

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE
Cyperus rotundus L. ACLIMATADA NO AMAZONAS

ANA LÚCIA MENDES DOS SANTOS

MANAUS
2014

ANA LÚCIA MENDES DOS SANTOS

ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Cyperus rotundus* ACLIMATADA
NO AMAZONAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro

MANAUS
2014

DEDICATÓRIA

A minha mãe **Maria José Mendes** pela
admiração e respeito.

DEDICATÓRIA

A minha filha **Lorena Santarém** e ao meu esposo
Valdnor Santarém pelo carinho, apoio e
incentivo.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro, pela orientação, incentivo, amizade e ensinamentos transmitidos durante a realização deste trabalho.

A Profa. Dra. Juliana Mesquita Vidal Martinez de Lucena, pelas sugestões, amizade, confiança e ensinamentos transmitidos durante a realização das análises microbiológicas.

A Profa. Dra. Izaltina Jardim, pela realização das análises de atividade leishmanicida.

Ao Prof. Dr. Anderson Barisson, pela realização dos experimentos de RMN e ensinamentos na identificação e elucidação de substâncias.

A Profa. Dra. Francinete Campos, pela colaboração, amizade, e pela realização dos experimentos de Cromatografia Gasosa.

Aos analistas Angelita e Kahlil Salomé da UFPR, pela colaboração e acompanhamento técnico nas análises de RMN.

Ao Prof. Emerson Lima e a Lorena Santarém pela realização dos ensaios enzimáticos.

Aos meus alunos de Iniciação Científica, Larissa Perrone, Laudjonson Almeida e Filipe Matos, pelos momentos agradáveis, paciência e companheirismo.

Aos amigos do curso de Pós-Graduação em Química pelo companheirismo e horas agradáveis que passamos juntos.

A todos os professores da Pós-Graduação em Química, pelos ensinamentos e amizade.

A coordenação da Pós-graduação em Química pela concessão de auxílio financeiro para custear as despesas para Curitiba.

Ao CNPq pela concessão do auxílio financeiro e bolsa de estudo.

A todos que colaboraram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

"A coisa mais bela que o homem pode experimentar é o mistério. É essa emoção fundamental que está na raiz de toda ciência e toda arte."

Albert Einstein

RESUMO

O presente trabalho descreve o isolamento e identificação estrutural dos constituintes químicos de *Cyperus rotundus*, aclimatada no Amazonas, bem como, a avaliação sazonal do óleo essencial extraído dos tubérculos que foram coletados em diferentes épocas do ano, além das atividades de sequestro do radical DPPH, ensaios enzimáticos elastase, tirosinase e α -glucosidase, ensaio citotóxico contra larvas de *Artemia salina* e ensaio colorimétrico contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A partir do extrato hexânico obtido dos tubérculos foram identificados uma mistura dos esteróides β -sitosterol e estigmasterol e o éster hexadecanoato de etila. Do extrato em acetato de etila foi identificada uma mistura binária de sesquiterpenos oxigenados cíclicos caracterizados como α -ciperona e ciperotundona e o ácido ferulico. Do extrato em metanol foi isolado o *D*-manitol e o peróxido de ergosterol. Do extrato hexânico obtido da inflorescência foi identificada a mistura de esteróides β -sitosterol e estigmasterol e do extrato em metanol foi isolada a luteolina. A composição do óleo essencial foi analisada por uma combinação de CGAR-EM e CG-DIC. Os resultados revelaram variação no teor do óleo essencial no período seco e chuvoso, bem como variação qualitativa dos principais constituintes em função da época do ano em que os tubérculos foram coletados. Os componentes majoritários do óleo essencial identificados foram β -selineno (5,79 a 7,34%), óxido de cariofileno (4,68 a 7,47%), cipereno (10,64 a 18,62%), ciperotundona (13,78 a 24,72%) e α -ciperona (20,34 a 23,73%). No ensaio quantitativo de sequestro de radicais livres, o extrato em metanol da inflorescência e a luteolina revelaram forte atividade antioxidante. Nos ensaios enzimáticos frente elastase e tirosinase, os extratos e substâncias isoladas apresentaram fraca atividade inibitória. No ensaio enzimático frente α -glucosidase os extratos hexânicos (tubérculos e inflorescência) e o óleo essencial apresentaram forte atividade inibitória com CI_{50} = 2,75; 12,75 e 15,17 μ g/mL, respectivamente. O resultado da DL_{50} do ensaio realizado com *Artemia salina* L. revelou baixa toxicidade para o extrato em hexano e óleo essencial e moderada toxicidade do extrato em acetato de etila e em metanol. Na avaliação da atividade antimicrobiana o extrato hexânico (tubérculos) e o óleo essencial apresentaram forte inibição contra as bactérias Gram positivas e contra a levedura e o extrato metanólico (inflorescência) e o *D*-manitol apresentaram elevada atividade contra *Candida albicans*. Na avaliação da atividade de inibição de adesão microbiana o óleo essencial e *D*-manitol reduziram em cerca de 50% a capacidade de formação do biofilme com *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, respectivamente. Os resultados do teste colorimétrico realizados *in vitro* dirigidos à ação leishmanicida, contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, revelaram significativa atividade para o extrato hexânico (CI_{50} = 3,65 μ g/mL), acetato de etila (CI_{50} = 4,29 μ g/mL) e o óleo essencial (CI_{50} = 5,07 μ g/mL). A partir dos tubérculos foram isolados e identificados seis gêneros de fungos endofíticos, sendo de maior ocorrência o *Colletotrichum*.

PALAVRAS-CHAVE: Cyperaceae; Óleo essencial; Sazonalidade; Ensaios biológicos.

ABSTRACT

This work describes the isolation, identification structural of the chemical constituents of *Cyperus rotundus*, acclimatized in the Amazon, as well as seasonal variation of the essential oil extracted from the tubers collected at different times of the year, besides the ability to sequester radical DPPH, enzymatic assays as elastase, tyrosinase and α -glucosidase inhibitors, cytotoxic assay against *Artemia salina* larvae and colorimetric assay against promastigotes of *Leishmania amazonensis*. From the hexane extract obtained from the tubers was identified mixture of β -sitosterol and stigmasterol steroids, and the ester ethyl hexadecanoate. The ethyl acetate extract was identified a mixture of cyclic oxygenated sesquiterpenes characterized as α -cyperone and cyperotundone and the ferulic acid. Extract in methanol was isolated *d*-mannitol and ergosterol peroxide. From inflorescence hexane extract was identified mixture of β -sitosterol and stigmasterol steroids and in methanol extract was isolated luteolin. The essential oil composition was analyzed by a combination of GC- MS and GC-FID, the results reveal variation in the content of essential oil in the dry rainy, as well as qualitative variation of the main constituents depending on the time of year when tubers were collected. The major components of the essential oil were identified β -selineno (5.79 to 7.34%), caryophyllene oxide (from 4.68 to 7.47%), cipereno (10.64 to 18.62%), ciperotundona (13.78 to 24.72%) and α -ciperona (20.34 to 23.73%). In the quantitative assay of scavenging free radicals, the methanol extract of the inflorescence and luteolin showed strong antioxidant activity. In enzymatic assays against elastase and tyrosinase, the extracts and isolated compounds showed weak activity. In enzyme assay against α -glucosidase the hexane extracts (tubers and inflorescences) and the essential oil showed strong activity with $IC_{50} = 2,75 ; 12.75$ and $15.17 \mu\text{g/mL}$, respectively. The result of the LD_{50} assay with *Artemia salina* shows low toxicity to the hexane extract and essential oil and moderate toxicity of the extract in ethyl acetate and methanol. In the evaluation of the antimicrobial activity hexane extract (tubers) and the essential oil showed strong inhibition against Gram positive bacteria and against yeast and methanol extract (inflorescence) and *d*-mannitol showed high activity against *Candida albicans*. In assessing the activity of inhibiting microbial adhesion and the essential oil *d*-mannitol reduced by about 50 % the capacity of biofilm formation with *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*, respectively. The results of the colorimetric assay performed in vitro directed the leishmanicidal action against promastigotes of *Leishmania amazonensis* revealed significant activity for hexane extract ($IC = 3.65 \mu\text{g/mL}$), ethyl acetate ($IC = 4.29 \mu\text{g/mL}$) and the essential oil ($IC = 5.07 \mu\text{g/mL}$). From the tubers were isolated and identified six genera of endophytic fungi, with the most frequent *Colletotrichum*.

KEYWORDS: Cyperaceae; Essential oils; Seasonality; Biological assays.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais constituintes isolados em espécies de <i>Cyperus</i>	23
Figura 2 - Constituintes predominantes e identificados no óleo essencial de espécies de <i>Cyperus</i>	24
Figura 3 - <i>C. rotundus</i> e suas bases tuberosas.....	27
Figura 4 - Fotomicrografias das secções transversais dos tubérculos de <i>C. rotundus</i> . A - Região cortical contendo óleo-resinosos; B - Região cortical evidenciando súber desenvolvido de conteúdo amiláceo.....	28
Figura 5 - Principais constituintes isolados da espécie <i>C. rotundus</i>	30
Figura 6 - Principais substâncias identificadas nos diversos ecotipos de <i>C. rotundus</i> ...	33
Figura 7 - Ciclo de transmissão da <i>Leishmania sp</i>	40
Figura 8 - Principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.....	42
Figura 9 - Local de coleta de <i>C. rotundus</i>	51
Figura 10 - Estabilização do radical livre DPPH	63
Figura 11 - Cromatograma de Íons Totais (CIT) do óleo essencial de <i>C. rotundus</i> (amostra coletada em janeiro/12).....	80
Figura 12 - Cromatograma de Íons Totais (CIT) do óleo essencial de <i>C. rotundus</i> (amostra coletada em abril/12).....	80
Figura 13 - Cromatograma dos Íons Totais (CIT) do óleo essencial de <i>C. rotundus</i> (amostra coletada em julho/12).....	81
Figura 14 - Cromatograma dos Íons Totais (CIT) do óleo essencial de <i>C. rotundus</i> (amostra coletada em outubro/12).....	81
Figura 15 - PCA para as análises cromatográficas do óleo essencial de <i>C. rotundus</i>	84
Figura 16 - Dendograma obtido através do PCA dos compostos químicos presentes no óleo essencial de <i>C. rotundus</i>	85
Figura 17 - <i>Loading</i> do óleo essencial de <i>C. rotundus</i>	86
Figura 18 - Espectro de massas do cipereno	87
Figura 19 - Espectro de massas do β -selineno	87
Figura 20 - Espectro de massas do óxido de cariofileno.....	87
Figura 21 - Espectro de massas do ciperotundona	87
Figura 22 - Espectro de massas da α -ciperona.....	88
Figura 23 - PCA dos diversos ecotipos de <i>C. rotundus</i>	88

Figura 24 - Dendograma obtido por meio do PCA dos diversos ecotipos de <i>C. rotundus</i>	89
Figura 25 - <i>Loading</i> do óleo essencial de <i>C. rotundus</i>	90
Figura 26 - Cromatograma dos Íons Totais da fração HF1.....	92
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H de HF 1.2.2 (CDCl_3 , 400 MHz).....	93
Figura 28 - Espectro de massas da mistura de esteroides	96
Figura 29 - Espectro de RMN de ^1H de HF 3.2.1 (CDCl_3 , 400 MHz).....	96
Figura 30 - Cromatograma dos Íons Totais (CIT) de EAC 1.3.....	97
Figura 31- Cromatograma dos Íons Totais da fração EAC2.....	98
Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C de EAC 2.3.2 (CDCl_3 , 100 MHz).....	99
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H de EAC 2.3.2 (CDCl_3 , 400 MHz).....	101
Figura 34 - Espectro de DEPT 135 da amostra EAC 2.3.2 (CDCl_3 , 100 MHz)	101
Figura 35 - Mapa de contornos gHMBC de EAC 2.3.2.....	102
Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H de EAC 3.4.4 (CDCl_3 , 400 MHz).....	104
Figura 37 - Mapa de contornos gHMBC região aromática ampliada de EAC 3.4.4	104
Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H de EAC 5.1.4 (CDCl_3 , 200 MHz).....	106
Figura 39 - Mapa de contornos gHMBC da região aromática de EAC 5.1.4	107
Figura 40 - Espectro de massas de primeira ordem, em modo full-scan da substância EMP1	108
Figura 41 - Região ampliada do espectro de RMN de ^1H de EMP1 (CDCl_3 , 400 MHz)	109
Figura 42 - DEPT 135 de EMP1 (CDCl_3 , 400 MHz)	109
Figura 43 - Mapa de contornos gHSQC região ampliada de EMP1	110
Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H de EHP23 (CDCl_3 , 400 MHz)	113
Figura 45 - Mapa de contornos gHMBC de EHP23	113
Figura 46 - Mapa de contornos gHSQC de EHP23	114
Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H de EMI 8-9 (MeOH, 400 MHz).....	116
Figura 48 - Mapa de contornos gHMBC região ampliada de EMI 8-9	117
Figura 49 - Atividade antioxidante qualitativa dos extratos obtidos dos tubérculos de <i>C. rotundus</i>	119
Figura 50 - Formação de halos de inibição no teste antimicrobiano. A – óleo essencial; B – extratos	130
Figura 51 - Avaliação da atividade dos extratos e óleos essenciais de <i>C. rotundus</i> frente a formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	134

Figura 52 - Isolados fúngicos dos tubérculos de <i>C. rotundus</i>	137
--	-----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações de coleta do material botânico de <i>C. rotundus</i>	51
Tabela 2 - Dados climatológicos referentes ao período de janeiro a outubro de 2012. ..	52
Tabela 3 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>C. rotundus</i>	82
Tabela 4 - Rendimento dos extratos de <i>C. rotundus</i>	91
Tabela 5 - Principais constituintes identificados em HF 1.2.2.....	92
Tabela 6 - Dados de RMN de ^{13}C de HF 3.2.1 A e HF 3.2.1 B.....	95
Tabela 7 - Principais constituintes identificados em EAC 1.3.....	97
Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C de EAC 2.3.2a e EAC 2.3.2b.....	99
Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EAC 3.4.4.....	103
Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EAC 5.1.4.....	106
Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EMP1	110
Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EHP 23.....	112
Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EHI 8-9.....	116
Tabela 14 - Concentração (%) de fenóis e flavonoides totais.....	118
Tabela 15 - Avaliação da atividade sequestrante de radical DPPH	120
Tabela 16 - Porcentagem de inibição de extratos e substâncias isoladas <i>C. rotundus</i> frente a enzima elastase.....	122
Tabela 17 - Porcentagem de inibição de extratos e substâncias isola de <i>C. rotundus</i> das frente a enzima tirosinase.....	123
Tabela 18 - Porcentagem de inibição da α -glucosidase dos extratos brutos e substâncias isoladas de <i>C. rotundus</i>	124
Tabela 19 - Número de óbitos de <i>A.salina</i> frente aos extratos brutos e óleo essencial testado e suas respectivas concentrações.	126
Tabela 20 - Avaliação da toxicidade dos extratos brutos e óleos essenciais testados (DL50).....	127
Tabela 21 - Médias dos diâmetros dos halos inibitórios (mm) dos extratos dos tubérculos e óleo essencial de <i>C. rotundus</i>	129

Tabela 22 - CIM* das frações do extrato em hexano contra <i>E. faecalis</i> e <i>S. sanguinis</i>	130
Tabela 23 - CIM dos extratos obtidos da inflorescência e de substâncias puras	131
Tabela 24 - Concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) e percentual de biofilme formado por <i>E. faecalis</i> e <i>C. albicans</i>	132
Tabela 25 - Concentração inibitória (IC ₅₀) da atividade leishmanicida dos extratos de <i>Cyperus rotundus</i> contra <i>L. amazonensis</i>	134
Tabela 26 - Isolados fúngicos de dos tubérculos de <i>C. rotundus</i>	135

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Matriz para obtenção de dados do PCA e HCA	54
---	----

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Rendimento do óleo essencial dos tubérculos de <i>C. rotundus</i> coletados em diferentes épocas do ano	77
Gráfico 2 - Temperatura média (A) e Precipitação (B).....	78
Gráfico 3 - Variação da proporção relativa das diferentes classes de compostos do óleo essencial de <i>C. rotundus</i>	83
Gráfico 4 – Concentração de fenois e flavonoides totais dos extratos de <i>C. rotundus</i> .	118
Gráfico 5 – Porcentagem de inibição (%) dos extratos e substâncias isoladas de <i>C. rotundus</i> frente ao radical DPPH	121
Gráfico 6 - Porcentagem de inibição dos extratos e substâncias isoladas frente a enzima α -glucosidase.....	126

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Esquema para obtenção dos extratos de <i>C. rotundus</i>	55
Fluxograma 2 - Esquema do fracionamento do extrato em hexano dos tubérculos de <i>C. rotundus</i>	57
Fluxograma 3 - Fracionamento do extrato em hexano da inflorescência de <i>C. rotundus</i>	57
Fluxograma 4 - Esquema do fracionamento do extrato em acetato de etila dos tubérculos de <i>C. rotundus</i>	59
Fluxograma 5 – Fracionamento de EHP	60
Fluxograma 6 - Fracionamento do extrato em metanol da inflorescência	61

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
CE	Concentração Efetiva
CI	Concentração Inibitória
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIMB	Concentração Inibitória Mínima de Biofilme
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia Gasosa
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
CG-DIC	Cromatografia Gasosa acoplada a detector de Ionização de Chama
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
ddd	Duplo duplo dubleto
dddd	Duplo duplo duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2'-difenil-1-picrilhidrazila
EM	Espectrometria de Massas
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
J	Constante de acoplamento
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
m	Multiplete
PCA	Principais Componentes de Análise
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Singlete
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	5
ABSTRACT	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE QUADROS.....	11
LISTA DE GRÁFICOS	11
LISTA DE FLUXOGRAMAS	12
LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS	13
SUMÁRIO	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 CYPERACEAE JUSS (1789).....	18
2.1.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	18
2.1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	19
2.1.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E USOS POPULARES DA FAMÍLIA CYPERACEAE	20
2.2 QUÍMICA DO GÊNERO <i>Cyperus</i> L	21
2.2.1 ESTUDOS BIOLÓGICOS DO GÊNERO <i>Cyperus</i>	25
2.2.2 <i>Cyperus rotundus</i> L.....	26
2.2.2.1 NOMES E SINONÍMIAS DE <i>Cyperus rotundus</i>	28
2.2.2.2 QUÍMICA DE <i>Cyperus rotundus</i>	29
2.2.2.3 ESTUDOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DE <i>C. rotundus</i>	33
2.3 A BUSCA DE COMPOSTOS ATIVOS FRENTE ÀS DOENÇAS TROPICAIS	37
2.3.1 LEISHMANIOSES	38
2.3.1.1 <i>Leishmania amazonensis</i>	39
2.3.2 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE.....	41
2.3.3 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA <i>IN VITRO</i> COM PRODUTOS NATURAIS	42
2.4 A BUSCA DE COMPOSTOS ATIVOS FRENTE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS	44
3.1 OBJETIVO GERAL.....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	47
4 METODOLOGIA.....	48
4.1 SUPORTES PARA CROMATOGRAFIA	48
4.2 EQUIPAMENTOS.....	49
4.3 COLETA, SELEÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA.....	50
4.4 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>C. rotundus</i>	52
4.4.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE <i>C. rotundus</i>	52
4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	54
4.6 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM HEXANO DOS TUBÉRCULOS	56
4.7 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM HEXANO DA INFLORESCÊNCIA	57
4.8 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DOS TUBÉRCULOS.....	58

4.10 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM METANOL DA INFLORESCÊNCIA	61
4.11 DETERMINAÇÃO DE FENOIS E FLAVONOIDES TOTAIS	62
4.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL DDPH	63
4.13 ENSAIOS BIOLÓGICOS	65
4.13.1 ENSAIOS ENZIMÁTICOS <i>in vitro</i>	65
4.13.1.1 TESTE DE INIBIÇÃO SOBRE A ELASTASE	66
4.13.1.2 TESTE DE INIBIÇÃO SOBRE A TIROSINASE	67
4.13.1.3 TESTE DE INIBIÇÃO SOBRE α -GLUCOSIDASE	68
4.13.2 TOXICIDADE FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i> (TAS)	69
4.13.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME	70
4.13.3.1 DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO BASEADO NA TÉCNICA DO POÇO	70
4.13.3.2 DISCO DIFUSÃO E MICRODILUIÇÃO EM CALDO	71
4.13.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA	73
4.13.4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> DOS EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAS DE <i>C. rotundus</i>	74
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1 RENDIMENTO (%) DO ÓLEO ESSENCIAL	77
5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. rotundus</i>	79
5.2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA	83
5.2.2 PCA DOS DIVERSOS ECOTIPOS DE <i>C. rotundus</i>	88
5.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	91
5.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES DE <i>C. rotundus</i>	92
5.4.1 IDENTIFICAÇÃO DE HF 1.2.2	92
5.4.2. IDENTIFICAÇÃO HF 3.2.1	94
5.4.3 IDENTIFICAÇÃO DE EAC 1.3	97
5.4.4 IDENTIFICAÇÃO DE EAC 2.3.2	98
5.4.5 IDENTIFICAÇÃO DE EAC 3.4.4	103
5.4.6 IDENTIFICAÇÃO DE EAC 5.1.4	105
5.4.7 IDENTIFICAÇÃO DE EMP1	108
5.4.8 IDENTIFICAÇÃO DE EHP 23	111
5.4.9 IDENTIFICAÇÃO DE EMI 8-9	115
5.5 DETERMINAÇÃO DE FENOIS E FLAVONOIDES TOTAIS	118
5.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL DPPH	119
5.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS	121
5.7.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-ELASTASE	121
5.7.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-TIROSINASE	123
5.7.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI- α -GLUCOSIDASE	124
5.7.4 TOXICIDADE FRENTE À <i>ARTEMIA SALINA</i> (TAS)	126
5.7.5 AVALIAÇÃO ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME	128
5.7.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA	133
5.8 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA de <i>C. rotundus</i>	135
6. CONCLUSÃO	138
7. REFERÊNCIAS	140

1 INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, as plantas têm sido utilizadas por populações de todos os continentes com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, bem como, no controle de pragas. Segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS, devido a pobreza e a falta de acesso aos medicamentos modernos, cerca de 80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento dependem essencialmente das plantas medicinais como um primeiro tratamento de saúde. Dessa forma, é reconhecida a importância dos produtos naturais, incluindo aqueles derivados de plantas, no desenvolvimento de drogas terapêuticas modernas (CALIXTO, 2000).

No Brasil, aproximadamente 84% dos medicamentos disponíveis no mercado são importados e 60% de todas as drogas processadas são consumidas por 23% da população, o que faz com que os remédios caseiros à base de plantas medicinais sejam ainda a principal fonte de medicamentos para a maioria do povo brasileiro (ELISABETSKY, 2002).

Nessa vertente, o Ministério da Saúde por meio de diretrizes determinou prioridades na investigação das plantas medicinais. O Plano Nacional propõe a implantação da fitoterapia como prática oficial da medicina, orientando as Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS) a buscarem a inserção de plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à Fitoterapia no SUS, com segurança, eficácia e qualidade (Brasil, 2009). No entanto, para que essa inclusão ocorra é essencial que os profissionais da área de saúde conheçam as atividades farmacológicas e a toxicidade das plantas medicinais de cada bioma brasileiro, de acordo com os costumes, tradições e condições sócio-econômicas da população.

Na literatura científica, diversas plantas são descritas quanto à sua composição química e atividade biológica, sendo que algumas têm proporcionado o desenvolvimento de novos fármacos, fitoterápicos, biocosméticos e produtos de ação inseticida.

Dentre essas espécies destaca-se *Cyperus rotundus* L., que tem sido reconhecida, em diversos países, como potente erva medicinal em decorrência do resultado de um grande número de estudos farmacológicos e biológicos incluindo atividade antifúngica, anti-inflamatória, antidiabética, antidiarréica, citoprotetora, antimutagênica, antimicrobiana, citotóxica, antipirética e analgésica (MEENA et al., 2010). No entanto, há também, muitos registros de infestação da espécie em culturas de guaraná, feijão, algodão, cana-de-açúcar, dentre outras. Estima-se que no Brasil, cerca de 1 bilhão de hectares de cana-de-açúcar apresentam infestação por *C. rotundus*, o que vêm despertando o interesse da comunidade agrônoma na descoberta de insumos agrícolas que possam controlar ou erradicar a espécie (MILÉO, 2007).

No Brasil, há registro do uso de *C. rotundus* como fitoterápico no Hospital de Medicina Alternativa em Goiânia, onde é usado como remineralizante e no tratamento de úlcera gástrica (ARANTES et al., 2005). Nosso grupo de pesquisa, em testes realizados *in vitro* dirigidos à ação antileishmania, usando formas promastigotas de *Leishmania guyanensis*, verificou que o extrato em hexano da espécie apresentava significativa atividade com $CI_{50/24h}$ $16,1 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$ (SANTOS, 2003).

Dessa forma, o presente estudo tem como finalidade realizar estudo químico do óleo essencial e dos extratos de *Cyperus rotundus*, bem como, como investigar por intermédio de ensaios químicos e biológicos específicos sua potencialidade em substâncias bioativas, visando gerar subsídios para o desenvolvimento de futuros fitoterápicos ou fitocosméticos a partir desta espécie.

Os fatores de relevância para a escolha da espécie foram: facilidade de acesso adaptabilidade e cultivo e por ser uma espécie comumente encontrada na Região Amazônica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CYPERACEAE JUSS (1789)

2.1.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

Cyperaceae Juss. é a terceira família mais representativa entre as monocotiledôneas e a sétima entre as angiospermas. A família é cosmopolita e ocupa, preferencialmente, ambiente aberto e úmido ou alagado, sazonal ou permanentemente, bem como, ambientes florestais ou de transição campo-mata. O maior gênero é o *Carex* com 2000 espécies, seguido por *Cyperus* com cerca de 600 espécies (GOETGHEBEUR, 1998).

Segundo o sistema taxonômico de Cronquist (1998) a família foi incluída na classe Liliopsida, ordem Cyperales, juntamente com a família Poaceae. Entretanto, estudos filogenéticos, incluindo dados moleculares, mostram a sua maior afinidade com Juncaceae, sendo incluída na classe Commelinidae, ordem Poales juntamente com o clado que agrupa as famílias Bromeliaceae, Eriocaulaceae, Juncaceae e Poaceae, entre outras (CHASE, 2003; APG III, 2009).

Diversas propostas de classificações quanto ao número de subfamílias, tribos, subtribos e gêneros vêm sendo propostas para Cyperaceae (BRUHL, 1995; GOETGHEBEUR, 1998; CHASE, 2003, APG III, 2009). Segundo Bruhl (1995), Cyperaceae é constituída por cerca de 5000 espécies distribuídas em duas subfamílias, 12 tribos e 112 gêneros. Para Goetghebeur (1998) a família é composta também por cerca de 5000 espécies, porém distribuídas em quatro subfamílias, 14 tribos e 104 gêneros. De acordo com Govaerts et al., (2007), a família possui cerca de 100 a 109 gêneros e entre 4500 e 5500 espécies.

Para o Brasil, Luceno et al. (1998) citaram a ocorrência de 500 a 600 espécies reunidas em 45 gêneros. Porém, estudos mais recentes de Alves et al., (2012) referiram 621 espécies distribuídas em 40 gêneros, correspondendo a 11% das espécies e 40% dos gêneros da família

ocorrentes no mundo, sendo que os gêneros com maior diversidade são: *Rhynchospora* Vahl (136 spp.), *Cyperus* L. (86 spp.), *Scleria* P. J. Berg. (71 spp.) e *Eleocharis* R. Br. (65 spp.).

2.1.2 CARACTERÍSTICAS GERAIS

As espécies de Cyperaceae são, em sua maioria, herbáceas e perenes, apresentando flores agrupadas em espiguetas e o fruto do tipo aquênio. O tipo de caule mais freqüente é o rizoma, sendo consideradas ervas rizomatosas, com folhas laminares e lineares, concentradas na base de ramos aéreos bastante rígidos (BACCHI, 1989). As inflorescências são do tipo espiguetas, sustentando uma ou mais flores reduzidas como sua unidade de reprodutiva básica, sendo que sua estrutura, arranjo, quantidade de flores masculinas e femininas são importantes para a sistemática do grupo. A polinização pelo vento (anemofilia) é uma estratégia comum da família, sendo rara a polinização por insetos (entomofilia) (DAHLGREN et al., 1985).

A anatomia foliar é a característica anatômica mais utilizada na família, sendo considerada um parâmetro indispensável, para classificação botânica das espécies. Uma das razões para a forte valorização da análise anatômica dos órgãos fotossintéticos está relacionada às variações que estes apresentam quanto à via de assimilação do carbono, C3 ou C4 (METCALFE, 1969; BRUHL, 1995). Segundo Soros & Bruhl (2000) aproximadamente 32% das espécies de Cyperaceae utilizam o mecanismo fotossintético C4.

As plantas com via de assimilação do carbono do tipo C4 tem vantagem sobre as do tipo C3, em condições de estresse hídrico, altas temperaturas e alta intensidade de luz, sendo mais facilmente adaptadas em locais com clima mais quente e seco (BRYSON & CARTER, 2008). O gênero *Cyperus* tem a maior diversidade de espécies no leste e sul da África, onde tais regiões são propensas à secas periódicas e apresentam temperaturas elevadas e alta intensidade de luz (SIMPSON et al., 2001).

2.1.3 IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E USOS POPULARES DA FAMÍLIA CYPERACEAE

Cerca de 500 espécies de Cyperaceae apresentam registros de utilização econômica ou etnobotânica tais como: alimentação animal (tubérculos, rizomas e partes aéreas), confecção de utensílios (fibras), usos sociais (religiosos, ornamentais), ambiental (contenção de erosão, inseticida natural), medicinais, sendo que as referências de espécies infestantes se sobrepõem as de importância econômica. Os gêneros que são mais amplamente citados são o *Cyperus* L. e *Carex* L. (GOETGHEBEUR, 1998; SIMPSON & INGLIS, 2001; KISSMANN, 1991).

Espécies de Cyperaceae tem demonstrado uso proveitoso para a agroquímica, por apresentarem substâncias conhecidas como fagorrepelentes, que interrompem o pastejo apresentando efeito temporário ou permanente, dentre estes podemos citar o remirol, ciperquinona e escabequinona que tem sido reportados como substâncias antialimentares (MORIMOTO et al., 1999).

Em relação à importância econômica do gênero *Cyperus* no Brasil, podemos citar a espécie *Cyperus maritimus* que tem sido considerada de grande importância no ambiente dunal, por atuar na rápida colonização das dunas e na fixação de sedimento, reduzindo assim, os danos causados pela erosão (CORDEIRO, 2005). O óleo essencial de *C. articulatus*, por apresentar aroma agradável vem sendo utilizado pela empresa Natura Cosméticos como ingrediente natural de diversos produtos de higiene e limpeza (CASTELLANI et al., 2011), sendo que a espécie é cultivada por comunidades rurais do Pará em quintais ou em sistemas de consórcio com outras culturas e comercializada como planta aromática (ZOGHBI et al., 2008). No Gabão, os tubérculos da espécie são utilizados para o tratamento da enxaqueca (INGLIS, 1994).

Os tubérculos de *C. esculentus* L., conhecidos como chufa ou nozes de tigre, são comestíveis e utilizados na África Ocidental, como sedativo, tônico e adoçante alimentar. O

óleo extraído dos tubérculos foi muito utilizado na Itália e no Egito para a fabricação de sabão (KISSMANN, 1991). No Brasil, a espécie é produzida anualmente por agricultores do Nordeste e comercializada em feiras, devido apresentar sabor levemente adocicado, ou ainda, como remédio popular supostamente afrodisíaco e antiofídico (LORENZI & MATOS, 2002). A espécie foi recentemente sugerida como matéria-prima para a produção de biodiesel, pois seus tubérculos possuem cerca de 26-36% de ácido graxo (OFOEFULE et al., 2013).

Em Portugal, os tubérculos de *C. rotundus*, conhecido pelos nomes vernáculos de juncinha, junça-brava, junça-de-conta, são utilizados na alimentação de suínos. Na Índia o tubérculo fresco é usado para o tratamento de úlceras da pele. No Vietnã a espécie é usada como diurético e contra a cefaleia. Na África o tubérculo é usado na forma de pasta para tratamento de doenças cardíacas (MOREIRA, 1990).

No Quênia, a espécie *Cyperus involucratus* é usado como forragem que serve de pastagem para ações domésticas. Na Tailândia, *Cyperus corymbosus* é usado na produção de tapetes (INGLIS, 1994).

2.2 QUÍMICA DO GÊNERO *Cyperus* L

Espécies do gênero *Cyperus* têm sido extensivamente estudadas e as principais classes de metabólitos secundários citados na literatura são quinonas (ALLAN et al., 1978; MORIMOTO et al., 1999; NASSAR et al., 2002), flavonoides (NASSAR et al., 2002; HARBONE et al., 1982), e sesquiterpenos (SONWA & KONIG, 2001; NYASSE et al., 1988).

Nassar et al., (2002) ao investigarem o extrato etanólico da inflorescência de *Cyperus alopecuroides* isolaram a quinona alopequinona [1] e os flavonoides 3,3'-dimetil-éter-quercetina [2] e o vicianin [3]. No extrato hexânico do caule de *Cyperus nipponicus* foram identificadas as quinonas ciperaquinona [4] e do seu precursor remirol [5], enquanto que no

extrato hexânico dos tubérculos de *Cyperus distans*, foi isolada a escabequinona [6]. Tais substâncias foram reportadas como antialimentares e tem sido utilizadas na agroquímica, uma vez que apresentam persistência ambiental mínima e reduzida toxicidade para os mamíferos (MORIMOTO et al., 1999).

A análise fitoquímica qualitativa dos extratos obtidos dos tubérculos de *Cyperus esculentus* L. revelou a presença de alcaloides, flavonoides, taninos, esteroides e terpenoides (PRAKASH & RAGAVAN, 2009).

Harborne et al. (1982) a partir da investigação de 92 espécies de Cyperaceae sugere a existência de um distintivo padrão de flavonoides presentes nos frutos, folhas e inflorescências. Nas folhas geralmente estão presentes as flavonas rutina [7], luteolina [8] e quercetina [9]. Os frutos e inflorescências, que normalmente são coloridos, apresentam a aureusidina [10] em sua composição química.

O extrato metanólico da inflorescência de *Cyperus capitatus* possibilitou o isolamento das metil-auronas, 4,6,3',4'-tetrahidroxi-5-metilaurona [11] e 4,6,3',4'-tetrahidroxi-7-metilaurona [12] (SEABRA et al., 1998) (Figura 1).

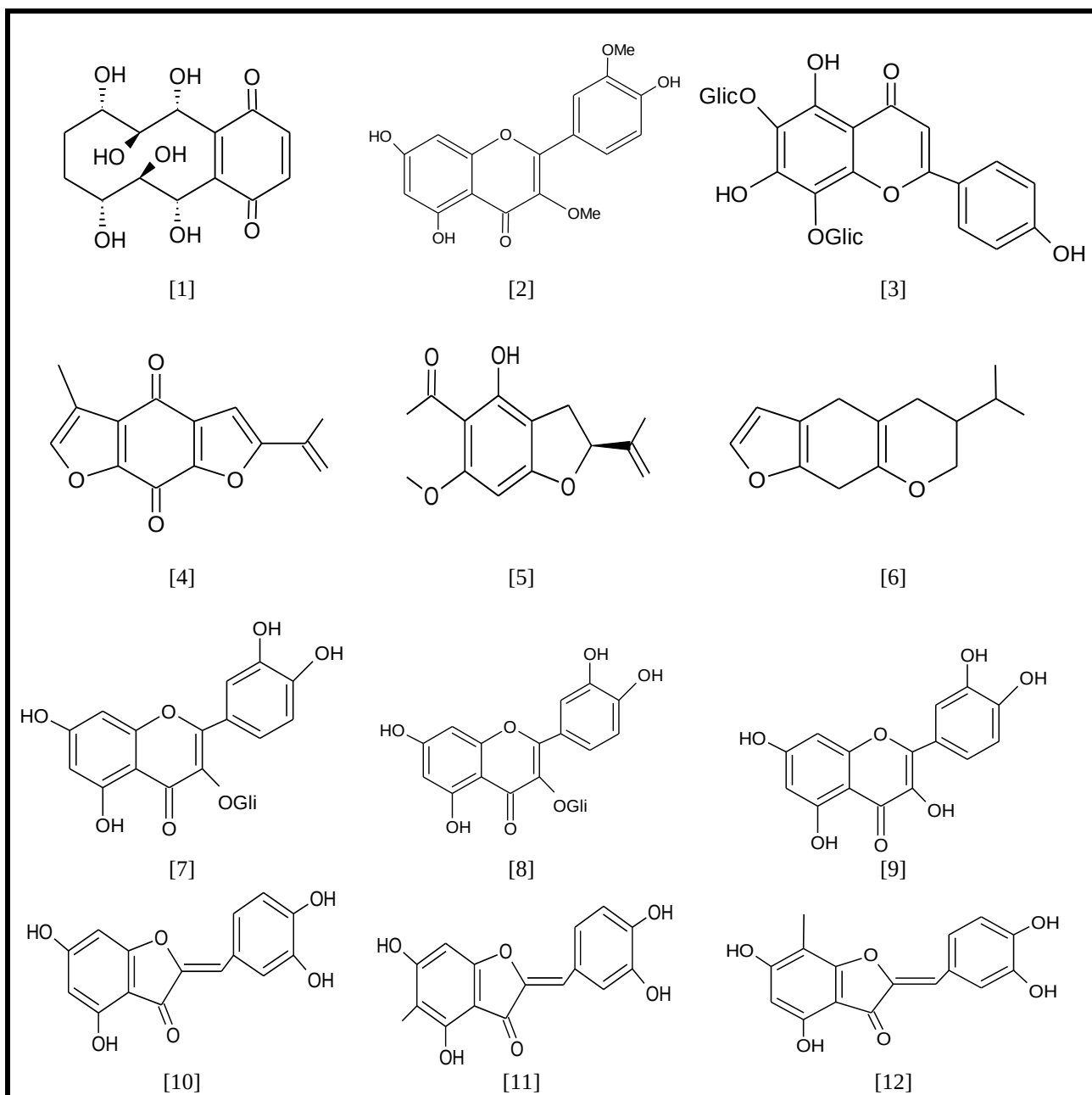


Figura 1 - Principais constituintes isolados em espécies de *Cyperus*

Os óleos essenciais de espécies de *Cyperus* são geralmente constituídos de traços de monoterpenos com predominância de sesquiterpenos do tipo cariofilano, eudesmano, rotundano e patchoulano, sendo o cipereno, α -ciperona e ciperotundona os principais hidrocarbonetos identificados.

A investigação do óleo essencial obtido dos tubérculos de *Cyperus alopecuroides* R. possibilitou a identificação de (-)-eudesma-2,4(15)-11-triene [13], (-)-eudesma-3,11-dien-5-

ol [14] e do diterpeno (-)-dolabella-3,7,18-triene, além de ciproteno [15], cipera-2,4-dieno [16], cipereno-epóxi [17] e do α -copaeno [18] (Figura 2) (SONWA & KONIG, 2001).

A partir dos tubérculos de *Cyperus articulatus* foram isolados os sequeiterpenos α -corimbolol [19] e β -corimbolol [20] e o mandassidiona [21] (NYASSE et al., 1988).

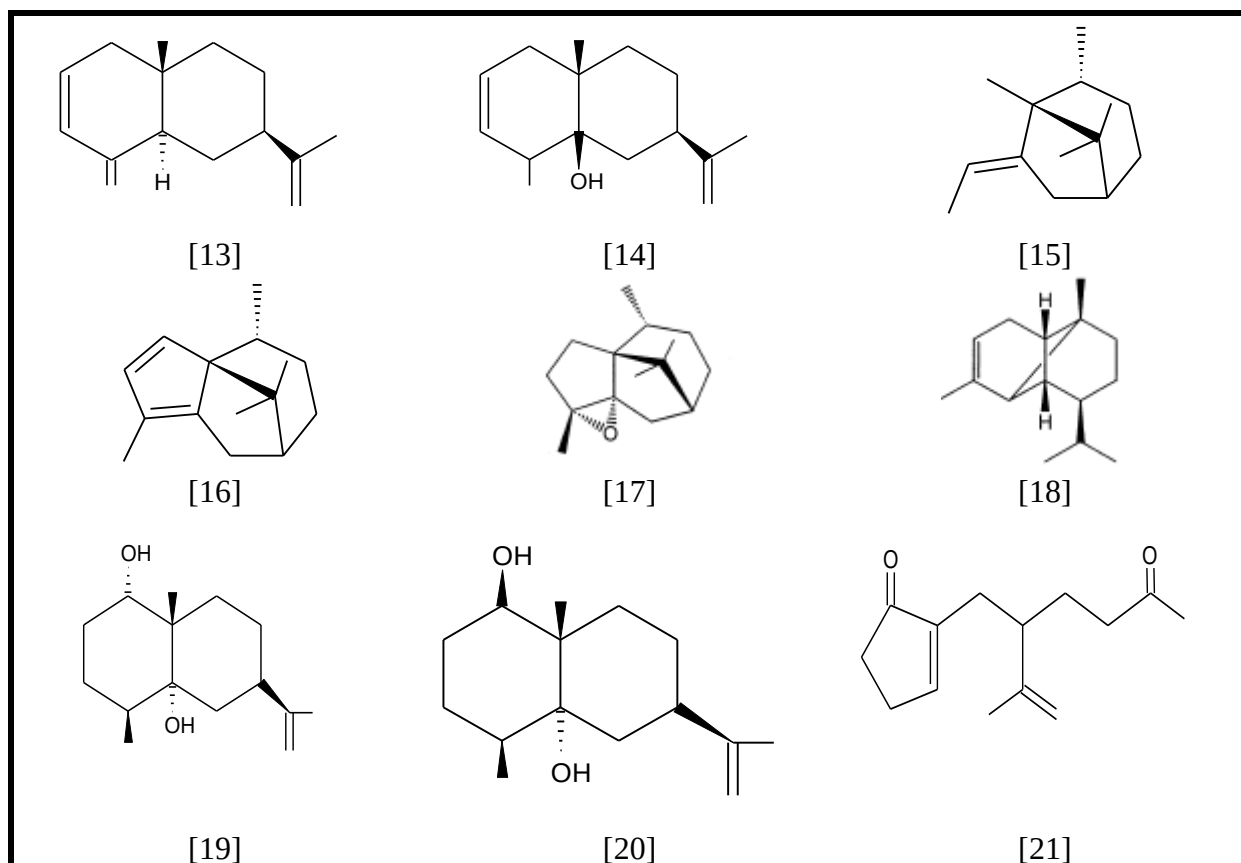


Figura 2 - Constituintes predominantes e identificados no óleo essencial de espécies de *Cyperus*

2.2.1 ESTUDOS BIOLÓGICOS DO GÊNERO *Cyperus*

No gênero *Cyperus* os estudos químicos e biológicos se concentram nas espécies *Cyperus rotundus*, com amplo espectro de ação biológica, além de *C. esculentus* e *C. articulatus*.

Os extratos obtidos dos tubérculos de *C. esculentus* L. foram avaliados pelo método de disco difusão. O extrato etanólico apresentou atividade antimicrobiana para *E. coli*, *S. aureus*, e *Salmonella sp.* O extrato acetônico apresentou moderada atividade antimicrobiana contra *Salmonella sp.* e *Pseudomonas auruginosa* (PRAKASH & RAGAVAN, 2009).

No estudo de atividade ovicida e larvicida, o óleo essencial de *Cyperus giganteus* Vahl apresentou atividade contra ovos e larvas do quarto instar de *Aedes albopictus*, indicado por valores de $CE_{50} < 5$ ppm e CL_{50} e $CL_{90} < 20$ ppm, revelando o potencial da espécie para uso como inseticida natural (KEMPRAJ & SUMANGALA, 2008).

Os sesquiterpenos corimbolona e mustakona que foram isolados dos rizomas de *Cyperus articulatus* foram ativos contra cepas de *Plasmodium falciparum* com $CI_{50} = 2$ mg/mL, sendo que o mustakona foi dez vezes mais ativo do que a corimbolona (RUKUNGA, et al., 2008). No estudo da atividade sedativa, induzida pela associação do extrato aquoso de *Cyperus articulatus* com diazepam que foi administrado em ratos, o extrato facilitou a indução do sono e aumentou o tempo total do sono, sem qualquer efeito analgésico concomitante, o que justifica o uso do tubérculo na medicina tradicional como sedativo (RAKOTONIRINA et al., 2001).

O extrato etanólico da inflorescência de *Cyperus alopecuroides* apresentou moderada atividade estrogênica contra cepa de *Saccharomyces cerevisiae* (NASSAR et al., 2002).

2.2.2 *Cyperus rotundus* L.

Cyperus rotundus é caracterizada como monocotiledônea perene, de larga amplitude ecológica, sendo favorecida pela alta intensidade luminosa e elevados teores de fósforo no solo. Os tubérculos e os bulbos subterrâneos são os principais órgãos de armazenamento de reservas e de propagação dessa espécie (Figura 3). É uma planta herbácea, ereta, de caule triangulado, com rizomas e tubérculos, de 20-40 cm de altura (KISSMANN, 1991).

A fotossíntese é efetuada pelo ciclo C4, altamente eficiente em regiões quentes, sendo que em condições ambientais favoráveis, onde há temperatura elevada e intensa luminosidade, seu estabelecimento é rápido devido ao intenso crescimento vegetativo e a produção de novos tubérculos, razão primária da sua vantagem competitiva com outras culturas (FISHER et al., 1998; KISSMANN, 1991; JAKELAITIS et al., 2003). Em condições adversas, sua capacidade de sobrevivência é enorme desenvolvendo-se numa grande variedade de ambientes e solos com as mais diferentes texturas, num amplo espectro de pH com variados graus de fertilidade. Em temperatura baixa, o desenvolvimento e a multiplicação dos tubérculos é lenta, pois o congelamento do solo mata os tubérculos, que quando jovens são brancos e suculentos e tornam-se marrons ou pretos e fibrosos quando mais velhos (ERASMO et al., 1994; KISSMANN, 1991).

É considerada uma das espécies vegetais com maior amplitude de distribuição no mundo. Está presente em todos os países de clima tropical e subtropical e em muitos de clima temperado. No Hemisfério Norte ocorre a partir do sul dos Estados Unidos e da Europa, aumentando sua presença em direção ao trópico. No Brasil, ocorre praticamente em toda extensão territorial. Acredita-se que a introdução no Brasil tenha se dado através dos navios mercantes portugueses, em tempos coloniais. O estabelecimento inicial teria sido em zonas portuárias como Salvador, Recife, Rio de Janeiro, Santos e São Vicente, com posterior alastramento para o interior (KISSMANN, 1991).



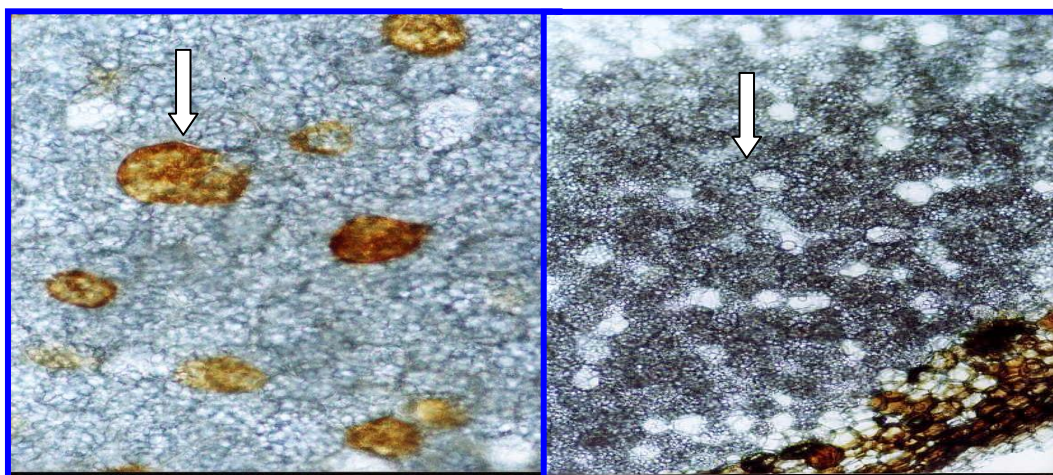
FOTOS: Corrêa, 2010

Figura 3 - *C. rotundus* e suas bases tuberosas

Segundo Soumaya et al. (2005), os tubérculos desta planta são utilizados no tratamento da amenorréia e irregularidades menstruais. Em grande parte do mundo, *C. rotundus* é utilizada na fabricação de papel, na indústria têxtil e na indústria alimentícia. Na China, o seu amido é utilizado comumente na cozinha tradicional (UMERIE & EZEUZO, 2000). No Brasil, não há indicações de uso popular da espécie *C. rotundus*.

Nos testes histológicos realizados por Santos (2003), os cortes transversais da parte cortical dos tubérculos de *C. rotundus*, revelaram um súber desenvolvido (tecido secundário elástico e impermeabilizante) e parênquima cortical com células arredondadas apresentando conteúdo amiláceo e idioblastos de óleo-resinosos (Figura 4).

No Brasil ocorrem diversos ecotipos, que apresentam pequenas diferenças morfológicas e de comportamento. No estado de São Paulo e no sul de Minas Gerais ocorre a subespécie *Cyperus rotundus* L. ssp. *tuberosus* Rottb que apresenta porte mais elevado, geralmente entre 50-100 cm, com espiguetas mais longas que alcançam até 5 m de comprimento e tubérculos menos numerosos e com menor tendência em formar correntes (KISSMANN, 1991).



FOTOS: Santos, 2003

Figura 4 - Fotomicrografias das secções transversais dos tubérculos de *C. rotundus*. A - Região cortical contendo óleo-resinosos; B - Região cortical evidenciando súber desenvolvido de conteúdo amiláceo

2.2.2.1 NOMES E SINONÍMIAS DE *Cyperus rotundus*

A palavra *Cyperus* é derivada de antigo nome dado a uma pessoa e *rotundus* é um adjetivo latino que significa “redondo” que é alusivo aos tubérculos arredondados que a planta forma no solo.

No Brasil, a espécie é conhecida popularmente como “tiririca-vermelha”, “tiririca-roxa”, “tiririca”, “tiririca verdadeira”, “piprioca”, “três-quinas”, “junçá”, “capim-alho”, “alho-bravo”, “capim-dandá”. na Argentina como “cebolita”; na Colômbia como “coquito”; na Itália como “cipero”; no México como “cebollín”; nos Estados Unidos como “nutgrass” e “purple nutsedge” (BLANCO, 2006).

As principais sinonímias de *C. rotundus* são: *Cyperus hexastachyos* Rottb., *Cyperus tetrastachyos* Desf., *Cyperus stoloniferus pallidus* Boeckeler, *Cyperus purpureo – variegatus* Boeckeler (KISMANN, 1991), *Cyperus olivaris* Targ e *Chlorocyperus rotundus* Palla (LORENZI, 2003).

2.2.2.2 QUÍMICA DE *Cyperus rotundus*

Estudos têm mostrado que a constituição química da espécie consiste principalmente de flavonoides, polifenóis, triterpenos, terpenos como mono e sesquiterpenos (OHIRA et al., 1998; KILANI et al., 2005) e alcaloides sesquiterpênicos (JEONG et al., 2000).

O estudo da fração etanólica dos tubérculos de *C. rotundus* forneceu os compostos fenólicos metóxi-ciperotundol [22] e o ciperotundol [23] (ZHOU & YIN, 2012).

A investigação fitoquímica do extrato hexânico obtidos dos tubérculos levou a identificação de três sesquiterpenos do tipo patchoulano {(6S,9S)-6,9-diacetoxi-cipereno}[24], {(6S)-6-acetoxi-cipereno}[25], e {(6S)-cipereno-6-ol}[26], além de dois sesquiterpenos do tipo eudesmano α -ciperona [27] e isociperol [28] (KIM et al., 2012).

Segundo Thebtaranonth et al. (1995), do extrato hexânico foram isolados pathchoulenona [29], óxido de cariofileno [30] e 4,7-dimetil-1-tetralona [31].

O extrato metanólico dos tubérculos forneceu os sesquiterpenóides 4,5-secoeudesmanolide [32], ciperolona [33], acetal tetracíclico com esqueleto da ciperolona [34], mustakone [35] (OHIRA et al., 1998).

A investigação fitoquímica do extrato metanólico dos tubérculos de *C. rotundus* coletado na Ásia, resultou na identificação dos flavonoides quercetina [36], kaemferol [37], miricetina [38] e isoramnetina [39] (AYAD et al., 2010). O extrato metanólico das folhas e da inflorescência da espécie coletada na Austrália resultou na identificação da luteolina e a aureusidina, respectivamente (HARBONE et al., 1982).

A investigação fitoquímica da fração alcaloídica de *C. rotundus* resultou na identificação de três pseudoalcalóides com esqueleto sesquiterpênico rotundina-A [40], rotundina-B [41] e rotundina-C [42] (JEONG et al., 2000). Os principais constituintes isolados de *C. rotundus* estão listados na Figura 5.

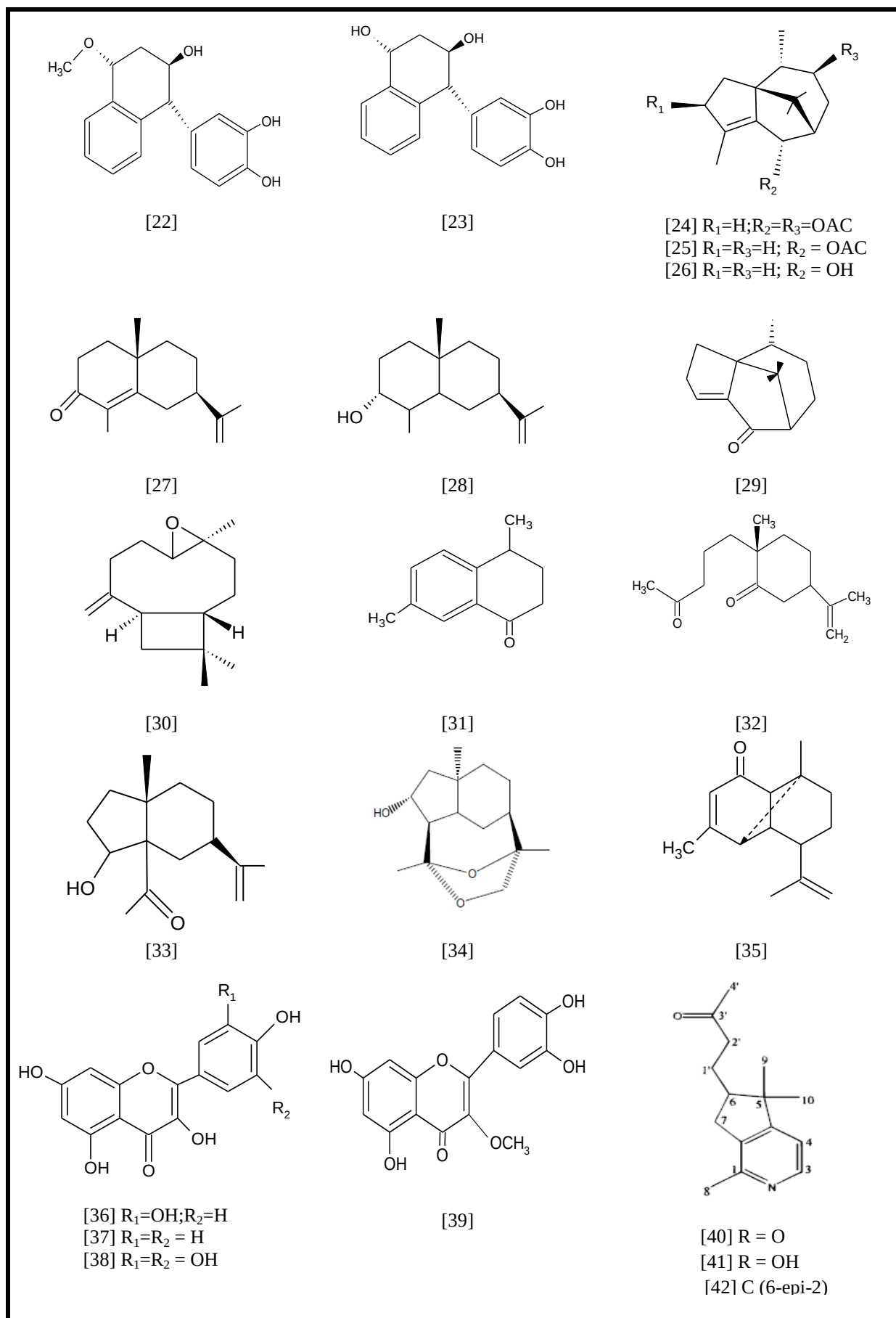


Figura 5 - Principais constituintes isolados da espécie *C. rotundus*

A composição química dos óleos essenciais de *C. rotundus* tem sido extensivamente estudada e quatro quimiotipos (H, K, M, e O) identificados a partir de espécies coletadas de diferentes localidades da Ásia têm sido relatados (KILANI et al., 2005; KOMAI & CHUNG, 1989; JIROVETZ et al., 2004).

O ecotipo-H coletado no Japão contém α -ciperona [43] (36,6%), β -selineno [44] (18,5%), ciperol [45] (7,4%) e óxido de cariofileno [46] (6,2%). O ecotipo-M coletado na China, Hong Kong, Japão, Taiwan e Vietnã apresentam α -ciperona (30,7%), ciperotundona [47] (19,4%), β -selineno (17,8%), cipereno [48] (7,2%) e ciperol (5,6%) (KOMAI & CHUNG, 1989; JIROVETZ et al., 2004).

O ecotipo-O coletado no Japão, Taiwan, Tailândia e Filipinas foi caracterizado por apresentar o cipereno (30,8%) e ciperotundona (13,1%). O ecotipo-O coletado no Hawaii apresentou como constituintes majoritários a ciperotundona (25%) e cipereno (20,7%). O ecotipo-K, também coletado no Hawaii apresentou o cipereno (28,7%), ciperotundona (8,8%), acetato de patcholenil [49] (8,0%) e acetato de sugeonil [50] (6,9%) (KOMAI & CHUNG, 1989; JIROVETZ et al., 2004).

Em espécies coletadas na Nigéria e Tunísia o cipereno (19,2 – 30,9%) e α -ciperona (4,5 – 25,2%) foram os constituintes mais abundantes (KILANI et al., 2005).

A espécie coletada no estado do Pará apresenta α -ciperona (22,8%) e ciperotundona (12,1%) como os principais constituintes, não tendo sido identificado o cipereno (ZOGHBI et al., 2008).

O estudo comparativo dos óleos essenciais dos tubérculos coletados nos meses de junho e outubro na Tunísia demonstrou a semelhança na constituição dos óleos, com variações nos teores dos seus constituintes. A α -ciperona (25,23%) e o cipereno (20,38%) foram os componentes majoritários, sendo que o cipereno apresentou elevado teor em junho, seguido do ciperotundeno e rotundeno, enquanto que a α -ciperona apresentou elevado teor em

outubro (SOUMAYA et al., 2008). Os principais estudos referentes a composição química de ecotipos e espécies de *C. rotundus* em diferentes partes do mundo estão sumarizados no Quadro 1 (pag. 55).

Os diversos ecotipos apresentaram elevada concentração de terpenóides. Essa classe de substância tem sido reportada como inibidora de crescimento de plantas superiores. As plantas possuem suas próprias defesas que as protegem de insetos fitófagos ou de herbívoros predadores. Estas defesas são de natureza química, e normalmente, envolvem substâncias do metabolismo secundário, as quais podem ser chamadas de fitotoxinas ou aleloquímicos (MORIMOTO et al., 1999). Os principais terpenoides identificados nos diversos ecotipos de *C. rotundus* estão listados na Figura 6.

As diferenças na composição química dos óleos essenciais coletados em diversos países sugerem a existência de mais diversidade química da espécie *C. rotundus*. Tais diferenças podem estar associadas a condições climáticas e ambientais, quimiotipos, estado nutricional das plantas, ritmo circadiano, além de outros fatores que podem influenciar a composição química do óleo essencial (KOMAI & CHUNG, 1989). Segundo Gobbo-Neto & Lopes (2007) nos óleos essenciais o teor dos constituintes ativos não é constante durante o ano e, portanto, a época em que uma droga é coletada é um dos fatores de maior importância. Lopes et al., 1997, estudando os efeitos da evolução dos ciclos circadianos e sazonais na composição dos constituintes do óleo essencial de *Virola surinamensis* verificaram variação na composição relativa dos componentes, embora o rendimento do óleo essencial tenha se mantido constante (0,5%) nas diferentes estações do ano.

Outro fator relevante a ser considerado na variação do rendimento de óleos essenciais é a temperatura, visto que a formação de óleos voláteis, em geral, parece aumentar em temperaturas mais elevadas, embora em dias muito quentes ocorram perdas excessivas destes metabólitos (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

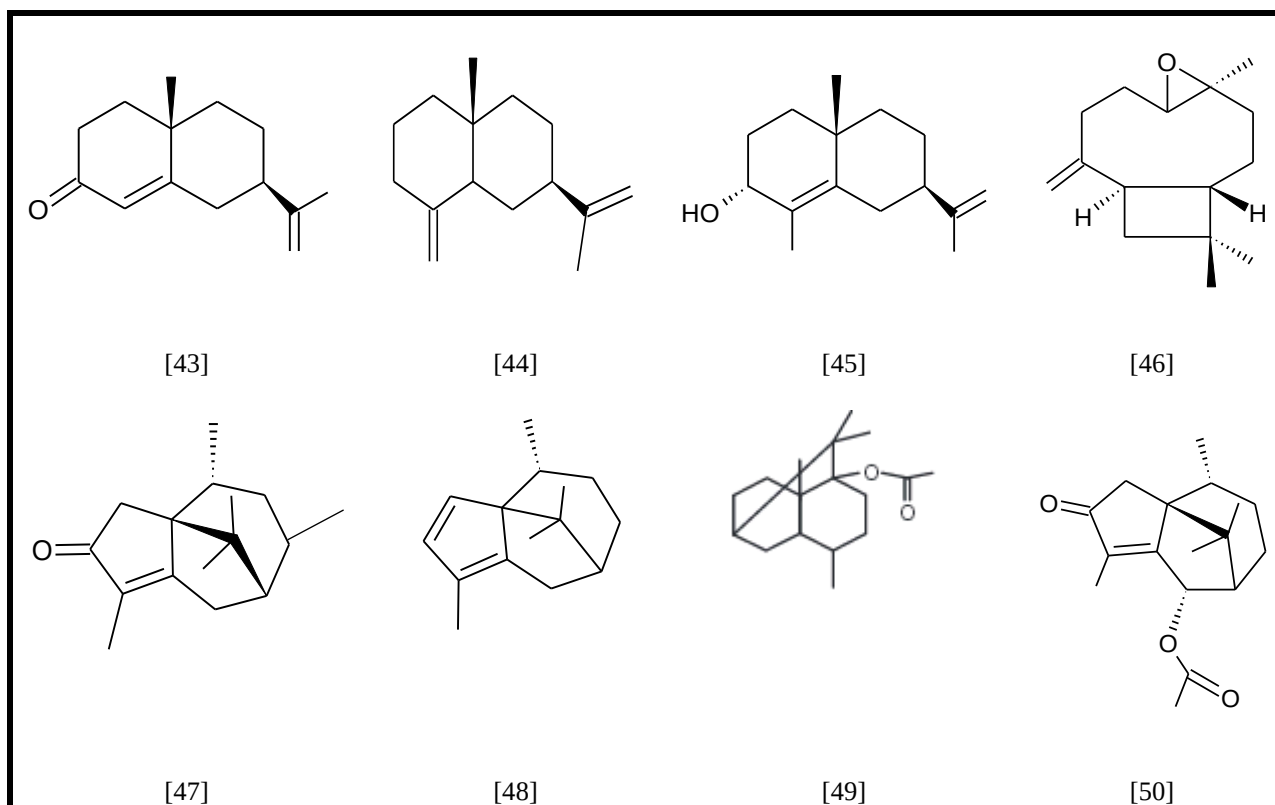


Figura 6 - Principais substâncias identificadas nos diversos ecotipos de *C. rotundus*

2.2.2.3 ESTUDOS BIOLÓGICOS E FARMACOLÓGICOS DE *C. rotundus*

Um grande número de estudos farmacológicos e biológicos incluindo atividade anticandida, anti-inflamatória, antidiabética, antidiarréica, citoprotetora, antimutagênica, antimicrobiana, citotóxica, antipirética e analgésica têm sido relatados para *C. rotundus* (MEENA et al., 2010).

Segundo Jin et al. (2011), os sesquiterpenos valenceno, nootkatono e óxido de cariofileno exerceram atividade antialérgica *in vitro* e *in vivo*. A pesquisa revela que o valenceno (sesquiterpeno mais ativo) inibe a desgranulação da β -hexosaminidase por meio da reação de fosforilação Lyn em células IgE-estimuladas e RBL-2H3. Os sesquiterpenos valenceno e nootkatono, também inibiram a reação de hipersensibilidade do tipo tardio em ratos quando administrado por via oral na faixa de 50-300 mg/Kg.

Nos estudos de Singh et al., (2011), o extrato em acetato de etila da *C. rotundus* inibiu em 100% a germinação de esporos de espécies de fungos do gênero *Colletotrichum* nas concentrações de 2000 µg/mL e 3000 µg/mL, sendo que em concentrações mais baixas a redução foi de 50 a 60%. A alta eficiência anti-fúngica das frações do extrato de acetato de etila contra fungos causadores da doença antracnose, sugere o uso do extrato no controle de alguns patógenos como fonte alternativa de fungicida natural, visto que a matéria-prima (tubérculos de *C. rotundus*) é de produção contínua, o que torna o material disponível para a produção comercial.

Zeid et al. (2008), ao estudarem a atividade antibacteriana do óleo essencial por meio do teste de disco-difusão, utilizando vários microrganismos (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), verificaram que óleo apresentou atividade notável contra bactérias Gram-positivas, menor atividade antibacteriana contra as Gram-negativas, não apresentando nenhuma atividade contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus vulgaris* Novel. No estudo de Bisht et al., (2011) o óleo essencial apresentou atividade contra *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

O óleo essencial apresentou notável atividade ovicida e larvicida contra ovos e larvas do quarto instar *Aedes albopictus*, indicado por valores de $EC_{50} < 5$ ppm e CL_{50} e $CL_{90} < 20$ ppm. Os ovos e larvas foram expostos a uma série de concentrações que variaram de 50-150 ppm. Os resultados obtidos sugerem que o óleo essencial pode servir como inseticida natural (KEMPRAJ & SUMANGALA, 2008).

Investigações realizadas *in vivo* avaliaram o efeito do extrato hidro-alcoólico sobre a hiperglicemia induzida por aloxana em ratos. A administração oral diária de 500 mg/Kg do extrato (uma vez por dia durante sete dias consecutivos) reduziu significativamente os níveis de glicose no sangue. A atividade antihiperglicêmica pode ser atribuída à atividade

antioxidante que se mostrou forte no extrato hidro-alcoólico referente ao sequestro de radicais livres em testes realizados *in vitro* (RAUT & GAIKWAD, 2006).

O extrato em metanol administrado oralmente em doses de 250 e 500 mg/Kg de peso corporal, mostrou atividade antidiarréica significativa em diarreia induzida por óleo rícino em ratos, sendo mais eficiente do que o controle. O extrato em acetato de etila não apresentou qualquer atividade (UDDIN et al., 2006).

Segundo Thebtaranonth et al. (1995) o sesquiterpeno 4,7-dimetil-1-tetralona, do extrato hexânico da espécie apresentou moderada atividade antimalárica (CE_{50} $8,62 \times 10^{-5}$ M).

No ensaio químico de avaliação da atividade antioxidante os extratos obtidos das partes aéreas de *C. rotundus* foram avaliados quanto à capacidade sequestrante do radical livre DPPH e inibição da formação de peróxidos lipídicos. Os extratos em acetato de etila e metanol mostram forte atividade antioxidante com valores de CI_{50} de 14 e 20 μ g/ml, respectivamente. No entanto, o extrato aquoso apresentou fraca atividade antixiodante quando comparado com o α -tocoferol (KILANI et al., 2008).

No Brasil, há registro do uso de *C. rotundus* como fitoterápico no Hospital de Medicina Alternativa em Goiânia, onde é usado como remineralizante e no tratamento de úlcera gástrica (ARANTES et al., 2005).

Puratchikody et al. (2006), avaliaram o extrato hidroalcoólico quanto à atividade de cicatrização de feridas sob a forma de pomada, em três tipos de modelos de feridas realizadas em ratos machos da raça “Wistar”. A pomada do extrato mostrou diferença considerável na resposta em todos os modelos, quando comparada a pomada do fármaco padrão de nitrofurazona (0,2% m/m NFZ), em termos da capacidade de contração de feridas, tempo de fechamento e resistência à tração. Na concentração de 2% m/m do extrato hidroalcoólico apresentou atividade de cura mais eficiente do que o padrão com o fechamento de 100% da

lesão, após uso de 18 dias e o efeito produzido pela aplicação da pomada do padrão foi o mesmo quando aplicada a pomada do extrato.

A atividade fungicida do óleo essencial de *C. rotundus* avaliada por Duarte et al., (2005), contra cepa de *C. albicans*, revelou atividade moderada. A Concentração Inibitória Mínima – CIM do óleo essencial foi de 0,6 mg/mL.

Santos (2003) em testes realizados *in vitro* dirigidos à ação antileishmania, usando formas promastigotas de *Leishmania guyanensis*, verificou moderada atividade para o extrato em hexano ($CI_{50/24h}$ $16,1 \pm 1,0 \mu\text{g/mL}$).

Estudos realizados por Ha et al. (2002), sugeriram que o composto isocurcumenol, extraído dos rizomas do *C. rotundus* pode ser um agonista do receptor benzodiazepínico e modulador alostérico gabaérgico, indicando uma possível ação ansiolítica desta planta.

Nos últimos anos, os usos tradicionais e etnobotânicos de compostos naturais, especialmente de origem vegetal tem recebido muita atenção à medida que são testados quanto à sua eficiência. A espécie *C. rotundus* tem sido reportada como uma potente erva medicinal, sendo muito utilizada como remédio popular para cura de doenças entre vários grupos tradicionais étnicos, praticantes de *Ayurveda*, a ciência da vida, que lida com a visão holística da vida saudável (MEENA et al., 2010).

Dessa forma, justifica-se a investigação química e a realização de ensaios biológicos de *C. rotundus*, aclimatada no Amazonas, tendo em vista que muitas propriedades terapêuticas da espécie ainda não são conhecidas.

2.3 A BUSCA DE COMPOSTOS ATIVOS FRENTE ÀS DOENÇAS TROPICAIS

As doenças causadas por protozoários em hospedeiros humanos representam, atualmente, um dos maiores problemas de saúde pública no mundo, com aproximadamente 1 bilhão de pessoas vivendo em áreas de risco. Destacam-se neste quadro as seguintes patologias: malária, leishmaniose visceral, doença do sono, doença de Chagas e esquistossomose (GUDDAT, 2011).

A alta incidência da leishmaniose, com grande número de indivíduos com lesões incapacitantes, desfigurantes e, algumas vezes, fatais, levaram a Organização Mundial de Saúde - OMS a incluí-la entre as seis mais importantes endemias do mundo, que está diretamente associada à situação de pobreza, as precárias condições de vida e as iniquidades em saúde. Dessa forma, a demanda por novos fármacos tem se intensificado com o aumento da resistência aos antimoniais pentavalentes, bem como, a fármacos de segunda geração. No entanto, o número de quimioterápicos disponíveis, principalmente para tratamento de doenças crônicas, ainda não é satisfatório (NEVES et al., 2001; VOULDOUKIS et al., 2006).

No Brasil, segundo o Ministério da Saúde – MS (2010), o incremento em investimento em pesquisas relacionadas às doenças negligenciadas durante o período de 2003 a 2008 foi na ordem de 39 milhões, com a publicação de editais de fomento específicos e criação de redes de pesquisa voltadas para as doenças negligenciadas. No entanto, o conhecimento produzido não se reverte na descoberta de novos fármacos, métodos diagnósticos e vacinas. Uma das razões para esse quadro é a falta de interesse da indústria farmacêutica, tendo em vista o reduzido potencial de retorno lucrativo para a indústria, uma vez que a população atingida é de baixa renda e presente, em sua maioria, nos países sub-desenvolvidos ou em desenvolvimento.

Nessa perspectiva, a quimioterapia para leishmaniose tem sido objeto de estudo de muitos laboratórios de pesquisa, os quais têm testado outras substâncias químicas e extratos

de plantas com a finalidade de se encontrar novos agentes leishmanicidas com menores efeitos colaterais e ótima biodisponibilidade. Dessa forma, a pesquisa com produtos naturais podem servir como subsídios para a síntese total de novos compostos bioativos, ou serem utilizados como substratos para a obtenção de derivados com as características químicas desejadas (MICHELETTI & BEATRIZ, 2012).

2.3.1 LEISHMANIOSES

O gênero *Leishmania*, definido por Ross em 1903 (Filo: Protozoa; Ordem: Kinetoplastida; Família: Tripanosomatidae), compreende espécies de protozoários parasitas unicelulares que apresentam entre si heterogeneidades bioquímicas, imunológicas e genéticas (ASHFORD, 2000).

De acordo com as manifestações clínicas a leishmaniose pode ser classificada em três grupos: leishmaniose cutânea, mucocutânea e visceral. A leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões crônicas na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor. A leishmaniose mucocutânea produz ulcerações destrutivas e desfigurantes que destroem o tecido e geralmente, são acompanhadas por infecções secundárias. A leishmaniose visceral, também conhecida por calazar, é a forma mais severa da doença, tendo em vista que os parasitas migram pela corrente sanguínea, afetando principalmente os órgãos com considerável concentração de leucócitos, tais como fígado, baço e medula óssea (ASHFORD, 2000).

As leishmanioses constituem um sério problema de saúde pública no Brasil, sendo consideradas doenças emergentes e sem controle, uma vez que a prevenção desta doença depende de medidas ecológicas, sanitárias, assim como emprego de fármacos antiparasitários eficazes e seguros (DESJEUX, 1996; ASHFORD, 2000).

O Brasil é um dos países mais endêmicos, dividindo com a Índia, Sudão, Nepal e Bangladesh cerca de 90% dos casos de leishmaniose visceral, e com Afeganistão, Irã, Peru, Arábia Saudita, Síria e Argélia 90% dos casos da forma cutânea. No ano de 2010 foram confirmados 21.981 casos de leishmaniose tegumentar e 3.536 de leishmaniose visceral, com registro de 219 mortes (MICHELETTI & BEATRIZ, 2012).

A população do Amazonas destaca-se como uma das mais acometidas por Leishmaniose Tegumentar Americana - LTA. Na Amazônia, a LTA ocorre habitualmente, na forma de surtos epidêmicos em locais de caça, em áreas de assentamentos e de construção de estradas, nos processos desordenados de ocupação nas periferias da cidade, bem como, nos treinamentos militares na selva e no período das chuvas (outubro a maio) quando há aumento da densidade de vetores (GUERRA, 2007).

2.3.1.1 *Leishmania amazonensis*

A *Leishmania amazonensis*, em particular, produz um amplo espectro de doenças clínicas e a gravidade da doença varia de leishmaniose cutânea localizada (LCL), caracterizada por lesões únicas e normalmente benignas e leishmaniose cutânea difusa (LCD), que representa uma das formas mais grave da leishmaniose tegumentar, devido a imunossupressão celular específica induzida pelo parasito que gera forte inibição da resposta de hipersensibilidade celular, pobre proliferação de linfócitos, além de fraca ativação dos macrófagos parasitados, o que dificulta o controle da infecção, resultando no caráter evolutivo crônico da doença. O quadro clínico da doença é caracterizado pela infiltração difusa da pele, lesões cutâneas fechadas que ocupam quase todo o corpo, em casos mais graves pode ocorrer ulceração, traumatismo e perda de substância óssea (SILVEIRA, 2009; COSTA et al., 2006).

A *L. amazonensis*, tem como hospedeiros naturais vários marsupiais, principalmente, o roedor “rato-soiá” (*Proechymis*), além do *Oryzomys*, seus principais vetores os *Lutzomyia*

flaviscutellata, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* têm hábitos noturnos, voo baixo e são pouco antropofílicos (LAINSON & SHAW, 1974), sendo que no Brasil, a incidência de LCD está concentrada nas regiões Norte e Nordeste, com maior número de casos relatados no Pará e Maranhão (SILVEIRA, 2009).

A multiplicação das leishmanias nos seus hospedeiros ocorre por fissão celular, não tendo sido descrito nenhum ciclo sexual. A transmissão da doença para o homem ocorre quando o flebotomíneo - fêmea promove seu repasto sanguíneo, enquanto o inseto vetor suga o sangue do hospedeiro vertebrado, ele transfere promastigotas metacíclicos (1); estas formas tendem a infectar células do sistema fagocítico mononuclear do homem, principalmente macrófagos e quando se encontram no interior do macrófago, os promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam, levando ao rompimento desta célula hospedeira (2, 3, 4, 5). A lise leva à liberação de grande quantidade de parasitas, que infectam outros macrófagos (6). A infecção gera lesões, sendo a forma visceral a mais grave e fatal desta protozoose (MAGILL, 1995).

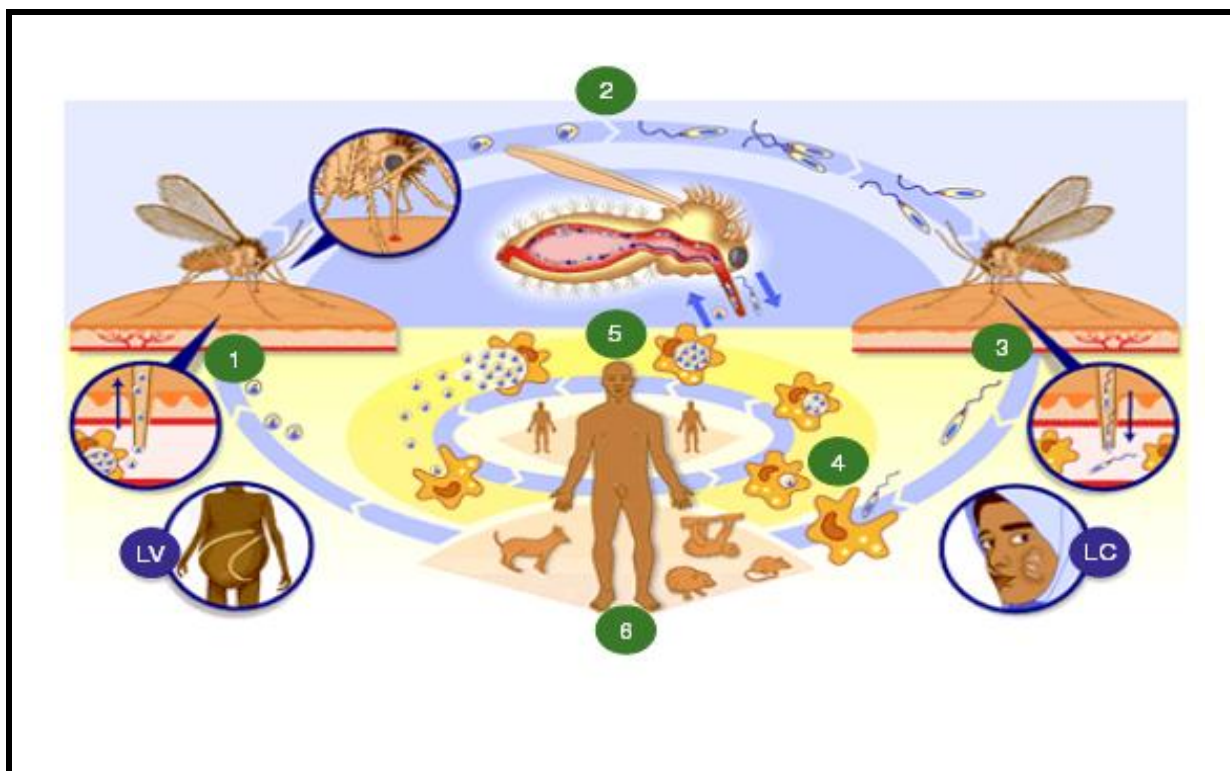


Figura 7 - Ciclo de transmissão da *Leishmania* sp

2.3.2 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Nos últimos 60 anos, o tratamento das leishmanioses está limitado à administração de agentes da família dos antimoniais pentavalentes, representados por estibogluconato de sódio [51] (Pentostan®) e antimoniato de meglumina [52] (Glucantime®) (BARBOSA et al., 2011).

Os medicamentos de segunda escolha incluem pentamidina [53] e anfotericina B [54] (AnfB), menos utilizados devido à alta toxicidade e alto custo. A pentamidina apresenta efeitos colaterais graves, como toxicidade renal e hepática, pancreatite, hipotensão, disglícemia e problemas cardíacos. A anfotericina B é efetiva no tratamento de leishmaniose visceral, com toxicidade mais baixa quando encapsulada em lipossomas, porém é um medicamento muito caro e, além disso, não é apropriada para o tratamento de outras formas da doença (JORDA et al., 2011).

No início deste século, o alquilfosfolipídeo miltefosina [55], único medicamento oral disponível para o tratamento da leishmaniose visceral, foi registrado na Índia, Europa e América do Sul. A droga é altamente efetiva em crianças, mas pode apresentar complicações gastrointestinais e seu uso em mulheres grávidas é limitado devido à sua teratogenicidade. Outro medicamento que se tem mostrado efetivo contra a leishmaniose visceral é a paromomicina [56] (também chamada aminosidine), antibiótico aminoglicosídeo que é ativo contra espécies de *Leishmania in vitro* e *in vivo* (BARBOSA et al., 2011).

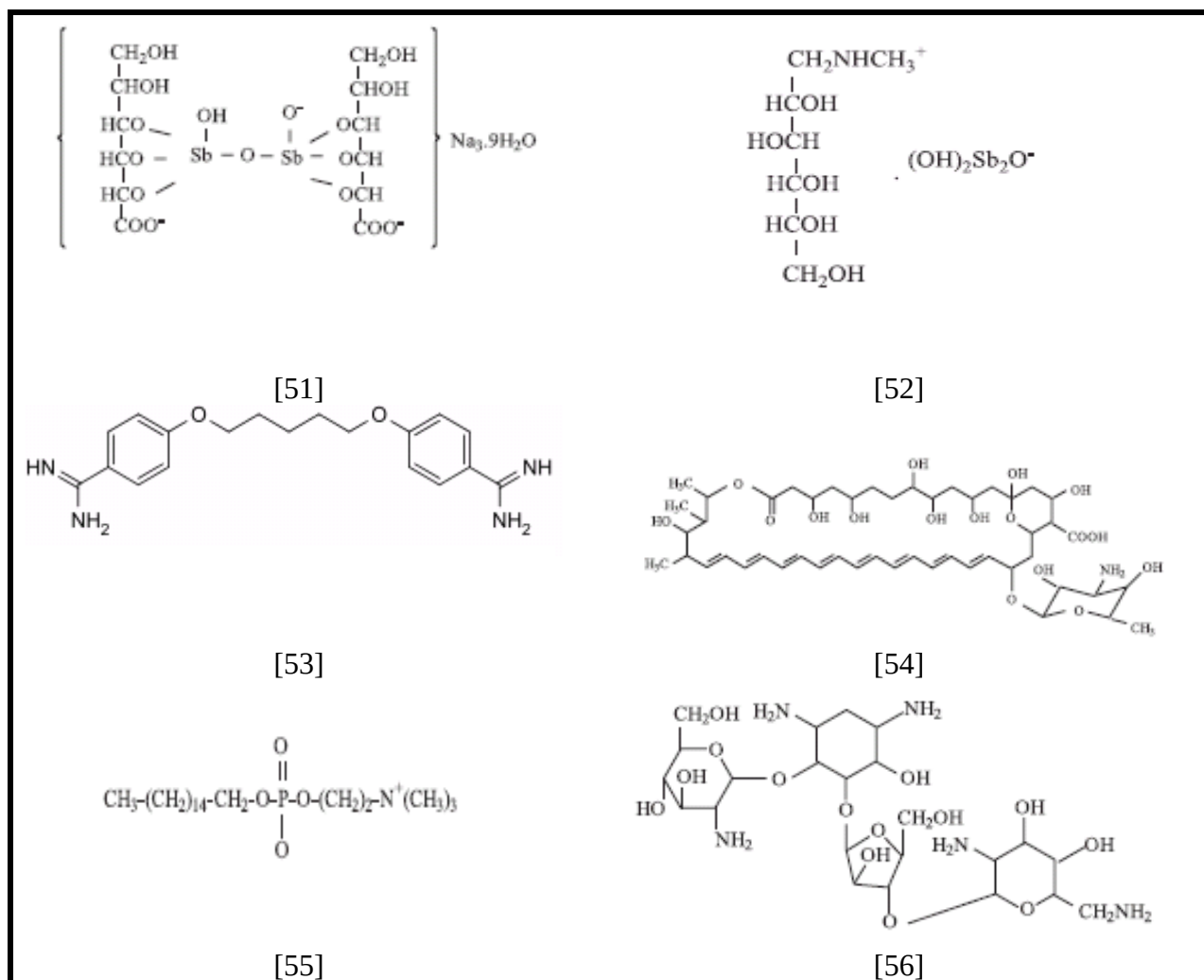


Figura 8 - Principais fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses

2.3.3 ATIVIDADE ANTILEISHMANIA *IN VITRO* COM PRODUTOS NATURAIS

Diversos ensaios *in vitro* com extratos vegetais têm comprovado atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e/ou amastigotas. Há registro da atividade leishmanicida de óleos essenciais (UEDA et al., 2006; MEDEIROS et al., 2011; COSTA et al., 2009) flavonoides (MENDONÇA-FILHO et al., 2004) alcaloides COSTA et al., 2006; TURABEKOVA et al., 2011; LIMA et al., 2012; SILVA et al., 2012) e iridóides glicosilados (SHUKLA et al., 2011).

Ueda et al. (2006), demonstraram a atividade antileishmania do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L., bem como de seu principal constituinte, o eugenol. O óleo essencial

inibiu progressivamente o crescimento de *L. amazonensis* na faixa de concentração de 100 a 1000 µg/mL. A CI_{50} do óleo para promastigotas e amastigotas foi respectivamente de 135 e 100 µg/mL, e a CI_{50} para o eugenol foi 80 µg/mL para formas promastigotas.

Os ensaios com óleos essenciais de *Lippia sidoides* (Verbenaceae) e do composto timol, majoritário do óleo essencial apresentaram moderada atividade antiparasitária contra promastigotas de *L. amazonensis* (CI_{50} 44,38 µg/mL e 22,6 µg/mL, respectivamente), porém com baixo índice de seletividade (MEDEIROS et al., 2011).

Lima et al. (2012), avaliaram o efeito antileishmania *in vitro* sobre *L. amazonensis* de frações alcaloídicas obtidas de extratos de *Annona mucosa*, das quais foi isolado o alcaloide liridenina, o qual apresentou CI_{50} = 1,43 µ/mL.

Em avaliação realizada por Silva et al. (2012), da atividade antileishmania *in vitro* sobre *L. amazonensis*, as frações ricas em alcalóides obtidas de extratos dos galhos, cascas e folhas de *Unonopsis guatterioides* foram consideradas altamente ativas, com CI_{50} = 1,07, 1,90, 2,79 µ/mL, respectivamente.

Mendonça-Filho et al. (2004), avaliaram o efeito antileishmania *in vitro* sobre *L. amazonensis* do extrato rico em polifenóis do mesocarpo fibroso dos frutos de *Cocos nucifera* L. (Palmae). O referido extrato apresentou CIM de 10 µg/mL.

Turabekova et al. (2011), realizaram estudos com derivados N-benzílicos do alcalóide cistina contra amastigotas de *L. donovani*, onde alguns dos compostos se mostraram ativos, com CI_{50} entre 8,7 e 77,0 µg/mL.

WERT e colaboradores (2011) sintetizaram derivados da betulina para avaliação dos efeitos das modificações estruturais da atividade contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. infantum* e *L. donovani*, onde o derivado heterociclo, 3,28-di-O-acetil-lup-13(18)eno foi o mais ativo (CI_{50} = 9,0 µM).

Iridóides glicosilados de *Nyctantes arbortristis* (Oleaceae) foram isolados e testados para atividade leishmanicida com bons resultados. Nos testes *in vitro* os iridóides inibiram a tripanotona redutase, enzima chave do metabolismo de tióis em tripanosomatídeos, um alvo interessante por não existir em mamíferos. O arbortristosídeo A composto mais ativo inibiu a enzima com CI_{50} de 2,29 μM (SHUKLA et al., 2011).

2.4 A BUSCA DE COMPOSTOS ATIVOS FRENTE ÀS DOENÇAS INFECCIOSAS

Infecções humanas, envolvendo a pele e mucosas constituem um sério problema de saúde pública, principalmente em países de clima tropical e subtropical, sendo que as doenças infecciosas são a segunda maior causa de morte no mundo.

O aumento da resistência dos microrganismos aos medicamentos e produtos químicos convencionais, tem levado os cientistas a procurar novas fontes de biocidas com atividades de amplo espectro, visto que as bactérias multiplicam-se rapidamente e sofrem mutação, o que facilita a troca de conteúdo genético entre linhagens de mesma espécie ou de espécies distintas. A resistência microbiana pode ser considerada um fenômeno ecológico que ocorre como resposta da bactéria frente ao amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente, e está diretamente associada aos seguintes fatores: inativação do antibiótico na molécula bioativa por alterações químicas, modificação do alvo que leva a perda da atividade do antibiótico, permeabilidade externa da membrana, dentre outros (LEVY, 2002; LAMBERT, 2005).

Geralmente, as bactérias Gram-negativas são mais resistentes do que as bactérias Gram-positivas e apresentam diferenças bioquímicas em sua parede celular. Aproximadamente 95% da parede celular das bactérias Gram-positivas são formadas por peptidoglicano, onde outras moléculas como o ácido teicóico e proteínas estão ligados. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais complexa, pois é formada por

peptidoglicano, lipoproteína, lipopolissacarídeos, além de apresentar parede externa que é responsável pela prevenção da perda de proteínas periplasmáticas e evitar o acesso de enzimas hidrolíticas e de certos antibióticos ao peptidoglicano (GUIMARÃES et al., 2010).

O mecanismo de ação de compostos naturais frente aos microrganismos oportunistas, ainda não está completamente elucidado, porém acredita-se que envolve a ruptura da membrana celular por compostos lipofílicos (DORMAN e DEANS, 2000). Na literatura tem sido relatado que os terpenos são ativos contra diversos microrganismos Gram-positivos. A ação dos terpenos, que normalmente constituem a composição química de óleos essenciais, pode estar associada à estrutura da parede celular da bactéria Gram-positiva que permite que as moléculas hidrofóbicas presentes no óleo essencial possam penetrar com facilidade nas células e atuar tanto na parede da célula e no citoplasma. Em baixas concentrações as moléculas podem interferir com as enzimas envolvidas na produção de energia, e em concentrações mais elevadas, elas podem desnaturar proteínas, levando a degradação da parede celular e consequente aumento da permeabilidade de vazamento do conteúdo da célula (NAZARRO et al., 2013).

Enterococcus faecalis é uma bactéria comensal que habita o trato gastrointestinal em humanos, mas podem agir como patógenos oportunistas causando infecções severas do trato urinário, bacteremia (presença de bactérias no sangue) e endocardite bacteriana. Na cavidade oral, é a mais comum e às vezes a única bactéria isolada de canais radiculares de dentes com lesões periapicais persistentes. A virulência de *E. faecalis* nos canais radiculares está relacionada a sua capacidade de resistir ao tratamento de drogas intracanal e à sua capacidade de sobreviver no canal radicular como o único microrganismo sem o apoio de outras bactérias, levando a formação de biofilmes, sendo este o responsável pelo fracasso dos tratamentos endodônticos (RÔÇAS et al., 2004; BADASSARI et al., 2005). Estruturalmente, as bactérias aderidas ao biofilme se comportam de maneira diferente diante de substâncias

químicas, porque as substâncias poliméricas que compõem a matriz do biofilme podem dificultar a difusão dessas substâncias no meio celular, uma vez que a velocidade de penetração da substância varia de acordo com o microrganismo e depende da composição de sua matriz de oxopolissacarídeo (COSTERTON et al., 1999).

Candida albicans é um patógeno oportunista que pode causar infecções locais e sistêmicas que normalmente afeta pacientes imunologicamente comprometidos ou submetidos a tratamentos prolongados com antibióticos. Espécies do gênero *Candida* fazem parte da flora normal da boca, estando presentes em 30% a 70% dos indivíduos saudáveis, sendo *Candida albicans* a espécie mais frequente em relação às outras deste gênero como agente colonizador de próteses dentárias (ZHANG et al., 2002, DARWAZETH et al, 2001).

A busca por novos agentes antimicrobianos de origem natural que possam ser utilizados no combate a agentes microbianos ou na irrigação de canais radiculares em tratamentos endodônticos tem se intensificado, visto que, nos tratamentos odontológicos, o irrigante utilizado na maioria das vezes é o hipoclorito de sódio, que embora apresente forte atividade antimicrobiana, é tóxico aos tecidos periapicais dependendo de sua concentração (SPENCER & BRENNAN, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo químico do óleo essencial e dos extratos de *Cyperus rotundus*, assim como investigar por intermédio de ensaios químicos e biológicos específicos sua potencialidade em substâncias bioativas, visando gerar subsídios para o desenvolvimento de futuros fitoterápicos ou fitocosméticos a partir desta espécie.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar o perfil químico dos constituintes voláteis presentes nos tubérculos da espécie *Cyperus rotundus* coletados em diferentes épocas do ano;
- Isolar os constituintes químicos dos extratos de *Cyperus rotundus* por meio de técnicas cromatográficas e espectroscópicas (UV, IV, RMN ^1H e ^{13}C CG e EM);
- Realizar testes de atividades leishmanicida, antimicrobiana, antibiofilme e antioxidante dos extratos e frações;
- Realizar ensaios enzimáticos de ação anti-elastase, anti-tirosinase e anti- α -glucosidase;
- Isolar e identificar a microbiota fúngica manifestada nos tubérculos de *C. rotundus*.

4 METODOLOGIA

4.1 SUPORTES PARA CROMATOGRAFIA

- **Cromatografia em coluna (CC).** Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck e gel polimérico LH 20 (SephadexTM). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades de amostras que foram cromatografadas. A proporção de sílica foi cerca de 20 vezes a massa do produto bruto a ser purificado (MATOS, 2009).

- **Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).** As análises em camada delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas Merck, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F254, com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura.

- **Reveladores.** A revelação das faixas foi feita sob luz ultravioleta 254 e 366 nm e solução de sulfato cérico, vanilina sulfúrica, reagente de Dragendorff e NP/PEG (difetilaminoborato/polietilenoglicol).

- **Solventes.** Para cromatografia foram utilizados solventes das marcas Dinâmica, Vetec, Cinética, Nuclear e Tédia.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os óleos essenciais e frações foram analisados em Cromatógrafo em fase Gasosa modelo CG 2010 da Shimadzu com detector por ionização de chama (CG-DIC). As análises foram realizadas com coluna CP-Sil 5 CB (5% fenil-95% dimetilpolisiloxano) da Varian, com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 mm, sendo utilizado Hélio como gás de arraste em um fluxo de 2,0 mL/min. A injeção em modo split 1:20 foi realizada com injetor a 250 °C. A temperatura do detector foi de 240 °C e o forno foi programado de 60 °C a 180 °C a 3 °C/min. Foram co-injetados padrões de hidrocarbonetos lineares para a determinação dos índices de retenção. Após a análise por CG-DIC, os óleos foram analisados em Cromatógrafo em fase Gasosa modelo QP-2010 da Shimadzu com detector por Espectrometria de Massas (CG-EM). As análises foram realizadas com coluna VF-1MS da Varian, com medidas de 15 m x 0,25 mm x 0,25 mm. As condições de análise do forno foram as mesmas utilizadas por CG-DIC, utilizando a técnica de impacto eletrônico a 70 eV. As análises foram realizadas no Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA.

Os índices de retenção foram calculados em relação aos tempos de eluição das substâncias e dos tempos de eluição de uma série de hidrocarbonetos lineares (C₉-C₃₀) que foram co-injetados com a amostra em CG-DIC. A identificação dos constituintes foi obtida com o conjunto de dados de índices de retenção e dos espectros de massas, comparando com dados da literatura (ADAMS, 2009) e de espectroteca Wiley 7.0.

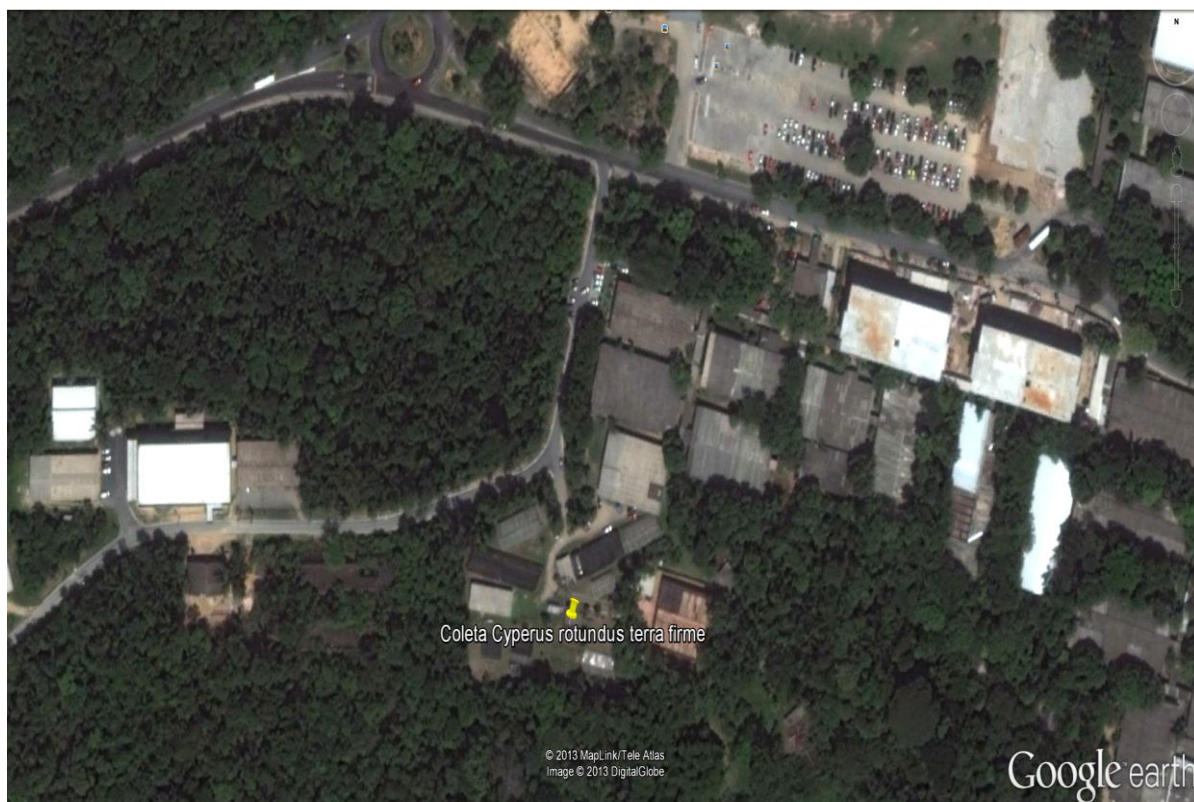
Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram registrados em espectrômetro Bruker Avance 600 e 400 do Laboratório de RMN da Universidade Federal do Paraná. Os hidrogênios foram observados a 400 e 600 MHz. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃), metanol deuterado (CD₃OD) e misturas destes, utilizando o tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna.

Os espectros de massas de alta resolução foram registrados em espectrômetros do tipo *ion-trap* operando com fonte de Ionização Electron Spray (*ESI*) e triplo-quadrupolo modelo TSQ Quantum Access que opera com fonte de ionização química à pressão atmosférica (*APCI*). Os dois equipamentos operam no modo positivo e negativo. As análises foram realizadas na Central Analítica da Universidade Federal do Paraná.

A leitura da CIMB foi realizada em leitora de microplacas ELx800, Biotek, utilizando filtro de 630nm.

4.3 COLETA, SELEÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO E PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

O material botânico foi coletado nos meses de janeiro/2012, abril/2012, julho/2012 e outubro/2012 no Campus da Universidade Federal do Amazonas – UFAM para obtenção dos óleos essenciais e no mês de janeiro/2012 para obtenção dos extratos (Figura 9), sendo que as principais especificações da coleta estão descritas na Tabela 1. A exsicata foi preparada, e identificada pelo Dr. Antônio Carlos Webber do Departamento de Biologia, do Instituto de Ciências Biológicas da UFAM e depositada no Herbário da instituição, sob o número de registro 9977. As plantas foram secas em estufa de ar circulante a 40 °C por um período que variou de 24 a 72 horas, posteriormente foram trituradas para obtenção do óleo essencial e dos extratos. Foram utilizados tubérculos (extração de óleos essenciais e extratos) e inflorescências (extratos) de *C. rotundus*.



Fonte: Google Earth a 605 m de altura

Figura 9 - Local de coleta de *C. rotundus*

Tabela 1 - Informações de coleta do material botânico de *C. rotundus*

Espécie	<i>C. rotundus</i>
Local de Coleta	Campus da UFAM, setor Sul
Coordenadas	Latitude 3° 06' 04,38" S
Geodésicas obtidas por GPS	Longitude 59° 58' 37,68" O Altimetria 71 m acima do nível do mar
Período	Janeiro/12 a outubro/2012
Horário	Manhã
Herbário	HUAM 9977
Coletor	686-S. Silva

Durante o período do experimento da extração do óleo essencial (janeiro/12 a outubro/12) foram observados os dados climatológicos referentes à temperatura e precipitação. Os dados que foram disponibilizados pelo Instituto Nacional de Meteorologia – INMET estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados climatológicos referentes ao período de janeiro a outubro de 2012.

Período	Temperatura (°C)			Precipitação total (mm)
	Máx.	Mín.	Méd.	
Janeiro/12	31,1	23,9	26,3	364,2
Abril/12	31,6	24,6	27,1	195,6
Julho/12	32,6	24,2	27,6	83,0
Outubro/12	34,4	24,8	28,8	181,4

Fonte: INMET

4.4 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *C. rotundus*

Os óleos essenciais extraídos a partir de 100 g do material seco proveniente dos tubérculos foram obtidos por meio de processo de hidrodestilação, em sistema Clevenger modificado por um período de 3,5 horas, mantendo-se a temperatura de 100 °C. Posteriormente foram filtrados usando sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) para retirar resíduos de água. Os óleos foram armazenados em ampolas, de cor âmbar seladas e mantidas sob refrigeração, para manutenção da integridade de seus constituintes químicos voláteis.

4.4.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA FRAÇÃO VOLÁTIL DE *C. rotundus*

Em decorrência da variedade de compostos presentes na matriz do óleo essencial e de diversos ecotipos citados na literatura, os resultados cromatográficos obtidos por CG-EM e CG-FID de *C. rotundus* foram analisados por PCA (principais componentes de análises) e HCA (análise hierárquica de agrupamentos), utilizando o Programa Chemoface versão 4.1. Os métodos estatísticos foram usados para sugerir a estrutura do conjunto e analisar as variáveis em relação às características em estudo. Para reduzir os efeitos de dispersão e para comparar as amostras, os cromatogramas obtidos a partir de óleos foram normalizados pela redução da área sob cada cromatograma para um valor de 1.

A PCA foi realizada com 30 variáveis, que corresponde a 30 substâncias identificadas na fração volátil. Na PCA, o agrupamento das amostras definiu a estrutura dos dados por

meio de gráficos de scores e *loadings*, cujos eixos são componentes principais (PCs) nos quais esses dados foram projetados. Os scores forneceram a composição das PCs em relação às amostras, enquanto os *loadings* forneceram essa mesma composição em relação às variáveis. O estudo conjunto de scores e *loadings* permitiu estimar a influência de cada variável em cada amostra.

A HCA foi realizada utilizando as matrizes das 4 (quatro) amostras, que foram coletadas em diferentes épocas do ano, e todas as variáveis (substâncias identificadas). O coeficiente de dissimilaridade utilizado foi a distância euclidiana. Para realizar o agrupamento foi utilizado o método pela associação média, foi escolhida a opção de truncamento automático para definir os conglomerados e obter o dendrograma.

O método estatístico também foi aplicado para os ecotipos citados na literatura. A PCA foi realizada com 12 (doze) variáveis que representam as principais substâncias identificadas nos diversos ecotipos. A HCA foi realizada utilizando as matrizes de 10 (dez) ecotipos e os dados do presente estudo. Definimos como parâmetro de análise a maior variação percentual da amostra analisada. Os resultados foram obtidos utilizando os dados citados na literatura, onde o ecotipo-H (1- Japão); Os ecotipos-O (2-Japão, Taiwan, Tailândia e Filipinas e 5-Hawaii); ecotipo-M (3-China, Hong Kong, Japão, Taiwan e Vietnã); ecotipo-K (Hawaii), e das demais localidades, conforme sumarizado no Quadro 1.

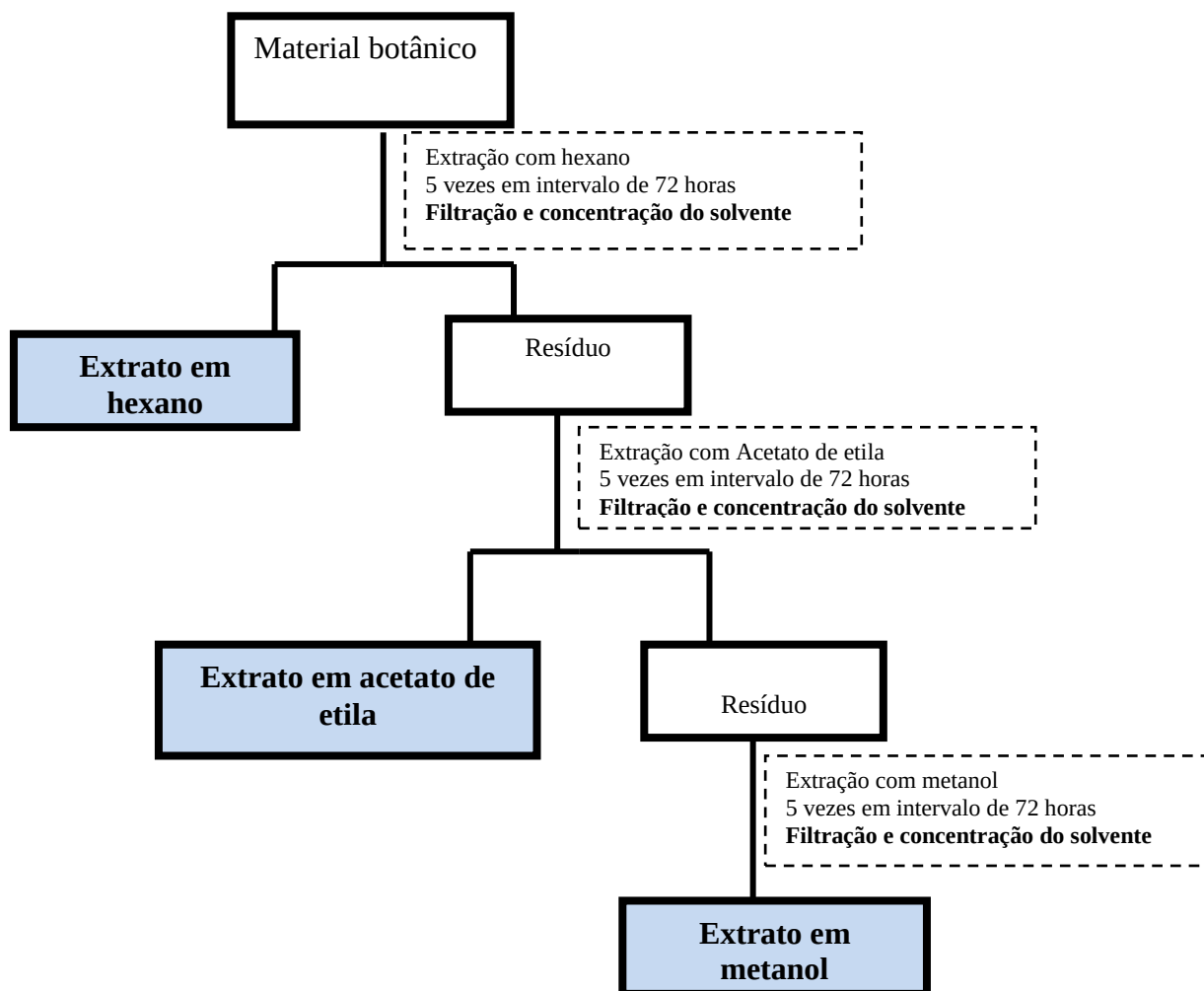
Quadro 1 - Matriz para obtenção de dados do PCA e HCA

Constituintes	Porcentagem da composição do óleo essencial										
	1 (H)	2 (O)	3 (M)	4 (K)	5 (O)	6 (Pará)	7 (Índia)	8 (Nigéria)	9 (Tunísia)	10 (África)	11 (Amazonas)
α -pineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	10,0	1,02
β -pineno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11,3	2,07
α -copaeno	-	-	-	-	-	-	12,1	-	-	-	-
cipereno	-	30,8	7,2	28,7	20,7	-	11,1	19,2	30,9	2,6	18,62
β -selineno	18,3	-	17,8	-	-	-	-	-	-	5,1	7,34
ciperotundona	-	13,1	19,4	8,8	25,0	12,1	-	-	8,8	-	24,72
α -ciperona	38,6	-	30,7	-	-	22,8	-	17,7	25,2	11,0	23,73
valerenal	-	-	-	-	-	-	9,8	-	-	-	-
óxido de cariofileno	-	-	-	-	-	-	9,7	-	-	5,4	7,47
acetato de patcholenil	-	-	-	8,0	-	-	9,7	-	-	-	-
acetato de sugeonil	-	-	-	8,9	-	-	-	-	-	-	-

- não identificado

4.5 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

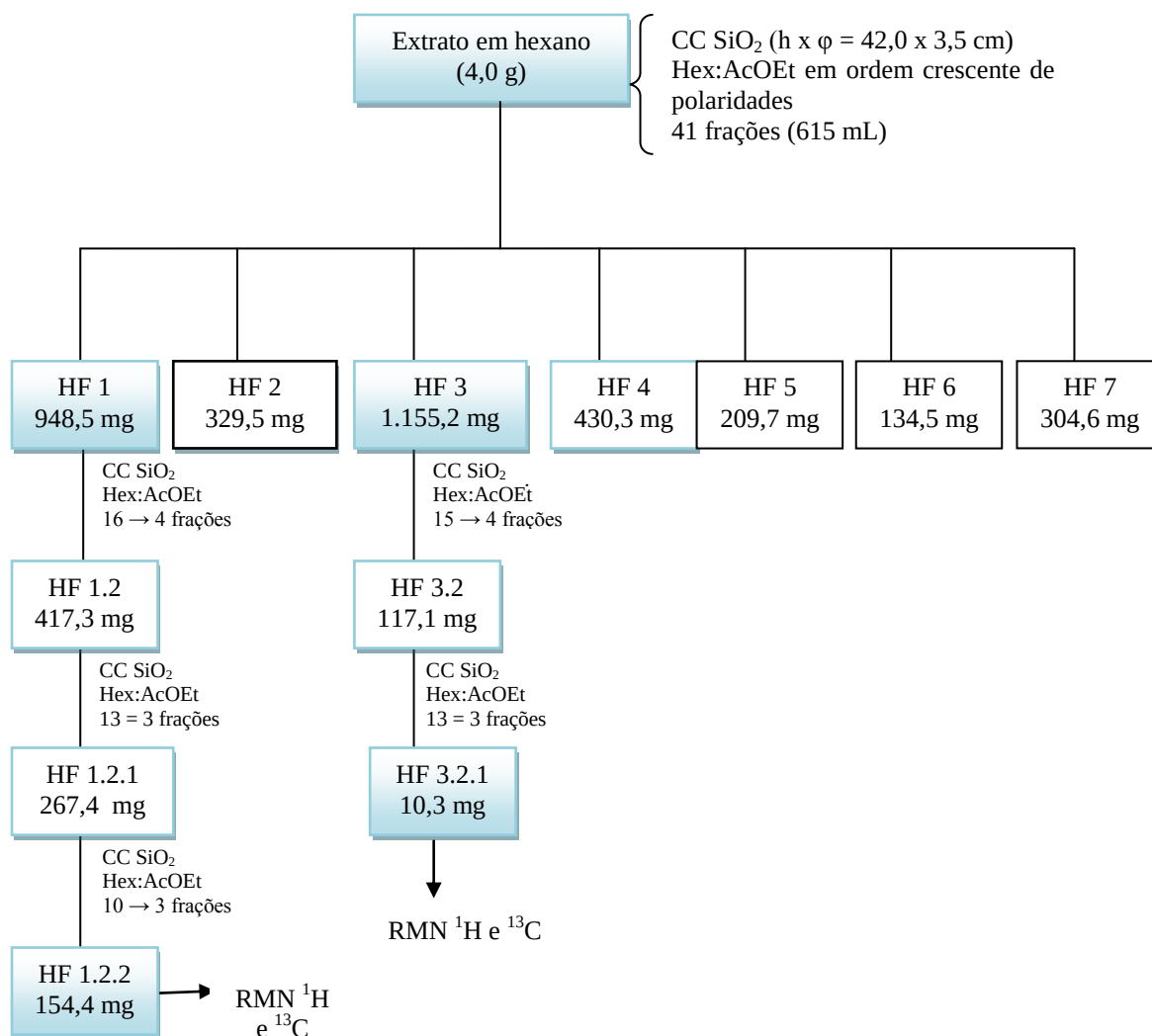
Os extratos provenientes dos tubérculos (1920,0 g) e inflorescência (122,8 g) de *C. rotundus* foram obtidos por meio de maceração com os solventes hexano, acetato de etila e metanol, por um período de 15 dias para cada solvente, com renovação a cada 3 dias. As soluções foram concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida e em seguida secas em dessecador e posteriormente pesados, codificados, armazenados em frascos de vidro e conservados em geladeira (Fluxograma 1).



Fluxograma 1- Esquema para obtenção dos extratos de *C. rotundus*

4.6 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM HEXANO DOS TUBÉRCULOS

Parte do extrato hexânico dos tubérculos de *C. rotundus* (4,0 g) foi inicialmente submetido a fracionamento por meio de uma coluna cromatográfica filtrante de sílica gel (0,063-0,200 mm, 80,0 g), eluída com hexano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 41 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 7 frações com as respectivas massas descritas no Fluxograma 2. As frações HF1 e HF3 foram submetidas a outros fracionamentos, obtendo-se 2 sólidos cristalinos que foram analisados por CG-EM e RMN de ^1H e ^{13}C .

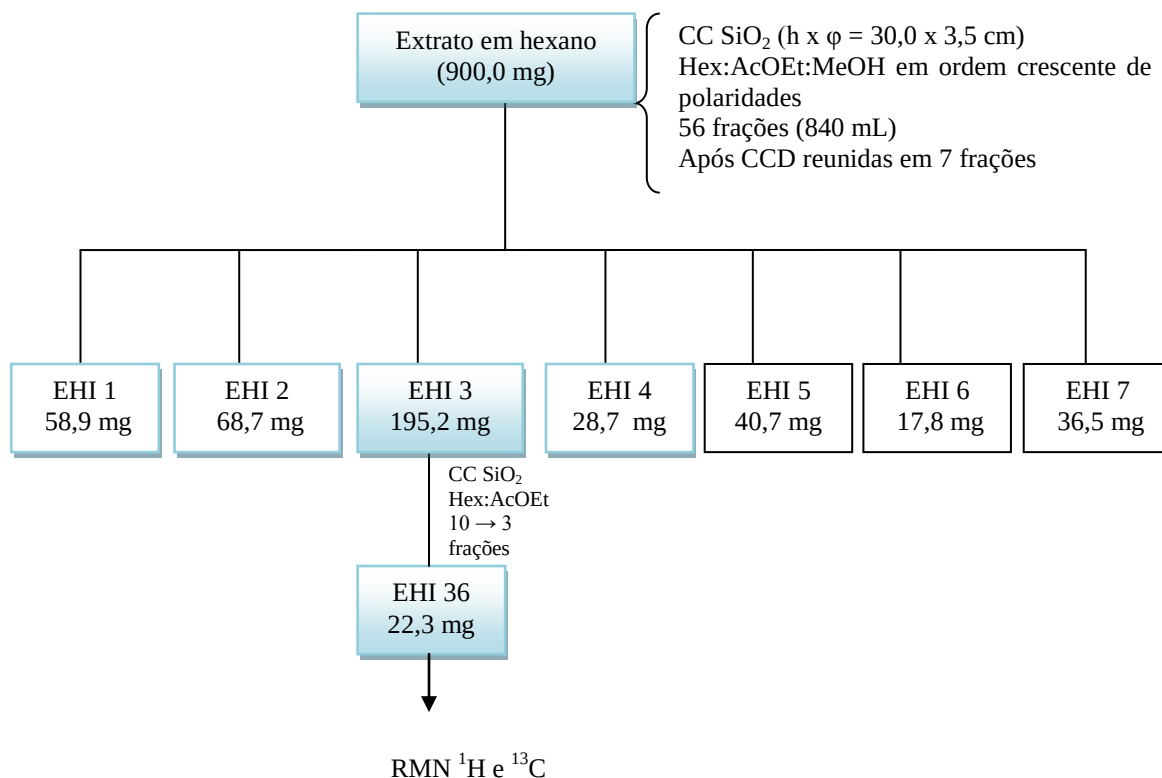


Fluxograma 2 - Esquema do fracionamento do extrato em hexano dos tubérculos de *C. rotundus*

4.7 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM HEXANO DA INFLORESCÊNCIA

Parte do extrato hexânico da inflorescência *C. rotundus* (900,0 mg) foi inicialmente submetido a fracionamento por meio de uma coluna cromatográfica filtrante de sílica gel (0,063-0,200 mm, 20,0 g), eluída com hexano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 56 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 7 frações com as respectivas massas descritas no Fluxograma 3.

A fração EHI 3 (195,2 mg) foi recromatografada em sílica gel (0,063-0,200 mm, 10,0 g), eluída com hexano e acetato de etila em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 10 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 3 frações. A fração codificada como EHI 36 (22,3 mg) apresentou-se como cristais em forma de agulhas. A amostra foi submetida a análises por RMN ^1H e ^{13}C de 1D e 2D.



Fluxograma 3 - Fracionamento do extrato em hexano da inflorescência de *C. rotundus*

4.8 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM ACETATO DE ETILA DOS TUBÉRCULOS

Parte do extrato em acetato de etila dos tubérculos de *C. rotundus* (4,0 g) foi inicialmente submetido a fracionamento por meio de uma coluna cromatográfica filtrante de sílica gel (0,063-0,200 mm, 80,0 g), eluída com hexano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 58 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 6 frações com as respectivas massas descritas no Fluxograma 4.

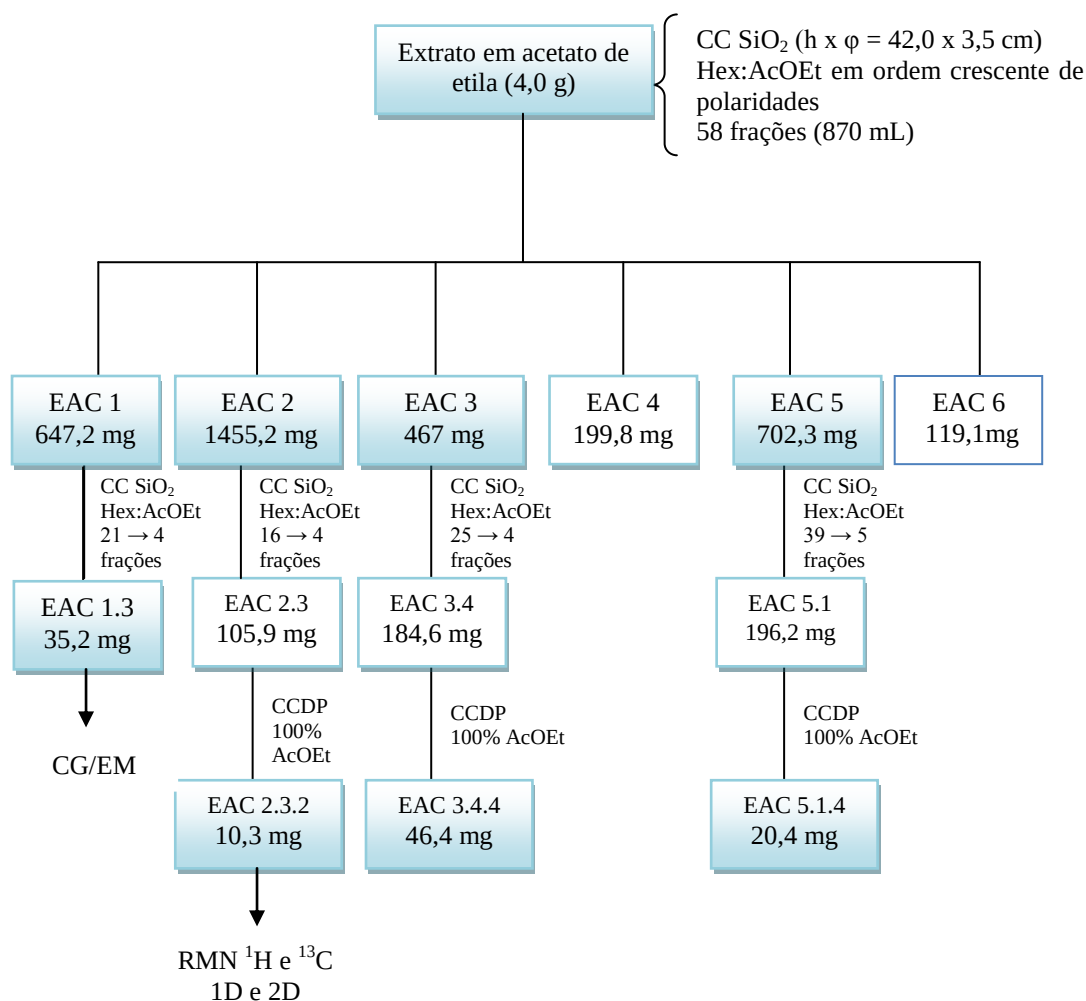
A fração EAC1 (647,2 mg) foi recromatografada em sílica gel (0,063-0,200 mm, 20,0 g), eluída com hexano e acetato de etila em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 21 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 4 frações. A fração codificada como EAC 1.3 (35,2 mg) apresentou aspecto oleoso sem coloração e quando analisada por CCDA e revelada com vanilina sulfúrica apresentava manchas característica de terpenos. A amostra foi analisada por CG-EM e CG-FID e forneceu uma mistura de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (EAC 1.3; 35,2 mg).

A fração EAC2 (1455,2 mg) foi analisada por uma combinação de CG-EM e CG-DIC e apresentou predominância de sesquiterpenos oxigenados. A amostra foi recromatografada em sílica gel (0,063-0,200 mm, 25,0 g), sendo eluída com hexano e acetato de etila em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 16 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 4 frações. A fração codificada como EAC 2.3 (105,9 mg), foi recromatografada em CCDP sendo eluída com Hexano:Acetato (8:2). A amostra forneceu a mistura de sesquiterpenos oxigenados (EAC 2.3.2; 10,3 mg) que foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C de 1D e 2D.

A fração EAC3 (467 mg) foi recromatografada em sílica gel (0,063-0,200 mm, 10 g), eluída com hexano e acetato de etila em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 25

frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 4 frações. A fração codificada como EAC 3.4 (184,6 mg), foi recromatografada em CCDP sendo eluída com acetato de etila. A amostra apresentou aspecto oleoso amarelado (EAC 3.4.4; 46,4 mg) e foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C de 1D e 2D.

A fração EAC5 (702,3 mg) foi recromatografada em sílica gel (0,063-0,200 mm, 20 g), eluída com hexano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 39 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 5 frações. A fração codificada como EAC 5.1 (196,2 mg), foi recromatografada em CCDP sendo eluída com acetato de etila. A amostra apresentou aspecto oleoso amarelado (EAC 5.1.4; 20,4 mg) e foi analisada por RMN ^1H e ^{13}C de 1D e 2D.

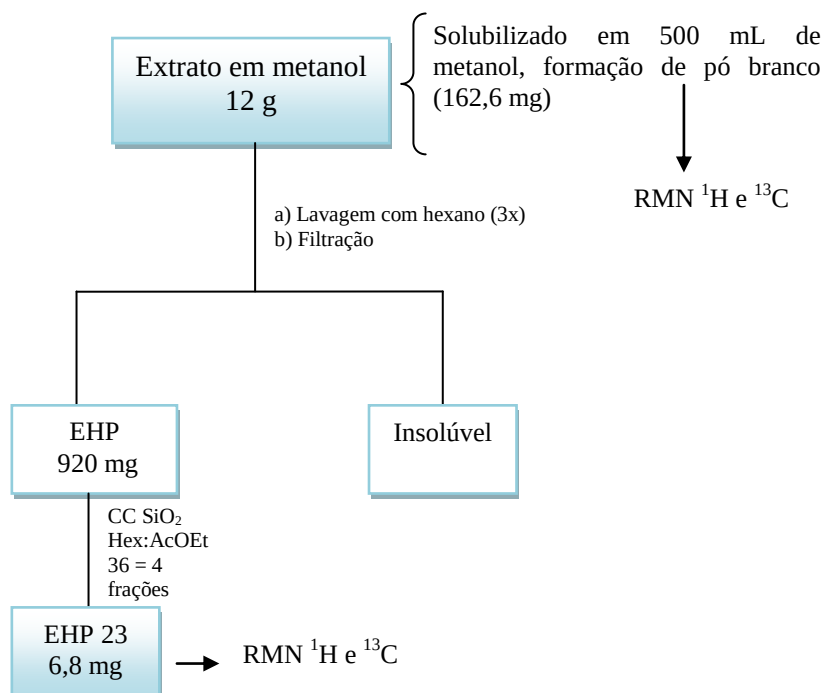


Fluxograma 4 - Esquema do fracionamento do extrato em acetato de etila dos tubérculos de *C. rotundus*

4.9 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM METANOL DOS TUBÉRCULOS

Inicialmente uma parte do extrato em metanol dos tubérculos de *C. rotundus* (12 g) foi solubilizada em metanol (500 mL) que ao término do processo, houve formação de um sólido branco amorfo (162,6 mg), fornecendo o composto EMP1 que foi analisado por RMN ^1H e ^{13}C de 1D e 2D.

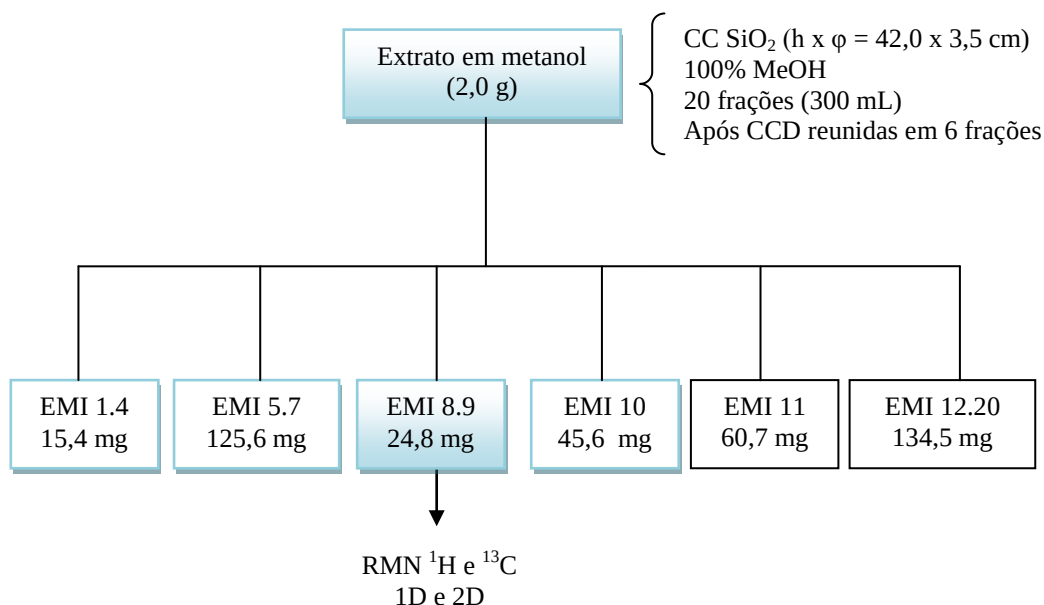
Em seguida, a parte solúvel em metanol foi lavada com hexano (3 x 200 mL), o sobrenadante da lavagem foi filtrado, concentrado em evaporador rotatório e seco em capela com exaustão. A fração solúvel em hexano (920,4 mg) apresentou aspecto oleoso com formação de um sólido branco, e foi cromatografada em coluna de sílica gel (0,063-0,200 mm, 20,0 g), eluída com hexano, acetato de etila em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 36 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 4 frações com as respectivas massas descritas no Fluxograma 5. A fração codificada como EHP 23 (eluída com hexano:acetato 1:1), forneceu o composto EHP 23 que foi submetido a análises por RMN ^1H e ^{13}C de 1D e 2D.



Fluxograma 5 - Fracionamento de EHP

4.10 FRACIONAMENTO DO EXTRATO EM METANOL DA INFLORESCÊNCIA

Parte do extrato em metanol da inflorescência de *C. rotundus* (2,0 g) foi submetido ao fracionamento por meio de uma coluna cromatográfica (0,063-0,200 mm, 20,0 g), em gel polimérico LH 20 sephadex e eluída com metanol 100%, obtendo-se 20 frações de 15 mL cada, que após comparação por CCDA foram reunidas em 6 frações com as respectivas massas descritas no Fluxograma 6. A fração EMI 8-9 apresentou um sólido amarelo amorfo que quando revelado com vanilina sulfúrica apresentava coloração amarela, fornecendo o composto EMI 8.9. A fração foi submetida a análises por RMN ^1H e ^{13}C de 1D e 2D.



Fluxograma 6 - Fracionamento do extrato em metanol da inflorescência

4.11 DETERMINAÇÃO DE FENOIS E FLAVONOIDES TOTAIS

A concentração de fenois totais foi quantificada pelo método descrito por Singleton & Rossi (1965) com modificações. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 10 µL dos extratos a 1 mg/mL, 50 µL da solução Folin-Ciocalteu (1:10) e incubada por 8 minutos. Após esse período foi adicionado o carbonato de sódio 0,4% e incubado por mais 3 minutos. Em seguida foi realizada a leitura da microplaca a 620 nm em leitora de Elisa. O padrão utilizado foi o ácido gálico.

O cálculo do teor de fenois totais (FET) seguiu a fórmula $FET = \frac{Abs_{amostra} \times 100}{Abs_{padrão}}$. Para a comparação das amostras com o ácido gálico foi construída uma curva padrão e a partir do cálculo da equação da reta foram determinados os valores em mili equivalentes de ácido gálico (mEqAG).

A quantificação de flavonoides totais foi realizada pelo método descrito por Zhishen, Mengcheng & Jianming (1999) com modificações. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 30 µL do extrato a 1 mg/mL, 90 µL de EtOH, 6 µL de cloreto de alumínio 10% e 6 µL de acetato de potássio. A microplaca foi incubada por 30 minutos e após este período foi realizada a leitura a 510 nm. O padrão utilizado para quantificação foi a quercetina.

A determinação de flavonoides foi deduzida pela seguinte fórmula $FLT = \frac{Abs_{amostra} \times 100}{Abs_{padrão}}$.

4.12 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL DPPH

O teste de DPPH é um método indireto mais antigo utilizado para se determinar a atividade antioxidante. O radical DPPH possui coloração púrpura com o máximo de absorção em comprimento de onda aproximadamente 517 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R.), o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela (Figura 10), com consequente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (BORGES, 2011).

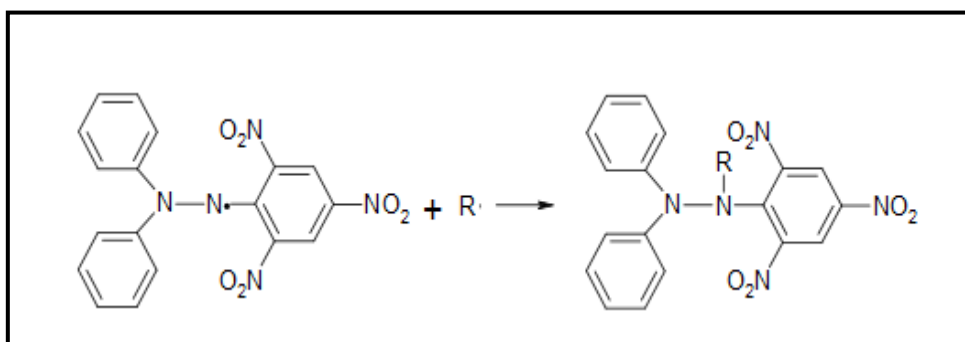


Figura 10 - Estabilização do radical livre DPPH

Os extratos brutos e o óleo essencial de *C. rotundus* foram avaliados com relação à sua capacidade de captura de radical livre estável 2,2'-difetil-1-picrilhidrazila (DPPH), segundo metodologia descrita por Molyneux (2004) com modificações necessárias para utilização de microplacas.

Inicialmente os extratos e óleo essencial foram avaliados qualitativamente com relação à sua capacidade de captura de radical livre estável 2,2'-difetil-1-picrilhidrazila (DPPH), por CCDA. Foram preparadas placas cromatográficas com o extratos em hexano e óleo essencial (hexano:acetato de etila – 8:2), acetato de etila (hexano:acetato de etila – 6:4) e metanol (metanol:acetato de etila – 9:1), e posteriormente eluídos em placa de sílica e fase reversa, de

acordo com a especificidade do extrato. Após a evaporação do solvente a placa foi nebulizada com a solução de DPPH e então, foi realizada a leitura da placa, em que halos amarelados sobre fundo de coloração púrpura, são considerados positivos.

Para o ensaio quantitativo, a solução de DPPH a 0,8 mmol/L foi previamente preparada. Na microplaca foram adicionados 30 µL do extrato a 1 mg/mL e 170 µL de etanol. O controle foi constituído de 200 µL de etanol e o padrão utilizado foi quercetina a 1 mg/mL. O ensaio foi realizado em quadruplicata.

Após a primeira leitura foi adicionado em cada poço 100 µL da solução de DPPH, em seguida as microplacas foram incubadas em temperatura ambiente na ausência de luz por 30 minutos e realizada a segunda leitura das absorbâncias em leitor de microplacas DTX800, da marca Beckman a 517 nm.

Os valores de capacidade sequestrante (CS) do radical DPPH foram calculados pela fórmula $CS = 100 \times [1 - (Abs2 - Abs1)/Abs]$, onde Abs2 = é a absorbância da amostra na segunda leitura e Abs1 = é a absorbância da amostra na primeira leitura e Abs = é a média das absorbâncias do controle.

4.13 ENSAIOS BIOLÓGICOS

O óleo essencial, extratos brutos, frações e substâncias isoladas foram submetidos à ensaios *in vitro* de ação enzimática, de atividade antimicrobiana e antibiofilme, de toxicidade frente a larvas de *Artemia salina* e contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

4.13.1 ENSAIOS ENZIMÁTICOS *in vitro*

As enzimas que estão presentes na matriz extracelular promovem a degradação de colágeno, elastina, ácido hialurônico e tirosina que estão diretamente envolvidas na perda da firmeza, elasticidade e tônus da pele (THRING et al., 2009).

A elastase é responsável principalmente pela quebra de elastina, que é uma proteína importante encontrada dentro da matriz extracelular. A elastina devido a sua propriedade de retração elástica única, é vital para dar elasticidade às artérias, pulmões, ligamentos e pele (KIM & KOBAYASHI, 2004). Em condições normais a atividade da elastase é necessária após o ferimento para degradar proteínas estranhas no interior da matriz extracelular agindo principalmente no reparo do tecido (MELZIG & LOSER, 2001).

A tirosinase, também denominada polifenol oxidase, é uma enzima multifuncional que contém cobre, sendo considerada a enzima chave na biossíntese de melanina que está diretamente associada a coloração da pele. A melanina é produzida por um processo fisiológico denominado melanogênese, que tem como função proteger a pele dos prejuízos induzidos pela radiação solar via absorção da luz ultravioleta e remoção das espécies reativas de oxigênio. (PAWELEK et al., 1992).

As glucosidases são enzimas responsáveis pela clivagem de grupos glicosídicos e são responsáveis pela mediação da digestão de oligossacarídeos no intestino delgado. Defeitos ou deficiências genéticas nessas enzimas estão associados a graves desordens do metabolismo de

carboidratos como diabetes e obesidade. A busca por novos inibidores de glucosidases são de grande interesse da indústria farmacêutica, uma vez que apresentam atividade contra vírus, crescimento tumoral e metástases, além de diabetes e doença de Gaucher (ASANO, 2003).

Na literatura é relatada a ação de compostos antioxidantes como inibidores das enzimas objeto deste estudo. Dessa forma, a ação de inibição dos extratos, óleo essencial e substâncias isoladas de *C. rotundus* foram avaliados frente às enzimas, elastase, tirosinase e α -glucosidase. As análises foram realizadas na Faculdade de Farmácia de Universidade Federal do Amazonas, sob a coordenação do Prof. Dr. Emerson Lima.

4.13.1.1 TESTE DE INIBIÇÃO SOBRE A ELASTASE

O ensaio de inibição de elastase dos extratos brutos, óleo essencial e substâncias isoladas foi realizada espectrofotometricamente de acordo com o método descrito por Kim & Kobayashi (2004).

Preparo dos reagentes: solução tampão TRIS-HCl a qual foi diluído em 100 mL de água estéril e ajustado o pH a 7,5 com HCl; solução da enzima elastase pancreática: preparar solução a 0,4 mg/mL da enzima diluída em água estéril; Substrato (N-succinil-ala-ala-ala-o-nitroanilide – AAPVN): diluir em 5 mL do tampão 0,0036 g do substrato.

Em uma placa de 96 poços, foram adicionados 10 μ L do diluente (tampão), 10 μ L do inibidor (extrato, óleo essencial ou substância pura), 10 μ L do controle negativo (DMSO) e 10 μ L do padrão (silverlestat 1mg/mL) em poços diferentes. Em seguida, foram adicionados 90 μ L da enzima em cada poço. A placa foi incubada por 15 minutos a 37 °C e adicionados 100 μ L do substrato (N-succnil-ala-ala-ala-p-nitroanilide-AAAPVN). Em seguida foi realizada a primeira leitura da placa (A1) em leitor de Elisa e as placas foram encubadas a temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas a leitura das placas de 10 em 10 minutos até 50

minutos (A2). A porcentagem de inibição sobre a tirosinase foi deduzida a partir da equação:

$$\%inib = 100 - (A2 - A1 \text{ amostra}) / (A2 - A1 \text{ controle}) \times 100$$

4.13.1.2 TESTE DE INIBIÇÃO SOBRE A TIROSINASE

A capacidade de inibição da enzima tirosinase pelos extratos brutos, óleo essencial e substâncias isoladas foi avaliada segundo o método descrito por Chang et al., 2009.

Preparo dos reagentes: solução tampão fosfato a qual foi diluído o PBS concentrado e ajustado o pH a 6,5; solução da enzima: 0,002 g da enzima foi dissolvida em 20 mL do tampão; reagente de cor (L-dopa): 0,0020 g do reagente sigma D9628 (DOPA-3.4-dihidroxi-L-fenilalanina) foi dissolvido em 10 mL do tampão.

Inicialmente foram preparadas diferentes soluções teste dos extratos em 20% de DMSO nas concentrações de 0, 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10 mg/mL. Para a leitura das absorbâncias dos extratos, 25 µL de cada solução teste dos extratos foram pipetados em triplicata a uma placa de 96 poços aos quais foram previamente adicionados 75 µL de solução de tirosinase. A absorbância 1 (A1) foi determinada em 475 nm. A placa foi incubada durante 5 minutos a 37 °C e em seguida adicionou-se 100 µL do reagente de cor DOPA (dihidroxifenilalanina). Incubou-se a placa por 15 minutos a 37° C e determinou-se a absorbância final (A2) no mesmo comprimento de onda em espectrofotômetro UV-Vis (modelo Biomat 3 da Thermo Electron Corporation). Como controle positivo foi utilizado o ácido fólico que foi preparado da mesma forma que as amostras.

A capacidade de inibição foi calculada por meio da seguinte fórmula: % inibição = $100 - (At2 \text{ amostra} - At0 \text{ amostra} / At2 \text{ controle} - At0 \text{ controle}) \times 100$, onde: At2 amostra - é a absorbância final da amostra; At0 amostra - é a absorbância da amostra no tempo zero; At2 controle - é a absorbância do controle; At0 controle - é a absorbância do controle no tempo zero.

4.13.1.3 TESTE DE INIBIÇÃO SOBRE α -GLUCOSIDASE

A capacidade de inibição da enzima α -glucosidase pelos extratos brutos, óleo essencial e substâncias isoladas foi avaliada segundo o método descrito por Andrade et al., 2008.

Preparo dos reagentes: solução tampão fosfato (10 mM) o qual foi ajustado o pH a 7,5 com adição de HCl; solução da enzima: diluir em 1 mL do tampão 0,002 g da enzima; reagente de cor (reagente sigma N 1377): diluir em 10 mL do tampão 0,0151 g do reagente.

Inicialmente foram preparadas as diluições das amostras a serem testadas e do padrão quercetina a uma concentração de 1 mg/mL. Em seguida foi retirada uma alíquota de 30 μ L e adicionada no primeiro e no segundo poço, seguido por diluição seriada até o oitavo poço. Para o poço controle foram adicionados 30 μ L do diluente e sua absorbância foi monitorada a cada 5 min, que deve estar próxima a 1,000 em 405 nm. A amostra foi incubada por um período de 5 min a 37 °C. Em seguida foram adicionados nos poços 170 μ L da solução da enzima e efetuada a primeira leitura da placa no método glucosidase no leitor de ELISA. Logo após foram adicionados 100 μ L do reagente de cor (PNPG) e realizada a leitura da absorbância a cada 5 min incubando a placa na estufa a 37 °C. Fazer o cálculo de inibição, utilizando a seguinte fórmula: %inibição = $100 - (A_{\text{final amostra}} - A_{\text{inicial amostra}} / A_{\text{final controle}} - A_{\text{inicial controle}}) \times 100$

4.13.2 TOXICIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA (TAS)

Diversos ensaios biológicos simples têm sido desenvolvidos no intuito de serem utilizados no monitoramento de extratos vegetais, dentre esses, a toxicidade sobre *A. salina*, que é um bioensaio rápido e conveniente como “screening” prévio no monitoramento de extratos de plantas. O teste de toxicidade frente à *A. salina* constitui um modelo de baixo custo e prático para análises de substâncias tóxicas devido a sua alta sensibilidade a quaisquer alterações do meio (CARVALHO et al., 2009).

O ensaio de avaliação de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS) foi realizado segundo a metodologia descrita por MEYER et al. (1982).

Os ovos de *A.salina* foram postos para eclosão em uma cuba de vidro com aproximadamente 200 mL de solução salina a 3,7% (m/v). Os ovos foram colocados para eclodir na solução salina por 24 horas, com aeração constante e temperatura controlada de 25°C. Após o período de 24 horas os náuplios foram transferidos para uma segunda cuba nas mesmas condições para a maturação dos microcrustáceos.

As amostras foram preparadas dissolvendo-se 2 mg do extrato bruto ou do óleo essencial em 1 mL de DMSO para que as amostras fossem testadas nas seguintes concentrações: 10, 20, 30 e 50 µg/mL.

Após o período de 24h foram contados 10 náuplios em 0,5 mL e transferidos para frascos de 10 mL, contendo 4,5 mL de solução salina.

Os testes foram realizados em triplicata, sendo que para cada amostra testada foram utilizados 12 frascos. O teste foi acompanhado de um ensaio branco com o solvente (DMSO) e de controle positivo utilizando o padrão de lapachol.

A contagem das larvas mortas e vivas foi realizada após 24h de incubação com o auxílio de uma lupa. Por se tratar de um crustáceo ativo em água salina, a morte do microcrustáceo é evidenciada pela sedimentação ou falta de movimento do mesmo.

Os resultados dos testes foram analisados em um programa de análise estatística de dados (PROBITOS) a 95% de confiança para a obtenção de suas respectivas CL₅₀. A concentração letal (CL₅₀) foi estimada a partir da regressão linear obtida da correlação entre a percentagem de indivíduos mortos e a concentração do extrato ou do óleo essencial.

4.13.3 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME

Para a avaliação da atividade antimicrobiana foram utilizadas as técnicas de difusão em meio sólido baseada na técnica do poço, disco difusão e a microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM. Os micro-organismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 15300), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* ATCC (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Os testes foram realizados no Laboratório de Microbiologia do INPA e no Laboratório de Produção e Pesquisa do Instituto Federal de Ciência e Tecnologia do Amazonas - IFAM.

4.13.3.1 DIFUSÃO EM MEIO SÓLIDO BASEADO NA TÉCNICA DO POÇO

O ensaio foi realizado com as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* ATCC (ATCC 25922) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Inicialmente o inóculo foi preparado com solução de cloreto de sódio a 0,8% e sua turbidez comparada com a escala 0,5 de McFarland, que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC (Unidades Formadoras de Colônias). Em seguida, foi acrescentado ao meio sólido Muller-Hinton, sendo fundido à temperatura de aproximadamente 50 °C e vertido em placas de Petri.

Após a solidificação em Ágar, foram feitos os orifícios de 4,0 mm de diâmetro cada, para acréscimo de 15 µL de extrato solubilizado em DMSO (20 mg/mL), como controle

positivo foi utilizada a amoxicilina (1 mg/mL) para as bactérias e o itraconazol (1 mg/mL) para a levedura e o branco (DMSO).

A presença de halo de inibição após 24 horas foi um indicativo da ação antimicrobiana das amostras testadas.

4.13.3.2 DISCO DIFUSÃO E MICRODILUIÇÃO EM CALDO

As cepas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 15300) e *Candida albicans* (ATCC 10231), cedidas pelo INCQS/FIOCRUZ – Rio de Janeiro, foram reativadas a partir do estoque em caldo de infusão cérebro coração (BHI, Merck) e incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas em estufa bacteriológica, previamente à realização dos ensaios de difusão em ágar e de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) por técnica de microdiluição utilizando placas de 96 poços. Os inóculos foram aferidos por contagem em câmara de Neubauer, assegurando uma concentração de 10^7 células/mL de cada cepa microbiana. As amostras foram diluídas em dimetil sulfóxido (DMSO), na concentração de 20 mg/mL.

Por técnica de disco-difusão, 50µL do inóculo de cada cepa foram depositados separadamente na superfície de ágar Mueller-Hinton estéril em placas de Petri. Em seguida, discos de filtro medindo 6 mm de diâmetro foram embebidos em cada amostra/DMSO e depositados com pinça estéril sobre o ágar, em triplicata. Todas as placas foram incubadas a 35 ± 2 °C em estufa bacteriológica por 24 h. Os resultados foram avaliados quanto ao diâmetro total dos halos inibitórios medidos com régua milimetrada e para cada amostra foi calculada a média.

Para a determinação da CIM por técnica de microdiluição em placas de 96 poços, todos os poços foram preenchidos com 100 µL de caldo BHI estéril e, posteriormente, foram

adicionados 100 µL de cada amostra (20 mg/mL) nos poços correspondentes à primeira coluna, linhas A-F. Como controle positivo foi utilizada solução de digluconato de clorexidina (0,12%) (linha G) e como controle negativo, água destilada estéril (linha H). Em seguida, a diluição em série foi realizada com a transferência de 100 µL entre todas as colunas de poços subsequentes. Por fim, foi adicionada uma alíquota de 100 µL do inóculo em cada poço. Cada micro-organismo foi inoculado em microplacas isoladamente e todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo de laminar.

A incubação foi realizada em estufa bacteriológica a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 21 h. A resazurina (fenoxazin-3-ona) 0,1 mg/mL, um corante indicador de óxido-redução, foi empregada para avaliar a atividade metabólica microbiana, sendo adicionada (10 µL) a cada poço e incubada por mais 3 horas antes da leitura e registro fotográfico dos resultados. A manutenção da coloração azul da resazurina indicou a ausência do crescimento microbiano (resultado positivo) e o desenvolvimento de coloração rosa, foi interpretado como presença de células viáveis em crescimento (resultado negativo). A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento microbiano, ou seja, o último poço da microplaca a manter o corante inalterado. Todos os testes foram efetuados em triplicata e a média das CIM de cada amostra foi calculada.

Seguindo o mesmo procedimento descrito para a microdiluição, uma segunda bateria de microplacas foi preparada para avaliar a atividade antibiofilme (CIMB). Porém, foi utilizado o caldo tripton de soja com adição de dextrose (TSB+1% dextrose) e a incubação se deu por 18h. O conteúdo de cada poço foi então aspirado e lavado cuidadosamente com água destilada estéril (3 x) para preservar as células microbianas aderidas. Para fixar o biofilme e aumentar a absorção subsequente do corante, as placas foram tratadas em estufa de secagem por 60 minutos a 60°C . Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de cristal

violeta (0,06%) a cada poço. O corante foi removido após 5 minutos com solução de etanol (10%), seguido por água destilada estéril e secagem em estufa por 5 a 10 minutos.

A leitura da CIMB foi realizada por método automatizado utilizando filtro de 630nm em leitora de microplacas (ELx800, Biotek). A quantidade de biofilme formado no controle negativo foi considerada como 100% e serviu para o cálculo do percentual de biofilme formado em todos os demais poços, em presença das amostras. Todos os testes foram realizados no mínimo em triplicata, sendo calculados a média e desvio padrão, e a significância da diferença entre esses valores, sendo que a média foi calculada pelo Teste T.

4.13.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Dentre as diversas metodologias utilizadas para realização de ensaios *in vitro* com a finalidade de avaliar a ação antileishmania de produtos advindos de plantas se destacou na literatura consultada o ensaio com difeniltetrazolium brometo. Esse teste baseia-se na medida do dano induzido por uma droga no metabolismo celular de glicídeos usualmente por meio da atividade de desidrogenases. A atividade celular é quantificada pela redução do brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT) (MACIEL et al., 2002).

As reações com o teste citado são usadas para localizar a atividade de desidrogenases presentes em células viáveis. O sal de tetrazólio não reage diretamente com as desidrogenases, mas com os produtos da reação nicotinamida-adenina-dinucleotídeo (reduzido) - NADH ou nicotinamidaadenina-dinucleotídeo-fosfato (reduzido) - NADPH que reduzem o MTT para a formazana correspondente. A quantificação da inibição enzimática é realizada espectrofotometricamente permitindo a obtenção dos valores de IC₅₀ - concentração das drogas que inibem 50% da atividade enzimática (MACIEL et al., 2002).

Para a realização do teste antileishmania foram utilizadas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8), cuja cultura original foi cedida pelo Dr. Francisco Juarez Ramalho-Pinto, da Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo.

As amostras foram testadas nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 µg/ml diluídas em DMSO.

4.13.4.1 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. amazonensis* DOS EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAS DE *C. rotundus*

Para avaliar a viabilidade das promastigotas na presença dos produtos de *Cyperus rotundus*, inicialmente, promastigotas de *L. amazonensis* em início de fase estacionária de crescimento foram lavadas duas vezes por centrifugação a 1000 xg por 10 min em PBS estéril. Após a lavagem, os parasitas foram distribuídos em placas de 96 poços contendo meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% e incubados por 72h a 24°C com diferentes concentrações diluídas em DMSO (100, 50, 25 e 12,5 g/ml). Após esse período, 10µl de uma solução de 5 µg/mL de MTT foi adicionado a cada poço e as placas incubadas por 4h a 24 °C. O controle para determinar a morte dos parasitas foi a Pentamidina (100 µg/ml) e as culturas contendo o controle do solvente foram incubadas com DMSO na maior concentração (1%).

O grau de redução de MTT para formazan foi quantificado pela medida de densidade óptica em espectrofotômetro a 540nm. O IC₅₀ foi calculado por meio da análise de regressão linear das amostras em triplicata.

4.14 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA DOS TUBÉRCULOS DE *C. rotundus*

Os fungos endofíticos constituem um vasto grupo de organismos produtores de metabólitos secundários com potencial para serem empregados na medicina como antitumorais, antiparasitários, imunossuppressores dentre outros, devido à sua capacidade metabólica de produzir uma grande diversidade de micromoléculas bioativas (STROBEL & DAISY, 2003; GUO et al., 2008). Portanto, o conhecimento da microbiota fungica de espécies vegetais tem sido alvo de muitos estudos em busca de compostos bioativos que possam ser empregados na medicina, na indústria e como inseticidas naturais.

Dessa forma, a investigação da microbiota fungica dos tubérculos de *C. rotundus* foi investigada a fim de isolar e identificar os fungos presentes nesta parte da planta.

4.14.1 DESINFECÇÃO SUPERFICIAL DAS AMOSTRAS

Para o isolamento dos fungos endofíticos o material vegetal passou por uma desinfecção visando retirar da superfície externa dos tubérculos os micro-organismos epifíticos. Para o processo de assepsia, o material vegetal foi cortado em fragmentos de 5 cm e posteriormente parafinados nas extremidades a fim de evitar que os agentes de desinfecção penetrassem nas aberturas das estruturas do vegetal, alterando-os. A desinfecção superficial foi feita por meio de lavagens por imersão. Primeiramente, duas vezes em água destilada esterilizada durante 30 segundos, seguida de solução de álcool etílico a 70% durante 1 minuto, após por solução de hipoclorito de sódio a 3% por quatro minutos, novamente em solução de álcool etílico a 70% durante 30 segundos e, posteriormente enxaguadas três vezes em água destilada esterilizada por um minuto (PIMENTEL, 2006). Como controle negativo foi coletado 50µl da última água utilizada na assepsia das amostras, sendo essa também

plaqueada; os que apresentaram crescimento de colônias foram descartados, evidenciando falhas no processo de assepsia superficial das amostras (MAGALHÃES et al., 2008).

4.14.2 INOCULAÇÃO, ISOLAMENTO E CONSERVAÇÃO DOS FUNGOS ENDOFITICOS

Os fragmentos dos tubérculos desinfectados foram novamente seccionados em pedaços de 1 cm e inoculados 5 fragmentos por técnica de *spread plate* em placas de Petri contendo meio de cultivo BDA (infuso em 200 g de batata; dextrose 20 g; ágar 15 g; solução de amoxilina, 350 mg/L; água destilada q.s.p., 1000 mL) e incubados à temperatura de 28 ± 2 °C, durante 7 dias. Após esse período, as colônias fúngicas que se apresentavam distintas umas das outras, de acordo com observações macroscópicas (coloração, características de crescimento em meio de cultura) foram isolados pela transferência dos micélios ou conídios para tubos de ensaio com meio BDA inclinado, para identificação ao nível de gênero (PIMENTEL, 2006).

Os fungos endofíticos foram identificados pela Dra. Lucilene da Silva Paes do Departamento de Biologia do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia – IFAM, onde foram inseridos na micoteca do Instituto Federal.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO (%) DO ÓLEO ESSENCIAL

O rendimento do óleo essencial obtido nas diferentes épocas do ano da espécie foi de 0,42% em janeiro/12 (chuvosa), 0,53% em abril/12 (chuvosa), 0,69% em julho/12 (seca) e 0,58% em outubro/12 (seca) (Gráfico 1). Outros estudos mostram variações de rendimento para o óleo essencial de *C. rotundus* na ordem de 0,2-0,9%, (KILANI et al., 2008; OLADIPUPO & ADEBOLA, 2009), a variação do nível de constituintes no óleo essencial pode estar sendo influenciada pelas condições de cultivo e desenvolvimento (tipo de solo e clima), colheita e pós-colheita de processamento (hora do dia e estação do ano), bem como, pelas diferentes épocas de coletas sobre os teores (GOBBO & NETO, 2007).

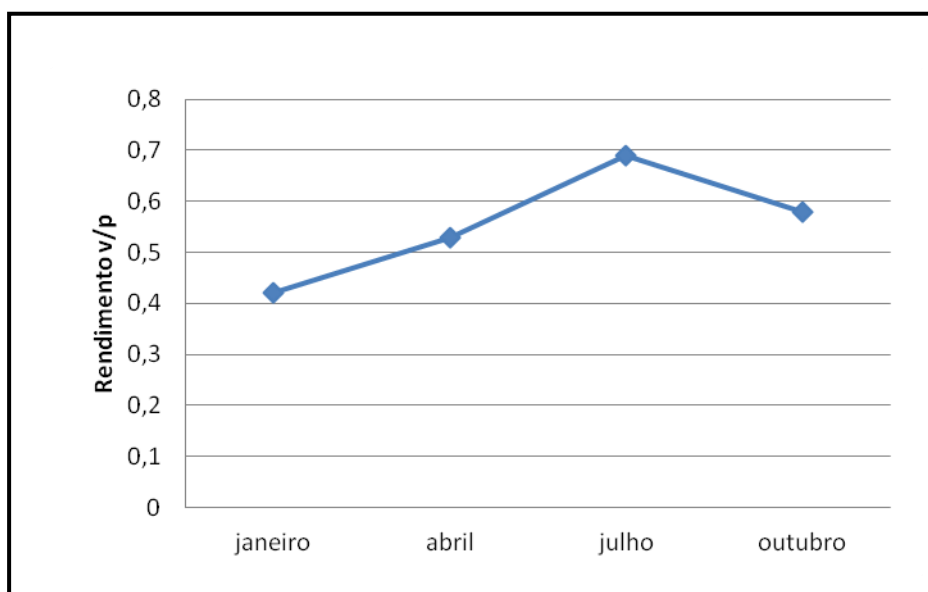
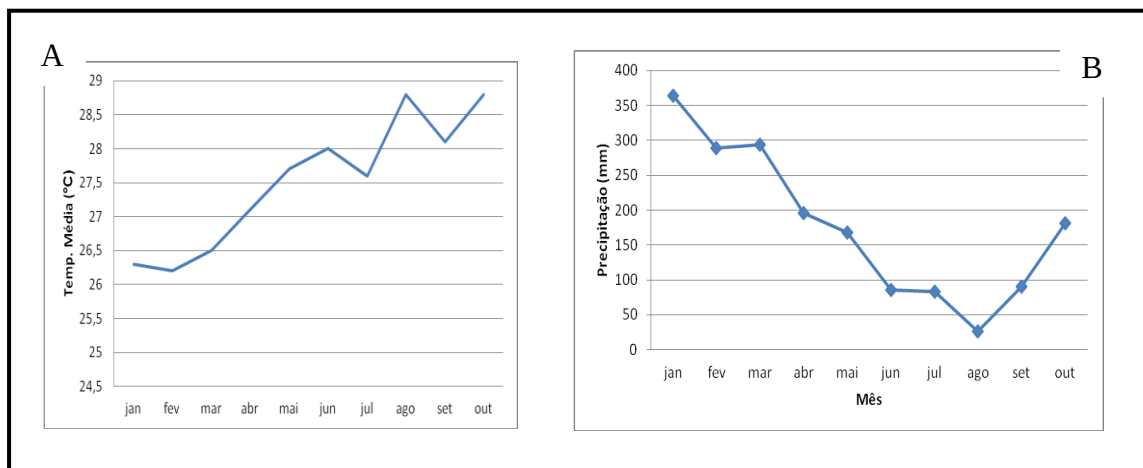


Gráfico 1 - Rendimento do óleo essencial dos tubérculos de *C. rotundus* coletados em diferentes épocas do ano

Durante o período experimental, a temperatura média no período de janeiro a abril foi de 26,5 °C, e a do período de julho a outubro de 28,3 °C.

A precipitação pluviométrica foi muito variável, atingindo picos de até 364,2 mm, em janeiro, seguida por valores mínimos de 26,6 mm, em agosto, acumulando um total de 1776,5 mm durante todo o experimento. As variações climáticas estão dispostas no Gráfico 2.



Fonte: INMET

Gráfico 2 - Temperatura média (A) e Precipitação (B).

No mês de janeiro/12, obtiveram-se os menores teores do óleo essencial. O período de menor incremento no conteúdo do óleo essencial coincidiu com o período de menor temperatura mensal e de alta precipitação pluviométrica. O período de maior incremento no conteúdo do óleo essencial coincidiu com o início do aumento na temperatura média mensal e com um momento de baixa precipitação pluviométrica. Os resultados sugerem que a variação no rendimento pode estar relacionada com as variações climáticas ao longo do período coletado, sendo o conteúdo de óleo inversamente proporcional ao aumento do índice pluviométrico e diretamente proporcional ao aumento da temperatura.

A época da coleta e a temperatura são fatores que podem afetar diretamente na composição química dos óleos essenciais, visto que durante o ano os constituintes ativos não são constantes e o rendimento dos óleos em geral, aumenta em temperaturas mais elevadas, embora em dias muito quentes ocorram perdas excessivas destes metabólitos (GOBBO & NETO, 2007). Segundo Taiz e Zeiger (1991), o aumento da temperatura e da intensidade luminosa durante a estação de seca pode atuar diretamente em processos primários, como

fotossíntese e respiração, e influenciar indiretamente a produção de metabólitos secundários, cuja síntese depende de produtos do metabolismo primário.

Lopes et al., (1997), estudando os efeitos da evolução dos ciclos circadianos e sazonais na composição dos constituintes do óleo essencial de *Virola surinamensis* verificaram variação na composição relativa dos componentes, embora o rendimento do óleo tenha se mantido constante (0,5%) nas diferentes estações do ano.

5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. rotundus*

Os óleos essenciais foram analisados por CG/EM e CG/DIC. Um total de 30 constituintes, representando 85,38% – 96,66% da composição total do óleo foram identificados. Os cromatogramas de íons totais da amostra coletada no mês de janeiro/12 a outubro/12 estão expressos nas Figuras 11, 12, 13 e 14 e a identificação dos constituintes voláteis identificados, bem como, suas concentrações relativas assinalados na Tabela 3.

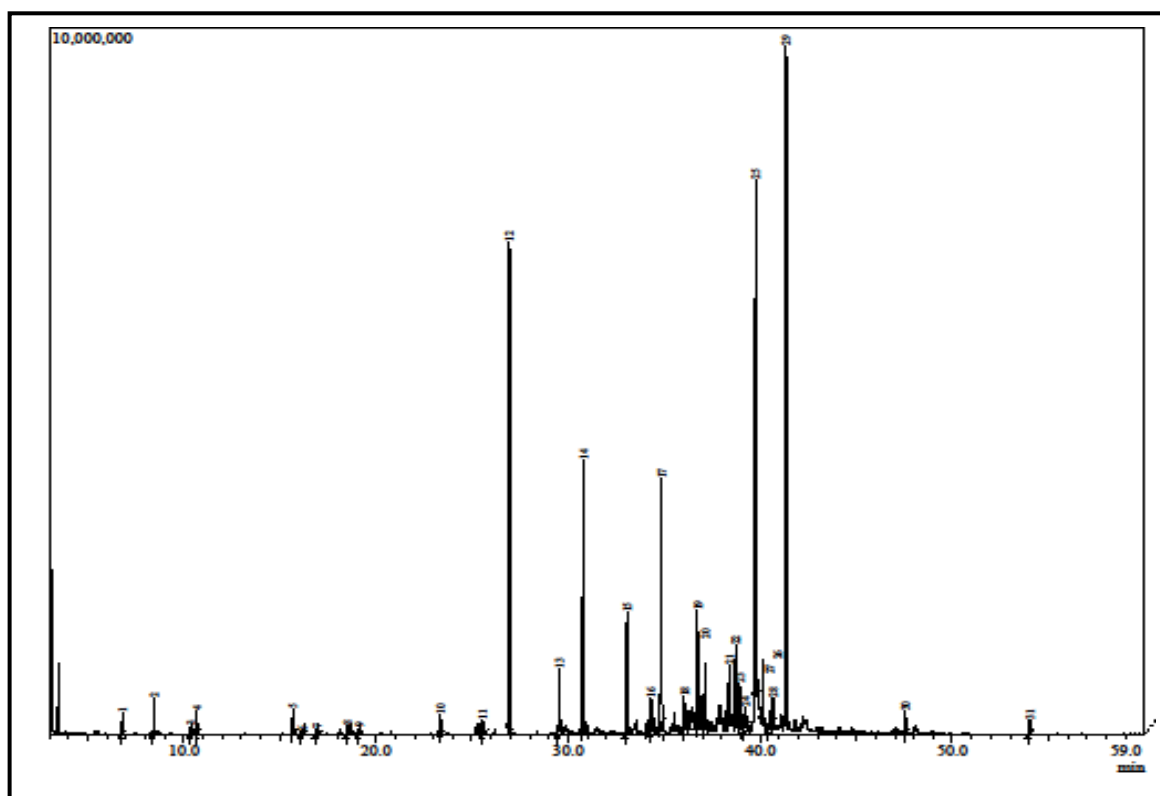


Figura 11 - Cromatograma de Íons Totais (CIT) do óleo essencial de *C. rotundus* (amostra coletada em janeiro/12)

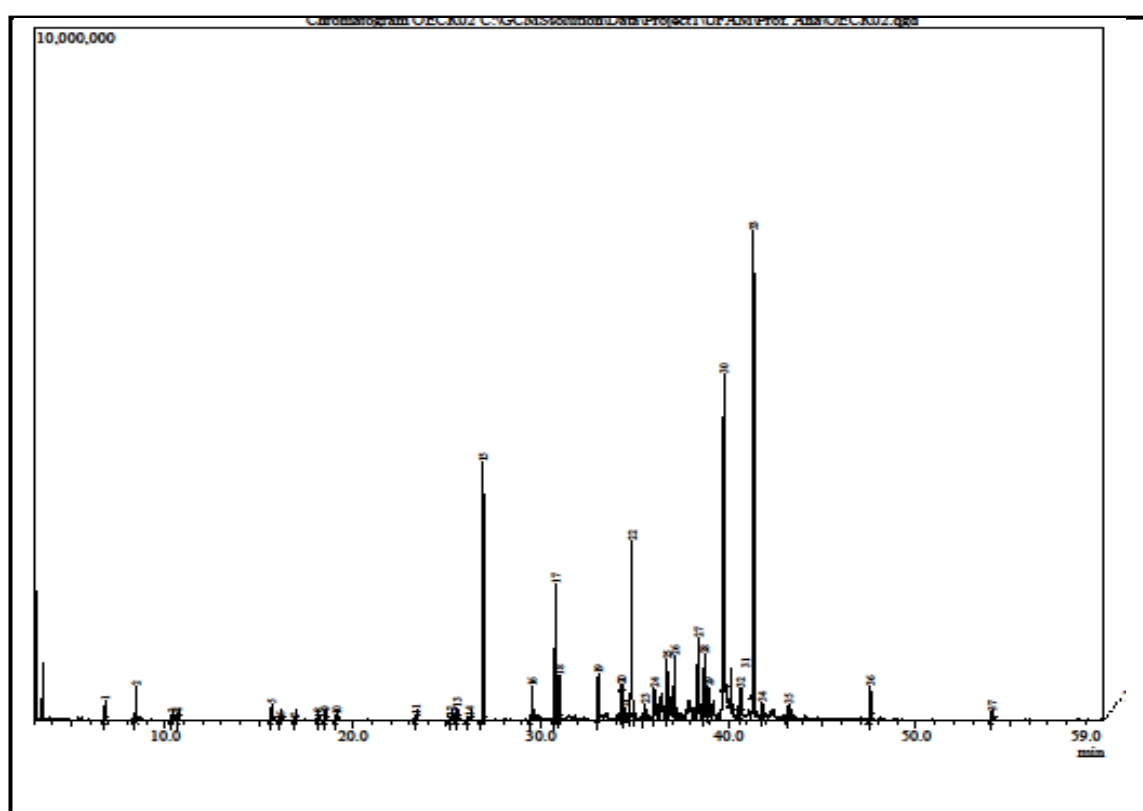


Figura 12 - Cromatograma de Íons Totais (CIT) do óleo essencial de *C. rotundus* (amostra coletada em abril/12)

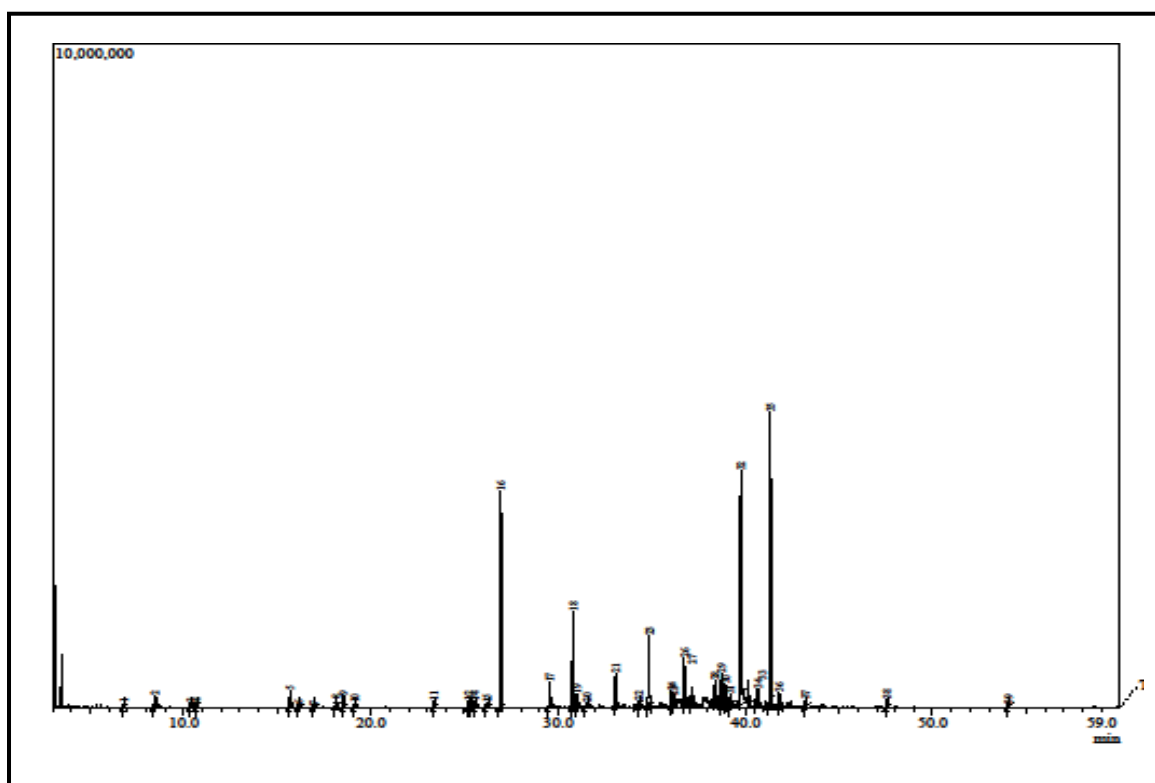


Figura 13 - Cromatograma dos Íons Totais (CIT) do óleo essencial de *C. rotundus* (amostra coletada em julho/12)

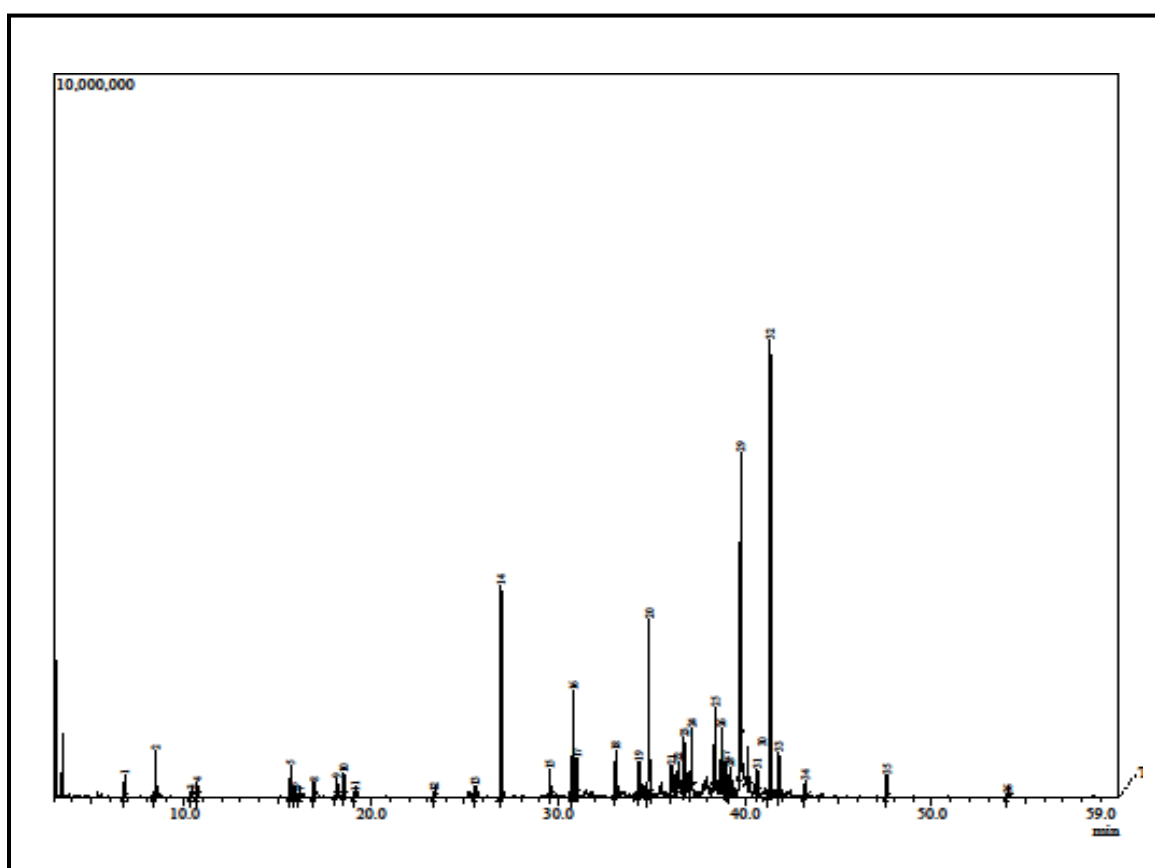


Figura 14 - Cromatograma dos Íons Totais (CIT) do óleo essencial de *C. rotundus* (amostra coletada em outubro/12)

Tabela 3 - Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *C. rotundus*

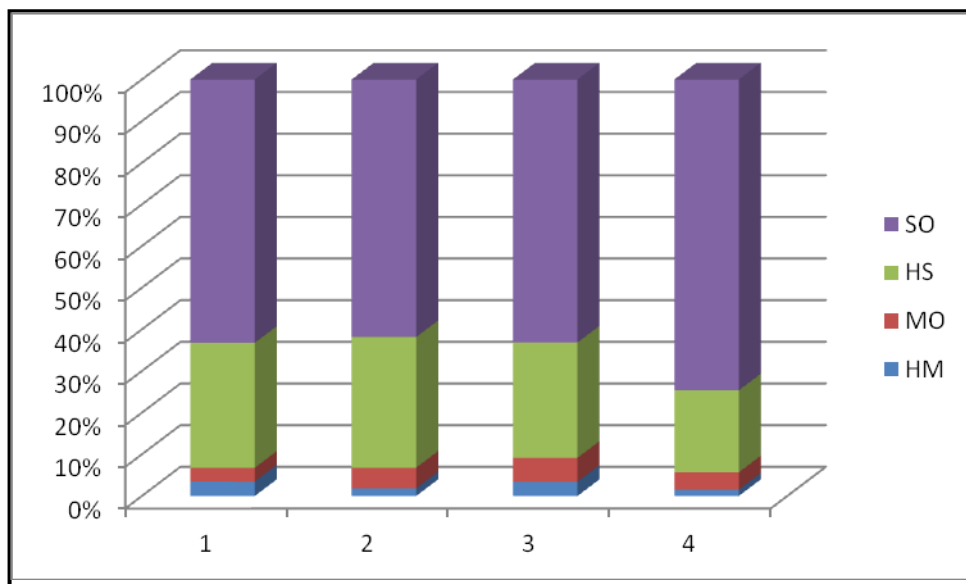
Constituintes	IK ¹	IK ²	Porcentagem relativa (%)			
			Jan/12	Abr/12	Jul/12	Out/12
α -pineno	939	932	1,02	0,44	0,67	-
β -pineno	979	975	2,07	1,07	1,20	1,47
<i>o</i> -cimeno	1026	1021	0,15	0,23	0,13	-
1,8 – cineol	1031	1028	0,29	0,19	0,52	0,48
<i>trans</i> -pinocarveol	1139	1135	1,00	1,52	1,03	1,21
nopinona	1140	1141	0,19	0,13	-	-
pinocarvona	1164	1158	0,15	0,09	0,61	-
mirtenol	1195	1186	0,11	0,30	1,54	0,62
mirtenal	1195	1192	0,92	1,90	0,39	1,71
verbenona	1205	1204	0,38	0,50	-	-
α -copaeno	1376	1375	0,60	0,54	0,56	-
β -elemeno	1390	1391	0,17	0,38	-	-
cipereno	1398	1399	15,61	18,62	12,38	10,64
rotundeno	1459	1460	1,86	1,90	1,68	1,25
β-selineno	1490	1487	7,32	7,34	6,88	5,79
α -selineno	1498	1496	2,28	0,68	2,68	1,36
italiceno éter	1537	1529	2,30	2,40	2,68	2,98
óxido de cariofileno	1583	1582	7,47	4,68	6,63	6,25
< <i>cis</i> -dihidro>maurono	1595	1594	0,74	-	2,7	-
epóxido de humuleno	1608	1608	2,17	2,11	2,18	2,58
<2- <i>epi</i> - α >cedren-3 – ono	1627	1619	2,32	3,49	2,89	3,61
<3- <i>iso</i> >thujopsanono	1642	1636	3,35	1,55	2,22	2,28
gimnomitrol	1670	1667	-	0,54	-	-
muskatona	1677	1679	-	0,42	-	3,80
khusinol	1680	1678	0,41	1,00	-	-
germacra-4(15), 5, 10, (14)-trien-1- α -ol	1686	1681	0,67	1,12	-	-
ciperotundona	1695	1696	13,78	17,55	18,15	24,72
longifolol	1714	1705	1,51	1,62	-	2,18
α-ciperona	1758	1750	23,41	21,15	20,34	23,73
α -vetivona	1843	1846	0,51	0,45	-	-
Hidrocarbonetos monoterpênicos			3,24	1,74	3,00	1,47
Monoterpenos oxigenados			3,04	4,63	5,00	4,02
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			27,84	29,46	24,18	19,04
Sesquiterpenos oxigenados			58,64	58,08	55,11	72,13
Total identificado			92,76	93,91	85,38	96,66

¹ Índice de Kovats em coluna DB-5 relativo a série de n-alcenos (Adams, 2009).

² Índice de Kovats em coluna RTX-5MS relativo a série de n-alcenos (C₇ a C₃₀).

Nas amostras analisadas há predominância dos sesquiterpenos oxigenados (55,11 a 72,13%) e dos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (19,04 a 29,46%), sendo que não foi observada variação qualitativa no teor do óleo essencial ao longo das estações, embora tenham sido observadas variações nas concentrações relativas dos fitoconstituintes. Os componentes majoritários identificados foram β -selineno (5,79 à 7,34%), óxido de cariofileno

(4,68 à 7,47%), cipereno (10,64 à 18,62%), ciperotundona (13,78 à 24,72%) e α -ciperona (20,34 à 23,73%). A variação da proporção relativa dos hidrocarbonetos monoterpênicos, monoterpênos oxigenados, sesquiterpenos e sesquiterpenos oxigenados, detectados nas amostras estão dispostas no Gráfico 3.

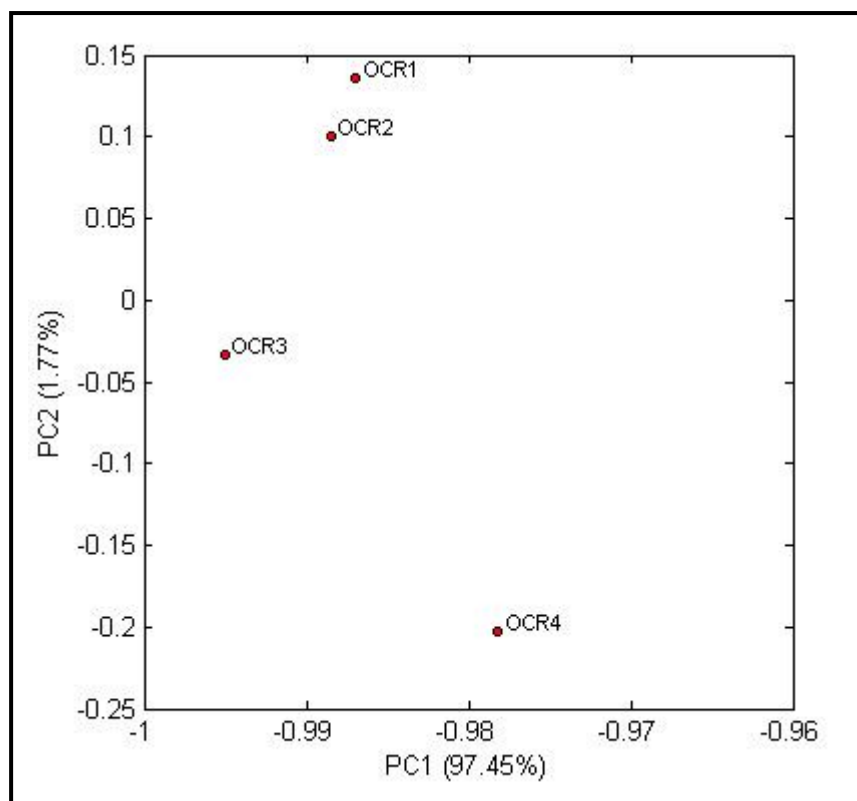


HM – hidrocarbonetos monoterpênicos; **MO** – monoterpênos oxigenados; **SH** – sesquiterpenos hidrogenados; **SO** – sesquiterpenos oxigenados.

Gráfico 3 - Variação da proporção relativa das diferentes classes de compostos do óleo essencial de *C. rotundus*

5.2.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados químicos pela técnica de PCA permitiu agrupar as amostras em 2 (dois) grupos de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças (Figura 15).



OCR1 – amostra de janeiro/12; OCR2 – amostra de abril/12; OCR3 – amostra de julho/12;
OCR4 – amostra de outubro/12

Figura 15 - PCA para as análises cromatográficas do óleo essencial de *C. rotundus*

Observa-se que as amostra OCR1 e OCR2 apresentam similaridade, ou seja, há concordância entre essas amostras e maior dependência em relação às suas massas percentuais. De maneira contrária, pôde-se observar a relativa diferença entre OCR3 e OCR4 em relação a OCR1 e OCR2. Para OCR4, a dispersão é bem mais elevada, visto que se observa um desvio em relação ao comportamento das amostras da vizinhança.

O valor percentual das componentes 97,45% e 1,77% explica a percentagem da variância, quanto maior o fator melhor é a resolução e menor será a perda de informações de dados durante o agrupamento das amostras, tornando os resultados confiáveis.

O dendograma da Figura 16 corrobora com os resultados previamente apresentados por PCA. Fica claro o agrupamento existente entre os grupos formados pelas amostras OCR1 e OCR2. Os resultados demonstram que estatisticamente não existe uma diferença significativa entre as composições dos óleos essenciais obtidos nos meses de janeiro/12 e

abril/12, fato não observado para as amostras dos meses de julho/12 e outubro/12, visto que a distância euclidiana é bem mais acentuada.

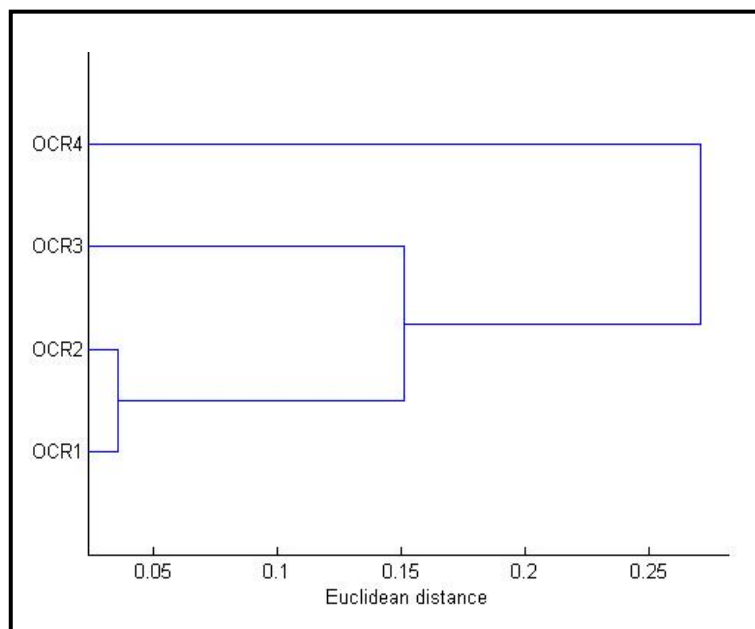


Figura 16 - Dendrograma obtido através do PCA dos compostos químicos presentes no óleo essencial de *C. rotundus*

O gráfico de *loading* atribuiu aos compostos 13 (cipereno), 15 (β -selineno), 18 (óxido de cariofileno) e 29 (α -ciperona) a contribuição na diferenciação do óleo essencial coletado ao longo do ano. A maioria dos compostos está próximo ao zero, o que significa que não estão envolvidos na diferenciação dos óleos essenciais.

Os compostos 13 (cipereno), 15 (β -selineno), 18 (óxido de cariofileno) e 29 (α -ciperona) estão deslocados positivamente no PC2 (Figura 17) e, portanto, colaboram de forma moderada na diferenciação dos óleos essenciais. Os compostos 24 (muskatono) e 27 (ciperotundona) estão deslocados negativamente no PC1 e não contribuem de forma efetiva na diferenciação dos óleos essenciais.

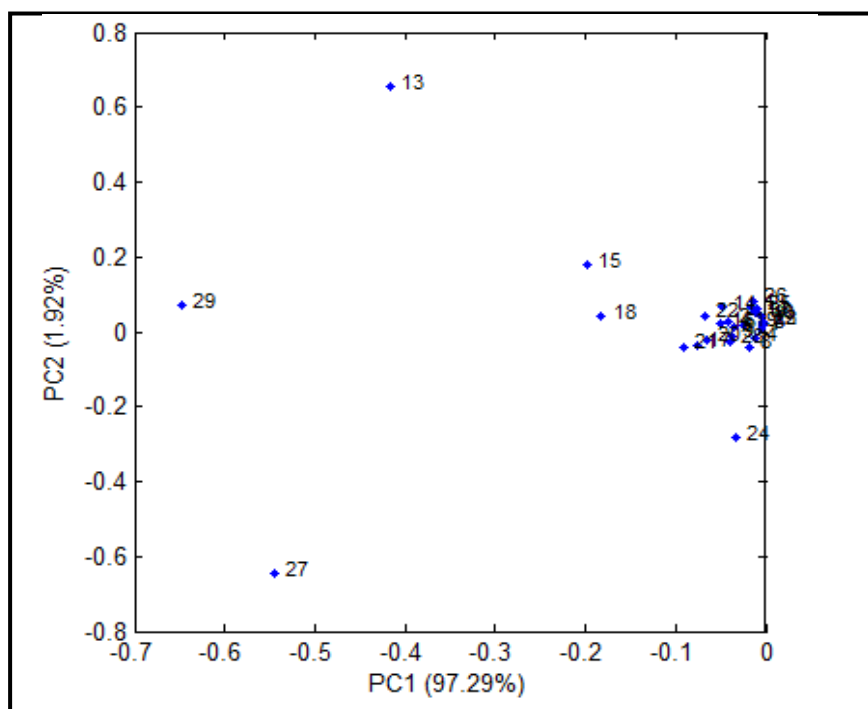


Figura 17 - Loading do óleo essencial de *C. rotundus*

A variação no teor de cipereno e α -ciperona nos meses de junho e outubro é relatada na literatura. Segundo Kilani et al., (2008), o teor de cipereno é mais elevado no mês de junho enquanto que o teor da α -ciperona é mais elevado no mês de outubro, tal variação na composição química do óleo essencial pode estar sendo influenciada pelo período da colheita, por fatores climáticos ou de quimiotipos. No presente estudo o cipereno obteve maior teor no mês de abril (18,62%) e da α -ciperona obteve o maior rendimento no mês de outubro (24,72%).

As técnicas de PCA e HCA mostraram ser úteis para diferenciação e agrupamento dos óleos essenciais analisados de *C. rotundus*, em combinação com a CG-EM e CG-FID, para avaliação da sazonalidade. Os espectros de massas dos principais constituintes identificados no óleo essencial de *C. rotundus* estão dispostos nas Figuras 18 a 22.

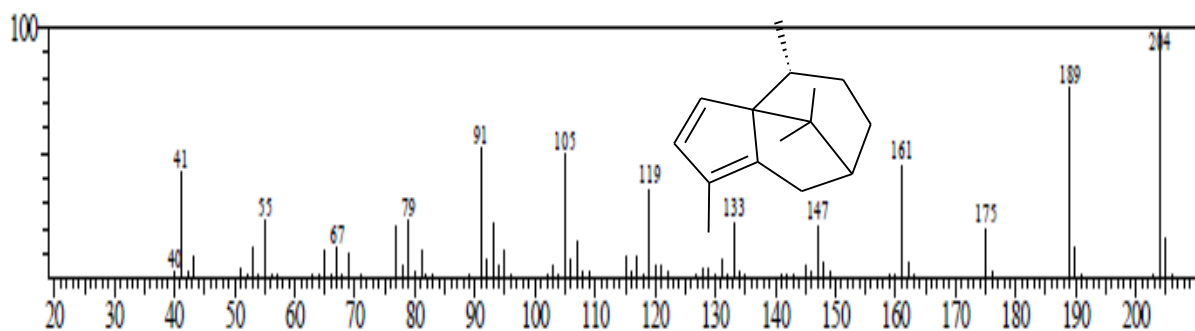


Figura 18 - Espectro de massas do cipereno

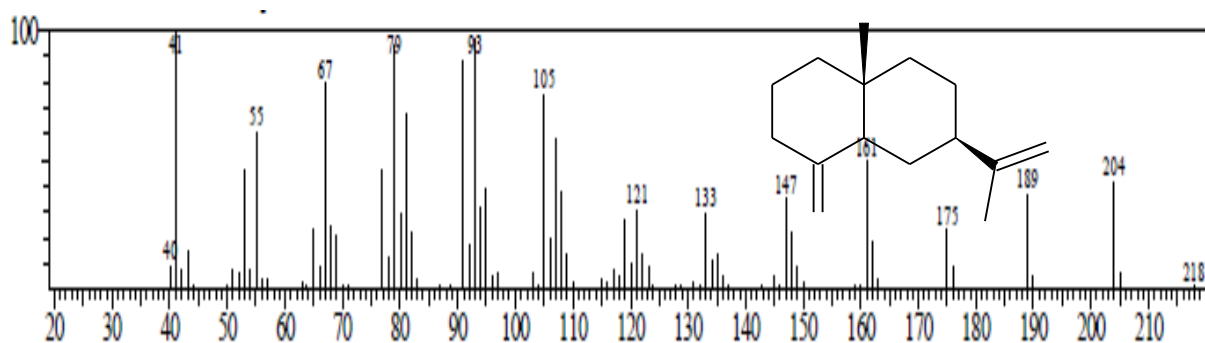


Figura 19 - Espectro de massas do β -selineno

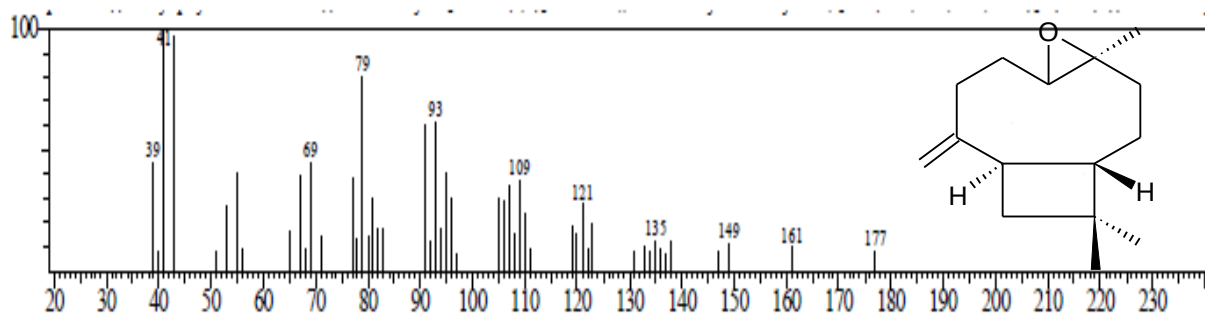


Figura 20 - Espectro de massas do óxido de cariofileno

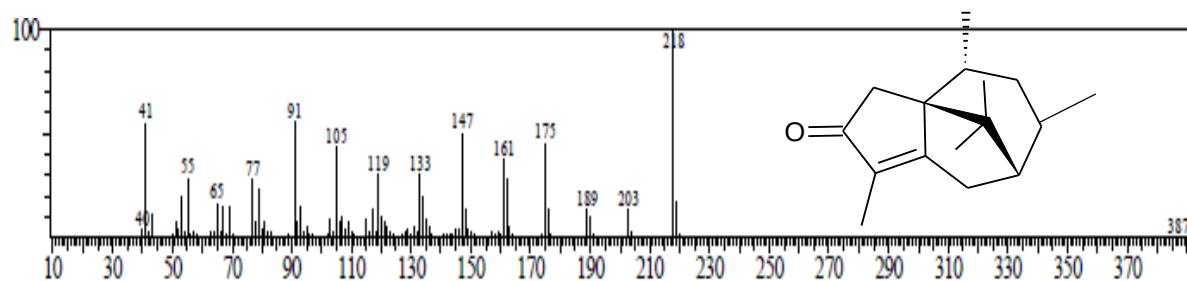


Figura 21 - Espectro de massas do ciperotundona

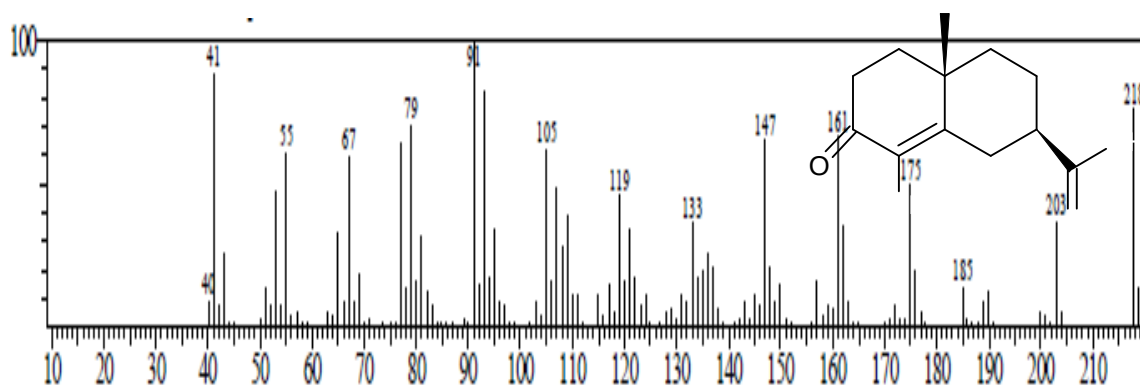


Figura 22 - Espectro de massas da α -cipерona

5.2.2 PCA DOS DIVERSOS ECOTIPOS DE *C. rotundus*

A análise multivariada dos principais componentes identificados nos diversos ecotipos de *C. rotundus* citados na literatura permitiu agrupar as amostras em três grupos de modo a expressar e evidenciar suas semelhanças e diferenças (Figura 23). As componentes explicam 55,64% (PC1) e 21,37% (PC2) da variância.

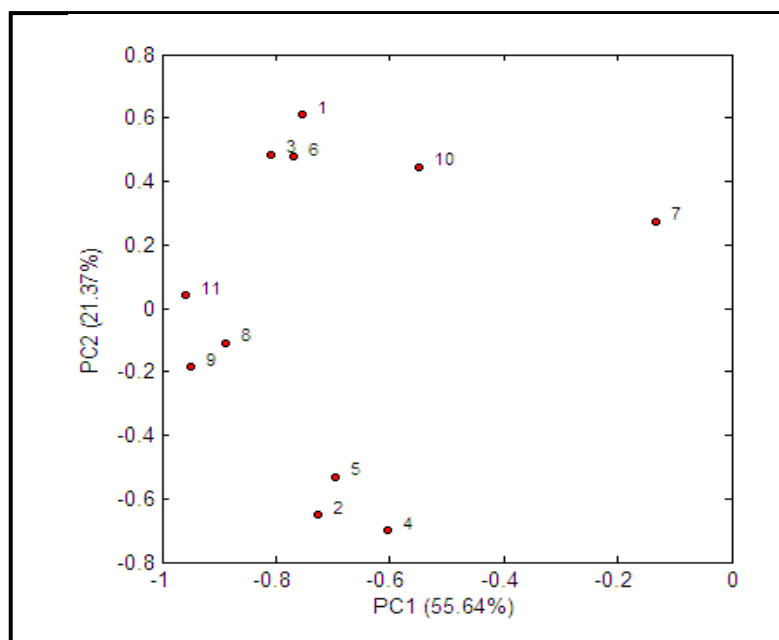


Figura 23 - PCA dos diversos ecotipos de *C. rotundus*

A partir do dendograma (Figura 24) é possível verificar que a espécie do presente estudo está associada aos ecotipos 8 (Nigéria) e 9 (Tunísia), não representando um ecotipo diferente dos que foram reportados na literatura.

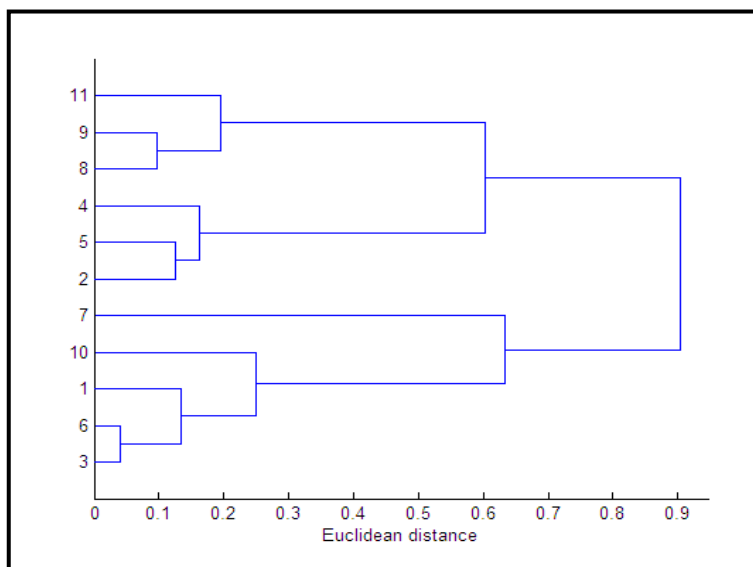


Figura 24 - Dendrograma obtido por meio do PCA dos diversos ecotipos de *C. rotundus*

O gráfico de *loading* (Figura 25) atribuiu aos compostos 5 (β -selineno), 6 (α -ciperona), 11 (ciperotundona) a contribuição na diferenciação dos óleos essenciais extraídos dos diversos ecotipos de *C. rotundus*. Os compostos 5 (β -selineno), 6 (α -ciperona) e 11 (ciperotundona) estão deslocados positivamente no PC2 e podem colaborar de forma moderada na diferenciação dos óleos essenciais. O composto 4 (cipereno) está deslocado negativamente no PC1 e não contribui de forma efetiva na diferenciação dos óleos essenciais

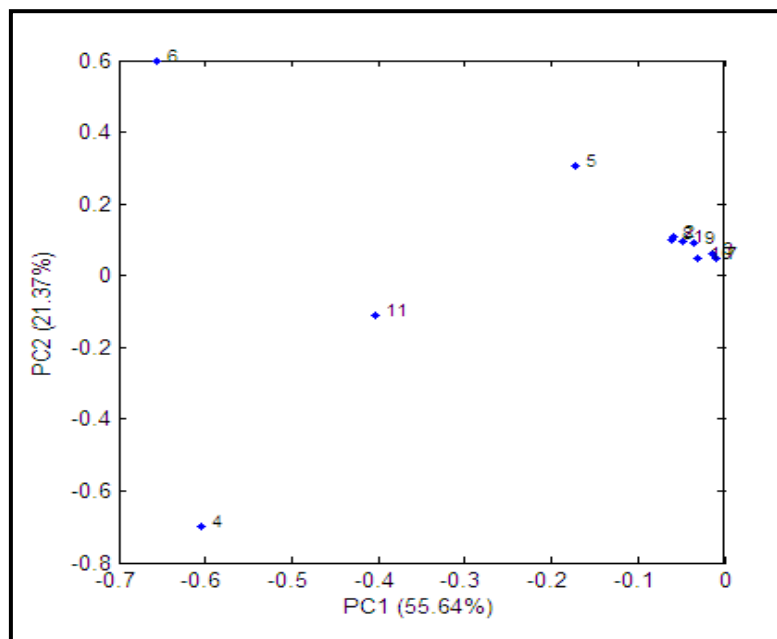


Figura 25 - Loading do óleo essencial de *C. rotundus*

Embora tenha ocorrido variação na concentração relativa dos fitoconstituintes os resultados revelam a não existência de novos quimiotipos, uma vez que a espécie em estudo apresenta forte correlação com as espécies coletadas na Nigéria e Tunísia. Outro fator relevante a ser considerado é que nas amostras analisadas há predominância dos compostos cipereno, β -selineno, óxido de cariofileno, ciperotundona e α -ciperona, podendo ser considerados como marcadores da espécie aclimatada no Amazonas.

5.3 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os extratos de *C. rotundus* obtidos por maceração com solventes orgânicos, após secos foram previamente pesados. Os rendimentos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Rendimento dos extratos de *C. rotundus*

Espécie	Parte da planta	Massa (g)	Rendimento (%)		
			EH	EAC	EM
<i>C. rotundus</i>	Tubérculos	1948	6,0 g (0,31%)	6,9 g (0,35%)	56,0 g (2,87%)
	Inflorescência	122,8	1,2 g (0,97%)	0,4 g (0,3%)	3,8 g (3,1%)

EH – extrato obtido em hexano; EAC – extrato obtido em acetato de etila; EM – extrato obtido em metanol

Os extratos que apresentaram maior rendimento foram o de alta polaridade. Considerando a indicação da literatura da presença de alcaloides na espécie *C. rotundus*, fizemos partição ácido-base do extrato metanólico obtido dos tubérculos (30 g) para obtenção da fração alcaloídica. No entanto, devido a pequena quantidade de amostra obtida 0,39 mg, não foi possível dar continuidade ao estudo desta fração.

5.4 IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DOS CONSTITUINTES DE *C. rotundus*

5.4.1 IDENTIFICAÇÃO DE HF 1.2.2

A fração principal HF1 quando analisada por CG-EM e CG-DIC apresentava como compostos majoritários o ciperotundona e o hexadecanoato de etila, além dos sesquiterpenos oxigenados, conforme Tabela 5, Figura 26.

Tabela 5 - Principais constituintes identificados em HF 1.2.2

Fração	Constituintes	¹ IK	² IK	IS	% área CG-DIC
HCR 1	óxido de cariofileno	1583	1584	95	9,87
	epóxido humuleno	1808	1810	94	3,11
	<2- <i>epi-α</i> >cedren -3 – ono	1627	1621	89	5,25
	ciperotundona	1696	1695	96	27,52
	hexadecanoato de etila	-	1994	92	15,42

¹ Índice de Kovats em coluna DB-5 relativo a série de n-alcanos (Adams, 2009).

² Índice de Kovats em coluna RTX-5MS relativo a série de n-alcanos (C₇ a C₃₀).

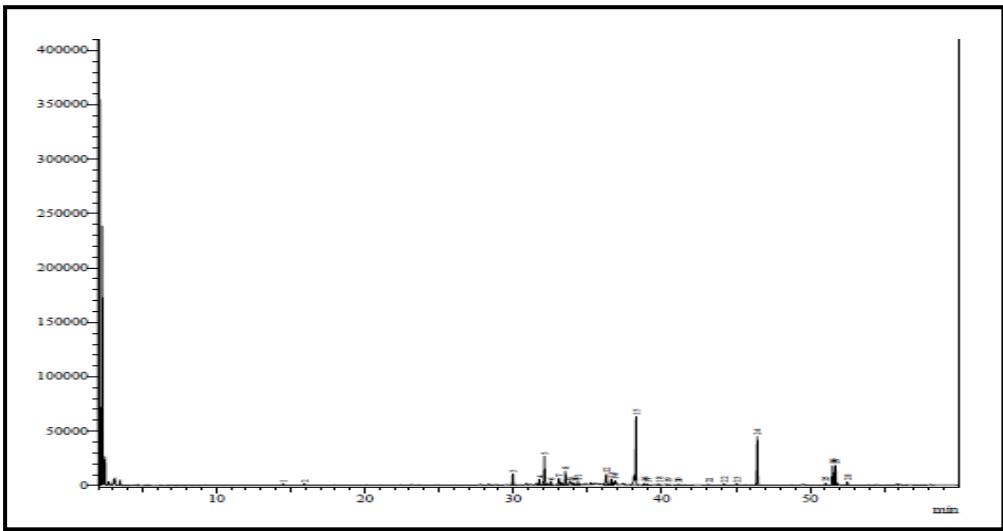


Figura 26 - Cromatograma dos Íons Totais da fração HF1

A fração após ter sido recromatografada forneceu a amostra HF 1.2.2 (154,4 mg), que apresentava-se como cristais brancos e quando revelado com vanilina sulfúrica apresentava coloração azul.

A análise do espectro de RMN de ^1H (Figura 27) permitiu identificar um tripleto em δ 2,29 ($J = 7,6$ Hz), atribuído ao hidrogênio α à carbonila, um quarteto em δ 4,12 ($J = 7,1$ Hz), referente aos hidrogênios metilênicos do grupo etoxila, indicativo da presença do éster derivado de ácido graxo. Os sinais entre δ 1,0-2,0 caracterizaram os demais hidrogênios da cadeia, bem como, dois tripletos em δ 0,89 e 0,88 ($J = 7,1$ Hz), sendo o primeiro atribuído à metila acoplada ao grupo metilênico do éster e o segundo a metila terminal. A partir dos dados obtidos pode-se determinar a presença do éster hexadecanoato de etila.

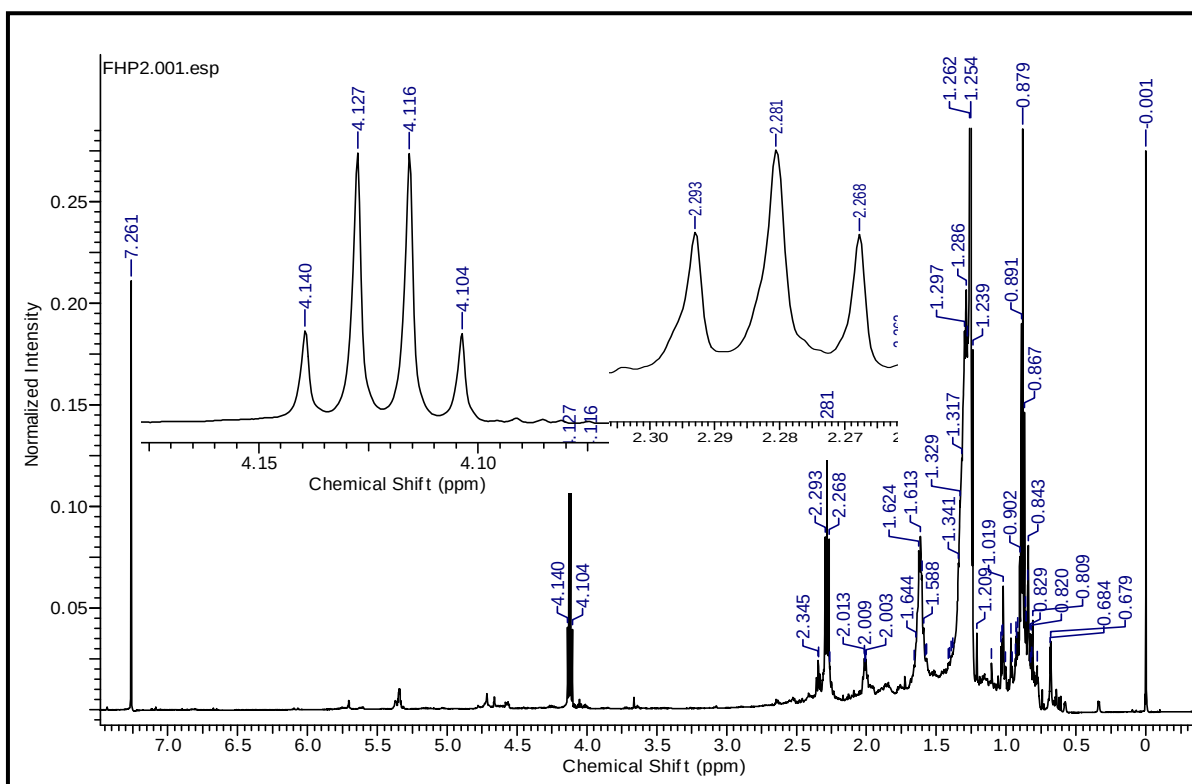


Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H de HF 1.2.2 (CDCl_3 , 400 MHz)

5.4.2. IDENTIFICAÇÃO HF 3.2.1

A amostra codificada como HF 3.2.1 (10 mg) apresentou-se como um sólido branco em forma de agulhas quando recristalizado em Hexano: AcOEt (8:2).

Pela análise preliminar do espectro de RMN de ^1H (Figura 29), observaram-se características de esqueleto esteroidal. No espectro de RMN de ^1H foi possível identificar um duplete largo em δ 5,35, compatível com o hidrogênio olefínico em H-6 e um multiplete centrado em δ 3,52 que é característico de hidrogênio carbinólico. Na região de δ 0,68 a δ 2,32 verificaram-se os sinais referentes aos hidrogênios metílicos e metilênicos, além de sinais de dois duplos dupletos, mutuamente acoplados em δ 5,02 (16,0 e 8,7 Hz, 1H) e em δ 5,16 (16,0 e 8,7 Hz, 1H) confirmando a presença de dupla ligação trans-dissubstituída, atribuídos aos hidrogênios vinílicos H-22 e H-23, sugerindo a presença do estigmasterol na mistura.

No espectro de RMN de ^{13}C foram observados os sinais em δ 140,7 e δ 121,7 característicos dos carbonos olefínicos C-5 e C-6 dos esteroides além de sinais em δ 138,2 δ 129,5 típicos do C-22 e C-23 da cadeia lateral do estigmasterol. O sinal em δ 71,9 referente a um carbono carbinólico foi atribuído ao C-3 de ambos os compostos, enquanto os sinais em δ 33,9, 26,4 e 23,0 correspondem aos carbonos sp^3 C-22 e C-23 e C-28 do β -sitosterol.

Os dados fornecidos pelas análises RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 6), do espectro de massas obtido por CG-EM (Figura 28) e comparações com os dados da literatura, Goad & Goodwin (1966), permitiram concluir que o sólido **HF 3.2.1** trata-se de uma mistura esteroidal de β -sitosterol (HF 3.2.1 A) e estigmasterol (HF 3.2.1 B).

Tabela 6 - Dados de RMN de ^{13}C de HF 3.2.1 A e HF 3.2.1 B

Posição	$^{13}\text{C}(\delta)$	$^{13}\text{C}(\delta)$
	HF 3.2.1 A	HF 3.2.1 B
1	37,3	37,3
2	31,4	31,4
3	71,9	71,9
4	42,3	42,3
5	140,7	140,7
6	121,7	121,7
7	32,1	32,1
8	31,9	31,9
9	50,1	50,1
10	36,5	36,5
11	21,3	21,3
12	39,8	39,7
13	42,3	42,2
14	56,8	56,9
15	56,8	56,9
16	28,4	28,4
17	56,0	55,9
18	11,9	11,9
19	19,4	19,4
20	36,1	36,1
21	18,9	18,8
22	34,2	138,2
23	26,4	129,5
24	46,1	51,2
25	29,4	29,1
26	19,9	19,8
27	19,5	19,1
28	23,3	23,0
29	12,1	12,0

Experimento realizado a 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno

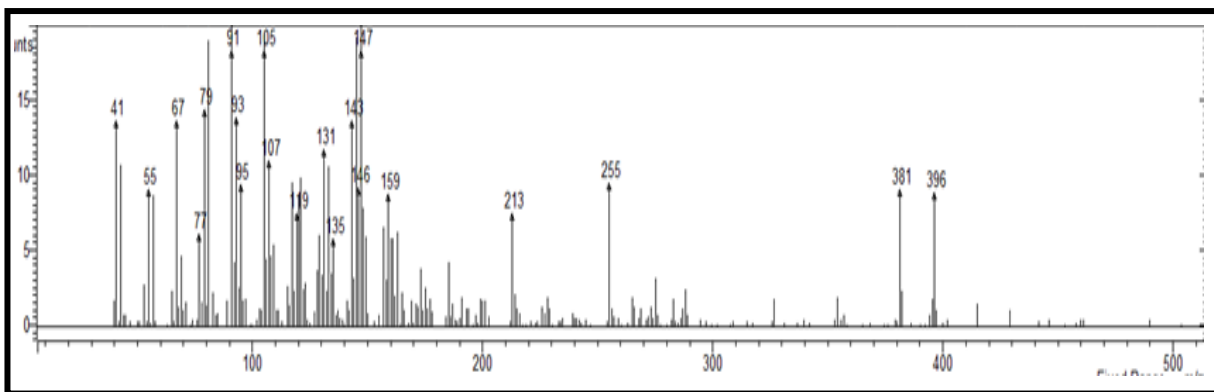


Figura 28 - Espectro de massas da mistura de esteroides

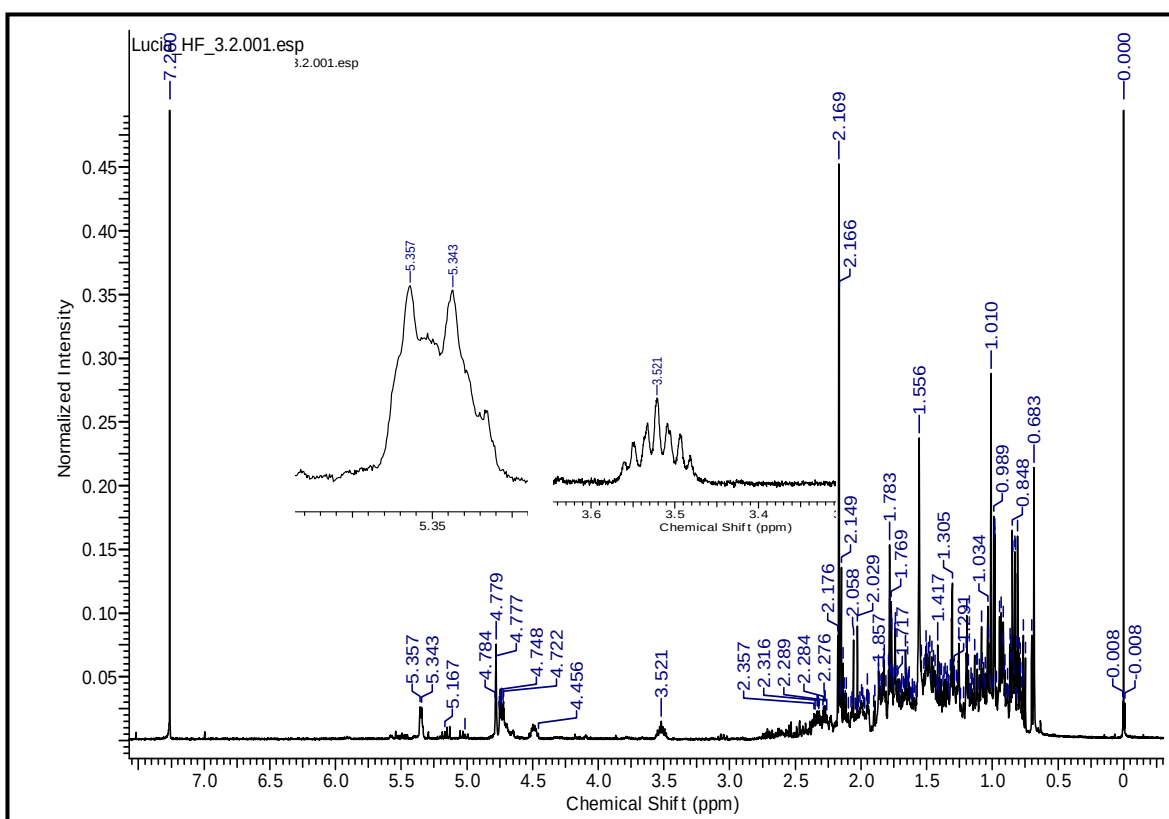


Figura 29 - Espectro de RMN de ¹H de HF 3.2.1 (CDCl₃, 400 MHz)

5.4.3 IDENTIFICAÇÃO DE EAC 1.3

A partir da análise comparativa da amostra EAC 1.3 com a biblioteca Wiley 7.0 do CG-EM foi possível identificar como principais constituintes hidrocarbonetos sesquiterpênicos, conforme Tabela 7, Figura 30.

Tabela 7 - Principais constituintes identificados em EAC 1.3

Amostra	Constituintes	¹ IK	² IK	IS	Principais fragmentos (EM)	% área CG-DIC
EAC 1.3	cipereno	1399	1402	92	204 (100), 189 (90), 175 (30), 161 (60), 147 (30), 133 (30)	47,99
	β-selineno	1490	1488	94	204 (55), 189 (50), 175 (30), 161 (60), 147 (40), 133 (30)	28,02
	α-selineno	1498	1497	91	204 (60), 189 (100), 175 (30), 161 (35), 147 (30), 133 (60)	5,16

¹Índice de Kovats em coluna DB-5 relativo a série de n-alcanos (Adams, 2009).

²Índice de Kovats em coluna RTX-5MS relativo a série de n-alcanos (C₇ a C₃₀).

IS – índice de similaridade

O composto que apresentou maior percentagem por normalização de área simples foi identificado como cipereno (47,99%). O íon do pico molecular $[M]^+ = 204$ confirma a fórmula molecular C₁₅H₂₄. Os picos m/z = 189 [$M^+ - 15$] e m/z=175 [$M^+ - 15 - 14$] referem-se à perda do grupo metila e metileno, respectivamente.

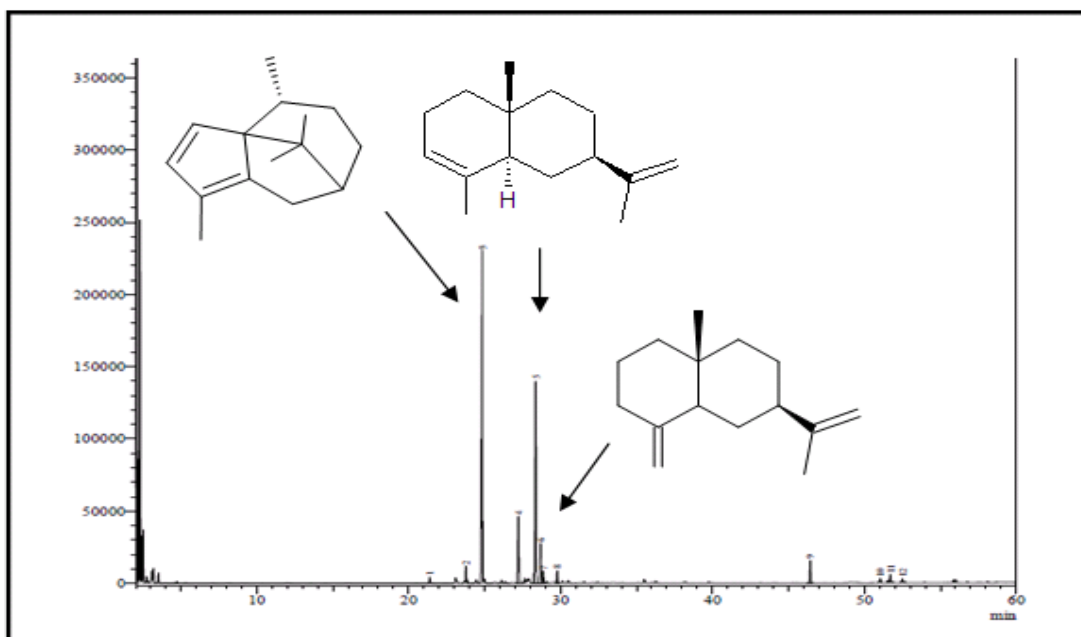


Figura 30 - Cromatograma dos Íons Totais (CIT) de EAC 1.3

5.4.4 IDENTIFICAÇÃO DE EAC 2.3.2

A amostra codificada como EAC 2.3.2 apresentou aspecto oleoso de coloração amarela, quando revelado em CCD com vanilina sulfúrica apresentou coloração rosa.

A análise por CG-EM e CG-DIC da fração principal (EAC 2) indicou uma mistura com predominância de sesquiterpenos oxigenados. O Cromatograma dos Íons Totais da fração inicial apresentou os picos com $t_R = 50,6$ e $t_R = 50,8$ min (Figura 31). A partir dos espectros de massas e em comparação com a espectroteca Wiley 7.0 foi possível identificar a presença dos sesquiterpenos oxigenados ciperotundona e α -ciperona, além de outros compostos. Após a fração EAC 2 ter sido recromatografada, forneceu somente a mistura dos sesquiterpenos oxigenados α -ciperona e ciperotundona.

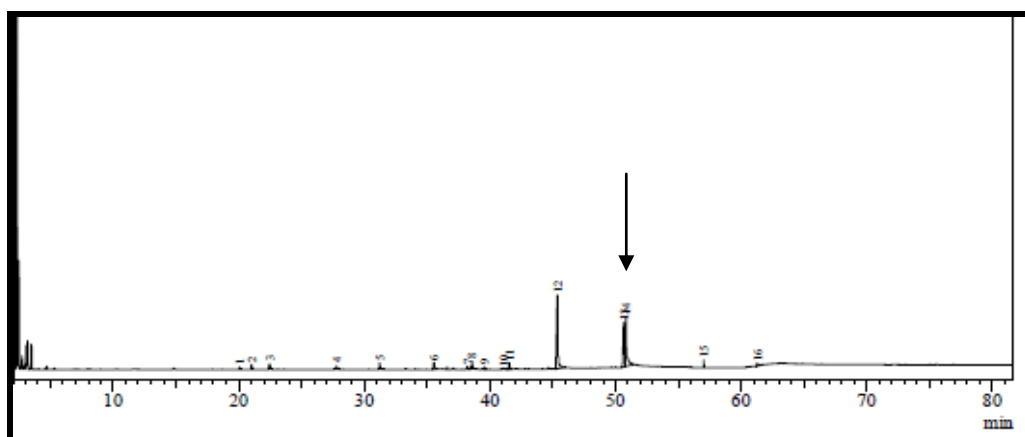


Figura 31- Cromatograma dos Íons Totais da fração EAC2

No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (Figura 32 e 34) foram observados sinais próximos de mesma intensidade, indicando que a amostra se tratava de uma mistura binária. A partir dos dados descritos na literatura, WONG et al. (2013), verificaram-se concordâncias entre os deslocamentos químicos atribuídos a substâncias com os sinais das enonas ciperotundona e α -ciperona (Tabela 8). Os sinais dos carbonos sp^2 C-4 e C-5 da α -ciperona foram observados em δ 128,8 e δ 161,9 e da ciperotundona em δ 133,4 e δ 181,3. O carbono carbonílico da α -ciperona foi observado em δ 198,9 e da ciperotundona em δ 210,6. Os sinais

dos carbonos vinílicos C-11 e C-13 da α -ciperona foram observados em δ 149,0 e δ 109,3, respectivamente.

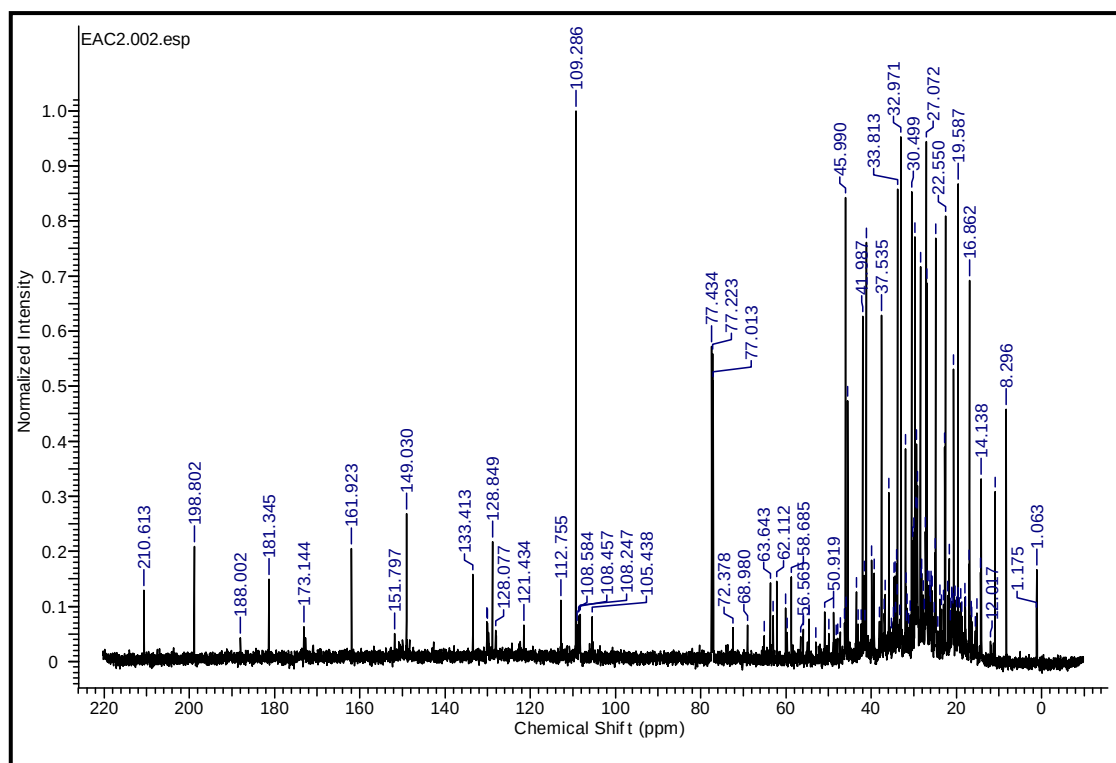


Figura 32 - Espectro de RMN de ^{13}C de EAC 2.3.2 (CDCl₃, 100 MHz)

Tabela 8 - Dados de RMN de ^{13}C de EAC 2.3.2a e EAC 2.3.2b

Posição	EAC 2.3.2 a (δ) ^a α -ciperona	α -ciperona ^b (δ)	EAC 2.3.2 b (δ) ^a ciperotundona	ciperotundona ^b (δ)
1	41,8	41,9	58,6	58,7
2	35,8	35,8	41,1	41,1
3	198,9	199,1	210,6	210,8
4	128,8	128,8	133,4	133,4
5	161,9	162,1	181,3	181,6
6	32,9	32,9	30,5	30,5
7	46,0	45,9	45,3	45,4
8	26,9	26,9	27,0	27,0
9	37,5	37,5	28,4	28,4
10	36,1	33,8	33,8	33,8
11	149,0	149,1	41,6	41,6
12	20,6	20,6	19,7	19,6
13	109,3	109,2	24,9	24,8
14	10,9	10,9	8,3	8,3
15	22,5	22,5	16,8	16,8

^a Experimento a 200 MHz para ^{13}C em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^b WONG et al., 2013 (100 MHz, CDCl₃). (δ) Deslocamentos em ppm.

Os sinais do RMN de ^1H (Figura 33) corroboram com a identificação das enonas. Os sinais dos prótons metílicos C-12, C-14 e C-15 da α -ciperona foram assinalados em δ 1,78, δ 1,77 e δ 1,22 respectivamente. Os prótons metílicos da ciperotundona C-13, C-14 e C-15 foram observados em δ 0,74, δ 1,52 e δ 0,61 (d, $J = 6,5$ Hz), respectivamente. Os sinais dos hidrogênios do grupo metilênico terminal da α -ciperona, referentes aos H-13a e H-13b foram observados em δ 4,77 e δ 4,78. Também foram identificados dois singletos em δ 0,74 e δ 1,11 que são referentes aos hidrogênios das metilas (C-13 e C-12) da cabeça de ponte da ciperotundona, além dos sinais característicos da cadeia terpênica na região de δ 0,8 a δ 1,5 ppm.

No mapa de contornos gHMBC (Figura 35) foi possível correlacionar os prótons vinílicos terminais da α -ciperona em δ 4,77 e δ 4,78 com os carbonos C-7, C-11 e C-12. Os prótons das metilas ligadas à cabeça de ponte da ciperotundona em δ 0,74 foram correlacionados com os carbonos C-1, C-7, C-11, C-12, e os em δ 1,11 com os carbonos C-1, C-7, C-11 e C-13.

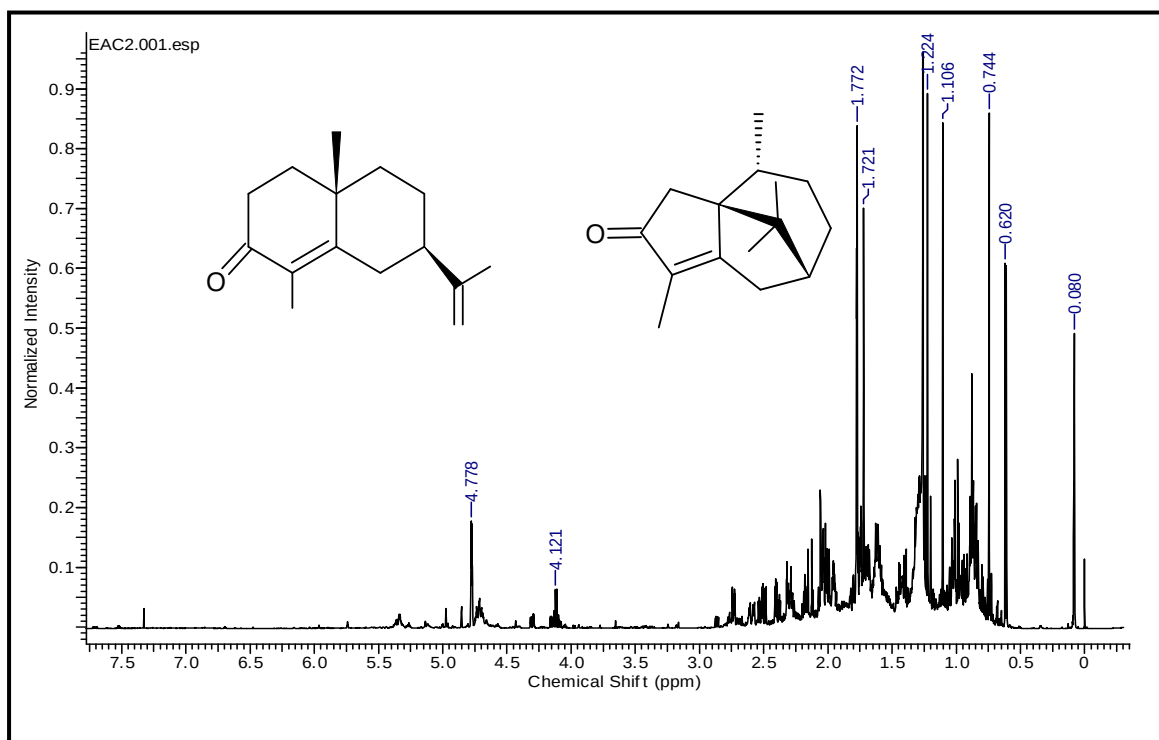


Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H de EAC 2.3.2 (CDCl_3 , 400 MHz)

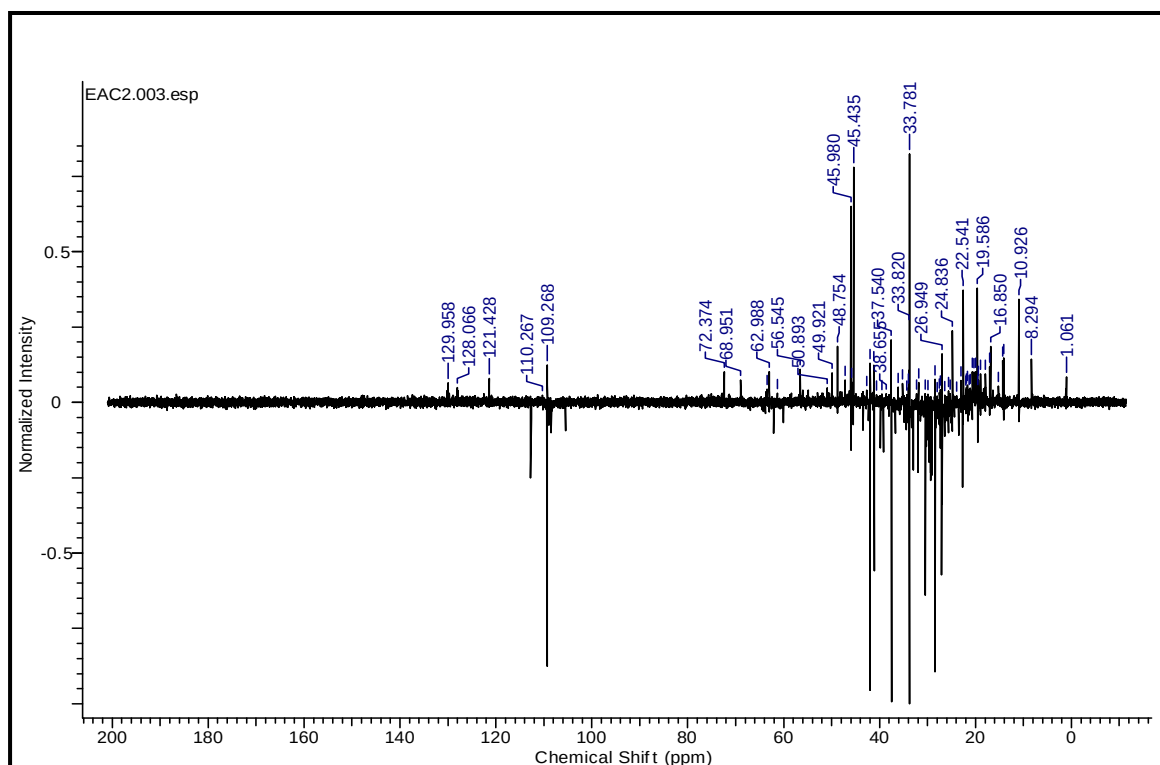


Figura 34 - Espectro de DEPT 135 da amostra EAC 2.3.2 (CDCl_3 , 100 MHz)

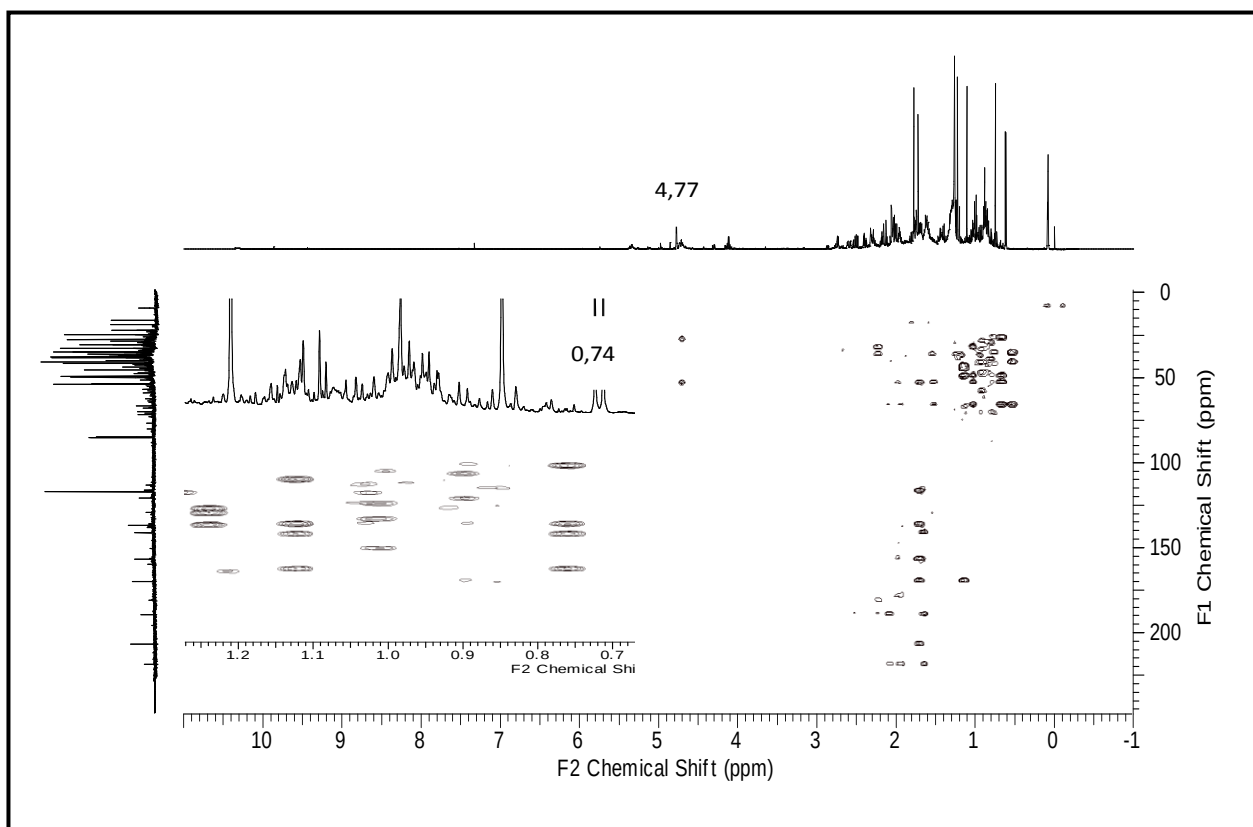


Figura 35 - Mapa de contornos gHMBC de EAC 2.3.2

No presente estudo as enonas foram identificadas como os sesquiterpenos oxigenados mais abundantes no óleo essencial de *C. rotundus*. Na literatura há relatos das cetonas terem sido isoladas do óleo essencial (WONG et al., 2013), sendo que a partir da investigação do extrato diclometânico foi isolada a ciperotundona (YAN XU et al., 2009).

5.4.5 IDENTIFICAÇÃO DE EAC 3.4.4

A amostra codificada como EAC 3.4.4 apresentou aspecto oleoso amarelado, quando revelado em CCD com vanilina sulfúrica apresentou coloração azul. A análise dos espectros de RMN de ^1H (Figura 36) permitiu identificar um par de dubletos entre δ 7,62-7,59 ($J = 15,9$ Hz; 1H) e δ 6,33-6,30 ($J = 15,9$ Hz; 1H), típicos do sistema *trans*-alceno de derivados aromáticos C6-C3. Os sinais em δ 7,16 (d, $J = 1,9$ Hz), δ 7,05 (ddd, $J = 8,2 : 1,9 : 0,4$ Hz) e δ 6,81 (d, $J = 8,2$ Hz) observados foram atribuídos aos hidrogênios H-2, H-6 e H-5, respectivamente. O singlete em δ 3,89 (3H) foi atribuído a metoxila. A ligação do grupo metoxílico ao anel aromático foi estabelecida pela correlação observada entre os sinais em δ 3,89 (OCH_3) e 149,3 (C-3) no mapa de contornos gHMBC (Figura 37). Esses dados sugerem a presença de um anel aromático 1,3,4-trissubstituído, permitindo caracterizar a substância como derivado do ácido hidroxí-cinâmico, conhecido como ácido ferúlico. Os dados referentes a RMN de ^1H e ^{13}C , estão dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EAC 3.4.4

Posição	$^{13}\text{C}(\delta)$	^1H (mult., J em Hz)	gHMBC (^1H - ^{13}C)
1	127,8	-	-
2	111,7	7,16 (d, 1,9Hz)	C-3, C-4, C-6, C7
3	149,3	-	-
4	150,4	-	-
5	116,5	6,81 (d, 8,2 Hz)	C-1, C-3, C-4
6	123,9	7,05 (ddd, 8,2:1,9: 0,4 Hz)	C-2, C-4, C-7
7	146,8	7,59 (d, 15,9 Hz)	C-2, C-6, C-9
8	116,0	6,30 (d, 15,9 Hz)	C-1, C-7, C-9
9	171,0	-	-
(OCH_3)	56,4	3,89 (s)	C-3

Experimento realizado a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. (δ) Deslocamentos em ppm.

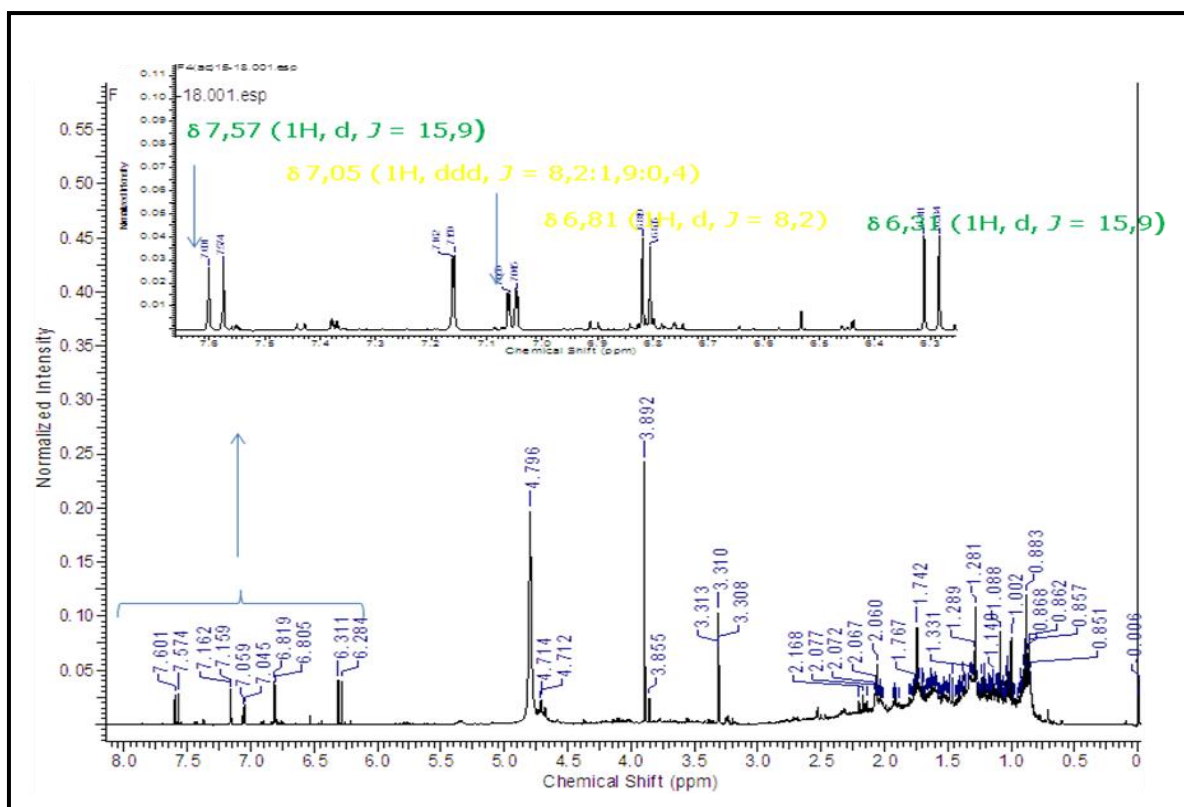


Figura 36 - Espectro de RMN de ^1H de EAC 3.4.4 (CDCl_3 , 400 MHz)

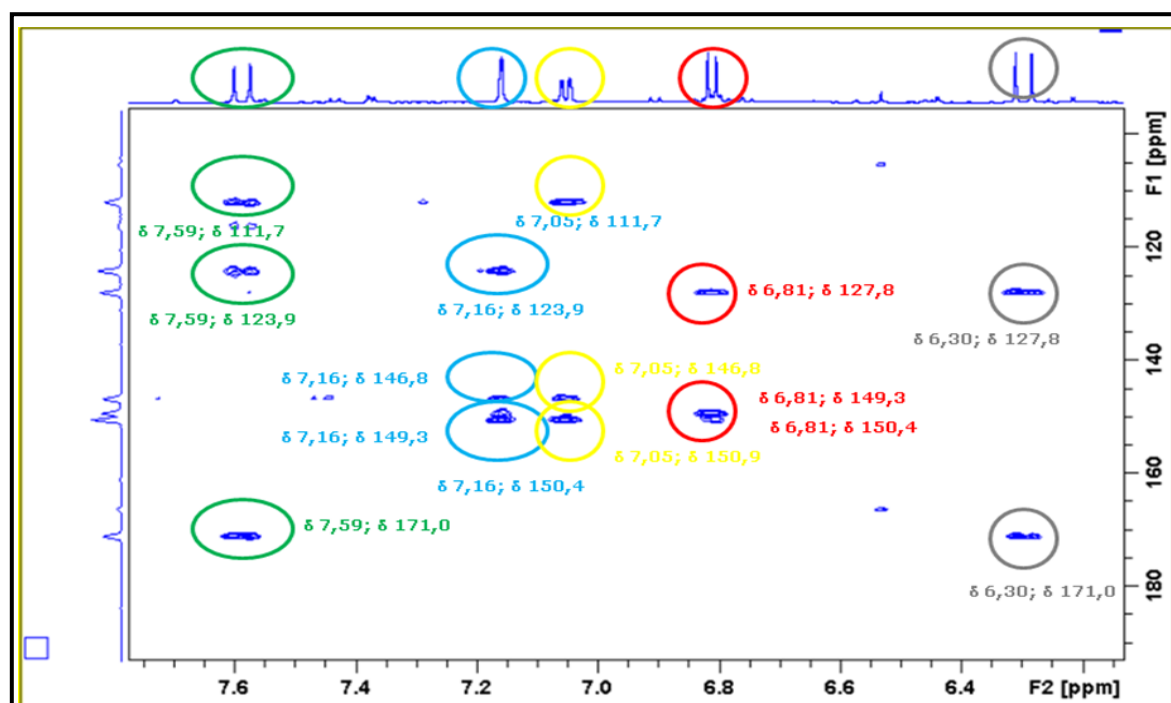


Figura 37 - Mapa de contornos gHMBC região aromática ampliada de EAC 3.4.4

O ácido ferulico pertence a classe dos fenilpropanóides é considerado como potente agente antioxidante, sendo atribuído a esse ácido ação fotoprotetora que inibe a formação de eritema provocado pela exposição da pele aos raios ultravioleta B (UVB) (SAIJA, et al., 2000).

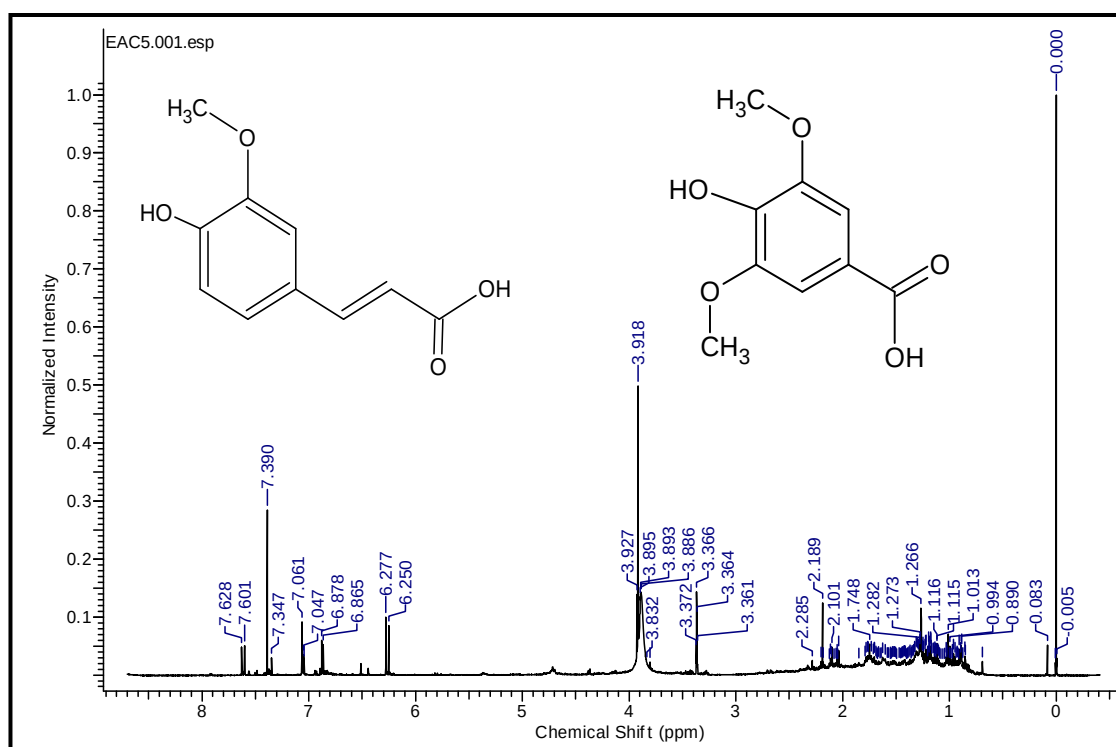
5.4.6 IDENTIFICAÇÃO DE EAC 5.1.4

A amostra codificada como EAC 5.1.4 apresentou aspecto oleoso amarelado, quando revelado em CCD com vanilina sulfúrica apresentou coloração azul. O espectro de RMN de ^1H (Figura 38) apresentava características da substância descrita anteriormente (EAC 3.4.4), onde o sistema *trans*-alceno típico de derivados aromáticos C6-C3 foi identificado pelo par de dubletos em δ 7,62 ($J = 15,9$ Hz; 1H) e δ 6,26 ($J = 15,9$ Hz; 1H). Os sinais em δ 7,05 (d, $J = 1,9$ Hz), δ 7,06 (dd, $J = 8,7; 1,9$ Hz) e δ 6,88 (d, $J = 8,7$ Hz) observados foram atribuídos aos hidrogênios H-2, H-6 e H-5, respectivamente. O singlete em δ 3,92 (3H) foi atribuído a metoxila. O carbono carbinólico da substância 1 (ácido ferúlico) foi identificado em δ 148,6 (C-4) e da substância 2 em δ 139,8 (C-4). No mapa de contornos gHMBC a ligação do grupo metoxílico ao anel aromático foi estabelecida pela correlação observada entre os sinais em δ 3,92 (OCH_3) e 147,7 (C-3). Na região aromática foi possível identificar ainda um singlete em δ 7,35 (1H) e uma metoxila em δ 3,93 que apresentava correlação com o carbono δ 147,1 no mapa de contornos gHMBC, sugerindo que a amostra era uma mistura binária. Os dados referentes a RMN de ^1H e ^{13}C , estão dispostos na Tabela 10.

Tabela 10 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EAC 5.1.4

Posição	$^{13}\text{C}(\delta)$	^1H (mult.) substância 1	gHMBC (^1H - ^{13}C)	$^{13}\text{C}(\delta)$	^1H (mult.) substância 2	gHMBC (^1H - ^{13}C)
1	126,9	-	-	121,1	-	-
2	110,2	7,05 (d, 1,9 Hz)	C-3, C-4, C-6	107,2	7,35 (s)	C-1, C-2, C-3, C-4, C-7
3	147,7	-	-	147,1	-	-
4	148,6	-	-	139,8	-	-
5	115,3	6,88 (d, 8,7 Hz)	C-1, C-3	147,1	-	-
6	123,3	7,06 (dd, 8,7 : 1,9 Hz)	C-2, C-4, C-7	107,2	7,35 (s)	C-1, C-2, C-3, C-4, C-7
7	146,0	7,62 (d, 15,9 Hz)	C-2, C-6, C-9	168,9	-	-
8	115,3	6,26 (d, 15,9 Hz)	C-1, C-9	-	-	-
9	169,7	-	-	-	-	-
(OCH ₃)	56,1	3,92 (s)	C-3	-	-	-
(OCH ₃)	-	-	C-3, C-5	56,5	3,93 (s)	C-3, C-5

Experimento realizado a 200 MHz para ^1H e ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno.

Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H de EAC 5.1.4 (CDCl_3 , 200 MHz)

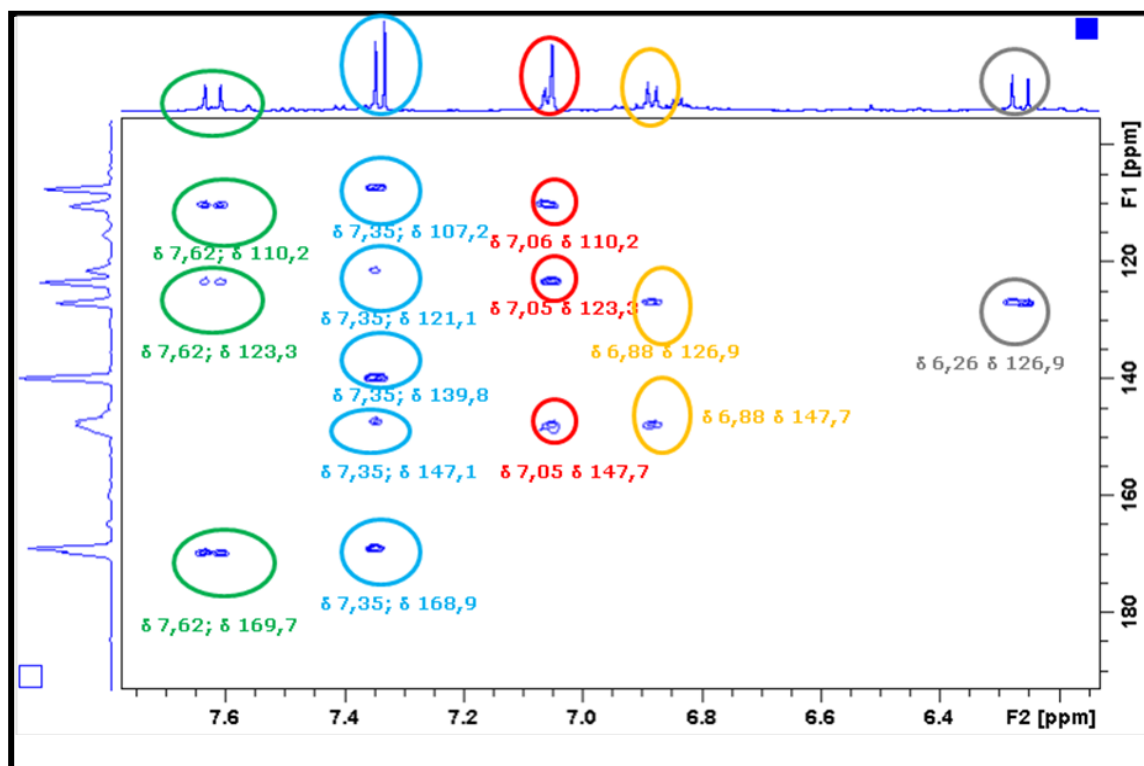


Figura 39 - Mapa de contornos gHMBC da região aromática de EAC 5.1.4

A partir dos dados referentes a RMN de 1D e 2D foi possível caracterizar a mistura binária constituída de um derivado do ácido hidroxi-cinâmico, ácido ferúlico, e um derivado do ácido benzoico, ácido-4-hidroxi-3,5-dimetóxi-benzeno.

5.4.7 IDENTIFICAÇÃO DE EMP1

A amostra codificada como EMP1 apresentou-se como um pó branco. O espectro de massas operando com fonte de eletrospray (ESI), no modo positivo registrou o pico de m/z 205,178 $[M+H]^+$, com intensidade máxima de 100% (Figura 40). A análise do espectro de massas evidenciou a molécula cationizada com sódio de m/z 205,08 $[M+Na]^+$, sugerindo a fórmula molecular $C_6H_{14}O_6$.

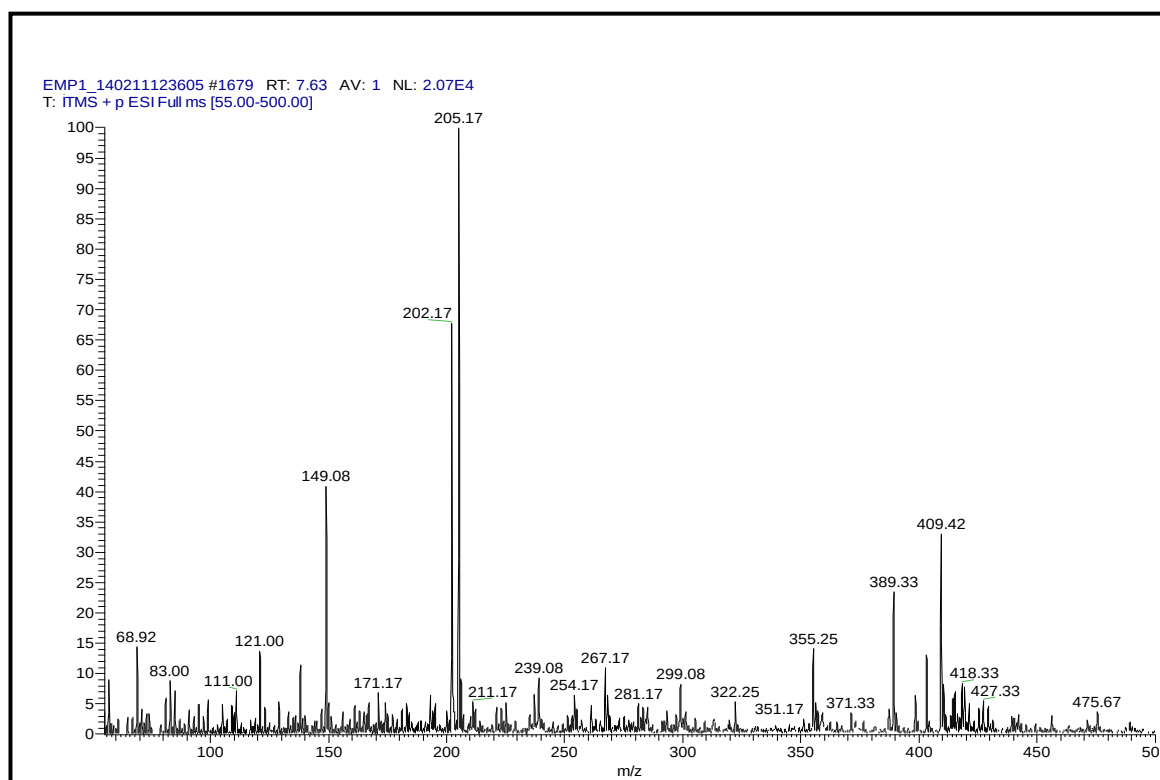


Figura 40 - Espectro de massas de primeira ordem, em modo full-scan da substância EMP1

O espectro de RMN de 1H (Figura 41) apresentou 4 sinais referentes a 6 hidrogênios carbinólicos, sendo dois duplos dubletos em δ 3,66 ($J = 11,6 : 6,1$ Hz) e δ 3,84 ($J = 11,6 : 3,0$ Hz), um duplo duplo dubleto em δ 3,73 ($J = 8,4 : 6,1 : 3,0$) e um dubleto em δ 3,78 ($J = 8,4$ Hz).

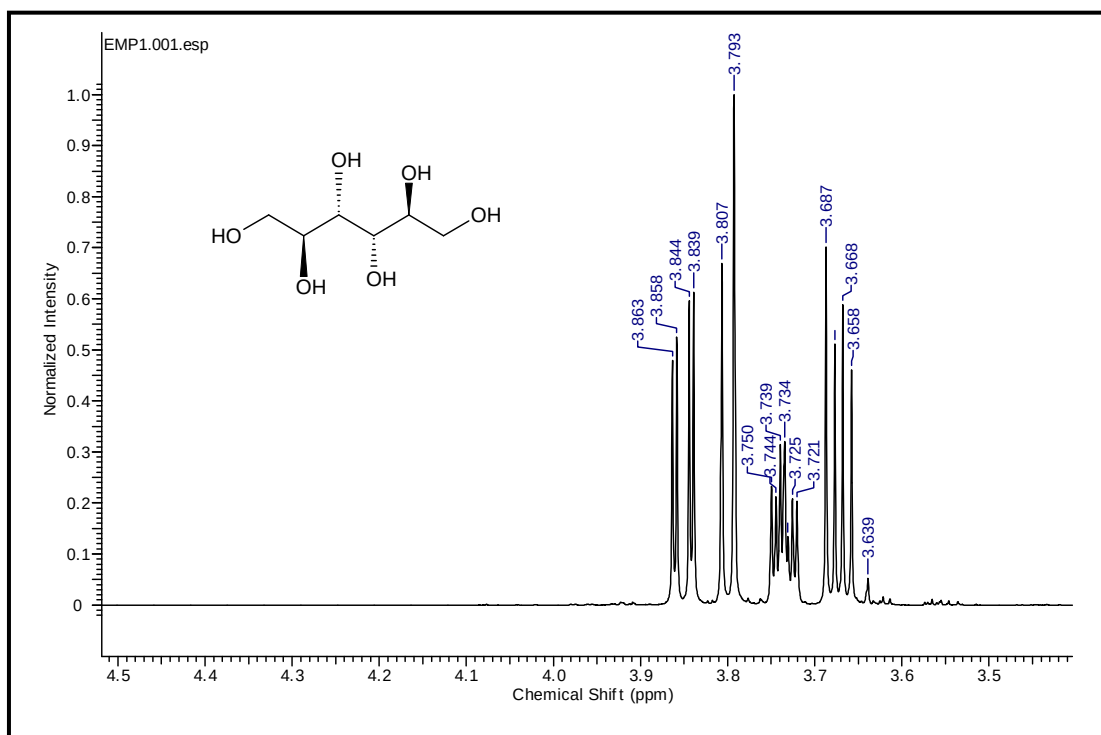


Figura 41 - Região ampliada do espectro de RMN de ^1H de EMP1 (CDCl_3 , 400 MHz)

No espectro do DEPT 135 (Figura 42) observou-se três carbonos carbinólicos em δ 74,0 (CH), δ 72,4 (CH) e 66,3 (CH_2) referentes aos seis carbonos presentes na molécula. A existência de apenas três sinais de carbonos é justificada pela simetria da molécula.

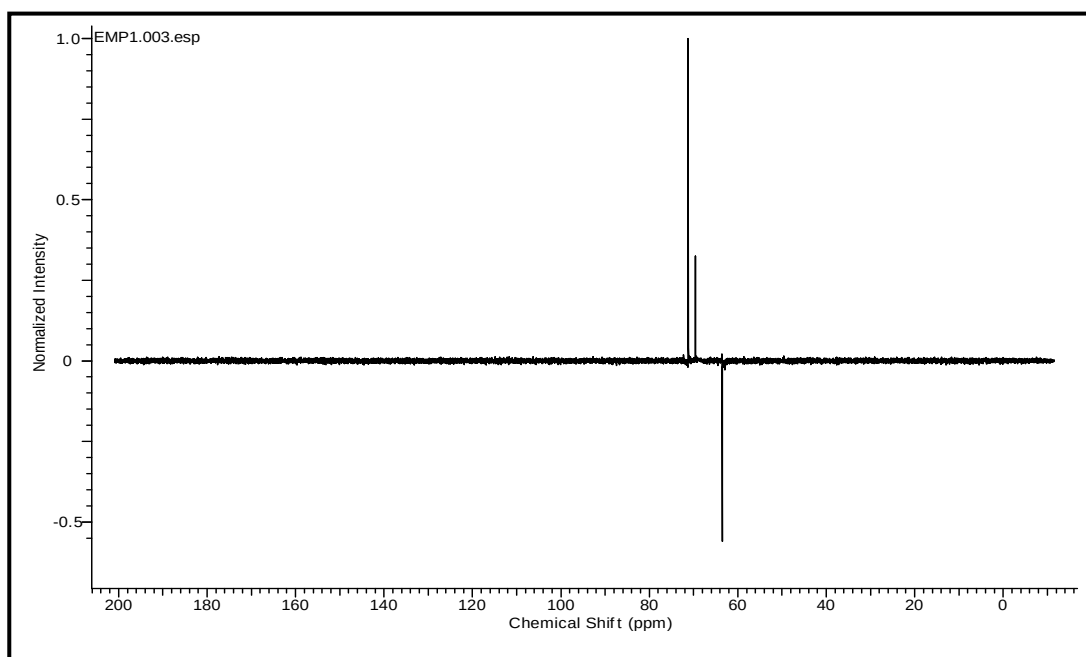


Figura 42 - DEPT 135 de EMP1 (CDCl_3 , 400 MHz)

No mapa de contornos (Figura 43), foi possível observar as correlações dos hidrogênios carbinólicos em δ 3,66 com os carbonos C-2 e C-3 e dos em δ 3,84 com o carbono C-3, além das correlações dos hidrogênios em δ 3,73 e δ 3,78 com os carbonos C-1 e C-3 e C-1 e C-2, respectivamente.

Os dados fornecidos pelas análises RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 11) e comparações com os dados da literatura permitiram concluir que o composto EMP1 é o *d*-manitol.

Tabela 11 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EMP1

Posição	$^{13}\text{C}(\delta)$	^1H (m, J em Hz)	gHMBC (^1H - ^{13}C)
1	66,3	1a – 3,66 dd (J = 11,6 : 6,1Hz) 1b – 3,84 dd (J = 11,6 : 3,0 Hz)	C-2; C-3 C-3
2	74,0	3,73 ddd (8,4 : 6,1 : 3,0 Hz)	C-1; C-3
3	72,4	3,78 d (J = 3,78 Hz)	C-1; C-2

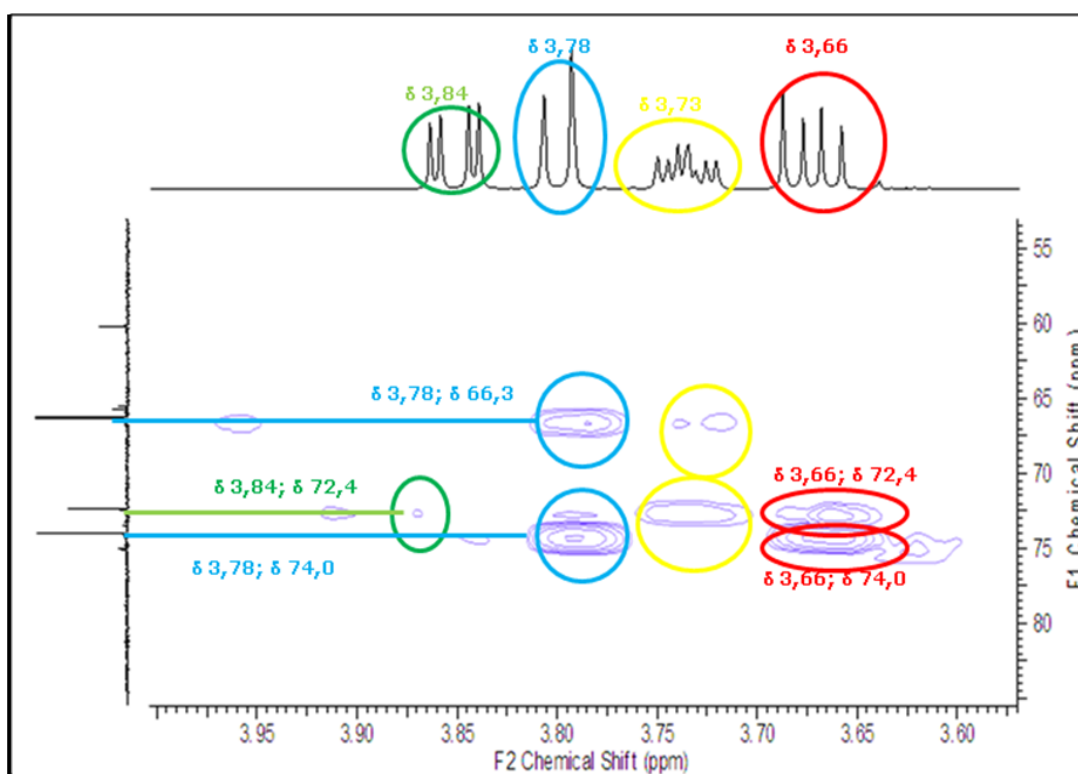


Figura 43 - Mapa de contornos gHSQC região ampliada de EMP1

5.4.8 IDENTIFICAÇÃO DE EHP 23

A amostra codificada como EHP 23 apresentou-se como um sólido branco em forma de agulhas, quando revelado em CCD com vanilina sulfúrica apresentou coloração azul, pela análise preliminar do espectro de RMN de ^1H (Figura 44), observaram-se características de esqueleto esteroidal.

O perfil do esteróide no espectro de RMN ^1H foi confirmado pela presença dos dubletos dos grupos referentes as metilas em δ 1.00 (H-21), δ 0.82 (H-26), δ 0.82 (H-27) e δ 0,91 (H-28), além dos singletos em δ 0.82 (H-18) e 0.88 (H-19), que são característicos de esteróides com esqueleto ergostano. O duplo duplete em δ 5,15 e δ 5,22 foram atribuídos aos prótons vinílicos (H-22 e H-23). Os sinais dos hidrogênios olefínicos em C-6 e C-7 aparecem como dois pares de dubletos em δ 6,50/6,24 e δ 6.60/6,28 (8.5 Hz), indicando a presença do peróxido de ergosterol nas formas *endo* e *exo* (Tabela 12).

No mapa de contornos gHMBC (Figura 45) foi possível observar as correlações dos prótons vinílicos da forma *endo* em δ 5,15 com os carbonos C-17 e C-24 e os em δ 5,22 com os carbonos C-17, C-24 e C-28, bem como os prótons em δ 6,24 com os carbonos C-5, C-8 e C-10 e os em δ 6,50 com os carbonos C-5 e C-8. As demais correlações foram observadas pelo mapa de contornos gHSQC (Figura 46).

A partir dos dados de RMN ^1H , comparados aos dados da literatura (YUE et al., 2001), levaram a identificação do composto como sendo o peróxido de ergosterol na forma *endo* (5 α ,8 α - *epidioxiergosta*- 6,22 - *dien*-3 β -ol) e na forma *exo* (5 β ,8 β - *epidioxiergosta*- 6,22 - *dien*-3 β -ol).

Tabela 12 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EHP 23

Posição	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$	^1H (m, J em Hz) EHP 23a	gHMBC (^1H - ^{13}C) EHP 23a	^1H (m, J em Hz) EHP 23b	gHMBC (^1H - ^{13}C) EHP 23b
1	34,8	30,2	-	-	-	-
2	33,1	34,7	-	-	-	-
3	66,5	66,4	3,97 (m)	-	4,01 (m)	-
4	39,8	39,4	-	-	-	-
5	82,1	82,1	-	-	-	-
6	135,5	135,2	6,24 (d, 8,5 Hz)	C-5, C-8, C-10	6,28 (d, 8,5 Hz)	C-5, C-8, C-10
7	130,8	130,7	6,50 (d, 8,5 Hz)	C-5, C-8	6,60 (d, 8,5)	C-5, C-8
8	79,6	79,4	-	-	-	-
9	51,2	51,2	-	-	-	-
10	36,9	37,0	-	-	-	-
11	19,3	20,6	-	-	-	-
12	33,2	37,0	-	-	-	-
13	42,7	44,6	-	-	-	-
14	51,4	51,7	-	-	-	-
15	25,3	23,4	-	-	-	-
16	28,3	28,5	-	-	-	-
17	56,1	56,3	-	-	-	-
18	12,7	12,9	0,82 (s)		0,82 (s)	
19	18,3	18,1	0,88 (s)	C-1, C-5, C-9, C-10	0,88 (s)	C-1, C-5, C-9, C-10
20	39,5	39,6	-	-	-	-
21	20,8	20,9	1,00 (d, 6,6 Hz)	-	1,00 (d, 6,6)	-
22	135,3	135,4	5,15 (dd, 15,3: 8,5 Hz)	C-17, C-24	5,16 (dd, 15,3:8,5)	C-17, C-24
23	132,4	132,3	5,22 (dd, 15,3 : 7,6 Hz)	C-17, C-24, C-28	5,24 (dd, 15,3:7,6)	C-17, C-24, C-28
24	42,6	42,8	-	-	-	-
25	33,0	33,1	-	-	-	-
26	19,1	19,6	0,82 (d, 6,8 Hz)	-	0,82 (d, 6,8 Hz)	-
27	19,8	19,9	0,82 (d, 6,8 Hz)	-	0,82 (d, 6,8 Hz)	-
28	17,4	17,5	0,91 (d, 6,8 Hz)	-	0,91 (d, 6,8 Hz)	-

^aExperimento realizado a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bYUE et al.,(2001) (400 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamentos em ppm.

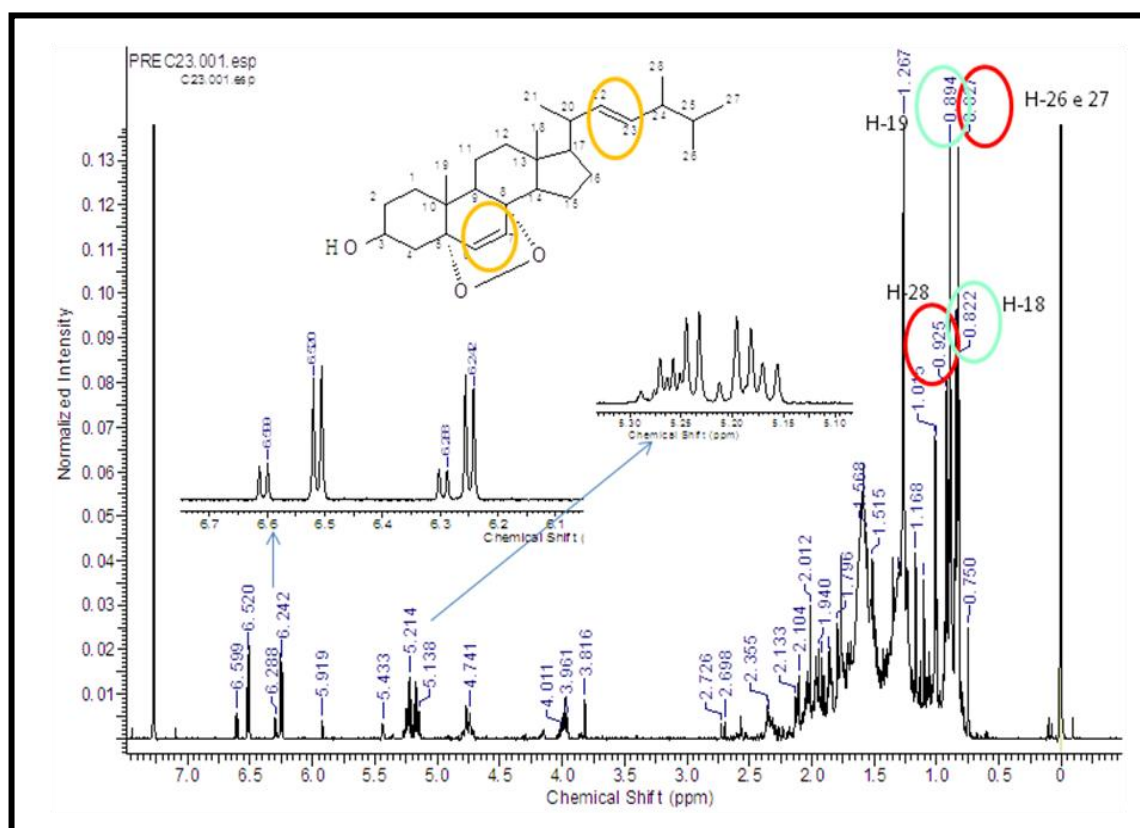


Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H de EHP23 (CDCl_3 , 400 MHz)

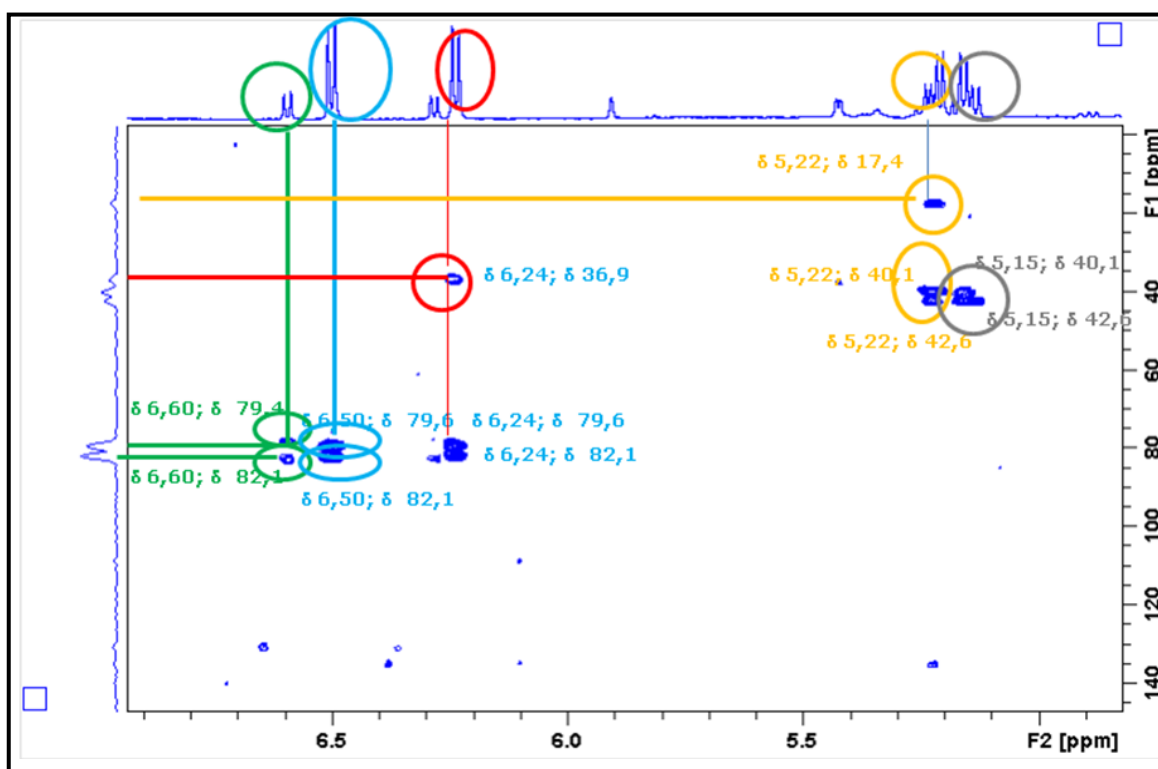


Figura 45 - Mapa de contornos gHMBC de EHP23

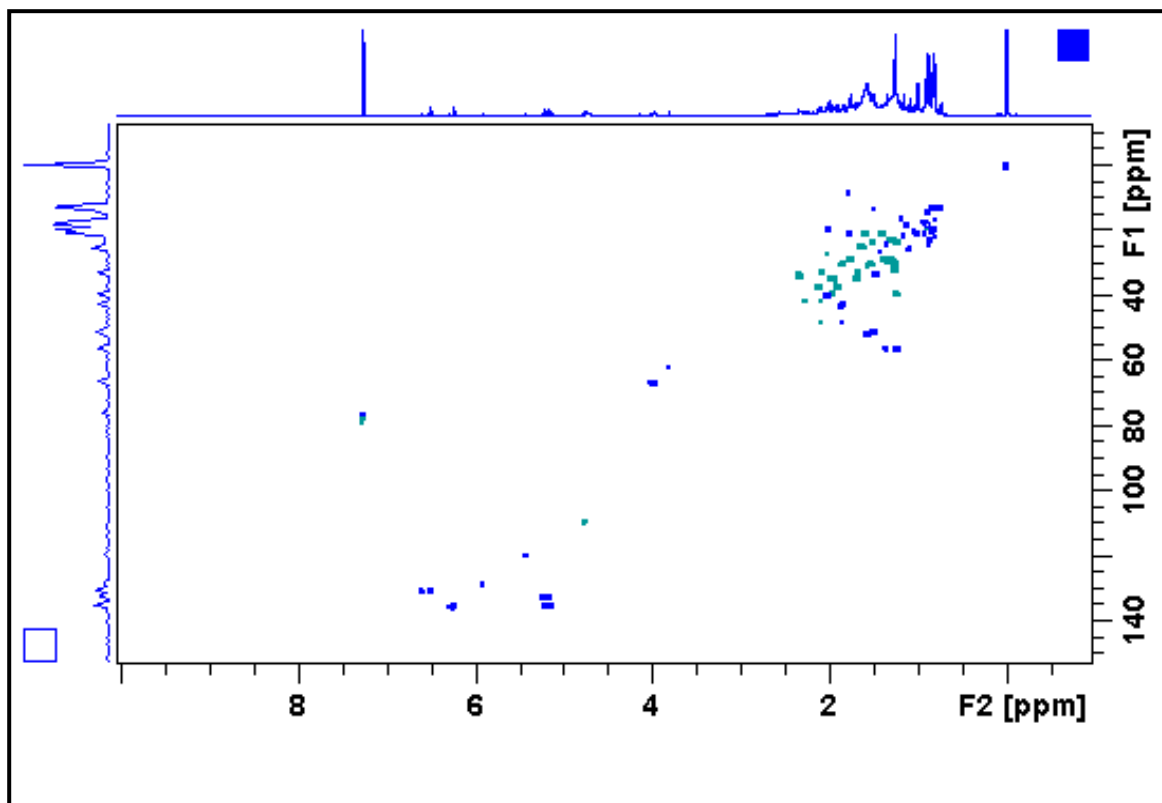


Figura 46 - Mapa de contornos gHSQC de EHP23

O peróxido de ergosterol também foi isolado do extrato etanólico de *C. rotundus* por Yan-Xu e colaboradores (2008). O composto não é metabolizado diretamente pelas plantas, sendo amplamente encontrado em extratos de fungos endofíticos.

5.4.9 IDENTIFICAÇÃO DE EMI 8-9

A amostra codificada como EMI 8-9 apresentou-se como sólido amorfo amarelo, quando revelado em CCD com vanilina sulfúrica apresentou coloração amarela. Os dados obtidos do espectro de RMN ^1H revelaram sinais que corroboram com valores de deslocamento químico, multiplicidade e constantes de acoplamento característicos de esqueleto flavonoídico.

O espectro de RMN ^1H (Figura 47) revelou a presença de um par de dubletos em δ 6,21 (d, $J = 2,1$ Hz) e δ 6,43 (d, $J = 2,12$ Hz) que são característicos de hidrogênios acoplados na posição *meta* no anel A. Três sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,37 (d, $J = 2,2$ Hz), δ 6,90 (d, $J = 8,8$ Hz) e em δ 7,36 (dd, $J = 8,2:2,2$ Hz), caracterizando a presença de um anel aromático tetra-substituído e um tri-substituído, respectivamente, além de um singlete em δ 6,52 característico de hidrogênio olefínico referente ao H-3.

A análise do mapa de contornos gHMBC (Figura 48) permitiu determinar as correlações diretas entre o sinal de H-6 em δ 6,43 com δ 95,1 e o sinal de H-8 em δ 6,21 com δ 100,2. Verificam-se ainda, os sinais dos hidrogênios aromáticos do anel B, H-2'/H-6' em δ 7,37 correlacionando com δ 150,8 e H-3'/H-5' em δ 6,90 com δ 123,7 bem como as outras correlações.

A partir dos dados obtidos pelos espectros RMN ^1H e 1D e 2D (Tabela 13) foi possível confirmar a estrutura da flavona 5,7,3',4'-tetrahidroxiflavona, conhecida como luteolina.

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de EHI 8-9

Posição	$^{13}\text{C}(\delta)$	^1H (m, J em Hz)	gHMBC (^1H - ^{13}C)
2	166,4	-	-
3	104,0	6,52 (s)	2, 4, 10, 1'
4	183,7	-	-
5	159,3	-	-
6	95,1	6,43 (d, 2,1)	5, 7, 8, 10
7	166,0	-	-
8	100,2	6,21 (d, 2,1)	6, 7, 9, 10
9	163,0	-	-
10	105,3	-	-
1'	123,7	-	-
2'	114,2	7,37 (d, 2,2)	3', 4', 6'
3'	145,0	-	-
4'	150,8	-	-
5'	116,8	6,90 (d, 8,8)	1', 3', 4'
6'	120,4	7,36 (dd, 8,8; 2,2)	2', 4'

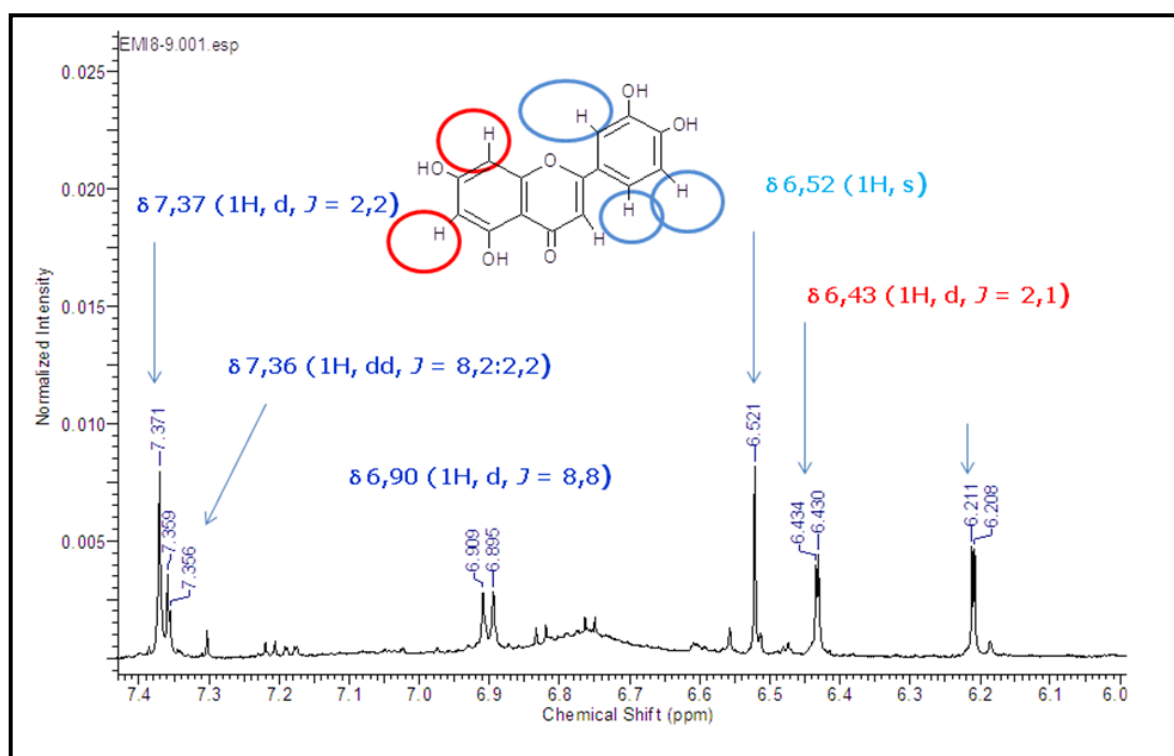


Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H de EMI 8-9 (MeOH, 400 MHz)

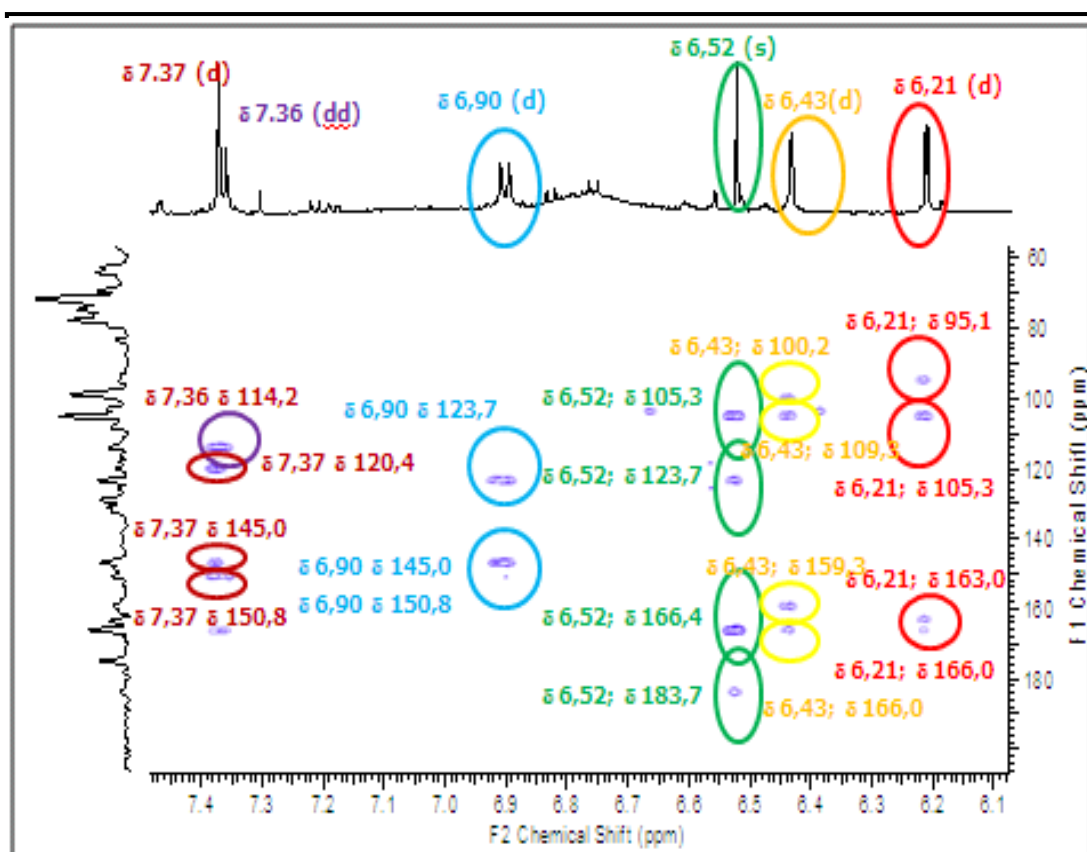


Figura 48 - Mapa de contornos gHMBC região ampliada de EMI 8-9

5.5 DETERMINAÇÃO DE FENOIS E FLAVONOIDES TOTAIS

Os extratos de alta polaridade e de média polaridade obtidos dos tubérculos e da inflorescência de *C. rotundus* apresentaram os maiores teores de fenóis totais, destacando-se o extrato em metanol da inflorescência que apresentou 60,08% em sua composição química, seguido pelo extrato metanólico (30,27%) e acetato de etila (26,13%) provenientes dos tubérculos. Todos os extratos analisados apresentaram baixo teor de flavonoides, conforme Tabela 14, Gráfico 4.

Tabela 14 - Concentração (%) de fenóis e flavonoides totais

Amostra (µg/mL)	Fenóis totais Teor (% ± DP)	Flavonoides totais Teor (% ± DP)
EH	5,28 ± 1,20	0,27 ± 0,40
EAC	26,13 ± 1,96	5,90 ± 0,08
EMCR	30,27 ± 2,27	5,42 ± 0,05
EMI	60,08 ± 4,50	3,40 ± 0,45
EHI	1,35 ± 1,62	2,35 ± 1,05

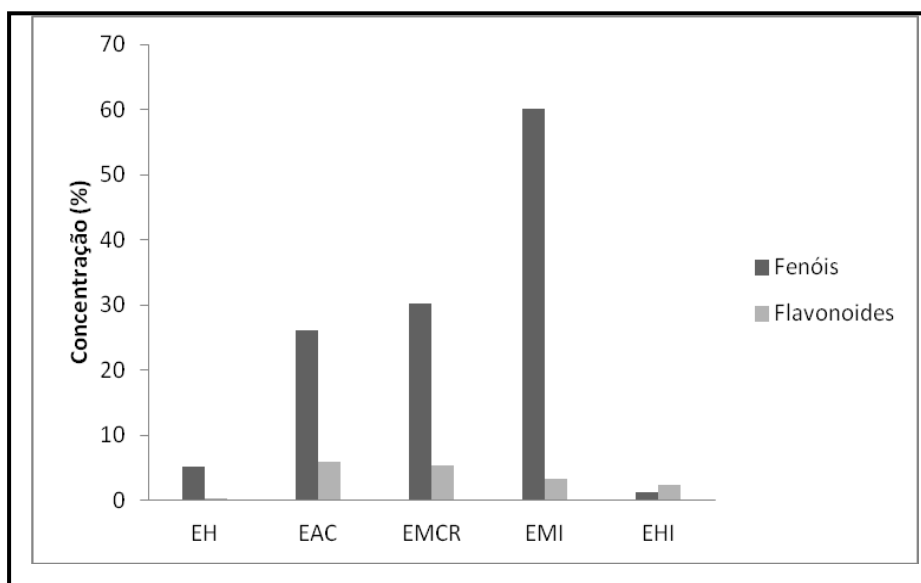


Gráfico 4 - Concentração de fenóis e flavonoides totais dos extratos de *C. rotundus*

5.6 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO RADICAL DPPH

O ensaio preliminar de atividade antioxidante frente ao radical DPPH em placas cromatográficas de gel de sílica revelou atividade de captura de radicais livres para os extratos obtidos dos tubérculos de *C. rotundus* em acetato de etila e metanol, não apresentando para o extrato em hexano (Figura 49).



Figura 49 - Atividade antioxidante qualitativa dos extratos obtidos dos tubérculos de *C. rotundus*

No ensaio quantitativo, o extrato metanólico da inflorescência e a amostra EMI 8-9 (luteolina) apresentaram maior eficiência na captura do radical livre DPPH (Tabela 15). A capacidade sequestrante do extrato metanólico foi superior a do padrão utilizado, sendo que o extrato apresentou elevado teor de fenois e baixa concentração de flavonoides totais. Dessa forma, podemos inferir que a eficiência do extrato está associada ao sinergismo de flavonoides e de outros compostos fenolicos presentes na amostra. Segundo Alves et al., (2010), para avaliação do efeito do sequestro de radicais deve-se levar em consideração não somente a reatividade do antioxidante com o radical, como também, sua concentração, tendo em vista que na amostra analisada, muitas moléculas, que são mais abundantes que as substâncias antioxidantes, reagem também rapidamente com esse radical.

Tabela 15 - Avaliação da atividade sequestrante de radical DPPH

Amostra	DPPH
($\mu\text{g/mL}$)	CS (%) $\pm$ DP
OECR	7,67 $\pm$ 0,77
EH	15,94 $\pm$ 0,3
EAC	33,58 $\pm$ 0,6
EMCR	43,12 $\pm$ 1,14
EMI	83,53 $\pm$ 0,23
EMP1	19,28 $\pm$ 1,14
EMI 8-9 (luteolina)	77,64 $\pm$ 0,51
EAC 3.4.4 (ácido ferúlico)	42,83 $\pm$ 0,26
quercetina (padrão)	83,22 $\pm$ 0,42

DP = desvio padrão

Nos estudos de Bashir e colaboradores (2012), o extrato metanólico dos tubérculos de *C. rotundus* coletados no Paquistão, apresentou elevada capacidade sequestrante do radical DPPH (61,73%), bem como, elevado teor de fenois (37,86%) e flavonoides totais (18,25%). No presente estudo, o extrato metanólico da inflorescência foi o que apresentou a maior porcentagem de inibição do radical DPPH (83,53%), quando comparado ao padrão quercetina e ao extrato metanólico dos tubérculos.

Os resultados revelam a potencialidade do extrato metanólico da inflorescência de *C. rotundus*, e fornece subsídios para utilização do referido extrato como agente antioxidante, estimulando a continuação dos estudos referentes aos seus constituintes químicos, tendo em vista a necessidade de se buscar fontes naturais na cura de doenças relacionadas ao estresse oxidativo e degenerativas.

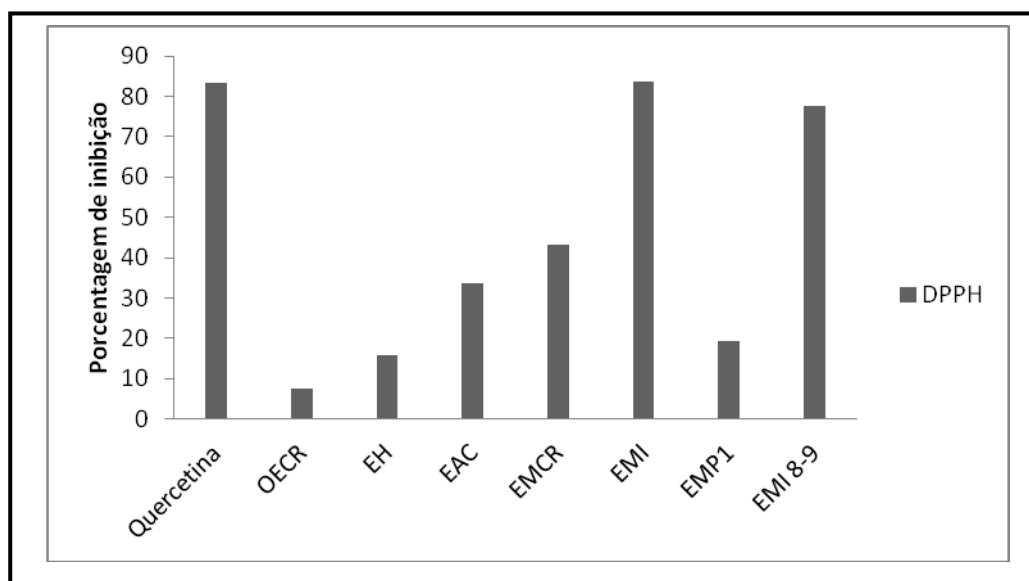


Gráfico 5 - Porcentagem de inibição (%) dos extratos e substâncias isoladas de *C. rotundus* frente ao radical DPPH

5.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

5.7.1 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-ELASTASE

Na avaliação da atividade anti-elastase observou-se que o óleo essencial, o extrato hexânico (tubérculos e inflorescência) e a amostra EMI 8-9 (luteolina) apresentaram efeito positivo frente a enzima, embora com porcentagem de inibição abaixo de 50%. As demais amostras apresentaram efeito negativo, ou seja, potencializaram a ação da enzima, não apresentando qualquer ação inibitória. Os resultados da porcentagem de inibição dos extratos e substâncias isoladas de *C. rotundus* estão expressos na Tabela16.

Tabela 16 - Porcentagem de inibição de extratos e substâncias isoladas *C. rotundus* frente a enzima elastase

Amostra (µg/mL)	% de inibição ± DP
OECR	23,41 ± 0,68
EH	18,28 ± 0,41
EAC	-2,95 ± 3,43
EMCR	-9,93 ± 0,72
EMI	-15,95 ± 2,04
EHI	14,56 ± 1,67
EMP1	-26,12 ± 2,74
EMI 8-9	15,98 ± 2,84
EAC 3.4.4	-4,78 ± 2,07
silvestart (padrão)	91,81 ± 0,66

O efeito negativo observado dos extratos EMCR e EMI podem estar relacionados a vários fatores tais como: baixa concentração de flavonoides, interferência de moléculas não fenolicas presentes nos referidos extratos, tendo em vista que a atividade inibitória da enzima está diretamente associada a concentração do agente antioxidante.

5.7.2 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-TIROSINASE

Na avaliação da atividade anti-tirosinase os melhores resultados foram das amostras EMI 8-9 (luteolina) e EAC 3.4.4 (ácido ferulico) quando comparado ao padrão de quercetina. As demais amostras demonstraram pouca eficiência na inibição da enzima. Os resultados da porcentagem de inibição dos extratos e substâncias isoladas de *C. rotundus* estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17 - Porcentagem de inibição de extratos e substâncias isoladas de *C. rotundus* frente a enzima tirosinase

Amostra (µg/mL)	% de inibição ± DP
OECR	12,26 ± 2,45
EH	9,78 ± 1,24
EAC	6,86 ± 1,78
EMCR	2,38 ± 1,76
EHI	7,45 ± 1,23
EMI	16,68 ± 1,76
EMP1	4,48 ± 0,79
EMI 8-9	19,11 ± 2,34
EAC 3.4.4	18,28 ± 0,84
quercetina (padrão)	44,81 ± 1,67

Os dados obtidos para os fenóis totais e atividade antioxidante indicam que os compostos fenólicos concentram-se preferencialmente no extrato polar (metanólico) da inflorescência e tubérculos de *C. rotundus*. No entanto, no presente ensaio não foi observada atividade significativa dos referidos extratos, demonstrando que os compostos fenolicos isolados apresentam maior capacidade de inibição da enzima.

5.7.3 ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI- α -GLUCOSIDASE

Na avaliação da atividade α -glucosidase observa-se que o óleo essencial, os extratos hexânico (tubérculos e inflorescência), acetato de etila (tubérculos) e as substâncias isoladas luteolina (EMI 8-9) e ácido ferulico (EAC 3.4.4) apresentaram porcentagem de inibição superior a do padrão utilizado. Os valores da porcentagem de inibição e de CI_{50} estão descritos na Tabela 18, Gráfico 6.

Tabela 18 - Porcentagem de inibição da α -glucosidase dos extratos brutos e substâncias isoladas de *C. rotundus*

AMOSTRA ($\mu\text{g/mL}$)	% de inibição $\pm$ DP	CI ($\mu\text{g/mL}$)
OECR	96,35 $\pm$ 0,16	15,17
EH	93,43 $\pm$ 0,03	2,75
EAC	92,09 $\pm$ 2,88	40,51
EMCR	82,00 $\pm$ 4,11	27,08
EHI	97,18 $\pm$ 0,08	12,75
EMI	85,06 $\pm$ 1,25	32,07
EMP1	15,85 $\pm$ 3,45	67,98
EMI 8-9	93,64 $\pm$ 0,96	30,39
EAC 3.4.4	98,17 $\pm$ 0,07	nr
quercetina (padrão)	90,27 $\pm$ 1,87	14,83

DP – desvio padrão; nr – não realizado

O extrato hexânico dos tubérculos apresentou concentração inibitória em cerca de 5 vezes superior a do padrão quercetina. No entanto, por se tratar de um extrato bruto, existem inúmeras substâncias que podem ser responsáveis por tal capacidade. Para a substância isolada EAC 3.4.4 (ácido ferulico), não foi possível determinar a concentração inibitória, tendo em vista que após sucessivas diluições a amostra ainda apresentava capacidade de inibição acima de 94%, fato que não permitiu que fosse determinada a curva para análise de regressão linear.

Recentemente o mecanismo de ação de inibição da α -glucosidase da flavona luteolina foi descrito por Yan e colaboradores (2014), por meio de interações cinéticas e moleculares, demonstrando que a alta afinidade da luteolina pelo sítio ativo da enzima à induziu a rearranjos e alterações conformacionais, o que indiretamente inibiu a atividade catalítica da enzima. Segundo Yan, a ação inibitória da luteolina é comparável ao padrão arcabose, independente da concentração utilizada. O padrão acarbose é um potente fármaco utilizado no tratamento da diabetes mellitus do tipo II e III e no controle da doença de Gaucher, no entanto, apresenta reações adversas, como dores abdominais, diarreia e flatulência, o que justifica a busca por novos inibidores da enzima.

Dessa forma, é possível que as substâncias presentes nos extratos e no óleo essencial exerçam a mesma ação frente à enzima da α -glucosidase e que sejam potencialmente tão ativas quanto o padrão utilizado.

Os resultados do presente estudo fornecem subsídios para novas pesquisas com substratos de *C. rotundus*. No entanto, estudos pré-clínicos são necessários para avaliar a eficácia dos produtos e a concentração inibitória da α -glucosidase *in vivo*. O interesse por novos agentes inibidores da enzima tem se intensificado, uma vez que, a inibição da atividade catalítica da enzima, retarda a liberação de glicose para o sangue. Inibidores de α -glucosidases também têm sido estudados como potenciais agentes anti-HIV, com grande influência no ciclo de replicação viral.

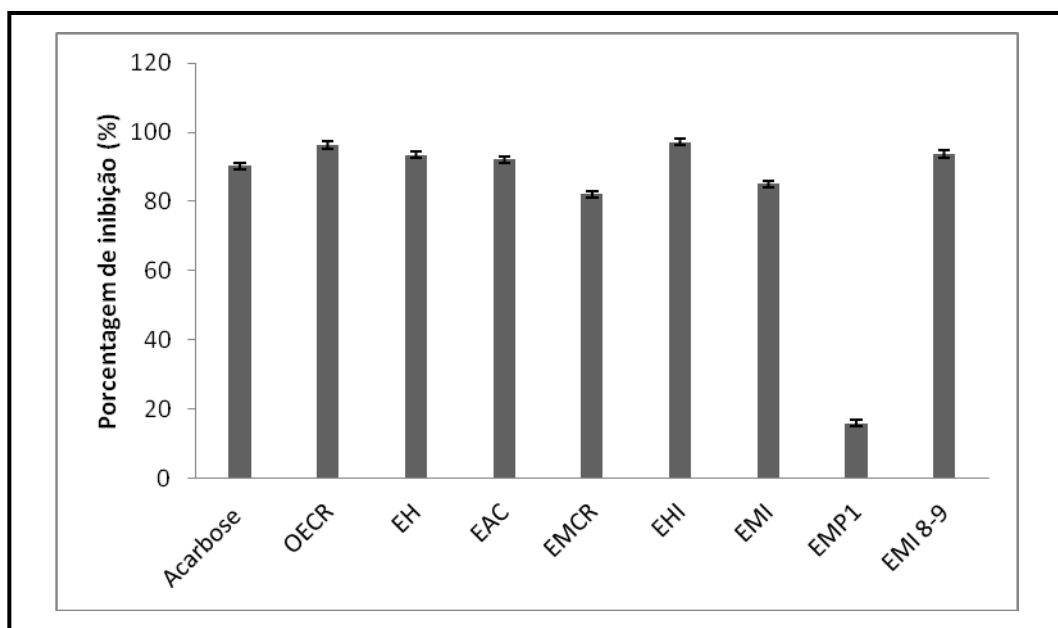


Gráfico 6 - Porcentagem de inibição dos extratos e substâncias isoladas frente a enzima α -glucosidase

5.7.4 TOXICIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA (TAS)

A Tabela 19 apresenta o número de óbitos de *A. salina* ocorridos na presença em diferentes concentrações dos extratos hexânico, acetato de etila, metanol e do óleo essencial obtidos dos tubérculos de *C. rotundus*. Considerando que o programa de análise de probitos (EPA probit analysis program, versão 1.5.) não admite o *input* de dados em triplicata, o número de óbitos para cada concentração foi considerado em conjunto, referindo-se então a um total de 10 indivíduos expostos.

Tabela 19 - Número de óbitos de *A.salina* frente aos extratos brutos e óleo essencial testado e suas respectivas concentrações.

Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	EH	EAC	EM	OECR	Controle
10	0	0	0	0	0
20	0	0	0	7	0
30	1	0	4	6	0
50	2	5	3	8	0

EH- extrato em hexano; EAC – extrato em acetato de etila; EM – extrato em metanol; OECR – óleo essencial de *C. rotundus*

Os dados quando analisados segundo o método de Finney (1971), resultaram nos valores de DL₅₀ constantes da Tabela 20.

Tabela 20 - Avaliação da toxicidade dos extratos brutos e óleos essenciais testados (DL₅₀)

Amostra	DL ₅₀ (µg/mL)
EH	944,01
EAC	501,82
EM	500,13
OECR	760,60

EH- extrato hexânico; EAC – extrato em acetato de etila; EM – extrato em metanol; OECR – não foi possível calcular.

Os resultados da DL₅₀ revelam baixa toxicidade para o extrato em hexano e óleo essencial. Moderada toxicidade do extrato em acetato de etila e em metanol.

Para avaliação da toxicidade frente à *A. salina* considerou-se baixa toxicidade quando a dose letal (DL₅₀) foi superior a 500 µg/mL; moderada para valores entre 100 e 500 µg/mL e muito tóxico quando a DL₅₀ foi inferior a 100 µg/mL (MEYER et al., 1982).

Os resultados obtidos frente à *A. salina* sugerem a necessidade de estudos posteriores mais específicos, principalmente, no que se refere aos mecanismos de ação dos metabólitos em nível fisiológico.

5.7.5 AVALIAÇÃO ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIBIOFILME

Na avaliação da atividade antimicrobiana, o óleo essencial dos tubérculos de *C. rotundus* apresentou média dos diâmetros dos halos inibitórios variando de 12,3 a 14,3 mm (Figura 50) e valores de CIM entre 0,31 e 0,62 mg/ mL para as bactérias Gram-positivas e de 0,31 mg/mL para a levedura, não apresentando nenhuma atividade contra a bactéria Gram-negativa. Tanto os valores alcançados por difusão em ágar como os de CIM demonstraram um desempenho superior do óleo essencial em comparação com o controle positivo de clorexidina (Tabela 21).

O extrato em hexano apresentou média de halo inibitório de 11,3 mm contra a bactéria *S. aureus*, demonstrando sensibilidade da bactéria ao extrato. As bactérias testadas foram resistentes aos extratos em acetato de etila e metanol.

Zeid e colaboradores (2008), ao estudarem a atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. rotundus*, verificaram que o mesmo apresentou atividade notável contra bactérias Gram-positivas, porém menor atividade inibitória contra as Gram-negativas. A atividade fungicida do óleo essencial de *C. rotundus* avaliada por Duarte et al., (2005) contra cepa de *C. albicans*, revelou atividade moderada, com CIM de 0,6 mg/mL. Embora no presente estudo, as médias dos diâmetros dos halos inibitórios e das CIM tenham indicado melhor desempenho do OECR do que o controle positivo e do que o valor relatado na literatura, essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa ($P < 0.5$). Entretanto, no que diz respeito ao teste de disco difusão, os halos formados demonstraram, além do efeito antifúngico, boa difusibilidade e baixa viscosidade do óleo.

Os métodos de disco-difusão e difusão em meio sólido foram utilizados como teste preliminar, pois apresenta limitações para substâncias com baixa difusibilidade no meio de cultura. Diante disso, há possibilidade de se obter resultados diferentes em outros testes de ação antimicrobiana.

No teste da microdiluição o extrato em hexano (tubérculos), demonstrou desempenho superior quando comparado ao padrão tanto para as bactérias Gram-positivas quanto para a levedura, destacando-se o melhor resultado para *S. sanguinis* com CIM = 0,78 mg/mL.

O extrato em acetato de etila (tubérculos) apresentou os mesmos valores de CIM do padrão, revelando sensibilidade das cepas testadas ao extrato e igual eficácia do extrato em relação ao padrão. O extrato em metanol apresentou CIM superior ao padrão para a bactéria *S. sanguinis*.

A clorexidina que foi utilizada como padrão, é um potente antisséptico empregado, especialmente na odontologia, para o controle de infecções na cavidade oral na forma de soluções colutórias (0,12%) e como solução irrigadora (2,0%) durante o tratamento de canais dentários infectados.

Tabela 21 - Médias dos diâmetros dos halos inibitórios (mm) dos extratos dos tubérculos e óleo essencial de *C. rotundus*

Micro-organismos								
Amostra	<i>E. faecalis</i> Ø (mm)	CIM (mg/mL)	<i>S. sanguinis</i> Ø (mm)	CIM (mg/mL)	<i>S. aureus</i> Ø (mm)	<i>E. coli</i> Ø (mm)	<i>C. albicans</i> Ø (mm)	CIM (mg/mL)
EH	8,0*	0,39	-	0,78	11,3	-	-	0,78
EAC	8,0**	3,13	-	12,5	-	-	-	3,13
EM	-	6,25	-	5,0	-	-	-	12,5
OECR	12,3	0,31	12,3	0,62	7,5	-	14,3	0,31
CHX (0,12%)	9,0	3,13	11,3	12,5	12,4	8,0	11,3	3,13
Água	-	-	-	-	-	-	-	-

* Halos com inibição parcial: pequenas colônias cresceram no interior do halo; **Houve formação de halo em apenas uma placa. CHX – clorexidina (controle positivo); Água (controle negativo)

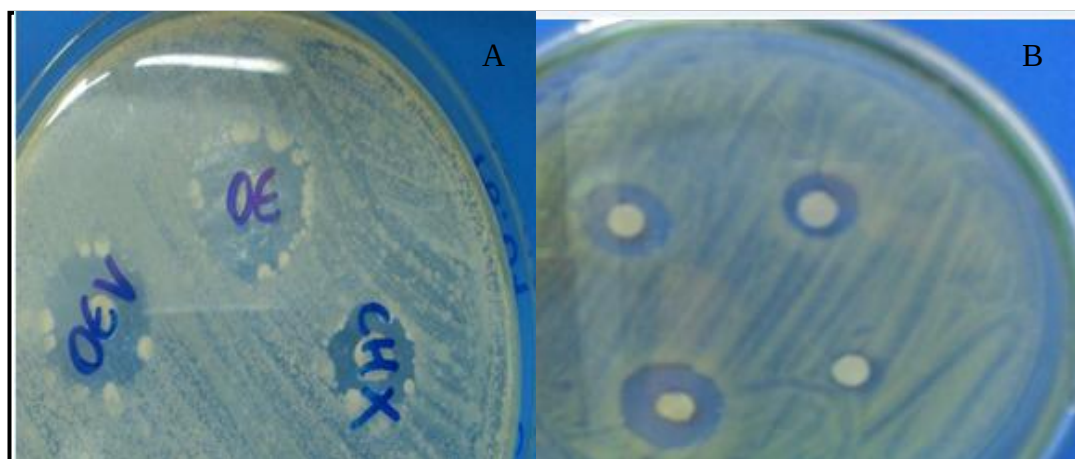


Figura 50 - Formação de halos de inibição no teste antimicrobiano. A – óleo essencial; B – extratos

Considerando os resultados para o extrato hexânico, as sete frações foram avaliadas frente às bactérias Gram-positivas (*E. faecalis* e *S. sanguinis*). Os resultados estão descritos na Tabela 22.

Tabela 22 - CIM* das frações do extrato em hexano contra *E. faecalis* e *S. sanguinis*

Fração	Micro-organismos	
	<i>E. faecalis</i> (CIM = mg/mL)	<i>S. sanguinis</i> (CIM = mg/mL)
HF1	10,00	5,00
HF2	0,62	2,50
HF3	1,25	2,50
HF4	5,00	1,25
HF5	5,00	2,50
HF6	10,0	2,50
HF7	1,25	2,50
CHX (0,12%)	5,00	2,50
Água	-	-

CHX – clorexidina (controle positivo); Água (controle negativo)

Os melhores resultados para as frações semipurificadas do extrato hexano foram de HF2, HF3 e HF7 para *E. faecalis*, que demonstraram desempenho superior ao padrão clorexidina. Para *S. sanguinis* o melhor desempenho foi da fração HF4. Embora os resultados tenham sido satisfatórios quando comparados ao padrão, observa-se que nenhuma das frações obteve melhor resultado do que o extrato de origem, demonstrando que a ação antimicrobiana do extrato pode ser por sinergismo frente as cepas testadas.

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos obtidos da inflorescência, as substâncias puras EMP1 (*d*-manitol), e EAC 3.4.4 (ácido ferulico), foi avaliada pela técnica da microdiluição contra as cepas de *E. faecalis*, *S. sanguinis* e *C. albicans*, os resultados estão descritos na Tabela 23.

Tabela 23 - CIM dos extratos obtidos da inflorescência e de substâncias puras

Amostra	Micro-organismos		
	<i>E. faecalis</i> CIM (mg/mL)	<i>S. sanguinis</i> CIM (mg/mL)	<i>C. albicans</i> CIM (mg/mL)
EHI	-	20,00	3,34
EMI	-	20,00	0,01
EMP1	20,00	20,00	0,84
PREC1	-	20,00	0,01
EAC 3.4.4	20,00	-	3,34
CHX (0,12%)	2,5	2,5	0,05
Água	-	-	-

CHX – clorexidina (controle positivo); Água (controle negativo)

Dos extratos da inflorescência avaliados contra a cepa de *C. albicans* o extrato em metanol apresentou desempenho superior ao padrão com CIM = 0,01 mg/mL. As substâncias puras *d*-manitol (EMP1) e ácido ferulico (EAC 3.4.4) apresentaram moderada atividade.

A fração PREC1 proveniente da partição do extrato em metanol (tubérculos) com hexano apresentou desempenho superior ao padrão de clorexidina. Da fração foi isolado o peróxido de ergosterol, no entanto, devido a pequena quantidade de substância obtida não foi possível realizar o ensaio com a substância pura.

Em relação à inibição de adesão microbiana, a ação do OECR foi especialmente significativa contra *E. faecalis*, reduzindo em cerca de 50% a capacidade de formação de biofilme por esta cepa e numa concentração várias vezes menor do que a necessária para obter efeito semelhante sobre *C. albicans*. Embora o efeito antibiofilme tenha sido atingido numa concentração superior à necessária para inibir seu crescimento, pode-se supor que os diferentes compostos presentes no OECR agem tanto em *E. faecalis* como em *C. albicans* por

mecanismos diversos, uns interferindo ao nível de parede celular e outros internamente na célula, impedindo a expressão de moléculas associadas à adesão celular.

Observa-se efeito contrário do *d*-manitol (EMP1), sua ação foi significativa para *C. albicans*, reduzindo em cerca de 50% a capacidade de formação de biofilme da levedura, numa concentração várias vezes menor para se obter o mesmo efeito contra *E. faecalis*, onde o percentual de inibição do biofilme também atingiu a percentagem de 50%. Os resultados da CIMB e do percentual de biofilme formado estão descritos na Tabela 24.

Tabela 24 - Concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) e percentual de biofilme formado por *E. faecalis* e *C. albicans*

Amostra	Micro-organismos			
	<i>E. faecalis</i>	CIMB%*	<i>C. albicans</i>	CIMB%**
	CIMB (mg/mL)		CIMB (mg/mL)	
EHI	0,01	66,0 ± 5,9	0,63	97,7 ± 2,1
EMI	0,01	74,8 ± 8,6	0,02	62,3 ± 6,3
EMP1	20,00	45,3 ± 3,5	0,02	46,3 ± 8,9
PREC1	0,63	75,7 ± 14,9	10,00	48,2 ± 7,9
OECR	0,63	52,0 ± 9,4	10,00	47,1 ± 7,3

*A média e desvio padrão de 100% de biofilme formado por *C. albicans* foi de 0,720_{OD} ± 0,4; ** A média e desvio padrão de 100% de biofilme formado por *E. faecalis* foi de 0,231_{OD} ± 0,1; Os ensaios foram realizados em triplicata

Os microrganismos utilizados como alvo deste estudo, além de patógenos sistêmicos são de importância odontológica devido à sua relação com infecções endodônticas persistentes (FERRARI et al., 2005; MOHAMMADI et al., 2012).

O presente estudo sugere que os extratos, o óleo essencial e as substâncias puras testadas têm um amplo espectro de atividade antibacteriana, embora o grau de susceptibilidade possa diferir entre os diferentes microrganismos. Os resultados promissores da atividade antibacteriana, podem ser atribuídos à presença de metabólitos secundários de diversas classes orgânicas presentes no material vegetal individualmente ou em combinação. Os nossos resultados indicam a utilidade potencial de *Cyperus rotundus* no tratamento de

diferentes doenças patogênicas, bem como, pode ajudar na descoberta de novas classes de produtos químicos antibióticos, além de fornecer subsídios para a possível utilização do óleo essencial de *C. rotundus* e do *D*-manitol como adjuvantes no tratamento de canais radiculares que mostram colonização por *E. faecalis* e *C. albicans*, respectivamente. No entanto, estudos pré-clínicos são necessários para avaliar a eficácia dos produtos e a concentração inibitória de biofilme *in vivo*.

5.7.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA

Para avaliar o efeito dos extratos e óleo essencial de *C. rotundus* sobre o crescimento de *L. amazonensis in vitro*, formas promastigotas foram tratadas com as concentrações de 1,5; 3,1; 6,2; 12,5; 25; 50 e 100 µg/mL. Na avaliação por meio da contagem diária foi possível observar, que o extrato metanólico não apresentou atividade em nenhuma das concentrações testadas. O extrato hexânico e em acetato de etila apresentaram atividade nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL. Na concentração de 100 µg/mL o extrato hexânico foi capaz de promover a morte de 100% dos parasitas.

O óleo essencial apresentou atividade nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, sendo que a concentração de 50 µg/mL foi mais eficiente para promover a morte de 100% dos parasitas, apresentando resultados semelhantes ao obtido pela pentamidina que é um medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose e que é capaz de matar todos os parasitas nesta concentração (SILVA-JARDIM et al., 2011).

A avaliação da viabilidade dos extratos e óleo essencial de *C. rotundus* sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* está expressa na Figura 51 e a CI₅₀ na Tabela 25.

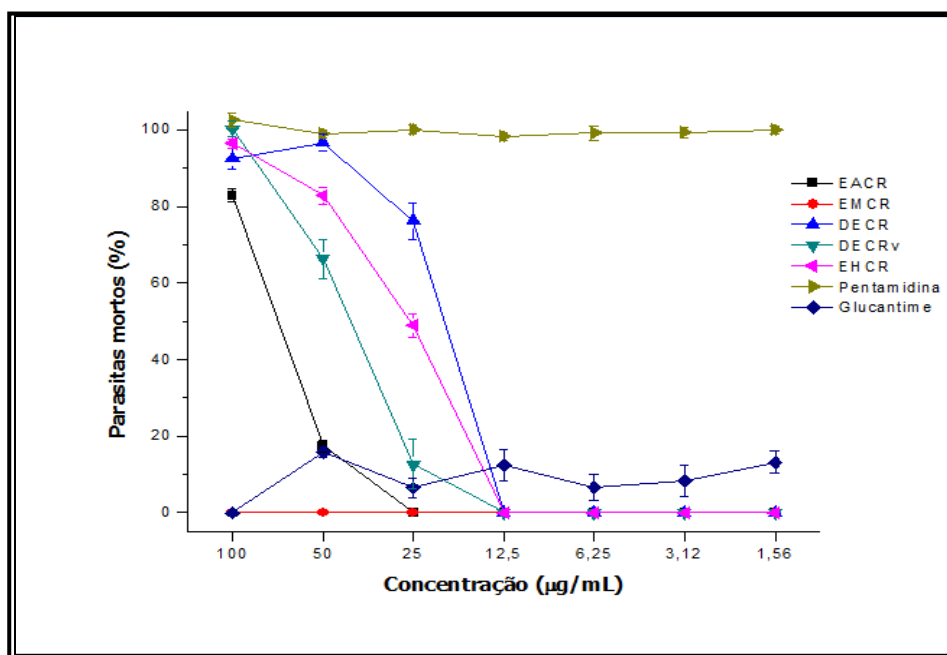


Figura 51 - Avaliação da atividade dos extratos e óleos essenciais de *C. rotundus* frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Tabela 25 - Concentração inibitória (IC_{50}) da atividade leishmanicida dos extratos de *Cyperus rotundus* contra *L. amazonensis*

Amostra	CI_{50} (µg/mL)
OECR	5,07
EH	3,65
EAC	4,29

Os resultados revelam a atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* do óleo essencial e dos extratos hexânico e acetato de etila. Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, o extrato hexânico e de diclorometano apresentaram atividade contra formas promastigotas de *Leishmania guyanensis* com CI_{50} de 16,1 µg/mL e 31,7 µg/mL respectivamente (Santos, 2003).

Estabelecer o mecanismo de ação de produtos naturais frente formas promastigotas de *Leishmanias* é muito complexo, uma vez que os parasitos do gênero são capazes de adaptar seu metabolismo conforme a disponibilidade de substratos energéticos, pois apresentam um ciclo de vida complexo, envolvendo dois hospedeiros diferentes. Para as formas amastigotas a

glicose é a principal fonte energética, porém promastigotas preferem os aminoácidos. No entanto, o estudo de compostos ativos de plantas pode se tornar um método alternativo na busca pelo controle e tratamento da doença (VAN-HELLEMOND & TIELENS, 1997).

Nessa perspectiva, o presente estudo fornece subsídios para novas pesquisas com o óleo essencial e os extratos de *C. rotundus* na busca de substâncias bioativas que possam auxiliar no tratamento da Leishmaniose.

5.8 AVALIAÇÃO DA MICROBIOTA FÚNGICA de *C. rotundus*

A partir dos tubérculos de *C. rotundus* foram obtidos 32 isolados fúngicos. A maior ocorrência foi do gênero *Colletotrichum* (12 isolados), seguida por *Aerobasidium* (6 isolados) e *Penicillium* (5 isolados), *Fusarium* (4 isolados), *Aspergillus* (2 isolados), *Cladosporium* (2 isolados), *Tricoderma* (1 isolado), conforme Tabela 26, Figura 52.

Tabela 26 - Isolados fúngicos de dos tubérculos de *C. rotundus*

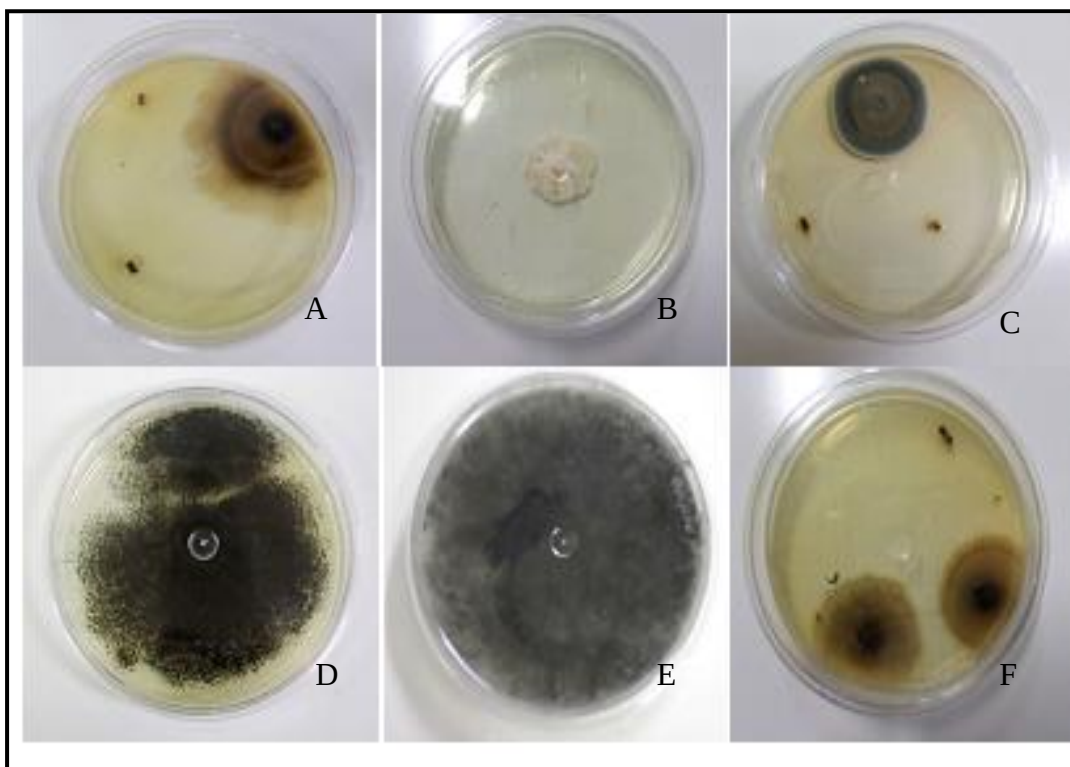
Gênero	Quantidade	Coloração
<i>Colletotrichum</i>	12	marrom véo
<i>Aerobasidium</i>	6	branco
<i>Penicillium</i>	5	cinza com a borda branca
<i>Aspergillus</i>	2	preto granulado
<i>Cladosporium</i>	2	preto veludo
<i>Tricoderma</i>	1	verde borda branca
<i>Fusarium</i>	4	bege

O gênero *Colletotrichum* é causador da doença conhecida como antracnose que comumente infesta cultura de café, tomate e mamão. No estado do Amazonas, há registros, de culturas de guaraná infestadas pelo fungo endofítico *Colletotrichum guaranicola* que foi isolado da espécie *Cyperus flavus*, fato que vem comprometendo a produção do guaraná nos municípios de Manaus, Maués e Presidente Figueiredo (MILÉO et al., 2007).

Espécies de *Penicillium* são reconhecidas por produzirem metabólitos tóxicos, as micotoxinas que comumente são encontradas em alimentos, tais como: ocratoxina, pantulina, cistinina e citroevidrina (MAZIERO & BERSOT, 2010). No entanto, o gênero possui capacidade de produzir metabólitos secundários bioativos, como é o caso dos policetídeos. Segundo Marinho et al., (2005), o policetídeo citrinina isolados do fungo *Penicillium janthinell* de *Melia azedarach*, mostrou importante atividade inibitória de crescimento de *Leishmania mexicana*.

A partir das espécies *Cyperus rotundus* e *Cyperus esculentus* foram isolados alcaloides do tipo ergot produzidos pelo fungo *Claviceps ciperi*. Os alcaloides isolados são substâncias altamente tóxicas que tem como função proteger a planta e o fungo dos predadores, que ao serem ingeridas junto com a planta provocam doenças em insetos e mamíferos herbívoros (NAUDE et al., 2005).

Na literatura há poucos registros sobre a investigação da microbiota fúngica da espécie *C. rotundus*, sendo tal conhecimento de fundamental importância para o entendimento das interações inter e intraespecíficas planta-microrganismo, a fim de que possam ser estudadas e elucidadas a base biológica dessas interações, tendo em vista, que muitos fungos endofíticos, são capazes de produzir metabólitos secundários de interesse farmacológico e têm sido utilizados como agentes de controle biológico de pragas e doenças.



A - *Colletotrichum* ; B – *Aerobasidium*; C – *Penicillium*; D – *Aspergillus*; E – *Cladosporium*; F - *Fusarium*
 Figura 52 - Isolados fúngicos dos tubérculos de *C. rotundus*

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *Cyperus rotundus* resultou no isolamento de compostos pertencentes a classes dos esteróides, sesquiterpenos, flavonoides e compostos fenólicos, pertencentes ao metabolismo secundário da espécie em estudo. O estudo permitiu ainda, identificar o triterpeno peróxido de ergosterol que é comumente encontrado na parede celular de fungos endofíticos.

A investigação do óleo essencial ao longo do ano revela variação no teor de óleo essencial no período seco e chuvoso, bem como variação qualitativa dos principais constituintes em função da época do ano em que os tubérculos foram coletados, tendo sido considerados os fatores abióticos como temperatura, época de coleta e precipitação, para avaliação da variação sazonal. Os principais constituintes identificados foram: β -selineno (5,79 à 7,34%), óxido de cariofileno (4,68 à 7,47%), cipereno (10,64 à 18,62%), ciperotundona (13,78 à 24,72%) e α -ciperona (20,34 à 23,73%),

No ensaio quantitativo de sequestro de radicais livres, o extrato em metanol da inflorescência e a luteolina revelaram forte atividade antioxidante. Nos ensaios enzimáticos frente as enzimas elastase e tirosinase os extratos e substâncias isoladas apresentaram fraca atividade inibitória. No entanto, no ensaio frente a enzima α -glucosidase os extratos hexânicos (tubérculos e inflorescência) e o óleo essencial apresentaram forte atividade.

O ensaio biológico realizado com *Artemia salina* L. revelou baixa toxicidade para o extrato em hexano e óleo essencial e moderada toxicidade do extrato em acetato de etila e em metanol.

Os resultados do teste colorimétrico realizados *in vitro* dirigidos à ação leishmanicida, contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, revelaram significativa atividade para o extrato hexânico (CI₅₀ = 3,65 μ g/mL), acetato de etila (CI₅₀ = 4,29 μ g/mL) e óleo

essencial ($CI_{50} = 5,07 \mu\text{g/mL}$), sugerindo a continuidade dos estudos em busca dos princípios ativos responsáveis por tal atividade.

Na avaliação da atividade antimicrobiana, o extrato hexânico (tubérculos) e o óleo essencial apresentaram moderada inibição contra as bactérias Gram positivas e forte inibição contra a levedura e o extrato metanólico (inflorescência) e o *d*-manitol apresentaram elevada atividade contra *Candida albicans*. Na avaliação da atividade de inibição de adesão microbiana o óleo essencial e *d*-manitol reduziram em cerca de 50% a capacidade de formação do biofilme com *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*, respectivamente.

A avaliação da microbiota fúngica de *C. rotundus* possibilitou isolar e identificar seis gêneros de fungos endofíticos, sendo o de maior ocorrência o *Colletotrichum*.

Os resultados deste estudo confirmaram o potencial químico e biológico da espécie para tratamento de diferentes patogenias, bem como, sugerem novos estudos no controle da enzima α -glucosidase e podem servir como subsídios para a descoberta de novas classes de antibióticos de origem vegetal, que possam satisfazer a demanda atual, tendo em vista que os agentes antibacterianos atualmente disponíveis no mercado são limitados devido à sua toxicidade, baixa efetividade e resistência bacteriana .

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4 ed. Illinois: Allured Publishing Corporation. 804 p. 2009.
- ALLAN, R. D.; WELLS, R. J.; CORREL, R. L.; MACLEOD, J. K. The presence of quinones in the genus *Cyperus* as an aid to classification. *Phytochemistry*, v. 17, p. 263 – 266, 1978.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quím. Nova*, v. 33, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, M.; ARAÚJO, A. C.; HEFLER, S. M.; TREVISAN, R.; SILVEIRA, G. H. LUZ, C. L. Cyperaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB000100>. (Acesso em 05/11/2013).
- ANDRADE, C. A.; BECERRA, J. J.; CÁRDENAS, V. R. Alfa-glucosidade-inhibiting activity of some Mexican plants used in the treatment of type 2 diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 116, p. 27-32, 2008.
- APG III (Angiosperm Phylogeny Group). An update of the Angiosperm Phylogeny Group Classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* v. 161, n. 2, p. 105-121, 2009.
- ARANTES, M. C. B.; OLIVEIRA, L. M. G.; FREITAS, M. R. F.; SILVA, L. N. M.; NOGUEIRA, J. C. M. PAULA, J. R.; BARA, M. T. F. Estudo farmacognóstico do *Cyperus rotundus* L. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 2, p. 17-20, 2005.
- ASANO, N. Glycosidase inhibitors: update and perspectives on practical use. *Glycobiology*, v. 13, p. 93-104, 2003.
- ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *International Journal of Parasitology*, v. 30, p. 1269-1281, 2000.
- AYAD, C. AL-Daody, AHMED, M. AL-Hyaly, AMMAR, A. AL-Soultany. Chromatographic identification of some flavonoids compounds from *Cyperus rotundus* growing in Iraq. *Tikrit Journal of Pure Science*, v. 15, p. 206-209, 2010.
- BACCHI, O. Plantas Invasoras de culturas. Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola. 840 p. 1989.
- BADASSARI, L.; CRETI, R.; MONTANARO, L.; OREFICI, G. ARCIOLA, C. R. "Pathogenesis of implant infections by enterococci," *International Journal of Artificial Organs*, v. 28, p. 1101–1109, 2005.
- BARBOSA, T. P.; SOUSA, S. C. O.; AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; ASSIS, P. A. C.; CALDAS, J. P. A.; OLIVEIRA, M. R.; VASCONCELOS, M. L. Design, synthesis and

antileishmanial in vitro activity of new series of chalcones-like compounds: a molecular hybridization approach. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 19, p. 4250, 2011.

BASHIR, A.; SULTANA, B.; AKHTAR, F. H.; MUNIR, A.; HASSAN, M. A. Investigation on the antioxidant activity of *Dheela Grass (Cyperus rotundus)*. *African Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 4, p. 1-6, 2012.

BISHT, A.; BISHT, G. R. S.; SINGH, M.; GUPTA, R.; SINGH, V. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of tubers of *Cyperus rotundus* Linn. collected from Dehradun (Uttarakhand). *International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, v. 2, p. 661-665, 2011.

BLANCO, F. M. G. Invasoras. *Caderno Técnico. Cultivar Grandes Culturas*, Pelotas, n. 90, p. 2-7, 2006.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, F. B. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. *Enciclopédia Biosfera. Centro Científico Conhecer*, vol.7, p. 1-20, 2011.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. *Revista de Saúde Pública*, v. 44, p. 200-202, 2010.

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, 1ª Edição, Brasília-DF, 2009.

BRUHL, J. J. Sedge genera of the world: relationships and a new classification of the Cyperaceae. *Australian Systematic Botany* v. 8, p. 125-305, 1995.

BRYSON, C. T. CARTER, R. The significance of Cyperaceae as Weeds. In: Naczi, R. F. & Ford, B. A. (Eds.). *Sedges: uses, diversity and Systematics of the Cyperaceae*. Saint Louis, Missouri Botanical Gardens Press, p. 15-101, 2008.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. v. 33, p. 179–190, 2000.

CARVALHO, C. A.; MATTA, S. L. P.; MELO, F. C. S. A.; ANDRADE, D. C. F. CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; SILVA, M. B. ROSA, M. B. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. 6, p. 51-57, 2009.

CASTELLANI, D.C.; DOMENICO, C.I.; RONCOLETTA, L. M. A.; SILVA, A. C.; TOZAKI, R. M.; OLIVEIRA, D. H. Coeficientes técnicos de produção da pripioca (*Cyperus articulatus* L.) em sistema orgânico, na região de Belém (PA). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 13, p. 606-611, 2011.

CHANG, TE-SHENG. An Updated Review of Tyrosinase Inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 10, p. 2440-2475, 2009.

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

CORDEIRO, S. Z. Composição e distribuição da vegetação herbácea em três áreas com fisionomias distintas na Praia do Peró, Cabo Frio, RJ, Brasil. *Acta Botânica Brasilica*, v. 19, p. 679-693, 2005.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Química Nova*, v. 32, p. 78-81, 2009.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G. MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. A Pyrimidine- α -carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity, *J. Nat. Prod.*, v. 69, p.292-294, 2006.

COSTA, A. A.; ABREU, A. L.; GOMES, C. M.; SALDANHA, A. C.; BARRAL, A.; COSTA, J. M. Experimental model of chronic osteomyelitis caused by *Leishmania (L.) amazonensis*. *Acta Tropica*, v. 98, p. 125-129, 2006.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. "Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections". *Science*, v. 284, p. 1318-1322, 1999.

CRONQUIST, A. The evolution and Classification of Flowering Plants. 2^a ed. Bronx: the New York Botanical Garden, p. 280 – 282, 1998.

DAHLGREN, R. M. T. A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 80, p. 91-124, 1985.

DARWAZETH, A.; AL-REFAI, S.; AL-MOJAIWEL S. Isolation of *Candida* species from the oral cavity and fingertips of complete denture wearers. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 86, p. 420-423 2001.

_____. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Poder Executivo, Brasília, DF, Seção 1, p. 2, 2006.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, v. 14, p. 417-423, 1996.

DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, v. 88, p. 308– 316, 2000.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G, DELARMELENA, C. Anti-candida activity of Brazilian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacologia*, v. 97, p. 305-311, 2005.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento*/Organizado por Simões, C. M. O. et al. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS, p. 91-103, 2002.

ERASMO, E. K. A.; ALVES, P. L. C. A.; KUVA, M. A. Fatores que afetam a brotação de tubérculos de tiririca (*Cyperus rotundus* L.): Qualidade da luz, concentração de CO₂, e temperatura. *Cultura Agronômica*, v. 3, n.1, p. 55-65, 1994.

FERRARI, P. H. P.; CAI, S.; BOMBANA, A. C. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infection. *International Endodontic Journal*, v. 38, p. 372-380, 2005.

FINNEY, D. J. Probit Analysis. 3^a ed. Cambridge: Cambridge University Press. p.76-80, 1971.

FISHER, A.; BROUQUISSE, R.; RAYMOND, P. Influence of senescence and of carbohydrate levels on the pattern of leaf proteases on purple nutsedge (*Cyperus rotundus* L.). *Physiologia Plantarum Lund*, v. 102, n. 3, p. 385-395, 1998.

GOAD, L. J.; GOODWIN, T. W. The biosynthesis of sterols in higher plants. *Biochemical Journal*, v. 99, p. 735, 1966.

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

GOETGHEBEUR, P. Cyperaceae. The families and genera of vascular plants, IV: Flowering plants – monocotyledons. Berlin, Springer –Verlag, p. 141-190, 1998.

GOVAERTS, R.; SIMPSON, D.; BRUHL, J.; EGOROVA, T.; GOETGHEBEUR, P.; WILSON, K. World Checklist of Cyperaceae – Sedges. Kew, Richmond Surrey, Royal Botanic Gardens, 2007.

GUDDAT, L. Drug targets for the treatment of protozoan parasitic diseases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.11, p. 2010-2011, 2011.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, p. 667-679, 2010.

GUERRA J.; BARBOSA, M. G. V.; LOUREIRO, A. C. S. P.; COELHO, C. P.; ROSA, G. Leishmaniose tegumentar americana em crianças: aspectos epidemiológicos de casos atendidos em Manaus, Amazonas, Brasil. *Cad. de Saúde Pública*, v. 23, p. 2215-2223, 2007.

GUO, B.; WANG, Y.; SUN, X.; TANG, K. Bioactive Natural Products from Endophytes: A Review. *Applied Biochemistry and Microbiology*, v. 44, p. 136–142, 2008.

- HA, J.A.; LEE, K.Y.; CHOL, J.; KANG, B.S.; LIM, J.C.; LEE, D.U. Modulation of radioligand binding to the GABA(A) – benzodiazepine receptor complex by a new component from *Cyperus rotundus* L. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 25, p.128-130, 2002.
- HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A.; WILSON, K. L.; Flavonoids in leaves and inflorescences of Australian *Cyperus* species. Phytochemistry, v. 21, p. 2491-2507, 1982.
- INGLIS, C. Checklist of economically important Cyperaceae. Cyperaceae Newsletter, v. 4, p. 256-360, 1994.
- JAKELAITIS, A.; FERREIRA, L. R.; SILVA, A. A.; AGNES, E. L.; MIRANDA, G. V. Efeitos de sistemas de manejo sobre a população de tiririca. Planta Daninha, v. 21, p. 89-95, 2003.
- JEONG, S. J.; TOMOFUMI, M.; INAGAKI, M.; KIM, Y. C.; HIGUCHI, R. Rotundines A-C, three novel sesquiterpene alkaloids from *Cyperus rotundus*. Journal of Natural Products, v. 63, p. 673-675, 2000.
- JIN, J. H.; LEE, D.; KIM, Y. S.; KIM H. P. Anti-allergic activity of sesquiterpenes from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. Archives of Pharmacal Research, v. 34, p. 223-228. 2011.
- JIROVETZ, L.; WOBUS, A.; BUCHBAUER, G.; SHAFI, M. P.; THAMPI, P.T. Comparative analysis of the essential oil and SPME-headspace aroma compounds of *Cyperus rotundus* L. roots/tubers from South-India using GC, GC-MS and olfactometry. Journal Essential Oil-Bearing Plants, v. 7, p. 100-106. 2004.
- JORDA, R.; SACERDOTI-SIERRA, N.; VOLLER, J.; HAVLICEK, L.; KRACALIKOVÁ,; NOWICKI, M. W.; NASEREDDIN, A.; KRYSTOF, V.; STNARD, M.; WALKINSSHAW, M. D.; JAFFE, C. L. Anti-leishmanial activity of disubstituted purines and related pyrazolo[4,3-d]pyrimidines. Bioorganic Medicinal Chemistry Letters, v. 21, p. 4233, 2011.
- KEMPRAJ, V.; BHAT, S. K. Ovicidal and larvicidal activities of *Cyperus giganteus* Vahl and *Cyperus rotundus* Linn. essential oils against *Aedes albopictus* (Skuse). Natural Product Radiance, v. 7, p. 416-419, 2008.
- KILANI, S.; ABDELWAHED, A.; CHRAIEF, I.; BEM, A. R.; HAYDER, N.; HAMMAMI, M.; GHEDIRA K.; CHEKIR, G. L. Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (Tunisian) *Cyperus rotundus*. Journal Essential Oil Research, v. 17, p. 695–700, 2005.
- KILANI, S.; LEDAUPHIN, J.; BOUHLEL, I.; SGHAIER, M. B. Comparative Study of *Cyperus rotundus* Essential Oil by a Modified GC/MS Analysis Method. Evaluation of Its Antioxidant, Cytotoxic, and Apoptotic Effects. Chemistry & Biodiversity, v. 5, p. 729-742, 2008.
- KIM, Y.; KOBAYASHI, U. S. Inhibition effects of (+)-catechinaldehyde polycondensates on proteinases causing proteolytic degradation of extracellular matrix. Biochemical and Biophysical Research Commun, v. 320, p. 256-261, 2004.

KIM, S. J.; KIM, J. H.; KIM, JANG, Y. P.; SOOK, M. O.; JANG, D. S. New patchoulane-type sesquiterpenes from the rhizomes of *Cyperus rotundus*. Bulletin. Korean Chemistry Society, v. 33, p. 3115-3118, 2012.

KISSMANN, K. G. Plantas Infestantes e nocivas. BASF - Brasileira S/A. São Paulo. 608 p. 1991.

KOMAI, K.; CHUNG, S. T. A chemotype of *Cyperus rotundus* in Hawaii. Phytochemistry, v. 28, p. 1883 – 1886, 1989.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Leishmaniasis y las leishmanias del nuevo mundo, con particular referencia en Brasil. Boletín de La Oficina Sanitaria Panamericana, v. 76, p. 93, 1974.

LAMBERT, P.A. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. Advanced Drug Delivery Reviews, v. 57, p. 1471–1485, 2005.

LEVY, S. B. Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 49, p. 25–30, 2002.

LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA, J. I.; COSTA, E. V. *In Vitro* Antileishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae), Revista Virtual de Química, v. 4, p. 692-702, 2012.

LOPES, N. P.; KATO, M. J.; AGUIAR, E. H.; MAIA, J.G.S.; MASSAYOSHI, Y. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. Phytochemistry, v. 46, p. 689-93, 1997.

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

LORENZI, H. Plantas daninhas do Brasil. Nova Odessa, SP, Instituto Plantarum, 440 p. 2003.

LUCENO, M.; ALVES, M.V.; MENDES, A.P. Catálogo florístico y claves de identificación de las ciperáceas de los estados de Paraíba y Pernambuco (Nordeste do Brasil). Anales Jardín Botánico Madrid, v, 55, p 67-100, 1998.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA-JR, V. F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares, Química Nova, v. 25, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, W. C. S.; MISSAGIA, R, V.; COSTA, F. A. F.; COSTA, M. C. M.; Diversidade de fungos endofíticos em candeia *Eremanthus erythropappus* (DC.) Revista Cerne, v. 14, p. 267-273, 2008.

MAGILL, A.J. Epidemiology of leishmaniasis. Dermatologia Clínica, v. 13, p. 5023-5055, 1995.

MARINHO, A. M. R.; FILHO, E. R.; MOUTINHO, M. L.; SANTOS, L. S. Biologically active polyketides produced by *Penicillium janthinellum* isolated as an endophytic fungus

from fruits of *Melia azedarach*. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 16, p. 280-283, 2005.

MATOS, Francisco José de Abreu. Introdução a fitoquímica experimental. 3 ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 150p, 2009.

MAZIERO, M. T.; BERSOT, L. S. Mitoxinas em alimentos produzidos no Brasil. Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais, v.12, p.89-99, 2010.

MEDEIROS, M. G. F.; SILVA, A. C.; CITO, A. M. G. L.; BORGES, A. R.; LIMA, S. G.; LOPES, J. A. D.; FIGUEIREDO, R. C. B. Q. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides*. Parasitology International, v. 60, p. 237, 2011.

MEENA, A. K.; YADAV, A. K.; NIRANJAN, U. S.; SINGH, B.; NAGARIYA, A. K.; VERMA, M. Review on *Cyperus rotundus* – A potential herb. Journal of Pharmaceutical Clinical Research, v. 2, p. 20-22, 2010.

MELZIG, M. F.; LOSER, B. C. Inhibition of neutrophil elastase activity by phenolic compounds from plants. Pharmazie, v. 56, p. 967-970, 2001.

MENDONÇA-FILHO, R. R.; RODRIGUES, I. A.; ALVIANO, D. S.; SANTOS, A. L. S.; SOARES, R. M. A.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. C. S.; ROSA, M. S. S. Leishmanicidal activity of polyphenolic rich extract from Husk Fiber of *Cocos nucifera* Linn. (Palmae). Research in Microbiology, v. 155, p.136-43, 2004.

METCALFE, C.R. Anatomy as an aid to classifying the Cyperaceae. American Journal of Botany, v. 56, p. 782-790, 1969.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. Planta Médica, v. 45, p.31-34, 1982.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade Leishmanicida. Revista Virtual de Química, v. 4, p. 268-286, 2012.

MILÉO, L. J.; SILVA, J. F.; BENTES, J. L. S.; CHISTOFFOLETI, P. J. Plantas daninhas hospedeiras alternativas de *Colletotrichum guaranicola* em cultivos de guaraná no Estado do Amazonas. Planta daninha, v. 25, p. 771-772, 2007.

MOHAMMADI, Z.; SHALAVI, S.; YAZDIZADEH, M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. Chonnam Medical Journal, v. 48, p.133-140, 2012.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Journal Science and Technology, v. 26, p. 211-219, 2004.

MOREIRA, Maria Manuela Nunes de Castro. Benzoquinonas existentes em espécies de *Cyperus* da flora Portuguesa, contribuição para o seu conhecimento. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas – Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Portugal. 168p, 1990.

MORIMOTO, M.; FUJII, Y.; KOMAI, K. Antifeedants in ciperaceae: coumaran and quinones from cyperus spp. *Phytochemistry*, v. 51, p. 605 – 608, 1999.

NASSAR, M. I.; ABDEL, A. F.; EL-DIN, E.; EL-KHRISY, A. M.; DAWIDAR, A. A. M.; BYSTTORN, A.; MABRY, T. J. A benzoquinone and flavonoids from *Cyperus alopecuroides*. *Phytochemistry*, v. 60, p. 385, 2002.

NAUDE, T. W. BOTHA, C. J.; VORSTER, J. H.; ROUX, C. VAN, J. L. Claviceps cyperi, a new cause of severe ergotism in dairy cattle consuming maize silage and teff hay contaminated with ergotised *Cyperus esculentus* (nut sedge) on the Highveld of South África. *Journal Veterinary Research*, v. 72, p. 23-27, 2005.

NAZARRO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on athogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NEVES, D. P. *Parasitologia humana*. 9ª ed. São Paulo. Editora Atheneu. 524 p. 2001.

NYASSE, B.; GHOGOMU, R.; TIH, B. L.; SONDEGAN, M. T.; MARTIN, B. Mandassidione and other sesquiterpenic ketones from *Cyperus articulatus*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 673 – 675, 1988.

OFOEFULE, A. U.; IBETO, C. N.; OKORO, U. C.; ONUKWULI, O. D. Biodiesel Production from Tigernut (*Cyperus esculentus*) oil and characterization of its blend with petro-diesel. *Physical Review & Research International*, v. 3, p. 145-153, 2013.

OHIRA, S.; TAISEKE, H.; KEN-ICHIRO, H; TAKUJI, H.; DAISUKE, T.; HIROSHI, N. Sesquiterpenoides from *Cyperus rotundus*. *Phytochemistry*, v. 47, p. 1577-1581. 1998.

OLADIPUPO, A. L.; ADEBOLA, O. O. Chemical composition of the essential oils of *Cyperus rotundus* L. from south Africa. *Molecules*, v. 14, p. 2909-2917, 2009.

OMS 56ª ASAMBLEA MUNDIAL DE LA SALUD: Punto 14.10 del orden del día provisional. Ginebra: OMS. (2003b) Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra, 2003.

PAWELEK, J. M.; CHARRABORTY, A. K.; OSBER, M.P.; BOLOGNIA, J. L. Ultraviolet ligh and pigmentation of the skin. *Cosmetics & Toiletries*, v. 107, p. 61-67, 1992.

PIMENTEL, I. C.; BLANCO, C. B.; GABARDO, J.; STUART, R. M.; AZEVEDO, J. L. Identification and Colonization of Endophytic Fungi from Soybean (*Glycine max* (L.) Merril) under different Environmental Conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 49, p. 705-711, 2006.

PRAKASH, N.; RAGAVAN, B. Phytochemical observation and antibacterial activy of *Cyperus esculentus* L. *Ascient Science of Life*, v. 28, p. 16-20, 2009.

PURATCHIKODY, A.; NITHYA, D.; NAGALAKSMI, G. Wound healing activity of *Cyperus rotundus* Linn. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 68, p. 97-101, 2006.

RAKOTONIRINA, V. S.; BUM, E. N.; RAKOTONIRINA, A.; BOPELET, M. Sedative properties of the decoction of the rhizome of *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia* v. 72, p. 22-29, 2001.

RAUT, N. A.; GAIKWAD, N. J. Antidiabetic activity of hydro-ethanolic extract of *Cyperus rotundus* in alloxan induced diabetes in rats. *Fitoterapia*, v. 77, p. 585–588, 2006.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F.; SANTOS, K. R. N. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics*, v. 30, p. 315–320, 2004.

RUKUNGA, G. M.; MUREGI, F. W.; OMAR, S. A.; GATHIRWA, J. W.; MUTHAUARA, C. N.; PETER, M. G.; HEYDENREICH, M.; MUNGAI, G. M. Anti-plasmodial activity of the extracts and two sesquiterpenes from *Cyperus articulatus*. *Fitoterapia*, v. 79, p.188-190, 2008.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; LO CASCIO, R.; TROMBETTA, D.; PROTOGGENTE, A.; DE PASQUALE, A. Ferulic and caffeic acids as potential protective agents against photooxidative skin damage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 79, p. 476–480, 2000.

SANTOS, Ana Lúcia Mendes. Contribuição ao estudo Químico e Biológico de *Cyperus rotundus* L. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas. 96 p, 2003.

SEABRA, R. M.; SILVA, A. M. S.; ANDRADE, P. B. MOREIRA, M. M. In vitro Antifungal activity of three geophytic plant extracts against three post-harvest pathogenic fungi. *Phytochemistry*, v. 48, p. 1429-1432, 1998.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Deciphering molecular mechanism underlying antileishmanial activity of *Nyctanthes arborescens*, an Indian medicinal plant. *Journal Ethnopharmacology*, v. 134, p. 996, 2011.

SILVA, B. S.; FERRERES, F.; MALVA, JO, DIAS, ACP. Phytochemical and antioxidant characterization of *Hypericum perforatum* alcoholic extracts. *Food Chemistry*, v. 90, p. 157-167. 2006.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; LIMA, J. P. S.; SANTOS, D. M. F.; JARDIM, I. S.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Leishmanicidal activity of fractions rich in aporphine alkaloids from Amazonian *Unonopsis* species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, p. 1368-1371, 2012.

SILVA-JARDIM, I; LIMA, E. R; MOREIRA, L. S; FACUNDO, V. A; TELES, C. B. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *Combretum leprosum* contra microrganismos. *Saber científico*, v. 3, p. 53-69, 2011.

SILVEIRA, S. T. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) na Amazônia, Brasil: Aspectos clínicos e epidemiológicos. *Gazeta Médica*, v. 79, p. 25-29, 2009.

SIMPSON, A. D.; INGLIS, A. C. Cyperaceae of economic, ethnobotanical and horticultural importance: a checklist. Kew Bulletin, v. 56, p. 257-360, 2001.

SINGH, A.; MAURYA, S.; SINGH, R.; SINHG, U. P. Antifungal efficacy of some ethyl acetate extract fractions of *Cyperus rotundus* rhizomes against spore germination of some fungi. Archives of Phytopathology And Plant Protection, v. 44, p. 2004-2011, 2011.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, v. 20, p. 144-158, 1965.

SONWA, M. M.; KOENIG, W. A. Chemical study of essential oil *Cyperus rotundus*. Phytochemistry, v. 58, p. 799-810, 2001.

SOROS, C. L. BRUHL, J. J. Multiple evolutionary origins of C4 photosynthesis in the Cyperaceae. p. 629-636. In: K.L. Wilson & D.A. Morrison (eds.). Monocots: Systematics and Evolution Melbourne, CSIRO Publishing, 2000.

SOUMAYA, K. ABDELWAHED, A.; AMMAR, R. B.; HAYDER, N. Chemical composition, antibacterial and antimutagenic activities of essential oil from (tunisian) *Cyperus rotundus*. Journal of Essential Oil Research, v. 20, n. 3, p. 478-484, 2005.

SOUMAYA, K; ABDELWAHED, A.; AMMAR, R. B.; HAYDER, N. Comparative Study of *Cyperus rotundus* Essential Oil by a Modified GC/MS Analysis Method. Evaluation of Its Antioxidant, Cytotoxic, and Apoptotic Effects. Chemistry & Biodiversity, v. 5, p. 729-742. 2008.

SPENCER, H. R.; IKE, V.; BRENNAN, P. A. Review: the use of sodium hypochlorite in endodontics — potential complications and their management. Journal British Dental, v. 202, p. 555-559, 2007.

STROBEL, G.A.; DAISY, B. Bioprospecting for microbial endophytes and their natural products. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 67, p. 491-502, 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. In: _____. Plant Physiology. Redwood City: Benjamin Cummings, p.318-345, 1991.

THEBTARANONTH, C.; THEBTARANONTH, Y.; WANAUPPTHAMKUL, S.; YUTHAVONG, Y. Antimalarial sesquiterpenes from tubers of *Cyperus rotundus*: structure of 10,12-peroxycalamenene, a sesquiterpene endoperoxide. Phytochemistry, v. 40, p.125–128, 1995.

THRING, T.S. A; HILI, P.; NAUGHTON, D. P. Anti-collagenase, anti-elastase and antioxidant activities of extracts from 21 plants. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 9, p. 256-260, 2009.

TURABEKOVA, M. A.; VINOGRADOVA, V. I.; WERBOVETZ, K. A.; CAPERS, J.; RASULEV, B. F.; LEVKOVICH, M. G.; RAKHIMOV, S. B.; ABDULLAEV, N. D. Structure activity relationship investigations of leishmanicidal N-benzylcytosine derivatives. Chemical Biology and Drug Design.v. 78, p. 183, 2011.

- UDDIN, S. J.; MONDAL, K.; SHILPI, J. A.; RAHMAN, M. T. Antidiarrhoeal activity of *Cyperus rotundus*. *Fitoterapia*, v. 77, p.134–136, 2006.
- UEDA, N. T.; MENDONÇA, F. R. R.; MORGADO, D. J. A.; MAZA, P. K.; DIAS, F. B. P.; CORTEZ, D. A. G.; ALVIANO, D. S.; ROSA, M. S. S.; LOPES, A. H. C. S.; ALVIANO, C. S.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology International Journal*, v. 55, p. 99-105, 2006.
- UMERIE, S. C.; EZEUZO, H. O. Physicochemical characterization and utilization of *Cyperus rotundus* starch. *Bioresource Technology*, v. 72, p. 193-196, 2000.
- VAN-HELLEMOND, J. J.; TIELENS, A. G. M. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 85, p. 135–138, 1997.
- VOULDOUKIS, I.; ROUGIER, S.; DUGAS, B.; PINO, P.; MAZIER, D.; WOEHLÉ, F., Canine visceral leishmaniasis: Comparison of in vitro leishmanicidal activity of marbofloxacin, meglumine antimoniate and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology*, v. 146, p. 135-137, 2006.
- WERT, L.; ALAKURTTI, S.; CORRAL, M. J.; SANCHEZ-FORTUN, S.; YLIKAUHALUOMA, J.; ALUNDA, J. M. Toxicity of betulin derivatives and in vitro effect on promastigotes and amastigotes of *Leishmania infantum* and *L. donovani*. *Journal Antibiotic*, v. 64, p. 475, 2011.
- WONG, W. Y.; ZHOU, Y. Q.; HUANG, X. J.; ZHANG, Q. W. Preparative and purification and α -cyperone from *Cyperus rotundus* Linn. with high speed counter-current chromatography. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, v. 3, p. 163-168, 2013.
- YAN, J.; ZHANG, G.; PAN, J.; WANG, Y. α -glucosidase inhibition by luteolin: kinetics, interaction and molecular docking. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 64, p. 213–223, 2014.
- YAN-XU.; HONG-WU, Z.; CHANG-YAN, Y.; ZOU, Z. M. Complete assignments of ^1H and ^{13}C NMR data for two new sesquiterpenes from *Cyperus rotundus* L. *Magnetic Resonance Chemistry*, v. 47, p. 527-531, 2009.
- YAN-XU.; HONG-WU, Z.; CHANG-YAN, Y.; YANG, L.; CHANG, Y.; ZHONG-MEI, Z. Norcyperone, a Novel Skeleton Nor-sesquiterpene from *Cyperus rotundus* L. *Molecules*, v. 13, p. 2474-2481, 2008.
- YUE, J.; CHEN, S.; SUN, H. Sterol from the fungi *Lactarium volemus*. *Phytochemistry*, v. 56, p. 801-806, 2001.
- ZEID, A. M. N.; MAJID, S. J.; RAGHIDAH, I. W.; HUDA, A. K. H. Extraction, identification and antibacterial activity of *Cyperus* oil from Iraq. *Engineering & Technology*, v. 26, p.10, 2008.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chemistry, v. 64, p.555-559, 1999.

ZHOU, Z. & YIN, W. Two novel phenolic compounds from the rhizomes of *Cyperus rotundus* L. Molecules, v. 17, p. 12636-12641, 2012.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H. N.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Natural products inhibiting *Candida albicans* secreted aspartic proteases from *Tovomita krukovii*. Planta Médica, v. 68, p. 49–54, 2002.

ZOGHBI, M. D. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; ROCHA, E. A. S. Comparison of the main Components of the essential oils of "priprioca": *Cyperus articulatus* var. *articulatus* L., *C. articulatus* var. *nodosus* L., *C. prolixus* Kunth and *C. rotundus* L. Journal Essential Oil Research, v. 20, p. 42-46. 2008.