade moderada (100 < CIM < 500 µg/mL) e boa atividade (CIM < 100 µg/mL).

ISOLAMENTO MOLECULAR

O método de isolamento da substância baseou se na recristalização de substâncias de acordo com o grau de polaridade da molécula. Metodologia simples rápida e barata, quando comparada às metodologias utilizadas em outros trabalhos. É importante ressaltar também que a planta em estudo trata se de uma monocotiledônea com fácil poder de disseminação (também considerada planta daninha ou mata pasto) desse modo é possível obtê-lá mais facilmente, embora em épocas de estiagem não exista evidencia da mesma.

No espectro de RMN de ^1H (figura 3) da substância (A) cuja estrutura está proposta na (figura 2), podem se constatadas presenças de dois dupletos com δ 6,06 ppm (1H, J= 2,4Hz) e a δ 5,92ppm (1H, J = 2,4Hz) correspondentes aos hidrogênios do C-5 e C-3, respectivamente. Enquanto que os hidrogênios metílicos do carbono-8 apresentam δ de 2,6 ppm (3H, singleto). Adicionalmente, têm duas metilas de metoxilas, com δ 3,85ppm (3H, singleto) e δ 3,82ppm (3H, singleto), correspondentes aos hidrogênios das metoxilas ligadas aos C-2 e C-4, respectivamente.

No espectro de RMN de ^{13}C (figura 4), têm-se os carbonos quaternários C-1, C-2, C-4, C-6 e C-7, com os deslocamentos químicos em ~105; 162,89, ~165, 167,58 e 203,14 respectivamente, compatíveis com o seu ambiente químico. Enquanto que os carbonos aromáticos metínicos a δ 90,73 e δ 93,58, correspondem a C-3 e C-5, respectivamente. Os dois carbonos das metoxilas, uma ligada a C-2 e a outra do C-4 apresentam deslocamento químico δ 55,52.

Os dados de HSQC e HMBC podem ser observados na (Tabela 7) confirmando que se trata do composto 2-hydroxy-4,6-dimethoxyacetophenone.

O espectro de infravermelho apresenta absorção na frequência de 1611 cm^{-1} correspondente à carbonila. Destacamos que este valor mais baixo do que o valor de frequência normalmente apresentado para a carbonila, que é em torno de 1680 a 1720 cm^{-1} .

¹pode ser justificado por ponte de hidrogênio promovida pela carbonila do carbono-7 com a hidroxila do carbono-6, diminuindo assim o caráter de dupla ligação da carbonila.

Registra-se ainda a absorção correspondente à hidroxila no valor de 3101 cm^{-1} , um pouco mais baixo do que a frequência apresentada normalmente pela hidroxila, compatível com a ponte de hidrogênio referida anteriormente. A estrutura proposta por RMN é confirmada por espectrometria de massas (Figura 6)

O CG-MS revelou o pico do ion molecular do componente principal (98.48 %) em m/z 196. Adicionalmente, os fragmentos apresentados no espectro de massa a m/z 181 e m/z 166, são justificados pelas perdas do radical metila e formaldeído, respectivamente, conforme pode ser mostrado no Esquema da Figura 7.

CONCLUSÃO

Com base nas metodologias propostas e usadas no presente trabalho, foram alcançados resultados inéditos devido à falta de estudos da espécie acrescentando dados científicos a família aqui estudada.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem constatar a importância no processo de identificação fitoquímica para as partes aéreas e raiz de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler, sobretudo pela ausência estudos relatados na literatura e por seu uso pela população. Após CG/MS do óleo essencial de *Rhynchospora nervosa*, foi possível elucidar 26 compostos identificando um baixo rendimento através da técnica de arraste a vapor não se mostrando uma planta promissora para a obtenção de compostos voláteis através desta técnica. Os extratos apolares de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler apresentaram atividade antibacteriana frente bactérias Gram positivas (*Enterococcus faecalis*) quanto para Gram negativas (*Staphylococcus aureus*) como também apresentando atividade fungicida frente a *Candida albicans*. Os extratos polares mostraram conter discreta atividade antioxidante. O extrato bruto e os extratos apolares das folhas testados na concentração de $50\text{ }\mu\text{g/mL}$ apresentou baixa atividade citotóxica.

A apresentação de uma metodologia de isolamento da molécula rápida barata e eficaz considerando a facilidade da obtenção da substância pura, torna promissor o estudo de bioensaios com essa substância isolada. Molécula essa isolada e confirmada de acordo com todas as tecnologias utilizadas para a elucidação. A partir da elucidação estrutural da molécula a planta em estudo passa a ser promissora para futuros estudos.

Novos estudos de síntese química ou substituições podem ser realizadas a partir da molécula já elucidada.

Este trabalho mostrou que as folhas de *Ryncosphora nervosa*, podem ser consideradas boas fontes de compostos bioativos, apresentando efeitos potenciais benéficos sobre a saúde humana e justificando a ampliação dos estudos.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4.ed. Carol Stream: Allured, p.469, 2007.

AGUILAR, S. L.; RAMÍREZ, G.; NICASIO, P.; ALEGRÍA-REYES, C.; HERRERA-ARELLANO, A. Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, p. 284-288, 2009.

AL-AZZAWI, A. M.; AI-KHATEEB, E.; AI-SAMERAEI, K.; AI-JUBOORI, A. G. Antibacterial activity and the histopathological study of crude extracts and isolated tecomine from *Tecoma stans* Bignoniaceae in Iraq. **Pharmacognosy Research**, v. 4, p. 37–43, 2012.

ALLEY, D. S.; SHEMAKER, R. H.; PAULL, K. D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T. H.; CURRENS, M. J.; SENIFF, D.; Michael R. BOYD, M. R. Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.

AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Func Ecosyst and Communit.**, v. 2, p. 88-94, 2008.

BAKKALI, F; AVERBEK, S.; AVERBEK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, p. 446-475, 2008.

BARROSO G. M.; PEIXOTO A. L.; COSTA C. G.; ICHASO C. L. F.; GUIMARÃES E. F.; LIMA H. C. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Viçosa, UFV: Imprensa Universitária. v.3, 1991.

BASTOS, M. L.; LIMA, M. R.; CONSERVA, L. M.; ANDRADE, V. S.; ROCHA, E. M.; LEMOS, R. P. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 8, p. 16, 2009.

BENDAOU, H.; BOUJILA, J.; RHOUMA, A.; SAVAGNAC, A.; ROMDHANE, M. GC/MS analysis and antimicrobial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus radiata*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v.89, p. 1202-1297, 2009.

BLOIS, M. S. A note on free radical formation in biologically occurring quinones. **Biochim. Biophys**, v.18, n.1, p.165, 1955

BRAGA, T.V.; OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NAGEM, T. J. Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & C. E. Jarvis subsp. *verticillata* e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.** V.28, p.287-290, 2007.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos/ Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, **Tecnologia e Insumos Estratégicos**, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de Diretoria Colegiada nº 48 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. *D.O.U.*, 18 de mar. 2004

CAI Y.; CHEN T.; XU Q. **Astilbin suppresses collagen-induced arthritis via the dysfunction of lymphocytes**. *Inflamm Res*, v. 52, p. 334-340, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal and Biological Research**, n. 33, p. 179-189, 2000.

CECHINEL, F. V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, n. 1, 1998.

CHOUDHURY, S.; DATTA, S. A.; TALUKDAR, A.; CHOUDHURY, M. D. Phytochemistry of the Family Bignoniaceae- A review, **Assam University Journal of Science & Technology: Biological and Environmental Sciences**, v. 7, n. 1, p. 145-150, 2011.

CINGI, M. R.; DE ANGELIS, I.; FORTUNATI, E. Choice and standardization of test protocols in cytotoxicology: a multicentre approach. **Toxicology in vitro**, v. 5, p. 119-125, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **Twenty-Second Informational Supplement**, v. 32, n. 3, 2012.

COSTA, J. P.; LOURENÇO, N. V.; SANTOS, C. M. P.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, G. F.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 421-428, 2012.

DUARTE, D. S.; DOLABELA, M. F.; SALAS, C. E.; RASLAM, D. S.; OLIVEIRA, A. B.; NENNINGER, A.; WIEDEMANN, B.; WAGNER, H.; LOMBARDI, J.; M. T. LOPES, M. T. Chemical characterization and biological activity of *Macfadyena unguis-cati* (Bignoniaceae). **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 52, p. 347-352, 2000.

DVORSKÁ, M.; ZEMLIČKA, M.; MUSELÍK, J.; KARARFIÁTOVÁ, J.; SUCHÝ, V. Antioxidant activity of *Catalpa bignonioides*, **Fitoterapia**, v. 78, p. 437-439, 2007.

GACHET, M. S.; SCHUHLY, W. Jacaranda – An ethnopharmacological and phytochemical review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, p. 14-27, 2009.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTSMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. **Phytochemistry**, v. 42, p. 1315-1320, 1996.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae. Part I (Crescentieae and Tourrettieae). New York: The New York Botanical Garden, **Flora Neotropica**, v. 25, n. 1, p. 1-130, 1980.

GENTRY, A. H. Studies in Bignoniaceae 25: new species and combinations in South American Bignoniaceae. **Annals of the Botanical Missouri Garden**. n. 64, p. 311-319. 1977.

GENTRY, A. H.; Flora Neotropica: Monograph 25, **Tribe Tecomeae**, vol. 2. The New York Botanical Garden, New York, p. 52-105, 1992.

GOBBO N. L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-371, 2007.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 894-901, 2008.

HIRABARA, S.M. et al. Acute effect of fatty acids on metabolism and mitochondrial coupling in skeletal muscle. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1757, n.1, p.57-66,2006.

HIRABARA, S.M.; CURI, R.; MAECHLER, P. Saturated fatty acid-induced insulin resistance is associated with mitochondrial dysfunction in skeletal muscle cells. **J. Cell. Physiol.**, v.222,n.1, p.187-194,2010.

HOLETZ F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memória Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n.7, p. 1027-1031, 2002.

HUBERLE, A., BEYEEN, A.D., ÖCKINGER, J., AYTURAN, M., JAGODIC, M., DE GRAAF, K.L., FISSOLO, N., MARTA, M., OLOFSSON, P., HULTQVIST, M., HOLMDAHL, R., OLSSON, T., WEISSERT, R. Advanced Intercross Line Mapping Suggests That *Ncf1* (*Ean6*) Regulates Severity in an Animal Model of Guillain-Barre´ Syndrome. **The Journal of Immunology**, v. 182, p. 4432–4438, 2009.

ISABELLA Santos Araújo, **Atividade Antimicrobiana De Plantas Aromáticas Que Ocorrem No Estado Do Pará**, Dissertação, Feira De Santana, Ba 2011

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. 7 .ed. São Paulo: Nacional. 1985.

JORGE AS, DANTAS SRPE. **Abordagem Multiprofissional do Tratamento de Feridas**. São Paulo: Atheneu; 2005.

LEITE, A.C.R.M. Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafil, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais. 2010. 120f. **Tese de Doutorado em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará**, Fortaleza, 2010.

LENTA, B. N.; WENIGER, B.; ANTHEAUME, C.; NOUNGOUE, D. T.; NGOUELA, S.; ASSOUB, J. C.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; FOKOU, P. A.; DEVKOTA, K. P.; TSAMO, E.; SEWALD, N. Anthraquinones from the stem bark of *Stereospermum zenkeri* with antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1595-1599, 2007.

LENTNER, C. Geigy Scientific tables. Physical chemistry composition of blood hematology somatometric data. **Ciba-Geigy limited**, West Caldwell, New Jersey. V.3,p. 122-123,1984.

LIMA, C. S.; AMORIM, E. L.; NASCIMENTO, S. C.; ARAÚJO, C. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V.; VIEIRA, I. J.; BRAZ-FILHO, R. **Cytotoxic pyranonaphthoquinones from *Melloa quadrivalvis* (Bignoniaceae). *Natural Product Research***, v. 19, p. 217-222, 2005.

LOHMANN, L. G.; PIRANI, J. R. **Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil: Bignoniaceae**. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo v.17, p. 127-153, 1998.

LOPES, M. M. M.; CARVALHO-OKANO, R. M.; SOUZA, A. L.; PAIVA, H. N. Crescimento de Mudas de Cipó-Cravo (*Tynanthus fasciculatus* Miers), uma Liana com Potencial Medicinal. **Revista Árvore**, v. 32, n. 2, p.211-216, 2008.

MANDELBAUM SH, DI SANTIS EP, MANDELBAUM MHS. Cicatrização: conceitos atuais e recursos auxiliares – Parte II. **Anais Bras de Dermatol**; 78(5): 525-42, 2003.

MARCUCCI, M. Propiedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. **Química nova**, v.19, n.5, p.539-536, 1996

McGINTY, D.; LETIZIA, C.S.; API, A.M. Fragrance material review on phytol. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 59-63, 2010.

MENSAH, A. Y.; HOUGHTON, P. J.; DICKSON, R. A.; FLEISCHER, T. C.; HEINRICH, M.; BREMNER, P. *In vitro* evaluation of effects of two Ghanaian plants relevant to wound healing. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 941-944, 2006.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunological Methods*, v. 65, n. 2, p. 55–63, 1983.

Nettleton, J.A. **Omega-2 fatty acids and health. 9th ed.** New York: Chapman Hall, 1995.

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

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

NISSEN, N., EVANS, S. Exploring the practice and use of Western herbal medicine: Perspectives from the social science literature. **Journal of Herbal Medicine**. v. 2, p. 15, 2012.

OFORI-KWAKYE, K.; KWAPONG, A. A.; ADU, F. Antimicrobial activity of extracts and topical products of the stem bark of *Spathodea campanulata* for wound healing. *African Journal of Traditional. Complementary and Alternative Medicines*, v. 6, p. 168-174, 2009.

OGURA, M.; CORDELL, G. A.; FARNSSWORTH, N. R. Potential anticancer agents. IV. Constituents of *Jacaranda caucana* Pittier (Bignoniaceae). **Lloydia**, v. 40, p. 157-168, 1977.

OLMSTEAD, R. G.; ZJHRA, M. L.; LOHMANN, L. G.; GROSE, S. O.; ECKERT, A. J. A molecular phylogeny and classification of Bignoniaceae. **American Journal of Botany** v. 96, p. 1731-1743, 2009.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCCOLI, C, M.; TOBOUTI, N. R. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier. 3ª. Ed. v. 1, p. 544, 2010.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; MARCOS E. L. LIMA, M. E. L.; TELMA M. KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 18, p. 301-307, 2008.

PALOMINO, J. C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F.; Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 46, p. 2720, 2002.

PARK, B. S.; KIM, J. R.; LEE, S. E.; KIM, K. S.; TAKEOKA, G. R.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Selective growthinhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1152-1157, 2005.

PARK, B. S.; LEE, H. K.; LEE, S. E.; PIAO, X. L.; TAKEOKA, G. R.; WONG, R. Y.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 255-262, 2006.

PEREIRA, E. M.; de MACHADO, B. T.; LEAL, I. C.; JESUS, D. M.; DAMASO, C. R.; PINTO, A. V.; GIAMBIAGI-deMAVAL, M.; KUSTER, R. M.; SANTOS, K. R. *Tabebuia avellanedae* naphthoquinones: activity against methicillinresistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and in vivo dermal irritability analysis. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 5, p. 5, 2006.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, V.29, n.4, p.755-760, 2006.

RICIEVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, London, v.2 n.4, p152-159, 1997.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with activity: a rewiev of the literartue. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 23, p. 124–149, 1987.

ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO, S. A.; MUNOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of tem medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of nonnosocomial infections. **BioMed Central Complementary and Alternative. Medicine**, v. 6, p. 1-6, 2006.

RONTANI, J-F., VOLKMAN, J.K. Phytol degradation products as biogeochemical tracers in aquatic environments. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 1–35, 2003.

SALVADOR, M. J. **Estudo químico e biotecnológico de *alternanthera marítima* e *alternanthera tenella* (Gomphrena, Amaranthaceae)**. p. 405, Tese (Doutorado em química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, 2013.

SILVA, P. B.; MEDEIROS, A. C. M.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; KOLB, R. M.; FREI, F.; SANTOS, C. Avaliação do potencial alelopático, atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos orgânicos das folhas de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 13, n. 4, p. 447-445, 2011.

SIMÕES, C. M. D.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; de MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6ª Ed.; Editora UFSC, 2010.

SINGH, K. V. & SHUKLA, N. P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v. 55, p. 313-315, 1984.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: Ed. UFSC, p.290-326, 2003.

STOPPA, M. A.; CASEMIRO, L. A.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. A. G. Estudo comparativo entre as metodologias preconizadas pelo CLSI e pelo EUCAST para avaliação da atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 498-502, 2009.

TABANCA, N.; PAWAR, R. S.; FERREIRA, D.; MARAIS, J. P.; KHAN, S. I.; JOSHI, V.; WEDGE, D. E.; KHAN, I. A. Flavan-3-ol-phenylpropanoid conjugates from *Anemopaegma arvense* and their antioxidant activities. **Planta Médica**, v. 73, p. 1107-1111, 2007.

TAKEMOTO FILHO, E. J. T.; GODOY, H.T. Validação de metodologia para determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n.5, p. 1189-1194, 2009.

TAYLOR, P. G.; CESARI, I. M.; ARSENAK, M.; BALLEEN, D.; ABAD, M. J.; FERNÁNDEZ, A.; MÍLANO, B.; RUIZ, M. C.; WILLIAMIS, B.; MICHELANGELI, F. Evaluation of Venezuelan medicinal plant extracts for antitumor and antiprotease activities. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, p. 349-362, 2006.

TIVERON, A.P. **Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil**. Dissertação Mestrado, 2010

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: a review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, Ghaziabad, v. 1, p. 98-106, 2011.

TYAGI, A.; SINGH, V.; BHARADWAJ, M.; KUMAR, A.; THAKUR, K. Isolation and antibacterial susceptibility testing of multi drug resistant *Pseudomonas aeruginosa* causing urinary tract infections. **Journal of Chemical and pharmaceutical Research**. v. 3, n. 4, p. 342-347. 2011.

UDULUTSCH, R. G. **Revisão taxonômica de *Adenocalymma* Mart. ex Meisn. (Bignoniaceae Juss.)**. PhD, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista brasileira de farmacognosia**, v.18, p. 308-313, 2008.

VIEGAS, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VILLASMIL, J.; ABAD, M. J.; ARSENAK, M.; FERNÁNDEZ, A.; RUIZ, M. C.; WILLIAMS, B.; MICHELANELI, F.; HERRERA, F.; TAYLOR, P. Cytotoxic and antitumor activities of Venezuelan plant extracts *in vitro* and *in vivo*. **Pharmacologyonline**, v.3, p. 808-816, 2006.

VOIGT R, Bornschein M. **Tratado de tecnologia farmacêutica**. 3º. ed. Zaragoza: Editorial Acribia, 1982.

YAMASAKI, K.; HASHIMOTO, A.; KOKUSENYA, Y; MIYAMOTO, T.; SATO, T. Protective effects of methanol extracts of crude drugs. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 42, p.1663-1665, 1994.

YAMASHITA, M.; KANEKO, M.; TOKUDA, H.; NISHIMURA, K.; KUMEDA, Y.; IIDA, A. Synthesis and evaluation of bioactive naphthoquinones from the Brazilian medicinal plant, *Tabebuia avellanedae*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 6286-6291, 2009.

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

ZANG, Z. M.; WU, W. W.; LI, G. K. A. GC-MS study of the volatile organic composition of straw and oyster mushrooms during maturity and its relations to antioxidant activity.

Journal of Chromatographic Science. v. 46, p. 690-696, 2008.

ZUANAZZI, J. A. S.; MAYORGA, P. Fitoprodutos e desenvolvimento econômico. **Química**

Nova, v. 33, n. 6, p. 109-114, 2010.

LISTA DE TABELAS

- 1- Prospecção fitoquímica representando a presença(+) ou ausência(-) dos metabólitos secundários: A – Alcalóides; B – Flavonóides; C – Triterpenos e Esteróides; D – Antraquinonas; E – Cumarinas; F – Leucoantocianidinas e proantocianidinas; G – Saponinas

Metabólitos	A	B	C	D	E	F	G
Presença(+)	-	+	+	-	+	+	-
Ausência(-)							

- 2- Teste de citotoxicidade dos extratos bruto e particionados das partes aéreas de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae) diante de linhagens de células tumorais NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano); HEP-2 (carcinoma de laringe humana); MCF-7 (câncer de mama humano); HT-29.

Produtos teste	% de inibição					
	NCI-H292	DP	HEP-2	DP	HT-29	DP
Extrato bruto metanólico	21,7	0,4	26,2	2,3	30,7	0,0
Extrato partição de acetato de etila	22,0	1,3	20,6	1,6	28,1	1,9
Extrato partição clorofórmio	33,1	2,4	26,3	2,1	88,1	3,1
Extrato partição diclorometano	23,5	0,6	21,6	0,0	27,1	2,7

Extrato partição hexâno	22,6	0,2	30,3	1,7	18,0	0,2
Doxorrubicina	94,1	1,9	79,4	2,6	64,1	1,1

3- Avaliação do potencial antioxidante pela técnica do DPPH do extrato bruto e extratos particionados de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae). Controle positivo ácido ascórbico (AA).

EXTRATO	CE50	DESV.P.	C V. %	CE50 A.A	% A.A.	% AA (25µg/ml)	DESV. P.	C.V %
Extrato partição hexâno	2184,98	568,94	26,04	24,72	54,84	16,77	0,04	21,84
Extrato partição diclorometano	1059,18	69,79	6,59	24,72	54,84	21,01	0,02	7,42
Extrato partição clorofórmio	1001,45	84,94	8,44	24,72	54,84	20,85	0,03	12,28
Extrato partição de acetato de etila	1234,37	49,93	4,04	24,72	54,84	17,14	0,03	17,37
Extrato partição de acetona	961,96	109,19	11,35	24,72	54,84	24,11	0,02	8,10
Extrato partição de etanol	645,77	76,86	11,90	24,72	54,84	25,91	0,01	4,61
Extrato partição de metanol	1960,76	61,39	3,13	24,72	54,84	21,31	0,03	12,46
Extrato bruto metanólico	619,76	62,20	10,04	24,72	54,84	25,92	0,03	13,10

4- Composição percentual do óleo essencial de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae). N = Nisto.L; W = Wiley7N.L; A = Adams

Pico	Tempo de retenção	Composto	IS	Área(%)	Observado	Fórmula molecular
1	12,407	Delta-3-careno	97 ^W	0,37	136	C ₁₀ H ₁₆
2	25,425	alpha-Copaene	99 ^A	1,82	204	C ₁₅ H ₂₄
3	26,8	Trans-	90 ^W	2,39	204	C ₁₅ H ₂₄

	27	Caryophyllene				
4	27,5 69	Ledene	90 ^N	0,25	204	C ₁₅ H ₂₄
5	27,8 92	Beta-selinene	99 ^W	0,81	204	C ₁₅ H ₂₄
6	28,5 95	1,2,4a,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl	99 ^N	0,98	204	C ₁₅ H ₂₄
7	28,8 43	bis(2-furyl)methylvinylsilane	90 ^W	1,35	204	C ₁₅ H ₂₄
8	29,1 7	δ-Gujene	90 ^W	1,08	204	C ₁₅ H ₂₄
9	29,3 17	α-Murolene	99 ^A	1,36	204	C ₁₅ H ₂₄
10	29,5 54	β-bisabolene	98 ^W	0,26	204	C ₁₅ H ₂₄
11	29,7 34	α-amorphene	97 ^W	0,22	204	C ₁₅ H ₂₄
12	30,0 6	transcalamene	90 ^A	3,32	202	C ₁₅ H ₂₂
13	30,5 93	alfa-calacorene	95 ^A	0,28	200	C ₁₅ H ₂₀
14	32,5 32	tetradecanal	90 ^N	0,23	212	C ₁₄ H ₂₈ O
15	34,3 46	Cadalene	95 ^N	1,04	198	C ₁₅ H ₂₈
16	35,3 4	Hexadecanal	95 ^N	4,14		C ₁₆ H ₃₂ O
17	38,7 44	Hexahydrofarnesylacetone	90 ^N	0,6	268	C ₁₈ H ₃₆ O
18	39,1 15	ácidopentadecanoico	99 ^N	0,3	242	C ₁₅ H ₃₀ O ₂
19	40,5	Farnesylacetone	90 ^A	0,37	262	C ₁₈ H ₃₀ O

	84	e				
20	41,7 38	Ácido hexadecano	99 ^N	46,37	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂
21	43,2 18	Z-farnesol	91 ^A	1,2	222	C ₁₅ H ₂₆ O
22	44,7 89	Heneicosane	95 ^W	0,27	296	C ₂₁ H ₄₄
23	45,5 63	Octadecadieno ic acid (Z,Z)	99 ^N	2,83	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂
24	45,6 96	(6Z,9Z)- pentadeca-6,9- dien..	98 ^N	4,37	224	C ₁₅ H ₂₈ O
25	49,0 93	Tricosane	98 ^W	1,94	324	C ₂₃ H ₄₈
26	54,0 33	Nonadecane, 9-methy	94 ^N	1,66	282	C ₂₀ H ₄₂

5- valiação potencial para atividade antimicrobiana dos extratos particionados de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae). A –Hexano; B–Clorofórmio; C – Acetato de Etila; D – Diclorometano; E – Acetona; F–Etanol; G – Metanol; H – Bruto metanólico

BACTERIAS	A	B	C	D	E	F	G	H
<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	-	+	-	-	-	-

<i>Pseudomonasaeruginosa</i>	+	-	+	+	-	-	-	-
<i>Salmonela enteritides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-

6- Concentração Inibitória Mínima das bactérias e fungo ensaiados com extrato bruto metanólico e particionados (hexano, diclorometano, clorofórmio e acetato de etila) das partes aéreas de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae).

MICRO- ORGANISMO	EXTRATOs	RESULTADO	
		CMI	
<i>S.aureus</i> 02	BRUTO METANÓLICO	CMI	125 µg
	HEXANO	CMI	62.5 µg
	DICLOROMETANO	CMI	31.25 µg
	CLOROFÓRMIO	CMI	---
<i>Pseudomonas-416</i>	HEXANO	CMI	----
	DICLORO	CMI	----
	ACETATO DE ETILA	CMI	----

<i>Bacillus 86</i>	Hexano	CMI	1000 µg
	Dicloro	CMI	1000 µg
	Clorofórmio	CMI	---
Candida- 1007			
	Dicloro	CMI	500 µg
	Clorofórmio	CMI	----

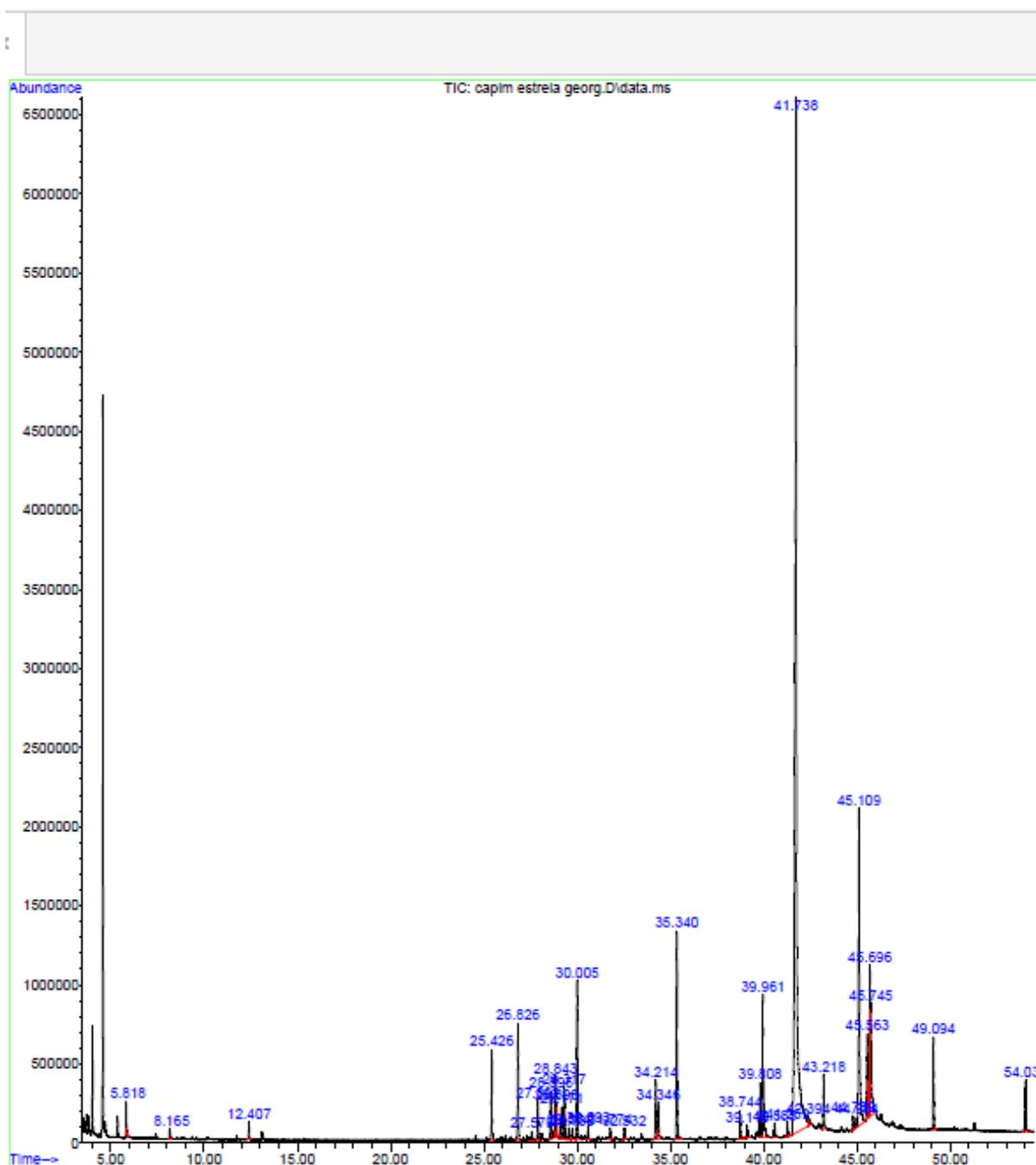
7- Dados HSQC e HMBC

	HSQC		HMBC	
	δ_C	δ_H	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
C				
1	~105	-		H-3; 3H-8
2	162.89	-		MeO-2
4	~165	-		MeO-4
6	167.58	-		
7	203.14	-	3H-8	

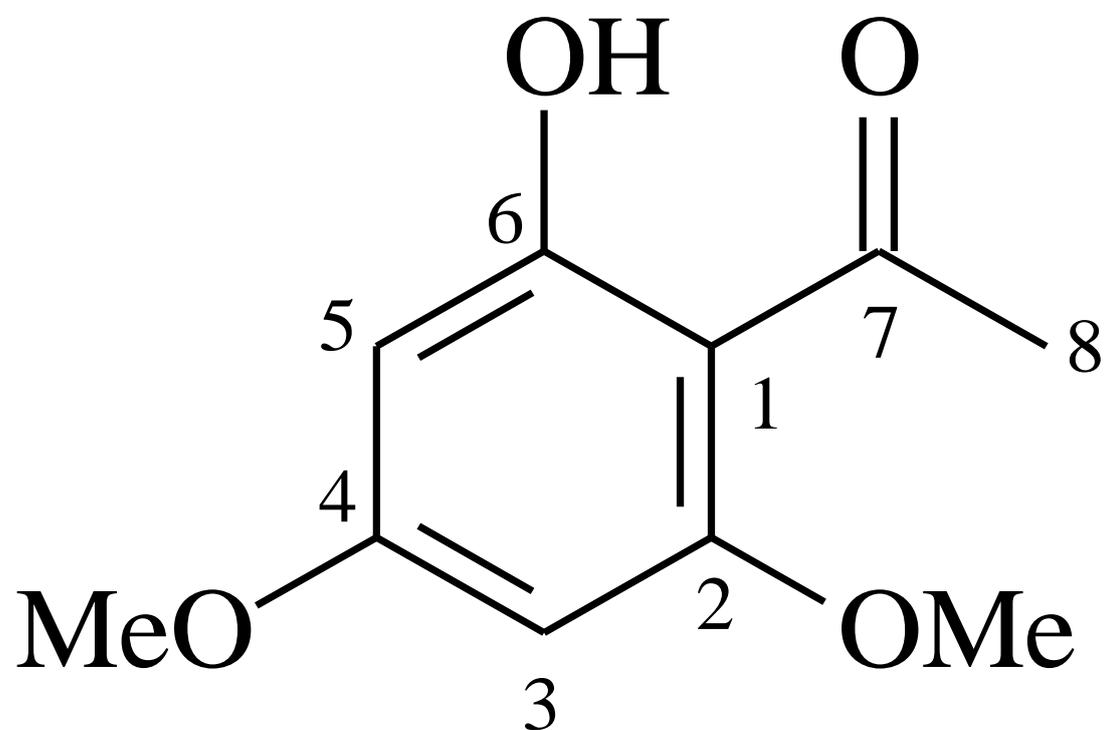
CH				
3	90.73	5.92 (d, 2.4)		
5	93.58	6.06 (d, 2.4)		
CH₃				
8	32.90	2.61 (s)		
MeO- 2	55.53	3.85 (s)		
MeO- 4	55.53	3.82 (s)		

LISTA DE FIGURAS

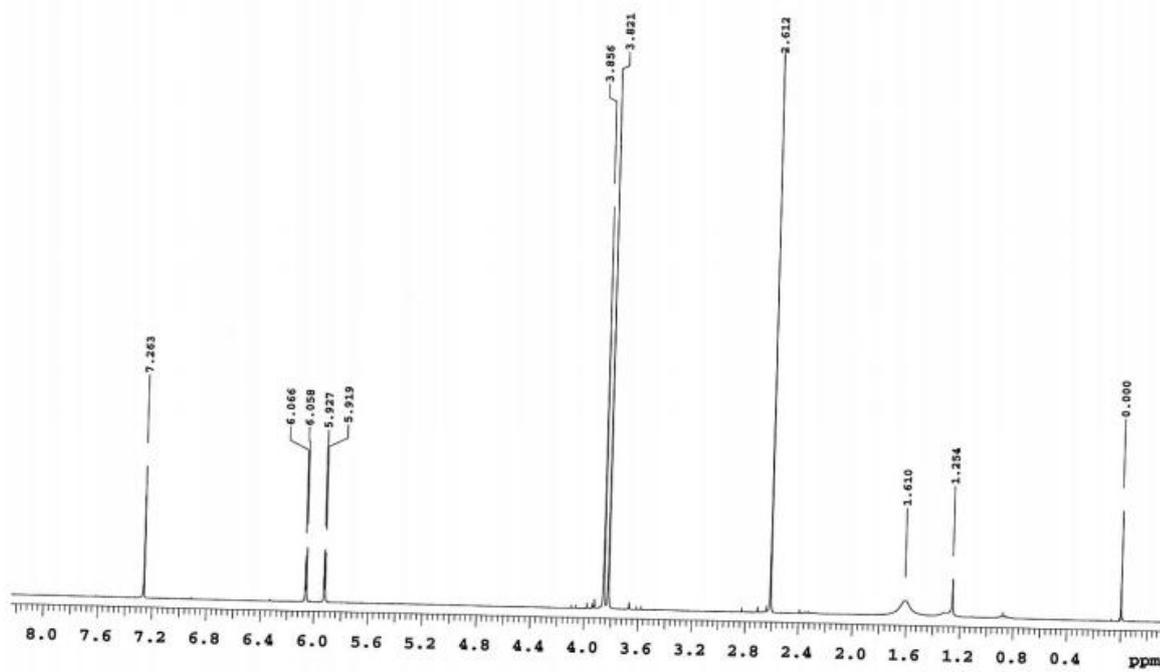
- 1- Cromatograma evidenciando os picos e tempos de retenção dos compostos identificados no óleo essencial de *Rhynchospora nervosa* (Vahl) Boeckeler (Cyperaceae) por CG-EM.

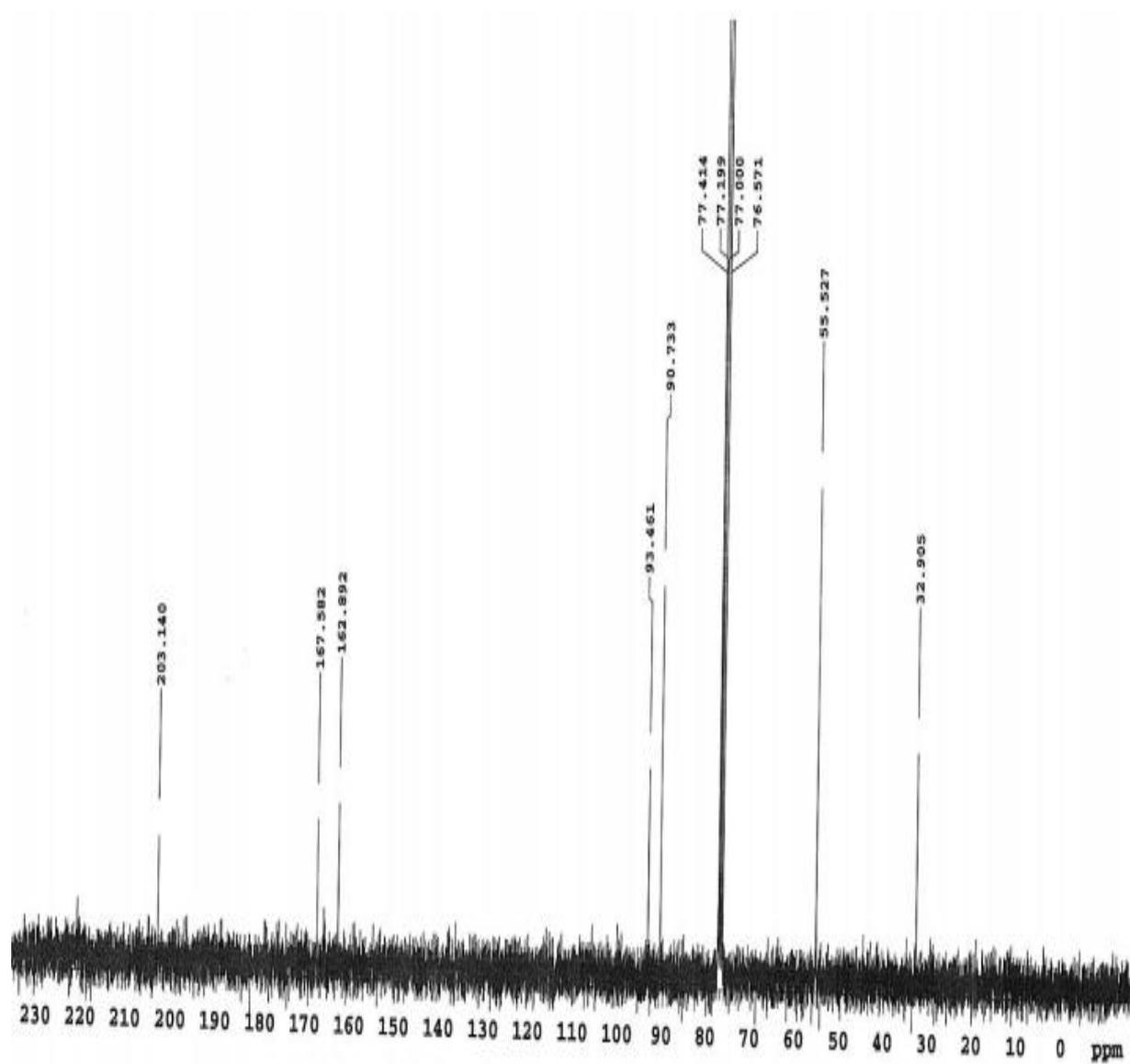


2- Estrutura molecular da xantofilina (A).

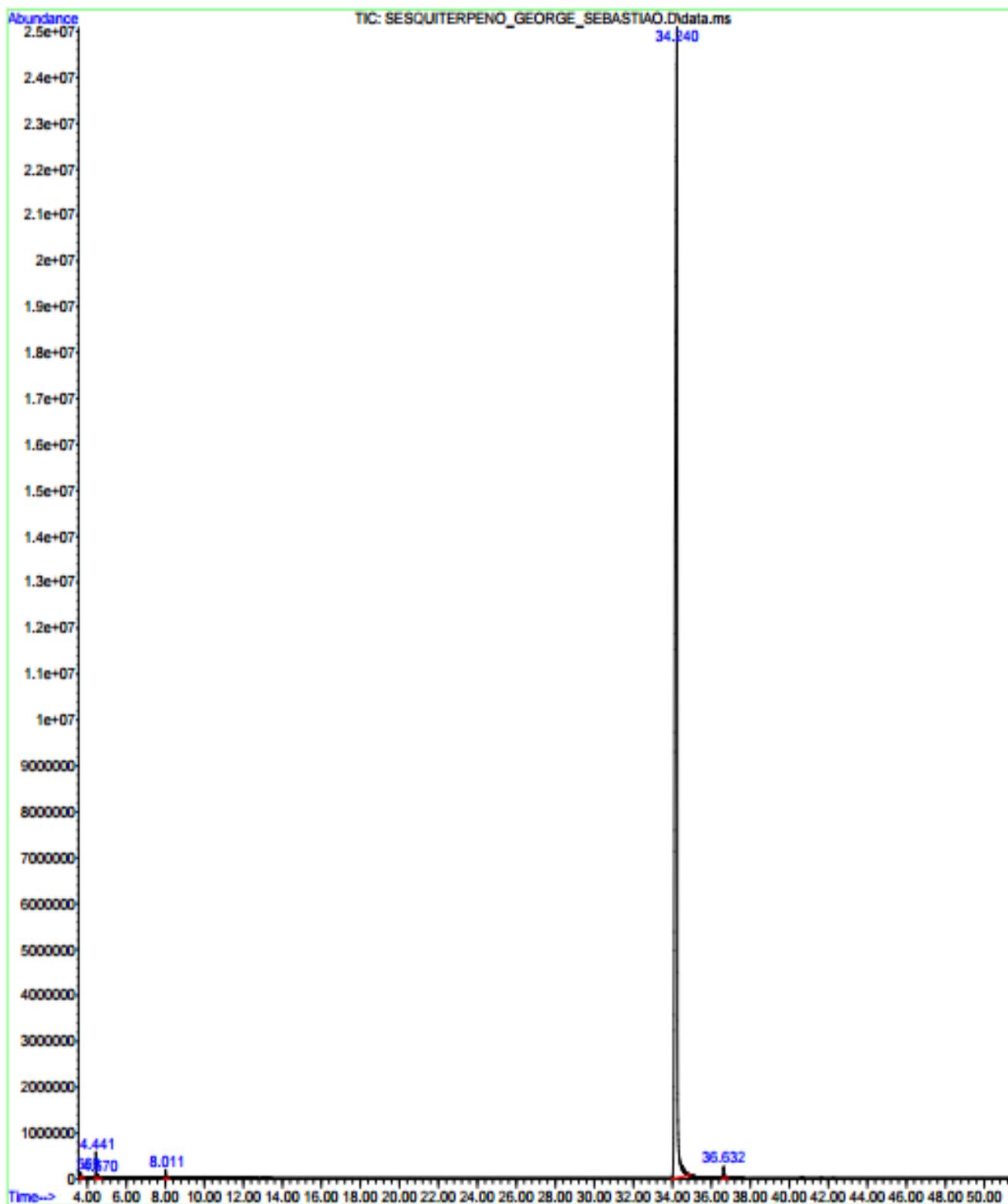


3- Espectro de RMN 1H, ; 400MHz, clorofórmio-d.



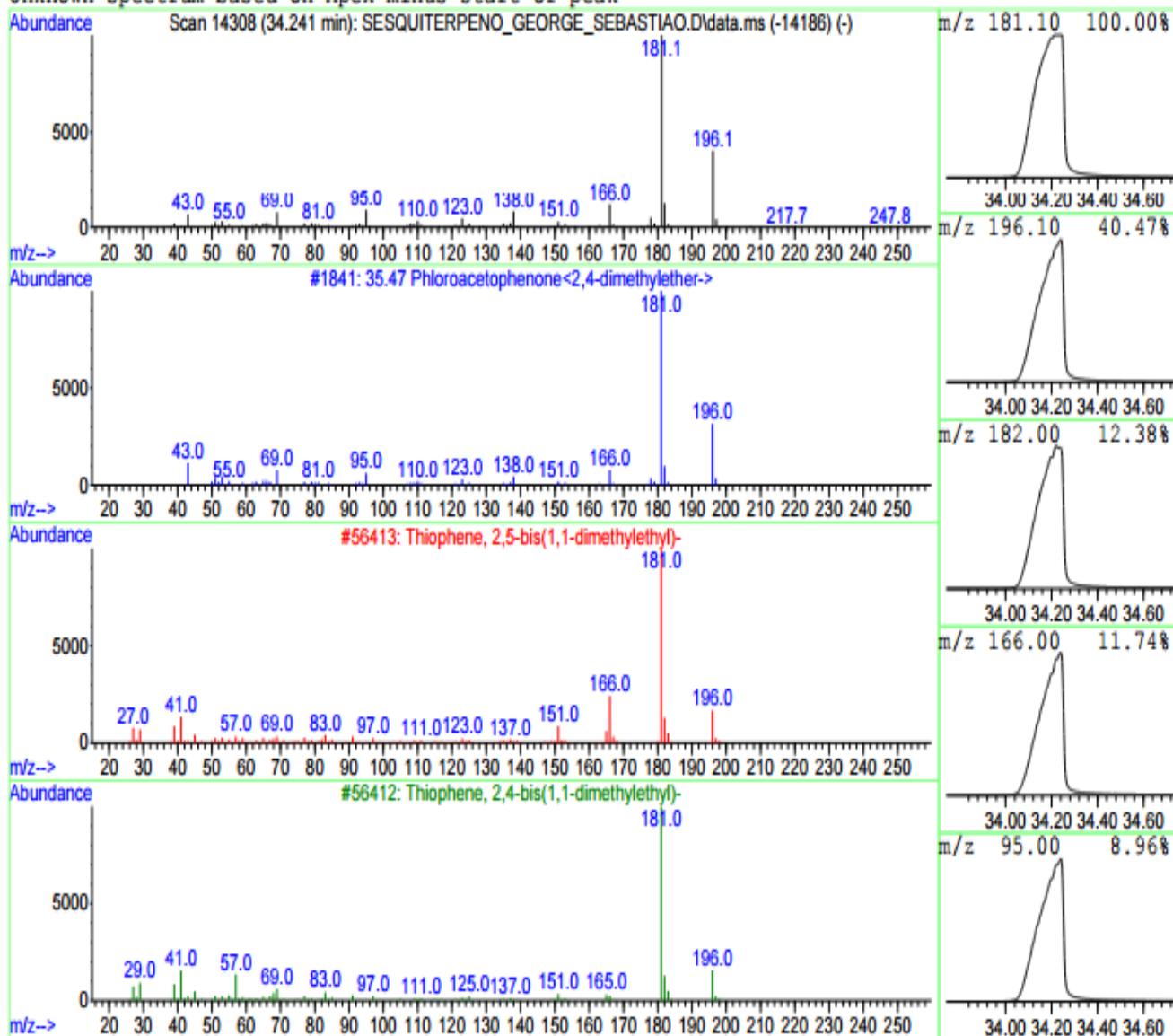
4- Espectro de RMN ^{13}C ; 400MHz do composto isolado

5- Espectro CG-MS da substancia isolada.



6- Espectro CG-MS na área 98,48 e 34,241 min

Unknown Spectrum based on Apex minus start of peak



Data File: C:\msdchem\1\data\2016_01_09\SESQUITERPENO_GEORGE_SEBASTIAO.D

Sample : Sesquiterpeno George Prof. Sebastiao

Peak Number: 5 at 34.241 min Area: 1932045326 Area % 98.48

The 3 best hits from each library.

	Ref\#	CAS\#	Qual
C:\Database\NIST08.L			
1 Ethanone, 1-(2-hydroxy-4,6-dimet...	56008	000090-24-4	94
2 Thiophene, 2,5-bis(1,1-dimethyle...	56413	001689-77-6	87
3 Thiophene, 2,4-bis(1,1-dimethyle...	56412	033369-81-2	72

7- Esquema de perda dos grupamentos metila e metoxila.R. Time 34.241 min. (Pico 5, 98.48 %)

