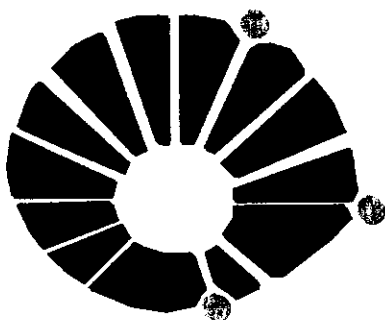




1150057304



T/UNICAMP R859e



Universidade Estadual de Campinas – Unicamp
Instituto de Química – IQ
Departamento de Química Orgânica - DQO

**Estudo Fitoquímico de Algumas Espécies de *Eleocharis* R. Br.
(Cyperaceae).**

Isolamento, Elucidação Estrutural e Atividade Biológica.

Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz

**Tese de Doutorado apresentada como parte
das exigências para conclusão do Doutorado
em Química – Área de concentração: Química
Orgânica.**

Profa. Dra. Eva Gonçalves Magalhães
Orientadora

03 de Outubro de 2003
Campinas, São Paulo – Brasil.

INIDADE 1.1
1ª CHAMADA 1.1.1
RBC
EX
OMBO BC/ 730
ROC 16/12/1994
D <
REÇO 1.1.1
ATA 1.1.1
2º CPD

B ID 311200

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

R859e

Ruiz, Ana Lúcia Tasca Gois

Estudo fitoquímico de algumas espécies de Eleocharis R. Br. (Cyperaceae): isolamento, elucidação estrutural e atividade biológica. / Ana Lúcia Tasca Gois Ruiz. -- Campinas, SP: [s.n], 2003.

Orientadora: Eva Gonçalves Magalhães

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Triterpenos. 2. Esteróides. 3. Atividade moluscocida. 4. Citotoxicidade. I. Magalhães, Eva Gonçalves. II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

A Deus pela vida.

*A meu esposo, Antonio, grande amor de minha vida,
pelo amor, dedicação e incentivo, e
A nosso filho, Bruno, primeiro fruto do grande amor de nossas vidas.*

*A meus pais, Amadeu e Maria de Lourdes,
pelo amor, carinho e constante presença.*

*A meu sogro Jesus,
meus irmãos Vanderlei e Amadeu Jr,
minhas cunhadas Gislaine, Olímpia e Silvia,
meus cunhados Miguel e Olivalte
meus sobrinhos Cíntia, Ciro, Vinicius, Gabriela e Laura,
minha tia Antonia e minha prima Lígia
pela amizade sempre presente.*

Eu dedico esta tese, fruto de muito trabalho e esforço.

“Agora, permanecem três coisas: a Fé, a Esperança e o Amor.

Porém a maior delas é o Amor ”.

I Cor 13, 13s.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pela bolsa de estudos e recursos concedidos.

À Profa. Eva Gonçalves Magalhães, pela excelente orientação, carinho, confiança e, sobretudo, pela amizade e incentivo.

Ao Prof. Aderbal F. Magalhães, pelo apoio e pela amizade.

À Profa. Maria do Carmo E. do Amaral e sua doutoranda Aparecida D. Faria pelas valiosas informações e discussões botânicas e pela atenção sempre carinhosa.

À Dra. Deborah Regina Serrano, ao Prof. Dr. Luiz A. Magalhães e à Profa. Dra. Eliana M. Zanotti-Magalhães pela colaboração na realização dos ensaios de atividade moluscocida e pela atenção sempre presente.

À Profa. Dra. Anita Joceline Marsaioli e sua doutoranda Sra. Adriana Flach pela colaboração na realização das análises dos óleos voláteis e pelo carinho dispensado.

Aos funcionários do Instituto de Química, em especial às técnicas do laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Sonia Crisóstomo e Sonia Fanelli, pelo excelente trabalho técnico e à Maria Lopez, anjo da guarda do laboratório, pela amizade e apoio técnico.

Às amigas Celira, Lourdes, Maria del Pilar, Mary Ângela, Miriam e Valéria que acompanharam e incentivaram este trabalho.

Aos colegas de grupo e de laboratório pela convivência agradável.

A todos, que direta ou indiretamente, colaboraram para a elaboração deste trabalho.

CURRICULUM VITAE

- **Técnico em Bioquímica (1987-1990):** Escola Técnica Estadual “Conselheiro Antonio Prado”, ETECAP.
- **Graduação: Ciências Farmacêuticas (1991-1995):** Faculdade de Ciências Médicas, Pontifícia Universidade Católica de Campinas.
- **Mestre em Química (1996-1998):** Dissertação: Estudo fitoquímico de *Poecilanthe parviflora* Benth. e *Lonchocarpus atropurpureus* Benth. (Leguminosae) – Isolamento, determinação estrutural e atividade biológica. Orientadora: Profa. Dra. Eva G. Magalhães. Instituto de Química, Unicamp.
- **Cursos Extracurriculares**
 1. “Tópicos especiais em RMN de Produtos Naturais”. Prof. Dr. Cosimo Pizza. IQ, UNESP/Araraquara, Abril de 1999 (90h de duração).
 2. “Biosynthesis of Marine Natural Products”. Profa. Dra. Mary J. Garson. IQ, USP/São Carlos, Julho de 1999 (24h de duração).
 3. “Introdução à Química Computacional”. CENAPAD/Unicamp. Setembro de 2000 (20h de duração).
- **Artigos:**
 1. Magalhães AF, Ruiz ALTG, Tozzi AMGA, Magalhães EG. Dihydroflavonols and flavanones from *Lonchocarpus atropurpureus* roots. *Phytochemistry* **52** (3): 1681-1685, 1999.
 2. Magalhães AF, Ruiz ALTG, de Faria AD, Magalhães EG, do Amaral MCE. Steroids and triterpenes from *Eleocharis acutangula* and *Eleocharis sellowiana* (Cyperaceae). *Phytochemical Analysis*, no prelo, 2003.
 3. Magalhães AF, Ruiz ALTG, de Faria AD, Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães EG, Magalhães LA, do Amaral MCE. Molluscicidal evaluation of

four Brazilian species of the genus *Eleocharis*. *Revista Bioikos*, submetido em junho de 2003.

• **Participação em congressos:**

1. 23ª RASBQ, Apresentação de pôster: PN-103, 2000.
2. 22nd IUPAC International Symposium on the Chemistry of Natural Products, Apresentação de poster: PPA-061, 2000.
3. 24ª RASBQ, Apresentação de pôster: PN-007, 2001.
4. XXIII RESEM, Apresentação de pôster, 2001.
5. III EBEQ, Apresentação de pôster, 2002.
6. 26ª RASBQ, Apresentação de pôster: PN-007, 2003.
7. XXV RESEM, Apresentação de pôster, 2003.

• **Resumos publicados em revistas**

1. Magalhães AF, Ruiz ALTG, de Faria AD, Magalhães EG, do Amaral MCE. "Betulinic acid, steroids, and esters of fatty acids from *Eleocharis sellowiana* Kunth extracts". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13** (suppl. 1): S99, 2001.
2. Magalhães AF, Ruiz ALTG, de Faria AD, Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães EG, Magalhães LA, do Amaral MCE. "Molluscicidal saponins from *Eleocharis sellowiana* Kunth". *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **13** (suppl. 1): S99, 2001.
3. Magalhães AF, Ruiz ALTG, de Faria AD, Serrano DR, Zanotti-Magalhães EM, Magalhães EG, Magalhães LA, do Amaral MCE. "Atuação moluscocida da *Eleocharis sellowiana*". *Jornal Brasileiro de Patologia* **37** (4): 239, 2001.

**Estudo Fitoquímico de Algumas Espécies de *Eleocharis* R. Br.
(Cyperaceae):
Isolamento, Elucidação Estrutural e Atividade Biológica.**

RESUMO

A análise fitoquímica de *Eleocharis acutangula*, *E. interstincta* e *E. sellowiana* resultou na identificação, por CG/EM, de oito alcanos de cadeia longa, dezoito ésteres de ácidos graxos, diidroactinidiolídeo, três sesquiterpenos, fitona e neofitadieno além de octadecanol e três açúcares na forma de seus derivados acetilados e de vários derivados do ácido ftálico. Através das técnicas de EM e RMN-1D (RMN¹H, ¹³C, DEPT, NOESY 1D e TOCSY 1D) e -2D (gCOSY, HSQC, HMBC) foram elucidados hexadecanoato de *E*-fitila, cinco triterpenos sendo dois inéditos, cinco esteróides dos quais um é inédito, e duas misturas de derivados de sacarose. Os compostos inéditos foram caracterizados como **neohopa-13(18)-eno-3 α -ol**, **3 α -hidroxi-13 α ,17 α ,21 α -hopano-15,19-diona** e **estigmasta-22-eno-3 β ,6 β ,9 α -triol**. Este é o primeiro relato da ocorrência de voláteis florais no gênero *Eleocharis* e na família Cyperaceae. Todos os extratos foram avaliados quanto às atividades antimicrobiana (bioautografia), citotóxica (ensaio de letalidade com *Artemia salina*) e moluscocida (ensaio de letalidade com desovas e indivíduos adultos de *Biomphalaria glabrata*, hospedeiro intermediário do *Schistosoma mansoni*). Os extratos hexânicos das partes subterrâneas de *E. sellowiana* e de *E. acutangula* foram ativo, respectivamente, contra o fungo *Alternaria alternata* e contra *A. salina* (CL₅₀ = 476 μ g/mL, indicativo de citotoxicidade). Já o extrato hidro-etanólico da parte subterrânea de *E. sellowiana* apresentou atividade ovicida no ensaio com desovas de *B. glabrata* (CL₅₀ = 24,27 μ g/mL).

**Phytochemical analysis of some *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae)
species:**

Isolation, Structural Elucidation and Biological Activities.

ABSTRACT

Phytochemical investigation of *Eleocharis acutangula*, *E. interstincta* and *E. sellowiana* extracts had furnished by GC/MS eight long chain alkanes, eighteen fatty acid esters, dihydroactinidiolide, three sesquiterpenes, phytone, neophytadiene, the acetates of octadecanol and three sugars and some phthalates. Using MS, 1D- (RMN¹H, ¹³C, DEPT, NOESY 1D e TOCSY 1D) and 2D- (gCOSY, HSQC, HMBC) NMR techniques, five triterpenes, five steroids, *E*-phythyl hexadecanoate and two mixtures of sucrose derivatives were elucidated. Three new compounds had been identified as **neohop-13(18)-en-3 α -ol**, **3 α -hydroxy-13 α ,17 α ,21 α -hopan-15,19-dione** and **stigmast-22-en-3 β ,6 β ,9 α -triol**. This is the first relate of floral volatiles identified in the *Eleocharis* genus and even in Cyperaceae family. All extracts were tested for antimicrobial activity (Bioautography method), citotoxicity (Brine Shrimp Lethality bioassay) and molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata*, the intermediate host of *Schistosoma mansoni*. The hexanic extract of *E. sellowiana* (fresh subterraneous parts) was active against the fungus *Alternaria alternata* and the hexanic extract of *E. acutangula* (fresh subterraneous parts) was active in the BSL bioassay (LC₅₀ = 476 μ g/mL), while the other extracts showed LC₅₀ >> 10³ μ g/mL. The aqueous ethanolic extract of *E. sellowiana* (fresh subterraneous parts) was active against *B. glabrata* spawns (LC₅₀ = 24.27 μ g/mL).

ÍNDICE GERAL

	Página
<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	1
1. Introdução Geral	2
2. Descrição Botânica	11
3. Objetivos	18
 <u>CAPÍTULO I. ANÁLISE FITOQUÍMICA</u>	 19
I. 1. Introdução	20
I. 2. Materiais e Métodos	20
I. 2. 1. Nomenclatura empregada na designação dos extratos	20
I. 2. 2. Obtenção dos Extratos	21
I. 2. 3. Isolamento e determinação estrutural dos metabólitos secundários	23
I. 2. 3. 1. Fracionamento dos Extratos Hexânicos	25
I. 2. 3. 1. 1. EaSFH - <i>Eleocharis acutangula</i> , Extrato Hexânico da parte subterrânea fresca	25
I. 2. 3. 1. 2. EsASH - <i>Eleocharis sellowiana</i> , Extrato Hexânico da parte aérea seca	28
I. 2. 3. 1. 3. EsSFH - <i>Eleocharis sellowiana</i> , Extrato Hexânico da parte subterrânea fresca	50
I. 2. 3. 2. Extratos Hidro-Etanólicos	64
I. 2. 3. 2. 1. EiAFHE - <i>Eleocharis interstincta</i> , Extrato hidro-etanólico da parte aérea fresca	64
I. 2. 3. 2. 2. EaSFHE - <i>Eleocharis acutangula</i> , Extrato hidro-etanólico da parte subterrânea fresca	66

I. 2. 3. 2. 3. Ensaio para Detecção de Saponinas	68
I. 2. 3. 2. 4. EsSFHE - <i>Eleocharis sellowiana</i> , Extrato hidro- etanólico da parte subterrânea fresca	70
I. 2. 4. Avaliação Cromatográfica dos Extratos	74
I. 2. 4. 1. Avaliação por Cromatografia em Camada Delgada ...	74
I. 2. 4. 2. Avaliação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	74
I. 3. Resultados e Discussão	75
I. 3. 1. Extratos obtidos	75
I. 3. 2. Avaliação Cromatográfica dos Extratos	77
I. 3. 2. 1. Avaliação por Cromatografia em Camada Delgada ...	77
I. 3. 2. 2. Avaliação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	80
I. 3. 3. Determinação Estrutural dos Compostos Isolados	82
I. 3. 3. 1. Alcanos	85
I. 3. 3. 2. Ésteres	87
I. 3. 3. 3. Esteróides	91
A. Campesterol (2), Estigmasterol (3) e β -Sitosterol (4)	92
B. 6 β -hidroxi-estigmasta-4-eno-3-ona (18)	96
C. Estigmasta-22-eno-3 β ,6 β ,9 α -triol (42)	97
I. 3. 3. 4. Terpenóides	102
I. 3. 3. 4. 1. Monoterpenóides	102
I. 3. 3. 4. 2. Sesquiterpenos	102
I. 3. 3. 4. 3. Derivados de Fitol	104
A. Fitona (6)	104
B. Neofitadieno (16)	104

C. Hexadecanoato de E-Fitila (34)	105
I. 3. 3. 4. 4. Triterpenos	108
A. Lupa-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol (1)	111
B. Ácido Betulínico (17)	112
C. Fern-9(11)-eno-3 α -ol (39)	113
D. Neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (40)	114
E. 3 α -hidroxi-13 α ,17 α ,21 α -hopano-15,19-diona (41)	119
I. 3. 3. 5. Açúcares	125
I. 3. 3. 5. 1. Derivados peracetilados	125
I. 3. 3. 5. 2. Álcoois glicosilados	125
I. 3. 3. 6. Outros Compostos	134
 <u>CAPÍTULO I - ANEXO A</u>	 137
 <u>CAPÍTULO II. ANÁLISE DOS ÓLEOS VOLÁTEIS</u>	 173
II. 1. Introdução	174
II. 2. Materiais e Métodos	176
II. 2. 1. Material Vegetal	177
II. 2. 2. Análise dos Voláteis Florais	177
II. 2. 2. 1. Inserção Direta de Sólidos	177
II. 2. 2. 2. <i>Headsapce</i> Dinâmico	178
II. 2. 3. Análise do Óleo Essencial dos Rizomas – Hidrodestilação	179
II. 3. Resultados e Discussão	179
II. 3. 1. Análise dos Voláteis Florais	179
II. 3. 1. 1. Inserção Direta de Sólidos	179
II. 3. 1. 2. <i>Headspace</i> Dinâmico	181

II. 3. 2. Análise do Óleo Essencial dos Rizomas – Hidrodestilação	183
<u>CAPÍTULO III. TESTES BIOLÓGICOS</u>	185
III. 1. Introdução	186
III. 2. Letalidade com <i>Artemia salina</i>	186
III. 2. 1. Introdução	186
III. 2. 2. Materiais e Método	187
III. 2. 3. Resultados e discussão	188
III. 3. Bioautografia	188
III. 3. 1. Introdução	188
III. 3. 2. Materiais e Métodos	189
III. 3. 3. Resultados e discussão	190
III. 4. Ensaio de Letalidade com <i>Biomphalaria glabrata</i>	191
III. 4. 1. Introdução	191
III. 4. 2. Materiais e Método	195
III. 4. 3. Resultados e discussão	197
<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	201

ABREVIATURAS E SIGLAS UTILIZADAS

1D	Monodimensional
2D	Bidimensional
AcN	Acetonitrila
AcO₂	Anidrido acético
AcOEt	Acetato de etila
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CCT	Culture Collection Tropical
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CL₅₀	Concentração letal
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
Comp.	Comprimento
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
DEPT	Espectro de RMN ¹³ C com intensificação do sinal sem distorção por transferência de polarização
<i>dl</i>	Dubleto largo
DMSO	Dimetilsulfóxido
EM	Espectrometria de massas
Et₂O	Éter dietílico
EtOH	Etanol
eV	Eletron-volts
Exp	Dado experimental

F.M.	Fase Móvel
gCOSY	<i>Correlated Spectroscopy</i> (HxH) com gradiente de campo
hept	Hepteto
Hex	Hexano
HMBC	Espectro bidimensional de correlação de deslocamento químico heteronuclear (CxH) a mais de uma ligação (<i>Heteronuclear Multiple Bound Correlation</i>)
HSQC	Espectro bidimensional de correlação de deslocamento químico heteronuclear (CxH) a uma ligação (<i>Heteronuclear Shift Quantum Coherence</i>)
Hz	Hertz
IE	impacto eletrônico
I_{RR}	Índice de retenção relativo
J	Constante de acoplamento
Lit	Dado da literatura
m	Multiplete
m/z	Razão massa/carga
M⁺_(calc.)	Peso molecular calculado
M⁺_(observ.)	Peso molecular observado
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mΩ	miliOhms
n-BuOH	n-Butanol
nm	Nanometro
NOESY 1D	Experimento monodimensional equivalente ao experimento de diferença de nOe (<i>Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy</i>)

<i>oct</i>	Octeto
ppm	Partes por milhão
ppt	Precipitado
Pyr	Piridina
Pyr-D₅	Piridina deuterada
RMN¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
<i>t</i>	Tripleto
Temp. amb.	Temperatura ambiente
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY 1D	Espectro monodimensional de correlação de deslocamento químico homonuclear (HxH) total (<i>Total Correlation Spectroscopy</i>)
<i>tq</i>	Triplo quarteto
t_R	Tempo de retenção
UV	Ultravioleta
V_F	Volume final
δ_C	Deslocamento químico de carbono-13
δ_H	Deslocamento químico de hidrogênio-1

CONVENÇÕES UTILIZADAS

• Numeração dos Compostos:

Algarismos arábicos: compostos identificados neste trabalho;

Algarismos romanos: compostos relatados pela literatura;

Letras: compostos plastificantes identificados neste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Página

INTRODUÇÃO GERAL

Tabela 1 - Substâncias identificadas anteriormente em espécies do gênero <i>Eleocharis</i>	6
---	----------

CAPÍTULO I. ANÁLISE FITOQUÍMICA

Tabela 1 - Condições empregadas nas análises por CG/EM	24
Tabela 2 - RMN ¹ H de Lupa-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol (1)	26
Tabela 3 - RMN ¹³ C de Lupa-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol (1)	27
Tabela 4 - Dados de RMN ¹ H da mistura de 2, 3 e 4	34
Tabela 5 - Dados de RMN ¹³ C e DEPT da mistura de 2, 3 e 4	35
Tabela 6 - Dados de RMN ¹ H do Ácido Betulínico (17)	38
Tabela 7 - Dados de RMN ¹³ C e DEPT do Ácido betulínico (17)	39
Tabela 8 - RMN ¹ H de 6 β -hidroxi-estigmasta-4-eno-3-ona (18)	40
Tabela 9 - RMN ¹³ C de 6 β -hidroxi-estigmasta-4-eno-3-ona (18)	40
Tabela 10 - Dados de RMN ¹ H do Hexadecanoato de <i>E</i> -Fitila (34)	48
Tabela 11 - Dados de RMN ¹³ C e DEPT do Hexadecanoato de <i>E</i> -Fitila (34)	49
Tabela 12 - Resultado do fracionamento em CC de EsSFH	50
Tabela 13 - RMN ¹ H de Fern-9(11)-eno-3 α -ol (39)	54
Tabela 14 - RMN ¹³ C de Fern-9(11)-eno-3 α -ol (39)	54
Tabela 15 - RMN ¹ H (CDCl ₃ /TMS, 500 MHz) e correlações observadas (HSQC e HMBC) de Neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (40)	56

Tabela 16 - RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de Neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (40)	56
Tabela 17 - RMN ¹ H (CDCl ₃ /TMS, 500 MHz) e correlações (HSQC e HMBC) de 41	60
Tabela 18 - RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de 41	60
Tabela 19 - Dados de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ /TMS) e correlações observadas nos experimentos de gCOSY, HSQC e HMQC de 42	63
Tabela 20 - Dados de RMN ¹³ C e DEPT (125 MHz, CDCl ₃) de 42	63
Tabela 21 - Frações e grupos resultantes do fracionamento de EsSFHE B1	70
Tabela 22 - Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e DEPT (11 tesla, CD ₃ OD) da fração EsSFHE B1 G17.2.	72
Tabela 23 - Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e DEPT (11 tesla, Pyr-D ₅) da fração EsSFHE B1 G18.4	73
Tabela 24 - Extratos e frações de <i>Eleocharis</i> sp comparados por CCDA .	74
Tabela 25 - Condições testadas para análise por CLAE	75
Tabela 26 - Extratos das espécies <i>Eleocharis</i> estudadas	76
Tabela 27 - Ésteres de ácidos graxos identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas	87
Tabela 28 - Dados de RMN ¹ H dos esteróides isolados – sinais característicos	91
Tabela 29: Valores de deslocamentos químicos calculados para estigmasta-22-eno-3,6,9-triol	100
Tabela 30 - Abundância relativa dos principais fragmentos iônicos de fitadienos	105

Tabela 31 - Valores de δ_H e δ_C característicos do esqueleto lupa-20(29)-eno	109
Tabela 32 - Valores de δ_H e δ_C característicos do esqueleto hopano	109
Tabela 33 - Valores de δ_H e δ_C característicos da substituição OH-CH-3	110
Tabela 34 - Comparação dos δ_C entre os compostos neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (40), boehmerol (XXIX) e neohopa-13(18)-eno-3 β -ol (XXX)	116
Tabela 35 - Dados de RMN das agliconas de XXXIII (hexil- β -sophorosídeo), XXXIV (2-(<i>S</i>)-pentanol-2-O- β -D-glicopiranosídeo) e XXXV (heloniosídeo A)	129
Tabela 36 - Dados de RMN ¹³ C dos açúcares	129
Tabela 37 - Dados de RMN da agliconas de EsSFHE B1 G18.4, de 2-propil-D-glicopiranosídeos (XXXVII) e de icarisídeo G ₁ (XXXVIII)	132
Tabela 38 - Dados de RMN ¹³ C dos açúcares	133

CAPÍTULO II. ANÁLISE DOS ÓLEOS VOLÁTEIS

Tabela 1 - Compostos identificados no óleo floral de <i>E. elegans</i>	182
---	------------

CAPÍTULO III. TESTES BIOLÓGICOS

Tabela 1 - Atividade moluscocida (caramujos adultos <i>B. glabrata</i>)	197
Tabela 2 - Atividade ovicida de EsSFHE	198
Tabela 3 - Atividade ovicida dos demais extratos (250 μ g/mL)	198
Tabela 4 - Desenvolvimento das desovas de <i>B. glabrata</i> na presença e ausência de <i>E. sellowiana</i>	199

LISTA DE FIGURA

	Página
<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	
Figura 1 - <i>E. interstincta</i> (Vahl) Roem. & Schult. em seu habitat	3
Figura 2 - Substâncias identificadas anteriormente em espécies do gênero <i>Eleocharis</i>	7
Figura 3 - Tubérculos de <i>E. dulcis</i> Trin.	9
Figura 4 - <i>Eleocharis acutangula</i> . A) Hábito; B) ápice da bainha; C) inflorescência; D) aquênio.	13
Figura 5 - <i>E. acutangula</i> . A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da inflorescência.	13
Figura 6 - <i>Eleocharis elegans</i> . A) Hábito; B) ápice da Bainha; C) inflorescência; D) aquênio.	14
Figura 7 - <i>E. elegans</i> . A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da Inflorescência.	14
Figura 8 - <i>Eleocharis interstincta</i> . A) Hábito; B) ápice da bainha; C) inflorescência; D) aquênio.	15
Figura 9 - <i>E. interstincta</i> . A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da inflorescência.	15
Figura 10 - <i>Eleocharis maculosa</i> . A) Hábito; B) ápice da bainha; C) inflorescência; D) aquênio.	16
Figura 11 - <i>E. maculosa</i> . A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da inflorescência.	16
Figura 12 - <i>Eleocharis sellowiana</i> . A) Hábito; B) ápice da bainha superior; C) inflorescência; D) aquênio.	17

Figura 13 - <i>E. sellowiana</i> . A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da inflorescência.	17
--	-----------

CAPÍTULO I. ANÁLISE FITOQUÍMICA

Figura 1 - Cromatogramas dos extratos hexânicos de <i>Eleocharis sp</i> ...	77
Figura 2 - Cromatograma dos extratos hexânicos de <i>Eleocharis sp</i> . F. M.: CH ₂ Cl ₂ /MeOH/H ₂ O 85:15:1	78
Figura 3 - Cromatograma dos extratos de <i>Eleocharis sp</i> . F. M.: CH ₂ Cl ₂ /MeOH 16:1	79
Figura 4 - Cromatograma dos extratos de <i>Eleocharis sp</i> . F. M.: CH ₂ Cl ₂ /MeOH 30%	80
Figura 5 - Cromatogramas (CLAE) de alguns extratos hexânicos de <i>Eleocharis</i>	81
Figura 6 - Cromatogramas (CLAE) de EsSFHE ppt	81
Figura 7 - Cromatograma (CLAE) – <i>E. microcarpa</i>	82
Figura 8 - Compostos identificados por CG/EM	83
Figura 9 - Compostos isolados e caracterizados através de seus dados espectroscópicos	84
Figura 10 - Plastificantes identificados em várias frações	85
Figura 11 - Espectro de massas do Pentacosano (38)	86
Figura 12 - Espectro de massas do Docosanoato de metila (30)	89
Figura 13 - Espectro de massas do Hexadecanoato de n-propila (26)	89
Figura 14 - Espectro de massas do Hexadecanoato de isopropila (25) ...	89
Figura 15 - Espectro de massas do Tetradecanoato de n-butila (24)	90
Figura 16 - Espectro de massas do Acetato de Octadecila (47)	90

Figura 17 -	Cromatograma e espectros de massas (2 , 3 e 4) da fração EaSFH 3.2	93
Figura 20 -	Cromatograma e espectros de massas (2ac , 3ac e 4ac) fração EsASH 6.4ac	95
Figura 23 -	Comparação de δ_C entre sitosterol (4 , rosa) e o composto 18 (azul)	97
Figura 26 -	Comparação dos δ_C entre estigmasterol (3 , preto) e o composto 42 (vermelho)	98
Figura 27 -	Comparação dos δ_H e δ_C entre os compostos 42 (preto) e XXII (vermelho)	99
Figura 28 -	Perfil do sinal dos hidrogênios carbinólicos	100
Figura 32 -	Espectro de massas do diidroactinidiolídeo (15)	102
Figura 33 -	Espectros de massas de a) curcumeno (19), b) α -muuroleno (20) e c) γ -cadineno (21)	103
Figura 34 -	Espectro de massas da fitona (6)	104
Figura 35 -	Espectro de massas do neofitadieno (16)	105
Figura 39 -	Ésteres de fitol utilizados como modelos	106
Figura 40 -	Comparação dos δ_C entre Hexadecanoato de <i>E</i> -fitila (XXV , preto), Hexadecanoato de <i>Z</i> -fitila (XXVI , vermelho) e composto 34 (azul)	107
Figura 42 -	Acoplamentos entre H-3 e H-2 em 3 α - e 3 β -OH-4-R,R-ciclohexanos	110
Figura 45 -	Comparação dos δ_C entre os compostos 1 (azul) e lupeol (XXVIII , vermelho)	112
Figura 53 -	Diastereoisômeros de Neohopa-13(18)-eno-3 β -ol descritos na literatura	115

Figura 54 -	Caminho biogenético para a formação dos esqueletos dos compostos 39 (D:C-friedo-B':A'-neogammacer-9(11)-eno-3-ol) e 40 (B':A'-neogammacer-13(18)-eno-3-ol)	117
Figura 60 -	Comparação dos δ_c entre hopano-3 α ,22-diol (XXXI , vermelho) e 41 (preto)	120
Figura 61 -	Correlações heteronuclear a longa distância (HMBC) observadas para os anéis D e E	121
Figura 64 -	Correlações observadas nos experimentos de TOCSY 1D ..	121
Figura 65 -	Configuração relativa do 17 α ,21 α -Hopano (a) e do composto 41 (b)	122
Figura 67 -	Espectros de massas dos peracetatos de sacarose (43), manitol (44) e glicose (45)	126
Figura 70 -	Compostos utilizados como modelos na elucidação estrutural de EsSFHE B1 17.2	128
Figura 71 -	Prováveis compostos presentes em EsSFHE B1 G17.2 (48)	130
Figura 74 -	Compostos utilizados como modelo na elucidação estrutural de EsSFHE B1 G18.4	131
Figura 75 -	Prováveis compostos presentes na fração EsSFHE B1 18.4 (49)	133
Figura 76 -	Cromatograma (a) e espectro de massas (b) da fração EsSFHE B1 17.2ac	134
Figura 77 -	Plastificantes identificados por CG/EM	134

CAPÍTULO I - ANEXO A

Figura 18 -	Espectro de RMN ¹ H (300MHz, CDCl ₃ /TMS) da mistura de 2 , 3 e 4	138
--------------------	--	------------

Figura 19 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) da mistura de 2 , 3 e 4	139
Figura 21 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de (18)	140
Figura 22 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) de (18) .	141
Figura 24 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 42	142
Figura 25 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) de 42	143
Figura 29 - Gráficos de contorno do experimento bidimensional gCOSY de 42	144
Figura 30 - Gráficos de contorno dos experimentos bidimensionais HSQC (a) e HMBC (b) de 42	145
Figura 31 - Espectro de massas (IE, alta resolução) de 42	146
Figura 36 - Cromatograma (a) e Espectros de massas (b, obtido; c, biblioteca Wiley) de 36	147
Figura 37 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 36	148
Figura 38 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) de 36	149
Figura 41 - Espectro de massas (IE, baixa resolução) de 36	150
Figura 43 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 1	151
Figura 44 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) de 1	152
Figura 46 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 17	153
Figura 47 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) de 17	154
Figura 48 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 39	155
Figura 49 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) de 39	156
Figura 50 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 40	157
Figura 51 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) de 40	158
Figura 52 - Espectro de massas (IE, alta resolução) de 40	159

Figura 55 - Gráfico de contorno dos experimentos bidimensionais HSQC (a) e HMBC (b) de 40	160
Figura 56 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 41	161
Figura 57 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CDCl ₃) de 41 ...	162
Figura 58 - Espectro de NOESY 1D (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 41	163
Figura 59 - Gráfico de contorno dos experimentos bidimensionais HSQC (a) e HMBC (b) de 41	164
Figura 62 - Espectro de TOCSY 1D (500MHz, CDCl ₃ /TMS) de 41	165
Figura 63 - Gráficos de contorno do experimento gCOSY de 41	166
Figura 66 - Espectro de massas (IE, alta resolução) de 41	167
Figura 68 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, CD ₃ OD) de 48	168
Figura 69 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, CD ₃ OD) de 48 ..	169
Figura 72 - Espectro de RMN ¹ H (500MHz, Pyr-D ₅) de 49	170
Figura 73 - Espectros de RMN ¹³ C e DEPT (125MHz, Pyr-D ₅) de 49	171

CAPÍTULO II. ANÁLISE DOS ÓLEOS VOLÁTEIS

Figura 1 - <i>E. sellowiana</i> –Inflorescências ocráceas	174
Figura 2 - Detalhe da inflorescência de <i>E. elegans</i>	175
Figura 3 - Inserção direta	178
Figura 4 - Cromatograma das inflorescências de <i>E. elegans</i> - Inserção direta	180
Figura 5 - Cromatograma das inflorescências de <i>E. sellowiana</i> - Inserção direta	180
Figura 6 - Prováveis compostos presentes nas flores de <i>E. elegans</i>	181
Figura 7 - Compostos identificados no óleo floral de <i>E. elegans</i>	183

CAPÍTULO III. TESTES BIOLÓGICOS

Figura 1 -	Antibióticos padrões empregados	189
Figura 2 -	Bioautografia – <i>E. sellowiana</i> parte subterrânea fresca	191
Figura 3 -	Casal de <i>S. mansoni</i>	192
Figura 4 -	Diferentes fases evolutivas do <i>S. mansoni</i>	193
Figura 5 -	Fármacos empregados no tratamento da esquistossomíase .	194
Figura 6 -	Moluscocida niclosamida (XXXXIV)	194
Figura 7 -	Caramujo adulto <i>B. glabrata</i>	195
Figura 8 -	Desenvolvimento da desova no ensaio controle	196
Figura 9 -	Atividade ovicida	199

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Figura 1 -	Compostos identificados distribuídos segundo o caminho biogenético	203
-------------------	--	------------

LISTA DE ESQUEMAS

	Página
<u>INTRODUÇÃO GERAL</u>	
Esquema 1 - Classificação botânica do gênero <i>Eleocharis</i> R. Br.....	2
Esquema 2 - Classificação do gênero <i>Eleocharis</i> R. Br. segundo Svenson	4

LISTA DE FLUXOGRAMAS

CAPÍTULO I. ANÁLISE FITOQUÍMICA

Fluxograma 1 - Maceração seguida de partição do extrato total em solventes com polaridade crescente	22
Fluxograma 2 - Metodologia para separação de clorofila	23
Fluxograma 3 - Separação de saponinas	69

LISTA DE QUADROS

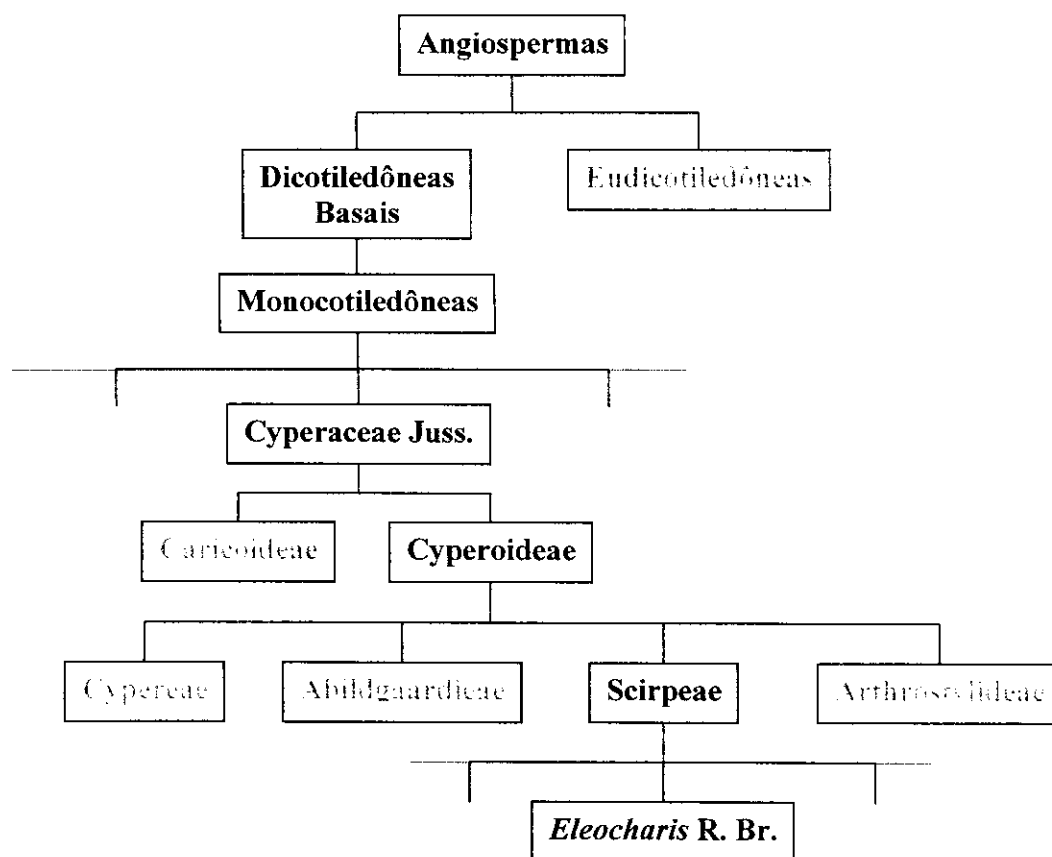
CAPÍTULO I. ANÁLISE FITOQUÍMICA

Quadro 1 - Fragmentos iônicos racionalizados através do Rearranjo de McLafferty	88
Quadro 2 - Proposta de fragmentação para o novo esteróide (42)	101
Quadro 3 - Proposta de fragmentação do Neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (40)	118
Quadro 4 - Proposta de fragmentação para 3 α -hidroxi-13 α ,17 α ,21 α - hopana-15,19-diona (41)	124

INTRODUÇÃO GERAL

1. Introdução Geral

Cyperaceae Juss. é uma grande família cosmopolita de monocotiledôneas, composta por cerca de 5.000 espécies distribuídas em 120 gêneros que ocorrem em diferentes habitats, prevalecendo ambientes úmidos, brejos e margens de rios, lagos e lagoas. De acordo com Bruhl¹, esta família divide-se nas subfamílias Cyperoideae e Caricoideae (Esquema 1).



Esquema 1: Classificação botânica do gênero *Eleocharis* R. Br.

O gênero *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae, Cyperoideae, Scirpeae) compreende cerca de 200 espécies, ocorrendo desde os trópicos até a região polar

¹ Bruhl JJ *apud* Faria AD. O Gênero *Eleocharis* R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

nos dois hemisférios, porém mais fortemente concentrada no Novo Mundo, em ambientes úmidos tais como brejos e margens de rios e lagos. O nome *Eleocharis* é derivado de duas palavras gregas que significam “brejo” e “graça”, em referência ao ambiente aquático em que ocorre e à beleza de suas espécies (Figura 1).

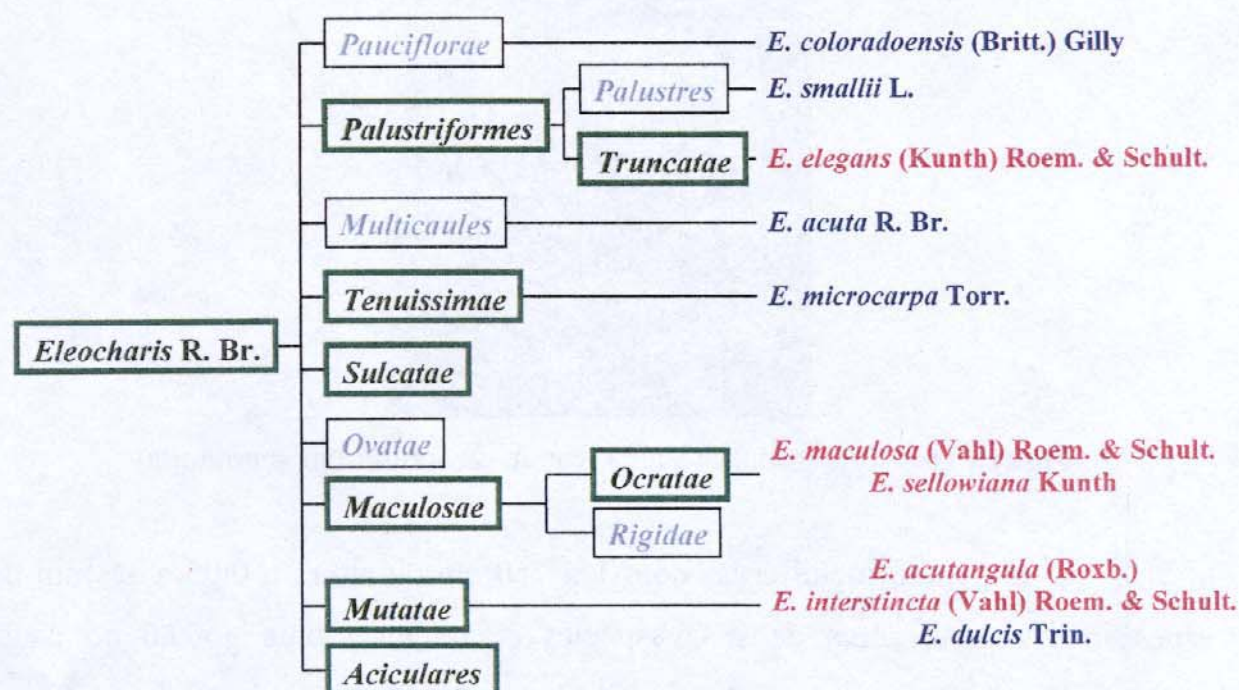


Figura 1: *E. interstincta* (Vahl) Roem. & Schult. em seu habitat.

O gênero inclui ervas com 1 a 150 cm de altura e 0,05 a 15 mm de espessura. A parte aérea de suas espécies compreende uma porção do caule (escapo) de estrutura simples, não ramificado e com secção transversal circular ou elíptica ou ainda apresentando três ou mais ângulos. No ápice do escapo localiza-se uma inflorescência congesta (espiguetas) onde são formados flores e frutos (aquênios). As folhas são muito reduzidas e não apresentam lamina foliar. A parte subterrânea é formada por outra porção do caule (rizoma ou estolão) e pelas raízes².

² Faria AD. *O Gênero Eleocharis R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

A delimitação infragenérica em *Eleocharis* vem sendo objeto de intensa discussão. Svenson³, analisando dados de morfologia vegetal de espécies coletadas em todo o mundo, subdividiu o gênero em 9 séries (Esquema 2), das quais seis ocorrem no Estado de São Paulo. Recentemente, Kukkonen⁴ e depois Gonzáles-Elizondo & Peterson⁵, ainda utilizando dados de morfologia, propuseram alterações na classificação proposta por Svenson. Entretanto não tentaram esclarecer a filogenia do gênero *Eleocharis*.



Esquema 2: Classificação do gênero *Eleocharis* R. Br. segundo Svenson.

As séries/subséries escritas em verde ocorrem no Estado de São Paulo; espécies escritas em azul foram estudadas previamente e as espécies escritas em vermelho foram investigadas no presente trabalho.

³ Svenson HK *apud* Faria AD. *O Gênero Eleocharis R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

⁴ Kukkonen I. *apud* Faria AD. *O Gênero Eleocharis R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

⁵ Gonzáles-Elizondo MS, Peterson PM. *apud* Faria AD. *O Gênero Eleocharis R. Br. (Cyperaceae) no Estado de São Paulo*. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, SP, 1998.

Recentemente, Roalson e Friar⁶ tentaram reconstruir as relações filogenéticas entre as espécies deste gênero através do seqüenciamento de uma região do DNA ribossômico. Seus resultados foram comparados com as três classificações infragenéricas propostas; os grupos encontrados não foram totalmente congruentes com nenhuma das classificações anteriores. Assim, a investigação dos metabólitos secundários pode adicionar dados importantes que auxiliem na delimitação infragenérica do gênero.

Um levantamento botânico recente sobre a ocorrência de *Eleocharis* no Estado de São Paulo resultou na identificação de 37 espécies, pertencentes a seis séries, um número bem maior do que o anteriormente estimado (cerca de 20 espécies)².

De acordo com a literatura (*Chemical Abstracts*, *Web of Science* e *Electronic Reference Library*), apenas cinco espécies *Eleocharis* já foram objeto de estudos fitoquímicos que resultaram na identificação das substâncias resumidas pelas Tabela 1 e Figura 2.

⁶ Roalson EH, Friar EA. Infrageneric classification of *Eleocharis* (Cyperaceae) revisited: Evidence from the internal transcribed spacer (ITS) region of nuclear ribosomal DNA. *Syst Bot* **25** (2): 323-336, 2000.

Tabela 1: Substâncias identificadas anteriormente em espécies do gênero *Eleocharis*.

Série*	Espécie	Substância	Referência
		ácido hexacosanóico (I), tricina (II), estigmasterol (III), β -sitosterol (IV), betulina (V), 5 α -estigmasterano-3,6-diona (VI),	7
<i>Mutatae</i>	<i>E. dulcis</i> Trin.	ácido 8-O-4'-diferrúlico (VII), ácido 5-5'-diferrúlico (VIII), ácido 8-5'-diferrúlico (IX),	8
		ácido 1-metil-1,2,3,4-tetra-hidro- β -carboline-3-carboxílico (X),	9
<i>Pauciflorae</i>	<i>E. coloradoensis</i> (Britt.) Gilly	tricina (II), estigmasterol (III), sitosterol (IV), diidroactinidiolideo (XI), ácido <i>p</i> -coumárico (XII), ácido ferrúlico (XIII), luteolina (XIV).	10, 11
<i>Multicaules</i>	<i>E. acuta</i> R. Br.	aureusidina (XV)	12
<i>Tenuissimae</i>	<i>E. microcarpa</i> Torr.	ácido 11-hidroxi-14-(3,5-diidroxi-2-metilciclopentil)tetradecen-9-ene-12-inóico (XVI).	13
<i>Palustriformes</i> subserie <i>Palustres</i>	<i>E. smallii</i> L.	4-metoxifenol (XVII), benzofurano (XVIII), ácido benzeno acético (XIX), 2-hidroxi-5-metil acetofenona (XX), 3,4-dimetoxifenil etanona (XXI).	14

* Segundo a classificação de Svenson.

⁷ Miles DH, Tunsuwan K, Chittawong V. Boll weevil antifeedants from *Eleocharis dulcis* Trin. *J Agr Food Chem* 42 (7): 1561-1562, 1994.

⁸ Parr AJ, Waldron KW, Ng A, Parker ML. The wall-bound phenolics of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*). *J Sci Food Agric* 71: 501-507, 1996.

⁹ Yang B, Zhang Y, Huang J, Shao L. The structure and configuration of alkaloid (MTC) in *Heleocharis dulcis*. *Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa* 7: 1-4, 1995 (CA 123: 138805).

¹⁰ Stevens KL, Merrill GB. Growth inhibitors from spikerush. *J Agric Food Chem* 28: 644-646, 1980.

¹¹ Stevens KL, Merrill GB. Dihydroactinidiolide - a potent growth inhibitors from *Eleocharis coloradoensis* (spikerush). *Experientia* 37: 1133, 1981.

¹² Clifford HT, Harbone JB. Flavonoid pigmentation in sedges (Cyperaceae). *Phytochemistry* 8: 123-126, 1969.

¹³ Van Aller RT, Clark LR, Pessoney GF, Rogers VA. A prostaglandin-like fatty acid from a species in the Cyperaceae. *Lipids* 18: 617-622, 1983.

¹⁴ Quayyum HA, Mallik AU, Orr DE, Lee PF. Allelopathic potential of aquatic plants associated with wild rice: II. Isolation and identification of allelochemicals. *J Chem Ecol* 25: 221-228, 1999.

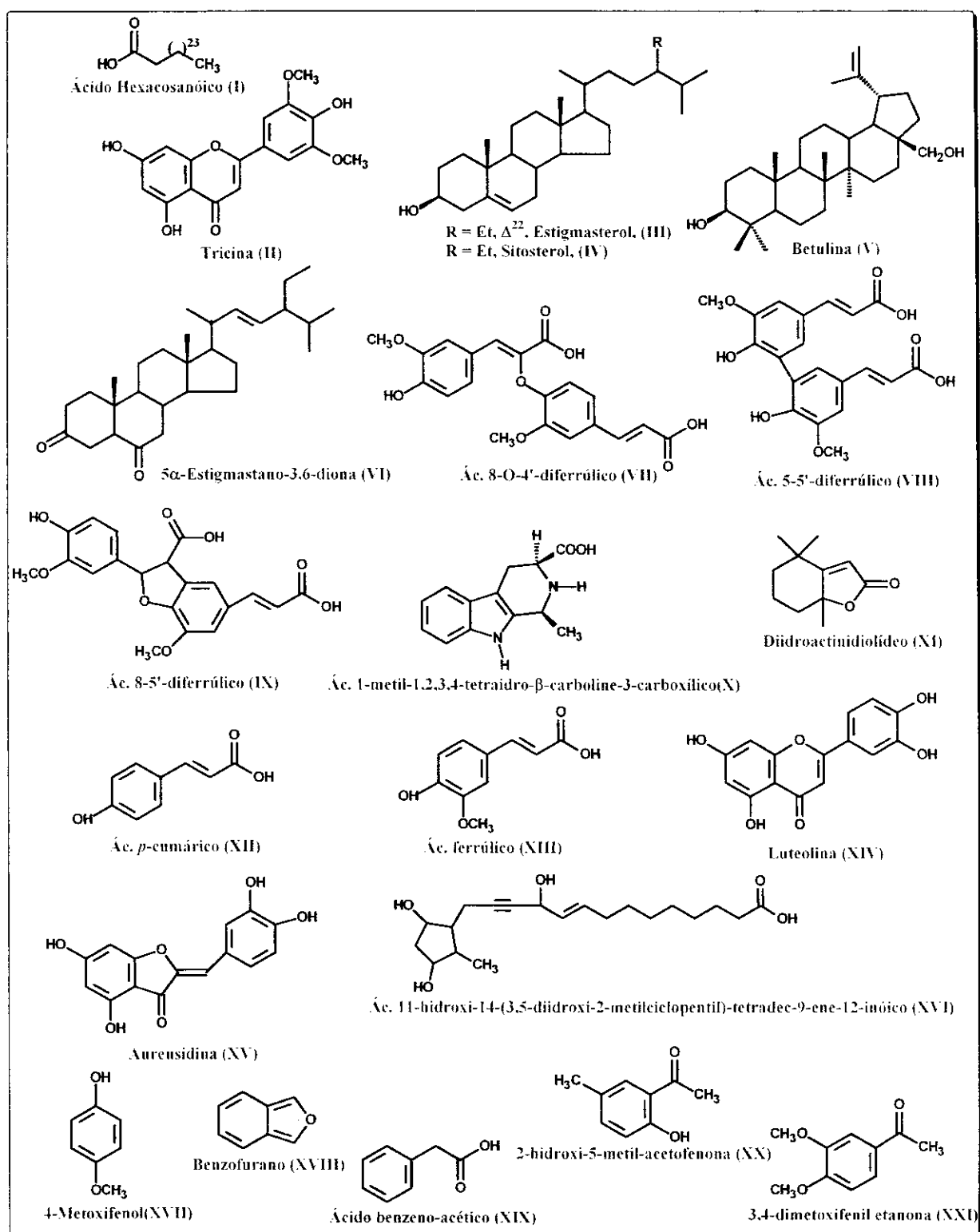


Figura 2: Substâncias identificadas anteriormente em espécies do gênero *Eleocharis*.

Foram encontrados relatos de atividades alelopática^{10, 11, 14, 15} e antimicrobiana¹⁶ dos extratos de algumas espécies do gênero sem que, em muitos casos, essa atividade tenha sido atribuída a um composto em particular.

Foi interessante verificar também que alguns trabalhos relatam o emprego de novos herbicidas¹⁷ no combate à proliferação de algumas espécies de *Eleocharis*, especialmente *E. kuroguwai*, que são invasoras em culturas de arroz.

Uma espécie bastante estudada é *E. dulcis*, conhecida comercialmente como “Chinese water chestnut”. Esta espécie apresenta tubérculos (Figura 3) que são apreciados na culinária chinesa por apresentarem consistência crocante. Assim, foram encontrados estudos da influência do fotoperíodo¹⁸ e do uso de herbicidas¹⁹ na produção dos tubérculos, de avaliação de textura antes e após processamento (enlatada e cozida)²⁰ assim como estudos de caracterização do amido²¹ e dos

¹⁵ a) Frank PA, Dechoretz N. Allelopathy in dwarf spikerush (*Eleocharis coloradoensis*). *Weed Sci* **28** (5): 499-505, 1980; b) Yeo RR, Thurston JR. The effect of dwarf spikerush (*Eleocharis coloradoensis*) on several submersed aquatic weeds. *J Aquat Plant Manage* **22**: 52-56, 1984; c) Van Aller RT, Pessoney GF, Rogers VA, Watkins EJ, Leggett HG. Oxygenated fatty acids: a class of allelochemicals from aquatic plants. *ACS Sym Ser* **268**: 387-400, 1985; d) Ashton FM, di Tomaso JM, Anderson LWJ. Spikerush (*Eleocharis* spp.): a source of allelopathics for the control of undesirable aquatic plants. *ACS Sym Ser* **268**: 401-414, 1985; e) Sutton DL, Portier KM. Influence of spikerush plants on growth and nutrient content of *Hydrilla*. *J Aquat Plant Manage* **29**: 6-11, 1991; f) Wooten JW, Elakovich SD. Comparisons of potential allelopathy of 7 fresh-water species of spikerushes (*Eleocharis*). *J Aquat Plant Manage* **29**: 12-15, 1991; g) Gopal B, Goel U. Competition and allelopathy in aquatic plant-communities. *Bot Rev* **59** (3): 155-210, 1993; h) Elakovich SD, Wooten JW. Allelopathic, herbaceous, vascular hydrophytes. *ACS Sym Ser* **582**: 58-73, 1995; i) Keddy P, Fraser LH, Wisheu IC. A comparative approach to examine competitive response of 48 wetland species. *J Veg Sci* **9** (6): 777-786, 1998; j) Quayyum HA, Mallik AU, Orr DE, Lee PF. Allelopathic potential of aquatic plants associated with wild rice: I. Bioassay with plant and lake sediment samples. *J Chem Ecol* **25**: 209-220, 1999.

¹⁶ a) Chen SL, Cheng BL, Cheng WK, Tang PS. An antibiotic substance in the Chinese water-chestnut, *Eleocharis tuberosa*. *Nature* **156** (3956): 234, 1945. b) Zeng Y, Hu P, Xia F. Study on bactericidal effect of the skin of *Eleocharis tuberosa*. *Shinpin Kexue* **17** (10): 56-58, 1996.

¹⁷ a) Inamura T. Control of *Eleocharis kuroguwai* by herbicides. *Nogyo Oyobi Engei* **64** (8): 945-950, 1989 (CA 111:169302); b) Tanaka M, Ohra J, Tsujino Y, Fujimori T, Ago H, Tsuge H. Sendryol A, B, C and D, four new compounds produced by a weed pathogenic fungus *Dendryphiella* sp. *Z Naturforsch C* **50** (11-12): 751-756, 1995; c) Matsuki T, Negishi H, Fujimori T. Mycelial preparation of *Nimbya scirpicola* for biological control of *Eleocharis kuroguwai* OHMI. *J Pestic Sci* **23** (3): 312-315, 1998; d) Sugawara F. Japanese research and developments on plant pathogens as weed control agents. *J Crop Prod* **4** (2): 277-285, 2001.

¹⁸ Li M, Kleinhenz V, Lyall T, Midmore DJ. Response of Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis* (Burm. F.) Hensch) to photoperiod. *J Hort Sci Biotech* **75** (1): 72-78, 2000.

¹⁹ Inamura T. Dry matter production and tuber formation in water chestnut treated with sulfonylurea herbicides. *Zasso Kenkyu* **45** (3): 173-181, 2000 (CA 134: 1562).

²⁰ Mudahar GS, Jen JJ. Texture of raw and canned jicama (*Pachyrrhizus tuberosus*) and Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*). *J Food Sci* **56** (4): 977-980, 1991.

polissacarídeos²² e polifenólicos²³ presentes na parede celular. Outro estudo interessante²⁴ relata que camundongos contaminados por cádmio apresentaram um aumento da excreção urinária desse metal após a ingestão do extrato aquoso de *E. dulcis*.



Figura 3: Tubérculos de *E. dulcis* Trin.

Esta espécie também já foi objeto de estudo em projetos visando o tratamento de águas residuais em sistema de leito cultivado. Os resultados demonstram que a planta apresenta uma grande capacidade de absorção de nutrientes e de redução da quantidade de coliformes fecais, melhorando significativamente a qualidade da água. Economicamente, esse sistema apresenta a vantagem da comercialização dos tubérculos de *E. dulcis* e da possibilidade de criação de peixes nas águas tratadas²⁵.

²¹ Yu B, Fujii S, Kishihara S. Physicochemical property of Huaishan (*Rhizoma dioscorea*) and Matai (*Eleocharis dulcis*) starches. *Starch-Starke* 51 (1): 5-10, 1999.

²² a) Klockeman DM, Pressey R, Jen JJ. Characterization of cell-wall polysaccharides of jicama (*Pachyrhizus tuberosus*) and Chinese water chestnut (*Eleocharis dulcis*). *J Food Biochem* 15 (5): 317-329, 1991; b) Tang, H. ¹³C MAS NMR studies of the effects of hydration on the cell walls of potatoes and Chinese water chestnuts. *J Agric Food Chem* 47 (2): 510-517, 1999.

²³ Parker ML, Waldron KW. Texture of Chinese water chestnut – Involvement of cell-wall phenolics. *J Sci Food Agr* 68 (3): 337-346, 1995.

²⁴ Liao H, Zhu P, Saito H, Wu Z. Effect of vitamin C and juice of *Eleocharis dulcis* on cadmium excretion in mice. *Yingyang Xuebao* 23 (2): 189-190, 2001 (CA 136: 36844).

²⁵ a) McCord-Jr CL, Loyacano HA Jr. Renoval and utilization of nutrients by Chinese water chestnut in catfish ponds. *Aquaculture* 13(2): 143-156, 1978; b) Maddox JJ, Kingsley JB. Waste treatment for confined swine with an integrated artificial wetland and aquaculture system. In *Constructed wetlands for wastewater treatment: Municipal, Industrial and Agricultural*. Lewis Publishers, Chelsea Michigan, p. 191-200, 1989; c) Kingsley JB, Maddox JJ, Giordano PM. Aquatic plant culture for waste treatment and resource recovery.

As espécies de *Eleocharis*, nas áreas alagadas onde ocorrem, constituem um habitat para diversos organismos tais como membros do zooplâncton (*E. palustris*²⁶; *E. sphacelata*²⁷; *E. aciculares*²⁸), lepidópteros (*E. dulcis*²⁹, *E. mutata*³⁰), larvas de *Anopheles* sp. (*Eleocharis* spp³¹), fungos (*E. quinqueflora*³²), macroinvertebrados e insetos (*E. sellowiana*³³). Outras espécies, como *E. cf. acutangula*, *E. interstincta*, *E. bonariensis* e *E. uniglumis*, são consideradas reserva nutricional, principalmente como fonte de nitrogênio, fósforo e energia, para vários herbívoros³⁴. Algumas destas espécies são ainda consideradas indicadores de poluição³⁵.

-
- In Constructed wetlands for wastewater treatment: Municipal, Industrial and Agricultural.* Lewis Publishers, Chelsea Michigan, p. 542-549, 1989.
- ²⁶ Illyova M, Nemethova D. Littoral cladoceran and copepod (Crustacea) fauna in the Canube and Morava river floodplains. *Biologia* 57 (2): 171-180, 2002.
- ²⁷ a) Humphries P. Aquatic macrophytes, macroinvertebrate associations and water levels in a lowland Tasmanian river. *Hydrobiologia* 321 (3): 219-233, 1996; b) Duggan IC, Green JD, Thompson K, Shiel RJ. The influence of macrophytes on the spatial distribution of littoral rotifers. *Freshwater Biol* 46 (6): 777-786, 2001.
- ²⁸ Kurashov EA, Telesh IV, Panov VE, Usenko NV, Rychkova MA. Invertebrate communities associated with macrophytes in Lake Ladoga: Effects of environmental factors. *Hydrobiologia* 322 (1-3): 49-55, 1996.
- ²⁹ Ranganath HR, Prasad GS, Sheeba. The sedge *Eleocharis dulcis* (Brum. f.) Henschel (Cyperaceae) traps rice white stem borer *Scirpophaga innotata* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *Curr Sci India* 83 (4): 371-372, 2002.
- ³⁰ Landry B. The cosmopterigidae (Lepidoptera) of the Galapagos Islands, Ecuador. *Rev Suisse Zool* 108 (3): 513-539, 2001.
- ³¹ a) Rejmankova E, Roberts DR, Harbach RE, Pecor J, Peyton EL, Manguin S, Krieg R, Polanco J, Legters L. Environmental and regional determinants of *Anopheles* (Diptera, Culicidae) larval distribution in Belize, Central America. *Environ Entomol* 22 (5): 978-992, 1993; b) Rejmankova E, Roberts DR, Manguin S, Pope KO, Komarek J, Post RA. *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) and cyanobacteria: an example of larval habitat selection. *Environ Entomol* 25 (5): 1058-1067, 1996; c) de Roa EZ, Gordon E, Montiel E, Delgado L, Berti J, Ramos S. Association of cyclopoid copepods with the habitat of the malaria vector *Anopheles aquasalis* in the peninsula of Paria, Venezuela. *J Am Mosquito Control* 18 (1): 47-51, 2002.
- ³² Hooper SS, Spooner BM. Occurrence of *Entorrhiza scirpicola* (Ustilaginales) on *Eleocharis quinqueflora* in Britain. *T Brit Mycol Soc* 76: 499-502, 1981.
- ³³ a) Nessimian JL. Functional characterization of macroinvertebrates of a sand dune marsh in the State of Rio de Janeiro. *Revista Brasileira de Biologia* 57 (1): 135-145, 1997; b) Nessimian JL, Ribeiro JRI. On the biology of *Buenoa platycnemis* (Fieber) (Insecta, Heteroptera, Notonectidae) at Restinga de Marica, Rio de Janeiro State Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 17 (1): 229-239, 2000; c) Nessimian JL. Seasonal variation in the zoobenthic community of a sand dune marsh in Rio de Janeiro State, Brazil. *Boletim do Museu Nacional do Rio de Janeiro – Zoologia* 447: 1-14, 2001.
- ³⁴ a) Jones RL, Walgenbach RP, Hanson HC. Carbohydrate contents of goose forages from estuaries of James and Hudson bays. *Can J Zoo* 63: 1733-1735, 1985; b) Whitehead PJ, Tschirmer K. Sex and age-related variation in foraging strategies of magpie geese *Anseranas semipalmata*. *EMU* 92: 28-32, 1992; c) McKnight SK, Hepp GR. Potential effect of grass carp herbivory on waterfowl foods. *J Wildlife Manage* 59 (4): 720-727, 1995; d) Furtado ALD, Esteves FD. Organic compounds, nutrients and energy of two tropical aquatic macrophytes. *Arq Biol Tecnol* 39 (4): 923-931, 1996; e) Robert M, Cloutier L, Laporte P. The summer diet of the yellow rail in Southern Quebec. *Wilson Bull* 109 (4): 702-710, 1997; f) Barreto GR, Herrera EA. Foraging patterns of capybaras in a seasonally flooded savanna of Venezuela. *J Trop Ecol* 14: 87-98, 1998;

2. Descrição Botânica

A seguir serão apresentadas as principais características morfológicas² das espécies estudadas:

- ❖ *Eleocharis acutangula* (Roxb.) Schult. (série Mutatae) (Figura 4A-D): espécie perene muito comum no Estado de São Paulo em brejos, margens de lagos, lagoas, riachos e rios (Figura 5A). Caracteriza-se por apresentar colmos triangulados com ângulos agudos, inflorescência cilíndrica (Figura 5B) com glumas endurecidas, ocráceas, aquênio oboval com superfície reticulada e base lameliforme ou levemente arredondada na forma de uma raquete. Às vezes, os colmos apresentam-se um pouco retorcidos e, dependendo do ambiente onde se encontram, podem ser pequenos (ca. 30 cm de altura) até robustos com ca. de 90 cm de altura. Os estolões são grossos com escamas oval-lanceoladas.
- ❖ *E. elegans* (Kunth) Roem. & Schult. (série Palustriformes) (Figura 6A-D): espécie perene, de ocorrência mais estrita a algumas regiões do Estado de São Paulo, sendo encontrada em brejos, várzeas, solos úmidos, cachoeiras e margens de riachos (Figura 7A). É uma espécie potencialmente ornamental, caracterizada por colmos cilíndricos grossos e evidentemente septados e inflorescências globosas a subglobosas, brancas e com ligeiro odor agradável (Figura 7B); os estolões apresentam internós curtos e escamas lanceoladas. A planta é descrita como provavelmente a única espécie tropical do gênero que é atraente aos olhos do coletor.

g) Borgnia M, Galante ML, Cassini MH. Diet of the coypu (nutria, *Myocastor coypus*) in agro-systems of Argentinean Pampas. *J Wildlife Manage* **64** (2): 354-361, 2000.

³⁵ a) Haslam SM. The evaluation of river pollution using vegetation in the Maltese islands. *Fresen Environ Bull* **9** (5/6): 347-351, 2000; b) Bajpai A, Bajpai AK, Pani S, Mista SM. Pollution and trophic status indicator species of Bhoj Wetland. *Ecology, Environment and Conservation* **7** (3): 245-249, 2001.

- ❖ *E. interstincta* (Vahl) Roem. & Schult. (série Mutatae) (Figura 8A-D): espécie perene, comum no Estado de São Paulo em canais de águas, lagoas rasas, margens de lagos e brejos (Figura 9A). Esta espécie parece estar adaptada somente a ambientes com água em excesso, pois foi sempre encontrada dentro de lagos ou lagoas, nas proximidades das margens, mas nunca em solos apenas úmidos. Apresenta colmos achatados e evidentemente septados e inflorescências cilíndricas com ápice arredondado (Figura 9B); os estolões apresentam escamas ovais.
- ❖ *E. maculosa* (Vahl) Roem. & Schult. (série Maculosae) (Figura 10A-D): espécie perene, de ocorrência mais estrita a algumas regiões no sudeste do Estado de São Paulo em brejos, margens de rios, solos alagados e solos úmidos em locais sombreados no interior de mata (Figura 11A). Apresenta aquênios negros quando maduros e um apêndice hialino no ápice da bainha superior; os colmos são elípticos em seção transversal e as espiguetas são de oval a lanceolada com flores espiraladas (Figura 11B) enquanto os estolões apresentam escamas lanceoladas.
- ❖ *E. sellowiana* Kunth (série Maculosae) (Figura 12A-D): espécie perene, amplamente distribuída pelo Estado de São Paulo, ocorrendo em brejos, solos alagados e margens de lagos, lagoas, riachos e rios (Figura 13A). Trata-se de uma espécie de grande plasticidade, variando em tamanho e espessura do colmo, que apresenta seção transversal circular, e na forma da espiguetas, a qual varia de elipsóide a lanceolada (Figura 13B); a coloração do fruto também varia de oliváceo a castanho-amarelado.

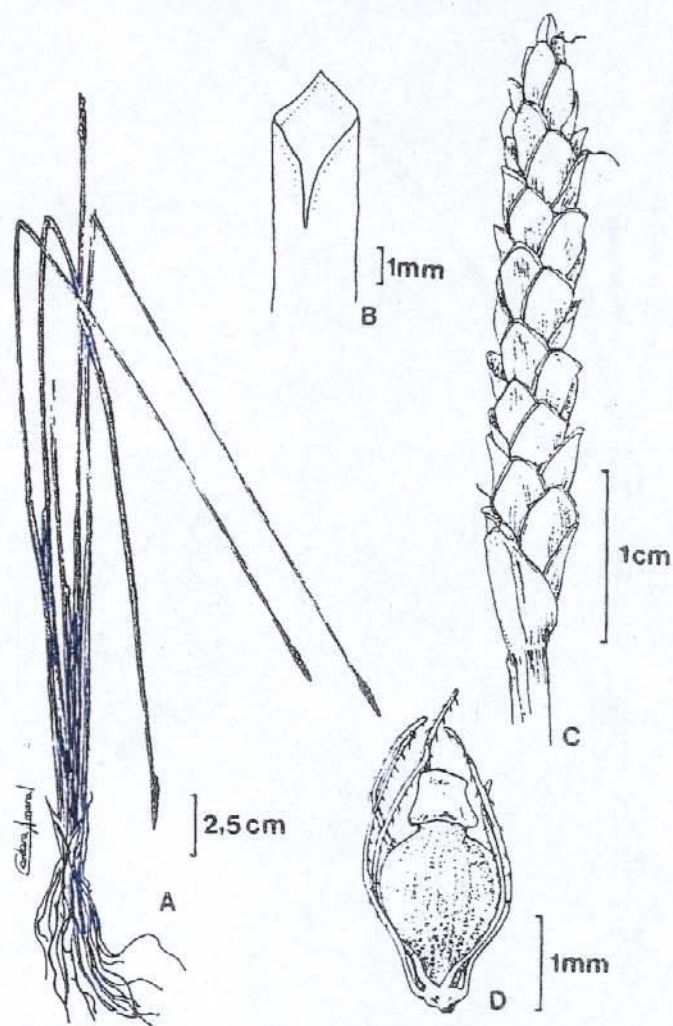


Figura 4: *Eleocharis acutangula*. A) Hábito; B) ápice da bainha; C) inflorescência; D) aquênio

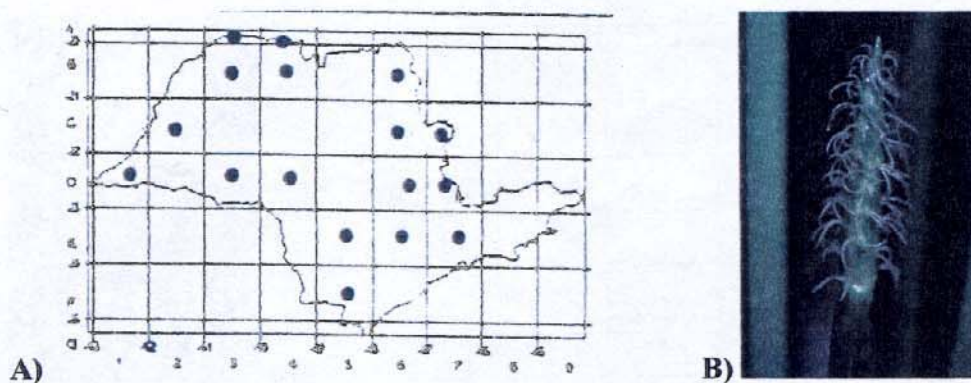


Figura 5: *E. acutangula*. A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da inflorescência.

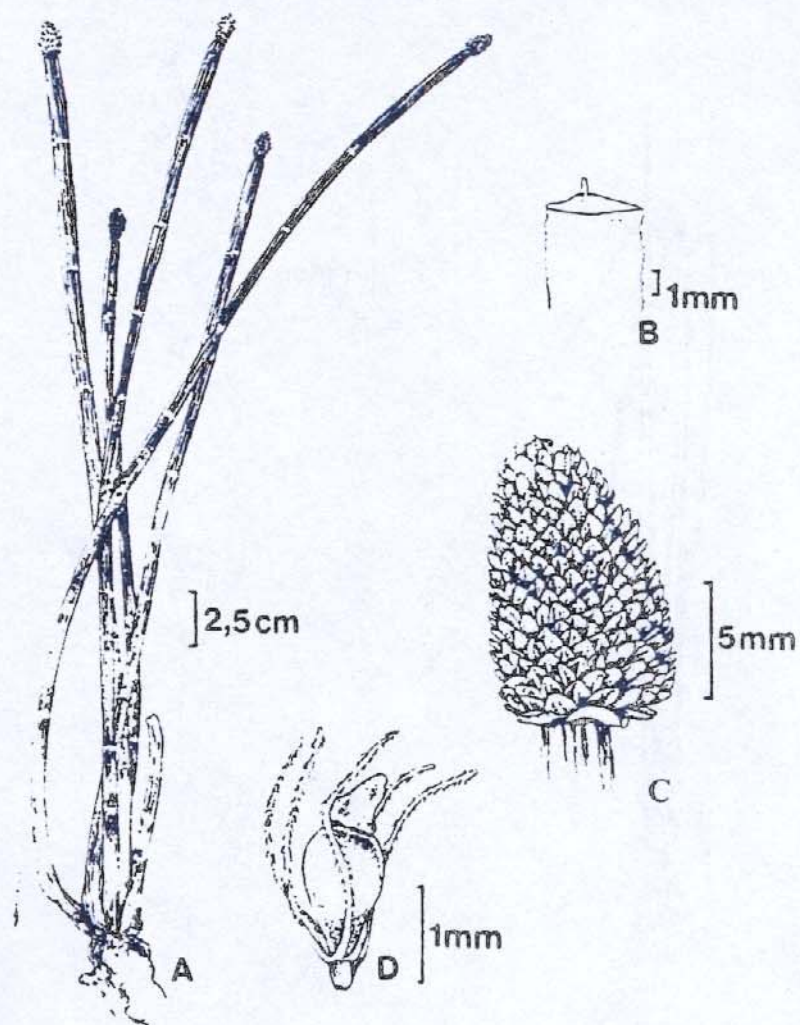


Figura 6: *Eleocharis elegans*. A) Hábito; B) ápice da Bainha; C) inflorescência; D) aquênio.

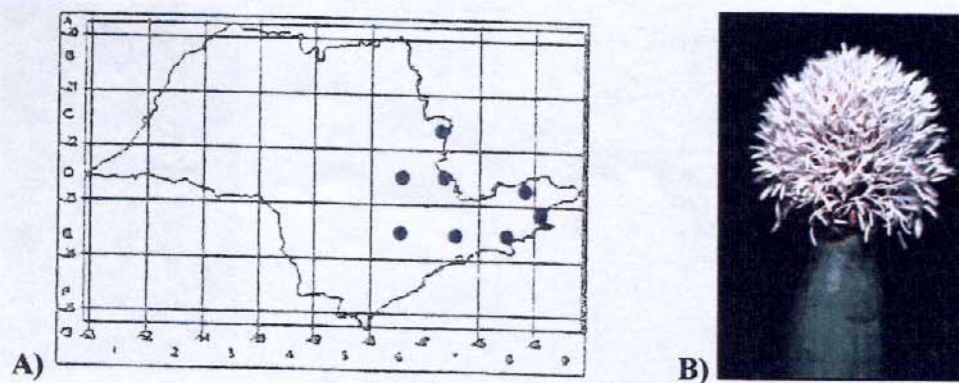


Figura 7: *E. elegans*. A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da Inflorescência.

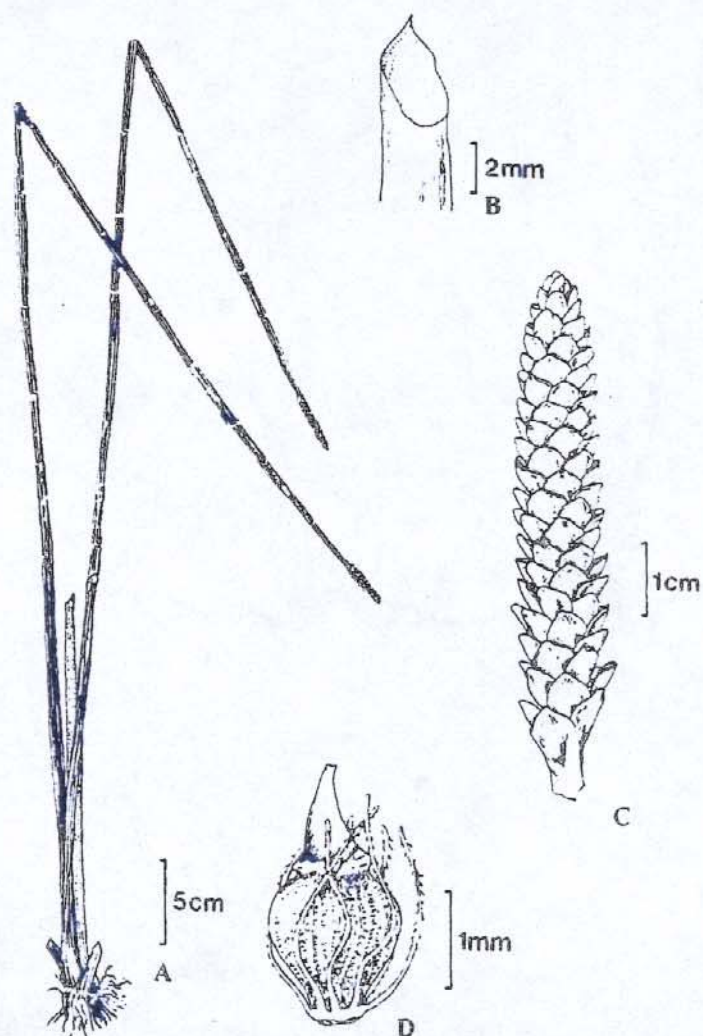


Figura 8: *Eleocharis interstincta*. A) Hábito; B) ápice da bainha; C) inflorescência; D) aquênio.

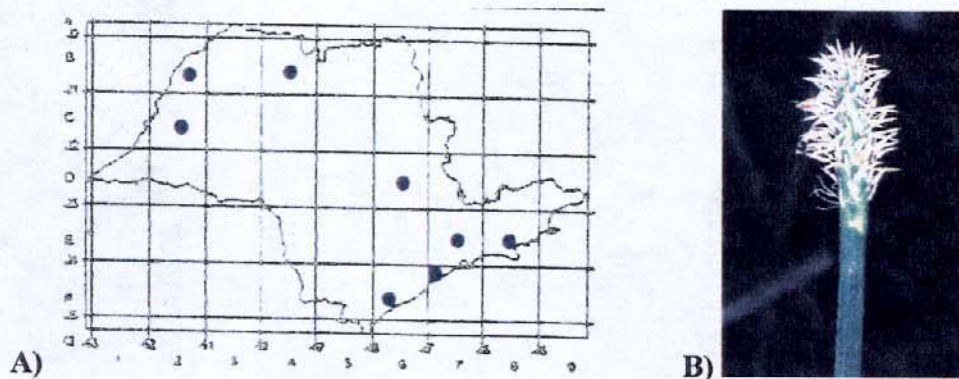


Figura 9: *E. interstincta*. A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da inflorescência.

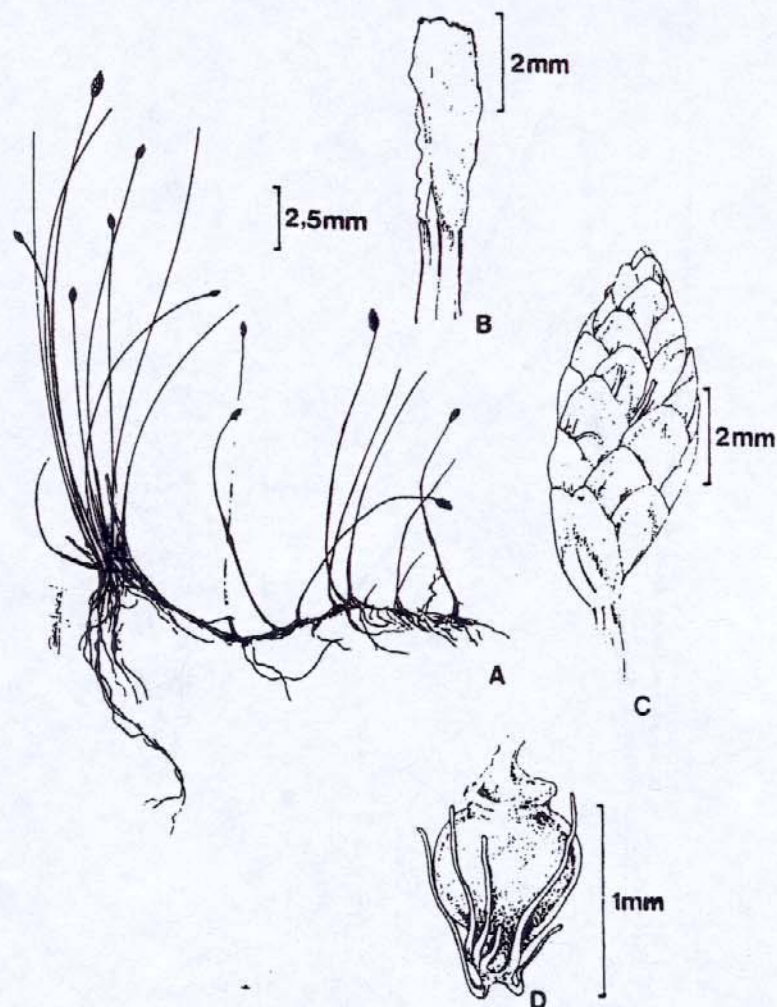


Figura 10: *Eleocharis maculosa*. A) Hábito; B) ápice da bainha; C) inflorescência; D) aquênio.

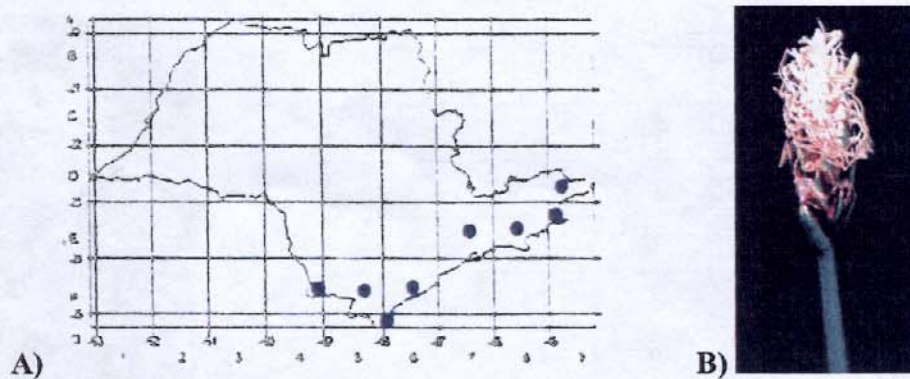


Figura 11: *E. maculosa*. A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da inflorescência.

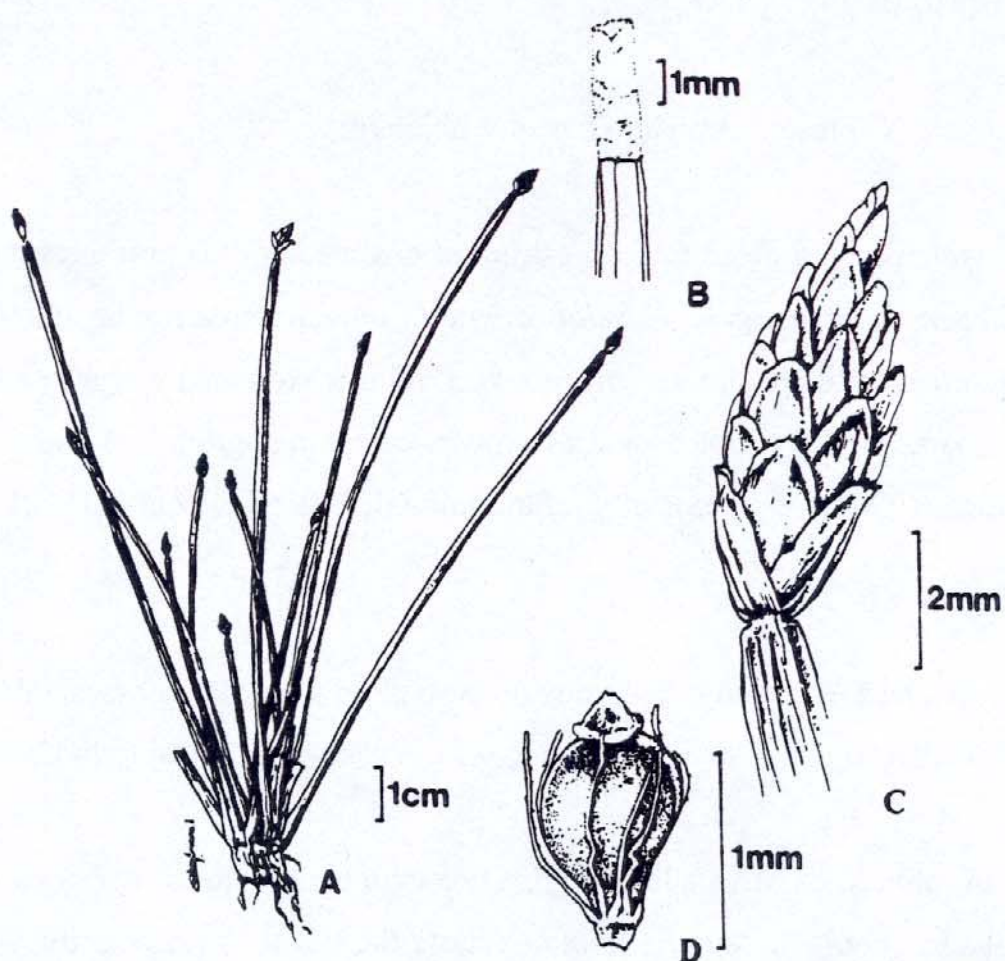


Figura 12: *Eleocharis sellowiana*. A) Hábito; B) ápice da bainha superior; C) inflorescência; D) aquênio.

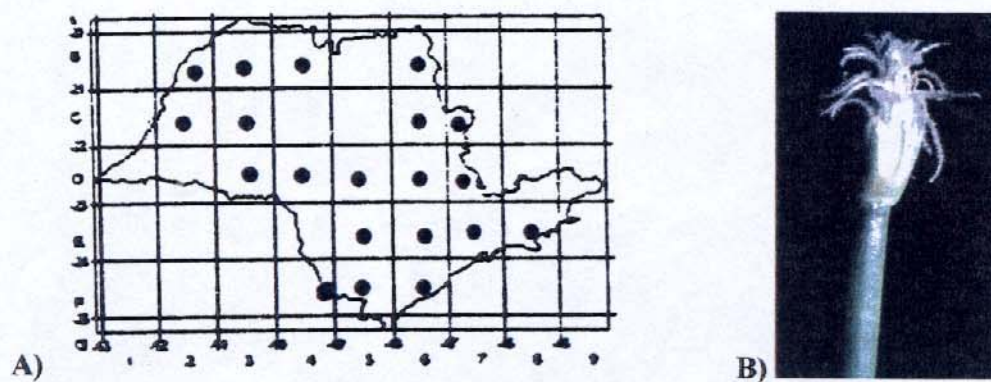


Figura 13: *E. sellowiana*. A) Distribuição no Estado de São Paulo; B) Detalhe da inflorescência.

3. Objetivos

O presente trabalho teve por objetivo:

· Isolamento e determinação estrutural dos metabólitos presentes nos extratos de *Eleocharis acutangula*, *E. sellowiana* e *E. interstincta* a fim de adicionar dados fitoquímicos que possam ser utilizados na quimiotaxonomia do gênero *Eleocharis* e comparação dos extratos obtidos através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) e de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) - Capítulo I;

· Avaliação da composição dos voláteis florais e do óleo essencial obtido por hidrodestilação dos rizomas de *E. elegans* e *E. sellowiana* - Capítulo II;

· Avaliação da atividade biológica dos extratos obtidos através dos ensaios de letalidade com *Artemia salina* (citotoxicidade), bioautografia (atividade antimicrobiana) e de letalidade com *Biomphalaria glabrata* (atividade moluscocida) - Capítulo III.

CAPÍTULO I - ANÁLISE FITOQUÍMICA

I. 1. Introdução

Como já relatado na Introdução Geral, apenas cinco espécies *Eleocharis* foram objeto de estudo fitoquímico anteriores resultando na identificação de compostos pertencentes a várias classes de metabólitos secundários.

Neste capítulo serão descritos os procedimentos experimentais empregados para o isolamento dos compostos presentes em vários extratos de *E. acutangula*, *E. interstincta* e *E. sellowiana* e a determinação das respectivas estruturas moleculares.

I. 2. Materiais e Métodos

I. 2. 1. Nomenclatura empregada na designação dos extratos

A abreviatura adotada na denominação dos extratos e das frações obtidas seguiu a metodologia subsequente.

↪ Primeira letra maiúscula e segunda letra minúscula: Nome da espécie.

E. acutangula – **Ea** *E. interstincta* – **Ei**
E. sellowiana - **Es** *E. maculosa* - **Em**

↪ Terceira letra maiúscula: Parte da planta utilizada.

Parte Aérea - **A** Parte subterrânea - **S**

↪ Quarta letra maiúscula: Referente ao tratamento do material antes da extração.

Material fresco - **F** Material seco - **S**

↯ Quinta letra maiúscula: Solvente empregado na extração e/ou partição.

Hexano – H ,	Diclorometano - D	Clorofórmio - C
Acetato de etila - Ac	Metanol - M	Hidro-etanol - HE

↯ Sexta letra maiúscula subscrita: Extrato submetido à metodologia para separação de clorofila.

Fração rica em clorofila - **c** Fração sem clorofila - **s**

↯ Sexta letra maiúscula: Extrato submetido à metodologia para obtenção de frações enriquecidas em saponinas.

Precipitado após adição de éter etílico - **B₁** Filtrado após adição de éter etílico – **B₂**

I. 2. 2. Obtenção dos Extratos

As espécies de *Eleocharis* analisadas neste trabalho foram fornecidas pela Profa. Dra. Maria do Carmo E. do Amaral (Departamento de Botânica - Instituto de Biologia, UNICAMP) e sua aluna de doutoramento Aparecida Donisete de Faria. Espécimes testemunhas encontram-se depositados no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, UNICAMP (UEC), sob os números:

❖ *E. acutangula*: A. D. Faria *et al.* 1001, UEC 103088;

❖ *E. interstincta*: L. Y. S. Aona, A. D. Faria & G. Jacobucci 95/12, UEC 94218;

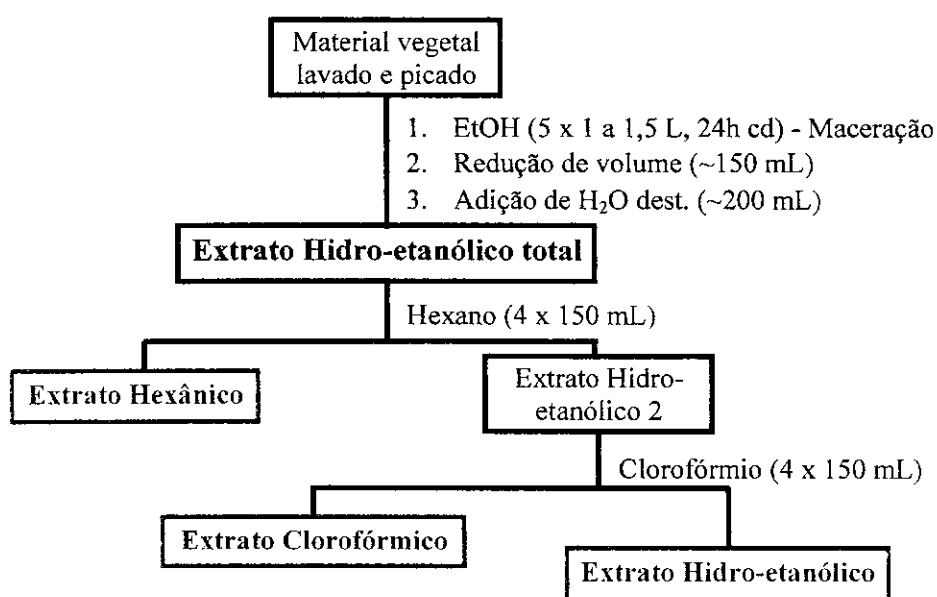
❖ *E. maculosa*: L. Y. S. Aona, A. D. Faria *et al.* 97/213, UEC 93701;

❖ *E. sellowiana*: A. D. Faria *et al.* 1000, UEC 103089

O material coletado de cada espécie foi lavado, separado em partes aéreas e subterrâneas e picado em pequenos pedaços. Uma parte foi submetida a um processo de secagem, enquanto outra extraída a fresco. Foram empregadas duas

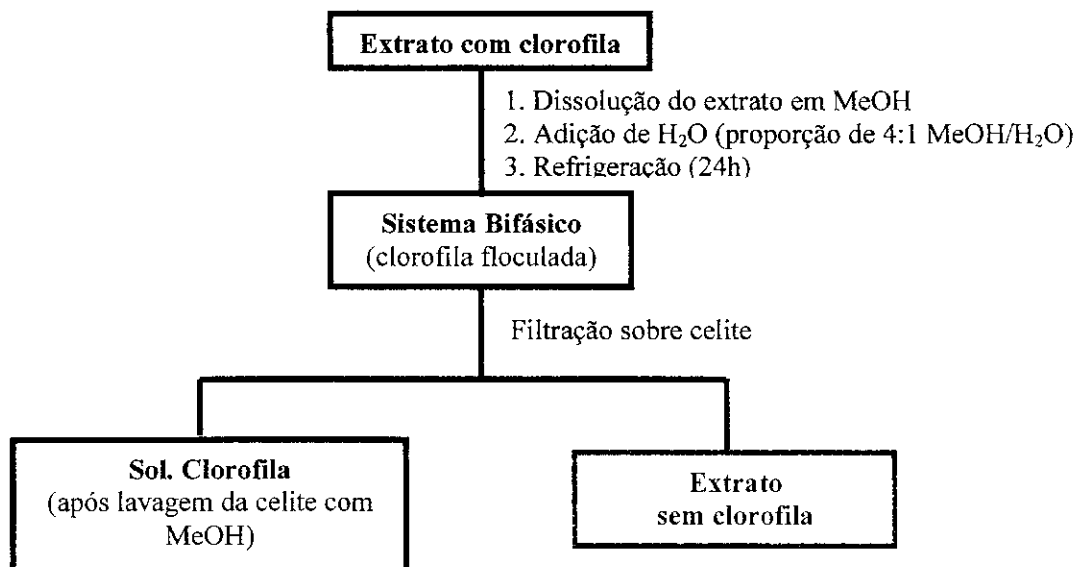
metodologias de extração, a saber, extração total por maceração com etanol seguida de partição com hexano e acetato de etila ou clorofórmio (Fluxograma 1) e a extração em Soxhlet com hexano, clorofórmio e metanol sucessivamente.

Fluxograma 1: Maceração seguida de partição do extrato total em solventes com polaridade crescente.



Os extratos hexânico, acetato de etila e clorofórmico das partes aéreas apresentaram clorofila o que dificultava a análise dos mesmos através de cromatografia em coluna. Assim, buscou-se uma metodologia para a separação da clorofila a fim de facilitar as análises. Optou-se pela metodologia descrita por Fernandes e colaboradores¹ que consistiu basicamente em dissolver-se o extrato rico em clorofila na menor quantidade possível de metanol seguida da adição lenta de água (o equivalente à terça ou quarta parte do volume total de metanol empregado) e filtração sobre celite, obtendo-se um extrato livre de clorofila, a qual ficou retida na celite e posteriormente foi extraída com metanol (Fluxograma 2).

¹ Fernandes AMAP, Barata LES, Ferri PH. Lignans and a neolignan from *Virola oleifera* leaves. *Phytochemistry* 32 (6): 1567-1572, 1993.

Fluxograma 2: Metodologia para separação de clorofila.**I. 2. 3. Isolamento e determinação estrutural dos metabólitos secundários**

As placas de CCDP e CCDA sobre vidro foram preparadas no laboratório com sílica gel GF₂₅₄ (Merck). Estas placas de CCD sobre vidro e as cromatofolhas de alumínio silicagel GF₂₅₄ 0,2 nm (Art. 1.05554, Merck) foram reveladas sob luz UV (254 e 366nm) e nebulizadas com solução de anisaldeído modificada² (etanol/anisaldeído/ácido sulfúrico/ác. acético 90:5:5:1) seguida de aquecimento. A numeração das faixas visualizadas nas placas de CCDP seguiu a ordem crescente dos valores de R_f.

As análises por CG/EM foram feitas em cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard HP5890 série 2 com coluna ultra-2 acoplado com espectrômetro de massa HP5970, sob as condições apresentadas na tabela 1. Os espectros de massas de alta

² MERCK 1971. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E. Merck, Darmstadt, 118p.

resolução foram obtidos por inserção direta da amostra, através da técnica de impacto eletrônico (70 eV), em equipamento VG-Autospec.

Os espectros de massas foram comparados com padrões presentes na biblioteca “The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data” version 3.2 e “NIST Mass Spectral Search Program” version 1.6d, 1998.

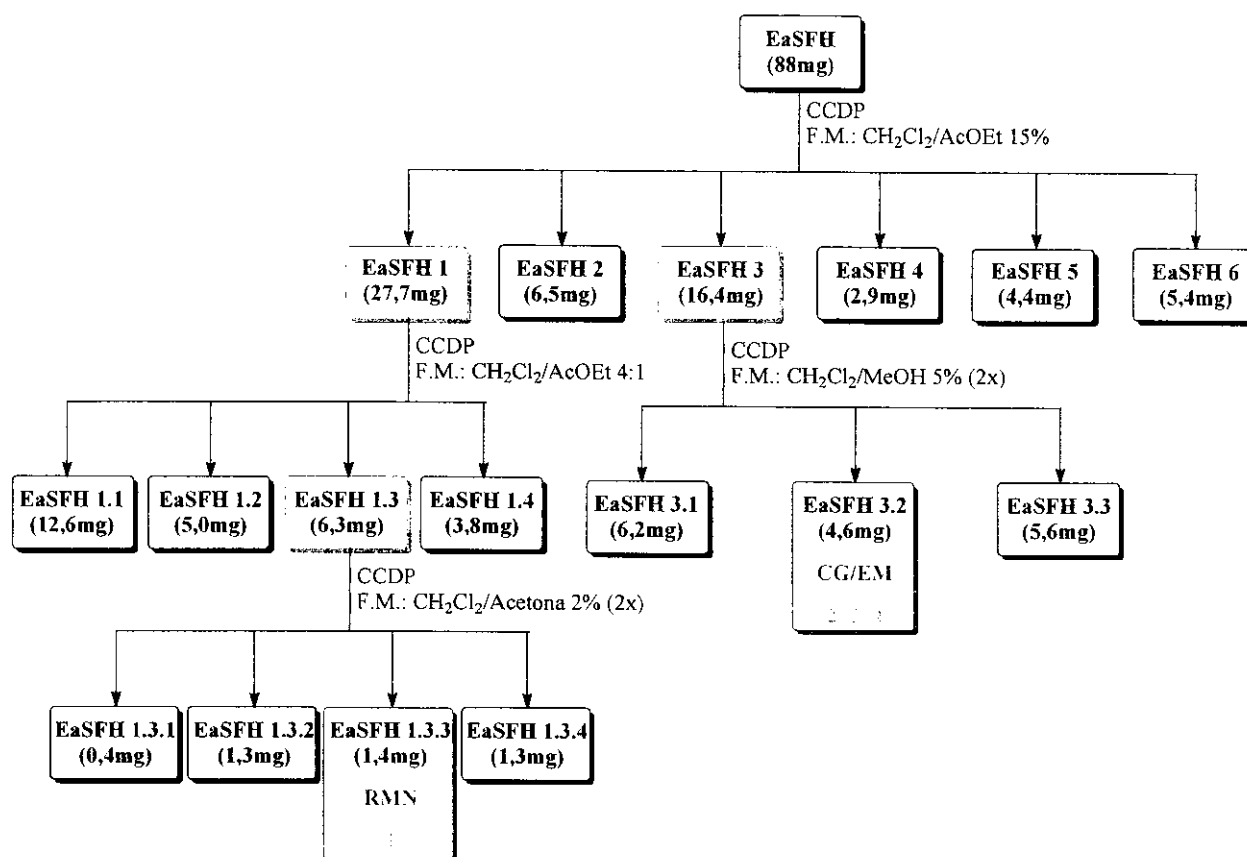
Tabela 1: Condições empregadas nas análises por CG/EM.

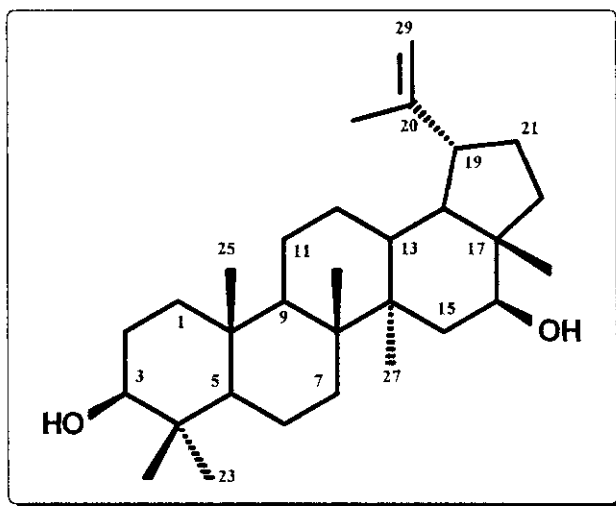
Injetor	Coluna	Interface	Amostra
250°C	50°C, 10°C/min até 280°C, mais 12min a 280°C	280°C	EaSFH 3.2; EiAFHE ac 1, 2 e 3; EaSFHE ac 2.2 e 3.2; EsASH 5.5 e 6.6
	100°C, 10°C/min até 280°C, mais 22min a 280°C		EsASH 6.2.3.2.2.2.2, 6.3, 7.4.3, 7.7.3, 7.10.2, 7.10.3, 7.11.3
	100°C, 4°C/min até 280°C, mais 15min a 280°C		EsASH 7.2, 7.6, 7.11.4
	50°C, 4°C/min até 280°C, mais 12min a 280°C		EsSFH G1.9
300°C	150°C, 10°C/min até 300°C, mais 15min a 280°C	285°C	EsASH 6.4ac
280°C	130°C por 2min, 2°C/min até 280°C, mais 20min a 280°C		EsSFHE B ₁ 17.2ac

Os espectros de RMN¹H, de ¹³C e experimentos 1D (DEPT, NoESY 1D, TOCSY 1D) e 2D (gCOSY, HSQC, HMBC) foram obtidos em equipamento GEMINI 2000 (VARIAN) com campo de 7 tesla e em equipamento INOVA 500 (VARIAN) com campo de 11 tesla, a temperatura ambiente, com as substâncias dissolvidas em solvente deuterado apropriado. No experimento de NOESY 1D para o composto EsSFH 3.3.2 foram irradiados os hidrogênios H-3, H-27 e H-28, utilizando-se *mixing time* de 500 ms; já no experimento de TOCSY 1D, para o mesmo composto, foram irradiados os hidrogênios H-3, H-16, H-20 e H-30, com *mixing time* variando entre 0 e 500 ms.

I. 2. 3. 1. Fracionamento dos Extratos Hexânicos

I. 2. 3. 1. 1. EaSFH - *Eleocharis acutangula*, Extrato Hexânico da parte subterrânea fresca.



Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β -diol (1)

Aspecto Físico: cristais incolores.

RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500MHz): Tabela 2.

RMN¹³C (CDCl₃/TMS, 125MHz): Tabela 3.

Tabela 2: RMN¹H de Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β -diol (1).

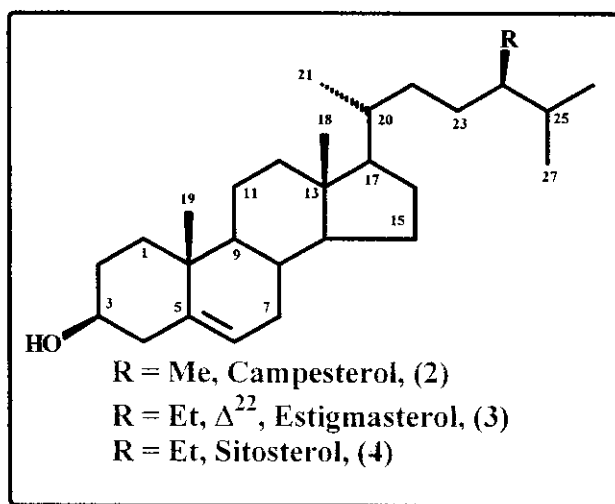
¹ H	δ_H^3	$\delta_H^{exp.}$
3	3,19 (dd, J = 10,6 e 5,1 Hz)	3,19 (dd, J = 11,3 e 4,9 Hz)
16	3,61 (dd, J = 11 e 4,6 Hz)	3,62 (dd, J = 10,5 e 5,0 Hz)
23	0,80 (s)	0,80 (s)
24	0,97 (s)	0,98 (s)
25	0,99 (s)	1,00 (s)
26	0,84 (s)	0,84 (s)
27	1,04 (s)	1,04 (s)
28	0,77 (s)	0,77 (s)
29a	4,60 (sl)	4,61 (sl)
29b	4,71 (sl)	4,72 (sl)
30	1,69 (s)	1,69 (s)

Ref. 3: 300 MHz; **Exp.:** 500 MHz; em CDCl₃/TMS.

³ Yürüker A, Orjala J, Sticher O, Rali T. Triterpenes from *Rhus taitensis*. *Phytochemistry* **48** (5): 863-866, 1998.

Tabela 3: RMN¹³C de Lup-20(29)-ene-3 β ,16 β -diol (1).

C	δ_C^4	$\delta_C^{exp.}$	C	δ_C^4	$\delta_C^{exp.}$
CH ₂ -1	38,9	38,71	CH-16	76,9	77,08
CH ₂ -2	27,4	27,36	C ₀ -17	48,6	48,58
CH-3	78,8	78,94	CH-18	47,7	47,68
C ₀ -4	38,9	38,84	CH-19	47,6	47,58
CH-5	55,4	55,29	C ₀ -20	149,8	149,97
CH ₂ -6	18,3	18,28	CH ₂ -21	30,0	29,88
CH ₂ -7	34,3	34,21	CH ₂ -22	37,8	37,69
C ₀ -8	41,0	40,90	CH ₃ -23	28,0	27,96
CH-9	50,0	49,98	CH ₃ -24	15,4	15,34
C ₀ -10	37,1	37,10	CH ₃ -25	16,1	16,17
CH ₂ -11	20,9	20,84	CH ₃ -26	16,1	16,12
CH ₂ -12	24,9	24,74	CH ₃ -27	16,1	15,98
CH-13	37,3	37,22	CH ₃ -28	11,8	11,65
C ₀ -14	44,1	44,06	CH ₂ -29	109,6	109,79
CH ₂ -15	36,9	36,87	CH ₃ -30	19,4	19,31

Ref. 4: 25 MHz; Exp: 125 MHz; em CDCl₃/TMS.**Campesterol (2), Estigmasterol (3) e Sitosterol (4).**

⁴ Wenkert E, Baddeley GV, Burfitt IR, Moreno LN. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of naturally-occurring substances. LVII. Triterpenes related to lupane and hopane. *Org Magn Reson* 11 (7): 337-43, 1978.

CG/EM:

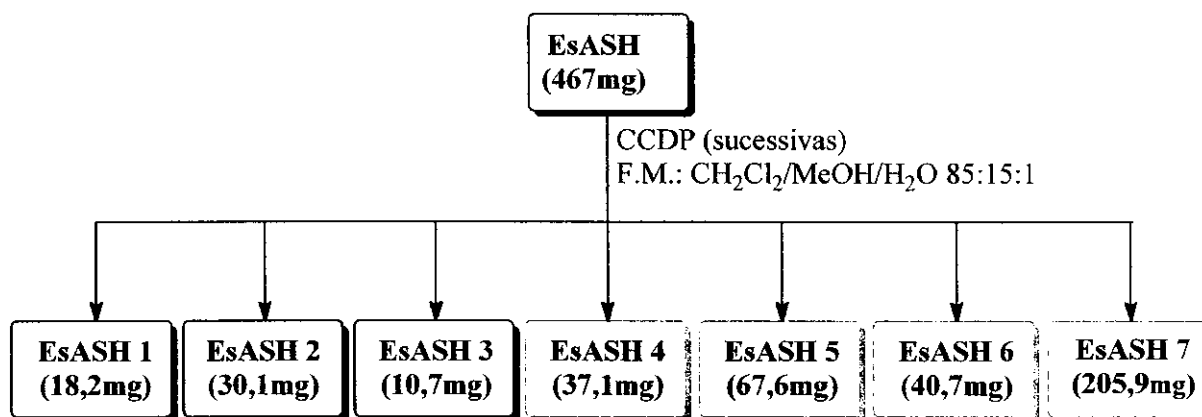
Campesterol (2), $t_R = 34,68$ min, m/z (%): 400 (44), 382 (35), 367 (18), 315 (33), 289 (30), 267 (12), 255 (19), 231 (18), 191 (19), 177 (12), 161 (32), 145 (37), 133 (35), 105 (53), 91 (54), 81 (67), 55 (81), 43 (100);

Estigmasterol (3), $t_R = 35,49$ min, m/z (%): 412 (26), 351 (12), 315 (4), 300 (14), 271 (28), 255 (28), 231 (5), 229 (9), 191 (11), 177 (14), 161 (21), 145 (28), 133 (33), 105 (49), 91 (44), 81 (60), 55 (100), 43 (49);

Sitosterol (4), $t_R = 37,43$ min, m/z (%): 414 (49), 396 (23), 381 (18), 354 (5), 329 (32), 303 (26), 273 (21), 255 (25), 231 (19), 191 (11), 177 (14), 161 (35), 145 (60), 133 (42), 105 (58), 91 (61), 81 (60), 55 (81), 43 (100).

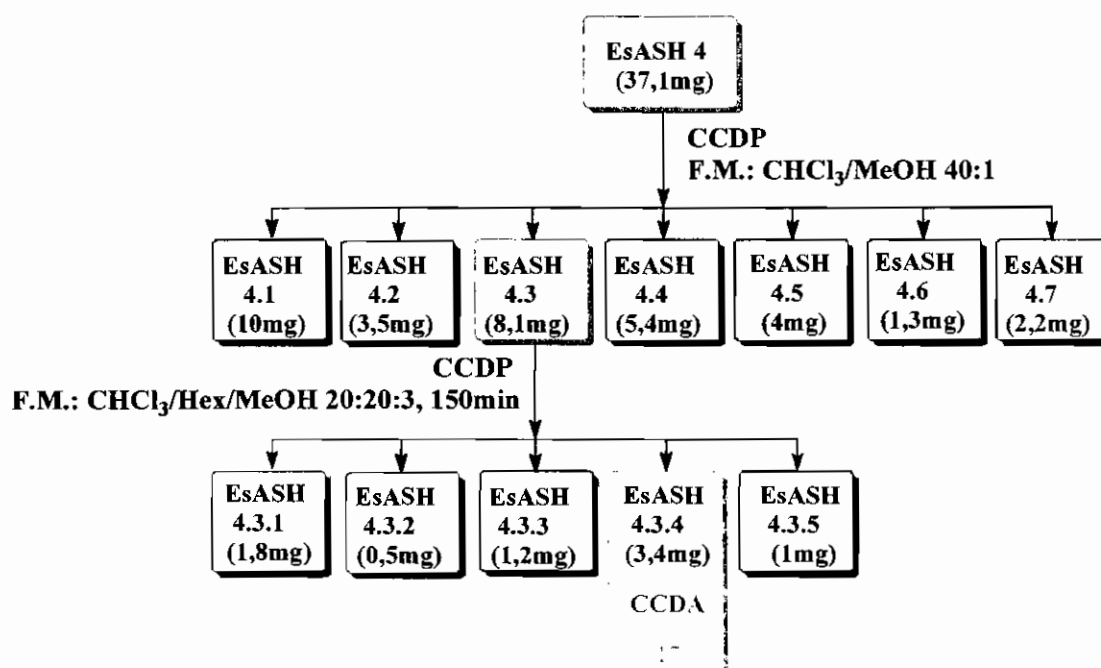
I. 2. 3. 1. 2. EsASH - *Eleocharis sellowiana*, Extrato Hexânico da parte aérea seca.

Para o fracionamento de EsASH, optou-se pela realização de CCDP com um sistema de desenvolvimento descrito por Van Aller e colaboradores (ref. 13, Introdução Geral) que resultou no acúmulo de clorofila em uma única fração (EsASH 7), facilitando a purificação das demais substâncias.

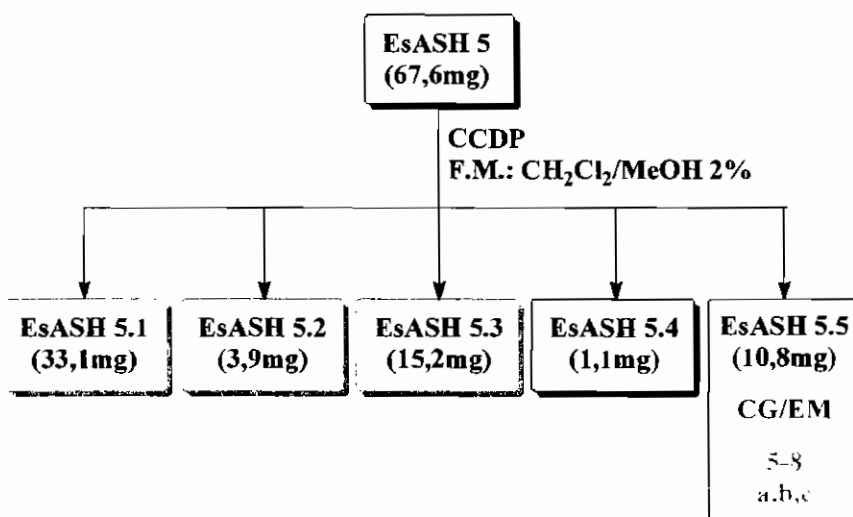


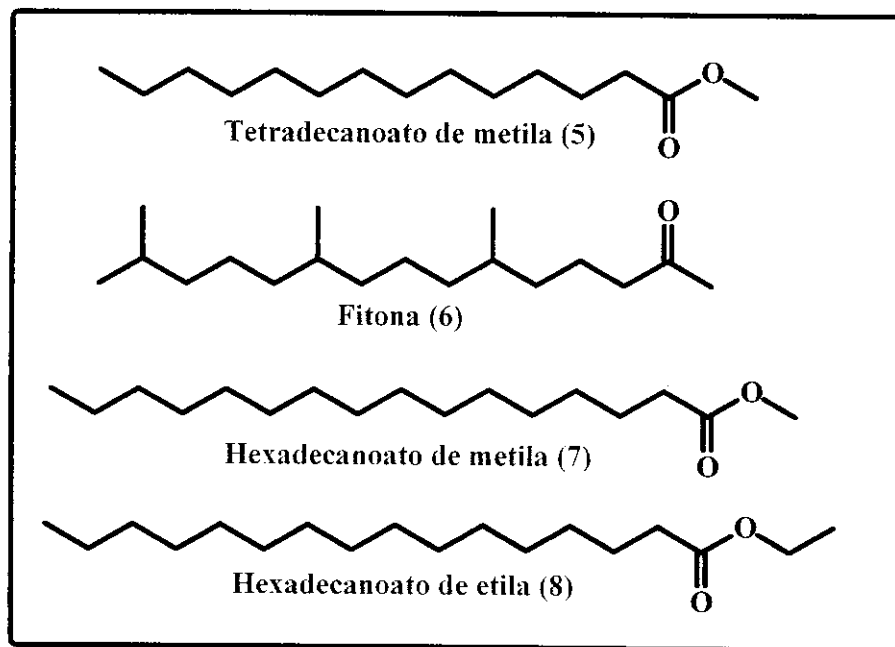
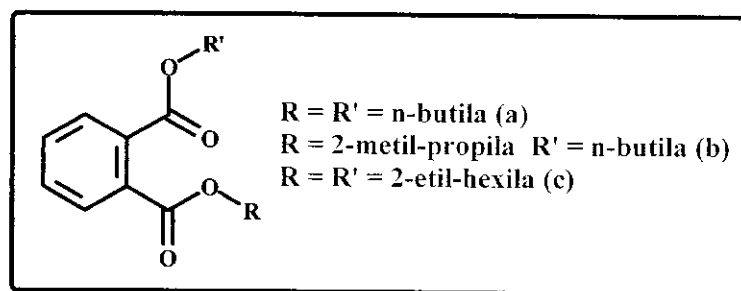
Os fluxogramas a seguir ilustram as análises das frações destacadas por sucessivas CCDP.

EsASH 4



EsASH 5



Ésteres de Ácidos Graxos (5,7 e 8) e Fitona (6).**Derivados do Ácido Ftálico (a – c).****CG/EM:**

Tetradecanoato de metila (5), $t_R = 16,45$ min, m/z (%): 242 (5), 211 (5), 199 (8), 185 (2), 157 (4), 143 (10), 129 (6), 111 (4), 97 (6), 87 (62), 74 (100), 55 (30), 43 (34);

Fitona (6), $t_R = 17,77$ min, m/z (%): 268 (<1), 250 (6), 210 (4), 194 (<1), 165 (6), 137 (6), 124 (8), 109 (14), 95 (16), 85 (22), 71 (42), 58 (77), 43 (100);

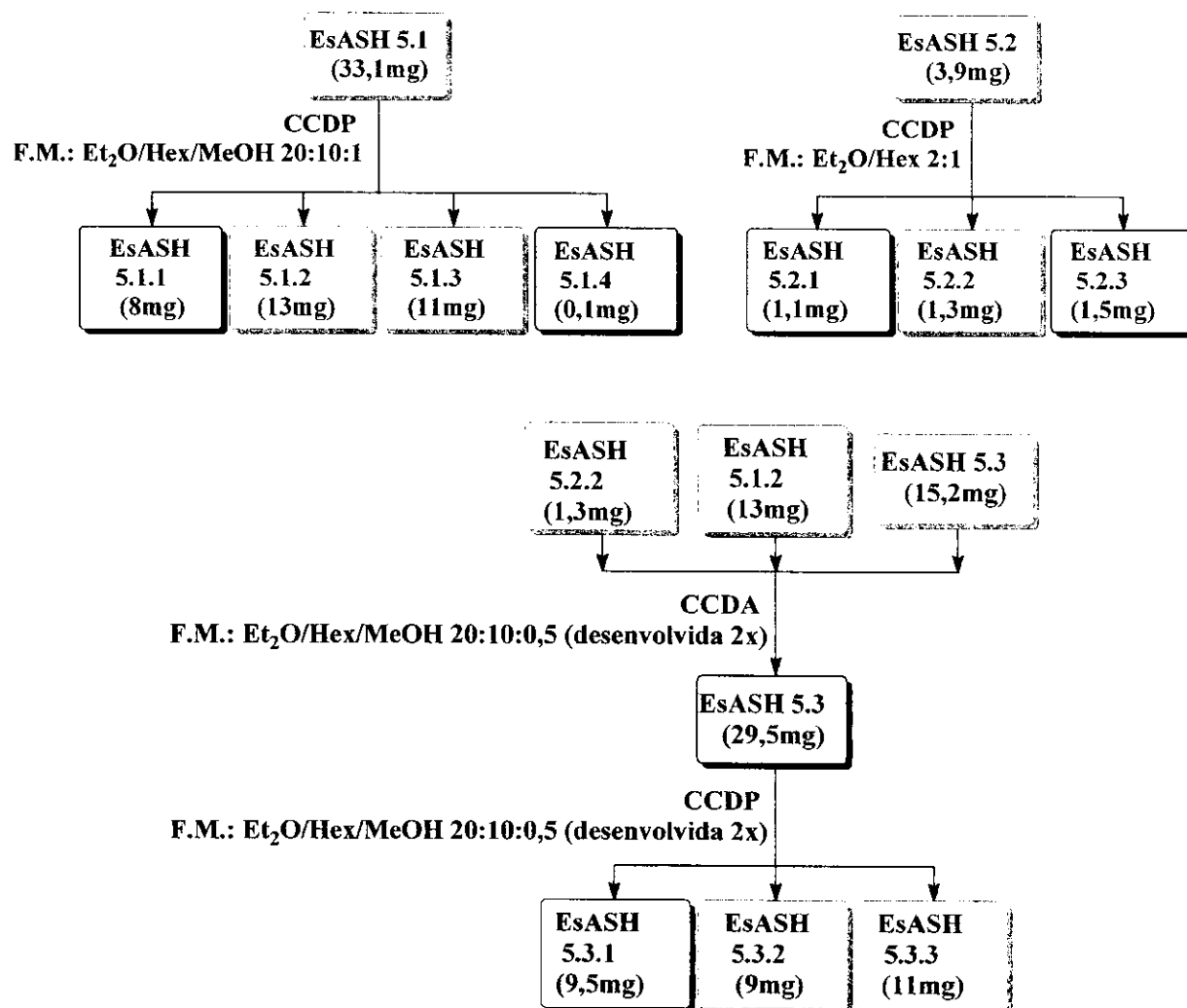
Ftalato de n-butila (a), $t_R = 18,15$ min, m/z (%): 278 (<1), 223 (8), 205 (2), 167 (4), 149 (100), 104 (8), 76 (6), 57 (24);

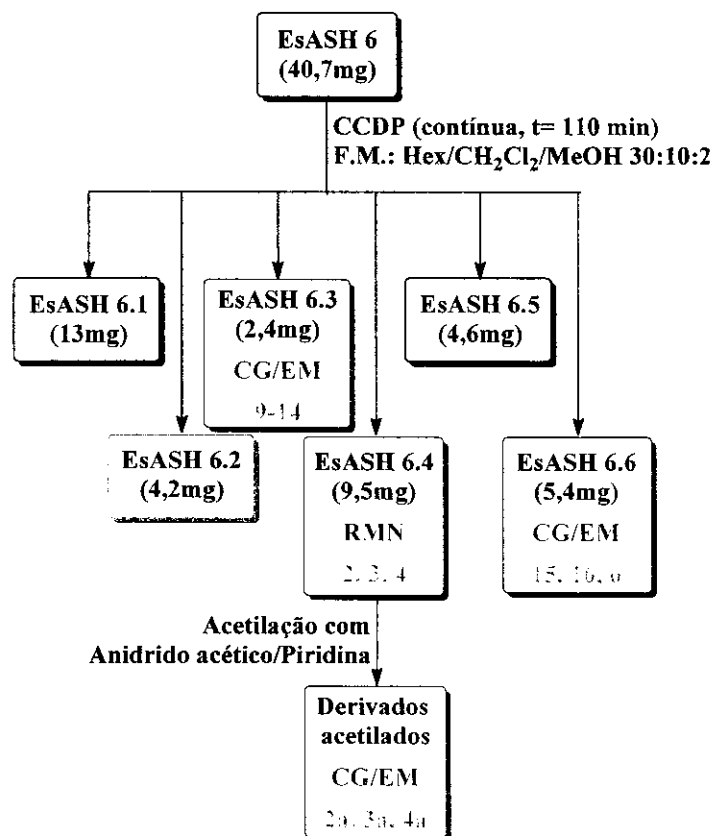
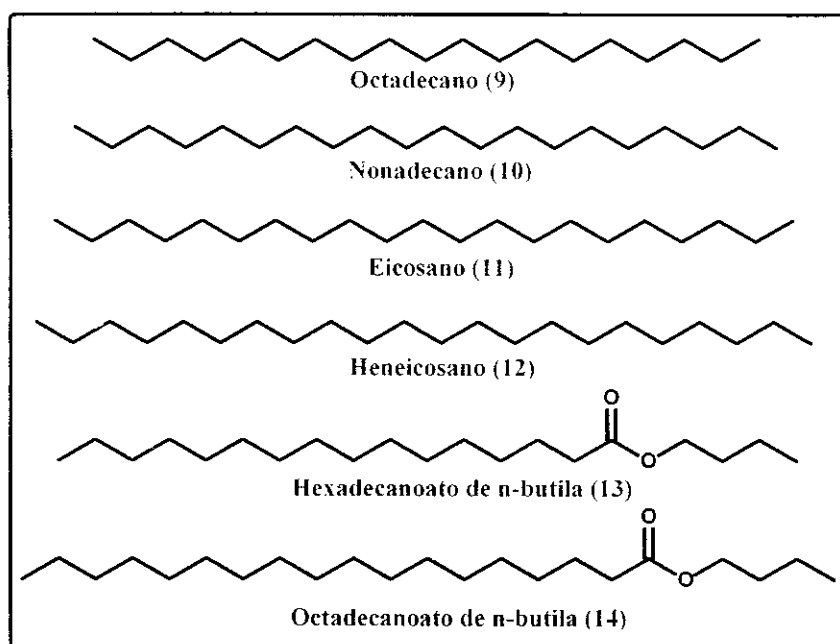
Hexadecanoato de metila (7), $t_R = 18,61\text{min}$, m/z (%): 270 (10), 239 (6), 227 (10), 199 (4), 185 (4), 171 (4), 143 (14), 129 (6), 97 (7), 87 (72), 74 (100), 57 (14);

Ftalato de n-butila e 2-metil-propila (b), $t_R = 19,14\text{min}$, m/z (%): 278 (<1), 223 (4), 205 (4), 149 (100), 121 (2), 104 (4), 93 (2), 76 (5), 65 (2), 57 (5);

Hexadecanoato de etila (8), $t_R = 19,30\text{min}$, m/z (%): 284 (5), 241 (5), 157 (10), 143 (5), 101 (52), 88 (100), 70 (18), 57 (30);

Ftalato de 2-etil-hexila (c), $t_R = 24,48\text{min}$, m/z (%): 390 (<1), 361 (<1), 279 (8), 167 (32), 149 (100), 132 (2), 113 (8), 83 (6), 71 (18), 57 (24).



EsASH 6**Alcanos (9 a 12) e Ésteres de Ácidos Graxos (13 e 14).**

CG/EM:

Octadecano (9), $t_R = 10,90$ min, m/z (%): 254 (8), 155 (2), 141 (3), 127 (4), 113 (10), 99 (20), 85 (52), 71 (71), 57 (100), 43 (68);

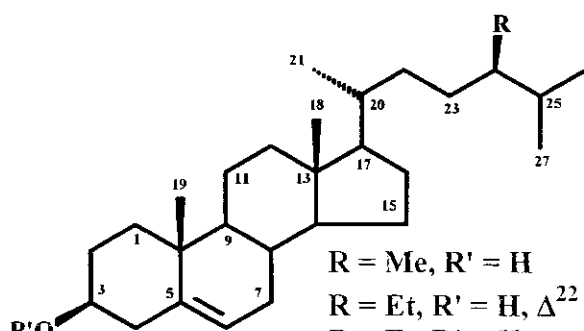
Nonadecano (10), $t_R = 11,97$ min, m/z (%): 268 (4), 155 (2), 141 (10), 127 (7), 111 (15), 97 (20), 85 (56), 71 (74), 57 (100), 43 (66);

Eicosano (11), $t_R = 12,98$ min, m/z (%): 282 (4), 267 (<1), 141 (4), 127 (7), 113 (12), 97 (20), 85 (54), 71 (66), 57 (100), 43 (72);

Heneicosano (12), $t_R = 13,97$ min, m/z (%): 296 (<1), 281 (<1), 197 (<1), 183 (<1), 155 (4), 141 (5), 127 (9), 113 (8), 111 (20), 99 (13), 97 (26), 85 (50), 71 (76), 57 (100), 43 (71);

Hexadecanoato de n-butila (13), $t_R = 14,84$ min, m/z (%): 312 (16), 269 (2), 257 (52), 239 (30), 185 (4), 171 (4), 157 (3), 129 (21), 111 (16), 97 (26), 73 (30), 69 (37), 56 (100), 43 (61);

Octadecanoato de n-butila (14), $t_R = 16,61$ min, m/z (%): 340 (18), 297 (<1), 285 (49), 267 (25), 241 (10), 185 (12), 129 (26), 116 (10), 97 (31), 85 (25), 73 (37), 56 (100), 43 (67).

Campesterol (2), Estigmasterol (3) e β -Sitosterol (4).

R = Me, R' = H Campesterol (2)

R = Et, R' = H, Δ^{22} Estigmasterol (3)

R = Et, R' = H Sitosterol (4)

R = Me, R' = COCH₃ Acetato de Campesterol (2a)

R = Et, R' = COCH₃, Δ^{22} Acetato de estigmasterol (3a)

R = Et, R' = COCH₃ Acetato de sitosterol (4a)

Aspecto físico da mistura de 2 a 4: cristais incolores

RMN¹H (CDCl₃/TMS, 300MHz): Tabela 4.

RMN¹³C (CDCl₃/TMS, 125MHz): Tabela 5.

CG/EM dos derivados acetilados:

Acetato de campesterol (2a), t_R = 23,21min, m/z (%): 442 (não aparece), 382 (66), 367 (20), 340 (<2), 274 (5), 261 (5), 253 (18), 177 (10), 159 (10), 147 (45), 145 (33), 133 (31), 91 (34), 55 (48), 43 (100);

Acetato de estigmasterol (3a), t_R = 23,21min, m/z (%): 454 (não aparece), 394 (71), 379 (2), 351 (10), 281 (10), 267 (2), 255 (27), 228 (5), 199 (20), 133 (31), 119 (16), 105 (31), 93 (31), 81 (87), 55 (100), 43 (89);

Acetato de β-sitosterol (4a), t_R = 24,41min, m/z (%): 456 (não aparece), 396 (68), 381 (16), 354 (2), 288 (9), 275 (4), 255 (11), 147 (44), 133 (23), 119 (20), 105 (33), 95 (29), 81 (53), 55 (51), 43 (100).

Tabela 4: Dados de RMN¹H da mistura de 2, 3 e 4.

H	δ _H ^{exp.}	δ _H ^{campesterol 5}	δ _H ^{estigmasterol *5}	δ _H ^{β-sitosterol 5}
3	3,53 (<i>m</i>)	n.r.	n.r.	n.r.
6	5,35 (<i>d</i> , <i>J</i> = 4,9 Hz)	n.r.	n.r.	n.r.
18	0,69 (<i>s</i>)	0,68 (<i>s</i>)	0,69(<i>s</i>)	0,68 (<i>s</i>)
19	1,02 (<i>s</i>)	1,01 (<i>s</i>)	1,02 (<i>s</i>)	1,01 (<i>s</i>)
21	0,93 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz)	0,91 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	1,02 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	0,92 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)
22	5,02 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 15,3 e 8,5 Hz)	-	n.r.	-
23	5,15 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 15,3 e 8,5 Hz)	-	n.r.	-
26	0,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,3 Hz)	0,85 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	0,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	0,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)
27	0,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6 Hz)	0,80 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	0,79 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	0,81 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8Hz)
28	0,78 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	0,77 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,8 Hz)	-	-
29	0,83 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)	-	0,80 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)	0,84 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,2 Hz)

n.r.: não relatado; **Exp.:** 300 MHz; **Ref. 5:** 220 MHz; em CDCl₃/TMS.

* dados do acetato de estigmasterila.

⁵ Rubinstein I, Goad LJ, Clague ADH, Mulheim LJ. The 220 MHz spectra of phytosterols. *Phytochemistry* 15: 195-200, 1976.

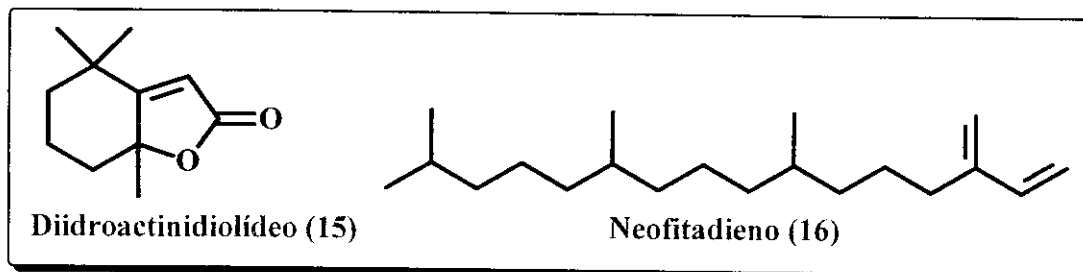
Tabela 5: Dados de RMN¹³C e DEPT da mistura de 2, 3 e 4.

C	Mistura (δ_C) ^{exp.}	Campesterol (δ_C) ⁶	Estigmasterol (δ_C) ⁶	β -Sitosterol (δ_C) ⁶
CH ₂ -1	37,23	37,34	37,31	37,31
CH ₂ -2	31,63	31,76	31,69	31,57
CH-3	71,81	71,81	71,81	71,69
CH ₂ -4	42,27	42,40	42,35	42,25
C ₀ -5	140,73	140,75	140,80	140,76
CH-6	121,72	121,72	121,69	121,59
CH ₂ -7	31,89	31,99	31,94	31,92
CH ₂ -8	31,89	31,99	31,94	31,92
CH -9	50,10	50,24	50,20	50,17
C ₀ -10	36,48	36,58	36,56	36,51
CH ₂ -11	21,06	21,16	21,11	21,11
CH ₂ -12	39,75	39,86	39,74	39,81
C ₀ -13	42,30	42,40	42,35	42,33
CH -14	56,84	56,85	56,91	56,79
CH ₂ -15	24,35	24,36	24,39	24,32
CH ₂ -16	28,24/28,91	28,27	28,96	28,26
CH -17	56,02	56,21	56,06	56,11
CH ₃ -18	11,93/12,03/11,84	11,90	12,07	11,87
CH ₃ -19	19,38	19,44	19,42	19,40
CH -20	n.d./40,49/ n.d.	35,96	40,54	36,17
CH ₃ -21	21,20/18,76	18,77	21,11	18,82
CH _x -22	138,31/33,91	33,80 (CH ₂)	138,37 (CH)	33,95 (CH ₂)
CH _x -23	n.d./129,24/26,02	30,37 (CH ₂)	129,32 (CH)	26,13 (CH ₂)
CH -24	38,81/51,22/45,80	38,92	51,29	45,85
CH -25	32,40/31,88/29,11	32,49	31,94	29,18
CH ₃ -26	20,20/21,20/19,81	20,26	21,26	19,84
CH ₃ -27	19,01	18,32	19,02	19,07
CH _x -28	15,35/25,40/23,04	15,44 (CH ₃)	25,44 (CH ₂)	23,09 (CH ₂)
CH ₃ -29	12,24	-	12,27	12,32

n.d.: não detectado; Exp.: 125 MHz; Ref. 6: 25 MHz; em CDCl₃.

⁶ Wright JLC, McInnes AG, Shimizu S, Smith DG, Walter JA, Idler D, Khalil W. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by C-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Can J Chemistry* **56** (14): 1898-1903, 1978.

Terpenóides (15 e 16).

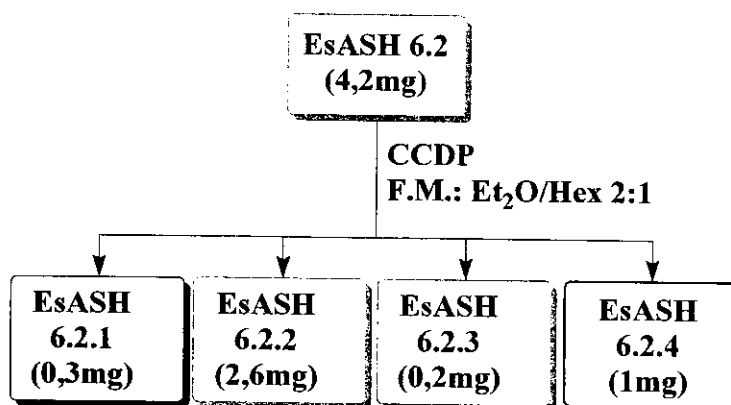


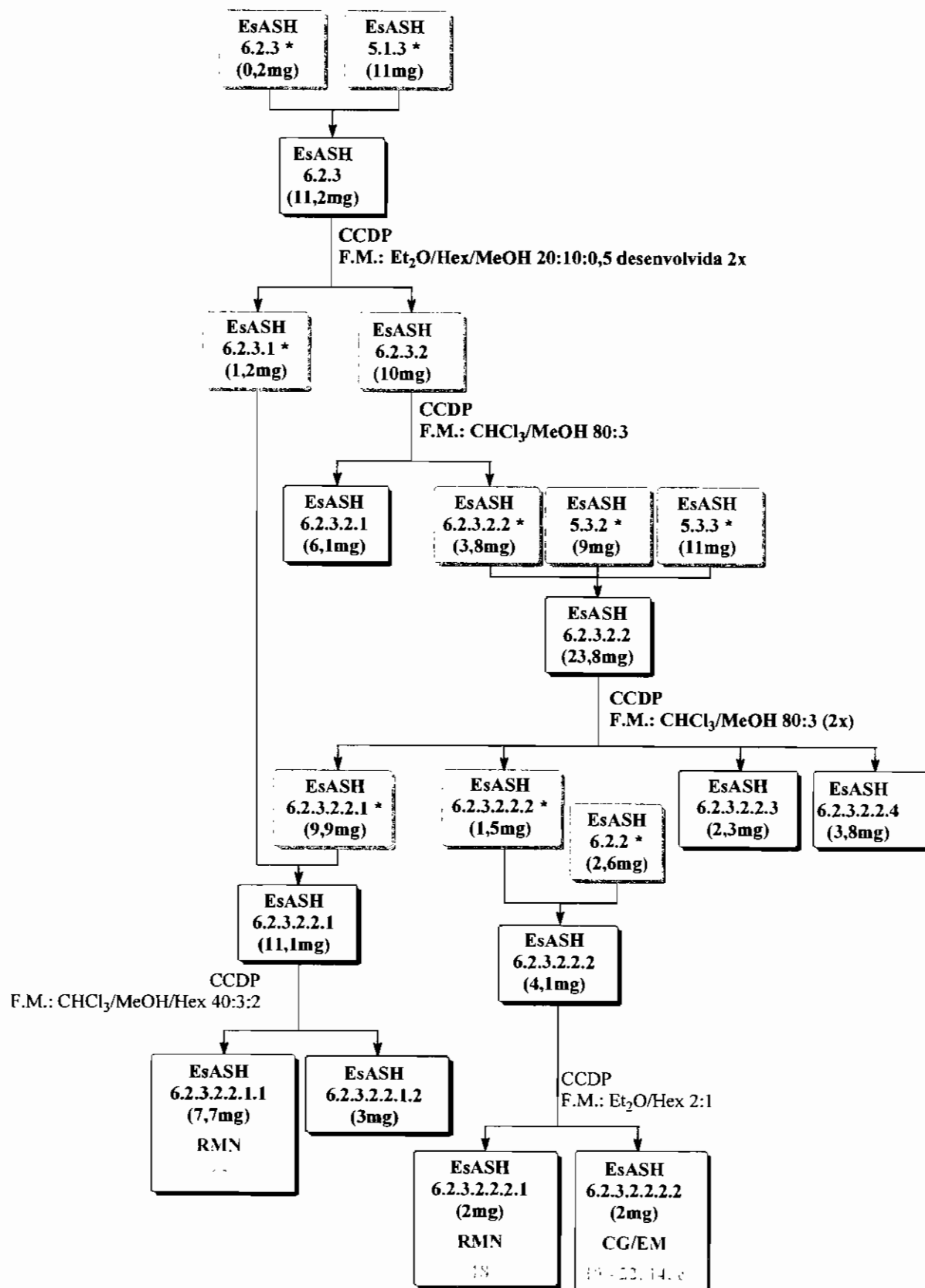
CG/EM:

Diidroactinidiolideo (15), $t_R = 13,73\text{min}$, m/z (%): 180 (16), 137 (33), 124 (12), 111 (100), 95 (16), 81 (12), 67 (27), 55 (15), 43 (55);

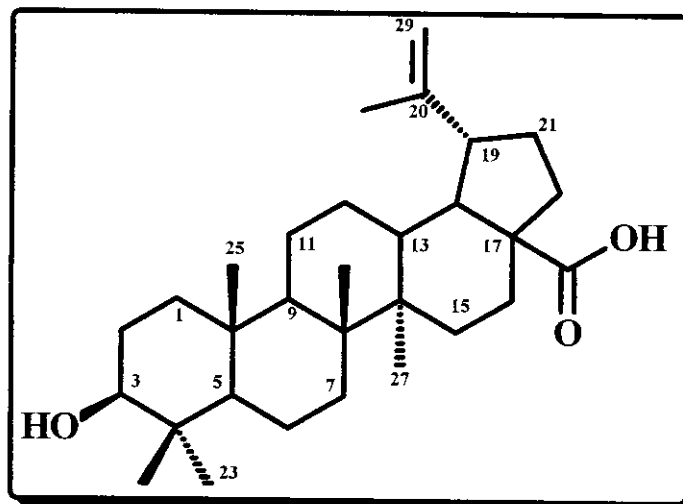
Neofitadieno (16), $t_R = 16,86\text{min}$, m/z (%): 278 (<1), 137 (9), 123 (47), 95 (76), 82 (73), 68 (100), 57 (71), 43 (67).

Fitona (6), $t_R = 16,96\text{min}$, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 31)





* Frações reunidas após CCDA.

Ácido Betulínico (17)

Aspecto físico: sólido amorfo incolor.

RMN¹H (CDCl₃/TMS, 300MHz): tabela 6.

RMN¹³C (CDCl₃, 75MHz): tabela 7.

Tabela 6: Dados de RMN¹H do Ácido Betulínico (17).

H	δ_H^7	δ_H^{exp}
3	3,19 (<i>dd</i> , $J = 10,0$ e $4,7$ Hz)	3,20 (<i>dd</i> , $J = 10,8$ e 5 Hz)
19	2,99 (<i>td</i> , $J = 11,0$ e $5,5$ Hz)	3,02 (<i>m</i>)
23	0,93 (<i>s</i>)	0,95 (<i>s</i>)
24	0,75 (<i>s</i>)	0,76 (<i>s</i>)
25	0,82 (<i>s</i>)	0,83 (<i>s</i>)
26	0,96 (<i>s</i>)	0,97 (<i>s</i>)
27	0,97 (<i>s</i>)	0,98 (<i>s</i>)
29a	4,60 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)	4,62 (<i>sl</i>)
29b	4,73 (<i>d</i> , $J = 1,5$ Hz)	4,75 (<i>sl</i>)
30	1,68 (<i>s</i>)	1,70 (<i>s</i>)

Ref. 7, Exp.: 300 MHz, CDCl₃/TMS.

⁷ Siddiqui S, Hafeez F, Begum S, Siddiqui BS. Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from leaves of *Nerium oleander*. *J Nat Prod* **51** (2): 229-233, 1988.

Tabela 7: Dados de RMN¹³C e DEPT do Ácido betulínico (17)

C	δ_C^7	$\delta_C^{exp.}$	C	δ_C^7	$\delta_C^{exp.}$
CH ₂ -1	38,7	38,69	CH ₂ -16	32,1	32,13
CH ₂ -2	27,4	27,38	C ₀ -17	56,3	56,26
CH-3	78,9	78,99	CH-18	46,8	46,86
C ₀ -4	38,8	38,85	CH-19	49,2	49,24
CH-5	55,3	55,32	C ₀ -20	150,3	150,41
CH ₂ -6	18,3	18,27	CH ₂ -21	29,7	29,68
CH ₂ -7	34,3	34,30	CH ₂ -22	37,0	37,00
C ₀ -8	40,7	40,66	CH ₃ -23	27,9	27,96
CH-9	50,5	50,50	CH ₃ -24	15,3	15,32
C ₀ -10	37,2	37,18	CH ₃ -25	16,1	16,10
CH ₂ -11	20,8	20,83	CH ₃ -26	16,0	16,00
CH ₂ -12	25,5	25,47	CH ₃ -27	14,7	14,68
CH-13	38,4	38,35	C ₀ -28	180,5	179,82
C ₀ -14	42,4	42,41	CH ₂ -29	109,6	109,68
CH ₂ -15	30,5	30,56	CH ₃ -30	19,4	19,35

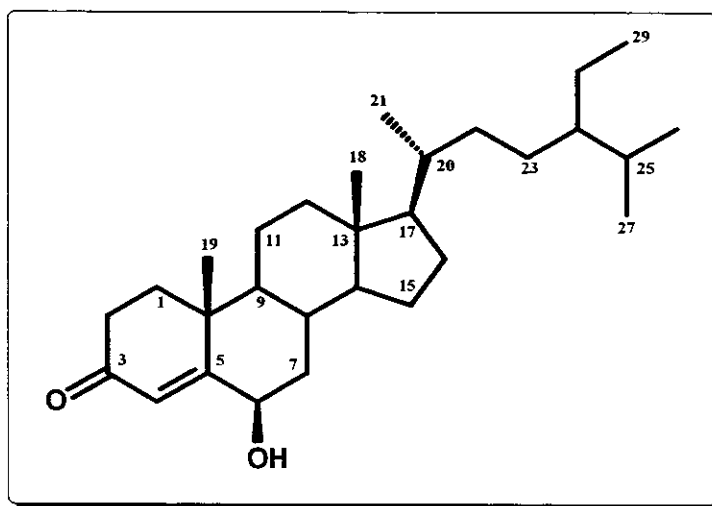
Ref. 7, Exp.: 75 MHz, CDCl₃.**6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (18)****Aspecto Físico:** sólido amorfo branco.**RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500MHz):** Tabela 8.**RMN¹³C (CDCl₃/TMS, 125MHz):** Tabela 9.

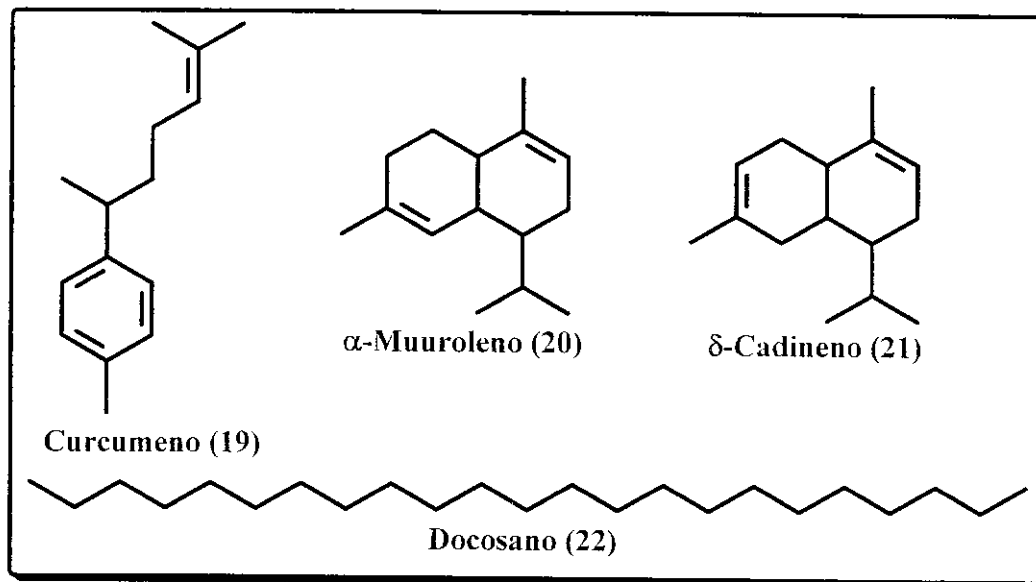
Tabela 8: RMN¹H de 6β-hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (**18**).

H	δ_H^8	$\delta_H^{exp.}$
4	5,82 (s)	5,83 (s)
6	4,34 (m)	4,36 (m)
18	0,75 (s)	0,75 (s)
19	1,38 (s)	1,38 (s)
21	0,93 (d, J = 6,5 Hz)	0,93 (d, J = 6,4 Hz)
26	0,84 (d, J = 6,1 Hz)	0,85 (d, J = 7 Hz)
27	0,82 (d, J = 6,1 Hz)	0,82 (d, J = 7 Hz)
29	0,85 (t, J = 6,7 Hz)	0,88 (t, J = 6,7 Hz)

Ref. 8: 400 MHz; Exp.: 500 MHz; em CDCl₃/TMS.**Tabela 9:** RMN¹³C de 6β-hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (**18**).

C	δ_C^8	$\delta_C^{exp.}$	C	δ_C^8	$\delta_C^{exp.}$
CH ₂ -1	37,06	37,07	CH ₂ -16	28,14	28,16
CH ₂ -2	34,22	34,24	CH-17	56,05	56,02
C ₀ -3	200,11	200,50	CH ₃ -18	11,98	11,95
CH-4	126,26	126,29	CH ₃ -19	19,46	19,48
C ₀ -5	168,55	168,52	CH-20	36,08	36,10
CH-6	73,22	73,24	CH ₃ -21	18,70	18,71
CH ₂ -7	38,56	38,57	CH ₂ -22	33,88	33,86
CH-8	29,70	29,68	CH ₂ -23	26,09	26,04
CH-9	53,61	53,58	CH-24	45,81	45,79
C ₀ -10	37,97	37,96	CH-25	29,15	29,11
CH ₂ -11	20,95	20,95	CH ₃ -26	19,77	19,80
CH ₂ -12	39,58	39,57	CH ₃ -27	19,00	19,00
C ₀ -13	42,49	42,48	CH ₂ -28	23,06	23,04
CH-14	55,87	55,86	CH ₃ -29	11,98	11,95
CH ₂ -15	24,12	24,13			

Ref. 8: 100 MHz; Exp.: 125 MHz; em CDCl₃.⁸ Della Greca M, Monaco P, Previtera L. Stigmasterols from *Typha latifolia*. *J Nat Prod* **53** (6): 1430-5, 1990.

Sesquiterpenos (19 a 21) e Alcano (22).**CG/EM:**

Curcumeno (19), $t_R = 7,36$ min, m/z (%): 202 (30), 145 (28), 132 (85), 119 (100), 105 (60), 91 (34), 77 (14), 55 (17);

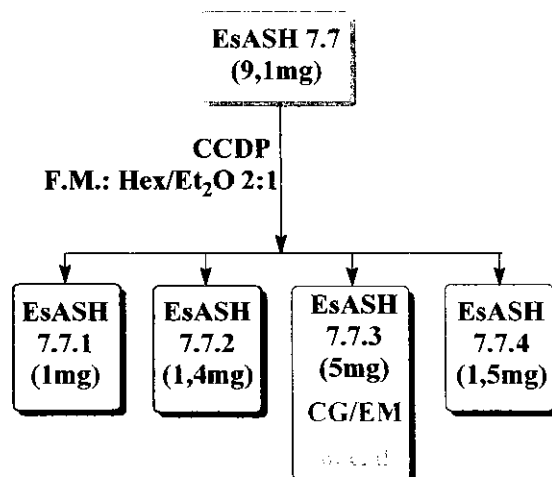
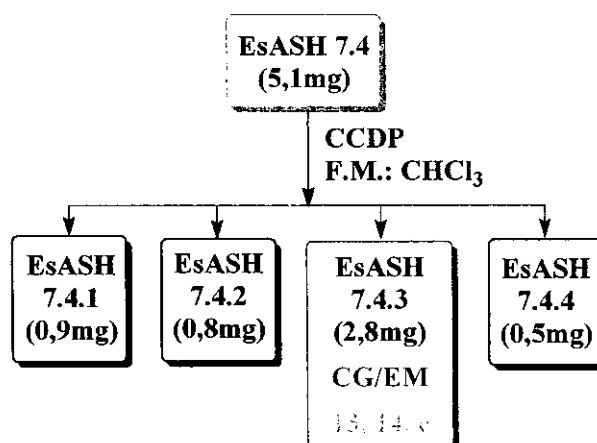
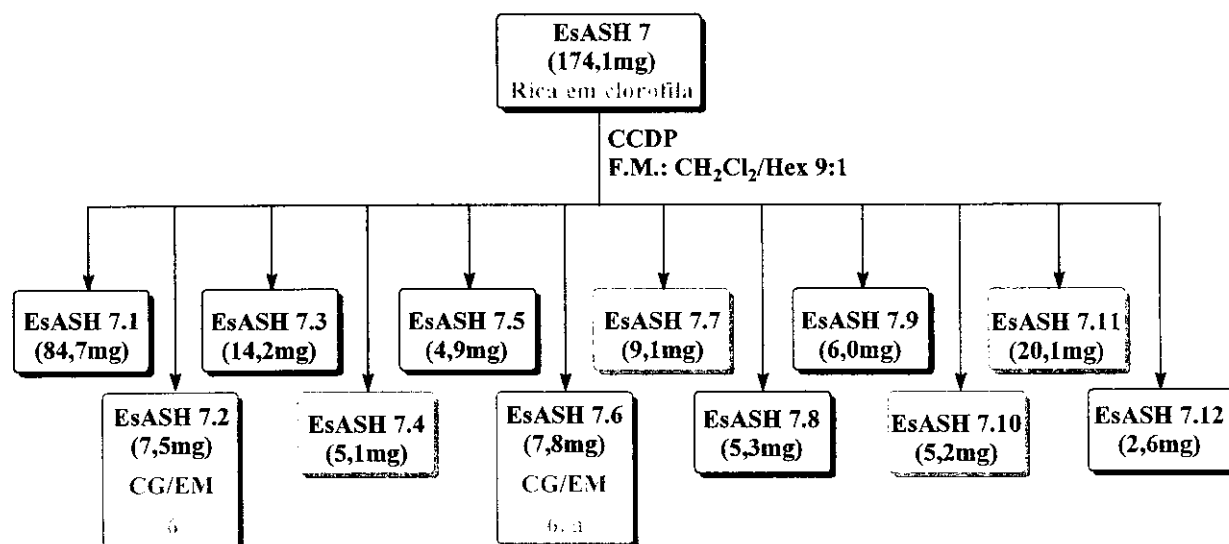
α-Muuroleno (20), $t_R = 7,63$ min, m/z (%): 204 (33), 189 (14), 161 (52), 147 (12), 133 (15), 119 (26), 105 (100), 94 (28);

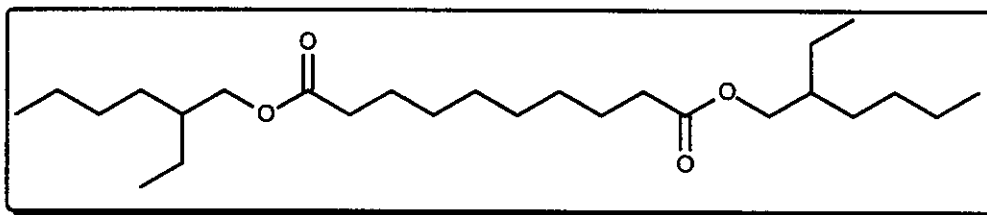
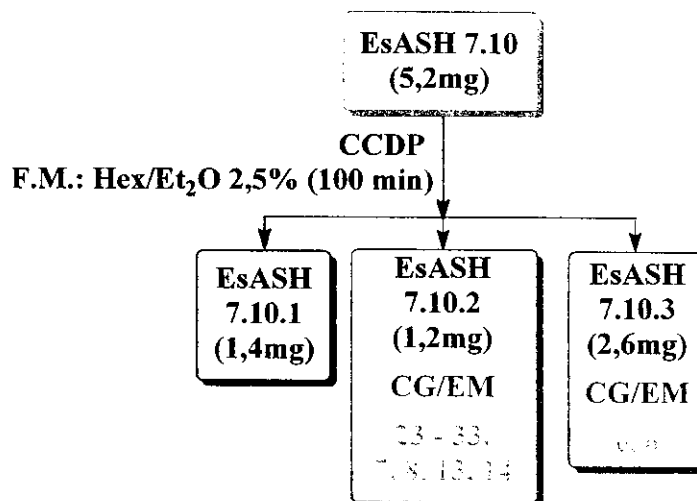
δ-Cadineno (21), $t_R = 7,91$ min, m/z (%): 204 (52), 189 (18), 161 (100), 147 (7), 134 (58), 119 (64), 105 (55), 91 (38), 69 (8);

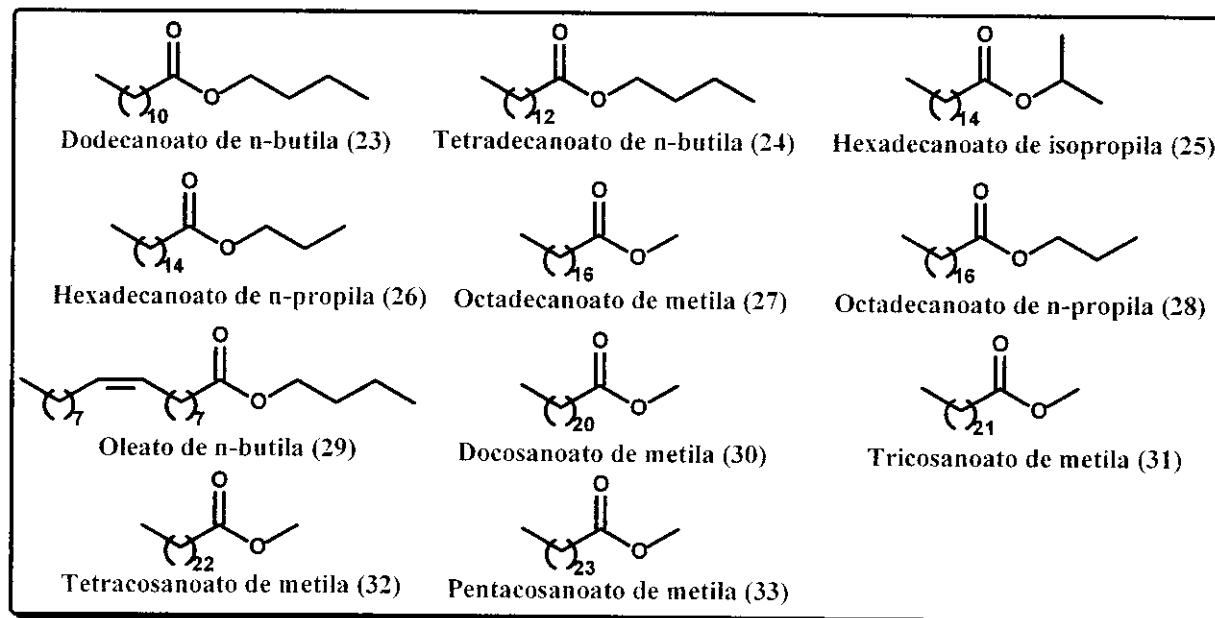
Docosano (22), $t_R = 14,91$ min, m/z (%): 310 (4), 253 (1), 239 (1), 225 (2), 211 (2), 197 (3), 183 (3), 169 (4), 141 (5), 127 (6), 113 (10), 99 (16), 85 (55), 71 (76), 57 (100), 43 (64);

Octadecanoato de n-butila (14), $t_R = 16,59$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 34);

Ftalato de 2-etil-hexila (c), $t_R = 18,04$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 32).

EsASH 7

Decanodiato de 2-etil-hexila (d).**CG/EM:****Fitona (6),** $t_R = 11,44$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 31);**Ftalato de 2-etil-hexila (c),** $t_R = 18,02$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 32);**Decanodiato de 2-etil-hexila (d),** $t_R = 20,40$ min, m/z (%): 426 (<1), 340 (<1), 315 (2), 297 (4), 255 (1), 203 (3), 185 (100), 166 (4), 143 (6), 125 (4), 112 (26), 98 (14), 83 (15), 71 (32), 57 (45), 43 (21).

Ésteres de Ácidos Graxos (23 -33).**CG/EM:**

Dodecanoato de n-butila (23), $t_R = 9,01$ min, m/z (%): 256 (3), 213 (2), 201 (56), 183 (32), 171 (2), 157 (7), 143 (2), 129 (21), 115 (6), 101 (10), 87 (8), 73 (37), 56 (100), 41 (41);

Hexadecanoato de metila (7), $t_R = 10,46$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 32);

Tetradecanoato de n-butila (24), $t_R = 11,06$ min, m/z (%): 284 (6), 255 (<1), 241 (3), 229 (53), 211 (29), 199 (3), 185 (15), 171 (4), 129 (26), 116 (12), 97 (15), 83 (18), 73 (41), 56 (100), 41 (47);

Hexadecanoato de etila (8), $t_R = 11,44$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 32);

Hexadecanoato de isopropila (25), $t_R = 11,43$ min, m/z (%): 298 (1), 256 (43), 239 (19), 227 (3), 213 (7), 199 (3), 185 (4), 171 (6), 157 (6), 143 (3), 129 (18), 115 (9), 102 (76), 97 (22), 83 (26), 73 (41), 60 (74), 43 (100);

Hexadecanoato de n-propila (26), $t_R = 12,09$ min, m/z (%): 298 (18), 269 (1), 257 (38), 239 (38), 227 (6), 213 (12), 199 (4), 185 (6), 171 (16), 129 (18), 115 (47), 102 (54), 97 (18), 83 (21), 73 (53), 61 (100), 43 (62);

Octadecanoato de metila (27), $t_R = 12,44$ min, m/z (%): 298 (6), 267 (2), 255 (6), 241 (2), 227 (<1), 213 (2), 199 (4), 185 (2), 171 (<1), 157 (2), 143 (10), 129 (3), 115 (2), 111 (3), 101 (4), 97 (7), 87 (71), 83 (12), 74 (100), 69 (18), 55 (29), 43 (35);

Hexadecanoato de n-butila (13), $t_R = 13,02$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 34);

Octadecanoato de n-propila (28), $t_R = 13,93$ min, m/z (%): 326 (13), 285 (10), 253 (7), 241 (4), 239 (6), 227 (4), 185 (4), 171 (9), 157 (4), 143 (3), 129 (18), 115 (38), 102 (44), 83 (29), 73 (56), 61 (100), 57 (68), 43 (91);

Oleato de n-butila (29), $t_R = 14,58$ min, m/z (%): 338 (1), 283 (1), 264 (18), 245 (1), 222 (10), 193 (3), 180 (4), 165 (4), 125 (15), 123 (12), 111 (29), 97 (65), 83 (68), 69 (76), 55 (100), 41 (76);

Octadecanoato de n-butila (14), $t_R = 14,78$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 34);

Docosanoato de metila (30), $t_R = 15,97$ min, m/z (%): 354 (15), 323 (1), 311 (9), 297 (1), 283 (<1), 269 (1), 255 (4), 241 (<1), 199 (4), 185 (3), 157 (3), 143 (15), 129 (6), 111 (9), 97 (9), 87 (79), 74 (100), 55 (29), 43 (32);

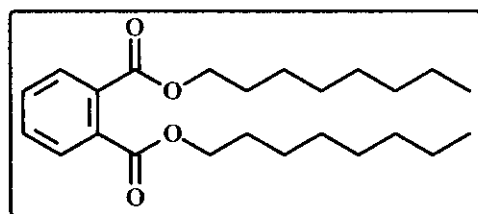
Tricosanoato de metila (31), $t_R = 16,82$ min, m/z (%): 368 (9), 325 (4), 311 (<1), 297 (<1), 283 (1), 269 (2), 255 (1), 241 (<1), 227 (1), 199 (3), 185 (3), 171 (1), 157 (1), 143 (15), 129 (5), 111 (7), 101 (9), 87 (80), 74 (100), 69 (17), 57 (26), 43 (37);

Tetracosanoato de metila (32), $t_R = 17,80$ min, m/z (%): 382 (13), 339 (9), 325 (1), 311 (<1), 297 (2), 283 (4), 269 (<1), 255 (2), 241 (1), 227 (1), 213 (<1),

199 (4), 185 (2), 171 (1), 157 (1), 143 (20), 129 (7), 111 (4), 97 (9), 87 (78), 74 (100), 57 (28), 43 (35);

Pentacosanoato de metila (33), $t_R = 18,95$ min, m/z (%): 396 (13), 353 (4), 339 (<1), 325 (<1), 311 (2), 297 (2), 255 (2), 241 (2), 227 (<1), 199 (2), 185 (2), 171 (<1), 157 (1), 143 (17), 129 (9), 111 (2), 97 (9), 87 (80), 74 (100), 57 (35), 43 (43).

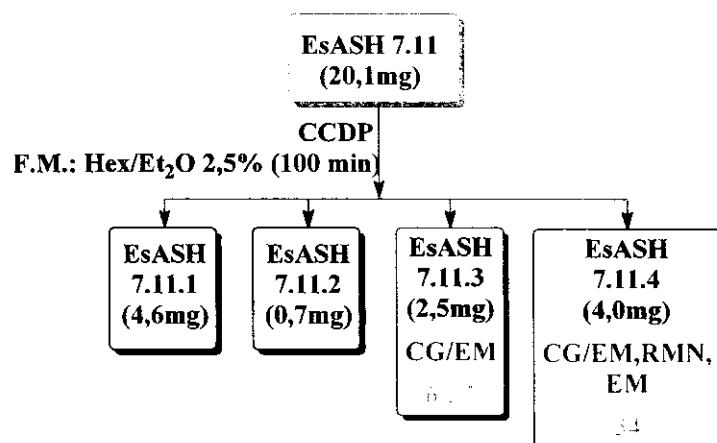
Ftalato de n-octila (e)

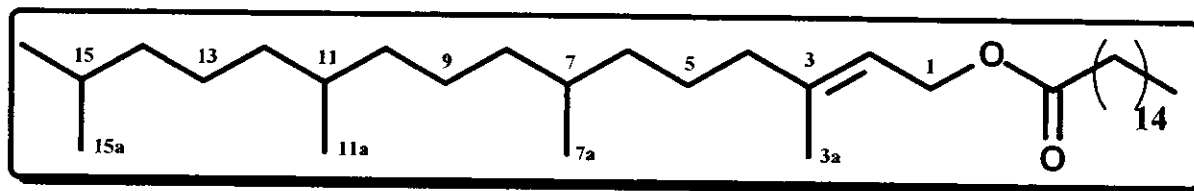


CG/EM:

Fitona (6), $t_R = 9,65$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 31);

Ftalato de n-octila (e), $t_R = 16,33$ min, m/z (%): 390 (1), 334 (1), 279 (10), 261 (1), 167 (34), 149 (100), 132 (1,5), 113 (7), 83 (3), 71 (11), 57 (14), 41 (6).



Hexadecanoato de *E*-fitila (34).

GC/EM, $t_R = 21,71$ min, m/z (%): íon molecular (não aparece), 278 (3), 236 (<1), 137 (10), 123 (58), 109 (32), 95 (96), 82 (85), 68 (100).

EM (IE, 70eV) m/z (%): 534 (<1), 278 (6,7), 256 (13,4), 239 (14,8), 137 (6,1), 123 (21,2), 109 (13,7), 97 (29,2), 95 (26,7), 83 (39,5), 69 (54,8), 57 (100).

RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500 MHz): tabela 10.

RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz): tabela 11.

Tabela 10: Dados de RMN¹H do Hexadecanoato de *E*-Fitila (34).

H	$\delta_{\text{Lit.}}^E$	$\delta_{\text{Lit.}}^Z$	$\delta_{\text{Lit.}}^{\text{hep}}$	$\delta_{\text{Exp.}}$
1	4,70 (<i>d</i> , <i>J</i> = 7Hz)	4,57(<i>d</i> , <i>J</i> = 7,1Hz)	4,59 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7Hz)	4,59 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0Hz)
2	5,30 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7Hz)	5,30 (<i>t</i> , <i>J</i> = 6,4Hz)	5,33 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7Hz)	5,34 (<i>tq</i> , <i>J</i> = 1,2 e 7,0Hz)
4	2,00 (<i>t</i> , <i>J</i> = 7,8Hz)		2,01 (<i>t</i>)	
5				
6	0,9 a 1,3 (<i>m</i>)		1,20 a 1,35 (<i>m</i>)	
7	1,3 a 1,7 (<i>m</i>)			
8				
9	0,9 a 1,3 (<i>m</i>)		1,20 a 1,35 (<i>m</i>)	
10				
11	1,3 a 1,7 (<i>m</i>)			
12				
13	0,9 a 1,3 (<i>m</i>)		1,20 a 1,35 (<i>m</i>)	
14				
15	1,3 a 1,7 (<i>m</i>)		1,53 (<i>m</i>)	1,53 (<i>hept</i> , <i>J</i> = 6,5 Hz)
16	0,86(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4Hz)	0,87(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6Hz)	0,866(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4Hz)	0,87(<i>dd</i> , <i>J</i> = 0,7 e 6,5Hz)
3a	1,67 (<i>sl</i>)	1,68 (<i>s</i>)	1,69 (<i>s</i>)	1,69(<i>t</i> , <i>J</i> = 0,5Hz)
7a				
11a	0,84(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,0Hz)		0,85(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4Hz)	0,85(<i>dd</i> , <i>J</i> = 2,7 e 6,6Hz)
15a	0,86(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4Hz)	0,87(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,6Hz)	0,866(<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4Hz)	0,87(<i>dd</i> , <i>J</i> = 0,7 e 6,5Hz)
2'	2,29(<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6Hz)		2,29 (<i>t</i>)	2,30(<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6Hz)
3'			1,62 (<i>m</i>)	1,60 (<i>m</i>)
4'				
5'	1,3 a 1,7 (<i>m</i>)		1,20 a 1,35 (<i>m</i>)	
6'				
7'			0,88 (<i>t</i>)	
8' a 12'			---	
13'			---	
14'	0,9 a 1,3 (<i>m</i>)		---	
15'			---	
16'	0,90(<i>t</i> , <i>J</i> = 7,6Hz)	0,86(<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0Hz)	---	0,88(<i>t</i> , <i>J</i> = 7,0Hz)

Lit.^E (Hexadecanoato de *E*-fitila, 200 MHz, Ref. 9); Lit.^Z (Hexadecanoato de *Z*-fitila, 400 MHz, Ref. 10); Lit.^{hep} (Heptanoato de *E*-fitila, 500 MHz, Ref. 11); Exp. 500 MHz; em CDCl₃.

⁹ a) Pereira Jr. OL, Wolter Filho W, da Rocha AFI, de Carvalho MG, Braz Filho R. Diterpenos isolados de *Guarea carinata*. *Quim Nova* 13 (4): 247-249, 1990; b) Hasan M, Burdi DK. Diterpene fatty acid ester from *Leucas nutans*. *J Nat Prod* 54 (5): 1444-1446, 1991.

¹⁰ Rasool N, Ahmad VU, Malik A. Terpenoids from *Pentatropis spiralis*. *Phytochemistry* 30 (4): 1331-1332, 1991.

¹¹ Zulueta MCA, Tada M, Ragasa CYA. Diterpene from *Bidens pilosa*. *Phytochemistry* 38 (6): 1449-1450, 1995.

Tabela 11: Dados de RMN¹³C e DEPT do Hexadecanoato de *E*-Fitila (34).

C	$\delta_{\text{Lit.}}^E$	$\delta_{\text{Lit.}}^Z$	$\delta_{\text{Lit.}}^{\text{Ac}}$	$\delta_{\text{Exp.}}$
CH ₂ -1	61,19	61,9	61,00	61,19
CH-2	118,15	118,23	118,16	118,12
C ₀ -3	142,40	142,52	141,92	142,64
CH ₂ -4	39,86	39,88	39,61	39,85
CH ₂ -5	25,03	25,07	24,80	25,01
CH ₃ -6	37,43	36,67	37,22	37,41
CH-7	32,67	32,70	32,44	32,78
CH ₂ -8	37,34	37,48	37,17	37,34
CH ₂ -9	24,45	24,49	24,24	24,45
CH ₂ -10	37,28	37,48	37,12	37,28
CH-11	32,79	32,88	32,56	32,78
CH ₂ -12	36,61	37,40	36,40	36,61
CH ₂ -13	24,78	24,82	24,58	24,78
CH ₂ -14	39,37	39,41	39,15	39,35
CH ₂ -15	27,97	28,08	27,74	27,97
CH ₃ -16	22,60	22,64	22,38	22,62
CH ₃ -3a	16,36	16,39	16,02	16,36
CH ₃ -7a	19,70	19,77	19,49	19,70
CH ₃ -11a	19,70	19,77	19,49	19,70
CH ₃ -15a	22,62	22,73	22,38	22,62
C ₀ -1'	174,00	173,88	170,02	173,97
CH ₂ -2'	34,36	34,44	20,57 (CH ₃)	34,40
CH ₂ -3'	25,03	25,07	---	25,01
CH ₂ -4'	29,15		---	29,15
CH ₂ -5'	29,25	29,18	---	29,27
CH ₂ -6'	29,48	a	---	29,47
CH ₂ -7' a	29,69	29,71	---	29,69
CH ₂ -12'				
CH ₂ -13'	29,36		---	29,36
CH ₂ -14'	31,91	31,94	---	31,92
CH ₂ -15'	22,70	22,70	---	22,69
CH ₃ -16'	14,11	14,10	---	14,11

Lit.^E (Hexadecanoato de *E*-fitila, 50 MHz, Ref. 10); Lit.^Z (Hexadecanoato de *Z*-fitila, 75 MHz, Ref. 11); Lit.^{Ac} (Acetato de *E*-fitila, Ref. 12); Exp. 125 MHz; em CDCl₃.

¹² Singh B, Agrawal PK, Thakur RS. Isolation of *trans*-phytol from *Phyllanthus niruri*. *Planta Med* 57 (1): 98, 1991.

I. 2. 3. 1. 3. EsSFH - *Eleocharis sellowiana*, Extrato Hexânico da parte subterrânea fresca

Uma alíquota (300 mg) do extrato EsSFH foi fracionada em coluna de silicagel 60Å (*flash*¹³, 200-400 mesh, 25 mm de Ø, fluxo de 50 mL/min, frações de 15 mL cada) eluída inicialmente com CHCl₃/Hex (4:1) aumentando-se a polaridade gradativamente com CHCl₃ e em seguida MeOH. Foram coletadas 159 frações posteriormente reunidas em 21 grupos com base na análise em CCDA (Tabela 12).

Tabela 12: Resultado do fracionamento em CC de EsSFH.

Grupo	Frações	Massa (mg)	Eluente	Compostos
1	1 - 3	63,8	CHCl ₃ /Hex 4:1	Campesterol (2), Stigmasterol (3), Sitosterol (4), Hexadecanoato de etila (8), Heneicosano (12), Oleato de etila (35), Octadecanoato de etila (36), Tricosano (37), Octadecanoato de butila (14), Pentacosano (38), Fer-9(11)-en-3α-ol (39), Neohop-13(18)-en-3α-ol (40).
2	4 - 6	15,8		
3	7 - 8	29,4		Ácido Betulínico (17)
4	9 - 12	23,1		3α-hidroxi-13α,17α,21α-Hopan-15,19-diona (41)
5	13 - 17	7,7	CHCl ₃ /Hex 9:1	
6	18 - 33	16,3	CHCl ₃	
7	34 - 37	2,1		
8	38 - 43	5,6	CHCl ₃ /MeOH 0,5%	
9	44 - 47	4,3	CHCl ₃ /MeOH 1%	
10	48 - 50	3,3	CHCl ₃ /MeOH 2%	
11	51 - 54	7,0		
12	55 - 60	6,8	CHCl ₃ /MeOH 3%	
13	61 - 64	27,0		Estigmast-22-en-3β,6β,9α-triol (42)
14	65 - 73	8,8		
15	74 - 77	4,7	CHCl ₃ /MeOH 4%	
16	78 - 86	9,9		
17	87 - 94	5,2	CHCl ₃ /MeOH 5%	
18	95 - 101	6,7	CHCl ₃ /MeOH 7,5%	
19	102 - 143	22,9	CHCl ₃ /MeOH 10% até 25%	
20	144 - 150	5,8	CHCl ₃ /MeOH 1:1	
21	151 - 159	5,6	MeOH	

¹³ Still WC, Kahn M, Mitra A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *J Org Chem* 43 (14): 2923-2925, 1978.

Hexadecanoato de etila (8), t_R 37,27min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 32);

Heneicosano (12), t_R 39,97min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 34);

Oleato de etila (35), t_R 41,00min, m/z (%): 310 (2), 264 (3), 235 (2), 222 (2), 180 (4), 166 (2), 155 (3), 137 (4), 123 (6), 111 (10), 97 (22), 88 (28), 83 (35), 69 (49), 55 (100), 41 (81);

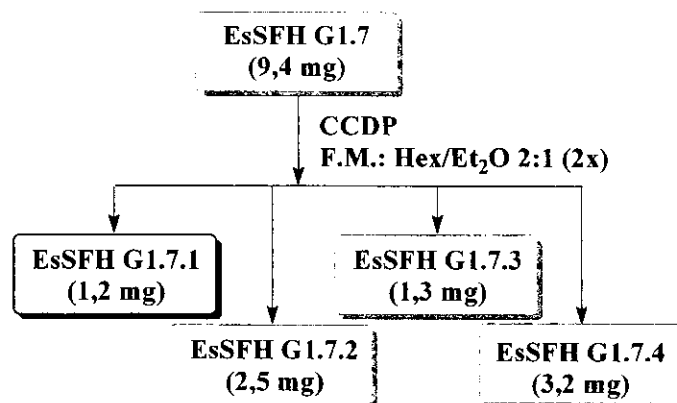
Octadecanoato de etila (36), t_R 41,65min, m/z (%): 312 (8), 269 (5), 227 (2), 157 (9), 143 (3), 115 (4), 101 (49), 88 (100), 69 (19), 57 (39), 43 (64);

Tricosano (37), t_R 43,86min, m/z (%): 324 (3), 253 (1), 239 (1), 225 (1), 211 (<1), 197 (<1), 155 (2), 141 (2), 127 (4), 113 (5), 99 (10), 85 (36), 71 (60), 57 (100), 43 (94);

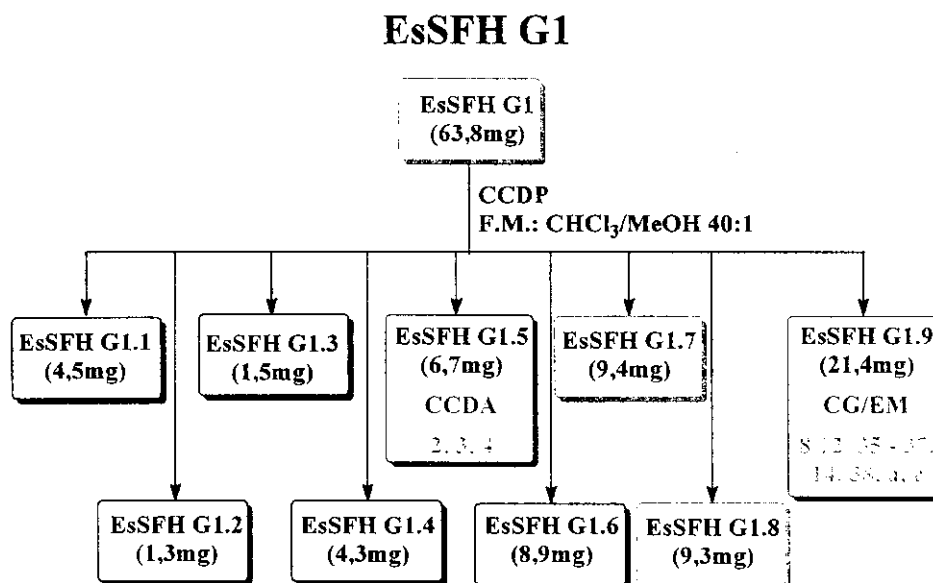
Octadecanoato de butila (14), t_R 45,70min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 34);

Pentacosano (38), t_R 48,04min, m/z (%): 352 (3), 323 (<1), 309 (<1), 295 (1), 281 (<1), 267 (1), 253 (<1), 239 (<1), 225 (<1), 211 (1), 197 (1), 183 (1), 169 (1), 155 (2), 141 (3), 127 (4), 113 (5), 99 (10), 85 (40), 71 (58), 57 (100), 43 (92);

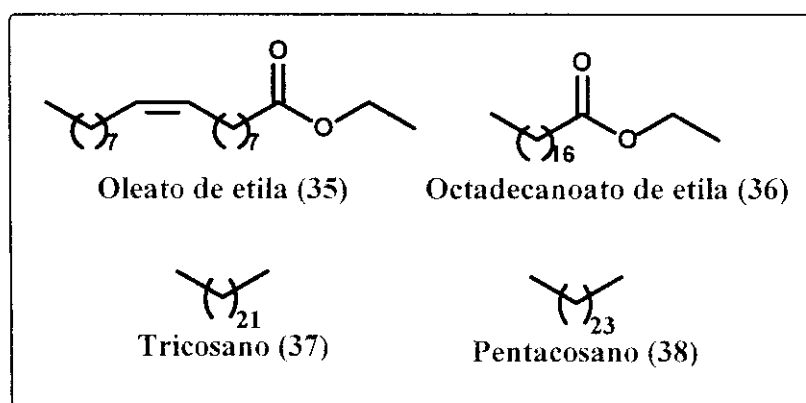
Ftalato de 2-etil-hexila (c), t_R 49,21min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 32).



A seguir encontram-se descritos os fluxogramas referentes às análises por CCDP dos grupos de frações reunidas.

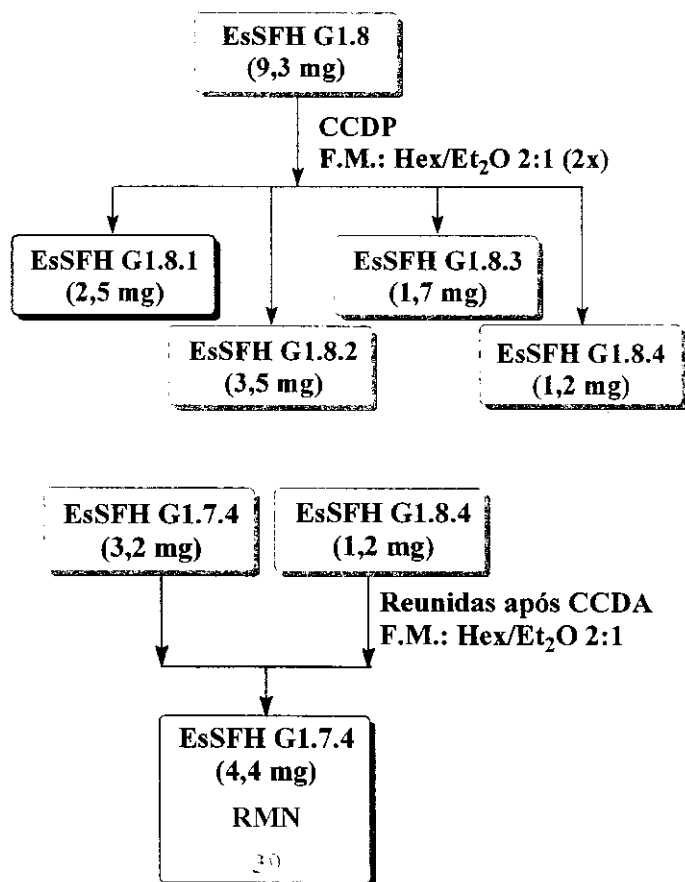


Ésteres de Ácidos Graxos (35 e 36) e Hidrocarbonetos (37 e 38).

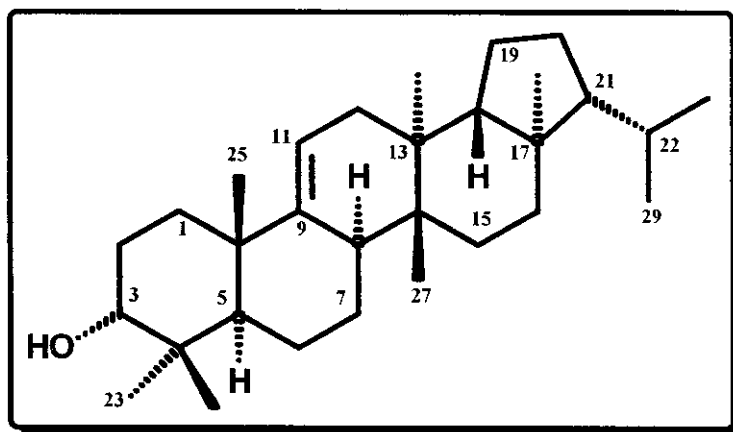


CG/EM:

Ftalato de dibutila (a), t_R 36,42min, m/z (%):ver dados anteriores (pág. 31);



Fer-9(11)-en-3 α -ol (39)



Aspecto Físico: sólido amorfo.

RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500MHz): Tabela 13.

RMN¹³C (CDCl₃/TMS, 125MHz): Tabela 14.

Tabela 13: RMN¹H de Fern-9(11)-eno-3 α -ol (39).

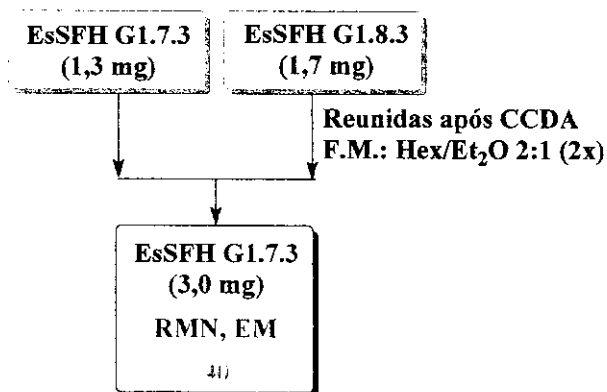
H	δ_H^{14}	$\delta_H^{exp.}$
3	3,42 (<i>sl</i>)	3,43 (<i>sl</i>)
11	5,32 (<i>dd</i> , <i>J</i> = 4,9 e 2,4 Hz)	5,33 (<i>sl</i>)
23	0,94 (<i>s</i>)	0,95 (<i>s</i>)
24	0,92 (<i>s</i>)	0,93 (<i>s</i>)
25	1,08 (<i>s</i>)	1,09 (<i>s</i>)
26	0,74 (<i>s</i>)	0,75 (<i>s</i>)
27	0,82 (<i>s</i>)	0,84 (<i>s</i>)
28	0,76 (<i>s</i>)	0,77 (<i>s</i>)
29	0,89 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)	0,90 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)
30	0,83 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)	0,84 (<i>d</i> , <i>J</i> = 6,4 Hz)

Ref. 14 e Exp.: 500 MHz; em CDCl₃/TMS.**Tabela 14:** RMN¹³C de Fern-9(11)-eno-3 α -ol (39).

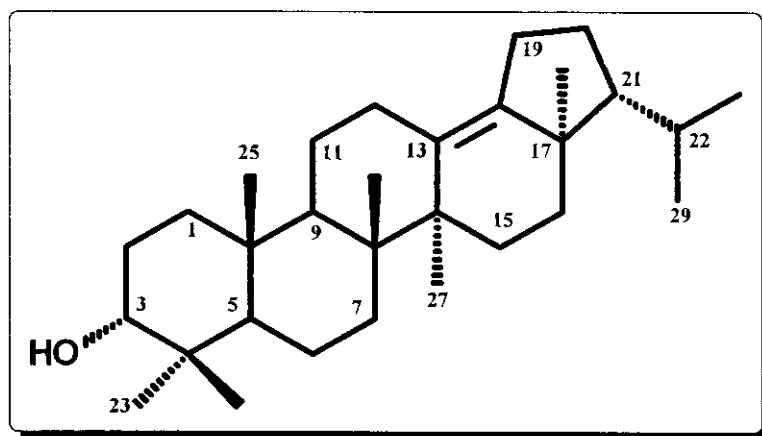
C	δ_C^{14}	$\delta_C^{exp.}$	C	δ_C^{14}	$\delta_C^{exp.}$
CH ₂ -1	33,79	33,74	CH ₂ -16	36,19	36,14
CH ₂ -2	25,95	25,90	C ₀ -17	42,96	42,90
CH-3	76,21	76,14	CH-18	52,00	51,95
C ₀ -4	35,93	36,68	CH ₂ -19	20,14	20,10
CH-5	37,97	37,90	CH ₂ -20	28,22	28,18
CH ₂ -6	19,11	19,07	CH-21	59,68	56,62
CH ₂ -7	17,95	17,90	CH-22	30,78	30,74
CH-8	39,95	39,90	CH ₃ -23	27,59	27,55
C ₀ -9	151,34	151,29	CH ₃ -24	22,17	22,13
C ₀ -10	37,69	37,64	CH ₃ -25	25,00	24,96
CH-11	115,90	115,84	CH ₃ -26	15,42	15,37
CH ₂ -12	36,76	36,71	CH ₃ -27	15,99	15,94
C ₀ -13	37,69	37,64	CH ₃ -28	13,99	13,95
C ₀ -14	36,74	36,42	CH ₃ -29	22,14	22,12
CH ₂ -15	29,27	29,22	CH ₃ -30	23,01	22,98

Ref.14 e Exp.: 500 MHz; em CDCl₃/TMS.

¹⁴ Nakane T, Arai Y, Masuda K, Ishizaki Y, Ageta H, Shiojima K. Fern constituents: six new triterpenoid alcohols from *Adiantum capillus-veneris*. *Chem Pharm Bull* 47 (4): 543-7, 1999.



Neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (40)



Aspecto Físico: sólido amorfo.

RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500MHz): Tabela 15.

RMN¹³C (CDCl₃/TMS, 125MHz): Tabela 16.

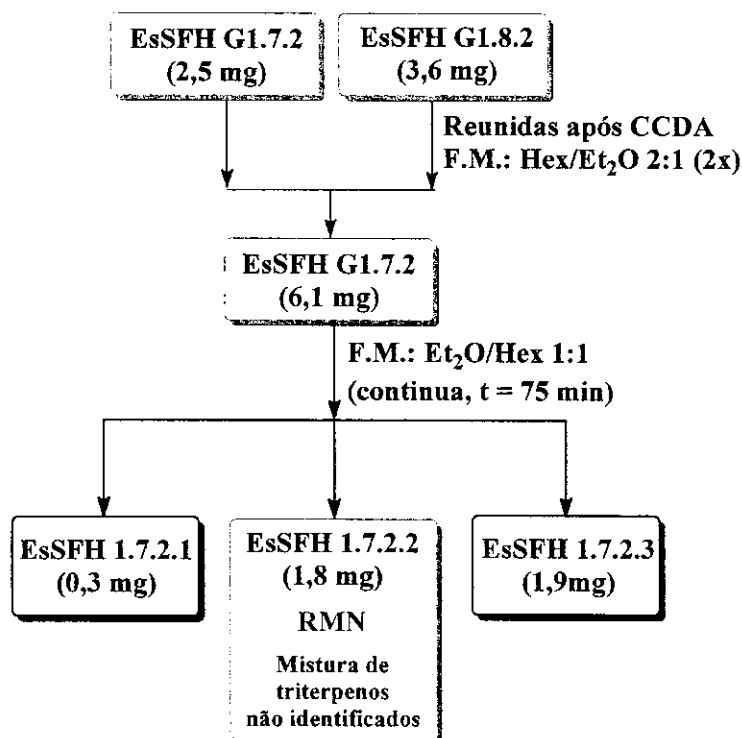
EM (Alta resolução, IE, 70eV), m/z (%): 426.3862 (79.2), 411.3654 (21.5), 383.3276 (4.2), 218.1984 (91.8), 207.1700 (54.3), 205.1906 (80.0), 190.1683 (100.0).

Tabela 15: RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500 MHz) e correlações observadas (HSQC e HMBC) de Neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (**40**).

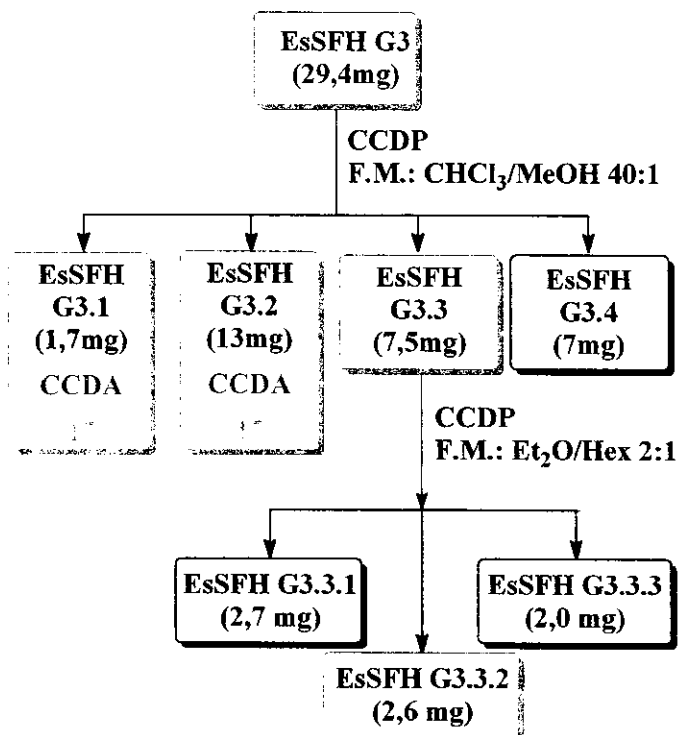
H (δ)	C (δ , J^1)	C (δ , J^n)
0,80 (<i>s</i> , H-28)	17,83 (C-28)	141,16 (C-18), 59,16 (C-21), 42,65 (C-17), 37,91 (C-18)
0,83 (<i>s</i> , H-24)	22,13 (C-24)	76,19 (C-3), 28,16 (C-23)
0,85 (<i>s</i> , H-25)	16,55 (C-25)	51,98 (C-9), 49,29 (C-5), 37,56 (C-10), 33,62 (C-1)
0,87 (<i>s</i> , H-26)	18,61 (C-26)	51,98 (C-9), 41,43 (C-8), 34,33 (C-7)
0,90 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz, H-30)	23,07 (C-30)	59,16 (C-21), 29,79 (C-22)
0,94 (<i>d</i> , $J = 6,7$ Hz, H-29)	22,86 (C-29)	59,16 (C-21), 29,79 (C-22), 23,07 (C-30)
0,97 (<i>s</i> , H-23)	28,16 (C-23)	76,19 (C-3), 49,29 (C-5), 37,56 (C-4), 22,13 (C-24)
1,11 (<i>s</i> , H-27)	26,77 (C-27)	131,55 (C-13), 42,34 (C-14), 29, 26 (C-15)
3,40 (<i>sl</i> , H-3 β)	76,19 (C-3)	

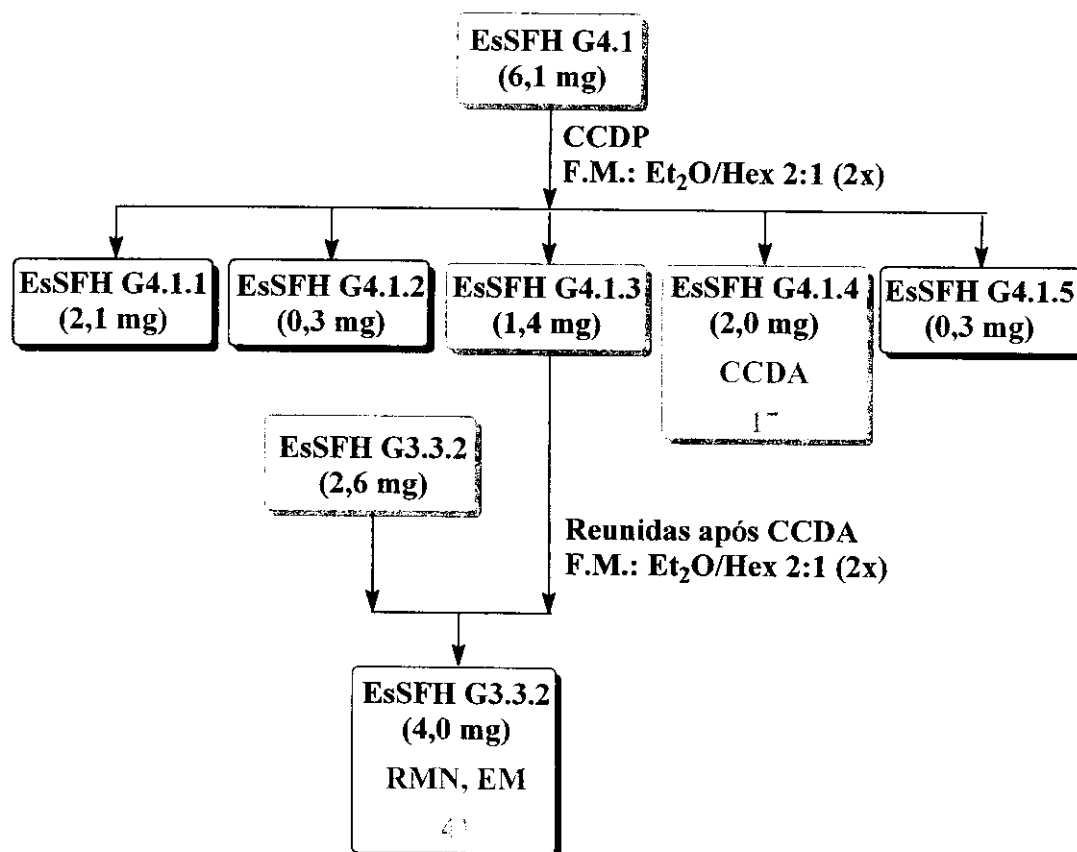
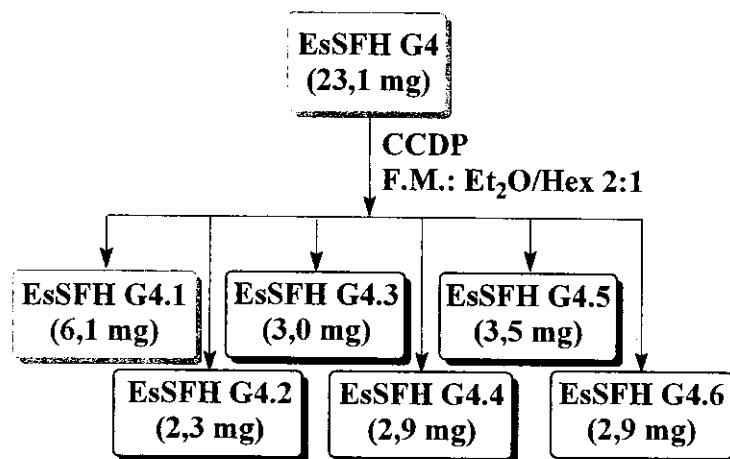
Tabela 16: RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de Neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (**40**).

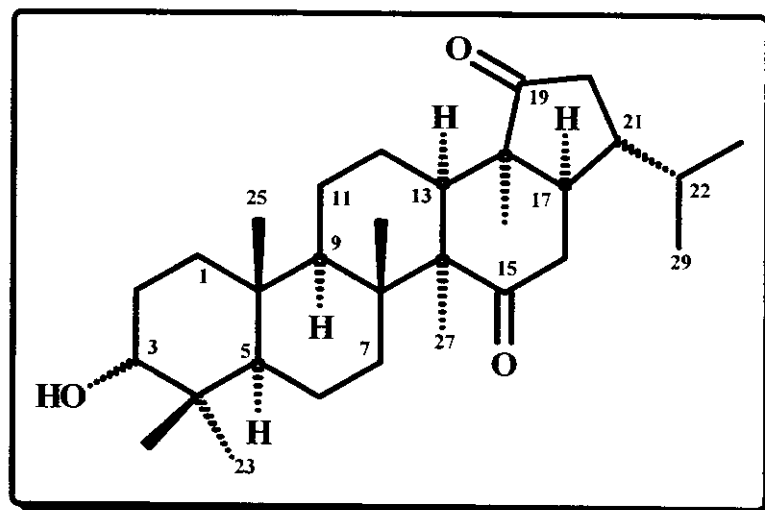
C	δ_C exp.	C	δ_C exp.
CH ₂ -1	33.62	CH ₂ -16	37.91
CH ₂ -2	29.35	C ₀ -17	42.65
CH-3	76.19	C ₀ -18	141.16
C ₀ -4	37.56	CH ₂ -19	26.46
CH-5	49.29	CH ₂ -20	27.54
CH ₂ -6	18.47	CH-21	59.16
CH ₂ -7	34.33	CH-22	29.79
C ₀ -8	41.43	CH ₃ -23	28.16
CH-9	51.98	CH ₃ -24	22.13
C ₀ -10	37.56	CH ₃ -25	16.55
CH ₂ -11	21.49	CH ₃ -26	18.60
CH ₂ -12	26.63	CH ₃ -27	26.77
C ₀ -13	131.55	CH ₃ -28	17.83
C ₀ -14	42.34	CH ₃ -29	22.86
CH ₂ -15	29.26	CH ₃ -30	23.07



EsSFH G3



EsSFH G4

3 α -hidroxi-13 α ,17 α ,21 α -hopano-15,19-diona (41).

Aspecto físico: Sólido amorfo.

RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500MHz): Tabela 17.

RMN¹³C (CDCl₃/TMS, 125MHz): Tabela 18.

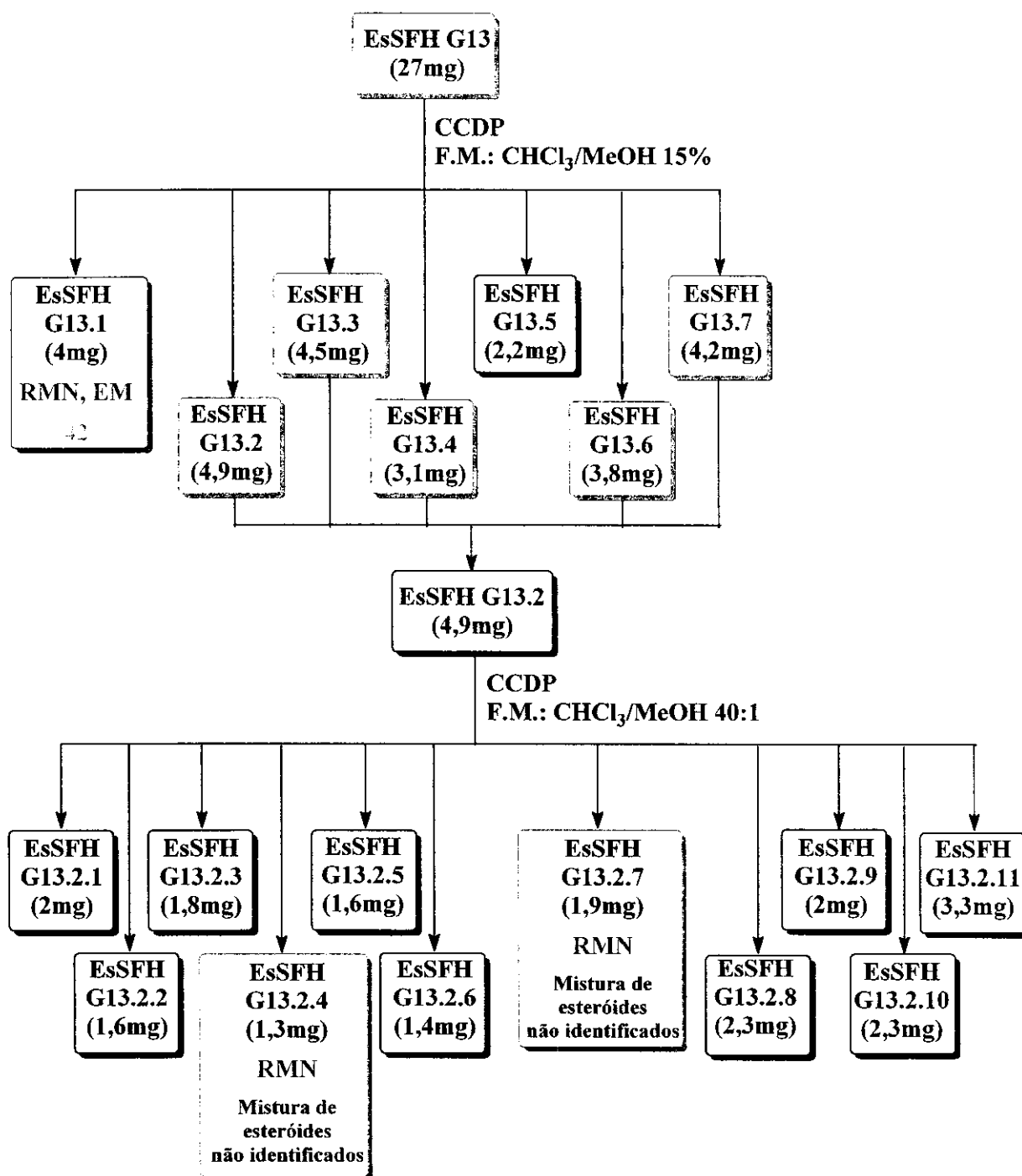
EM (Alta resolução, IE, 70eV), m/z (%): 456,3607 (2,0), 441,3680 (9,1), 318,2508 (84,6), 303,2231 (20,4), 300,2370 (24,2), 277,2109 (39,1), 233,1865 (11,8), 207,1671 (16,0), 189,1581 (100,0), 177,1566 (7,2), 175,1408 (38,2), 152,1162 (9,8), 139,1056 (16,8), 137,1275 (9,2), 135,1118 (61,5), 121,0952 (51,2), 109,0966 (41,3), 107,0806 (55,8), 97,0590 (84,4), 95,0801 (62,7), 93,0646 (47,8).

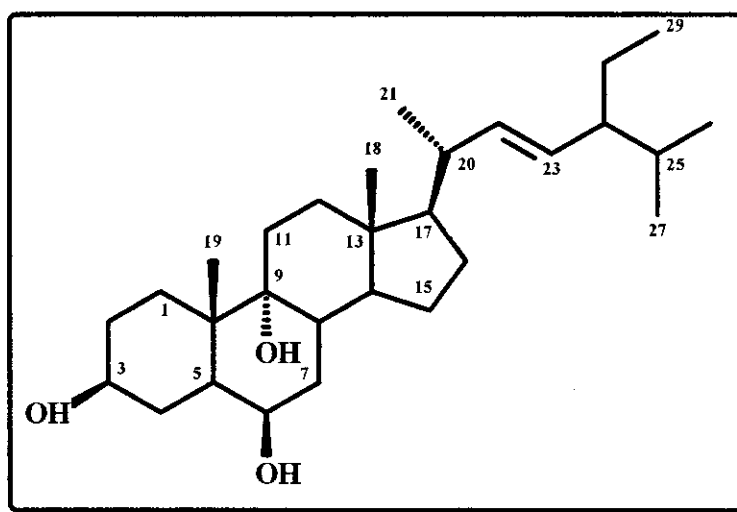
Tabela 17: RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500 MHz) e correlações (HSQC e HMBC) de **41**.

H (δ)	C (δ, J ¹)	C (δ, J ²)
0,85 (s, H-26)	16,82 (C-26)	55,24 (C-14), 50,41 (C-9), 44,69 (C-8), 34,05 (C-7)
(s, H-24)	21,98 (C-24)	75,89 (C-3), 48,80 (C-5), 37,43 (C-4), 28,16 (C-23)
0,86 (d, J = 7,0 Hz, H-29)	20,28 (C-29)	48,85 (C-21), 28,88 (C-22), 22,39 (C-30)
0,89 (s, H-25)	16,31 (C-25)	50,41 (C-9), 37,76 (C-10), 33,67 (C-1)
0,94 (s, H-28)	16,94 (C-28)	224,09 (C-19), 52,07 (C-18), 50,41 (C-17)
0,97 (s, H-23)	28,16 (C-23)	75,89 (C-3), 48,80 (C-5), 37,43 (C-4), 21,98 (C-24)
1,00 (d, J = 7,0 Hz, H-30)	22,39 (C-30)	48,85 (C-21), 28,88 (C-22), 20,28 (C-29)
1,15 (s, H-27)	18,07 (C-27)	215,72 (C-15), 55,24 (C-14), 44,69 (C-8)
1,74 (oct, J = 6,0 Hz, H-22)	28,88 (C-22)	131,55 (C-13), 42,34 (C-14), 29, 26 (C-15)
1,87 (m, H-9)	50,41 (C-9)	44,69 (C-8), 33,67 (C-1)
1,89 (m, H-17)	50,41 (C-17)	37,20 (C-20), 16,94 (C-28)
1,91 (m, H-21)	48,85 (C-21)	52,07 (C-18), 22,39 (C-30), 20,18 (C-29)
2,18 (m, H-20)	37,20 (C-20)	224,09 (C-19), 50,41 (C-17)
2,26 (m, H-20)	37,20 (C-20)	224,09 (C-19), 48,85 (C-21)
2,55 (m, H-16)	37,91 (C-16)	215,72 (C-15)
3,44 (sl, H-3β)	75,89 (C-3)	33,67 (C-1), 48,80 (C-5)

Tabela 18: RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de **41**.

C	δ _C exp.	C	δ _C exp.
CH ₂ -1	33.67	CH ₂ -16	37.91
CH ₂ -2	25.29	CH-17	50.41
CH-3	75.89	C ₀ -18	52.07
C ₀ -4	37.43	C ₀ -19	224.09
CH-5	48.80	CH ₂ -20	37.20
CH ₂ -6	18.47	CH-21	48.85
CH ₂ -7	33.21	CH-22	28.88
C ₀ -8	44.69	CH ₃ -23	28.16
CH-9	50.41	CH ₃ -24	21.98
C ₀ -10	37.76	CH ₃ -25	16.31
CH ₂ -11		CH ₃ -26	16.81
CH ₂ -12	24.49	CH ₃ -27	18.07
CH-13	48.85	CH ₃ -28	16.94
C ₀ -14	55.24	CH ₃ -29	20.28
C ₀ -15	215.72	CH ₃ -30	22.39

EsSFH G13

Estigmasta-22-eno-3 β ,6 β ,9 α -triol (42).

Aspecto físico: cristais aciculares incolores

RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500 MHz): tabela 19.

RMN¹³C (CDCl₃/TMS, 125 MHz): tabela 20.

EM (Alta resolução, IE, 70eV), m/z (%): 446,3769 (10,8), 428,3725 (19,2), 414,4042 (35,0), 410,3477 (23,00), 396,3722 (20,9), 392,4303 (2,1), 381,3552 (12,3), 378,4266 (7,9), 317,3221 (12,2), 307,3473 (2,5), 304,3149 (10,9), 281,2305 (11,3), 271,2048 (13,4), 267,2962 (7,4), 253,1868 (12,2), 180,1864 (6,8), 139,1414 (13,6), 124,0811 (15,3), 111,1122 (74,4), 97,0962 (93,8), 93,0648 (14,3), 85,0976 (69,7), 71,0807 (87,3), 57,0667 (100).

Tabela 19: Dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS) e correlações observadas nos experimentos de gCOSY, HSQC e HMQC de **42**.

H (δ)	H (δ, J ³)	C (δ, J ¹)	C (δ, J ²)
0,69 (H-18, <i>s</i>)		12,13 (C-18)	55,91 (C-17)
0,82 (H-27, <i>d</i> , J = 7,0 Hz)		19,00 (C-27)	
0,87 (H-26, <i>d</i> , J = 5,8 Hz)		20,19 (C-26)	
0,89 (H-29, <i>t</i> , J = 6,1 Hz)		11,95 (C-29)	
0,92 (H-21, <i>d</i> , J = 6,4 Hz)		18,43 (C-21)	
1,09 (H-17, <i>m</i>)		55,91 (C-17)	
1,12 (H-19, <i>s</i>)		16,88 (C-19)	45,86 (C-5)
3,55 (H-6, <i>sl</i>)	1,62 (<i>m</i>), 1,65 (<i>m</i>)	76,06 (C-6)	30,82 (C-4)
4,12 (H-3, <i>m</i>)	1,62 (<i>m</i>), 1,51 (<i>m</i>)	67,61 (C-3)	
5,02 (H-23, <i>dd</i> , J = 8,5 and 15,1 Hz)	1,56 (<i>m</i>)	129,29 (C-23)	
5,15 (H-22, <i>dd</i> , J = 8,5 and 15,1 Hz)	2,02 (<i>m</i>)	138,28 (C-22)	129,29 (C-23)

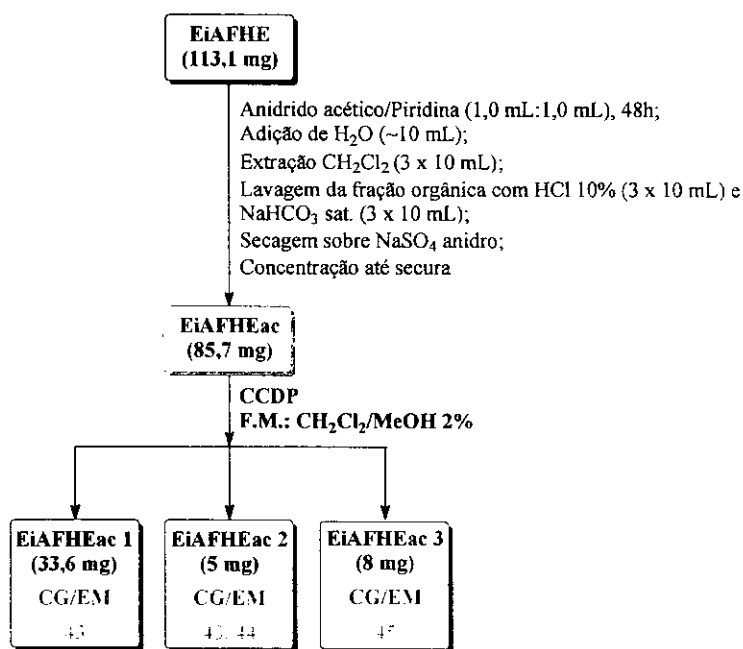
Tabela 20: Dados de RMN¹³C e DEPT (125 MHz, CDCl₃) de **42**.

C	δ _{Exp.}	C	δ _{Exp.}
CH ₂ -1		CH ₂ -16	28,22
CH ₂ -2		CH-17	55,91
CH-3	67,61	CH ₃ -18	12,13
CH ₂ -4	30,82	CH ₃ -19	16,88
CH-5	45,86	CH-20	40,70
CH-6	76,06	CH ₃ -21	18,43
CH ₂ -7		CH-22	138,28
CH ₂ -8		CH-23	129,29
C ₀ -9	76,08	CH-24	51,23
C ₀ -10		CH-25	31,86
CH ₂ -11		CH ₃ -26	20,19
CH ₂ -12	39,90	CH ₃ -27	19,00
C ₀ -13	42,60	CH ₂ -28	25,40
CH-14	56,12	CH ₃ -29	11,95
CH ₂ -15	24,11		

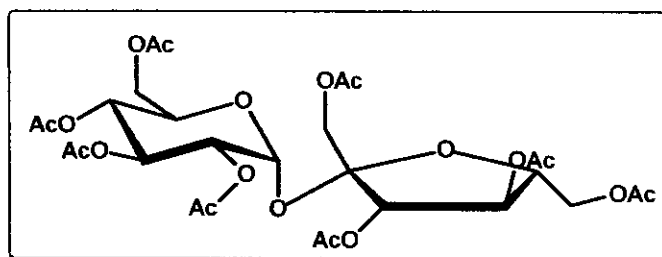
I. 2. 3. 2. Fracionamento dos Extratos Hidro-Etanólicos

Para o estudo dos extratos hidro-etanólicos foram empregadas duas metodologias, a saber, a acetilação prévia de uma alíquota do extrato e a metodologia para obtenção de frações ricas em saponinas.

I. 2. 3. 2. 1. EiAFHE - *Eleocharis interstincta*, Extrato hidro-etanólico da parte aérea fresca

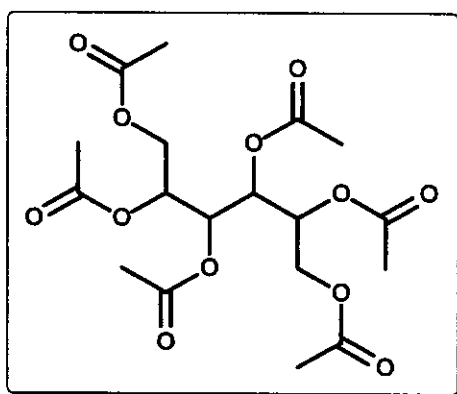


Sacarose Peracetilada (43)



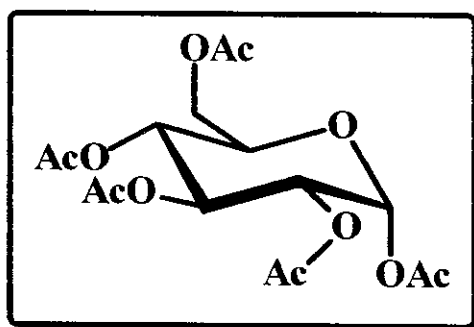
CG/EM:

Sacarose peracetilada (43), t_R 36,42 min, m/z (%): 678 (não aparece), 473 (<1), 361 (<1), 331 (8), 271 (<1), 211 (10), 188 (<1), 169 (15), 145 (2), 127 (4), 109 (8), 73 (5), 43 (100).

Manitol Peracetilado (44)**CG/EM:**

Manitol peracetilado (44), t_R 17,51 min, m/z (%): 434 (não aparece), 392 (<1), 258 (<1), 217 (4), 200 (2), 187 (3), 158 (2), 145 (10), 128 (2), 115 (8), 103 (6), 43 (100);

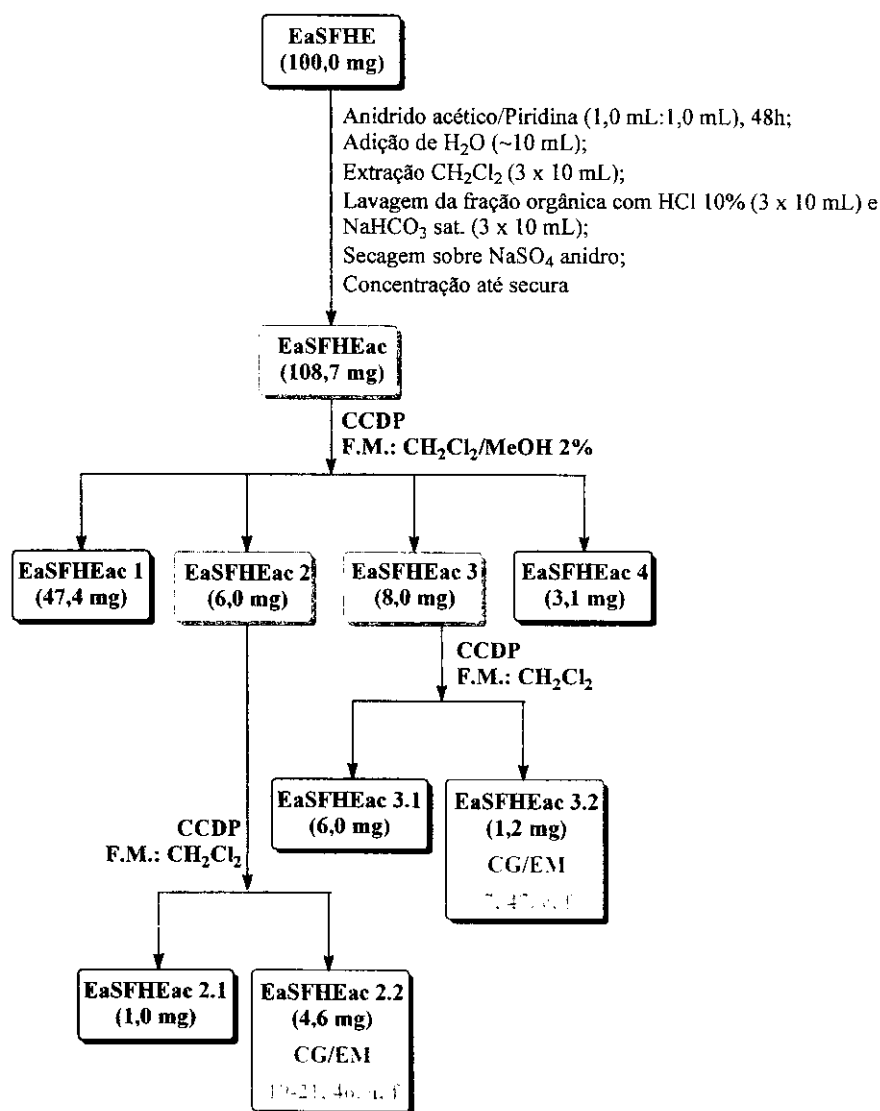
Sacarose peracetilada (43), t_R 32,42 min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 66).

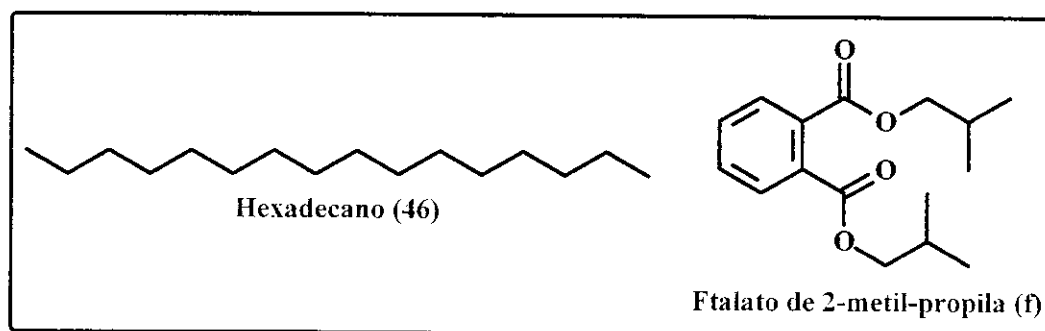
Glicose Peracetilada (45)

CG/EM:

Glicose peracetilada (44), t_R 19,47 min, m/z (%): 390 (não aparece), 346 (<1), 331 (<1), 270 (<1), 242 (2), 211 (<1), 200 (2), 169 (1), 157 (3), 140 (2), 115 (8), 98 (6), 73 (2), 43 (100).

I. 2. 3. 2. 2. EaSFHE - *Eleocharis acutangula*, Extrato hidro-etanólico da parte subterrânea fresca



Hexadecano (46) e Ftalato de 2-metil-propila (f).**CG/EM:**

Curcumeno (19), $t_R = 12,77$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 42);

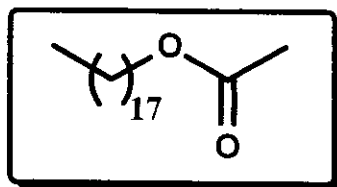
α -Muuroleno (20), $t_R = 13,06$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 42);

δ -Cadineno (21), $t_R = 13,40$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 42);

Ftalato de 2-metil-propila (f), $t_R = 17,37$ min, m/z (%): 278 (<1), 223 (10), 205 (3), 167 (5), 149 (100), 132 (3), 104 (11), 76 (9), 57 (56), 41 (29);

Hexadecano (46), $t_R = 17,54$ min, m/z (%): 226 (<1), 185 (<1), 169 (1), 141 (2), 127 (2), 113 (4), 97 (8), 85 (28), 71 (54), 57 (100), 43 (88);

Ftalato de n-butila (a), $t_R = 18,37$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 31).

Acetato de Octadecila (47)**CG/EM:**

Ftalato de 2-metil-propila (f), $t_R = 17,35$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 68);

Hexadecanoato de metila (7), $t_R = 17,84$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 32);

Acetato de Octadecila (47), $t_R = 20,62$ min, m/z (%): 283 (2), 252 (2), 224 (2), 125 (4), 111 (10), 83 (32), 61 (40), 43 (100);

Ftalato de 2-etil-hexila (c), $t_R = 23,71$ min, m/z (%): ver dados anteriores (pág. 32).

I. 2. 3. 2. 3. Ensaio para Detecção de Saponinas

Após a concentração dos extratos hidro-etanólicos e dos metanólicos até secura, observou-se a formação de espuma em alguns deles quando da adição de água para auxiliar na transferência do extrato do balão para o frasco de armazenamento.

Esta evidencia sugeriu a possível presença de saponinas, que são glicosídeos de esteróides ou triterpenos policíclicos. Uma vez em solução aquosa, as saponinas formam espuma persistente e abundante quando a solução é submetida a agitação vigorosa. Essa espuma é estável à adição de ácidos minerais diluídos, o que a diferencia da espuma dos sabões comuns¹⁵.

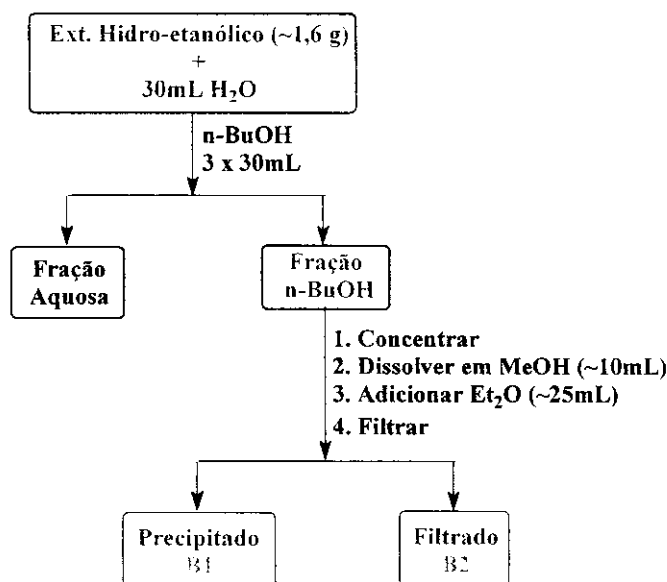
Assim, os extratos EaAFHE, EaSFHE, EiAFHE, EsAFHE, EsASM, EsSFHE, EmAFHE e EmASM foram submetidos ao ensaio de formação de espuma segundo descrito por Costa¹⁶.

Com base nos resultados obtidos com o ensaio de espuma, os extratos EsSFHE e EsAFHE foram submetidos ao tratamento para obter frações ricas em saponinas. De maneira geral, o método consistiu em dissolver uma alíquota do

¹⁵ Schenkel EP, Gosmann G, Athayde ML. *in* Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia, da planta ao medicamento. Editora da UFSC e Editora da Universidade (UFRGS), Florianópolis, Porto Alegre. Segunda edição, Capítulo 27: 597-604 2000.

¹⁶ Costa AF. Farmacognosia. Vol. II, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal. 1967.

extrato em água e, após partição com n-butanol, promover a precipitação das saponinas presentes na fração orgânica com éter etílico (fluxograma 3)¹⁷.



Fluxograma 3: Separação de saponinas.

Outra tentativa de evidenciar a presença de saponinas foi explorar a característica de baixa solubilidade destas em éter etílico. Assim, uma alíquota (~200mg) do extrato EsSFHE foi dissolvida em água (10mL) e, após adição de éter etílico (~5mL), ocorreu a formação de um precipitado amarelado, denominado EsSFHE ppt, que foi analisado por CLAE.

¹⁷ Hostettmann K, Hostettmann M, Marston A. Saponins. *Methods in plant biochemistry* 7: 435-471, 1991.

**I. 2. 3. 2. 4. EsSFHE - *Eleocharis sellowiana* –
Extrato hidro-etanólico da parte subterrânea fresca.**

O precipitado EsSFHE B1 (190mg) foi fracionado por cromatografia *flash* em coluna de sílica (Ø10mm, 10g de sílica, frações de 1ml, fluxo de eluição de cerca de 5ml/min) segundo a metodologia descrita por Yesilada e Takaishi¹⁸. A Tabela 21 resume as frações obtidas e os grupos resultantes após comparação por CCDA.

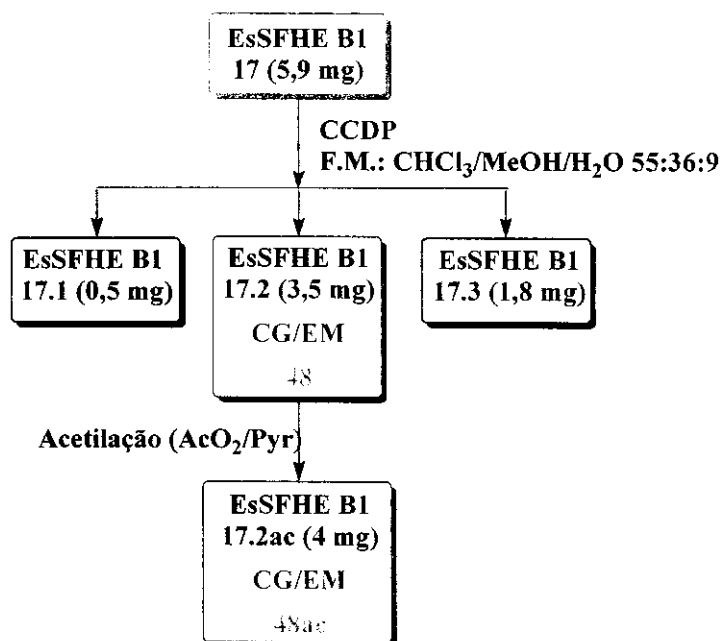
Tabela 21: Frações e grupos resultantes do fracionamento de EsSFHE B1

Grupos	Frações	Massa (mg)	Eluente
1	1-26	3,0	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 75:23:2
2	27-30	0,4	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 72:24:4
3	31-37	1,0	
4	38-42	0,9	
5	43-52	2,1	
6	53-57	1,2	
7	58-69	3,3	CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O 57:35:8
8	70-72	1,3	
9	73-78	2,6	
10	79-82	1,6	
11	83-90	6,7	
12	91-104	15,4	
13	105-114	12,4	
14	115-121	9,3	
15	122-127	14,4	
16	128-138	18,9	
17	139-144	5,9	
18	145-166	12,8	
19	167-187	31,9	MeOH 100%
20	188-239	16,1	H ₂ O 100%

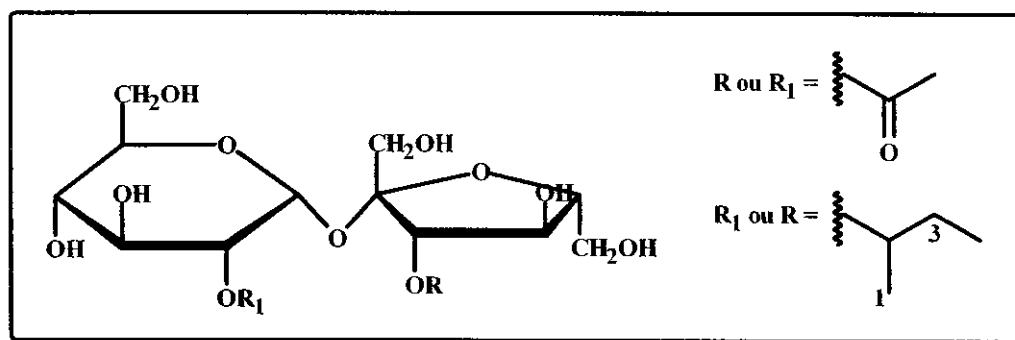
¹⁸ Yesilada E, Takaishi Y. A saponin with anti-ulcerogenic effect from the flowers of *Spartium junceum*. *Phytochemistry* 51 (7): 903-8, 1999.

A seguir encontram-se descritos os fluxogramas referentes às análises por CCDP dos grupos de frações reunidas.

EsSFHE B1 G17



Derivados de Sacarose (48)



Aspecto físico: sólido incolor amorfo.

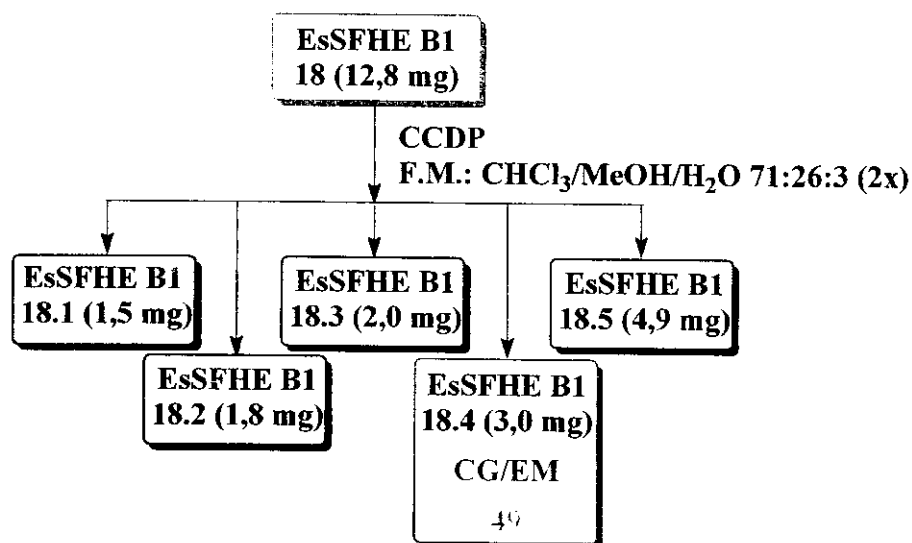
RMN¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS): tabela 22.

RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS): tabela 22.

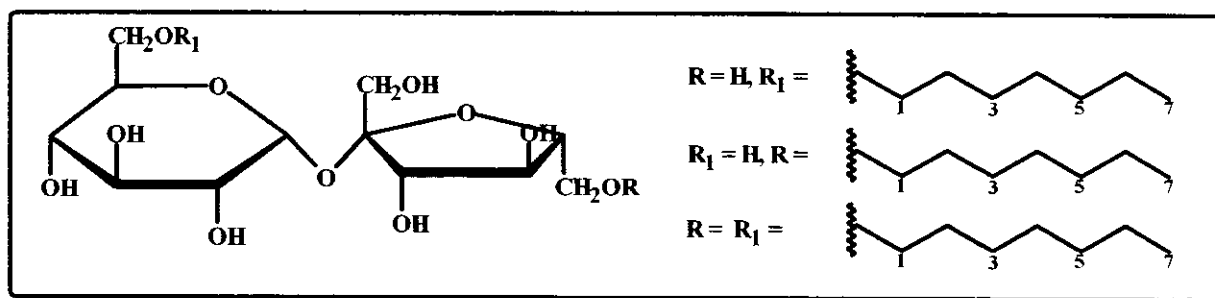
Tabela 22: Dados de RMN¹H, ¹³C e DEPT (11 tesla, CD₃OD) da fração EsSFHE B1 G17.2.

δ_H	δ_C
0,849 (<i>m</i>)	14,43 (CH ₃)
1,215 -1,319(<i>m</i>)	21,65 (CH ₃)
1,583 (<i>m</i>)	24,22 (CH ₃)
1,882 (<i>s</i>)	30,76 (CH ₂)
3,344 - 4,101 (<i>m</i>)	63,37 (CH ₂)
5,378 (<i>d</i> , <i>J</i> = 4 Hz)	64,01 (CH ₂)
	64,40 (CH ₂)
	69,55 (CH)
	71,31 (CH)
	73,22 (CH)
	73,86 (CH)
	74,40 (CH)
	74,63 (CH)
	75,68 (CH)
	79,29 (CH)
	83,80 (CH)
	93,65 (CH)
	105,31 (C ₀)

EsSFHE B1 G18



Derivados de Sacarose (49)



Aspecto físico: sólido amorfo incolor.

RMN¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS): tabela 23.

RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS): tabela 23.

Tabela 23: Dados de RMN¹H, ¹³C e DEPT (11 tesla, Pyr-D₅) da fração EsSFHE B1 G18.4.

δ_H	δ_C
3,622 (<i>m</i>)	14,21 (CH ₃)
1,545 (<i>m</i>)	22,83 (CH ₂)
	27,83 (CH ₂)
1,125 (<i>m</i>)	29,95 (CH ₂)
	32,04 (CH ₂)
0,825 (<i>m</i>)	32,11 (CH ₂)
	62,31 (CH ₂)
	62,91 (CH ₂)
	64,52 (CH ₂)
	64,69 (CH ₂)
	70,56 (CH ₂)
	71,73 (CH)
	73,31 (CH)
	73,97 (CH)
	75,49 (CH)
	79,82 (CH)
	84,16 (CH)
	93,53 (CH)
	105,73 (C ₀)

I. 2. 4. Avaliação Cromatográfica dos Extratos.

I. 2. 4. 1. Avaliação por Cromatografia em Camada Delgada.

Visando observar o perfil dos extratos obtidos de outras *Eleocharis* comparando-os com os compostos isolados e identificados, foram realizadas algumas análises por CCDA com os sistemas de desenvolvimentos descritos na tabela 24.

Tabela 24: Extratos e frações de *Eleocharis* sp comparados por CCDA.

Fase Móvel	Extratos e Frações
CH ₂ Cl ₂ /Hex 9:1	EmASH _C , EmASH _S , EmAH _C , EiAH _C , EiAH _S , EfAH _C , EfAH _S , EsAH _C , EsAH _S , EsASH, EsSFH, EsSFH G2
CH ₂ Cl ₂ /MeOH/H ₂ O 85:15:1	1) EmASH _C , EmASH _S , EmAH _C , EiAH _C , EiAH _S , EfAH _C , EfAH _S , EsAH _C , EsAH _S , EsASH, EsSFH
	2) EmASH _C , EmASH _S , EmAH _C , EiAH _C , EiAH _S , EsSFH 1.5, EsASH 6.2.3.2.2.1.1, EsSFH 13.1, EfAH _C , EfAH _S , EsAH _C , EsAH _S , EsASH, EsSFH
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 16:1	EmASH _S , EmASD _C , EmASD _S , EmAAc, EiAH, EiAAc, EaSAc, EaAAc _C , EaAAc _S , EaAH, EsAFH, EsAFac, EsASH, EsASD _C , EsASD _S , EsSFC.
CH ₂ Cl ₂ /MeOH 30%	EiAFac, EiAFHE, EaSFHE, EaAFac, EaAFHE, EsAFac, EsASD, EsAFHE, EsASM (S _{MeOH}), EsASM (S _{H2O}), EmAFac, EmAFHE, EmASD.

I. 2. 4. 2. Avaliação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a análise qualitativa dos extratos obtidos e da fração EsSFHE ppt foi empregado o cromatógrafo líquido de alta eficiência HP1090 série II/M com

detetor espectrofotométrico UV/VIS arranjo de diodos. Foram testadas várias condições, sendo que na tabela 25 encontram-se as que apresentaram os melhores resultados.

As amostras foram dissolvidas em solvente grau HPLC apropriado e filtradas em filtro tipo Millex®. Os solventes utilizados foram filtrados e desgaseificados antes do início de cada análise, sendo a água destilada e deionizada (18mΩ).

Tabela 25: Condições testadas para análise por CLAE.

Condições	Extratos hexânicos	Extratos acetato de etila	Fração EsSFHE ppt
Coluna	Hypersil ODS C ₁₈ (5 µm, 100 x 4,6 mm).		NovaPak C ₁₈ (150 x 3,9mm)
Condições de eluição	34:66 (H ₂ O/MeOH) - 100 (MeOH) em 48 min + 12 min a 100 (MeOH)	83:17 (H ₂ O/MeOH) - 27:73 (H ₂ O/MeOH) em 20 min + 2 min a 27:73 (H ₂ O/MeOH) - 100 (MeOH) em 8 min + 30 min a 100 (MeOH) *	95:5 (H ₂ O/AcN) mantida por 5 min - 0:100 (H ₂ O/AcN) em 30 min + 15 min a 0:100 (H ₂ O/AcN);
Fluxo		0,8 mL/min	
Volume de injeção		25 µL	
Detetor (nm)	254, 270 e 280.	254, 280 e 300.	203, 206, 210, 254 e 365.
Temperatura		Ambiente	

* baseado na metodologia empregada por Parr e colaboradores (ref. 8, Introdução Geral).

I. 3. Resultados e Discussão

I. 3. 1. Extratos obtidos

A tabela 26 resume todos os extratos obtidos com suas respectivas quantidades, bem como os resultados dos tratamentos para separação de clorofila e obtenção de frações ricas em saponinas.

Tabela 26: Extratos das espécies *Eleocharis* estudadas

Espécie	Parte (g)	Extrato (mg)	Separação de clorofila#	Separação de saponinas*
<i>E. acutangula</i> (Ea)	Aérea fresca (187,4)	H (869,0)	H _C (701,9)	
			H _S (159,1)	
		Ac (1075,9)	Ac _C (611,0)	
			Ac _S (464,9)	
	Subterrânea fresca (111,9)	HE (2023,7)	-	
		H (145,3)	-	
<i>E. interstincta</i> (Ei)	Aérea fresca (207,5)	Ac (125,6)	-	
		HE (1267,5)	-	
		H (1779,6)	H _C (792,2)	
			H _S (887,4)	
<i>E. maculosa</i> (Em)	Aérea fresca (210,0)	Ac (742,3)	-	
		HE (6590,0)	-	
		H (907,8)	H _C (perdida)	
			H _S (762,9)	
	Aérea seca (98,6)	Ac (525,4)	-	
		HE (3528,5)	-	
		H (1485,4)	-	
		D (605,0)	H _C (314,5)	
<i>E. sellowiana</i> (Es)	Aérea fresca (270,0)		H _S (143,7)	
		M (8708,1)	-	
		H (1283,4)	H _C (1068,1)	
			H _S (215,3)	
		Ac (670,9)	-	
		HE (2931,0)	-	B1 (110,6)
	Subterrânea fresca (300,0)			B2 (106,7)
		H (358,4)	-	
		C (1303,4)	-	
		HE (2500,0)	-	B1 (194,4)
<i>E. sellowiana</i> (Es)	Aérea seca (95,8)			B2 (182,3)
		H (2249,3)	-	
		D (211,2)	D _C (84,3)	
			H _S (127,9)	
		M (2352,0)	-	

C = fração rica em clorofila, S = fração sem clorofila; * uma alíquota (~1,5g) foi submetida.

I. 3. 2. Avaliação Cromatográfica dos Extratos

I. 3. 2. 1. Avaliação por Cromatografia em Camada Delgada

As figuras 1, 2, 3 e 4 apresentam os cromatogramas obtidos para os diversos extratos frente às fases móveis de interesse.

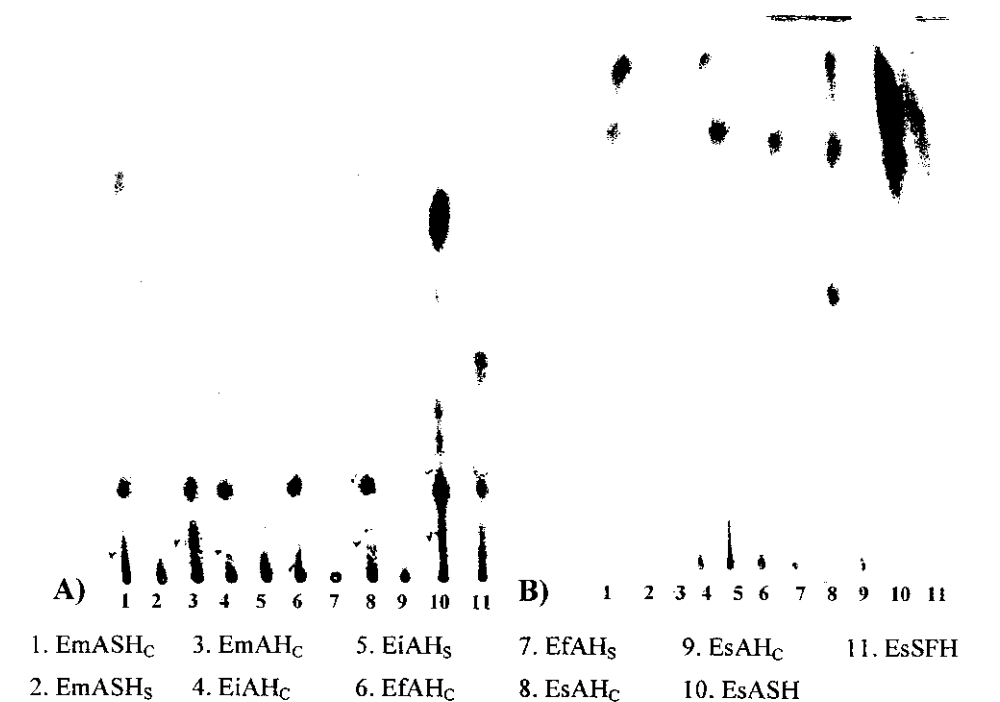


Figura 1: Cromatogramas dos extratos hexânicos de *Eleocharis* sp.

A) F. M.: CH₂Cl₂/Hex 9:1; **B)** F. M.: CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 85:15:1

Foi interessante observar a posição relativa da mancha de clorofila após o desenvolvimento das placas de CCDA apresentada na Figura 1. No primeiro caso (Figura 1A), observou-se que a clorofila concentrou-se próxima à origem enquanto que no segundo sistema (Figura 1B) a clorofila migrou junto com a frente do solvente. Outra observação importante foi a de que o método empregado para

separação de clorofila através de floculação removeu a fração mais apolar do extrato junto com a clorofila resultando em uma fração livre de clorofila mais complexa para ser analisada por CCD e rica em compostos mais polares.

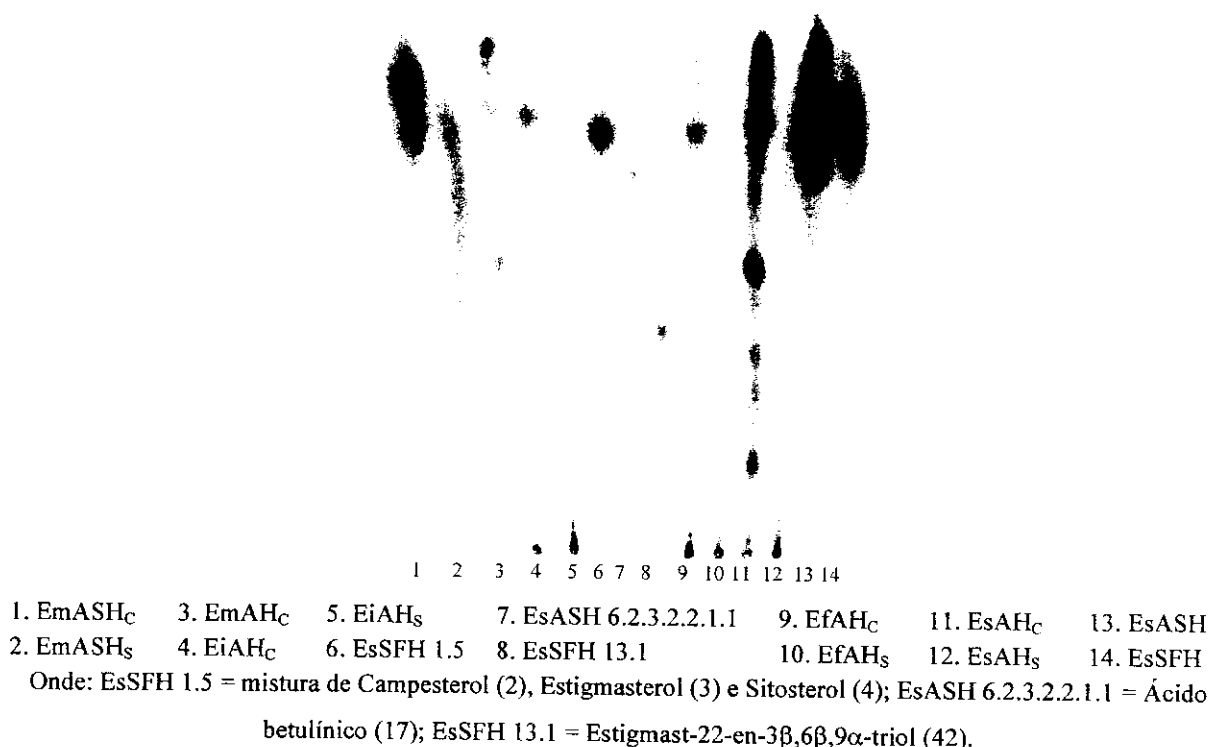
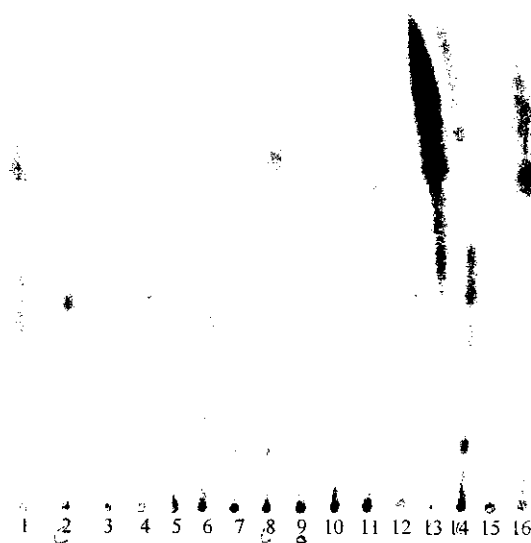


Figura 2: Cromatograma dos extratos hexânicos de *Eleocharis* sp. F. M.:

CH₂Cl₂/MeOH/H₂O 85:15:1

O cromatograma apresentado na Figura 2 sugere a presença em todos os extratos da mistura de esteróides Campesterol (2), Estigmasterol (3) e Sitosterol (4), enquanto que o Ácido Betulínico (17) parece ocorrer apenas nos extratos de *E. sellowiana*. Já o novo derivado esteroidal, Estigmast-22-eno-3 β ,6 β ,9 α -triol (42), parece presente apenas no extrato da parte subterrânea fresca de *E. sellowiana*.



- | | | | | | | | |
|-----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|------------|------------------------|------------------------|
| 1. EmASH | 3. EmASD _S | 5. EiAH _S | 7. EaSAc | 9. EaAAc _S | 11. EsAFH | 13. EsASH | 15. EsASD _S |
| 2. EmASD _C | 4. EmAAc | 6. EiAAc | 8. EaAAc _C | 10. EaAH _S | 12. EsAFAc | 14. EsASD _C | 16. EsSFC |

Figura 3: Cromatograma dos extratos de *Eleocharis* sp. F. M.: CH₂Cl₂/MeOH 16:1

O cromatograma da Figura 3 apresenta um perfil geral dos extratos de polaridade baixa (hexânico) e média (acetato de etila e diclorometânico).

Já os extratos mais polares (Figura 4) apresentaram um perfil que sugeria a presença de compostos poli-hidroxilados, tais como açúcares e ciclitóis, por causa dos baixos valores de R_f (R_f < 0,5) e por aparecem como manchas em tons de verde escuro após revelação com solução de anisaldeído.

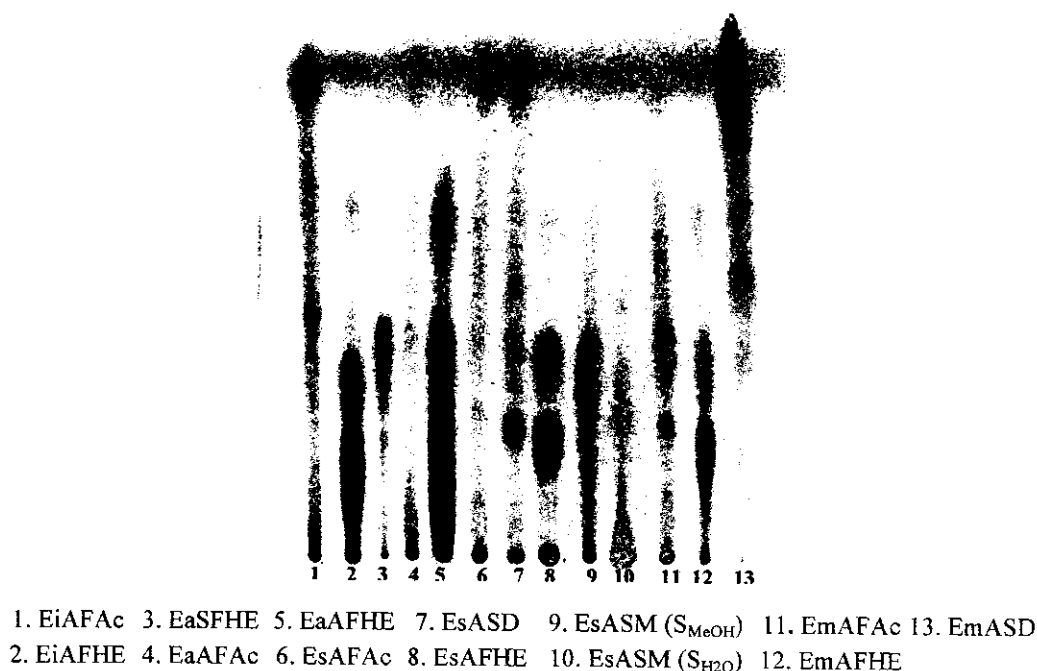


Figura 4: Cromatograma dos extratos de *Eleocharis* sp. F. M.: CH₂Cl₂/MeOH 30%

I. 3. 2. 2. Avaliação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Apesar de todas as tentativas realizadas com o objetivo de otimizar condições de análise para os diferentes extratos obtidos, os cromatogramas ainda não apresentaram uma resolução adequada. Porém foi interessante notar que os extratos hexânicos da parte subterrânea apresentaram cromatogramas mais ricos do que os da parte aérea (figuras 5a-b), da mesma forma que os extratos hexânicos obtidos por extração em Soxhlet em relação aos obtidos por maceração (figuras 5c-d).

Observou-se ainda que, para a fração EsSFHE ppt, os cromatogramas indicaram a presença de um grupo de substâncias com espectro de ultravioleta muito parecido e com máximo de absorção entre 203 e 210 nm (Figura 6).

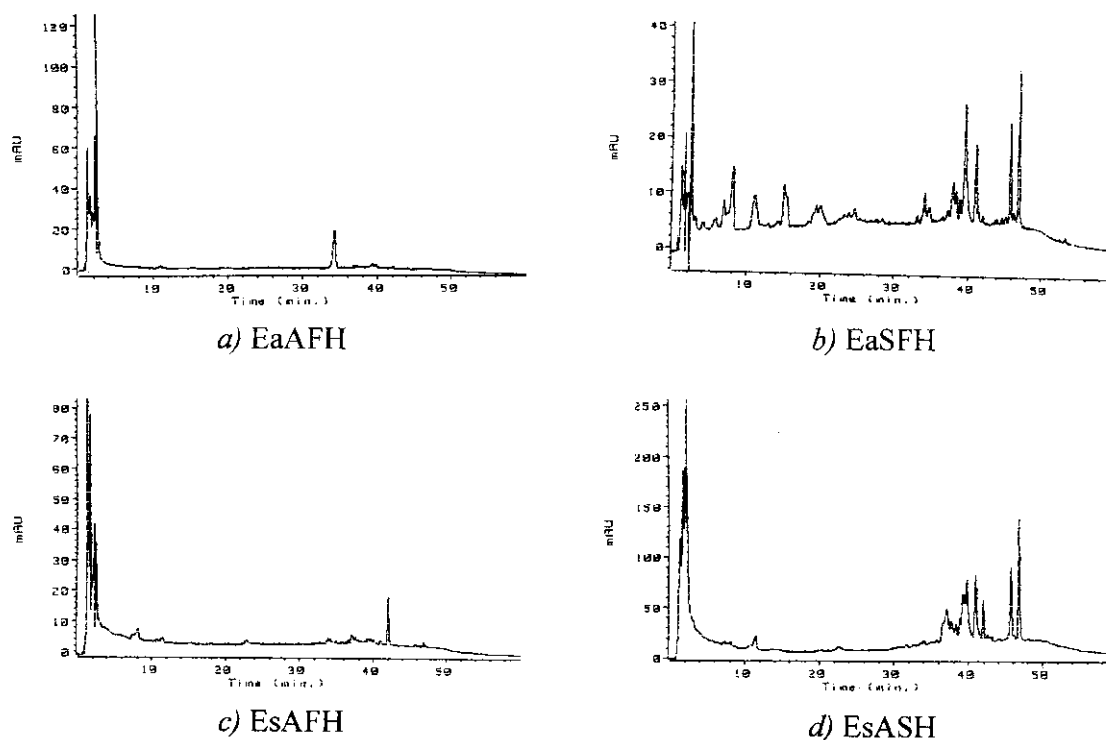


Figura 5: Cromatogramas (CLAE) de alguns extratos hexânicos de *Eleocharis*.

Condições de análise: Tabela 25.

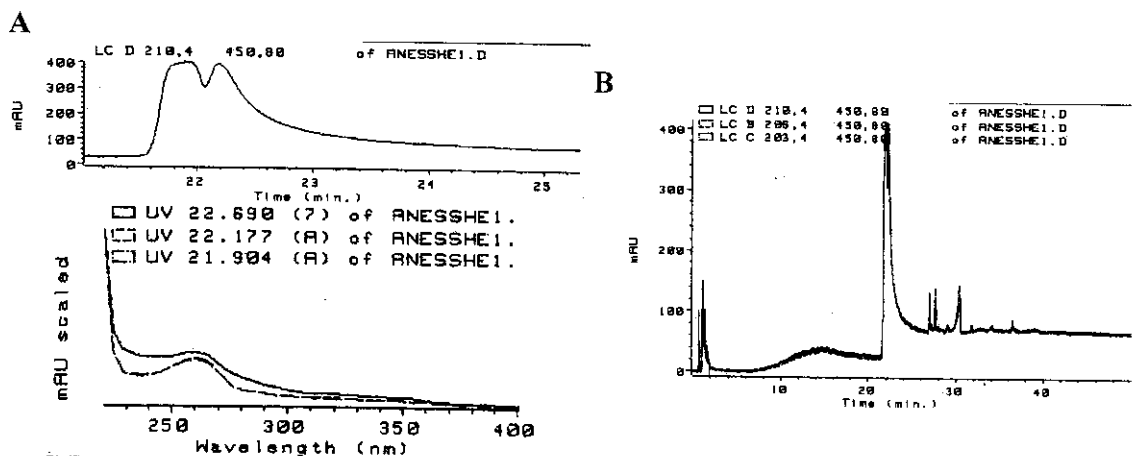


Figura 6: Cromatogramas (CLAE) de EsSFHE ppt.

A) Espectros de ultravioleta observados para os principais picos do cromatograma a 210nm; B) Sobreposição dos cromatogramas a 210, 206 e 203nm. Condições de análise: Tabela 25.

Todos os cromatogramas apresentaram, em diferentes proporções, uma elevação da linha de base, tal como anteriormente observado por Van Aller e

colaboradores (Ref. 13, Introdução Geral) nas análises com os extratos de *E. smallii* (Figura 7).

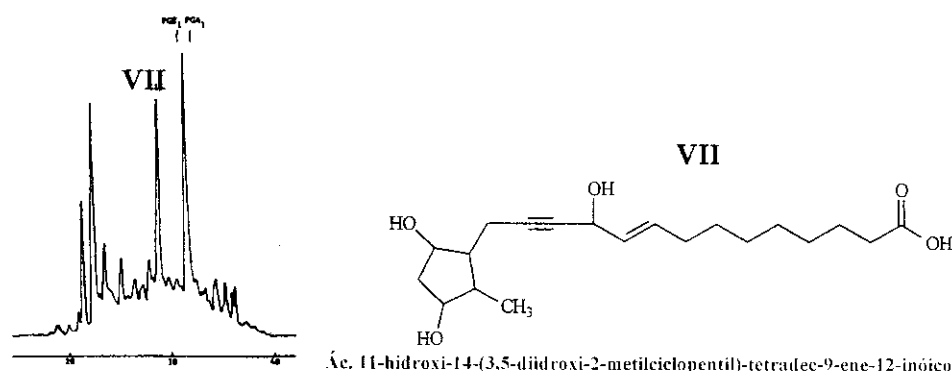


Figura 7: Cromatograma (CLAE) – *E. microcarpa*.

Notar a elevação da linha de base.

I. 3. 3. Determinação Estrutural dos Compostos Isolados

Neste estudo fitoquímico, foram estudadas as espécies *Eleocharis sellowiana*, *E. acutangula* e *E. interstincta*, sendo que a primeira resultou em extratos menos complexos e mais facilmente elaboráveis com as metodologias já estabelecidas em nosso grupo de pesquisa.

Este trabalho resultou na identificação por CG/EM de oito alcanos de cadeia longa (9-12, 22, 37, 38 e 46), dezoito ésteres de ácidos graxos (5, 7-8, 13-14, 23-33, 35-36), o derivado acetilado do álcool octadecanol (47), o monoterpênóide diidroactinidiolídeo (21), três sesquiterpenos (19-21), fitona (6), neofitadieno (16) e três açúcares na forma de seus derivados peracetilados (43-45) (Figura 8).

Tiveram suas estruturas elucidadas, por RMN (1D e 2D) e EM, cinco esteróides (2-4, 10, 42) dos quais um é inédito (42), cinco triterpenos pentacíclicos (1, 5, 35, 36, 41) sendo dois novos derivados de núcleo hopano (35 e 41),

hexadecanoato de *E*-fitila (34) e duas misturas de derivados de sacarose (48 e 49) (Figura 9).

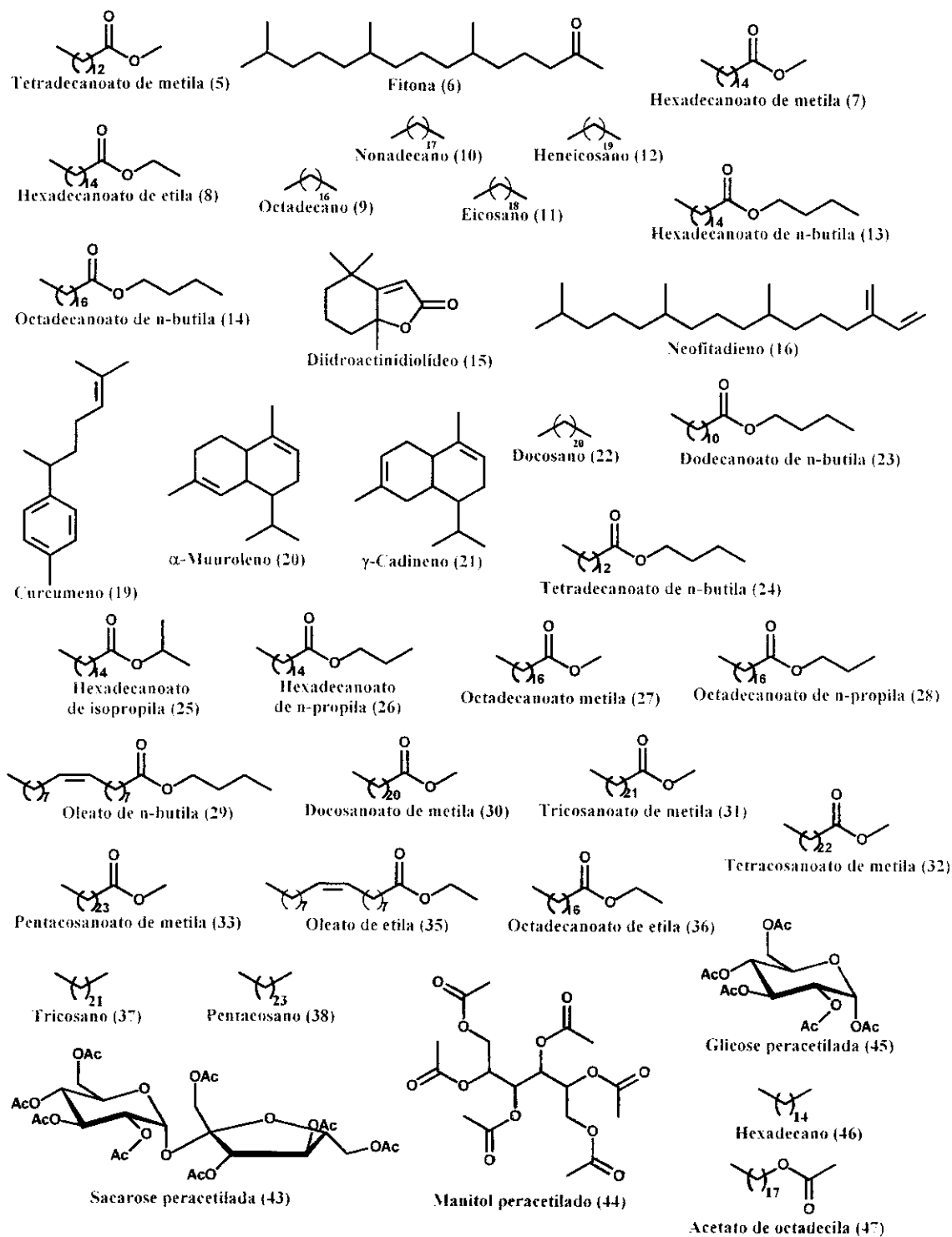


Figura 8: Compostos identificados por CG/EM.

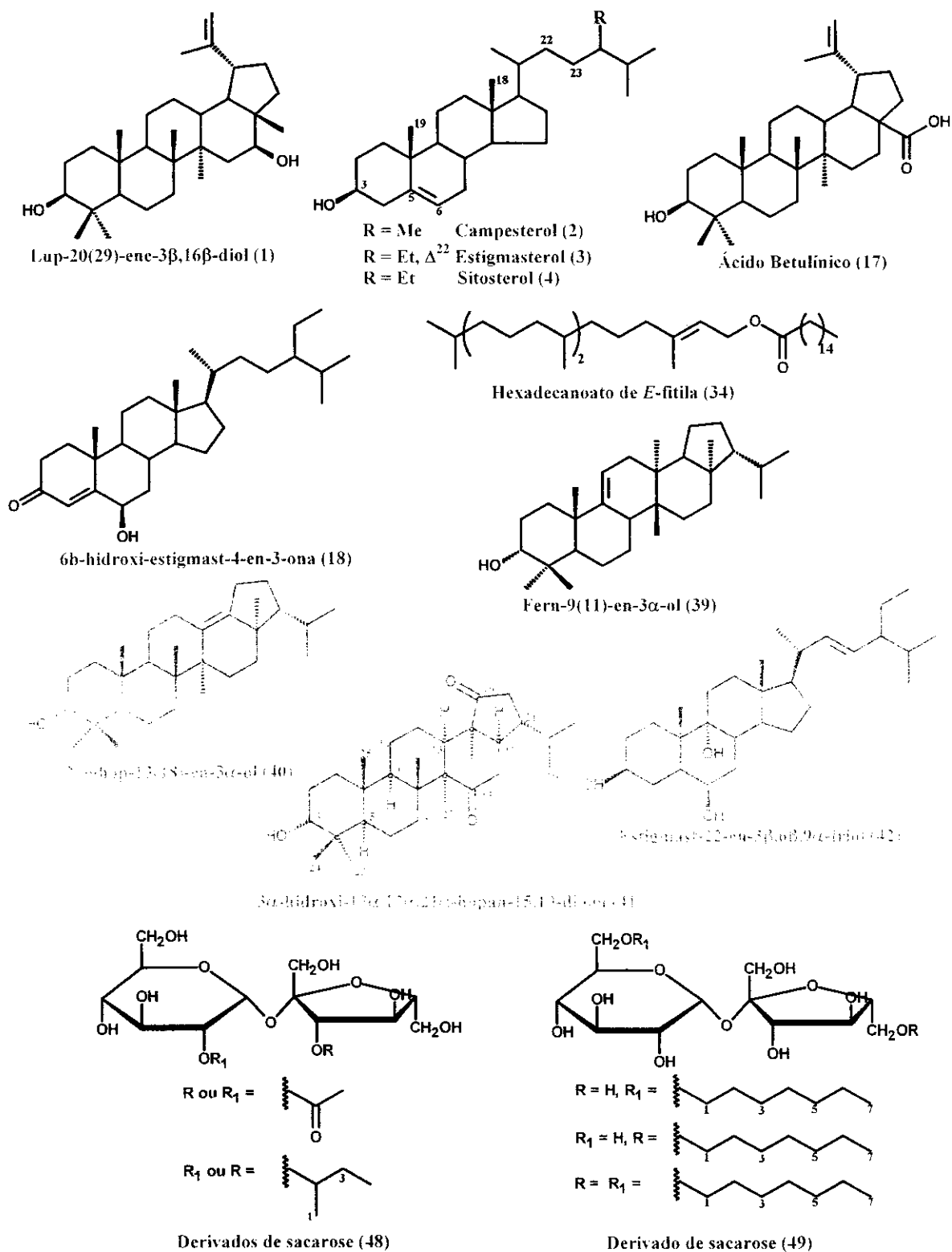


Figura 9: Compostos isolados e caracterizados através de seus dados espectroscópicos.

Foram ainda detectados, por CG/EM, alguns derivados do ácido ftálico (**a-c, e, f**) e decanodiatos de 2-etil-hexila (**d**) (Figura 10).

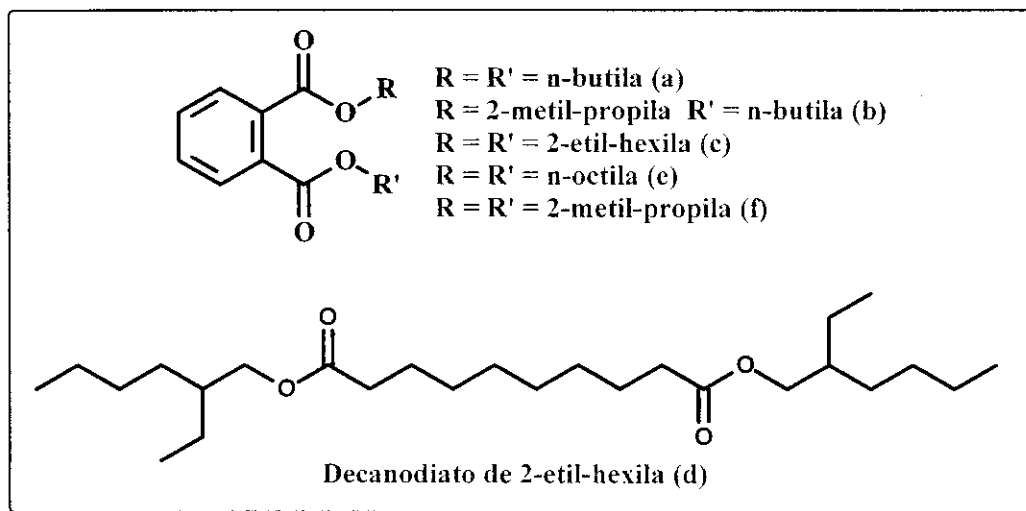


Figura 10: Plastificantes identificados em várias frações.

Para melhor clareza da discussão dos dados obtidos, os compostos serão descritos agrupados segundo a classe a que pertencem. Junto com a descrição de cada composto foi relatada sua ocorrência.

I. 3. 3. 1. Alcanos

Foram identificados, através da análise dos espectros de massas obtidos por CG/EM e comparação destes com as bibliotecas eletrônicas Willey e NIST, os alcanos Hexadecano (**46**) na fração EaSFHEac 2.2, Octadecano (**9**), Nonadecano (**10**) e Eicosano (**11**) na fração EsASH 6.3, Heneicosano (**12**) nas frações EsASH 6.3 e EsSFH 1.9, Docosano (**22**) na fração EsASH 6.2.3.2.2.2.2, Tricosano (**37**) e Pentacosano (**38**) na fração EsSFH 1.9.

Estes compostos apresentam um comportamento muito característico quando submetidos ao impacto eletrônico para obtenção dos espectros de massas. Todos estes espectros de massas apresentaram um perfil semelhante até íon $m/z = 155$, isto é, estavam presente os íons 43 (61 a 72% de abundância relativa), 57 (100%), 71 (66 a 76%), 85 (50 a 56%), 97 (20%), 99 (20 a 13%), 113 (8 a 12%), 127 (4 a 9%), 141 (3 a 10%) e 155 (0 a 4%), decaimento típico de compostos com cadeia longa (Figura 11).

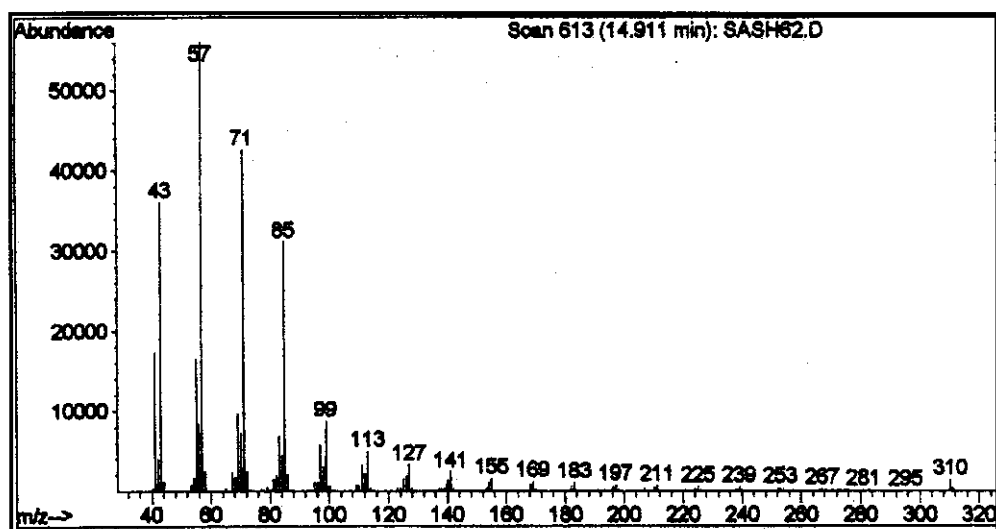


Figura 11: Espectro de massas do Pentacosano (38).

Esta é a primeira vez que estes compostos são relatados para este gênero. Muito provavelmente estes hidrocarbonetos são constituintes da cera epicuticular.

I. 3. 3. 2. Ésteres

Foram identificados 18 ésteres de ácidos graxos e 1 éster de álcool de cadeia longa em diferentes frações (tabela 27), sendo que a frações EsASH 7.10.2 era constituída exclusivamente por estes compostos.

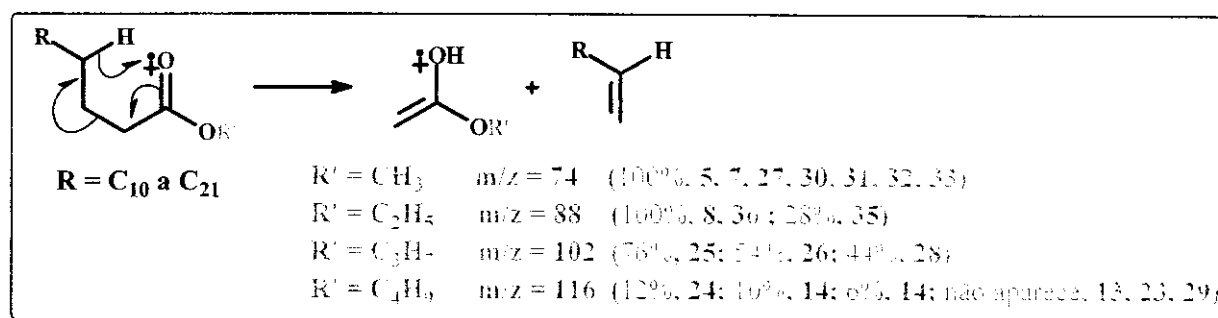
Tabela 27: Ésteres de ácidos graxos identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

No. C	Éster	Fração
15	Tetradecanoato de metila (5),	EsASH 5.5
16	Dodecanoato de n-butila (23)	EsASH 7.10.2
17	Hexadecanoato de metila (7),	EsASH 5.5, 7.10.2, 7.11.4, EsSFHE ac 3.2
18	Tetradecanoato de n-butila (24)	EsASH 7.10.2
18	Hexadecanoato de etila (8)	EsASH 5.5, 7.10.2; EsSFH 1.9
19	Hexadecanoato de isopropila (25)	EsASH 7.10.2
19	Hexadecanoato de n-propila (26)	EsASH 7.10.2
19	Octadecanoato de metila (27)	EsASH 7.10.2
20	Acetato de Octadecila (47)	EsSFHE ac 3.2
20	Oleato de etila (35)	EsSFH 1.9
20	Octadecanoato de etila (36)	EsSFH 1.9
20	Hexadecanoato de n-butila (13)	EsASH 6.3, 7.4.3, 7.10.2
21	Octadecanoato de n-propila (28)	EsASH 7.10.2
22	Oleato de n-butila (29)	EsASH 7.10.2; EsSFH 1.9
22	Octadecanoato de n-butila (14)	EsASH 6.3, 7.4.3, 7.10.2, 6.2.3.2.2.2.2
23	Docosanoato de metila (30)	EsASH 7.10.2
24	Tricosanoato de metila (31)	EsASH 7.10.2
25	Tetracosanoato de metila (32)	EsASH 7.10.2
26	Pentacosanoato de metila (33)	EsASH 7.10.2

Para todos os ésteres o íon molecular foi observado, porém sempre com baixa intensidade relativa (1 a 18%). Foi interessante notar que os ésteres metílicos e quase todos os ésteres etílicos apresentaram como o pico base os íons radicalares $m/z = 74$ (para ésteres CH_3) e $m/z = 88$ (para ésteres C_2H_5) (Figura 12), os quais podem ser racionalizado através de uma clivagem tipo MacLaferty, que é

um caminho de fragmentação bastante importante na identificação da cadeia alcoólica que esterifica o ácido graxo¹⁹. O Quadro 1 resume os fragmentos iônicos encontrados que puderam ser racionalizados através do rearranjo de McLafferty.

Quadro 1: Fragmentos iônicos racionalizados através do Rearranjo de McLafferty



Observou-se ainda que, para os ésteres dos álcoois n-propílico, isopropílico e n-butílico, os íons radicalares $m/z = 102$ (para ésteres C_3H_7) e $m/z = 116$ (para ésteres C_4H_9), resultantes do rearranjo de McLafferty, não correspondiam ao pico base como aconteceu para os ésteres metílicos e etílico. Assim, os ésteres n-propílicos apresentaram pico base em $m/z = 61$ (Figura 13) enquanto que para os isopropílicos o íon do pico base foi $m/z = 43$ (Figura 14)²⁰; já os ésteres n-butílicos apresentaram pico base em $m/z = 56$ (Figura 15).

O fragmento catiônico em $m/z = 61$, observado para os ésteres n-propílicos, pode ser explicado pela clivagem do cátion radicalar $m/z = 102$ (rearranjo McLafferty) com transferência de dois hidrogênios e perda do radical alila; este caminho de fragmentação foi comprovado por Benoit e colaboradores²¹ através de estudos de energia de formação dos radicais envolvidos.

¹⁹ Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH. *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry*. V. II - Steroids, terpenoids, sugars, and miscellaneous classes. Holden-Day, Inc. San Francisco, USA, chapter 25, p. 166, 1964.

²⁰ Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH. *Mass Spectrometry of Organic Compounds*. Holden-Day, Inc. San Francisco, USA, p. 188, 1967.

²¹ Benoit FM, Harrison AG, Lossing FP. Hydrogen migrations in mass spectrometry. III - Energetics of formation of $[R'CO_2H_2]^+$ in the mass spectra of $R'CO_2R$. *Org Mass Spectrom* 12 (2): 78-81, 1977.

Outra observação importante foi a presença de picos afastados uns dos outros por 14 unidades de massa, que são característicos de compostos com cadeias carbônicas lineares e permitiram confirmar que se tratavam de ésteres de ácidos graxos (figuras 12-15).

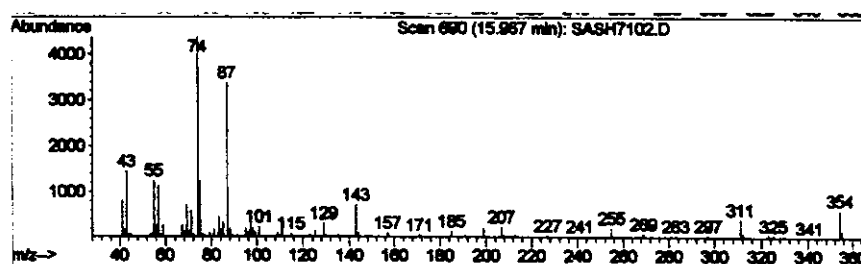


Figura 12: Espectro de massas do Docosanoato de metila (30).

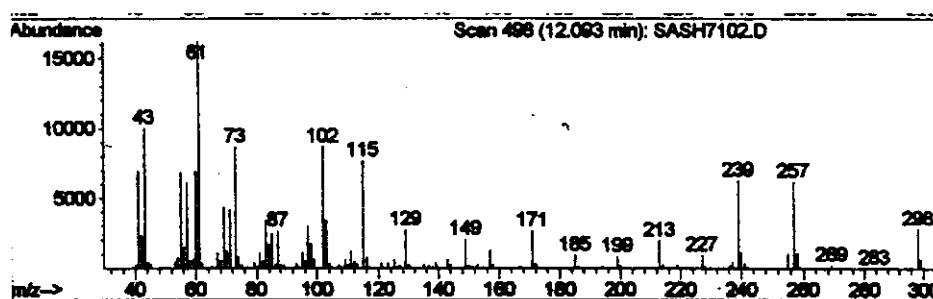


Figura 13: Espectro de massas do Hexadecanoato de n-propila (26).

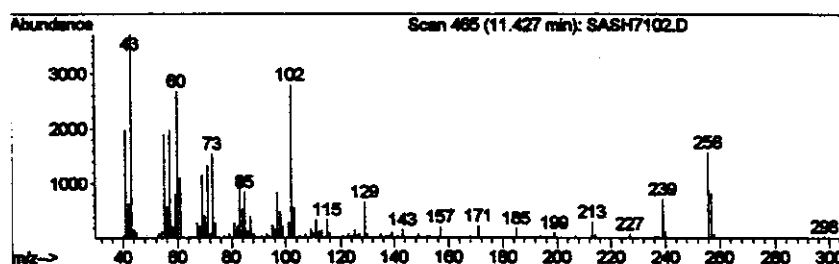


Figura 14: Espectro de massas do Hexadecanoato de isopropila (25).

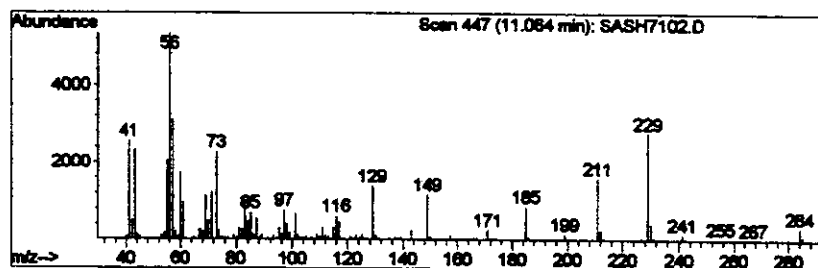


Figura 15: Espectro de massas do Tetradecanoato de n-butila (24).

Já o acetato de octadecila (47) apresentou, como pico base, o fragmento $m/z = 43$, característico de compostos acetilados. Além do decaimento típico de compostos de cadeia longa, foram importantes na identificação deste composto os picos dos íons $m/z = 283$ (2%), $m/z = 252$ (2%) e $m/z = 224$ (2%) (Figura 16). Como este composto foi isolado de uma alíquota acetilada do extrato EaSFHEac, muito provavelmente o produto natural deve ser o álcool octadecanol.

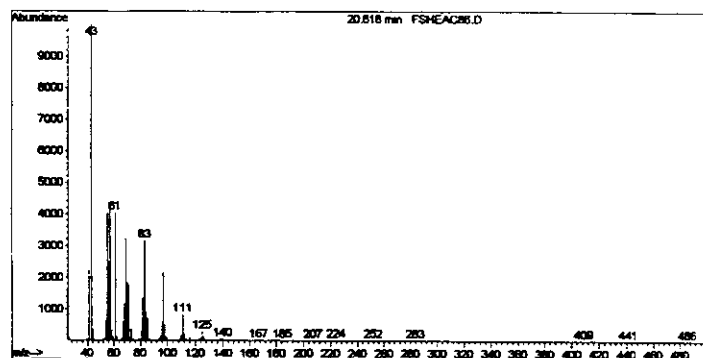
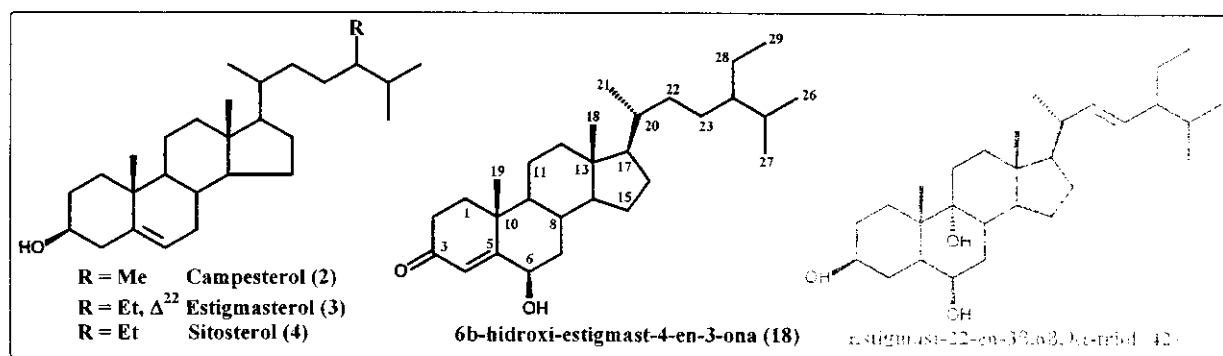


Figura 16: Espectro de massas do Acetato de Octadecila (47).

A ocorrência do ácido hexacosanóico (II, Figura 1, Introdução Geral) já foi relatada em *E. dulcis* Trin (Ref. 7, Introdução Geral), porém esta é a primeira vez que todos estes ésteres são descritos neste gênero. É interessante observar também que os ésteres mais frequentes, encontrados em diferentes frações, foram os Hexadecanoatos de metila (7), de etila (8) e de n-butila (13) e o Octadecanoato de n-butila (14).

I. 3. 3. 3. Esteróides



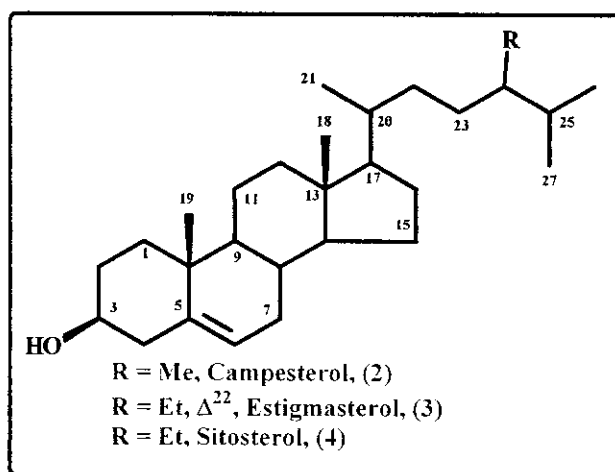
Estes compostos apresentaram como características comuns no espectro de RMN¹H as absorções típicas hidrogênios das metilas angulares CH₃-18 e C H₃-19 na forma de singletos e das metilas CH₃-21, CH₃-26 e C H₃-27 na forma de dubletos com constante de acoplamento de 5,8 a 7,0 Hz (Tabela 28).

Segundo a revisão apresentada na Introdução Geral, já foram isolados estigmasterol (III) e sitosterol (IV) *E. dulcis* (Ref. 7, Introdução Geral) e *E. coloradoensis* (Ref. 10, Introdução Geral) e 5 α -estigmastano-3,6-diona (VI) de *E. dulcis* (Ref. 7, Introdução Geral).

A seguir, serão descritas as particularidades estruturais dos cinco esteróides isolados.

Tabela 28: Dados de RMN¹H dos esteróides isolados – sinais característicos.

H	δ_H (multiplicidade, J = Hz)		
	Mistura 2, 3 e 4	18	42
18	0,69 (s)	0,75 (s)	0,69 (s)
19	1,02 (s)	1,38 (s)	1,19 (s)
21	0,93 (d, 6,6)	0,93 (d, 7,0)	0,92 (d, 6,4)
26	0,84 (d, 6,3)	0,85 (d, 7,0)	0,87 (d, 5,8)
27	0,82 (d, 6,6)	0,82 (d, 7,0)	0,82 (d, 7,0)

A) Campesterol (2), Estigmasterol (3) e β -Sitosterol (4)

A análise por CG/EM (Figura 17) da fração EaSFH 3.2 resultou em um cromatograma com pelo menos quatro substâncias, das quais três ($t_R = 34,68$, $t_R = 35,49$ e $t_R = 37,43$ min) foram identificadas pelos respectivos espectros de massas como campesterol (2), estigmasterol (3) e sitosterol (4) após comparação com dados das bibliotecas eletrônicas e da literatura²².

²² a) Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH. *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. Vol II. Steroids, terpenoids, sugar and miscellaneous classes*. Holden-Day, Inc. San Francisco, USA. p. 96, 1964; b) Brooks CJW, Middleditch BS. Some aspects of mass spectrometry in steroid analysis. In Heftmann E. *Modern Methods of Steroid Analysis*. Academic Press. New York, NY, USA. 1973.

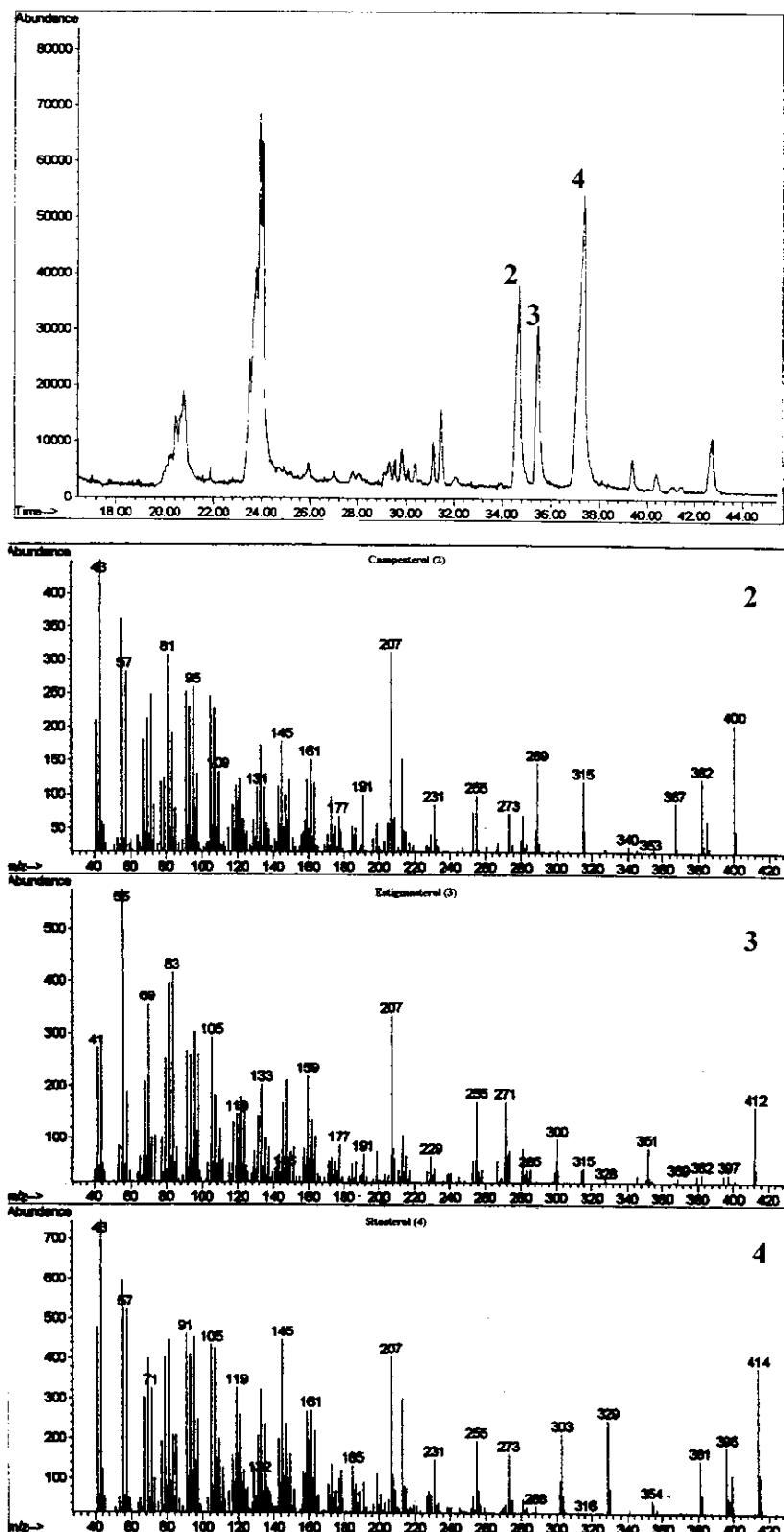


Figura 17: Cromatograma e espectros de massas (2, 3 e 4) da fração EaSFH 3.2.

Obs.: o íon $m/z = 207$ é impureza da coluna.

Já análise do espectro de RMN¹H (Tabela 4, pág. 35; Figura 18, anexo A) da fração EsASH 6.4 sugeriu a presença de uma mistura de substâncias de núcleo esteroidal. Além das absorções características, foram observadas absorções atribuídas ao hidrogênio carbinólico em CH-3 (δ_H 3,53, *m*) e ao hidrogênio olefínico em CH-6 (δ_H 5,36, *d*, *J* = 4,9 Hz); as absorções em δ_H 0,78 (*d*, *J* = 6,8 Hz) foram atribuídas aos hidrogênios da metila CH₃-28 do campesterol (**2**) enquanto aquelas em δ_H 5,02 (*dd*, *J* = 8,5 e 15,3 Hz) e δ_H 5,16 (*dd*, *J* = 8,5 e 15,3 Hz) foram atribuídas aos hidrogênios olefínicos (H-22 e H-23) em *trans* da cadeia lateral do estigmasterol (**3**).

Nos espectros de RMN¹³C e DEPT (Tabela 5, pág. 36, Figura 19, anexo A) destacaram-se os δ_C de CH-3 (δ_C 71,8), CH₀-5 (δ_C 140,7), CH-6 (δ_C 121,7) comuns aos três e CH-22 (δ_C 138,3) e CH-23 (δ_C 129,2) do estigmasterol (**3**) ao lado de CH₂-22 (δ_C 33,9) e CH₂-23 (δ_C 26,0) do campesterol (**2**) e do sitosterol (**4**).

Uma alíquota da fração EsASH 6.4 foi acetilada e analisada por CG/EM (Figura 20) resultando em um cromatograma com três picos interessantes (t_R = 22,68, t_R = 23,19 e t_R = 24,41 min), cujos respectivos espectros de massas permitiram identificar os acetatos de campesterol (**2ac**), estigmasterol (**3ac**) e sitosterol (**4ac**) após comparação com dados das bibliotecas eletrônicas e da literatura²².

Destes esteróides, campesterol (**2**) é relatado pela primeira vez no gênero.

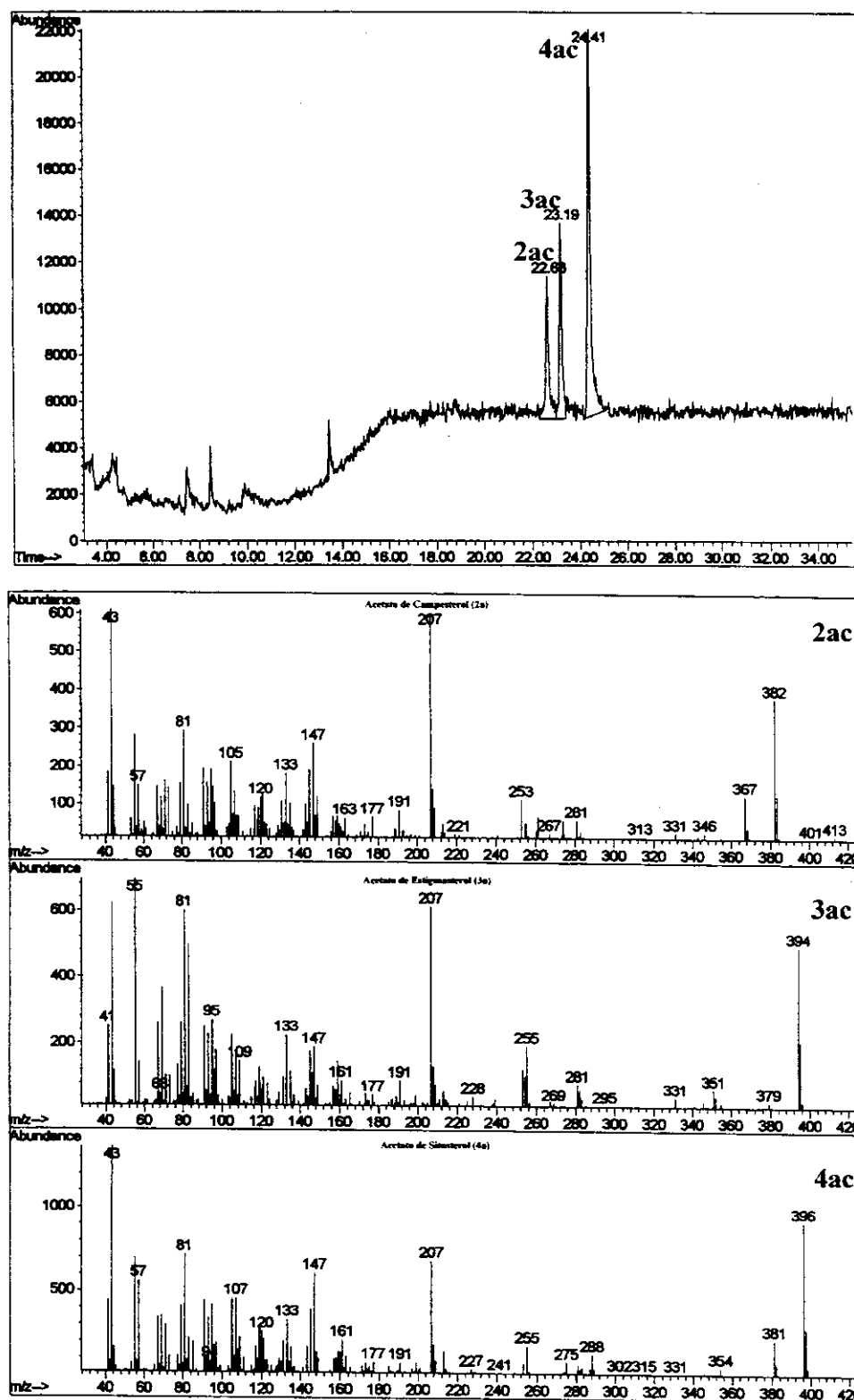
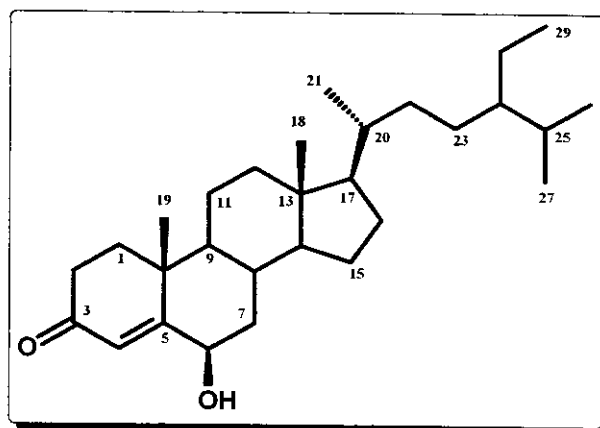


Figura 20: Cromatograma e espectros de massas (2ac, 3ac e 4ac) fração EsASH

6.4ac. Obs.: o íon $m/z = 207$ é impureza da coluna.

B) 6 β -hidroxi-estigmasta-4-eno-3-ona (18)

O esqueleto esteroidal foi evidenciado, na análise dos dados de RMN¹H (500MHz, CDCl₃; Tabela 8, pág. 41; Figura 21, anexo A) e ¹³C (125MHz, CDCl₃; Tabela 9, pág. 41; Figura 22, anexo A) da fração EsASH 6.2.3.2.2.1, pela presença das absorções características. Um tripleto em δ_H 0,88 (*d*, *J* = 7Hz, H-29) foi atribuído ao grupo metílico CH₃-29 indicando a presença de uma cadeia exocíclica como a do sitosterol (4). Outros sinais interessantes em δ_H 4,36 (*m*, CH-6) e em δ_H 5,83 (*s*, H-4) foram atribuídos respectivamente a um hidrogênio carbinólico e um hidrogênio metínico.

Já no espectro de RMN¹³C, além dos sinais esperados para os grupos metilas (δ_C 18,71, CH₃-21; δ_C 19,80, CH₃-26; δ_C 19,00, CH₃-27 e δ_C 11,95, CH₃-29), foram observadas absorções referentes a um carbono carbinólico (δ_C 73,24, CH-6), a dois carbonos em ligação dupla endocíclica (δ_C 126,29, CH-4 e δ_C 168,52, CH₀-5) e a um carbono carbonílico (δ_C 200,50, CH₀-3). Comparando-se esses dados com aqueles disponíveis para o sitosterol (4), foi possível observar que os grupos substituintes (carbonila, hidroxila e ligação dupla) encontravam-se nos anéis A e B (Figura 23).

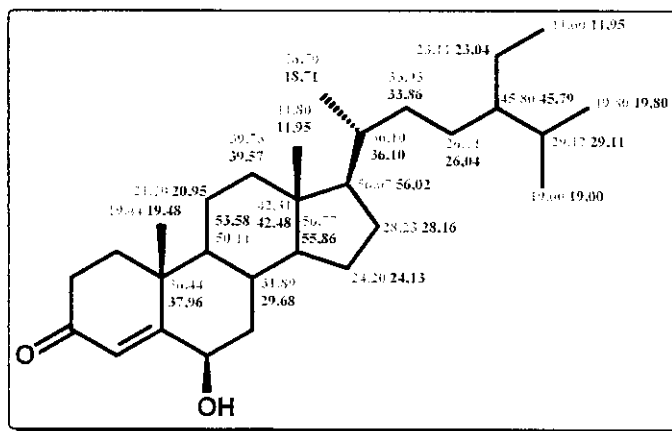
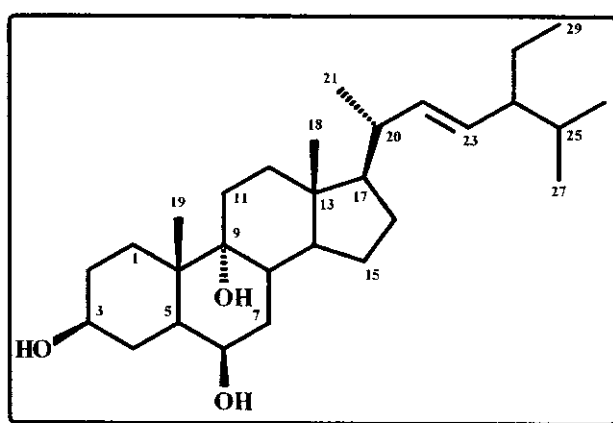


Figura 23: Comparação de δ_C entre sitosterol (4, rosa) e o composto 18 (azul).

Com base nestas observações e comparando-se os dados obtidos com aqueles disponíveis na literatura⁸ foi possível identificar a 6 β -hidroxi-estigmast-4-en-3-ona (18), que é relatada pela primeira vez no gênero *Eleocharis*.

C) Estigmasta-22-eno-3 β ,6 β ,9 α -triol (42)



A análise do espectro de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS, Tabela 19, pág. 64, Figura 24, anexo A) de EsSFH 13.1 permitiu concluir que se tratava de uma substância de núcleo esteroidal com uma ligação dupla em *trans* na cadeia

lateral, evidenciada pela presença dos sinais em δ_H 5,02 (*dd*, $J = 8,5$ e $15,1$ Hz, H-22) e δ_H 5,15 (*dd*, $J = 8,5$ e $15,1$ Hz, H-23). Um sinal em δ_H 4,12 (*m*) foi atribuído ao CH-3 carbinólico. Observou-se ainda no espectro de RMN¹³C e DEPT (125 MHz, CDCl₃/TMS, Tabela 20, pág. 64, Figura 25, anexo A) a presença de três carbonos carbinólicos em δ_C 67,61 (CH), δ_C 76,08 (C₀) e δ_C 76,06 (CH) e a ausência dos sinais em δ_C 140 (C₀) e δ_C 121 (CH) característicos da ligação dupla em Δ^5 .

Estes resultados indicaram que se tratava de um derivado do estigmasterol (**3**). A comparação dos dados de δ_C do composto **42** com aqueles de **3** evidenciou que os grupos hidroxilas estavam localizados sobre os anéis A e B (Figura 26).

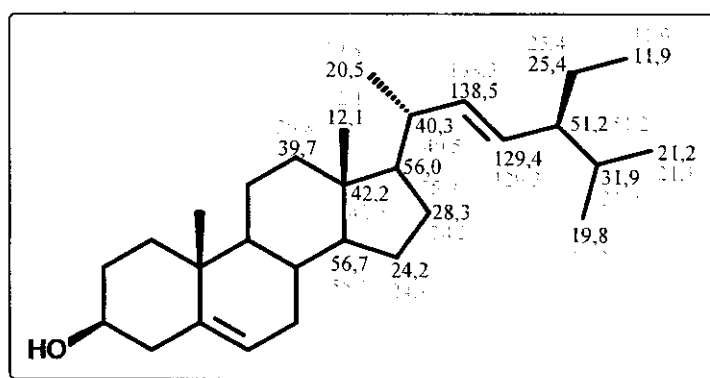


Figura 26: Comparação dos δ_C entre estigmasterol (**3**, preto) e o composto **42** (vermelho).

Buscando-se modelos na literatura, encontrou-se um derivado tipo colestanoltriol²³ (**XXII**) cujos valores dos δ_H e δ_C carbinólicos e metílicos foram coincidentes com aqueles observados nos espectros de **42** (figura 27).

²³ Su J, Peng T, Long K, Zeng L. 24-Sigma-methyl-5 α -cholestane-3 α ,6 β ,9 α ,25 tetrol 25-monoacetate, a novel polyhydroxylated steroid from the soft coral *Sarcophyton tortuosum*. *Steroids* **48** (3-4): 233-238, 1986.

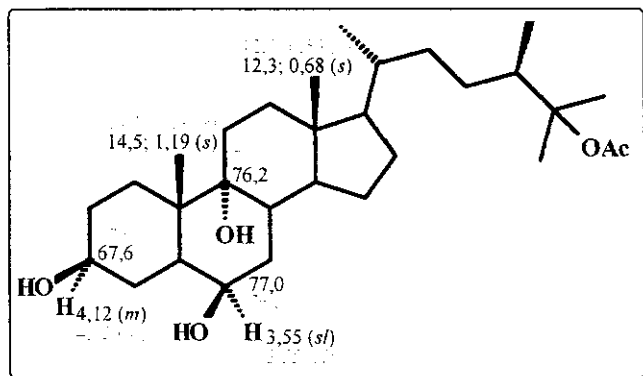
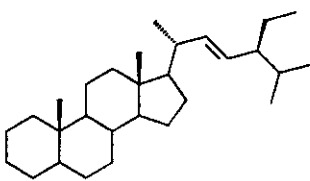


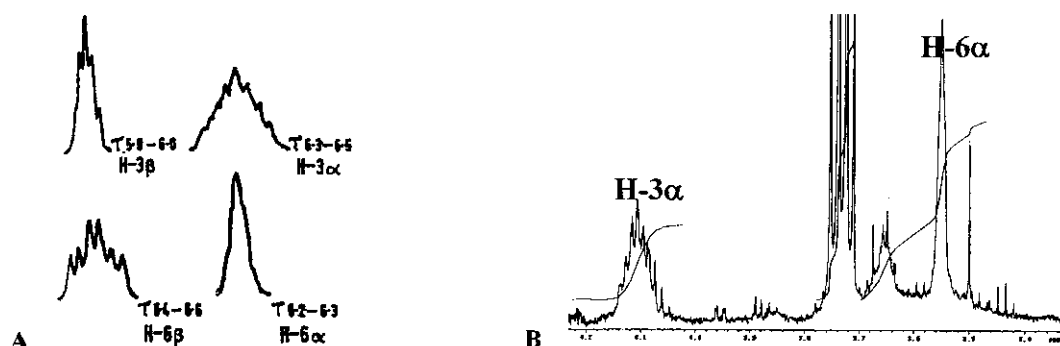
Figura 27: Comparação dos δ_H e δ_C entre os compostos **42** (preto) e **XXII** (vermelho).

Esta observação foi reforçada pelos cálculos de incrementos sobre o δ_H das metilas CH_3 -18 e CH_3 -19 propostos por Jones²⁴, tendo-se como composto base o estigmasta-22-eno⁵ (**XXIII**). Assim, os valores expressos na Tabela 29 foram obtidos e, aliados ao perfil esperado para os sinais dos hidrogênios carbinólicos (Figura 28), permitiram concluir também a posição relativa das hidroxilas como 3 β ,6 β ,9 α -triol. Os experimentos de gCOSY, HSQC e HMBC (Tabela 19, pág. 64; figuras 29 e 30, anexo A) corroboraram com a estrutura proposta.

²⁴ Bridgeman JE, Cherry PC, Clegg AS, Evans JM, Jones ERH, Kasal A, Kumar V, Meakins GD, Morisawa Y, Richards EE, Woodgate PD. Microbiological hydroxylation of steroids. Part I. Proton magnetic resonance spectra of ketones, alcohols, and acetates in the androstane, pregnane and estrane series. *J Chem Soc C*: 250-257, 1970.

Tabela 29: Valores de deslocamentos químicos calculados para estigmast-22-en-3,6,9-triol.

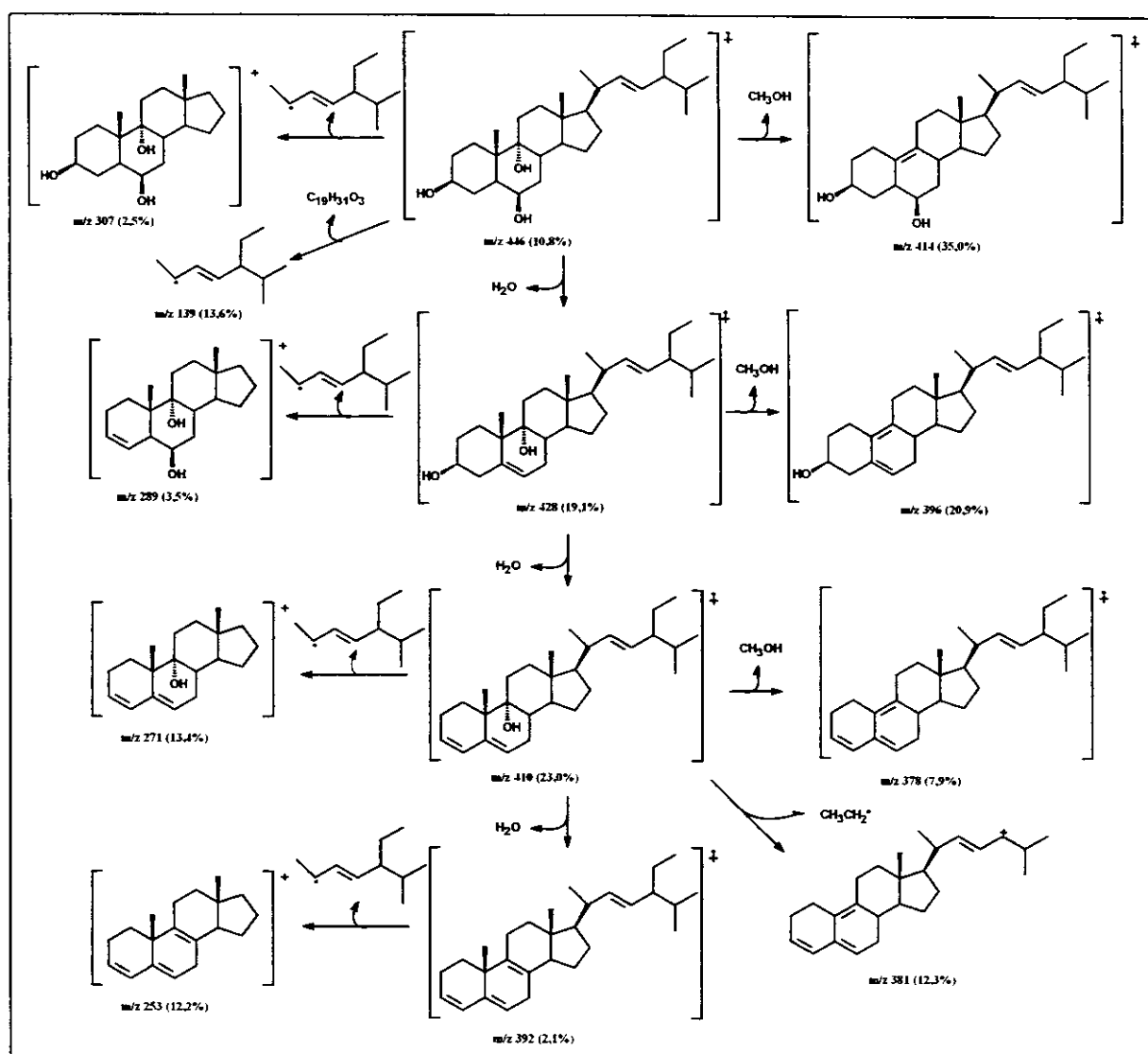
		τ H-19 (δ)	τ H-18 (δ)
Valor base ⁵			
		9,23 (0,78)	9,34 (0,66)
Incrementos ²⁴			
	3 α	0,00	-0,01
	6 α	+0,05	-0,02
	9 α	-0,13	-0,03
τ + incrementos		9,15 (0,85)	9,28 (0,72)
Incrementos			
	3 α	0,00	-0,01
	6 β	-0,23	-0,04
	9 α	-0,13	-0,03
τ + incrementos		8,87 (1,13)	9,26 (0,74)
Incrementos			
	3 β	-0,03	-0,01
	6 α	+0,05	-0,02
	9 α	-0,13	-0,03
τ + incrementos		9,12 (0,88)	9,28 (0,72)
Incrementos			
	3 β	-0,03	-0,01
	6 β	-0,23	-0,04
	9 α	-0,13	-0,03
τ + incrementos		8,84 (1,16)	9,26 (0,74)
Valor experimental		1,19	0,69

**Figura 28:** Perfil do sinal dos hidrogênios carbinólicos.A) Descritos por Jones e colaboradores²⁴; B) Observados experimentalmente para o composto 42.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 31, anexo A) mostrou o pico do íon molecular $M^{+}_{\text{observ}} = 446,3769$, correspondente à fórmula molecular $C_{29}H_{50}O_3$ ($M^{+}_{\text{calc}} = 446,3700$). O Quadro 2 apresenta a racionalização dos principais fragmentos iônicos observados no espectro de massas.

Com base em todas essas observações foi possível determinar a estrutura do composto **42** como sendo Estigmast-22-en-3 β ,6 β ,9 α -triol, até então inédito na literatura.

Quadro 2: Proposta de fragmentação para o novo esteróide (**42**).



I. 3. 3. 4. Terpenóides

I. 3. 3. 4. 1. Monoterpenóides

O composto diidroactinidiolídeo (**15**) foi identificado na fração EsASH 6.6 a partir da análise do cromatograma e da comparação do espectro de massas do pico com $t_R = 13,73$ min (Figura 32), com a biblioteca eletrônica NIST e com dados da literatura²⁵. Este é o segundo relato da ocorrência de diidroactinidiolídeo em *Eleocharis*; este composto já foi isolado de *E. coloradoensis* (Britt.) Gilly (refs. 10 e 11, Introdução Geral).

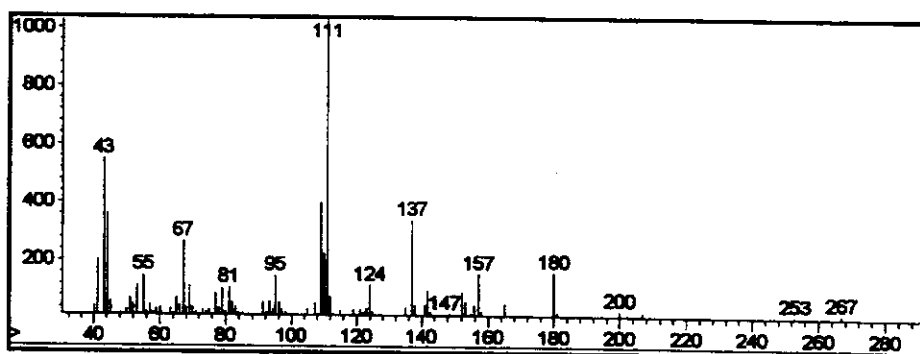


Figura 32: Espectro de massas do diidroactinidiolídeo (**15**).

I. 3. 3. 4. 2. Sesquiterpenos

A análise dos espectros de massas (Figura 33) da fração EsASH 6.2.3.2.2.2 e comparação dos mesmos com aqueles da biblioteca eletrônica NIST permitiu a identificação dos sesquiterpenos curcumeno (**19**), α -muuroleno (**20**) e γ -

²⁵ a) Chen PH, Kuhn WF, Williii F, Ikeda RM. High resolution mass spectrometric studies of some bicyclic g-lactones. *Org Mass Spectrom* 3: 199-209, 1970; b) Enzell CR, Wahlberg I. Mass spectra of degraded tobacco isoprenoids. *Mass Spectrom Rev* 5 (1): 39-72, 1986.

cadineno (21). Estes compostos são relatados pela primeira vez em espécies de *Eleocharis*.

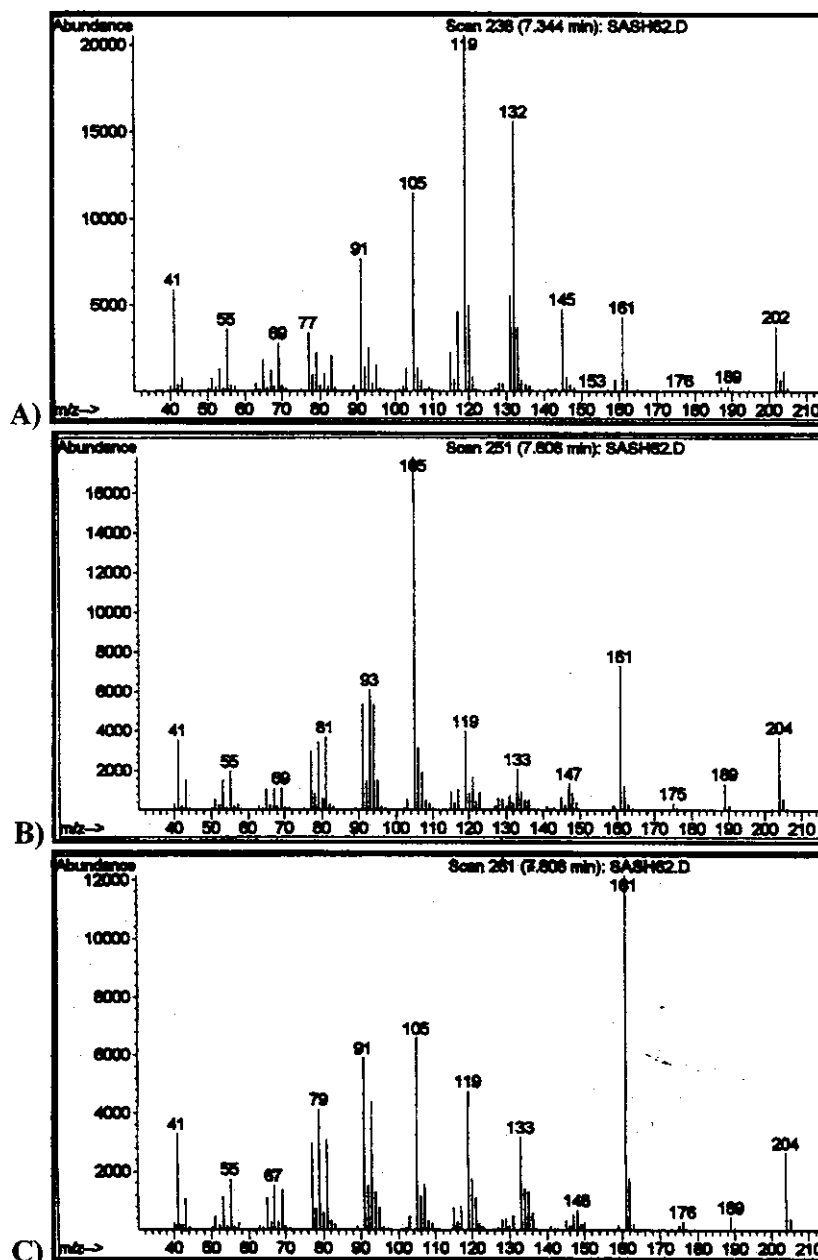


Figura 33: Espectros de massas de a) curcumenol (19), b) α -muurenol (20) e c) γ -cadinene (21).

I. 3. 3. 4. 3. Derivados de Fitol

A. Fitona (6)

O composto fitona (6) foi identificado nas frações EsASH 5.5, 6.6, 7.2, 7.6, 7.7.3, 7.10.3 e 7.11.4 pela análise de seu espectro de massas (Figura 34) e comparação deste com as bibliotecas eletrônicas Wiley e NIST e com dados da literatura^{25b}. Este composto é amplamente distribuído em espécies vegetais e é relatado pela primeira vez neste gênero.

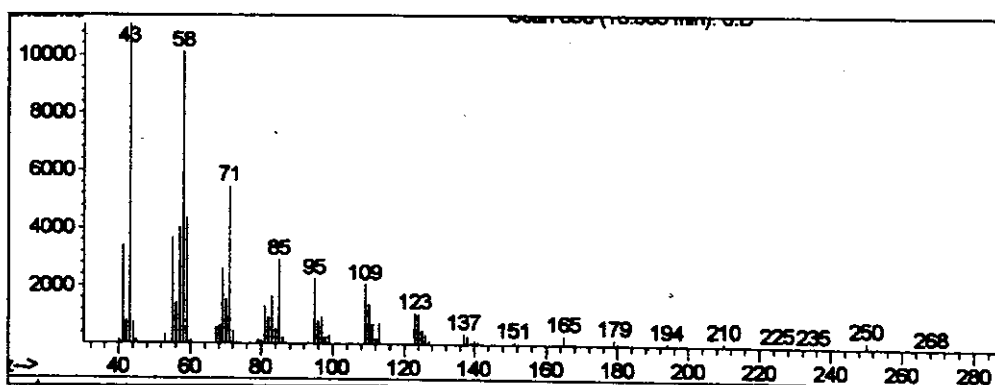


Figura 34: Espectro de massas da fitona (6).

B. Neofitadieno (16)

A análise do espectro de massas (Figura 35) correspondente ao pico com $t_R = 16,86\text{min}$ no cromatograma da fração EsASH 6.6 e comparação deste com dados da literatura²⁶ permitiu a identificação de neofitadieno (16).

²⁶ a) Hites RA. Phytadienes from the pyrolysis of pheophytin A. *J Org Chem* 39 (17): 2634-2635, 1974; b) Dev S, Misra R. *Handbook of terpenoids - Vol. I - Diterpenoides*. CRC Press Inc. Boca Raton, Florida, USA. Pag. 84; 89-90; 116, 1985.

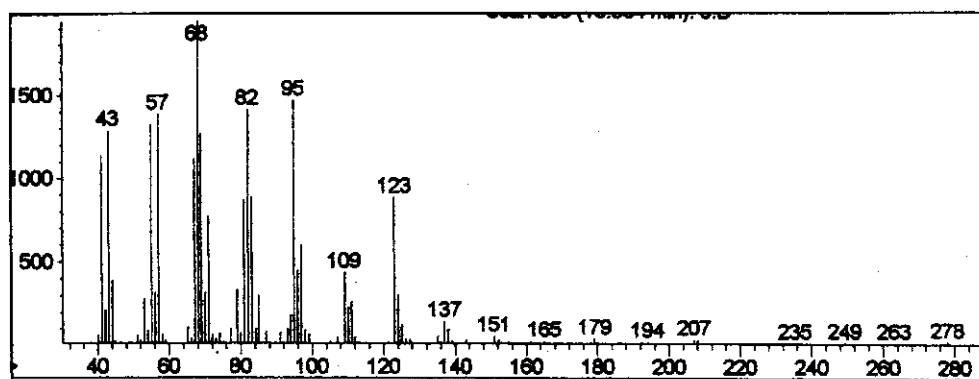
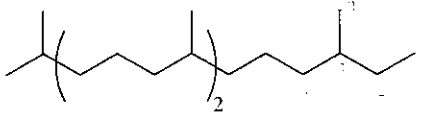


Figura 35: Espectro de massas do neofitadieno (16).

Segundo Hites^{26a}, a posição das duplas ligações altera a abundância relativa dos principais fragmentos iônicos conforme resumido na Tabela 30. Esta é a primeira descrição deste composto neste gênero.

Tabela 30: Abundância relativa dos principais fragmentos iônicos de fitadienos.

Composto	m/z (%)
	
1,3(3a)-fitadieno (Neofitadieno)	82 (73), 68 (100), 57 (86), 43 (80)
3(3a),4-fitadieno	68 (90), 57 (84), 43 (100), 41 (71)
1,3(<i>E</i>)-fitadieno	82 (100), 81 (71), 57 (77), 43 (78)
1,3(<i>Z</i>)-fitadieno	82 (96), 68 (90), 57 (89), 43 (100)
Composto 16	82 (73), 68 (100), 57 (71), 43 (67)

C. Hexadecanoato de *E*-Fitila (34)

A análise da fração EsASH 7.11.4 por CG/EM indicou que a mesma poderia ser formada por fitol (Figura 36, anexo A), porém o espectro de RMN¹H (Tabela 10, pág. 49; Figura 37, anexo A) apresentou o sinal relativo ao hidrogênio

H-1 (δ_H 4,59, *t*, $J = 7,0$ Hz) mais desprotegido do que aquele referente ao *E*-fitol (H-1; δ_H 4,14, *d*, $J = 6,9$ Hz) e ao *Z*-fitol (H-1; δ_H 4,48, *d*, $J = 6,4$ Hz) Também no espectro de RMN¹³C (Tabela 11, pág. 50; Figura 38, anexo A) observou-se que o carbono C-1 (δ_C 61,19) estava mais desprotegido do que aquele do *E*-fitol (C-1, δ_C 58,95 $\pm$ 0,5)^{10b, 13, 27}. Estas observações, aliadas à presença de um carbono carbonílico em δ_C 173,97, sugeriram que este composto poderia tratar-se de um éster de fitila.

A comparação dos dados de RMN¹³C deste composto com aqueles relatados para o acetato de fitila¹³ (XXIV) confirmou a presença de um derivado éster e que muito provavelmente tratava-se de um éster de um ácido graxo por causa do grande número de CH₂ presentes no espectro. Na busca de compostos com essas características, encontrou-se na literatura o Hexadecanoato de *E*-fitila¹⁰ (XXV), o Hexadecanoato de *Z*-fitila¹¹ (XXVI) e o Heptanoato de *E*-fitila¹² (XXVII) (Figura 39).

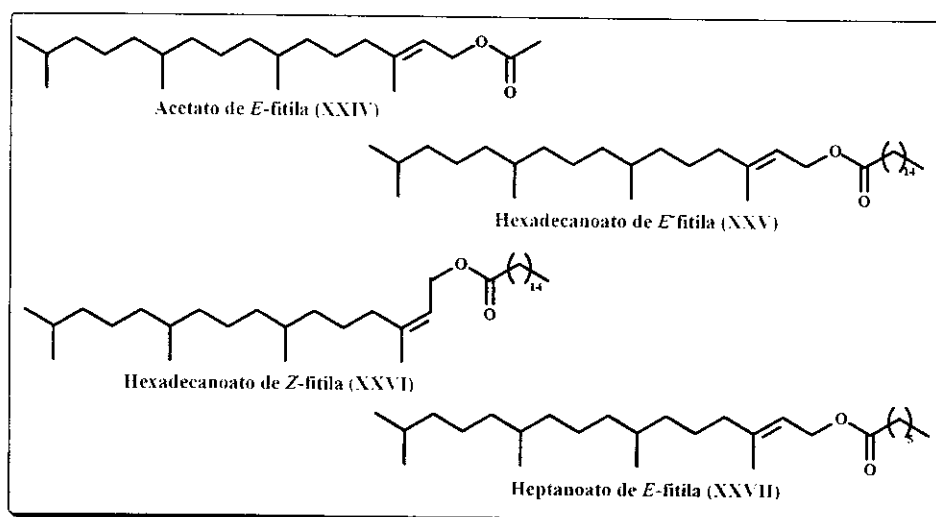


Figura 39: Ésteres de fitol utilizados como modelos.

²⁷ a) Sims JJ, Pettus Jr. JA. Isolation of free *cis* and *trans*-phytol from the red alga *Gracilaria anderdoniana*. *Phytochemistry* **15** (6): 1076-1077, 1976; b) Pongprayoon U, Baeckström P, Jacobsson U, Lindström M, Bohlin L. Antispasmodic activity of β -damascenone and *E*-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Med* **58** (1): 19-21, 1992.

A comparação dos dados obtidos com os da literatura permitiu concluir que o éster era formado pelo *E*-fitol (Figura 40), porém a grande similaridade entre os valores de deslocamento químico entre o Hexadecanoato de *E*-fitila e Heptanoato de *E*-fitila não permitiram concluir qual o ácido graxo envolvido.

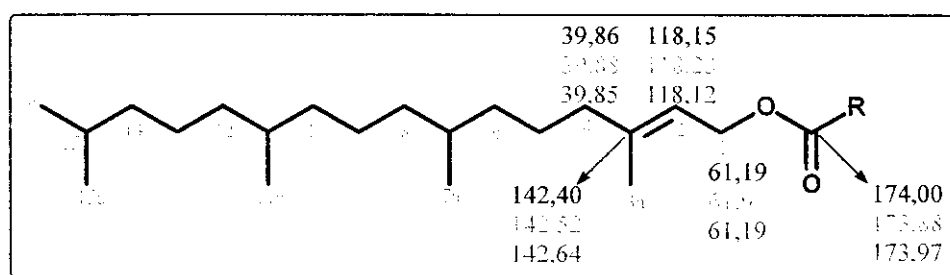
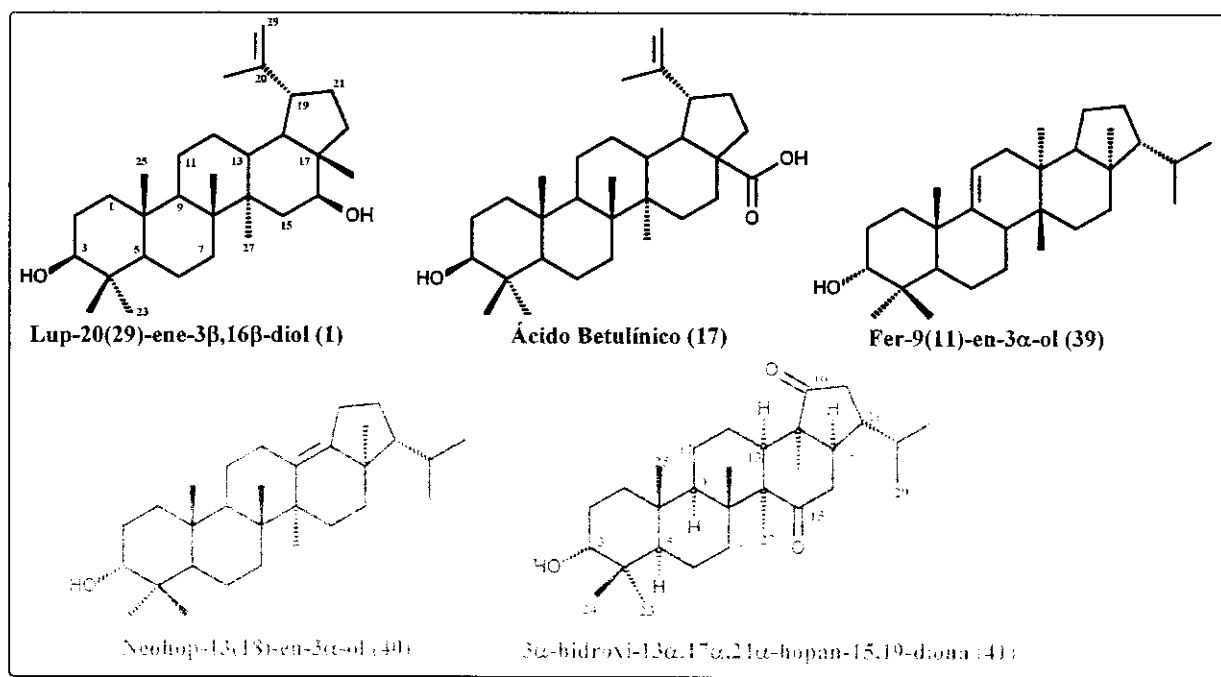


Figura 40: Comparação dos δ_C entre Hexadecanoato de *E*-fitila (XXV, preto), Hexadecanoato de *Z*-fitila (XXVI, vermelho) e composto 34 (azul).

Dessa forma, o espectro de massas obtido por inserção direta (Figura 41, anexo A) foi de grande importância, pois forneceu o pico do íon molecular ($M^+ = 534$), identificando-se então conclusivamente o Hexadecanoato de *E*-fitila (34). Este é o primeiro relato deste composto no gênero *Eleocharis*.

I. 3. 3. 4. 4. Triterpenos



Os derivados lupa-20(29)-eno (1 e 17) apresentaram, no espectro de RMN¹H, absorções para sete metilas (singletos) e para hidrogênios de uma dupla terminal (singletos largos), enquanto no espectro de RMN¹³C foram observados sinais para seis carbonos sp³ metílicos, um carbono sp² metilênico e um carbono sp² quaternário, caracterizando assim o esqueleto lupa-20(29)-eno²⁸ (Tabela 31).

Já os derivados hopano (39, 40 e 41) apresentaram nos espectros de RMN¹H e ¹³C, absorções para oito metilas, sendo que no espectro de RMN¹H duas apareciam na forma de dubleto ($J \approx 6,0$ Hz), característico para o grupo isopropila, enquanto as demais se apresentavam como singletos (Tabela 32).

²⁸ Olea RSG, Roque NF. Análise de misturas de triterpenos por RMN¹³C. *Quim Nova* 13 (4): 278-281, 1990.

Tabela 31: Valores de δ_H e δ_C característicos do esqueleto lupa-20(29)-eno.

Posição	1		17	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
20	-	149,97 (C ₀)	-	150,41 (C ₀)
23	0,98 (s)	27,96 (CH ₃)	0,94 (s)	27,96 (CH ₃)
24	0,77 (s)	15,34 (CH ₃)	0,76 (s)	15,32 (CH ₃)
25	0,84 (s)	16,17 (CH ₃)	0,83 (s)	16,10 (CH ₃)
26	1,00 (s)	16,12 (CH ₃)	0,97 (s)	16,00 (CH ₃)
27	1,04 (s)	15,98 (CH ₃)	0,98 (s)	14,68 (CH ₃)
28	0,80 (s)	11,65 (CH ₃)	-	179,82 (C ₀)
29	4,61 (sl), 4,72 (sl)	109,79 (CH ₂)	4,61 (sl), 4,75 (sl)	109,68 (CH ₂)
30	1,69 (s)	19,31 (CH ₃)	1,70 (s)	19,35 (CH ₃)

Tabela 32: Valores de δ_H e δ_C característicos do esqueleto hopano.

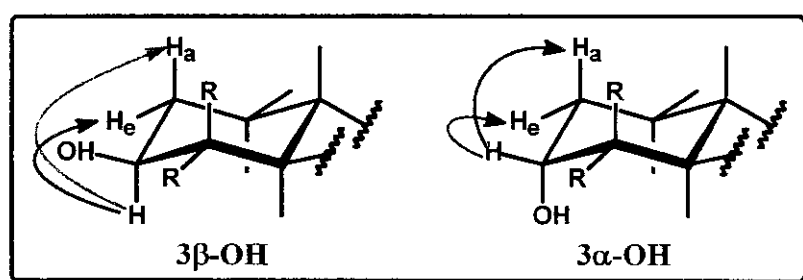
	39		40		41	
	δ_H (mult., J)	δ_C	δ_H (mult., J)	δ_C	δ_H (mult., J)	δ_C
CH ₃ -23	0,95 (s)	27,55	0,97 (s)	28,16	0,97 (s)	28,16
CH ₃ -24	0,93 (s)	22,13	0,83 (s)	22,13	0,85 (s)	21,98
CH ₃ -25	1,09 (s)	24,96	0,85 (s)	16,55	0,89 (s)	16,31
CH ₃ -26	0,75 (s)	15,37	0,87 (s)	18,60	0,85 (s)	16,81
CH ₃ -27	0,83 (s)	15,94	1,11 (s)	26,77	1,15 (s)	18,07
CH ₃ -28	0,77 (s)	13,95	0,80 (s)	17,83	0,94 (s)	16,94
CH ₃ -29	0,90 (d, 6,4)	22,12	0,94 (d, 6,7)	22,86	0,86 (d, 7,0)	20,28
CH ₃ -30	0,84 (d, 6,4)	22,98	0,90 (d, 6,7)	23,07	1,00 (d, 7,0)	22,39

Uma característica comum a todos estes compostos foi a presença de um grupo hidroxila no carbono CH-3 (Tabela 33).

A posição relativa deste grupo, se α ou β , pode facilmente ser verificada através da análise dos dados de RMN; assim, o hidrogênio CH-3 em posição α apresenta-se como um duplo dubleto devido às constantes de acoplamento J_{ax-ax} ($\sim 10\text{Hz}$) e J_{ax-eq} ($\sim 6\text{Hz}$) enquanto o sinal do CH-3 β aparece como um singlete largo devido a sobreposição das constantes de acoplamento axial-equatorial e equatorial-equatorial (Figura 42).

Tabela 33: Valores de δ_H e δ_C característicos da substituição OH-CH-3.

Posição	Composto	δ_H	δ_C
H-3 α	1	3,19 (<i>dd</i> , $J = 10,6$ e $5,1$ Hz)	78,34
	17	3,20 (<i>dd</i> , $J = 10,8$ e $5,0$ Hz)	78,99
H-3 β	39	3,43 (<i>sl</i>)	76,14
	40	3,40 (<i>sl</i>)	76,19
	41	3,44 (<i>sl</i>)	75,89

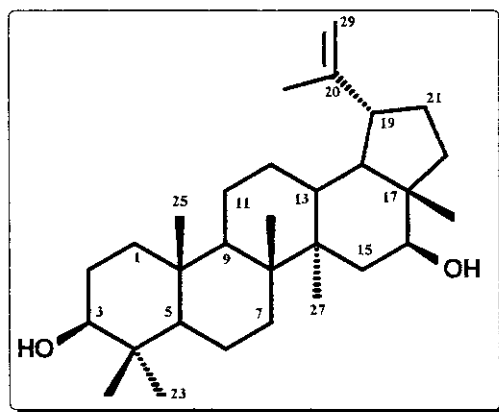
**Figura 42:** Acoplamentos entre H-3 e H-2 em 3 α - e 3 β -OH-4-R,R-ciclohexanos.

Em vermelho: acoplamento axial-axial; em azul: acoplamento axial-equatorial; em verde: equatorial-equatorial.

Outra observação importante diz respeito ao deslocamento químico. Quando o grupo hidroxila ocupa a posição β , o hidrogênio H-3 ($\delta_H \sim 3,2$) apresenta-se mais protegido e o carbono C-3 mais desprotegido ($\delta_C \sim 78,0$) do que quando o grupo hidroxila ocupa a posição α ($\delta_H \sim 3,4$ e $\delta_C \sim 76,0$)²⁸.

Conforme o levantamento bibliográfico apresentado na Introdução Geral, betulina (V) já foi isolado de *E. dulcis* (Ref. 7, Introdução Geral).

A seguir, encontram-se descritas as particularidades dos cinco triterpenos isolados.

A. Lupa-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol (1)

A análise dos espectro de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃; Tabela 2, pág. 27; Figura 43, anexo A) e de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃; Tabela 3, pág. 28; Figura 44, anexo A) da fração EaFSH 1.3.3 revelou a presença dos sinais característicos do esqueleto lupa-20(29)-eno, e dos sinais típicos para um grupo hidroxila, em posição equatorial (β), em CH-3.

Restava atribuir a posição do segundo grupo hidroxila evidenciado pelos sinais δ_H 3,61 (*dd*, $J = 11$ e 4,6 Hz) e em δ_C 77,08. Verificou-se uma grande semelhança entre os δ_H e δ_C dos anéis A, B e C do composto **1** e aqueles do lupeol (XXVIII, Figura 45), sugerindo que o segundo grupo hidroxila estaria localizado nos anéis D ou E.

Através da comparação de dados disponíveis na literatura^{4, 29}, foi possível então determinar a estrutura do lupa-20(29)-eno-3 β ,16 β -diol (**1**). Este composto esta sendo relatado pela primeira vez no gênero *Eleocharis*.

²⁹ a) Sholichin M, Yamasaki K, Kasai R, Tanaka O. ¹³C Nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes, lupeol, betulin and betulinic acid. *Chem Pharm Bull* **28** (3): 1006-8, 1980. b) Tanaka R, Masuda K, Matsunaga S. Lup-20(29)-en-3 β ,15 α -diol and ocotillol-II from the stem bark of *Phyllanthus flexuosus*. *Phytochemistry* **32** (2): 472-4, 1993; c) Mustafa G, Anis E, Ahmed S, Anis I, Ahmed H, Malik A, Shahzad-UI-Hassan S, Choudhary MI. Lupene-type triterpenes from *Periploca aphylla*. *J Nat Prod* **63** (6): 881-3, 2000.

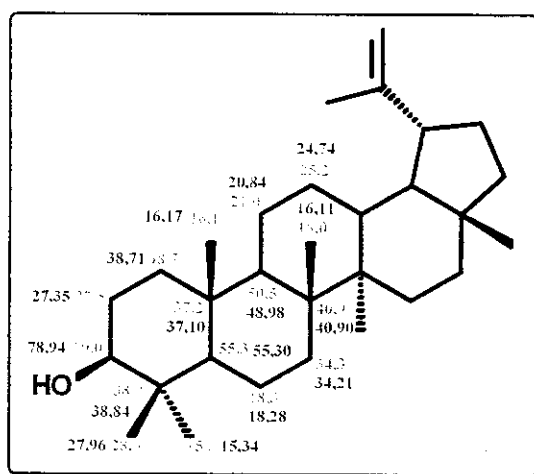
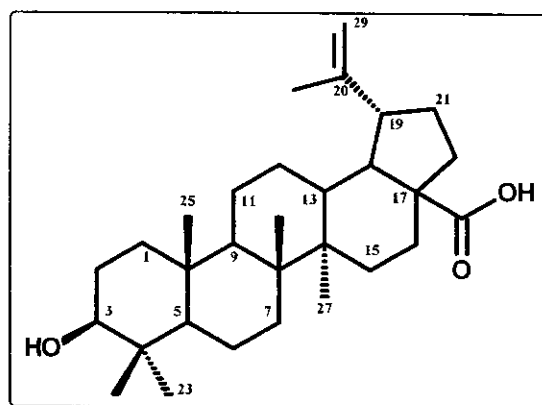


Figura 45: Comparação dos δ_C entre os compostos **1** (azul) e lupeol (**XXVIII**, vermelho).

B. Ácido Betulínico (17)

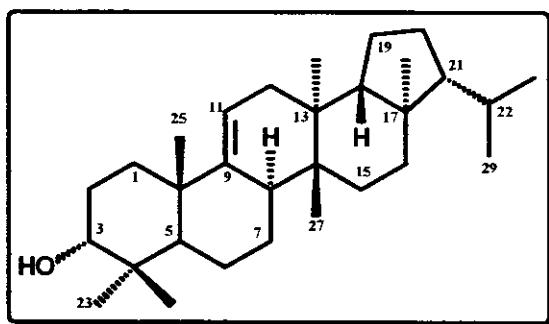


A análise dos espectros de RMN¹H (300 MHz, CDCl₃/TMS, tabela 6, pág. 39; Figura 46, anexo A), de RMN¹³C e DEPT (75 MHz, CDCl₃/TMS, tabela 7, pág. 40; Figura 47, anexo A) da fração EsASH 6.2.3.2.2.1.1 revelou a presença de triterpeno pentacíclico do tipo 3 β -lupeol. Observou-se ainda um sinal em δ_C 179,82

(C-28) atribuído a uma carbonila de um ácido carboxílico e a presença de apenas seis metilas.

Estes dados, quando comparados com aqueles presentes na literatura^{4, 7, 30}, permitiram identificar o Ácido betulínico (17), um triterpeno pentacíclico conhecido por suas atividades de inibição de DNA β -polimerase³¹, atividade alelopática³², anti-HIV³³ e antitumoral³⁴ entre outras. É isolado pela primeira vez em *Eleocharis*.

C. Fern-9(11)-eno-3 α -ol (39)



A análise dos dados de RMN¹H (CDCl₃/TMS, 500 MHz; Tabela 13, pág. 55; Figura 48, anexo A) da fração EsSFH G1.7.4 indicou a presença de oito

³⁰ Sholichin M, Yamasaki K, Kasai R, Tanaka O. ¹³C nuclear magnetic resonance of lupane-type triterpenes lupeol, betulin and betulinic acid. *Chem Pharm Bull* 28 (3): 1006-1008, 1980.

³¹ Ma J, Starck SR, Hecht SM. DNA polymerase beta inhibitors from *Tetracera boiviniana*. *J Nat Prod* 62 (12): 1660-1663, 1999.

³² a) Macias FA, Simonet AT, Steban MD. Potential allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of *Melilotus messanensis*. *Phytochemistry* 36 (6): 1369-1379, 1994. b) Macias FA, Simonet AM, Galindo JCG. "Natural products as allelochemicals". 5. Bioactive steroids and triterpenes from *Melilotus messanensis* and their allelopathic potential. *J Chem Ecol* 23 (7): 1781-1803, 1997.

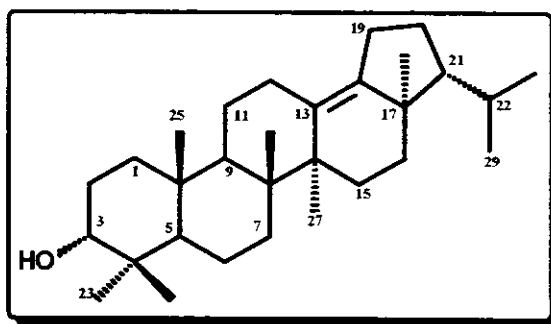
³³ a) Kashiwada Y, Hashimoto F, Cosentino LM, Chen C-H, Garret PE, Lee KH. Betulinic acid and dihydrobetulinic acid derivatives as potent anti-HIV agents. *J Med Chem* 39 (5): 1016-1017, 1996; b) Lee KH, Morris-Natschke SL. Recent advances in the discovery and development of plant-derived natural products and their analogs as anti-HIV agents. *Pure Appl Chem* 71 (6): 1045-1051, 1999.

³⁴ a) Yasukawa K, Takido M, Matsumoto T, Takeuchi M, Nakagawa S. Sterol and triterpene derivatives from plants inhibit the effects of a tumor promoter, and sitosterol and betulinic acid inhibit tumor formation in mouse skin two-stage carcinogenesis. *Oncology* 48 (1): 72-76, 1991; b) Fulda S, Jeremias I, Pietsch T, Debatin KM. Betulinic acid: a new chemotherapeutic agent in the treatment of neuroectodermal tumors. *Klin Padiatr* 211 (4): 319-322, 1999.

grupos CH₃, sendo seis na forma de singletos e dois na forma de dubletos além de dois singletos largos atribuídos a um hidrogênio carbinólico em CH-3 e um hidrogênio olefínico (δ_H 5,33, *sl*, H-11). Por outro lado, o espectro de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃; Tabela 14, pág. 55; Figura 49, anexo A) apresentou sinais em δ_C 115,84 (CH-11) e em δ_C 151,29 (CH₀-9) que, segundo a literatura ^{4, 28, 35}, são característicos do esqueleto D:C-friedo-B':A'-neogamacer-9(11)-eno (fern-9(11)-eno).

Comparações entre esses dados e aqueles disponíveis na literatura ¹⁴ permitiram identificar o Fern-9(11)-eno-3 α -ol (**39**). Esta é a primeira vez que este composto, bem como esta classe de triterpenos, é relatado para o gênero *Eleocharis*.

D. Neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (**40**)



No espectro de RMN¹H (CDCl₃/TMS, Tabela 15, pág. 57; Figura 50, anexo A) e no espectro de RMN¹³C (CDCl₃, Tabela 16, pág. 57; Figura 51, anexo A) observou-se sinais que sugeriram um esqueleto hopano hidroxilado em C-3. Já

³⁵ a) Wilkins AL, Bird PW, Jager PM. Carbon-13 NMR study of some triterpene hydrocarbons of the hopane group. *Magn Reson Chem* **25** (6): 503-7, 1987; b) Ageta H, Shiojima K, Suzuki H, Kiyotani T. NMR spectra of triterpenoids. II. Hopenes and migrated hopenes. *Chem Pharm Bul* **42** (1): 39-44, 1994.

os sinais em δ_C 141,16 (CH_0) e δ_C 131,55 (CH_0) puderam ser atribuídos com base na literatura ^{4, 28, 35} a uma ligação dupla entre os carbonos C-13 e C-18 de um esqueleto neohopano. A fórmula molecular de $C_{30}H_{50}O$ ($M^{+}_{\text{observado}} = 426.3862$; $M^{+}_{\text{calculado}} = 426.3862$) foi deduzida por espectrometria de massas de alta resolução (Figura 52, anexo A).

Após uma ampla revisão na literatura, verificou-se que não havia nenhum exemplo de um neohop-13(18)-eno-3 α -ol, embora dois diastereoisômeros, ambos 3 β -OH, os compostos Boehmerol (XXIX)³⁶ e Neohop-13(18)-eno-3 β -ol (XXX)³⁷ tenham sido encontrados (Figura 53).

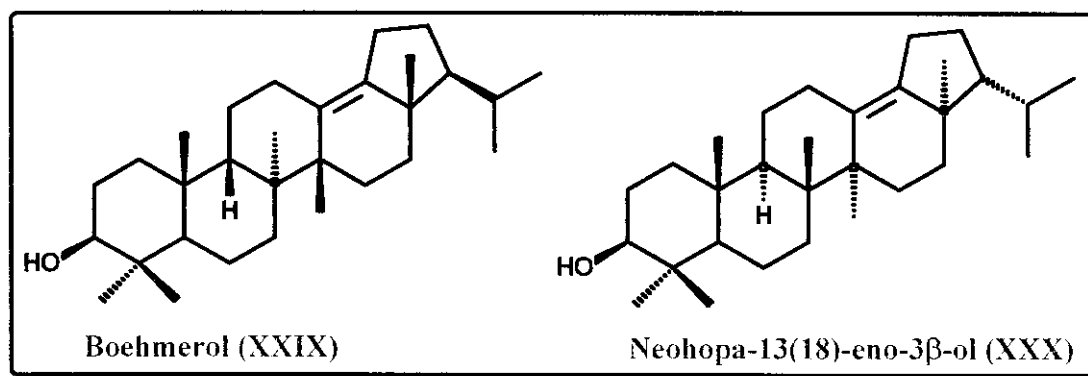


Figura 53: Diastereoisômeros de Neohop-13(18)-en-3 β -ol descritos na literatura.

A comparação entre os dados de RMN¹³C (Tabela 34) dos compostos 40, XXIX e XXX permitiu observar que os compostos 40 e XXX têm a mesma configuração relativa dos grupos metílicos, como evidenciado pelos δ_C de CH_2 -15, CH_2 -16, CH_2 -19, CH_2 -20, CH_3 -25, CH_3 -26 e CH_3 -28.

³⁶ Oyarzún ML, Garbarino JA, Gambaro V, Guilhem J, Pascard C. Two triterpenoids from *Boehmeria excelsa*. *Phytochemistry* 26 (1): 221-3, 1987.

³⁷ Chakravarty AK, Masuda K, Suzuki H, Ageta H. Unambiguous assignment of ¹³C chemical shifts of some hopane and migrated hopane derivatives by 2D NMR. *Tetrahedron* 50 (9): 2865-76, 1994.

Tabela 34: Comparação dos δ_C entre os compostos neohop-13(18)-en-3 α -ol (**40**), boehmerol (**XXIX**) e neohop-13(18)-en-3 β -ol (**XXX**).

	40 ^a	XXIX ^b	XXX ^c		40 ^a	XXIX ^b	XXX ^c
CH₂-1	33.62	33.4	39.02	CH₂-16	37.91	35.0	37.90
CH₂-2	29.35	29.3	27.44	CH₀-17	42.65	42.7	42.67
CH-3	76.19	79.3	78.98	CH₀-18	141.16	142.0	141.83
CH₀-4	37.56	39.2	38.87	CH₂-19	26.46	27.5	26.50
CH-5	49.29	46.5	55.65	CH₂-20	27.54	27.6	27.57
CH₂-6	18.47	22.7	18.52	CH-21	59.16	59.2	59.17
CH₂-7	34.33	30.5	34.53	CH-22	29.79	29.8	29.88
CH₀-8	41.43	41.5	41.37	CH₃-23	28.16	29.1	27.97
CH-9	51.98	48.2	52.18	CH₃-24	22.13	16.1	15.41
CH₀-10	37.56	37.2	37.46	CH₃-25	16.55	18.0	16.76
CH₂-11	21.49	19.0	21.67	CH₃-26	18.60	23.0	18.62
CH₂-12	26.63	26.4	26.65	CH₃-27	26.77	26.7	26.65
CH₀-13	131.55	130.8	131.46	CH₃-28	17.83	25.7	17.85
CH₀-14	42.34	42.6	42.16	CH₃-29	22.86	23.0	22.88
CH₂-15	29.26	26.5	29.35	CH₃-30	23.07	23.0	23.08

a) CDCl₃, 125 MHz; b) Ref.36; c) Ref.37.

Esta configuração relativa é compatível com o isolamento do compostos Fern-9(11)-eno-3 α -ol (**39**), uma vez que ambos compostos **39** e **40** podem ser originados a partir de um mesmo precursor biogenético³⁸ (Figura 54).

Todos os sinais de RMN¹H e ¹³C foram confirmados através de experimentos bidimensionais de HSQC e HMBC (Tabela 15, pág. 57; Figura 55, anexo A).

Analisando-se o espectro de massas, foi possível racionalizar os fragmentos iônicos característicos para esta classe de compostos³⁹ em $m/z = 411$ (21.5%, **40a**), $m/z = 383$ (4.2%, **40b**), $m/z = 218$ (91.8%, **40c**), $m/z = 207$ (54.3%, **40d**), $m/z = 205$ (80.0%, **40e**) e $m/z = 190$ (100%, **40f**) (quadro 3).

³⁸ Ohmoto T, Ikuse M, Natori S. Triterpenoids of the Gramineae. *Phytochemistry* **9**: 2137-48, 1970.

³⁹ Budzikiewicz H, Wilson JM, Djerassi C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII. Pentacyclic triterpenes. *J Am Chem Soc* **85** (22): 3688-3699, 1963.

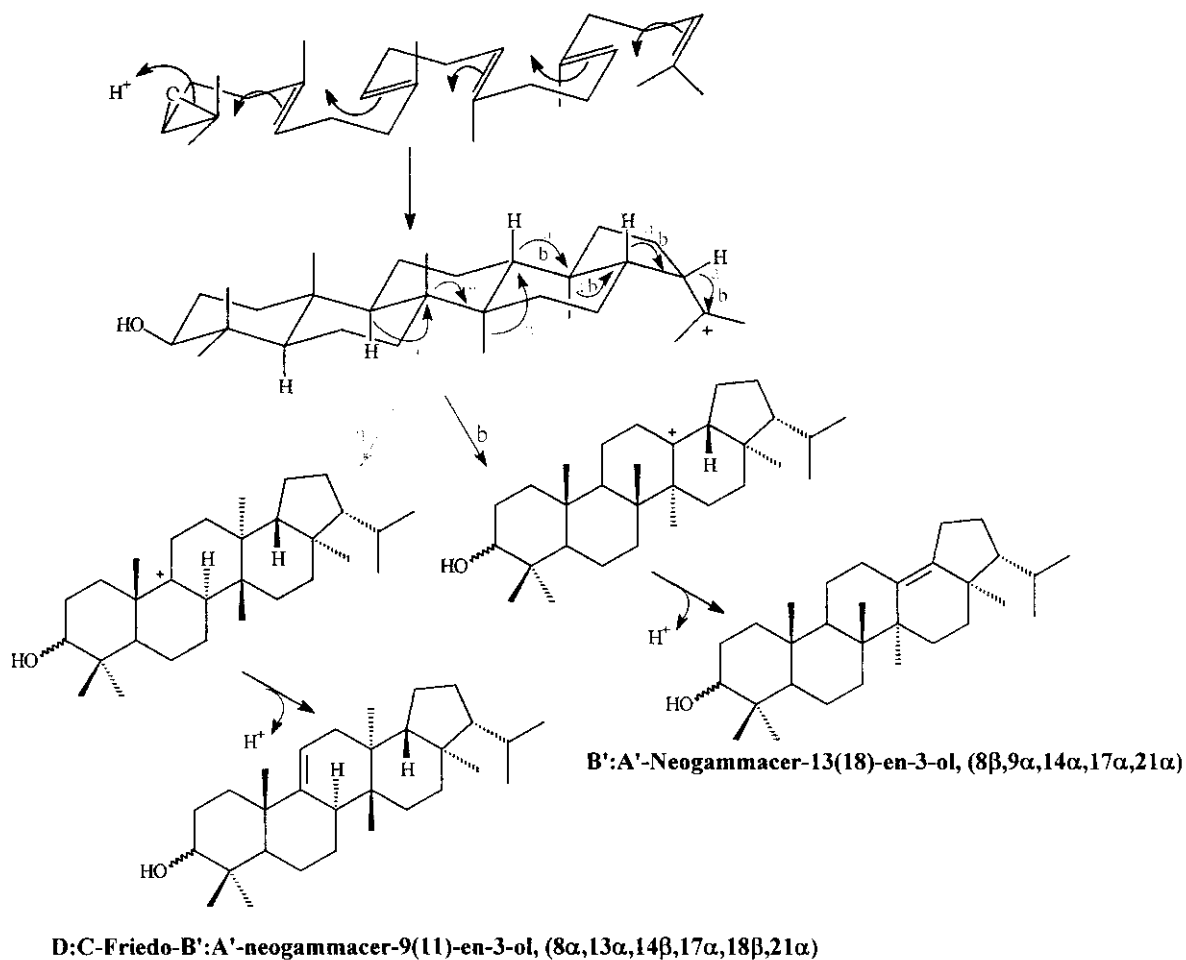
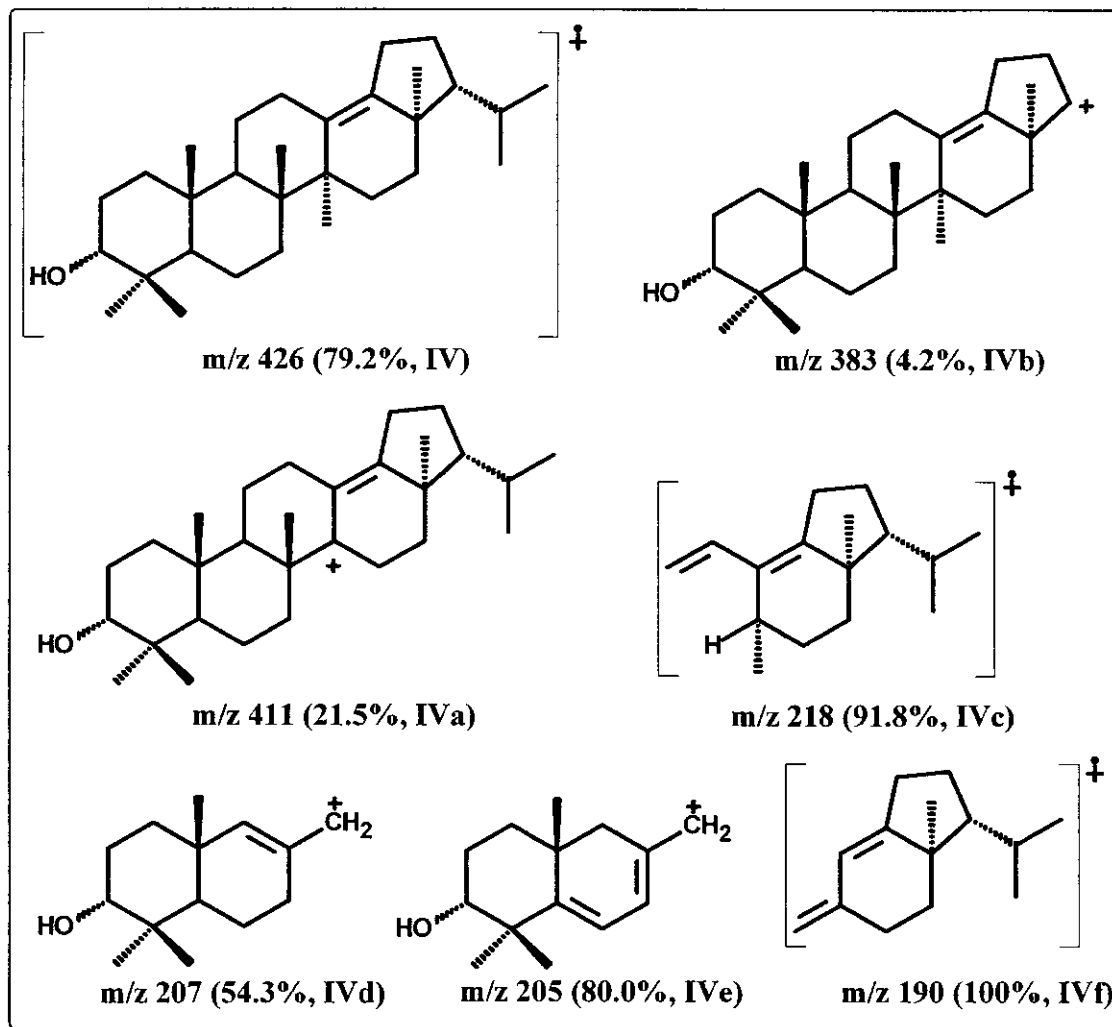
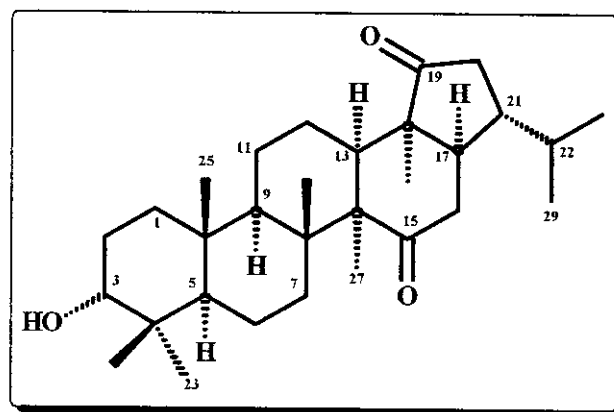


Figura 54: Caminho biogenético para a formação dos esqueletos dos compostos **39** (D:C-friedo-B':A'-neogammacer-9(11)-en-3-ol) e **40** (B':A'-neogammacer-13(18)-en-3-ol).

Quadro 3: Proposta de fragmentação do Neohop-13(18)-en-3 α -ol (**40**)

Este composto é relatado pela primeira vez como produto natural. Após ampla pesquisa bibliográfica no *Chemical Abstracts* e *Web of Science*, encontrou-se que o composto **40** já fora obtido como derivado sintético duas vezes⁴⁰ na década de 70, porém nenhum dado espectral foi relatado nessas ocasiões.

⁴⁰ a) Achari B, Pal A, Pakrashi SC. Studies on Indian medicinal plants. Part XXXVI: New D:E-cis neohopane derivatives from *Alangium lamarckii*. *Tetrahedron Lett* **48**: 4275-4278, 1975; b) Khastgir HN, Pradhan BP. Acid catalyzed isomerization of 3-epi-moretenyl acetate. *J Indian Chem Soc* **54** (9): 922, 1977.

E. 3 α -hidroxi-13 α ,17 α ,21 α -hopano-15,19-diona (41)

A análise dos dados de RMN¹H (500 MHz, CDCl₃/TMS, tabela 17, pág. 61; Figura 56; anexo A) e de RMN¹³C (125 MHz, CDCl₃/TMS, tabela 18, pág. 61; Figura 57; anexo A) da fração EsSFH 3.3.2 e comparação com dados da literatura^{35a, 41} indicaram a presença de um esqueleto 3 α -hidroxi-hopano. Outra evidência a favor desta observação foram os picos em m/z 207 (16,0%) e m/z 189 (100%) observados no espectro de massas e descritos na literatura³⁹ como característicos para a fragmentação de triterpenos pentacíclicos hidroxilados em C-3.

Outro indicativo da posição equatorial do hidrogênio H-3 foi obtido através do experimento de diferença de nOe, NOESY 1D (Figura 58a, anexo A). Quando se irradiou o sinal em δ_H 3,44, observou-se incrementos em ambas as metilas CH₃-23 (δ_H 0,97, 1,67%) e CH₃-24 (δ_H 0,85, 2,50%) e sobre os hidrogênios H-2 (δ_H 1,98, *tl*, *J* = 12Hz, 2,31%, H-2_{ax}; δ_H 1,60, *dl*, *J* = 12Hz, 2,91%, H-2_{eq}), o que só seria possível se o hidrogênio H-3 estivesse em posição equatorial e portanto praticamente equidistante dos hidrogênios vizinhos.

⁴¹ Mahato SB, Kundu AP. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry* 37 (6): 1517-1575, 1994.

Foi interessante observar no espectro de RMN¹³C a ausência de sinais entre δ_C 100 e δ_C 150, indicando a inexistência de ligações dupla C-C. No gráfico de contorno do experimento HMBC (Figura 59b, anexo A), as metilas CH₃-27 e CH₃-28 apresentaram correlação a três ligações com os carbonos carbonílicos em δ_C 215,20 e δ_C 224,09, respectivamente, o que aliado ao fato de no espectro de RMN¹³C constarem todos os sinais referentes os carbonos dos anéis A e B com um grupo 3 α -OH (Figura 60)⁴², sugeriu que as duas carbonilas encontravam-se sobre os carbonos C-15 e C-19 (Figura 61). Isto foi confirmado pelas correlações observadas nos experimentos de RMN-2D (HSQC e HMBC, figuras 59a e 59b, anexo A) para os anéis C, D e E.

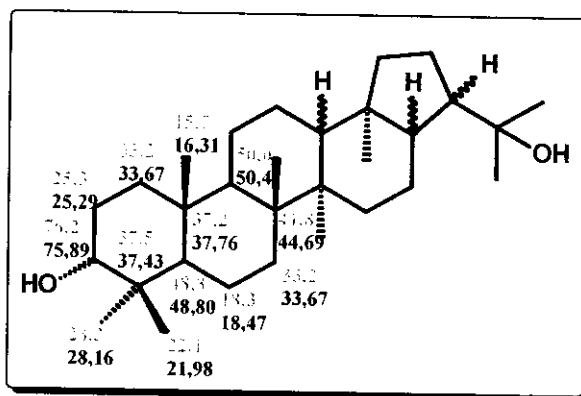


Figura 60: Comparação dos δ_C entre hopano-3 α ,22-diol (XXXI, vermelho) e 41 (preto).

⁴² Takana R, Matsunaga S. Saturated hopane and gammacerane triterpene-diols from the stem bark of *Abies veitchii*. *Phytochemistry* **31** (10): 3535-3539, 1992.

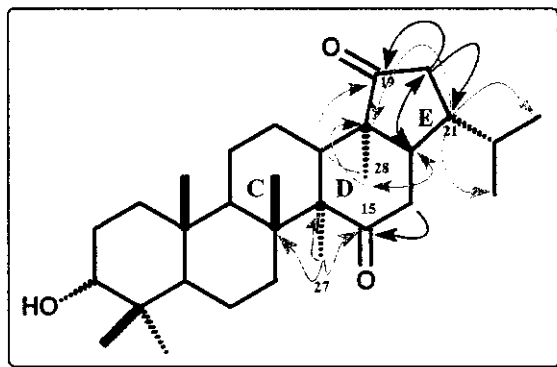


Figura 61: Correlações heteronuclear a longa distância (HMBC) observadas para os anéis D e E.

Foi de grande auxílio o experimento de TOCSY 1D (Figura 62, anexo A), juntamente com o experimento bidimensional gCOSY (Figura 63, anexo A), que permitiu uma clara visualização dos sistemas de *spins* relacionados aos hidrogênios dos carbonos C-16, C-20 e C-30, auxiliando assim na correta atribuição destes sinais (Figura 64).

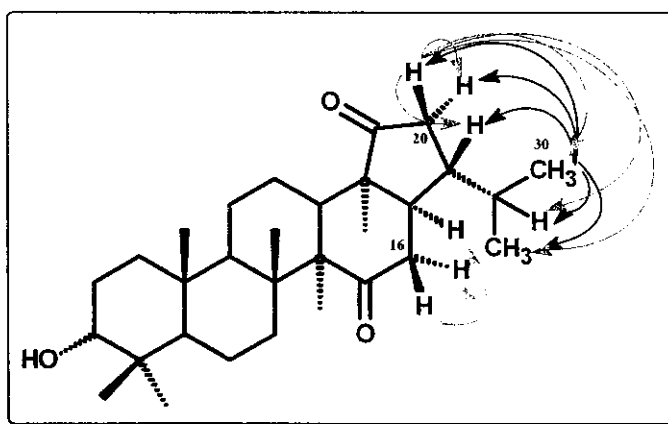


Figura 64: Correlações observadas nos experimentos de TOCSY 1D.

Outras informações interessantes fornecidas por este experimento permitiram inferir sobre a configuração relativa da cadeia isopropílica e da fusão dos anéis D e E. Assim, observou-se o sinal de H-21 como um quarteto largo com J

= 6 Hz em δ_H 1,91, não observou-se o hidrogênio H-17 no sistema de *spins* quando irradiou-se o H-20 e por sua vez não foi observado o sinal referente ao H-21 quando H-16 foi irradiado. Estas observações sugeriram que a constante de acoplamento entre os hidrogênios H-17 e H-21 era próxima de zero impossibilitando a transferência de magnetização por todo o sistema de *spins* acoplados. Em ciclo-pentanos, essa condição ($J \approx 0$ Hz) é satisfeita quando os hidrogênios vicinais estão em posição relativa *trans* (ângulo de diedro $\approx 90^\circ$), ou seja, o grupo isopropila deveria ocupar a posição 21α .

Dessa forma, quanto à configuração relativa do esqueleto hopanóide, a análise dos dados de RMN obtidos sugeriu que o composto deveria apresentar a configuração relativa do esqueleto tipo $17\alpha,21\alpha$ -hopano (XXXII) com inversão da configuração relativa do carbono C-13 (Figura 65).

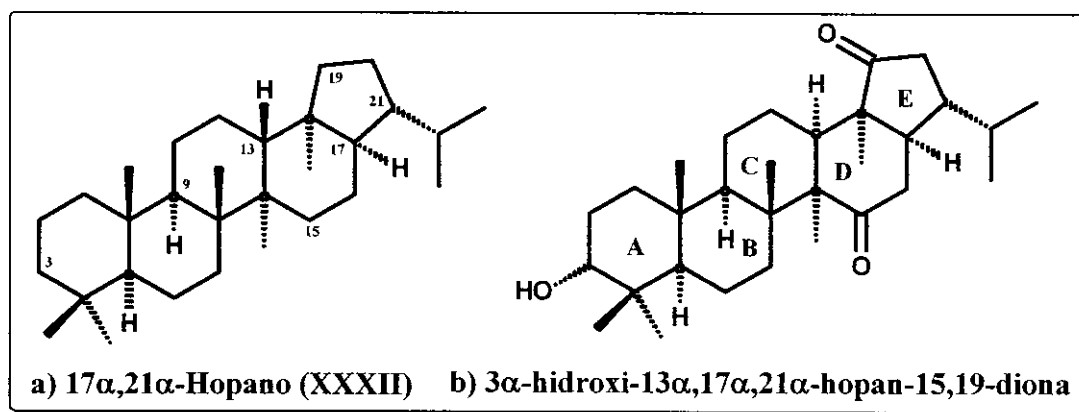


Figura 65: Configuração relativa do $17\alpha,21\alpha$ -Hopano (a) e do composto **41** (b).

Através da montagem de modelos moleculares, ficou evidente que, nessa configuração relativa (Figura 65b), as metilas CH_3 -27 e CH_3 -28 ocupariam posições equatoriais distantes o suficiente para explicar o resultado obtido nos experimentos de diferença de nOe (figuras 58b e 58c, anexo A); irradiaram-se respectivamente os hidrogênios dessas metilas e não foram observados incrementos

de uma metila angular sobre a outra como seria esperado caso a molécula apresentasse uma fusão *trans* entre os anéis C e D (figura 65a). Quando a metila CH₃-27 foi irradiada foram observados apenas incrementos nos hidrogênios H-7 α (δ_H 1,72, 1,78%), H-9 α (δ_H 1,90, 0,95%) e H-12 α (δ_H 1,52, 2,13%); já quando a metila CH₃-28 foi irradiada observou-se apenas incrementos nos hidrogênios H-22 (δ_H 1,76, 1,66%).

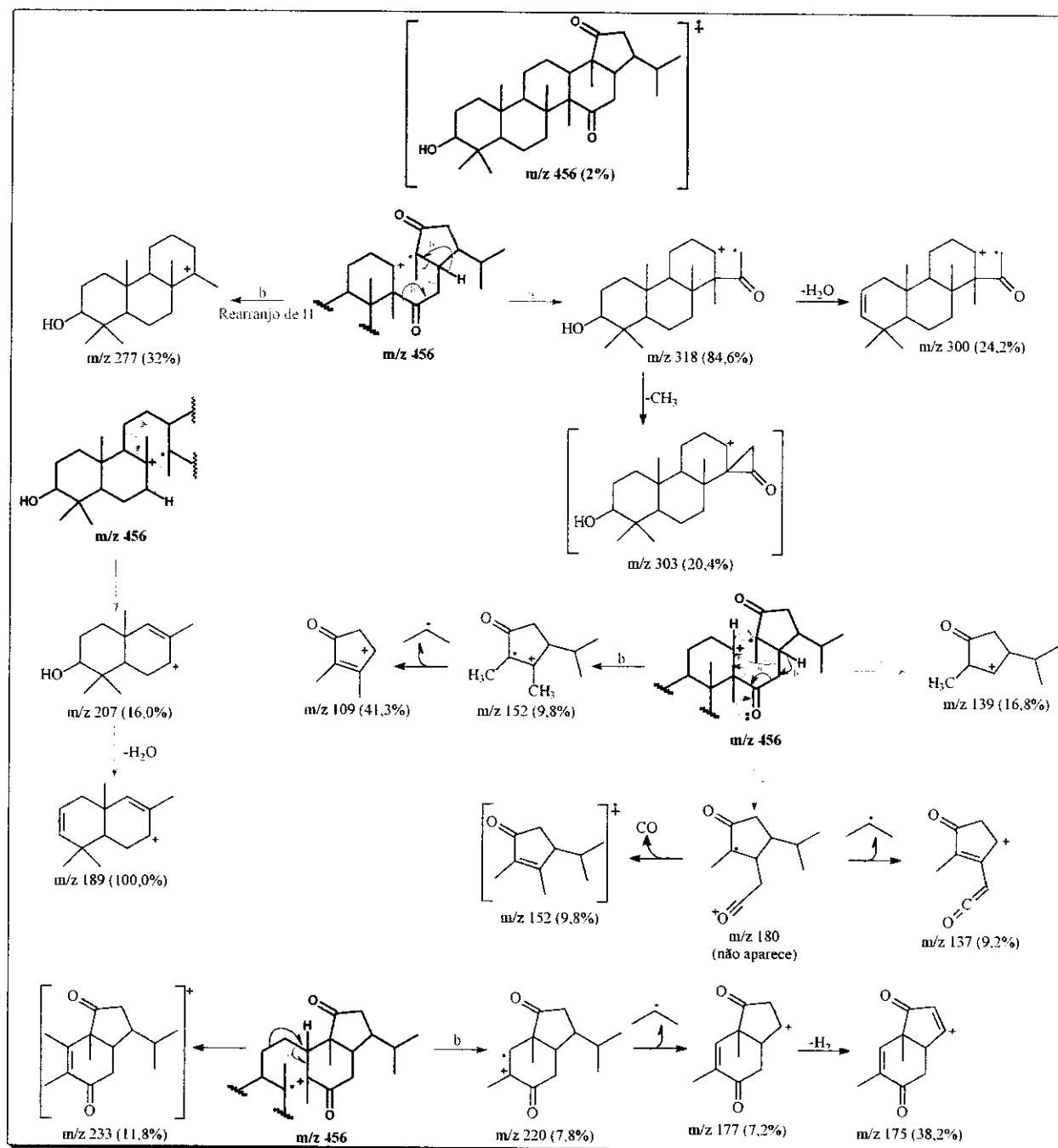
Foi possível observar também que na configuração relativa ilustrada na Figura 65b, a metila CH₃-26 encontrava-se sob o cone de proteção da carbonila em C-19, o que explica a proteção observada no deslocamento químico dos hidrogênios da metila CH₃-26 (δ_H 0,85) quando comparado àquele relatado para o 17 α ,21 β -hopano (δ_H 0,95) ⁴³.

O espectro de massas de alta resolução (Figura 66, anexo A) confirmou a fórmula molecular esperada (C₃₀H₄₈O₃, M⁺_(observ.) = 456,36067, M⁺_(calc.) = 456,36035); a partir da análise desse espectro foi possível racionalizar os principais fragmentos observados (Quadro 4), com base nos caminhos de fragmentação relatados na literatura para esta classe de compostos⁴⁴, corroborando-se assim com a elucidação estrutural deste composto.

Após ampla revisão bibliográfica, verificou-se que se tratava de um composto inédito.

⁴³ Ageta H, Shiojima K. Fern constituents: two new triterpenoid hydrocarbons, hop-16-ene and isohop-22(29)-ene, isolated from *Davallia mariesii*. *Chem Pharm Bull* **38** (2): 347-349, 1990.

⁴⁴ a) Schmidt J, Huneck S. Mass spectroscopy of natural products. VI – localization of functional groups in the hopane skeleton. *Org Mass Spectrom* **14** (12): 656-662, 1979; b) Shiojima K, Arai Y, Masuda K, Takase Y, Ageta T, Ageta H. Mass spectra of pentacyclic triterpenoids. *Chem Pharm Bull* **40** (7): 1683-1690, 1992.

Quadro 4: Proposta de fragmentação para 3 α -hidroxi-13 α ,17 α ,21 α -hopan-15,19-diona (41).

I. 3. 3. 5. Açúcares

I. 3. 3. 5. 1. Derivados peracetilados

Através da análise por CG/EM (Figura 67) das frações e comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles descritos nas bibliotecas eletrônicas Willey e NIST e com dados descritos na literatura⁴⁵, foi possível identificar os derivados peracetilados de sacarose (43), manitol (44) e glicose (45).

I. 3. 3. 5. 2. Álcoois glicosilados

Analisando-se os dados obtidos para a fração EsSFHE B1 G17.2 por RMN (¹H, ¹³C e DEPT, 11 tesla, CD₃OD, Tabela 22, pág. 73; figuras 68 e 69, anexo A) foi possível observar os multipletos em δ_H 0,85 δ_H 1,28 (*m*) e δ_H 1,58 (*m*), que poderiam ser atribuídos aos hidrogênios de uma cadeia alifática, respectivamente grupos metílicos terminais, metilênicos e metilênicos vizinhos a carbonos oxigenados; o indicativo da presença de uma mistura de álcoois alifáticos foi dado pela multiplicidade do sinal em δ_H 0,85 (*m*), o que poderia ser interpretado como a sobreposição de dois ou mais tripletos.

⁴⁵ Budzikiewicz H, Djerassi C, Williams DH. *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry. Vol II. Steroids, terpenoids, sugar and miscellaneous classes*. Holden-Day, Inc. San Francisco, USA. Chapter 27: Carbohydrates, p. 203-216, 1964.

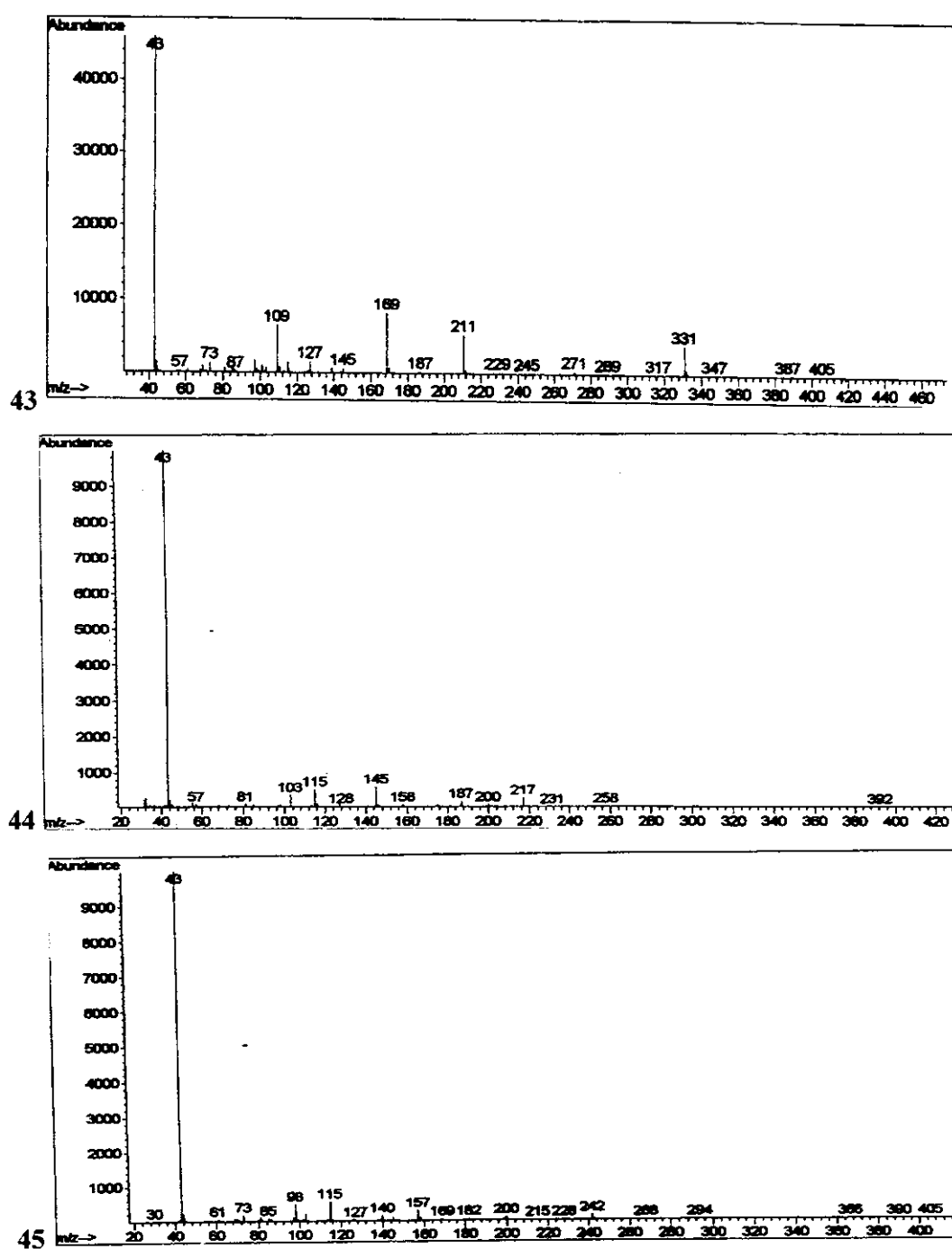


Figura 67: Espectros de massas dos peracetatos de sacarose (43), manitol (44) e glicose (45).

Outras evidências interessantes foram a presença de um singlete em δ_H 1,88 (s) e de um sinal em δ_C 21,65 (CH₃) que poderiam ser atribuídos a um grupo

acetato (CH_3COO), com o carbono carbonílico absorvendo em δ_{C} 170,33 (CH_0), além de multipletos entre δ_{H} 3,2 e δ_{H} 4,2 que sugeriram a presença de hidrogênios carbinólicos, provavelmente de uma molécula de açúcar. Esta última observação foi reforçada pela presença de vários sinais entre δ_{C} 68 e δ_{C} 105 observados no espectro de RMN¹³C.

Assim, na região esperada para hidrogênios anoméricos foi observado um dubleto em δ_{H} 5,38 (*d*, $J = 4$ Hz) que, segundo Agrawal⁴⁶, está de acordo com hidrogênio H-1_(eq) (δ_{H} 5,1-5,8). Já no espectro de RMN ¹³C, destacaram-se os sinais em δ_{C} 93,65 (CH), provavelmente a um carbono C-1 de um açúcar terminal (redutor), e em δ_{C} 105,31 (CH_0), bastante característico para o carbono C-2 da β -D-frutose.

Na busca de exemplos que auxiliassem na elucidação dos compostos presentes na fração EsSFHE B1 G17.2, com base nas evidências espectrais obtidas, foram encontrados os compostos hexil- β -sophorosídeo⁴⁷ (XXXIII), 2-(*S*)-pentanol-2-O- β -D-glicopiranosídeo⁴⁸ (XXXIV), heloniosídeo A⁴⁹ (XXXV) juntamente com metil-D-frutofuranosídeo⁴⁶ (XXXVI) (Figura 70).

Comparando-se os dados de RMN encontrados na literatura com aqueles obtidos para a fração EsSFHE B1 G17.2 (tabelas 22, 35 e 36), foi possível verificar que a amostra isolada tratava-se de pelo menos um derivado de sacarose com um grupo substituinte no carbono C-3 do resíduo frutose e/ou no carbono C-2 do resíduo glicose, sendo os substituintes possíveis um grupo acetato e um álcool secundário de quatro carbonos (Figura 71).

⁴⁶ Agrawal PK. NMR Spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31 (10): 3307-30, 1992.

⁴⁷ Yuda M, Ohtani K, Mizutani K, Kasai R, Tanaka O, Jia M-R, Ling Y-R, Pu X-F, Saruwatari Y-I. Neolignan glycosides from roots of *Codonopsis tangshen*. *Phytochemistry* 29 (6): 1989-1993, 1990.

⁴⁸ Kijima H, Otsuka H, Ide T, Ogimi C, Hirata E, Takushi A, Takeda Y. Glycosides of megastigmane and of the simple alcohols from *Alangium premnifolium*. *Phytochemistry* 42 (3): 723-727, 1996.

⁴⁹ Nakano K, Murakami K, Takaishi Y, Tomimatsu Y. Feruloyl sucrose derivatives from *Heloniopsis orientalis*. *Chem Pharm Bull* 34 (12): 5005-5010, 1986.

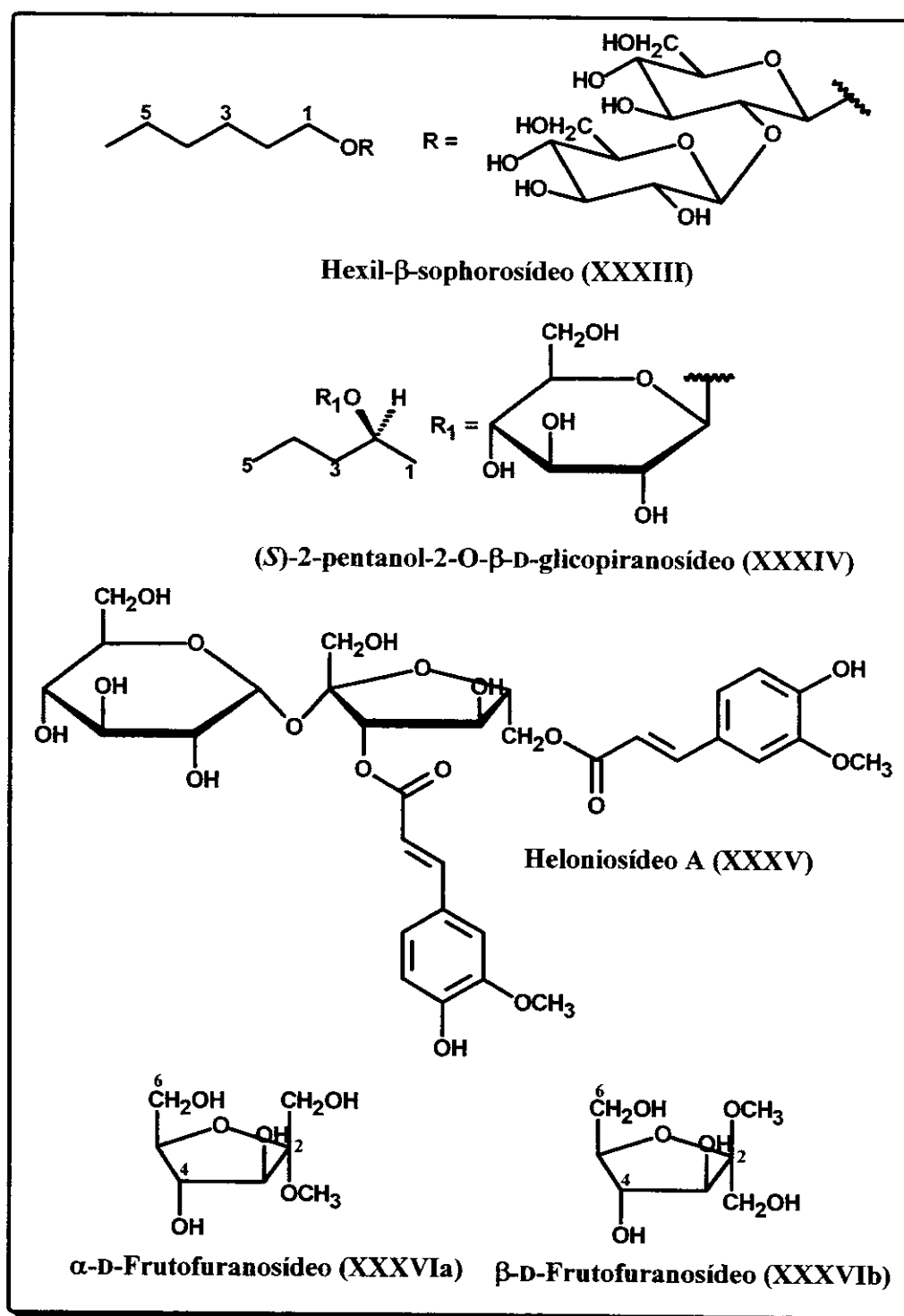


Figura 70: Compostos utilizados como modelos na elucidação estrutural de EsSFHE B1 17.2.

Tabela 35: Dados de RMN das agliconas de **XXXIII** (hexil- β -sophorosídeo), **XXXIV** (2-(*S*)-pentanol-2-O- β -D-glicopiranosídeo) e **XXXV** (heloniosídeo A).

Aglicona	hexil- β -sophorosídeo (XXXIII)		2-(<i>S</i>)-pentanol-2-O- β -D- glicopiranosídeo (XXXIV)		heloniosídeo A (XXXV)	
	1-Hexanol ⁴⁷		2-(<i>S</i>)-pentanol ⁴⁸		Ferrulato de metila ⁴⁹	
	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
C-1	n.i.	71,1 (CH)	1,22 (<i>d</i> , $J = 6$ Hz)	22,0 (CH ₃)	----	127,5 (CH ₀)
C-2	1,61 (<i>tt</i> , $J = 7,0$ e 6,7 Hz)	30,8 (CH ₂)	3,82 (<i>sexteto</i> , $J =$ 6 Hz)	78,2 (CH)	n.d.	112,1 (CH)
C-3	1,28-1,41 (<i>m</i>)	26,8 (CH ₂)	1,35-1,48 (<i>m</i> , H- 3a, H-4)	40,0 (CH ₂)	----	150,5 (CH ₀)
C-4		32,8 (CH ₂)	1,53-1,63 (<i>m</i> , H- 3b)	19,6 (CH ₂)	----	149,1 (CH ₀)
C-5		23,7 (CH ₂)	0,92 (<i>t</i> , $J = 7$ Hz)	14,6 (CH ₃)	n.d.	116,4 (CH)
C-6	0,91 (<i>t</i> , $J = 7,0$ Hz)	14,5 (CH ₃)			n.d.	124,1 (CH)
C- α					----	168,9 (CH ₀)
C- β					n.d.	115,0 (CH)
C- γ					n.d.	147,7 (CH)
OCH ₃					n.d.	56,5 (CH ₃)

n.i.: não identificado; n.d.: não disponível.

Tabela 36: Dados de RMN¹³C dos açúcares.

	1-hexanol-1-O- β - sophorosídeo (XXXIII) ⁴⁷	2-(<i>S</i>)-pentanol-2-O- β -D- glicopiranosídeo (XXXIV) ⁴⁸	heloniosídeo A (XXXV) ⁴⁹	metil- β -D- frutofuranosídeo (XXXVIa) ⁴⁶	metil- α -D- frutofuranosídeo (XXXVIb) ⁴⁶
	β -D-Glicose	β -D-Glicose	β -D-Frutose	β -D-Frutose	α -D-Frutose
CH-1	103,3	104,0	65,2	60,0	58,7
CH-2	82,8	75,3	105,1 (CH ₀)	104,7 (CH ₀)	109,9 (CH ₀)
CH-3	77,7	77,8	79,4	77,7	80,3
CH-4	71,4	71,8	75,0	75,9	77,2
CH-5	78,2	77,5	81,2	82,1	83,4
CH ₂ -6	62,7	62,9	66,1	63,6	62,1
	β -D-Glicose		α -D-Glicose		
CH-1'	104,9		93,0		
CH-2'	75,9		73,1		
CH-3'	77,7		74,2		
CH-4'	71,4		71,4		
CH-5'	78,2		75,0		
CH ₂ -6'	62,7		62,7		

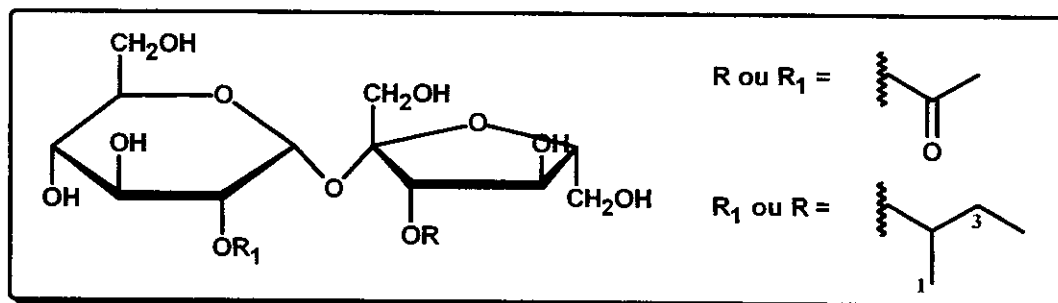


Figura 71: Prováveis compostos presentes em EsSFHE B1 G17.2 (48).

De maneira semelhante, o espectro de RMN ^1H (500 MHz, Pyr- D_5 , Tabela 23, pág. 74; Figura 72, anexo A) da fração EsSFHE B1 G18.4 também apresentou multipletos em δ_{H} 0,83 (*m*), δ_{H} 1,13 (*m*) e δ_{H} 1,55 (*m*) que foram atribuídos aos hidrogênios de uma cadeia alifática, respectivamente grupos metílicos terminais, metilênicos e metilênicos vizinhos a carbonos oxigenados. Já o sinal em δ_{H} 3,62 (*m*) foi atribuído a hidrogênios carbinólicos em uma cadeia alifática. Além disso, foram observados multipletos entre δ_{H} 4,0 e δ_{H} 5,0 o que sugeriu a presença de hidrogênios carbinólicos, provavelmente de uma molécula de açúcar. No espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, Pyr- D_5 , Tabela 23, pág. ; Figura 73, anexo A) foi interessante observar os sinais em δ_{C} 93,53 (CH) e em δ_{C} 105,73 (CH_0) que, segundo Agrawal⁴⁶, são típicos dos carbonos C-1 de um açúcar terminal (redutor), geralmente glicose, e C-2 de um resíduo β -D-frutose, respectivamente, porém como os dados relatados nesse trabalho são em metanol deuterado não foi possível a comparação direta entre eles.

Buscando modelos na literatura, encontraram-se os compostos 2-propil-D-glicopiranosídeo⁵⁰ (XXXVII), icarisídeo G_1 ⁵¹ (XXXVIII), recurvosídeo D ⁵² (XXXIX) e sacarose⁴⁹ (XXXX) (Figura 74).

⁵⁰ Seo S, Tomita Y, Tori K, Yoshimura Y. Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Chem Soc* **100** (11): 3331-3339, 1978.

⁵¹ Miyase T, Ueno A, Takizawa N, Kobayashi H, Oguchi H. Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* Morr. var. *thunbergianum* (Miq.) Nakai. III. *Chem Pharm Bul.* **36** (7): 2475-2484, 1988.

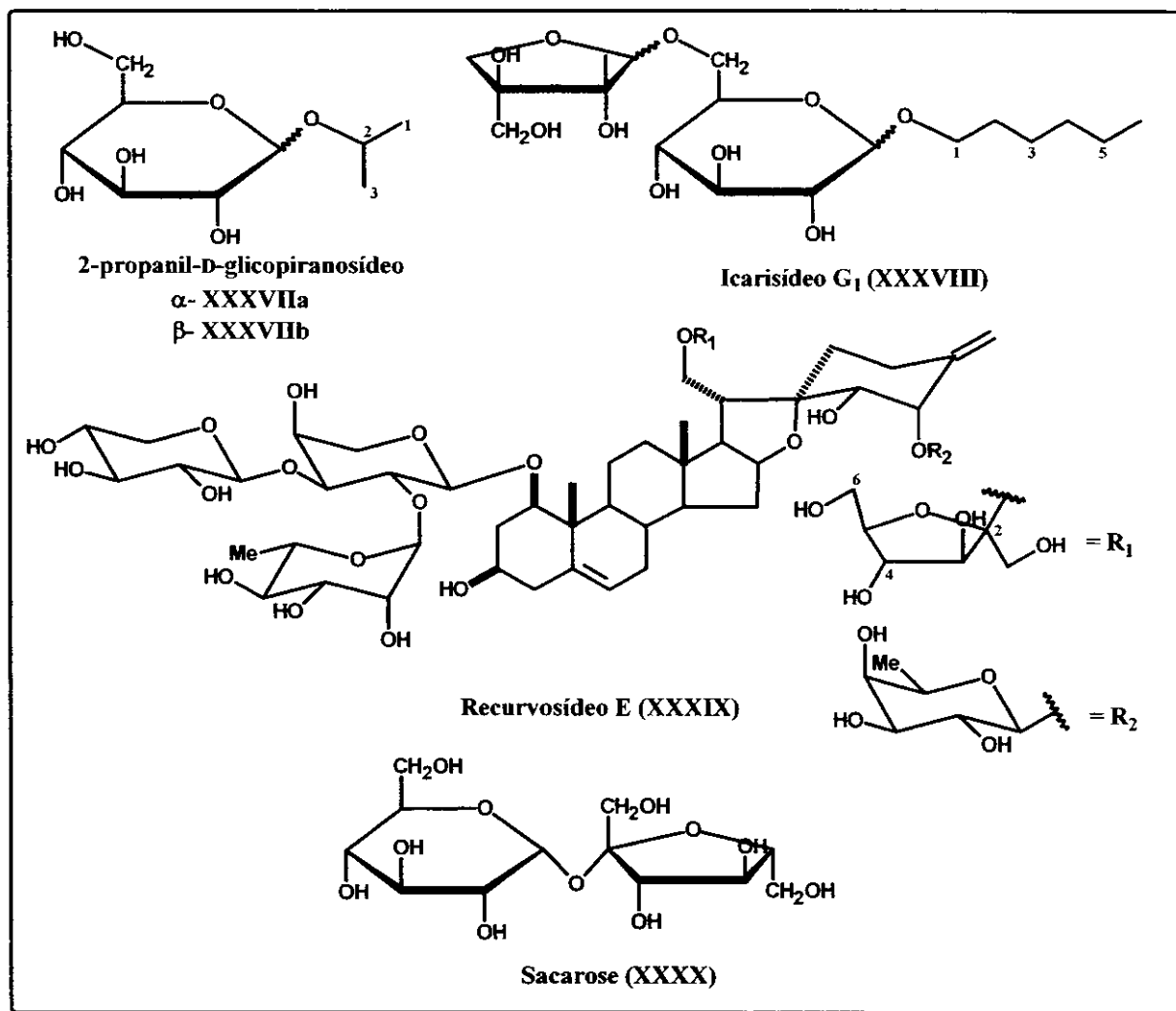


Figura 74: Compostos utilizados como modelo na elucidação estrutural de EsSFHE B1 G18.4.

A comparação dos dados de RMN¹H e ¹³C entre as agliconas 2-propanol (XXXVII), 1-hexanol (XXXVIII) e a fração EsSFHE B1 G18.4 (Tabela 37) indicou que a fração em estudo era constituída, muito provavelmente, por uma mistura de álcoois alifáticos primários glicosilados. Isto porque se observou apenas a presença de um sinal de carbono metílico em δ_C 14,21 (CH₃) sugerindo a presença de um álcool primário; o indicativo da presença de uma mistura de álcoois

⁵² Takaashi Y, Mimaki Y, Kuroda M, Sashida Y. Recurvosides A - E, new polyhydroxylated steroidal saponins from *Nolina recurvata* stem. *Tetrahedron* 51 (8): 2281-2292, 1995.

alifáticos foi dado pela multiplicidade de δ_H 0,83 (*m*), cujo multipletto pareceu ser resultante da sobreposição de dois ou mais tripletos.

Tabela 37: Dados de RMN da agliconas de EsSFHE B1 G18.4, de 2-propil-D-glicopiranosídeos (XXXVII) e de icarisídeo G₁ (XXXVIII).

Aglicona	2-Propanol ⁵⁰		1-Hexanol ⁵¹		EsSFHE B1 G18.4	
	δ_C (α -glucose)	δ_C (β -glucose)	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
CH ₂ -1	21,6 (CH ₃)	23,8 (CH ₃)	3,67 (2H, <i>m</i>)	69,9	3,622 (<i>m</i>)	70,56
CH ₂ -2	69,7 (CH)	70,8 (CH)	1,57 (2H, <i>m</i>)	30,3	1,545 (<i>m</i>)	29,95
CH ₂ -3	23,6 (CH ₃)	22,0 (CH ₃)		26,2		27,83
CH ₂ -4			1,16 (6H, <i>m</i>)	32,0	1,125 (<i>m</i>)	32,04; 32,11
CH ₂ -5				22,9		22,83
CH ₃ -6			0,78 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7Hz)	14,3	0,825 (<i>m</i>)	14,21

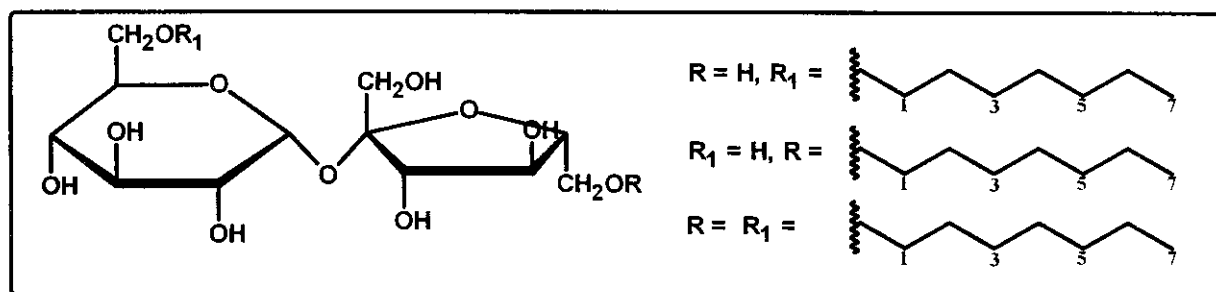
Analisando-se os dados de RMN¹³C referentes aos resíduos de açúcares presentes em XXXVII, XXXVIII, XXXIX e XXXX em comparação com os obtidos para a fração EsSFHE B1 G18.4 (Tabela 38), juntamente com os dados para a aglicona, foi possível encontrar fortes indícios da presença de sacarose ligada a uma cadeia alifática, com no mínimo 7 carbonos (1-heptanol), através do carbono C-6 do resíduo β -D-frutose, ou do carbono C-6 do resíduo α -D-glicose, ou ainda em ambas as posições (Figura 75). Muito provavelmente tratava-se de uma mistura desses compostos.

Na tentativa de obter mais informações sobre essas amostras, procedeu-se a análise por CG/EM dos derivados acetilados da fração EsSFHE B1 G17.2, empregando-se as condições de análise descrita por Wang e colaboradores⁵³ para o estudo de compostos glicosilados precursores de aroma em folhas de chá (Tabela 1, pág. 25).

⁵³ Wang D, Yoshimura T, Kubota K, Kobayashi A. 2000. Analysis of glycosidically bound aroma precursors in tea leaves. 1. Qualitative and quantitative analyses of glycosides with aglicons as aroma compounds. *J Agric Food Chem* 48 (11): 5411-5418.

Tabela 38: Dados de RMN¹³C dos açúcares.

	α -D-propanil-Glucose (XXXVIIa) ⁵⁰	β -D-propanil-Glucose (XXXVIIb) ⁵⁰	Icarisídeo G ₁ (XXXVIII) ⁵¹	Recurvosídeo D (XXXIX) ⁵²	Sacarose (XXXX) ⁴⁹	EsSFHE B1 G18.4
	α -D- Glucose	β -D-Glucose	β -D-Glucose	β -D-Fructose	α -D- Glucose	
CH-1	98,3	102,4	104,7	62,7 (CH ₂)	93,3	93,53
CH-2	73,5	75,0	75,2	105,3 (CH ₀)	73,1	73,31
CH-3	75,2	78,2	78,6	79,2	74,8	75,49
CH-4	72,2	71,6	72,0	77,1	71,6	71,73
CH-5	74,0	78,1	77,2	84,2	74,6	73,97
CH ₂ -6	62,9	62,7	69,1	64,3	62,3	62,91/70,56
			Apiose		β -D-Fructose	
CH-1'			111,2		64,6 (CH ₂)	62,31/64,52 (CH ₂)
CH-2'			78,0		105,4 (CH ₀)	105,73 (CH ₀)
CH-3'			80,6 (CH ₀)		79,8	79,82
CH-4'			75,2 (CH ₂)		75,5	75,49
CH-5'			65,7 (CH ₂)		84,0	84,16
CH ₂ -6'			----		62,8	62,91/64,69

**Figura 75:** Prováveis compostos presentes na fração EsSFHE B1 18.4 (49).

O cromatograma de EsSFHE B1 G17.2ac apresentou um pico majoritário em $t_R = 35,94$ min (Figura 76). Porém os dados de espectrometria de massas desse pico, bem como dos demais, não forneceram informações conclusivas.

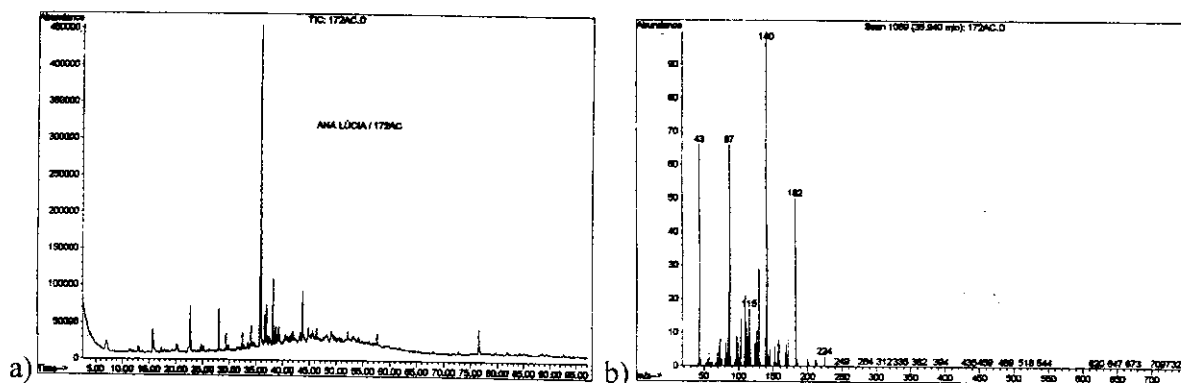


Figura 76: Cromatograma (a) e espectro de massas (b) da fração EsSFHE B1 17.2ac.

I. 3. 3. 6. Outros compostos

Foram identificados por CG/EM, em várias frações dos extratos hexânicos das partes aérea seca e subterrânea fresca de *E. sellowiana*, quatro derivados do ácido ftálico, os ftalatos de n-butila (a), de 2-metil-propila e n-butila (b), de 2-etil-hexila (c), de n-octila (e) e de 2-metil-propila (f), e um derivado do ácido decanodióico, o decanodiato de 2-etil-hexila (d) (Figura 77), todos utilizados como plastificantes.

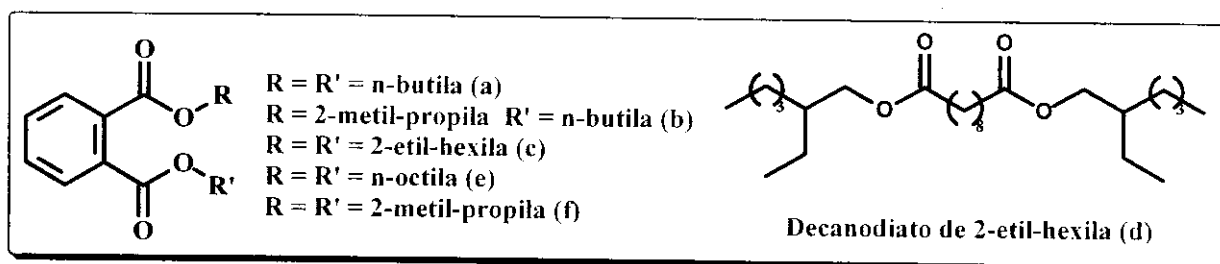


Figura 77: Plastificantes identificados por CG/EM.

É bastante comum atribuir a presença destes compostos a impurezas dos solventes empregados nas diversas etapas do trabalho. Porém é importante lembrar que pode tratar-se de compostos incorporados pela planta a partir do meio

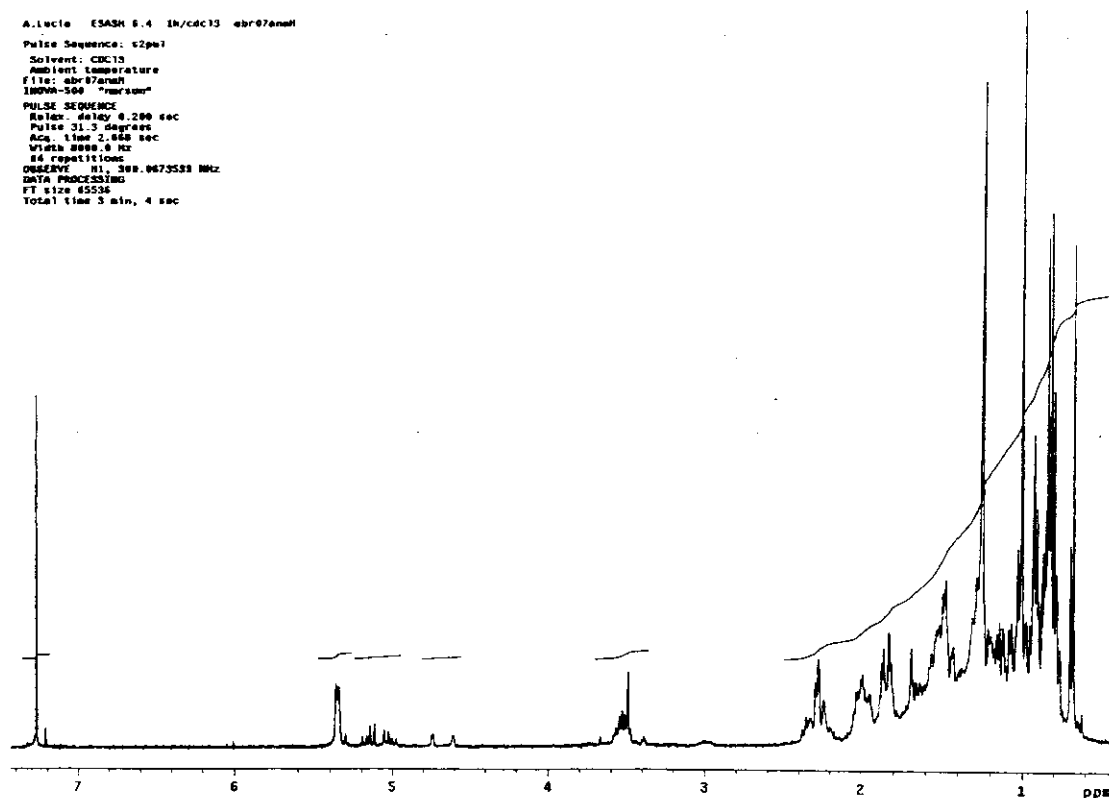
ambiente, tendo-se em vista a grande quantidade de lixo plástico presente na natureza. Já foi observado para plantas do gênero *Elodea*⁵⁴, que também são plantas de ambiente aquático, que estas absorvem esses compostos presentes no ambiente.

Neste sentido vale ainda lembrar que se esses compostos fossem apenas impurezas de solvente, eles seriam freqüentemente detectados durante as análises fitoquímicas que vem sendo desenvolvidas em nosso laboratório ao longo de 30 anos; ao contrario, eles foram raramente detectados em nosso grupo de pesquisa.

⁵⁴ Metcalf RL, Booth GM, Schuth CK, Hansen DJ, Lu PY *apud* Staples CA, Peterson DR, Parkerton TF, Adams WJ. The environmental fate of phthalate esters: a literature review. *Chemosphere* 35 (4): 667-749, 1997.

CAPITULO I - ANEXO A

A.Lucia ESASH 6.4 1h/cdc13 ebr07amh
Pulse Sequence: s2pul
Solvent: CDC13
Ambient temperature
File: ebr07amh
1000A-500 "nucson"
PULSE SEQUENCE
Relax. delay 0.200 sec
Pulse 31.3 degrees
Acq. time 2.000 sec
Width 8000.0 Hz
64 repetitions
OBSERVED 11, 500.0679558 MHz
DATA PROCESSING
FT size 65536
Total time 3 min, 4 sec



A.Lucia ESASH 6.4 1h/cdc13 ebr07amh
Pulse Sequence: s2pul

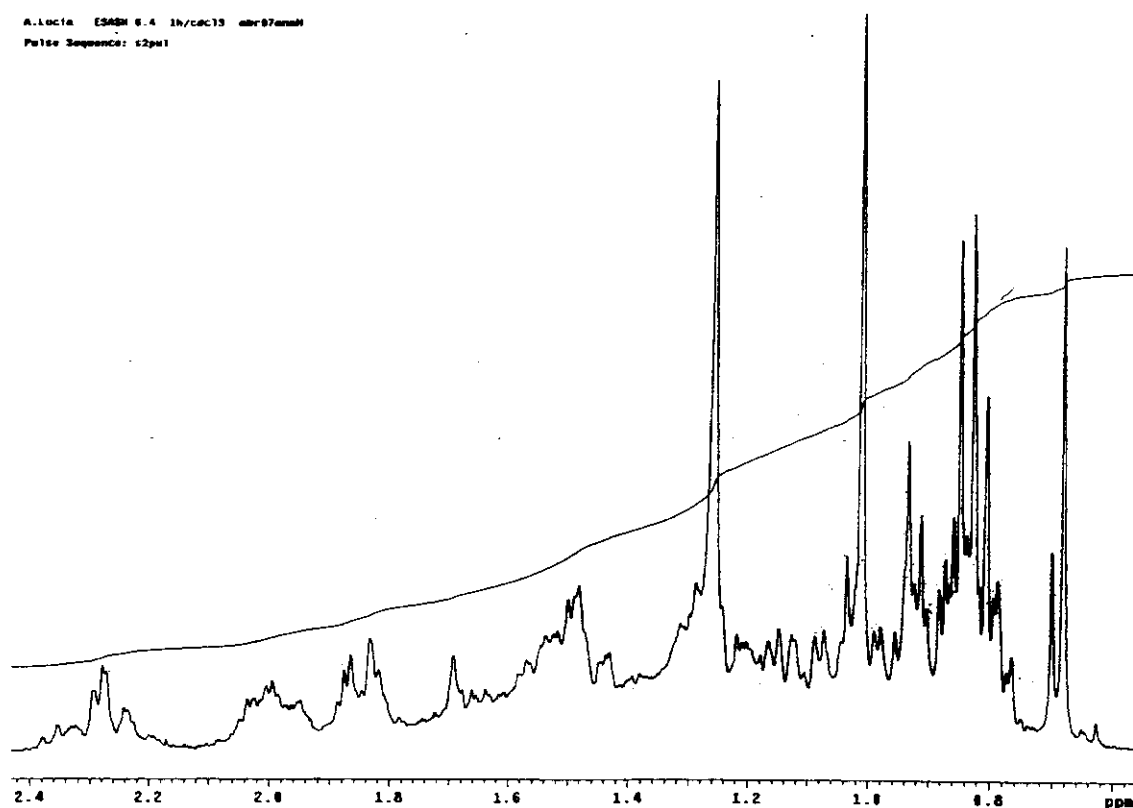


Figura 18: Espectro de RMN¹H (300MHz, CDCl₃/TMS) da mistura de 2, 3 e 4.

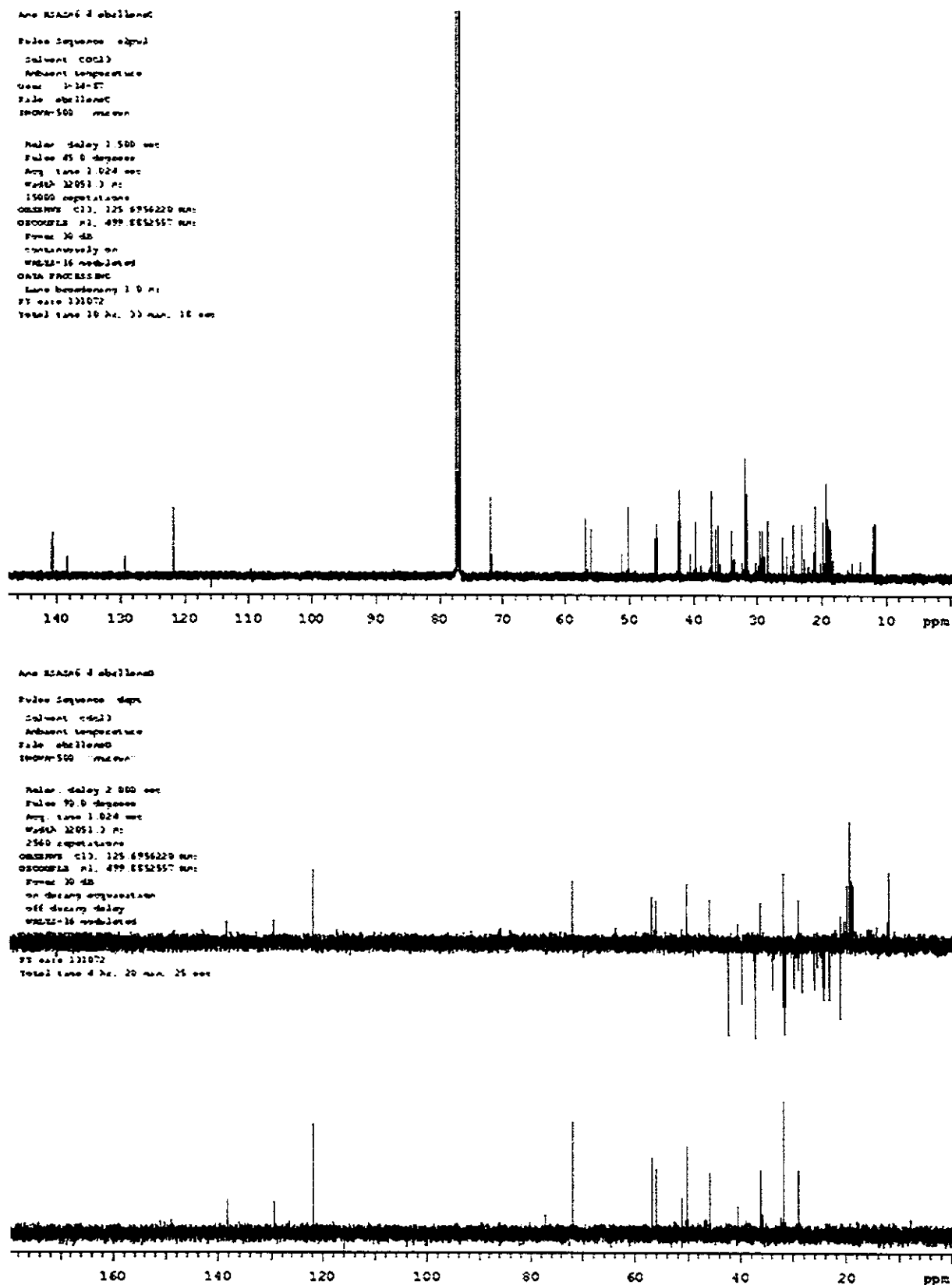


Figura 19: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, CDCl₃) da mistura de 2, 3 e

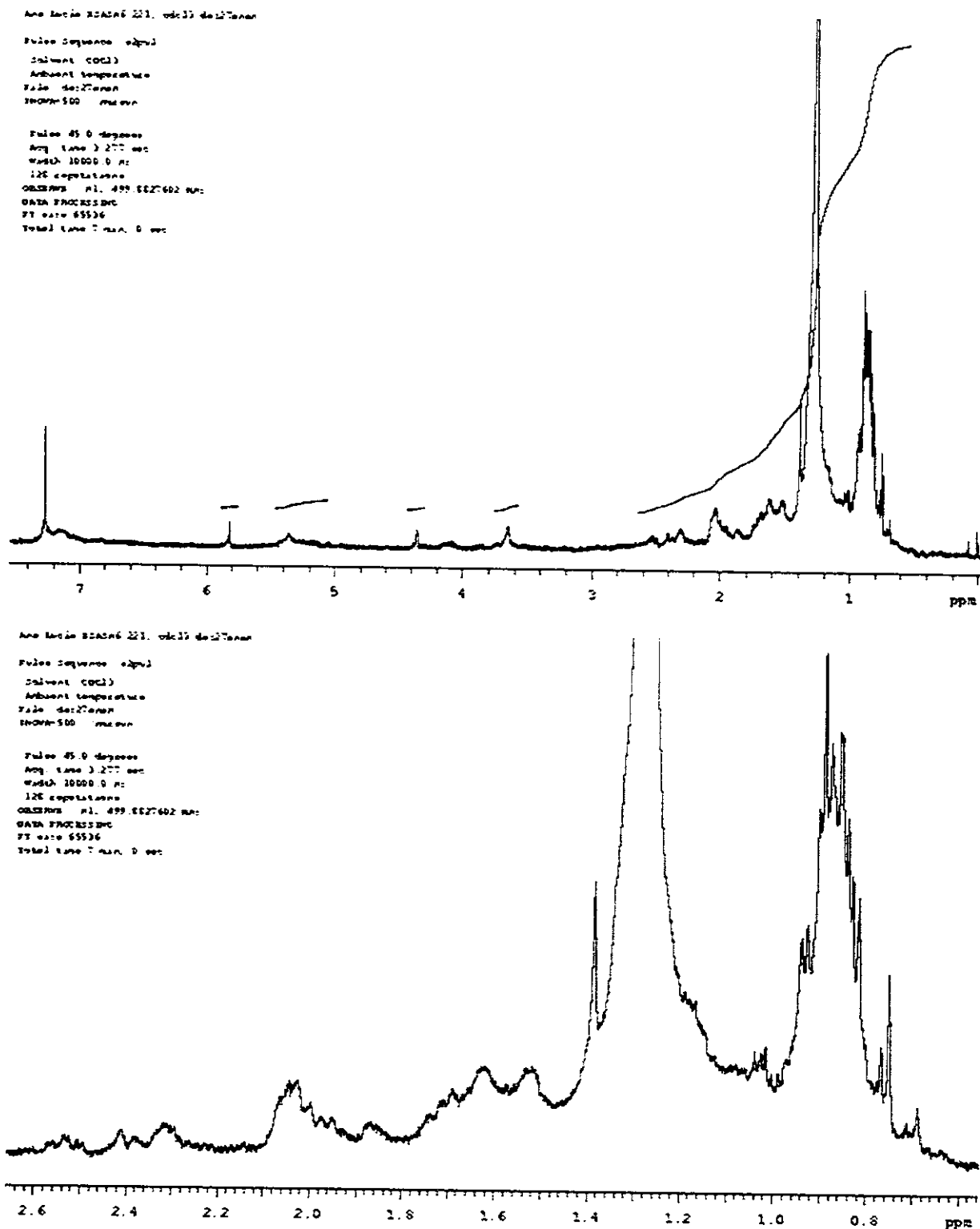


Figura 21: Espectro de RMN¹H (500MHz, CDCl₃/TMS) de 18.

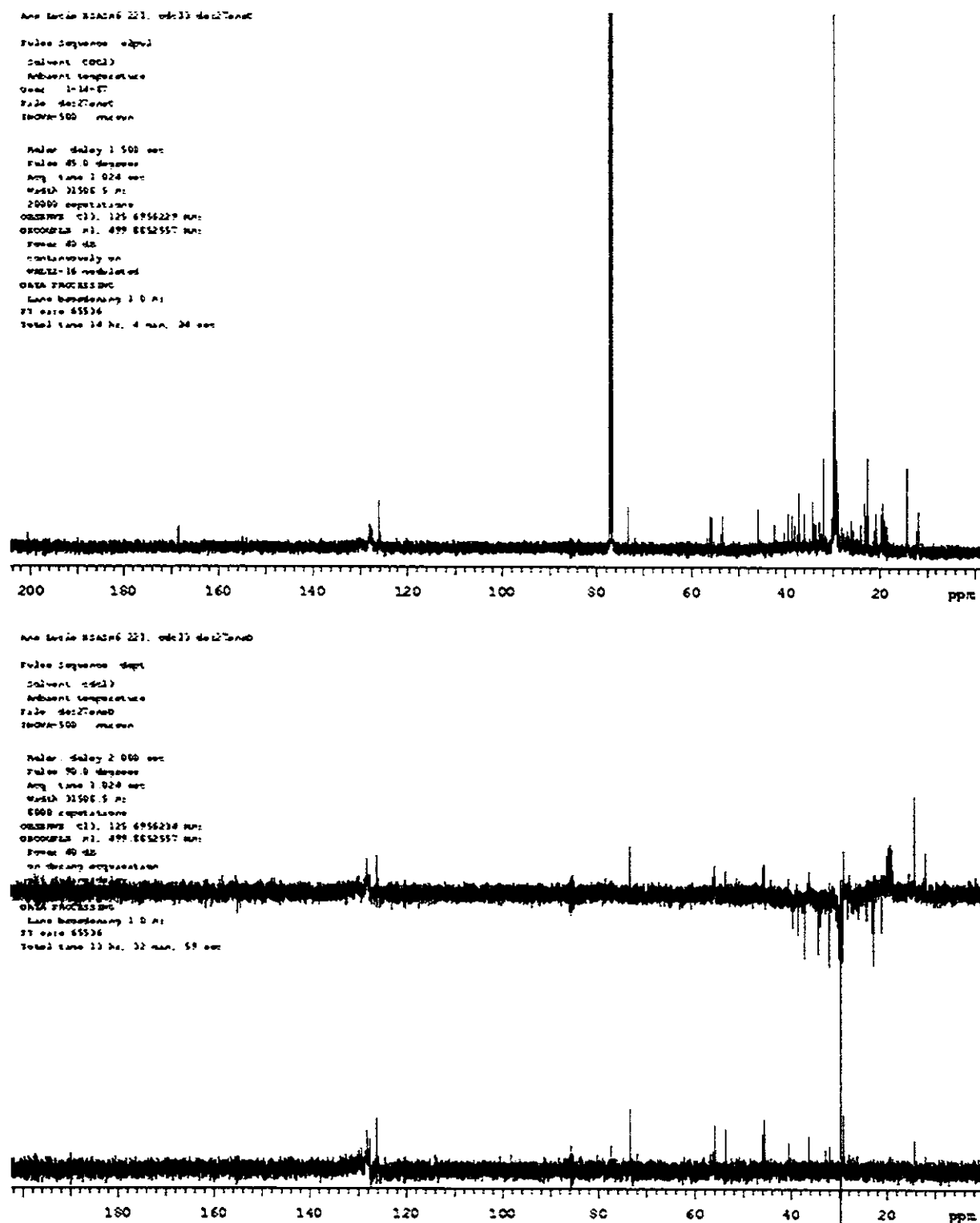


Figura 22: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, CDCl₃) de 18.

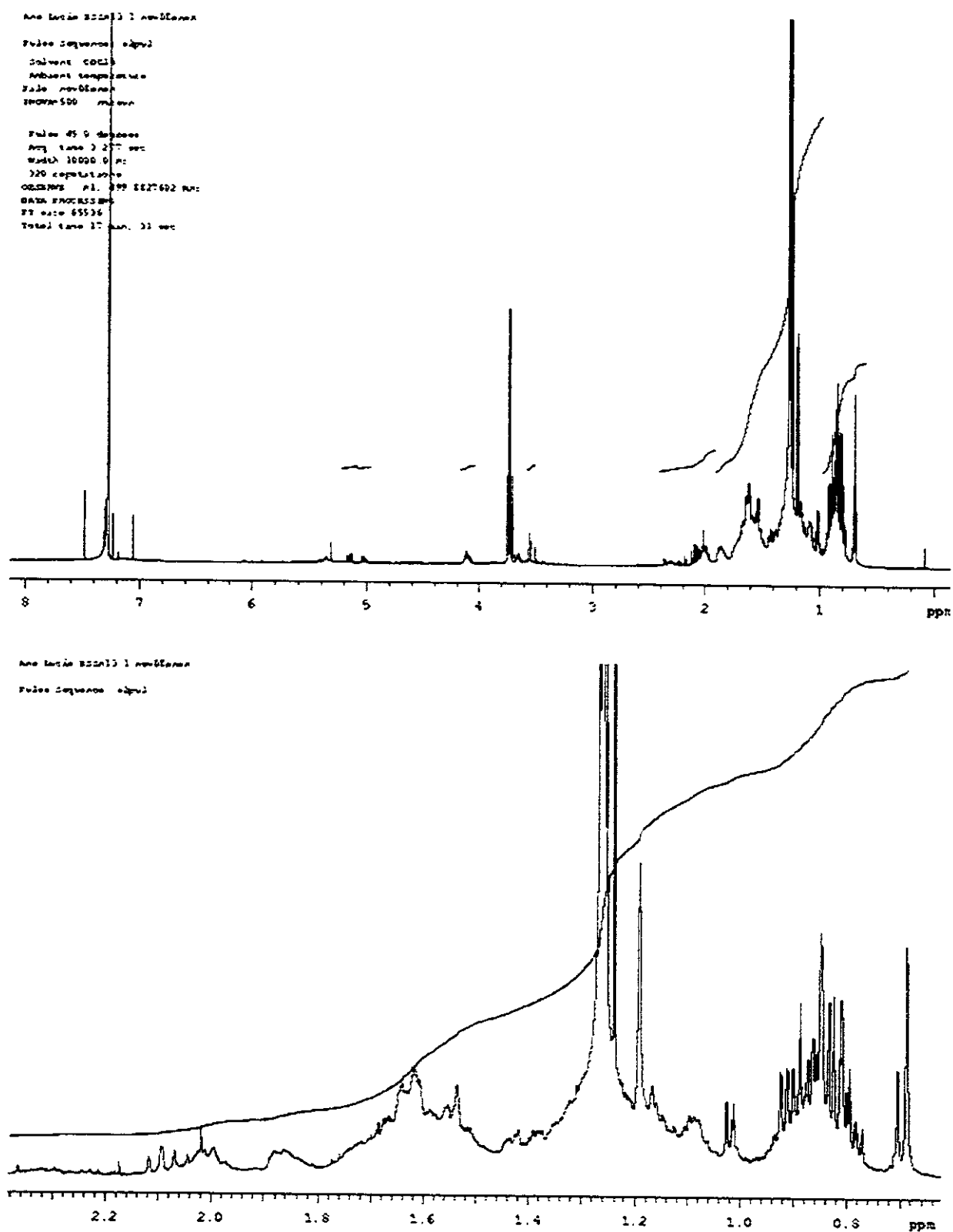


Figura 24: Espectro de RMN¹H (500MHz, CDCl₃/TMS) de **42**.

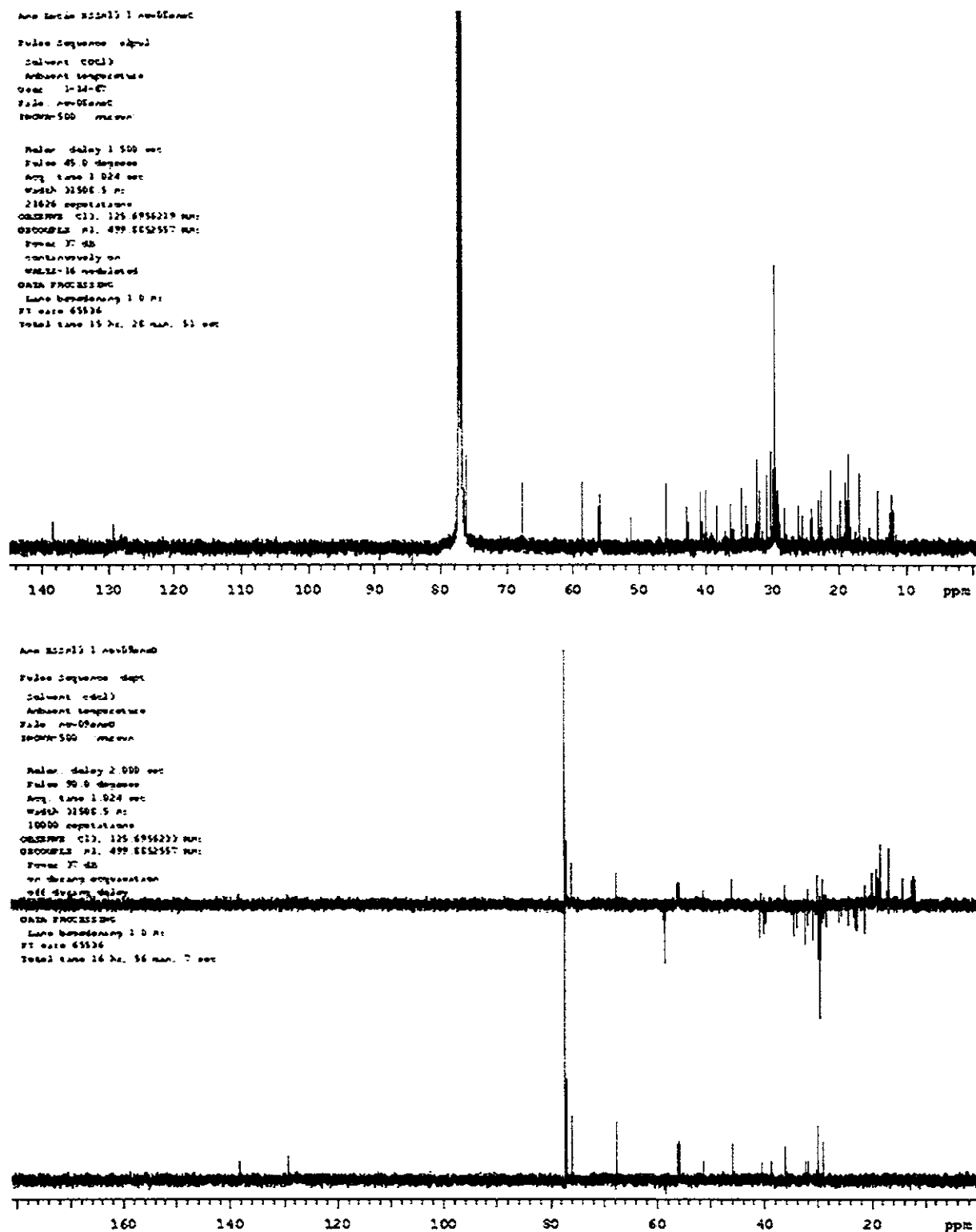


Figura 25: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, CDCl₃) de 42.

A: 100% Me2SO-d6 1 100% Me2SO-d6

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: CDCl3

Acquire temperature:

F2: 100% Me2SO-d6

100% Me2SO-d6

Pulse delay: 1.500 sec

Acq. time: 0.200 sec

Width: 5115.4 Hz

20 width: 5115.4 Hz

16 exponentials

64 increments

Observed: 11, 499 652,605 Hz

DATA PROCESSING:

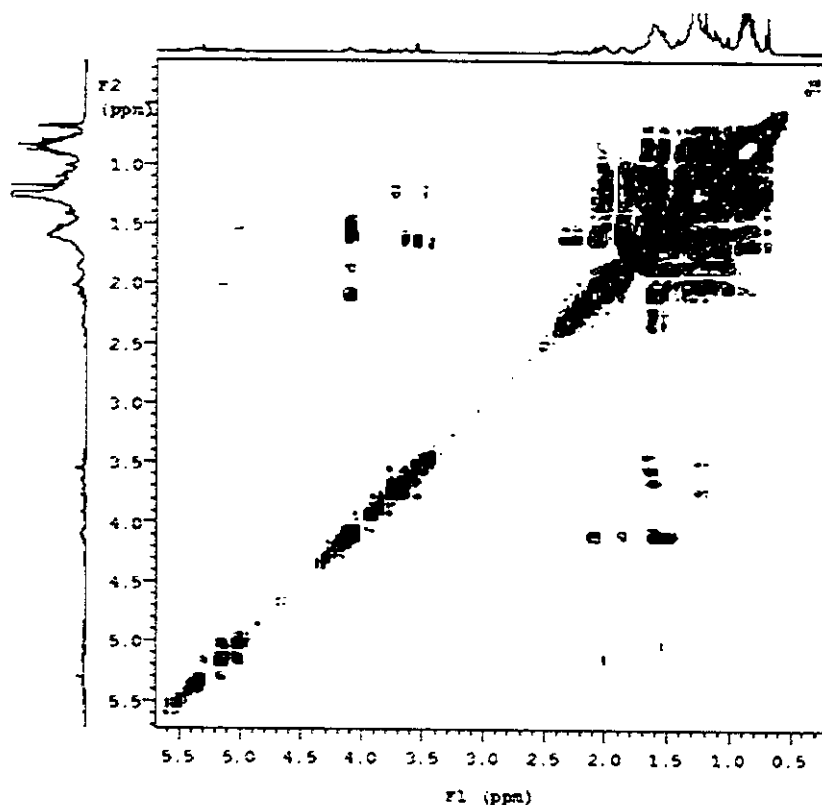
Sq. zero build: 0.100 sec

F1 DATA PROCESSING:

Sq. zero build: 0.010 sec

F2: 2048 x 2048

Total time: 29 min. 48 sec



A: 100% Me2SO-d6 1 100% Me2SO-d6

Pulse Sequence: gCOSY

Solvent: CDCl3

Acquire temperature:

F2: 100% Me2SO-d6

100% Me2SO-d6

Pulse delay: 1.500 sec

Acq. time: 0.200 sec

Width: 5115.4 Hz

20 width: 5115.4 Hz

16 exponentials

64 increments

Observed: 11, 499 652,605 Hz

DATA PROCESSING:

Sq. zero build: 0.100 sec

F1 DATA PROCESSING:

Sq. zero build: 0.010 sec

F2: 2048 x 2048

Total time: 29 min. 48 sec

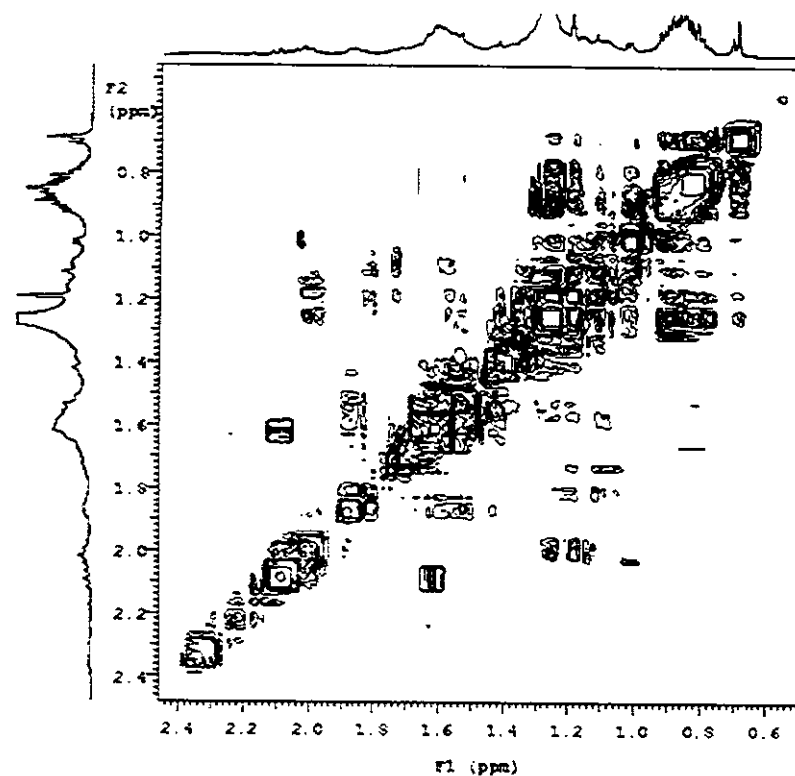


Figura 29: Gráficos de contorno do experimento bidimensional gCOSY de 42.

A 802913 1 (cd13) nml22nmr500

Pulse Sequence: zgpg30

Solvent: CDCl₃

Acquisition Temperature: 300.2 K

QNP: 1H-13C

Pulse: nml22nmr500

PROBHD: 500 mmQNP

Relaxation delay: 1.500 sec

Acq. time: 0.200 sec

Width: 5115.4 Hz

2D width: 2552.5 Hz

256 experiments

2 x 64 increments

Observed: 41, 499 8227544 Hz

Observed: 113, 125 7687732 Hz

Phase: 90 deg

90 degree compensation

off during delay

GROUP: 1 modulation

DATA PROCESSING

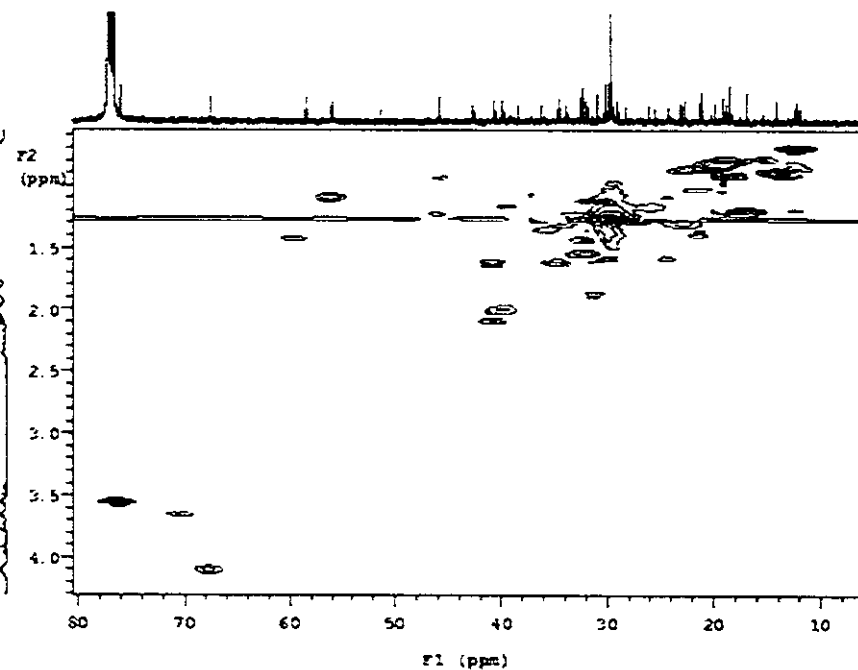
Gain: 0.000 sec

F1: 0.000 sec

Gain: 0.000 sec

F1: 0.000 sec

Total time: 15 hr, 52 min, 35 sec



a

A 802913 1 (cd13) nml22nmr500

Pulse Sequence: zgpg30

Solvent: CDCl₃

Acquisition Temperature: 300.2 K

QNP: 1H-13C

Pulse: nml22nmr500

PROBHD: 500 mmQNP

Relaxation delay: 1.500 sec

Acq. time: 0.195 sec

Width: 5115.4 Hz

2D width: 2552.5 Hz

256 experiments

2 x 64 increments

Observed: 41, 499 8227544 Hz

Observed: 113, 125 7687732 Hz

Phase: 90 deg

90 degree compensation

off during delay

GROUP: 1 modulation

DATA PROCESSING

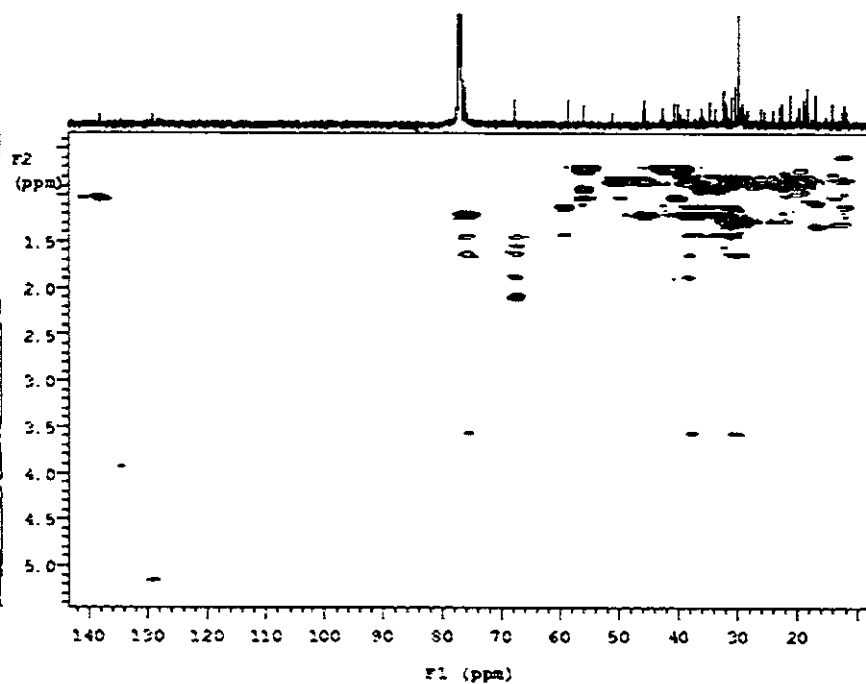
Gain: 0.000 sec

F1: 0.000 sec

Gain: 0.000 sec

F1: 0.000 sec

Total time: 17 hr, 50 min, 44 sec



b

Figura 30: Gráficos de contorno dos experimentos bidimensionais HSQC (a) e HMBC (b) de **42**.

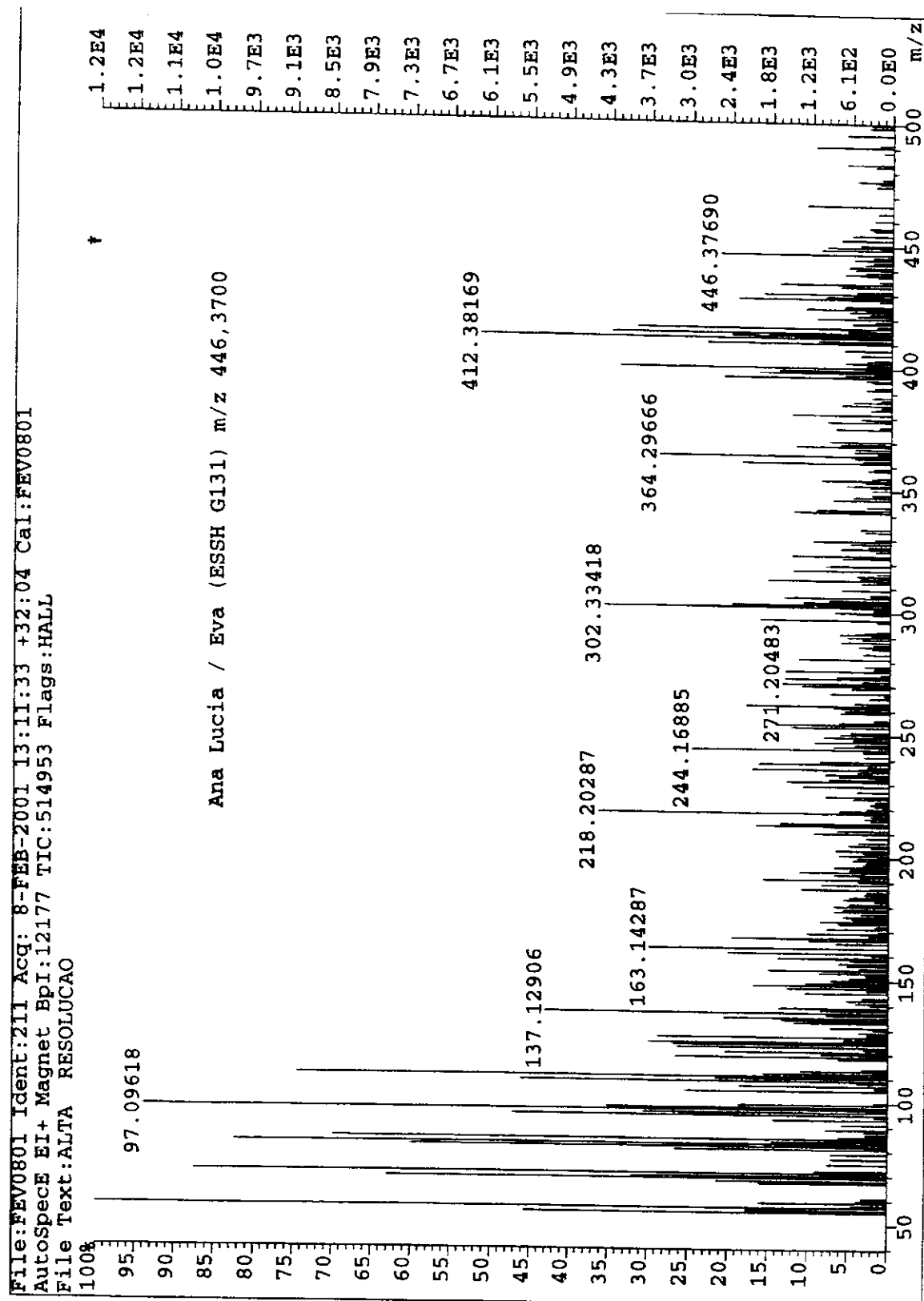


Figura 31: Espectro de massas (impacto eletrônico, alta resolução) de 42.

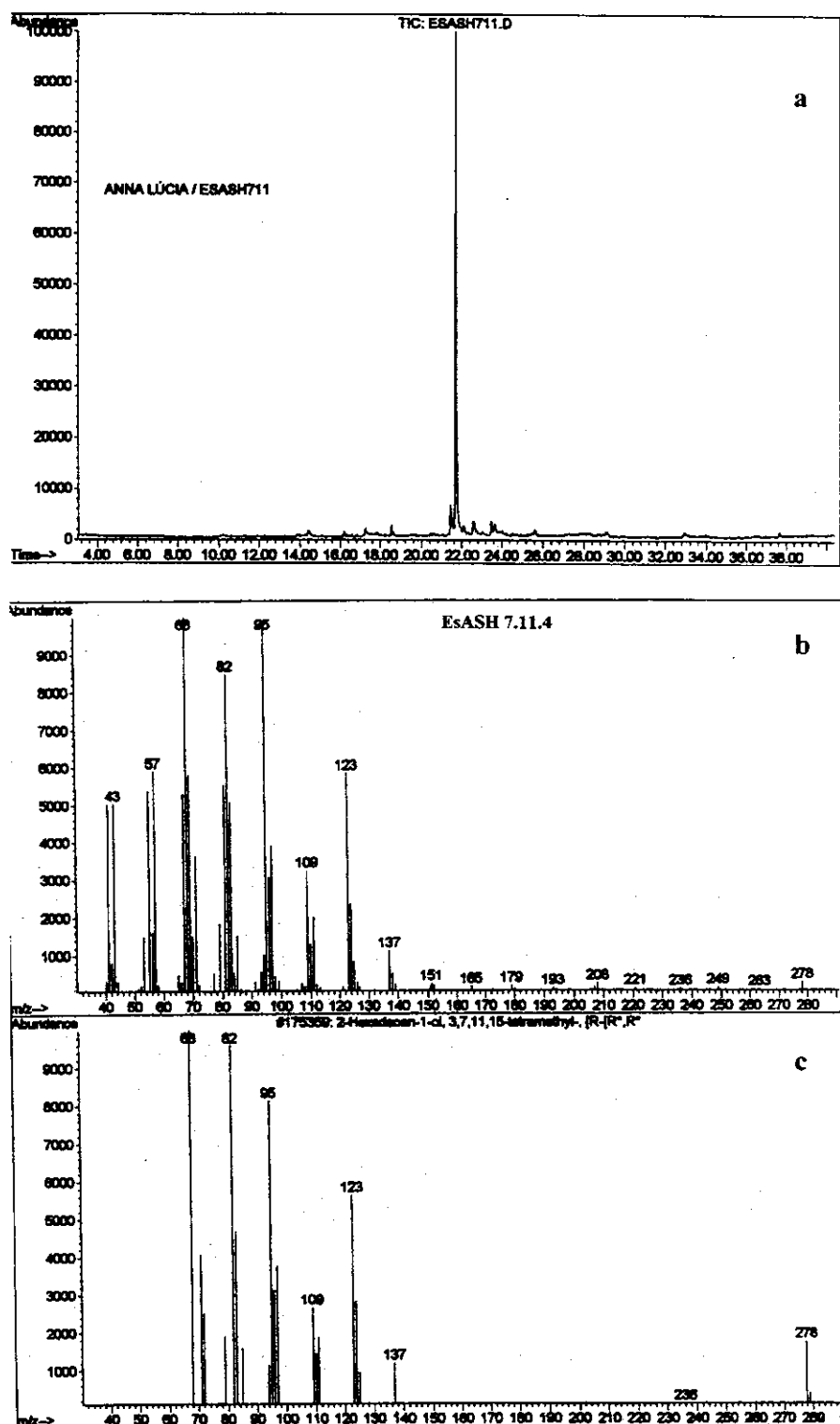


Figura 36: Cromatograma (a) e Espectros de massas (b, obtido; c, biblioteca Wiley) de 36.

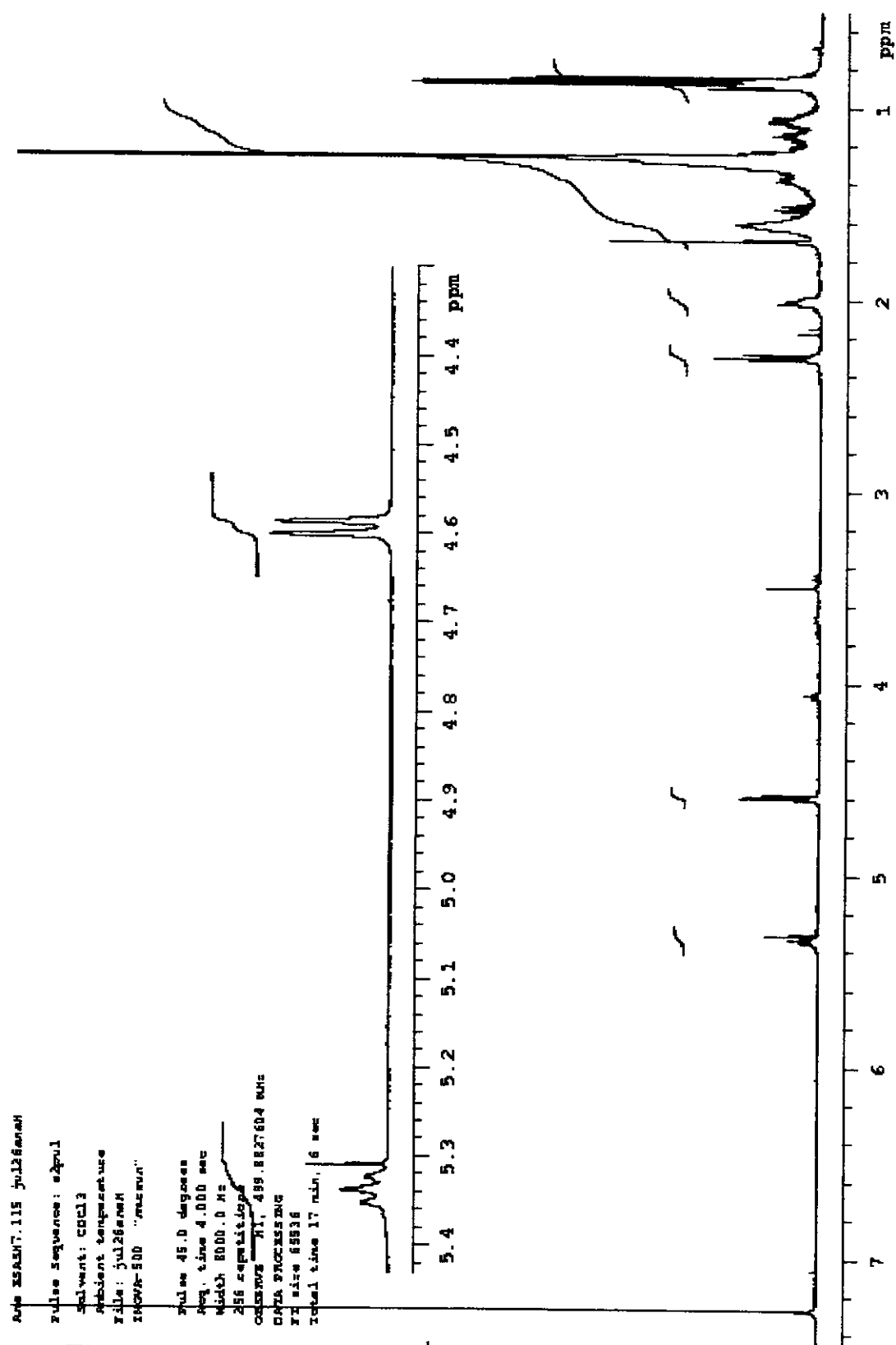


Figura 37: Espectro de RMN¹H (500MHz, CDCl₃/TMS) de 36.

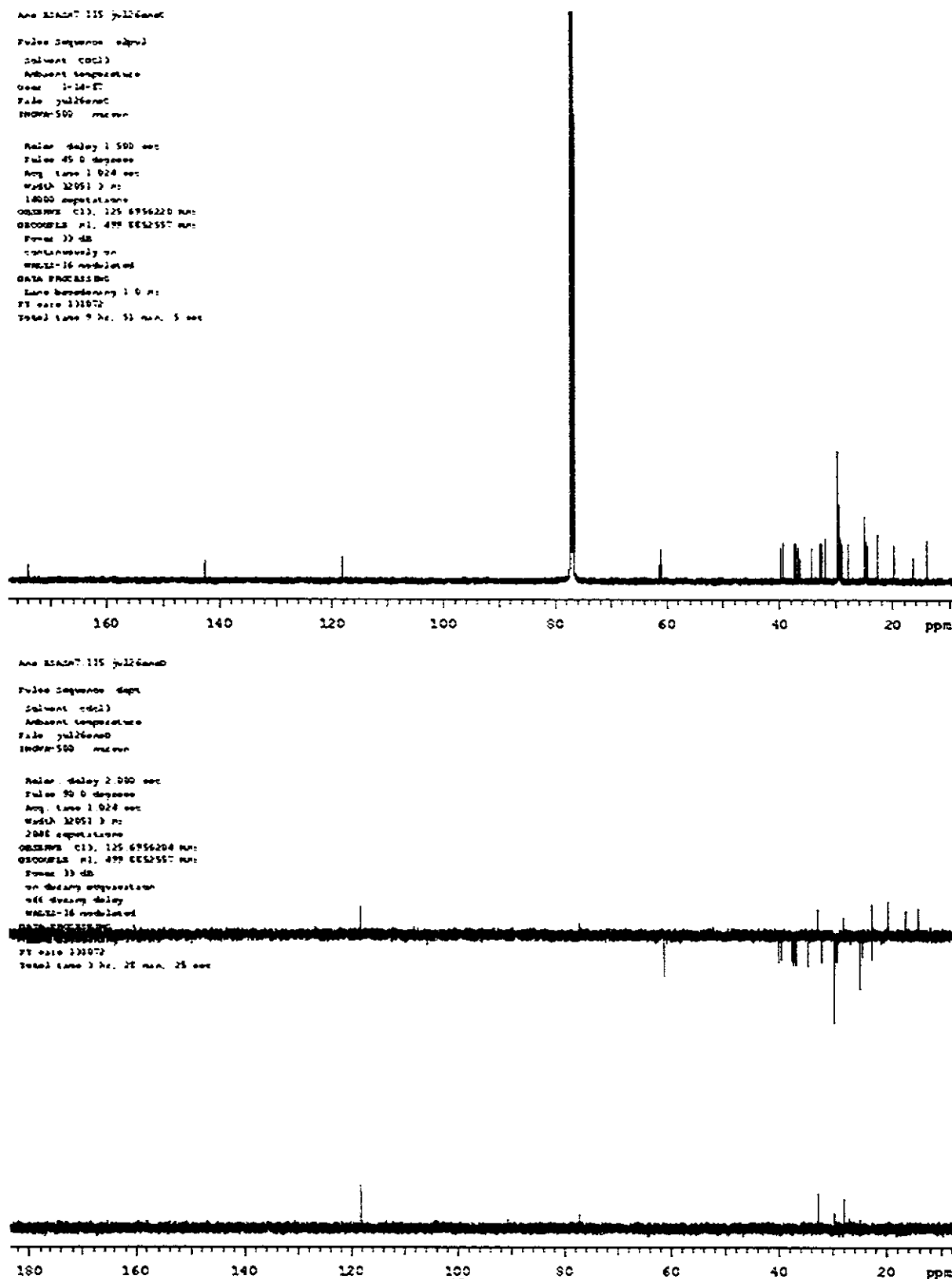


Figura 38: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, CDCl₃) de 36.

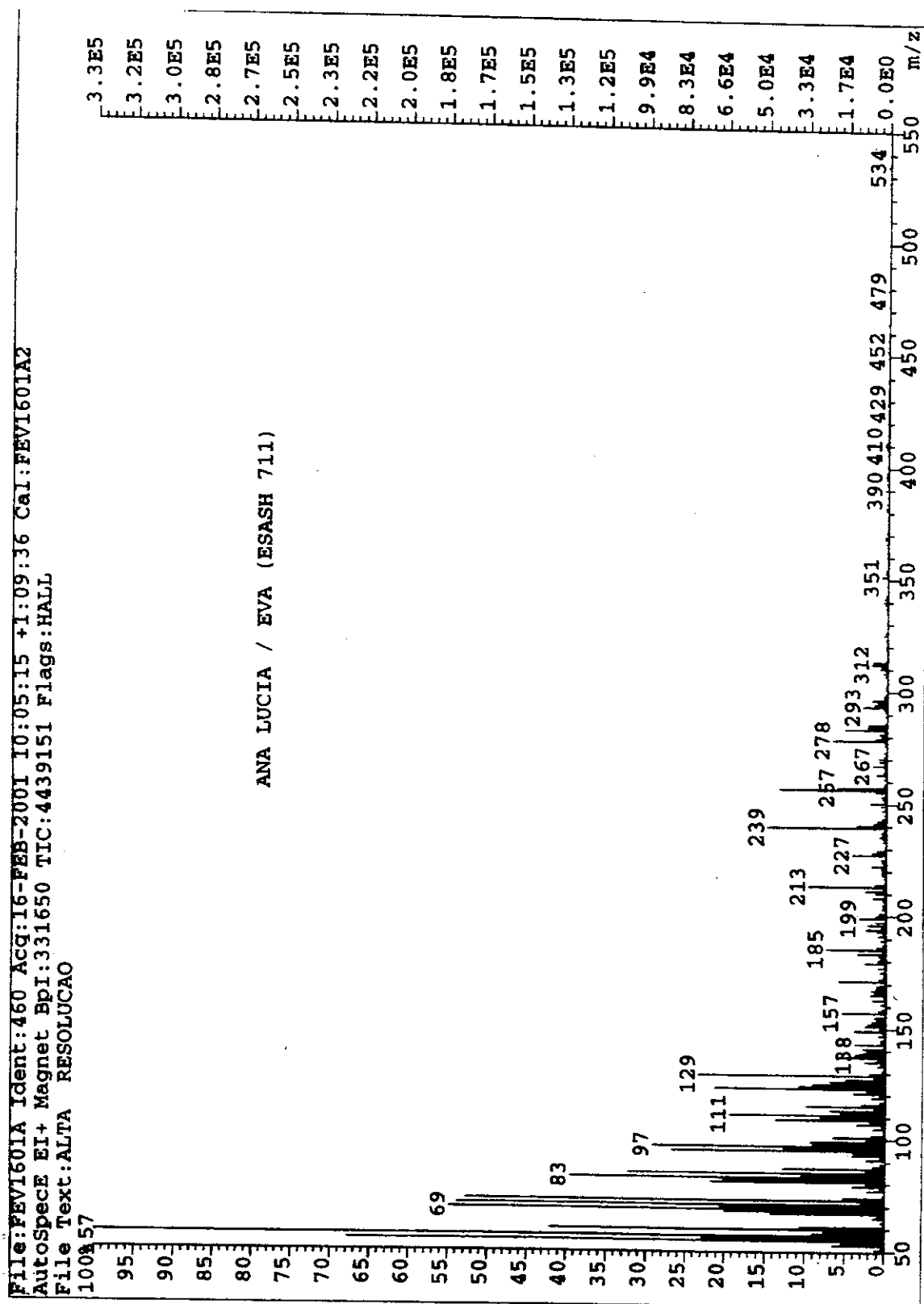


Figura 41: Espectro de massas (impacto eletrônico, baixa resolução) de 36.

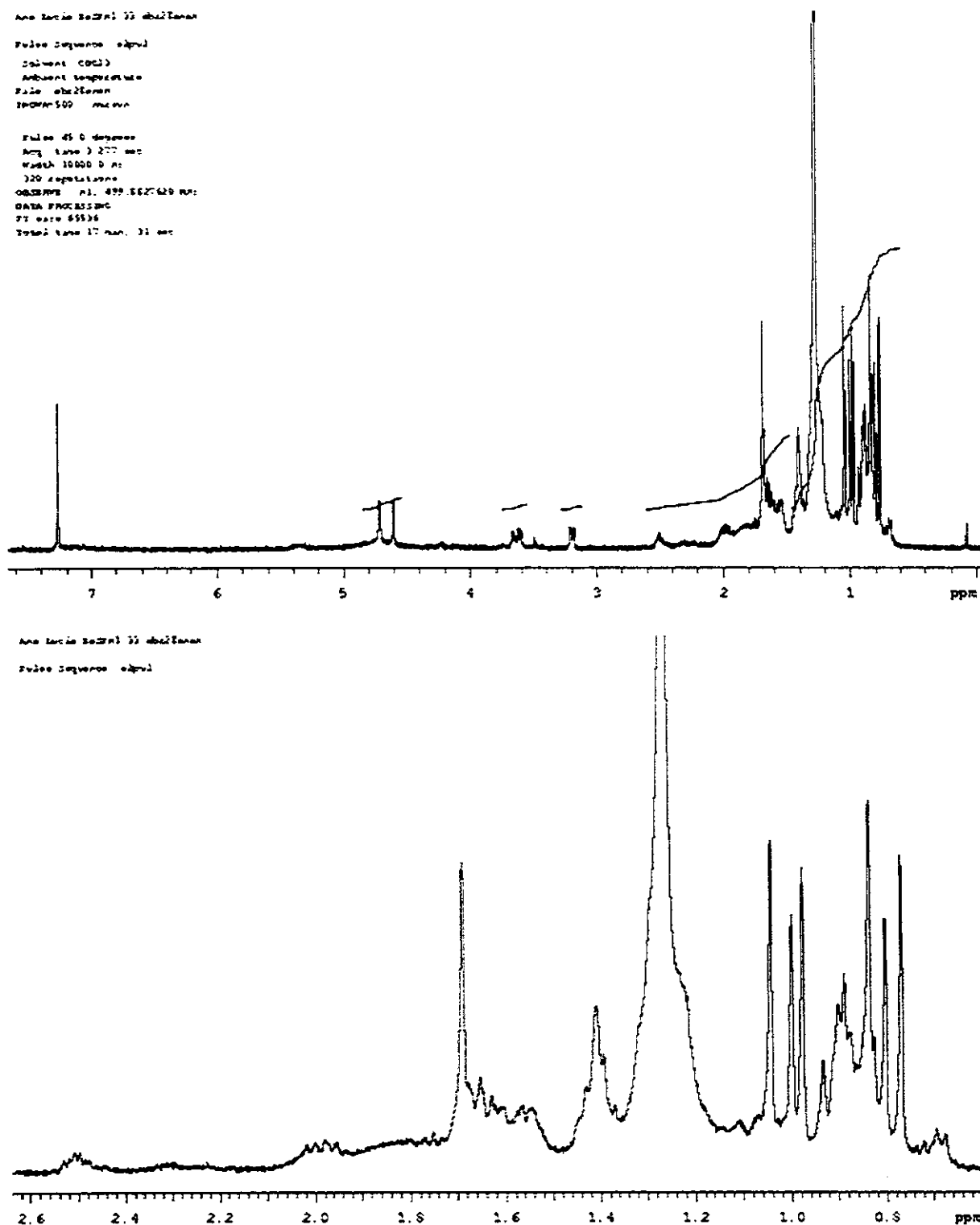


Figura 43: Espectro de RMN¹H (500MHz, CDCl₃/TMS) de 1.

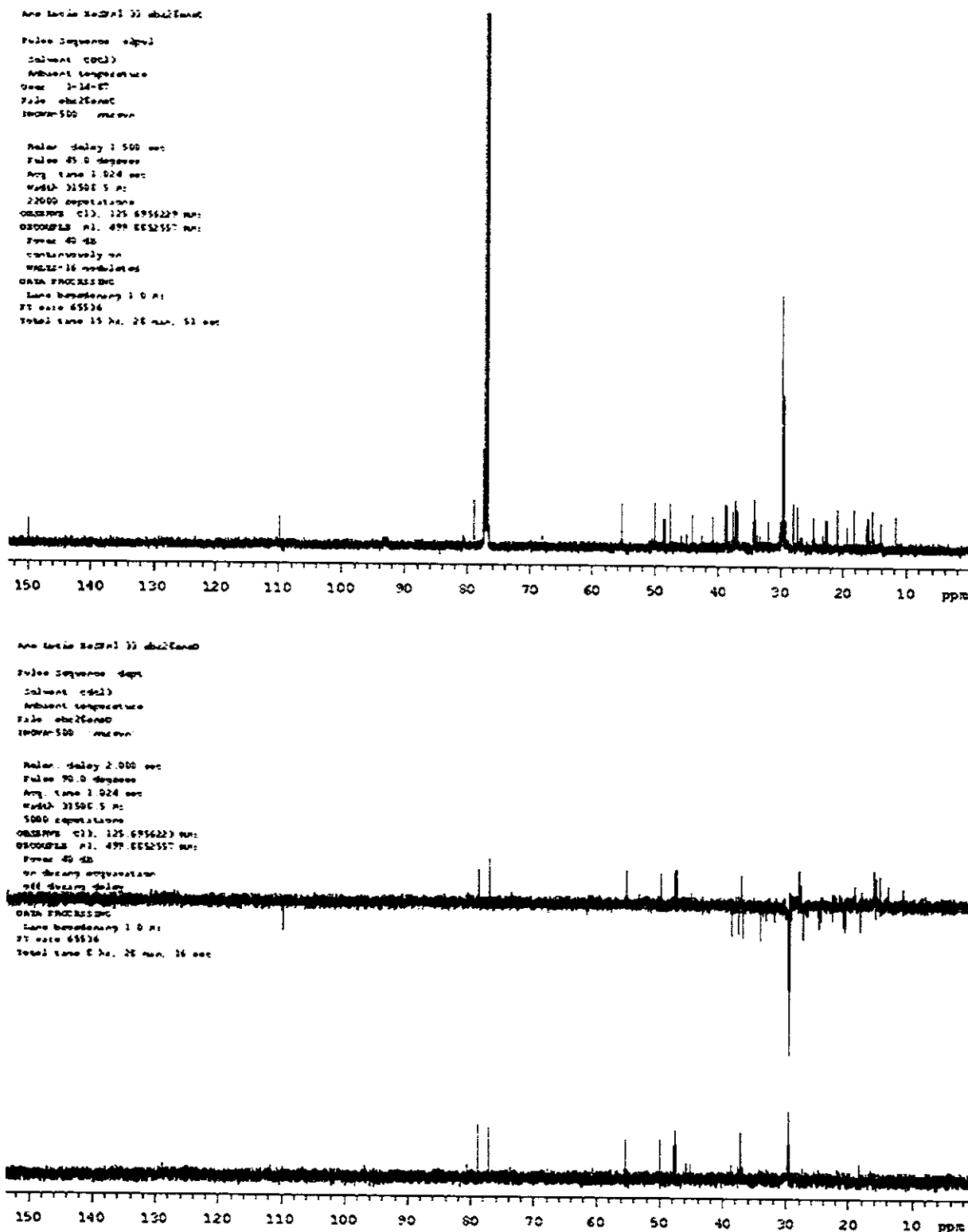


Figura 44: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, CDCl₃) de 1.

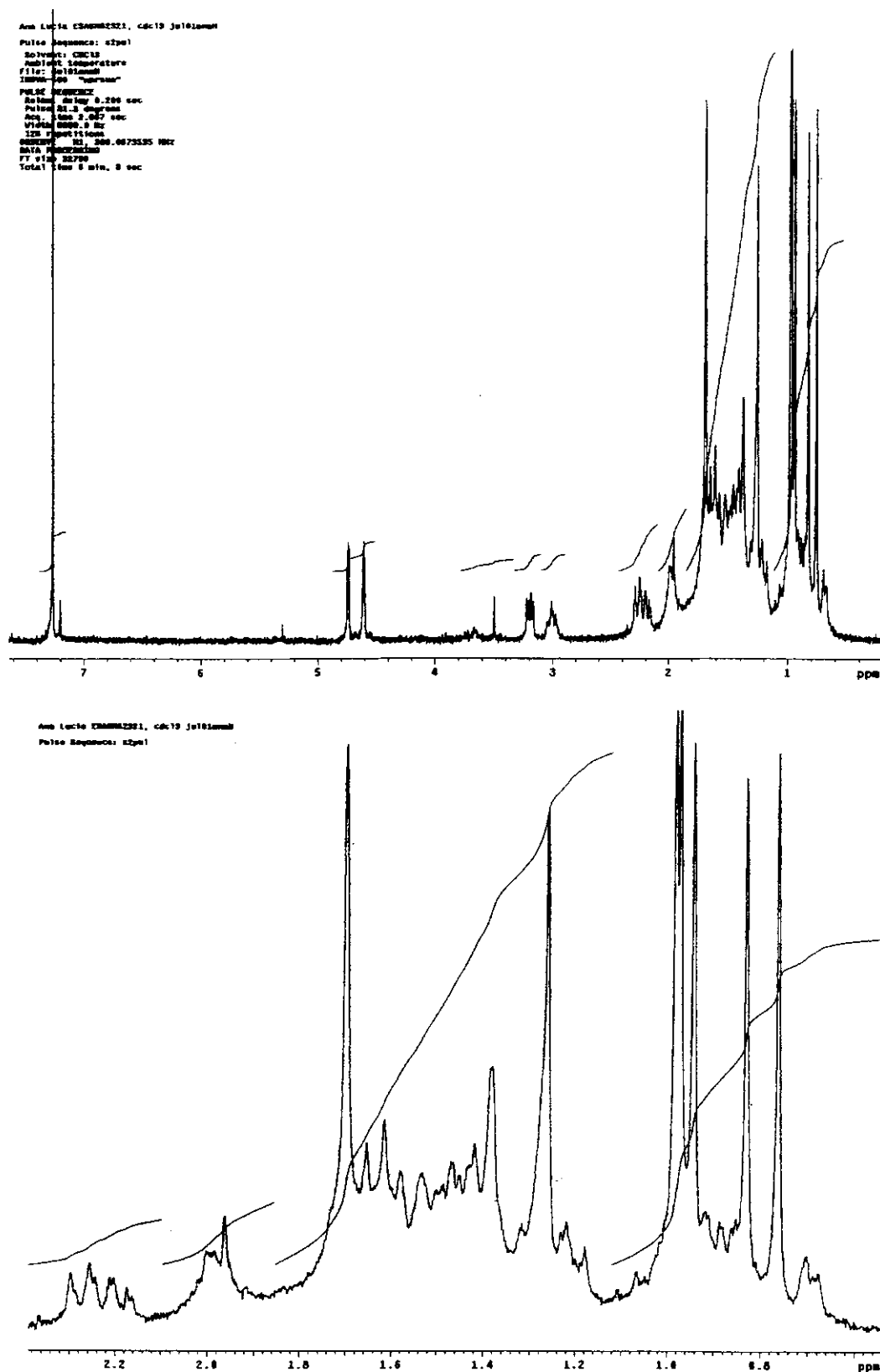


Figura 46: Espectro de RMN¹H (500MHz, CDCl₃/TMS) de 17.

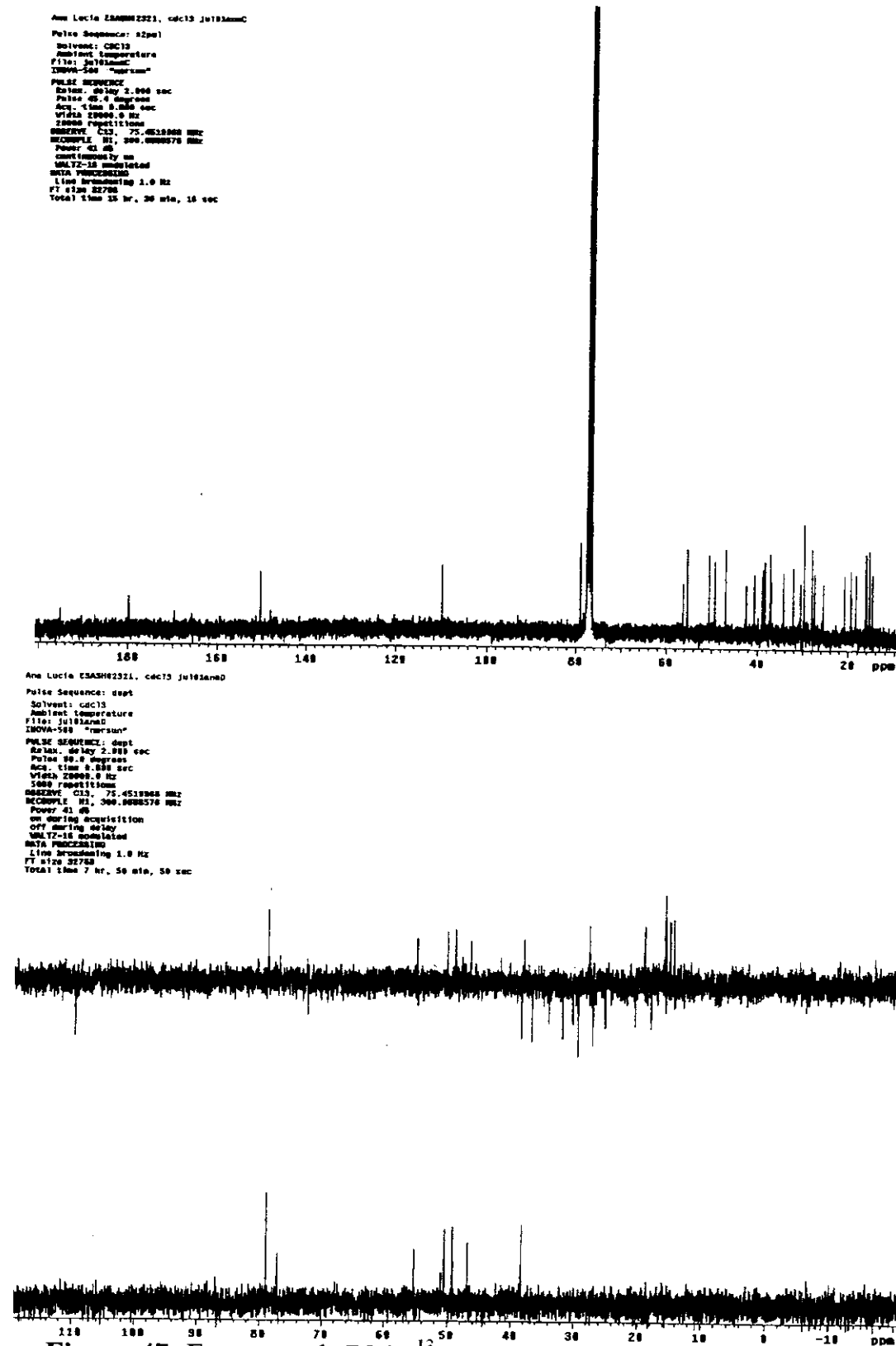


Figura 47: Espectros de RMN ^{13}C e DEPT (125MHz, CDCl_3) de 17.

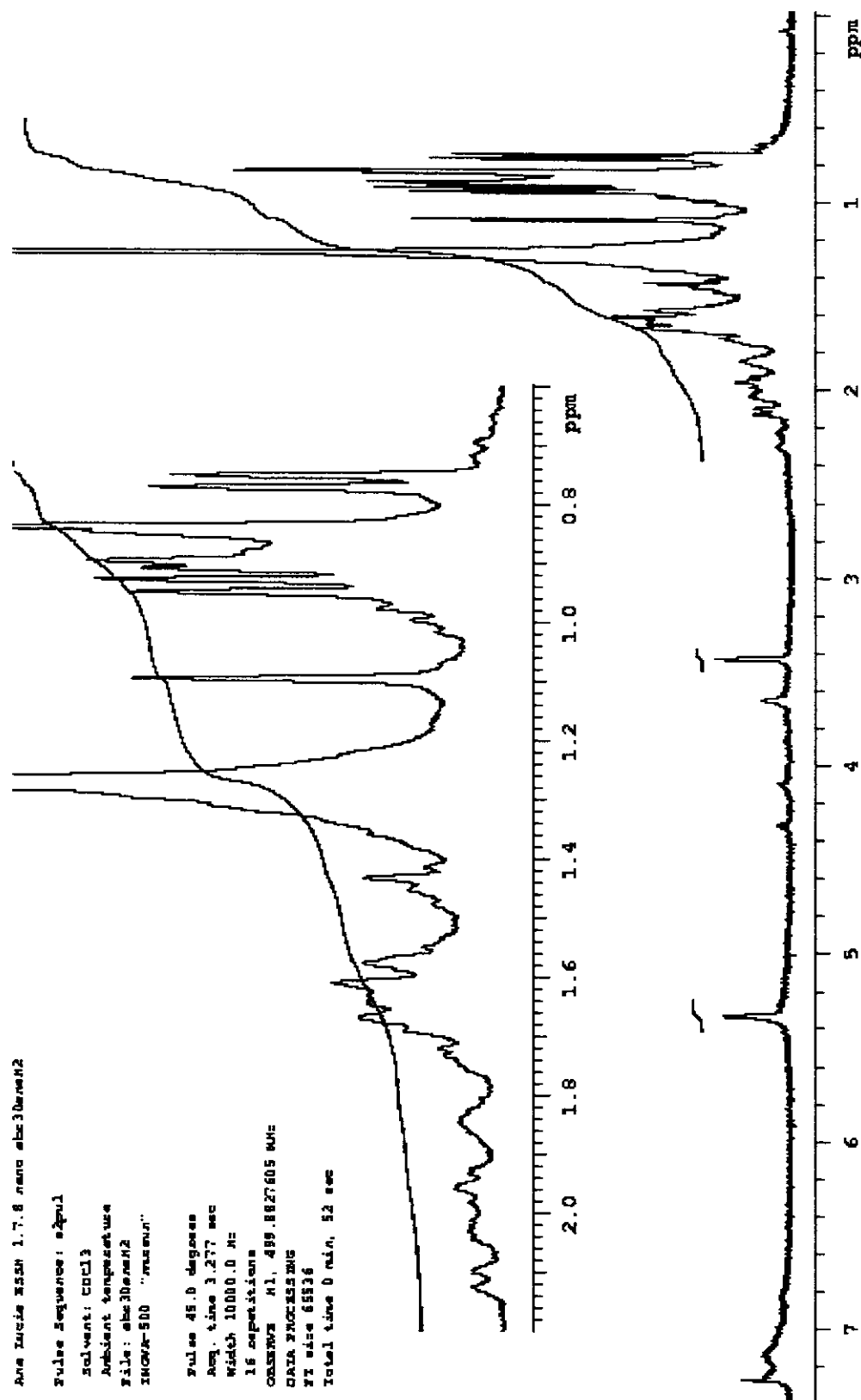


Figura 48: Espectro de RMN¹H (500MHz, CDCl₃/TMS) de 39.

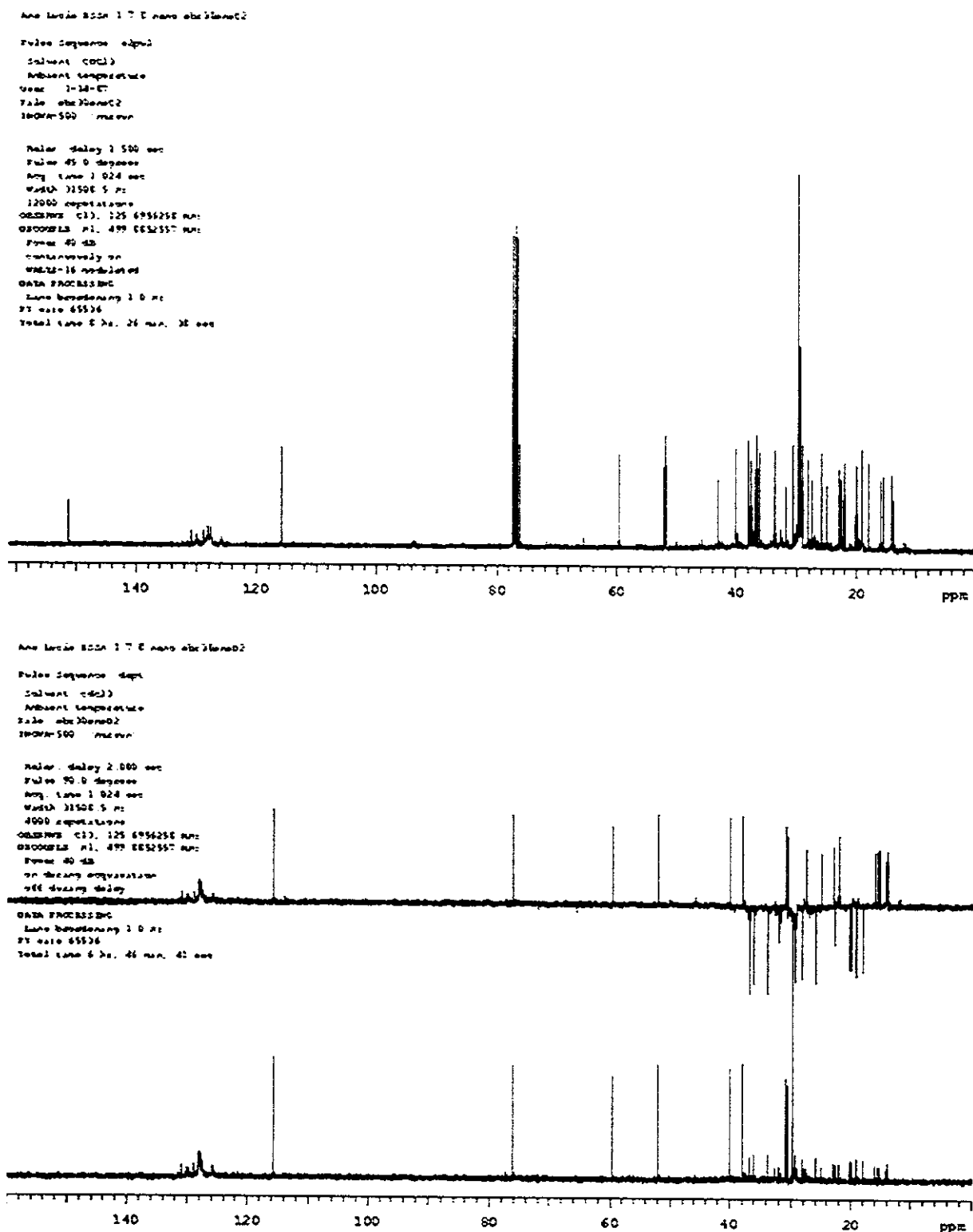


Figura 49: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, CDCl₃) de 39.

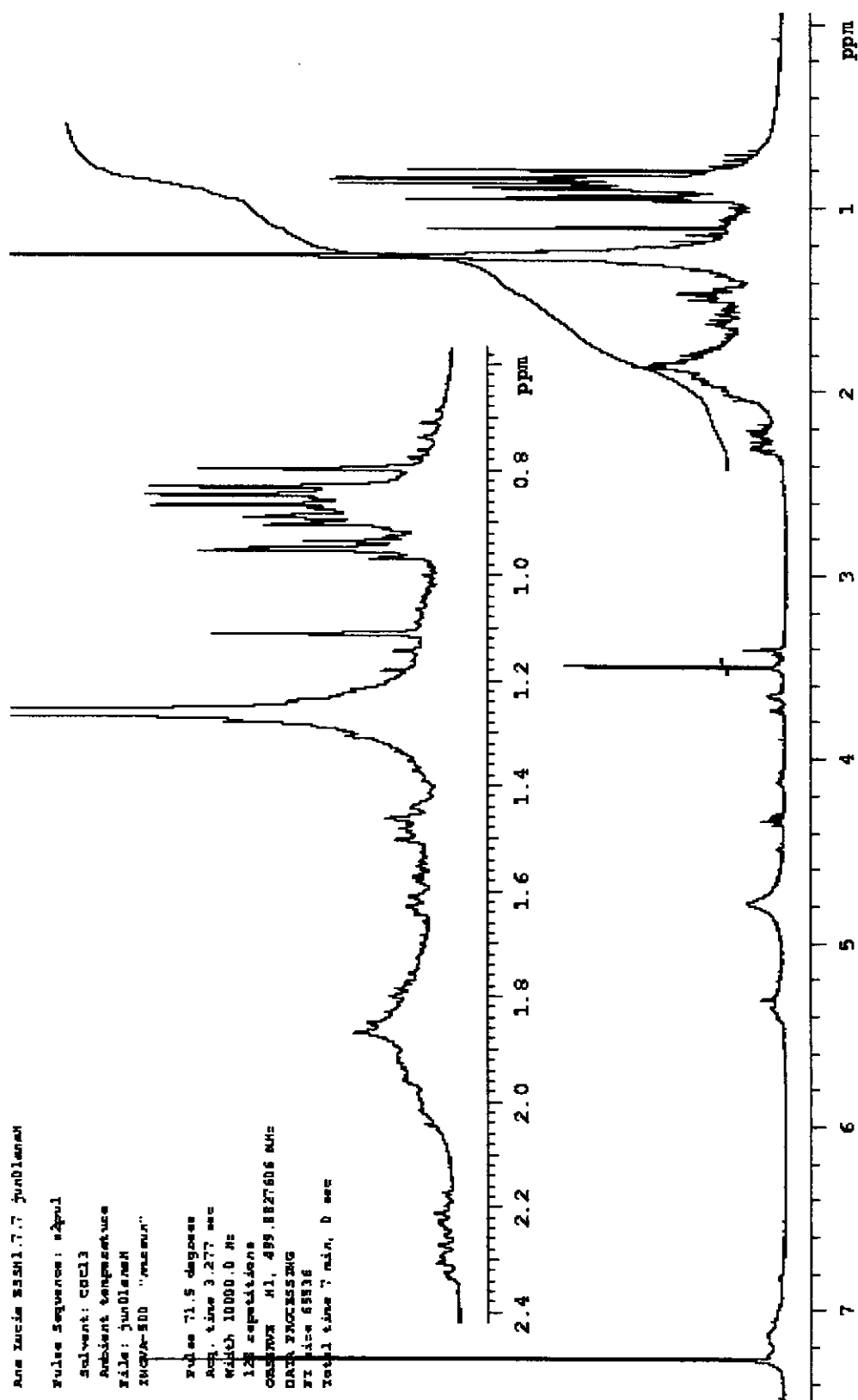


Figura 50: Espectro de RMN¹H (500MHz, CDCl₃/TMS) de **40**.

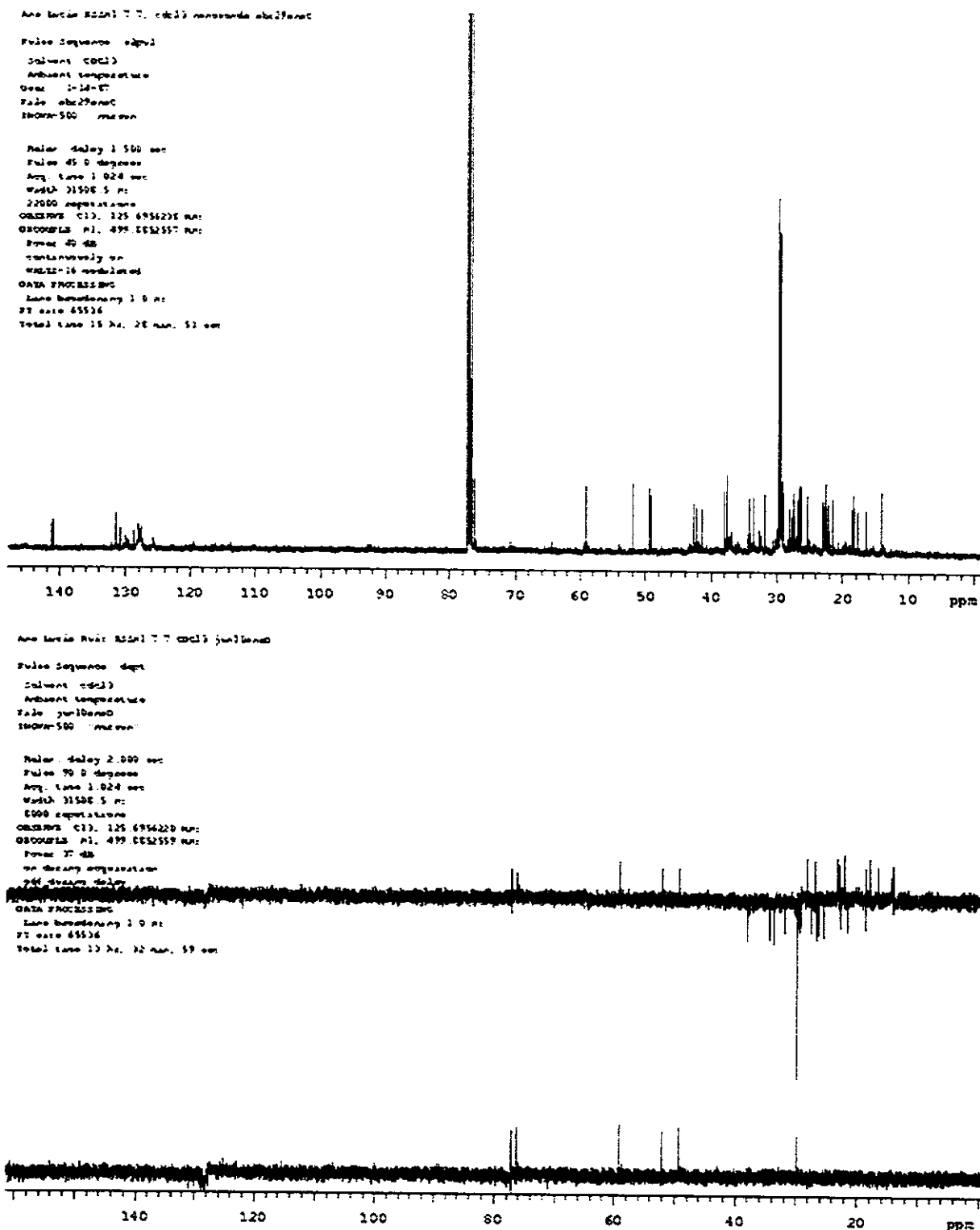


Figura 51: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, CDCl₃) de 40.

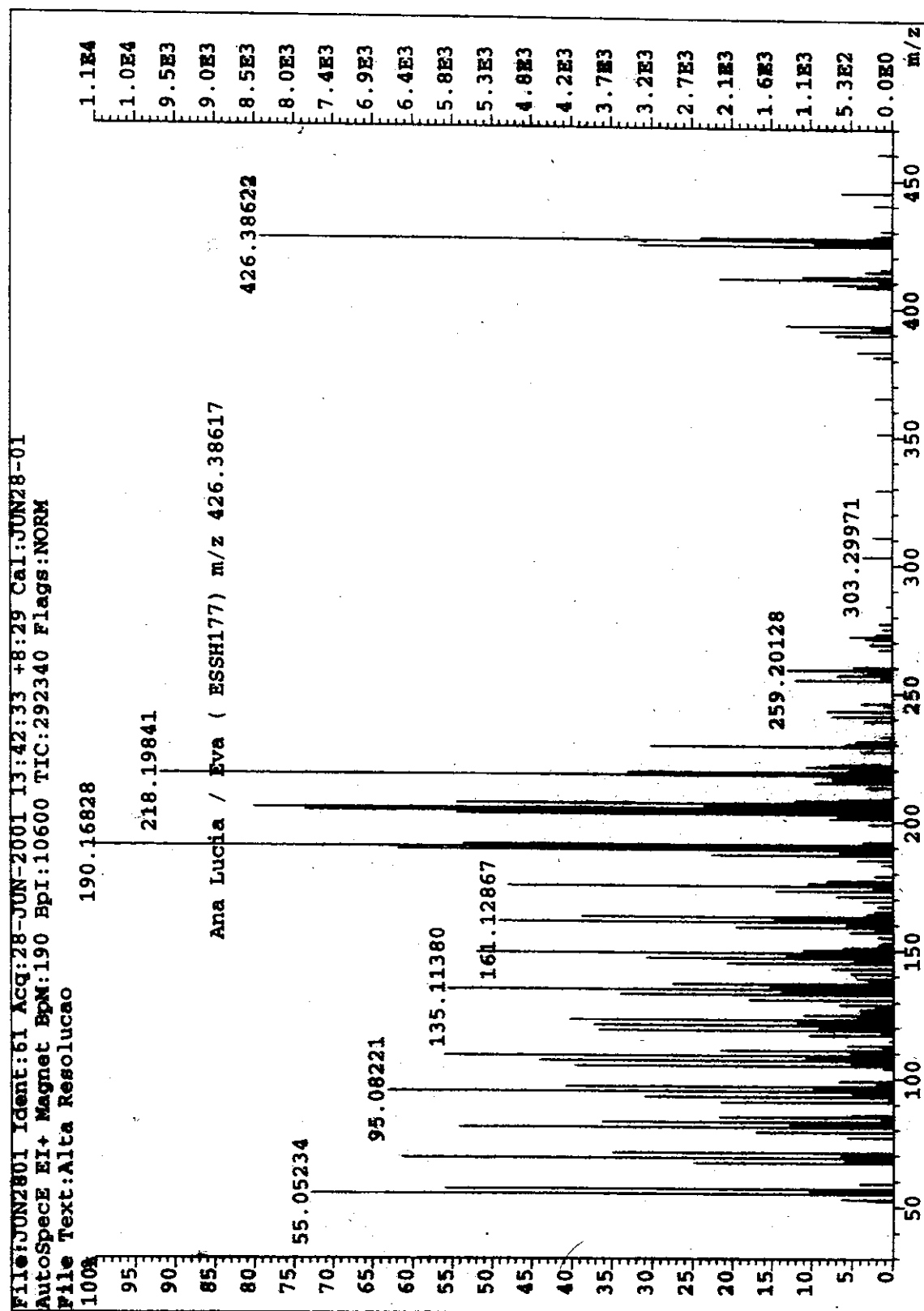


Figura 52: Espectro de massas (impacto eletrônico, alta resolução) de 40.

Amo. teste: 82261 7.7 jvb01anexa502

Pulse Sequence: HMQC

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

Gate: 1-1d-ET

File: jvb01anexa502

INSTR: 500 MHz

Pulse delay: 1.000 sec

Avg. time: 0.224 sec

Width: 4574.0 Hz

20 width: 19705.4 Hz

160 experiments

2 x 96 accumulations

OBSERVE: F1, 499.827404 MHz

OBSERVE2: F2, 125.769767 MHz

Power: 50 dB

on decoupling experiment

off decoupling delay

CANON: 1 modulation

DATA PROCESSING

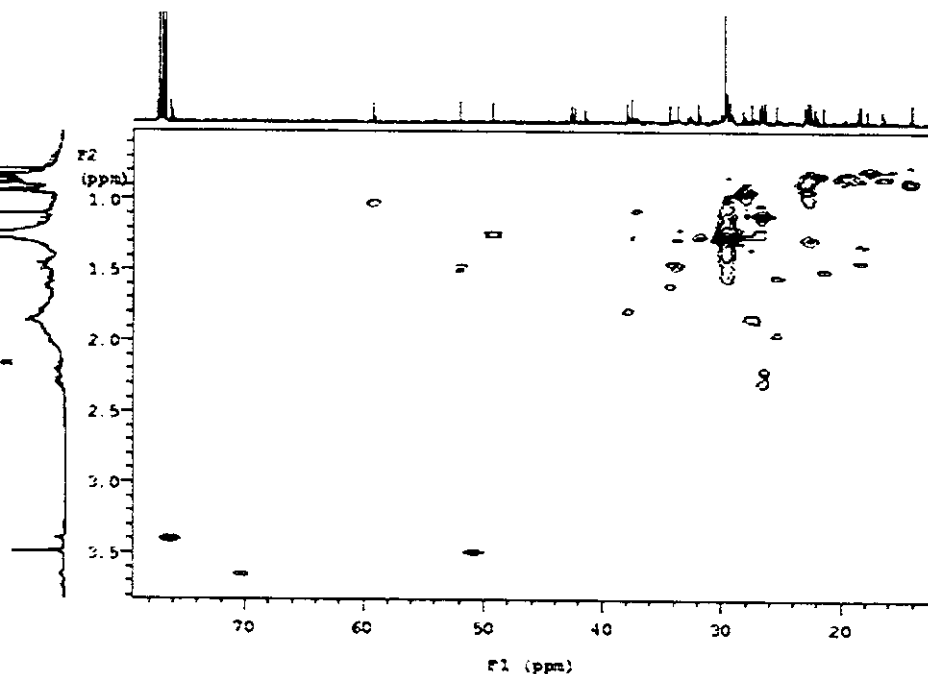
Gate acquisition: 0.100 sec

F1 DATA PROCESSING

Gate acquisition: 0.005 sec

F1 gate: 2048 x 1024

Total time: 16 hr, 53 min, 37 sec



a

Amo. teste: 82261 7.7 jvb01anexa502

Pulse Sequence: gHMBC

Solvent: CDCl₃

Ambient temperature

Gate: 1-1d-ET

File: jvb01anexa502

INSTR: 500 MHz

Pulse delay: 1.000 sec

Avg. time: 0.213 sec

Width: 4610.0 Hz

20 width: 19705.4 Hz

1152 experiments

96 accumulations

OBSERVE: F1, 499.827553 MHz

DATA PROCESSING

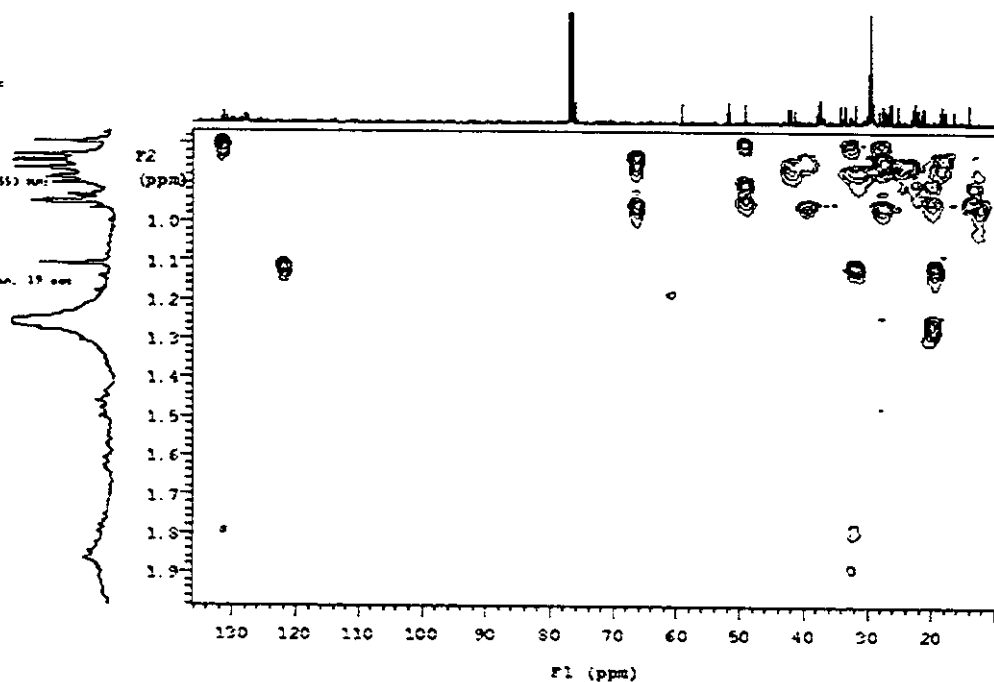
Gate: 0.106 sec

F1 DATA PROCESSING

Gate: 0.005 sec

F1 gate: 2048 x 1024

Total time: 39 hr, 36 min, 19 sec



b

Figura 55: Gráfico de contorno dos experimentos bidimensionais HSQC (a) e HMBC (b) de **40**.

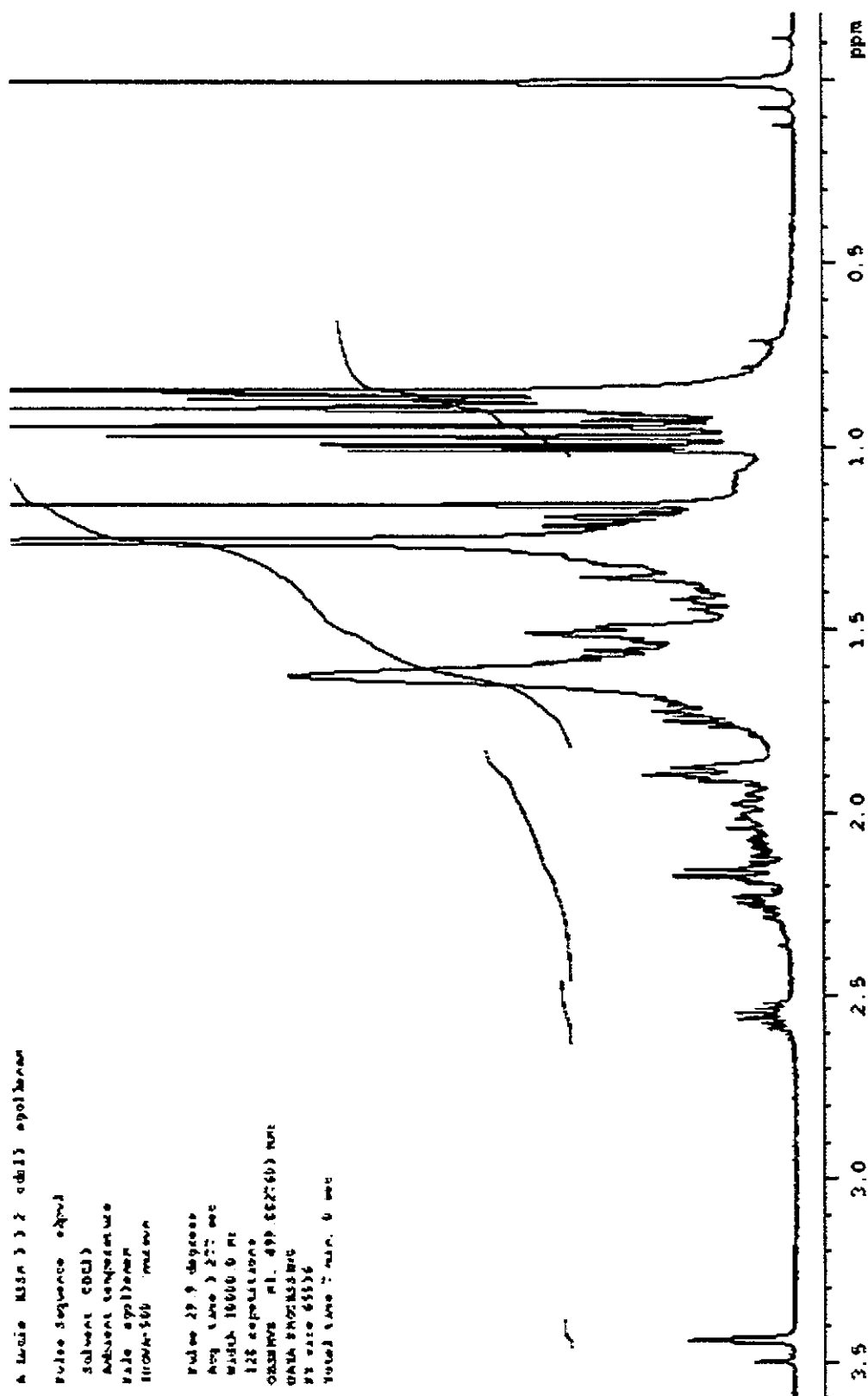
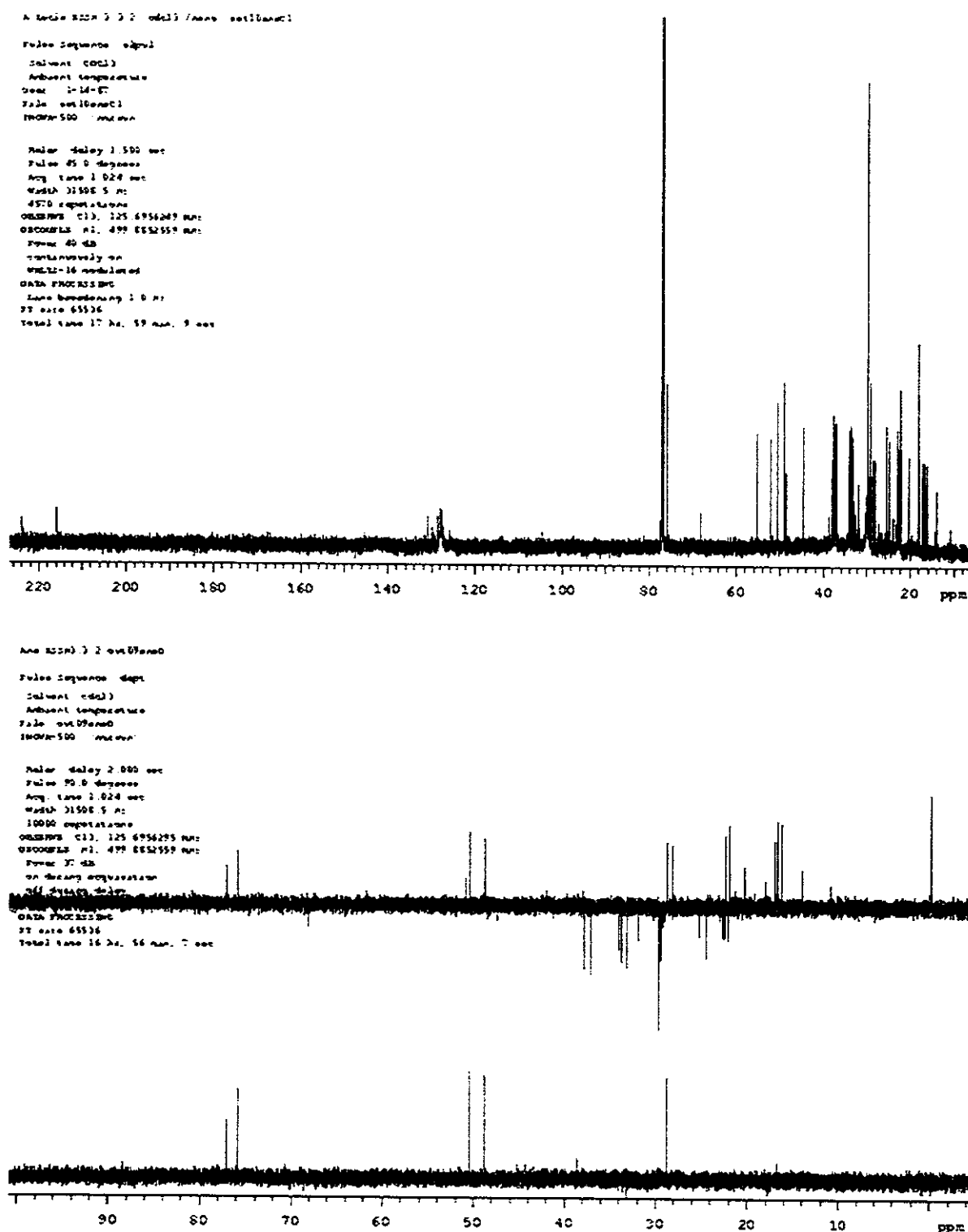
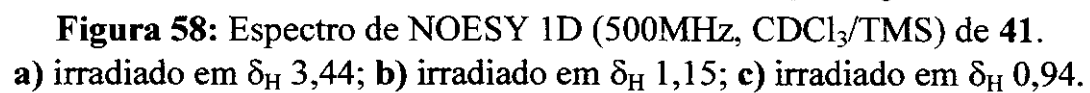


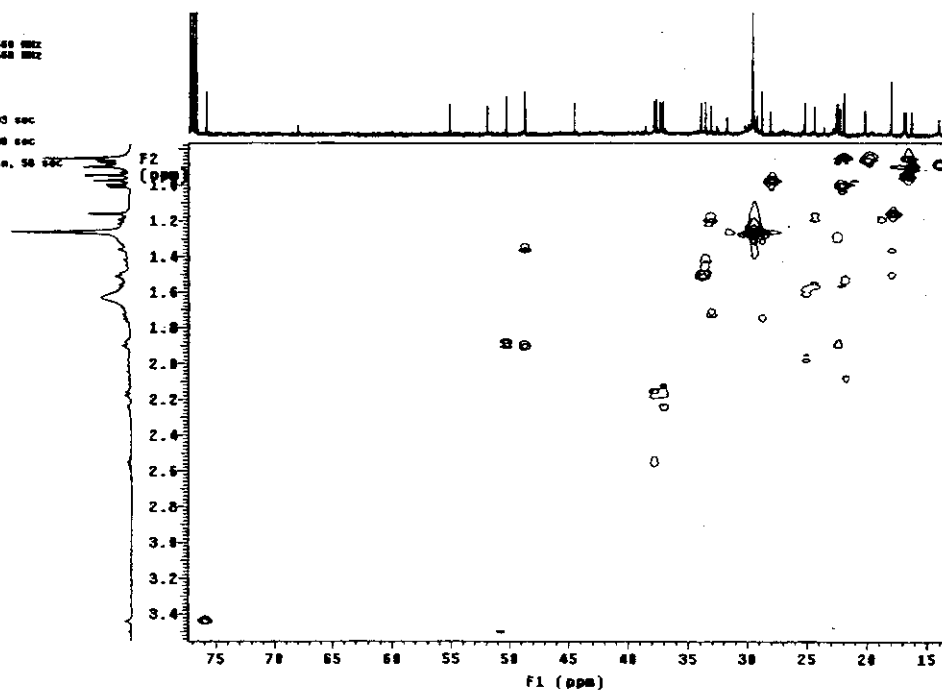
Figura 56: Espectro de RMN¹H (500MHz, CDCl₃/TMS) de 41.





Am: Lucie T @ Reiz ERM 3.3.2 out28ana199C
 Pulse Sequence: WALT
 Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 Date: 1-14-87
 File: out28ana199C
 INOVA-500 "nuc100"

Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.222 sec
 Width 4607.8 Hz
 2D Width 38882.4 Hz
 200 repetitions
 2 x 125 increments
 OBSERVE F1, 499.8827568 MHz
 PREAMP C13, 125.760508 MHz
 Power 50 dB
 On during acquisition
 off during delay
 GARP-1 simulated
 DATA PROCESSING
 Gamma amplification 0.100 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gamma amplification 0.000 sec
 FT size 1040 x 1000
 Total time 21 hr, 45 min, 50 sec

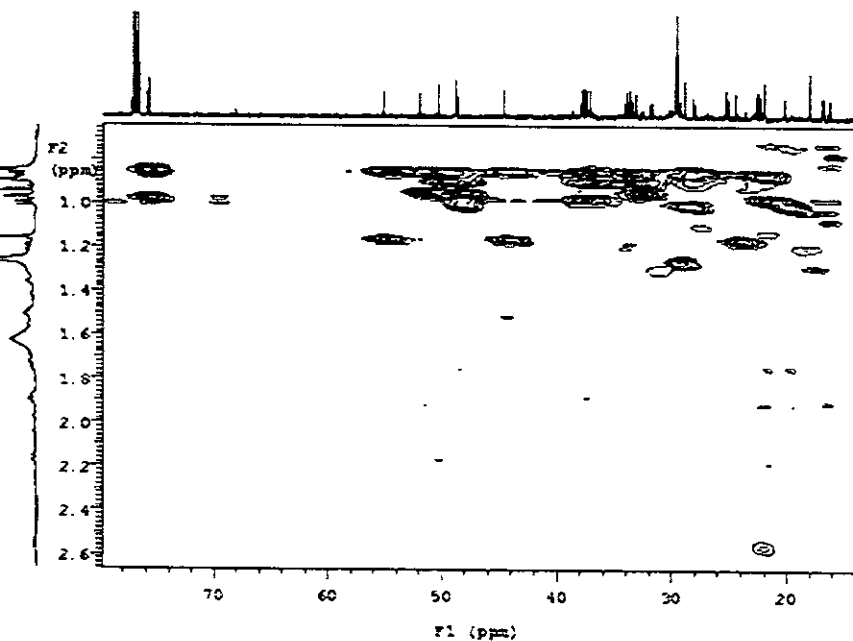


a

A: Lucie ERM 3.3.2 out28ana199C

Pulse Sequence: gmdc
 Solvent: CDCl₃
 Ambient temperature
 Date: 1-14-87
 File: out28ana199C
 INOVA-500 "nuc100"

Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.222 sec
 Width 4607.8 Hz
 2D Width 31508.5 Hz
 400 repetitions
 125 increments
 OBSERVE F1, 499.8827568 MHz
 DATA PROCESSING
 Gamma amplification 0.121 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gamma amplification 0.004 sec
 FT size 2040 x 1000
 Total time 18 hr, 24 min, 31 sec



b

Figura 59: Gráfico de contorno dos experimentos bidimensionais HSQC (a) e HMBC (b) de **41**.

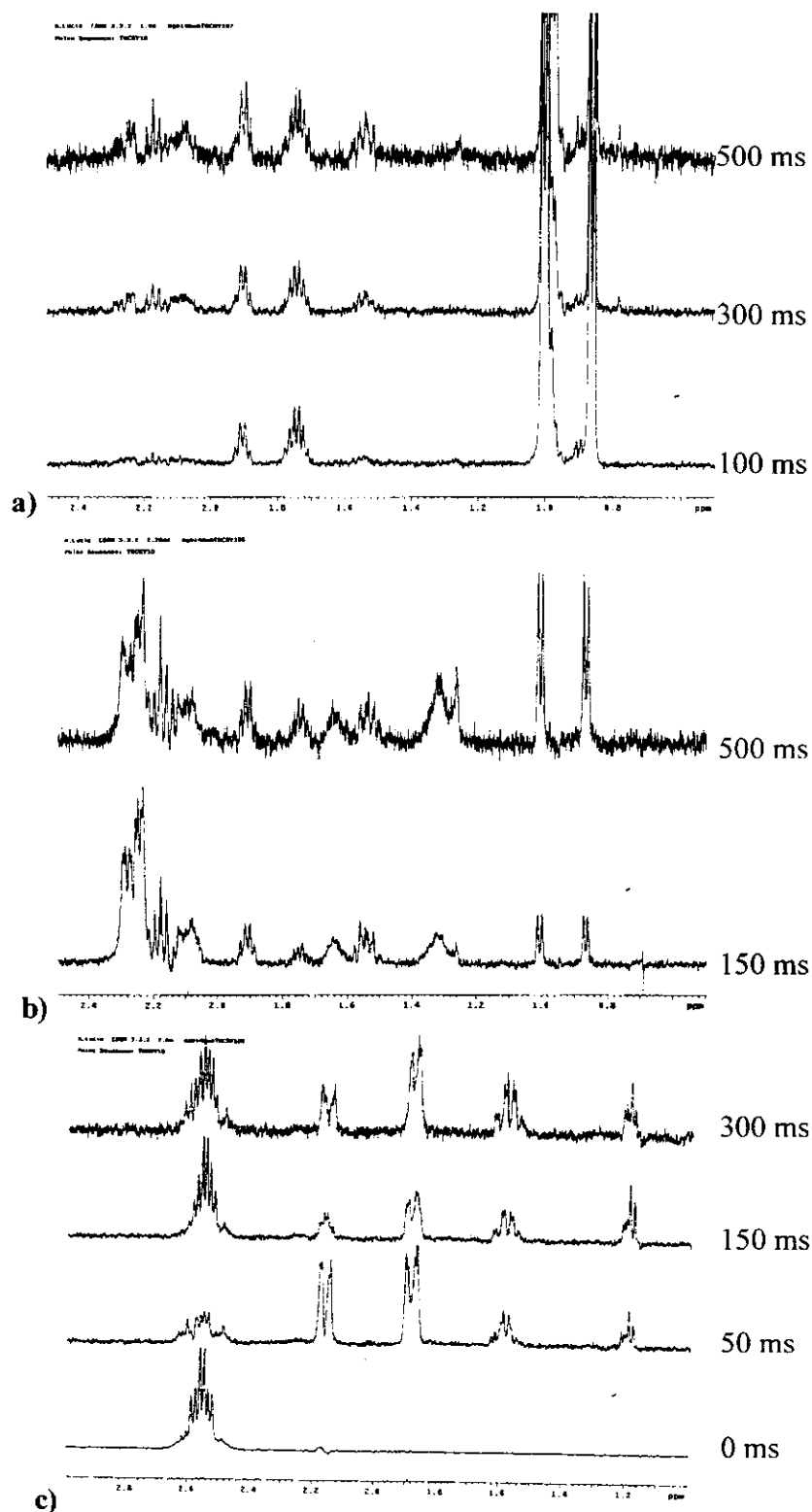


Figura 62: Espectro de TOCSY 1D (500MHz, CDCl₃/TMS) de 41. a) irradiado em δ_H 1,00; b) irradiado em δ_H 2,28; c) irradiado em δ_H 2,60.

A Luria R22A 3.3.2 cd33 apeldanayCOSY

Pulse Sequence gCOSY

Solvent CDCl₃

Arbuser temperature

Pulse apeldanayCOSY

INSTR-500 mhz

Pulse delay 1.000 sec

Acq. time 0.226 sec

width 4533 Hz

20 width 4533 Hz

16 acquisition

128 acquisition

COSYPRG v1.499 EE27605 mhz

DATA PROCESSING

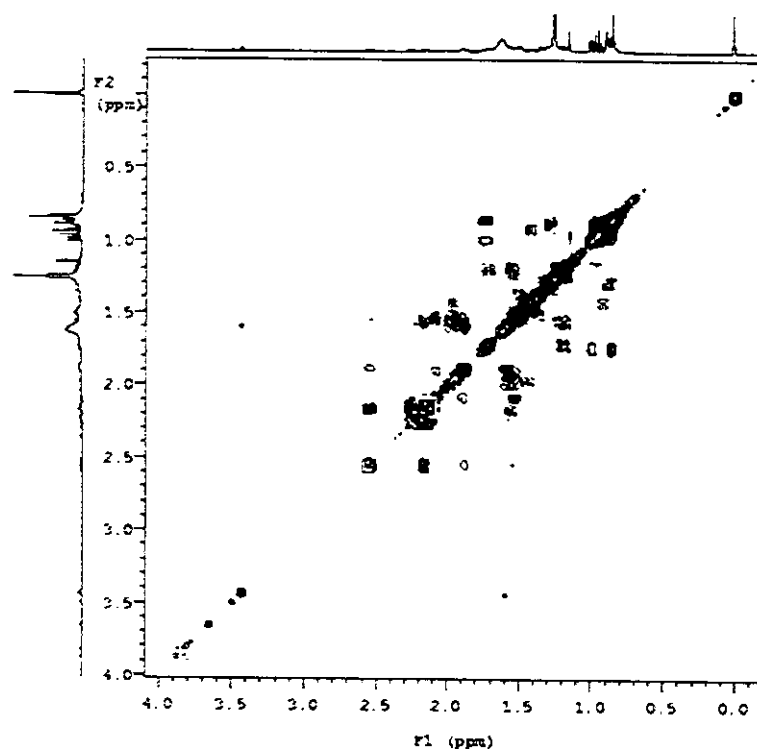
Sq. same ball 0.113 sec

F1 ORCA PROCESSING

Same ball 0.025 sec

FT rate 2048 Hz

Total time 43 min. 5 sec



A Luria R22A 3.3.2 cd33 apeldanayCOSY

Pulse Sequence gCOSY

Solvent CDCl₃

Arbuser temperature

Pulse apeldanayCOSY

INSTR-500 mhz

Pulse delay 1.000 sec

Acq. time 0.226 sec

width 4533 Hz

20 width 4533 Hz

16 acquisition

128 acquisition

COSYPRG v1.499 EE27605 mhz

DATA PROCESSING

Sq. same ball 0.113 sec

F1 ORCA PROCESSING

Same ball 0.025 sec

FT rate 2048 Hz

Total time 43 min. 5 sec

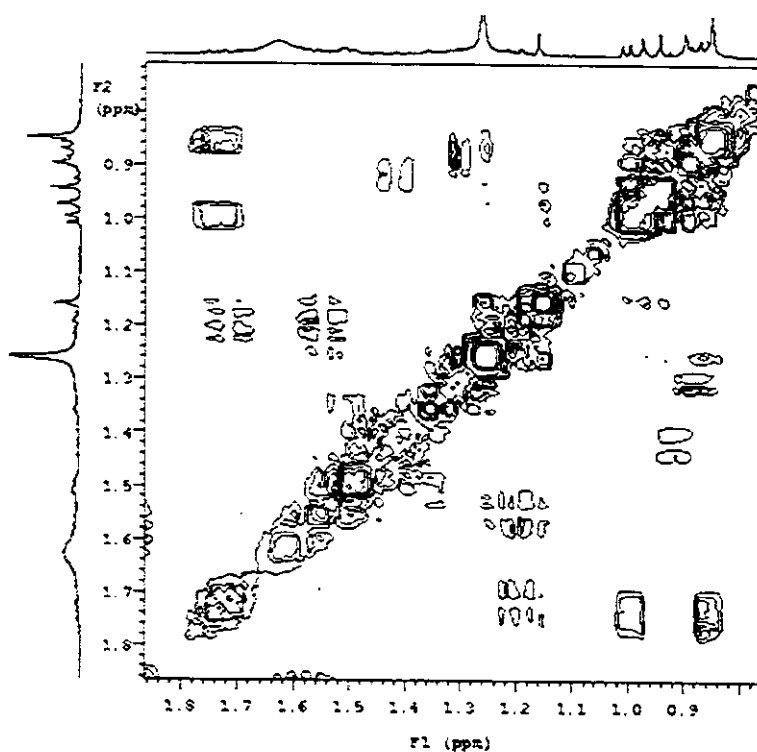


Figura 63: Gráficos de contorno do experimento gCOSY de 41.

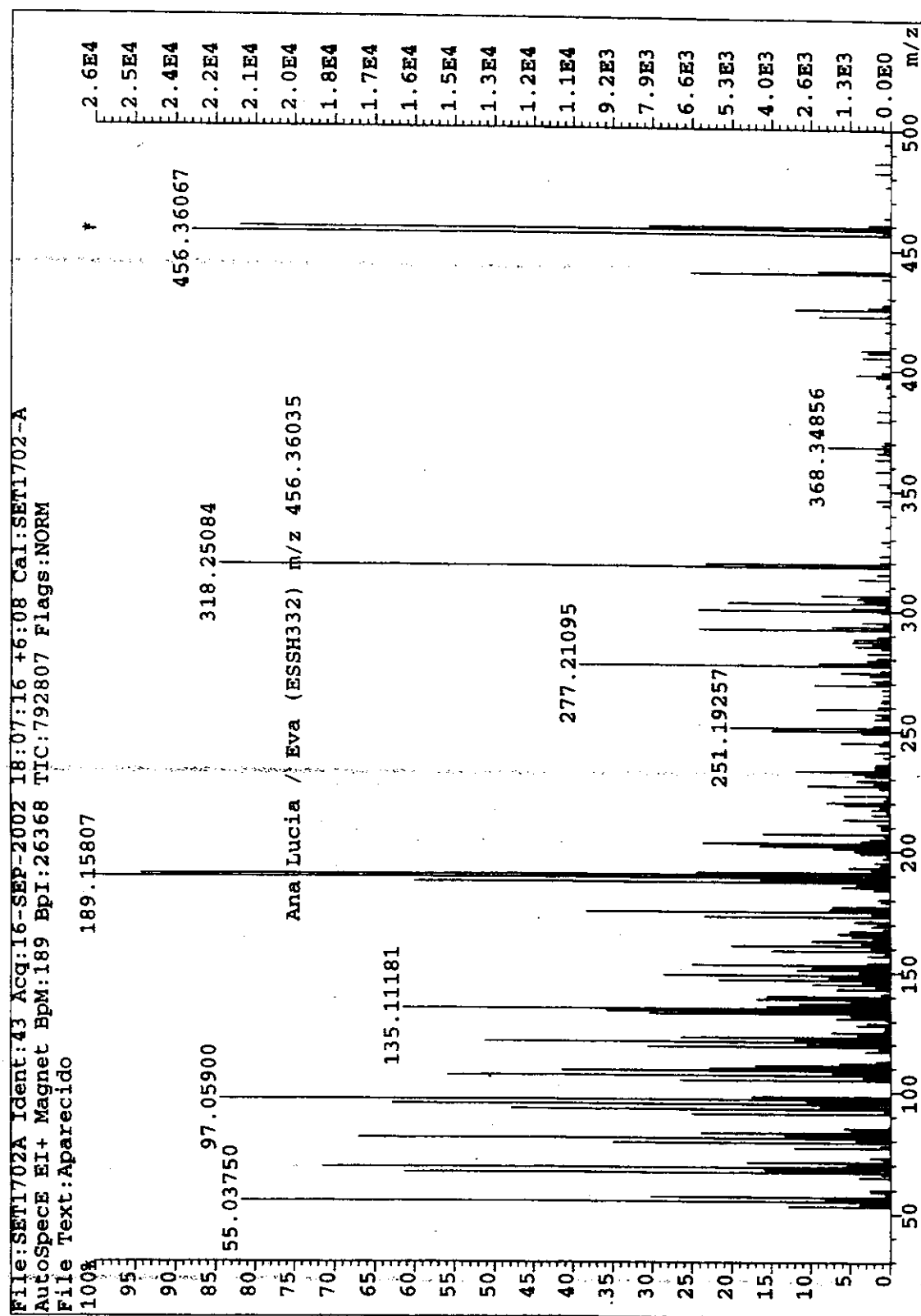


Figura 66: Espectro de massas (impacto eletrônico, alta resolução) de 41.

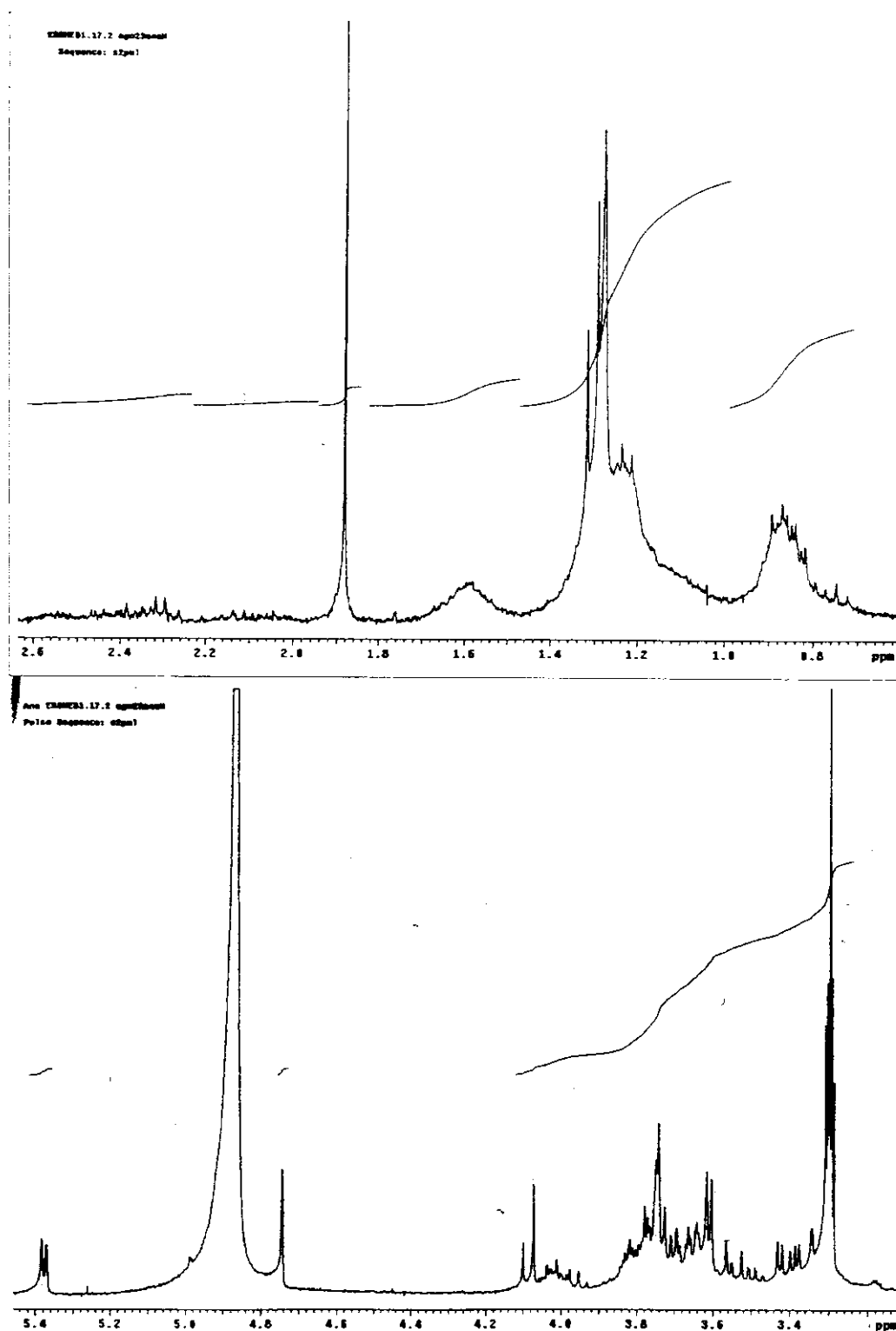


Figura 68: Espectro de RMN^1H (500MHz, CD_3OD) de 48.

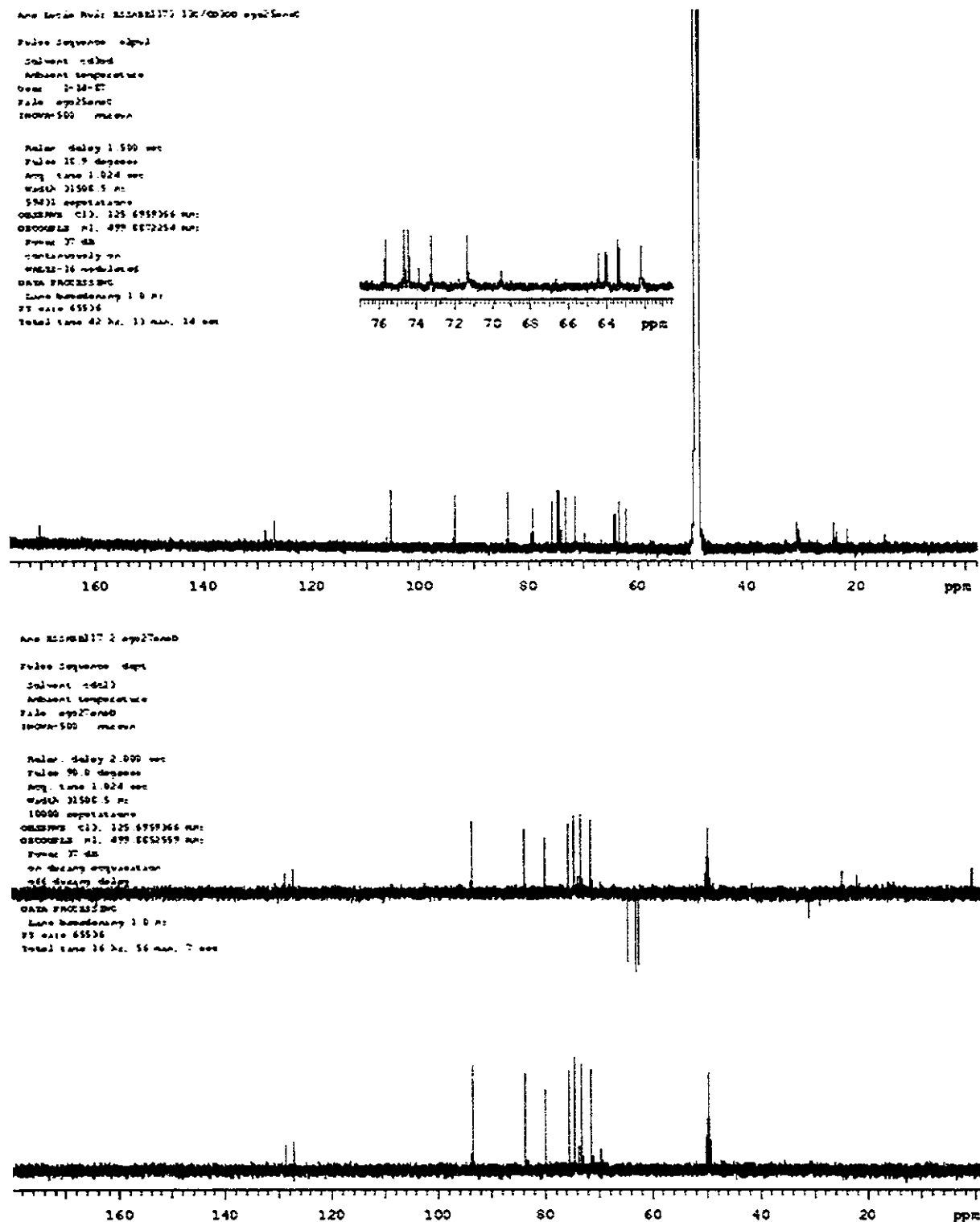


Figura 69: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, CD₃OD) de 48.



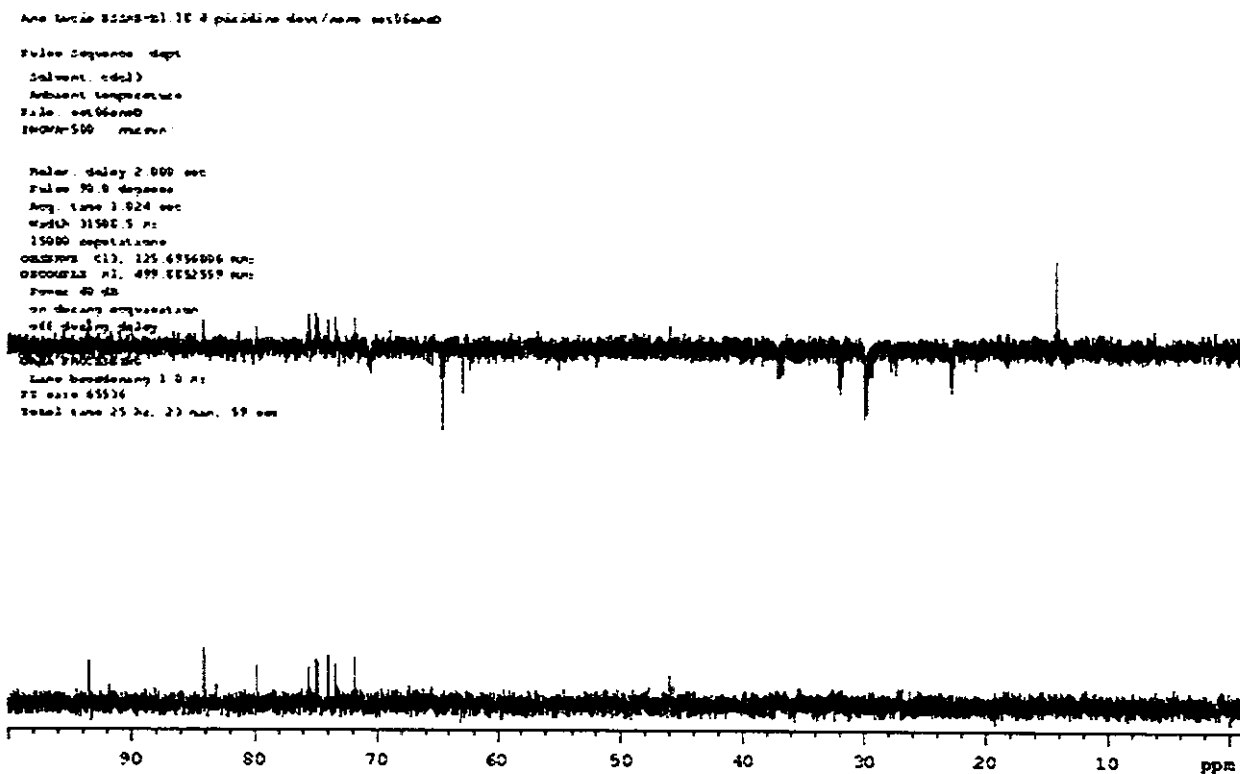
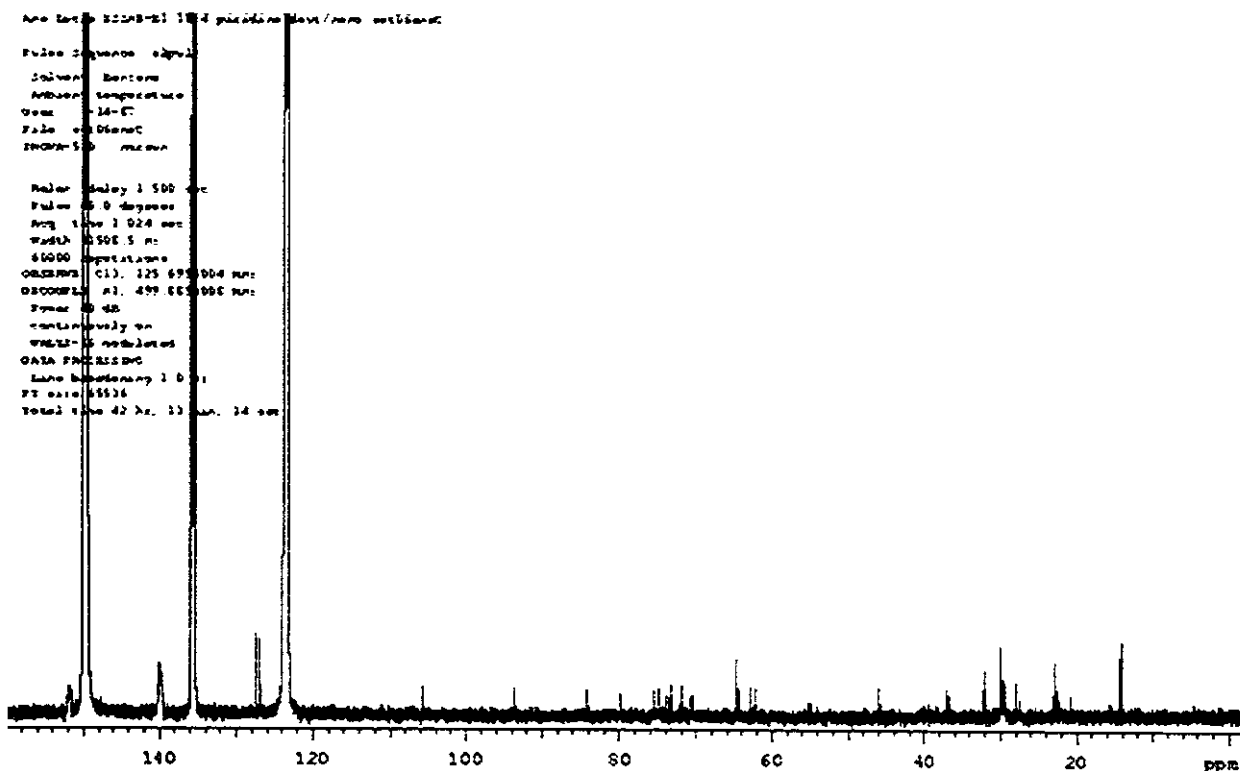


Figura 73: Espectros de RMN¹³C e DEPT (125MHz, Pyr-D₅) de 49.

CAPÍTULO II – ANÁLISE DOS ÓLEOS VOLÁTEIS

II. 1. Introdução

Plantas anemófilas, isto é, polinizadas pelo vento, apresentam redução das características de atração e recompensa a visitantes como ocorre na maioria dos gêneros de Cyperaceae e com quase todas as espécies de *Eleocharis*, que apresentam inflorescências ocráceas sem odor aparente (Figura 1).



Figura 1: *E. sellowiana* – Notar as inflorescências ocráceas.

Porém, a inflorescência de *E. elegans* (Kunth) Roem. & Schult. (série Palustriformae) possui coloração branca (Figura 2) com ligeiro odor agradável e durante o cultivo desta espécie em tanques no Departamento de Botânica (IB-Unicamp), observou-se que as inflorescências eram visitadas por insetos que poderiam estar atuando como polinizadores. Esta espécie é relatada como, provavelmente, a única representante tropical do gênero que é atraente aos olhos do coletor (Referência 2, Introdução Geral).



Figura 2: Detalhe da inflorescência de *E. elegans*.

Um amplo levantamento bibliográfico (*Chemical Abstracts*, *Web of Science*, *Biological Abstracts*) revelou que nenhum representante da família Cyperaceae já foi estudado quanto à composição de voláteis florais¹. Foram encontrados relatos de algumas ciperáceas², principalmente do gênero *Cyperus*³,

¹ Knudsen JT, Tollsten L, Bergström LG. Floral scents - a checklist of volatile compounds isolated by head-space techniques. *Phytochemistry* **33** (2): 253-280, 1993.

² a) Mahmoud Y, Bessiere JM, Dolmazon R. Composition of the essential oil from *Kyllinga erecta* S.. *J Agr Food Chem* **41** (2): 277-279, 1993.; b) Mve-Mba CE, Menut C, Lamaty G, Zollo PHA, Tchoumboungang F, Bessiere JM. Aromatic plants of tropical Central Africa. XXV. Volatiles constituents from rhizomes of *Scleria striatinux* de Wild. from Cameroon. *J Essent Oil Res* **8** (1): 59-61, 1996.

³ a) Soliman MM, Osman F, El-Sawy AA. Volatiles components of roasted chufa-tubers (*Cyperus esculentus*). *Agr Biol Chem Tokyo* **46** (11): 2843-2845, 1982; b) Komai K, Tang CS. Chemical constituents and inhibitory activities of essential oils from *Cyperus brevifolius* and *C. kyllingia*. *J Chem Ecol* **15** (8): 2171-2176, 1989; c) Komai K, Seto N, Matsubayachi K, Hamada M. Plant growth inhibition by a sesquiterpene ketoalcohol, cyperolone, isolated from purple nutsedge tubers. *Zasso Kenkyu* **35** (2): 164-168, 1990; d) Ekundayo O, Oderinde R, Ogundeyin M, Stahl-Biskup E. Essential oil constituents of *Cyperus tuberosus* Rottb. rhizomes. *Flavour Frag J* **6** (4): 261-264, 1991; e) Komai K, Tang CS, Nishimoto RK. Chemotypes of *Cyperus rotundus* in Pacific rim and basin: distribution and inhibitory activities of their essential oils. *J Chem Ecol* **17** (1): 1-8, 1991; f) Negbi M. A sweetmeat plant, a perfume plant and their weedy relatives: a chapter in the history of *Cyperus esculentus* L. and *C. rotundus* L. *Econ Bot* **46** (1): 64-71, 1992; g) Dhillon RS, Singh S, Kundra S, Basra AS. Studies on the composition and biological activity of essential oil from *Cyperus rotundus* Linn. *Plant Growth Regul* **13** (1): 89-93, 1993; h) Cantalejo MJ. Analysis of volatiles components derived from raw and roasted earth-almond (*Cyperus esculentus* L.). *J Agr Food Chem* **45** (5): 1853-1860, 1997; i) Sonwa MM, Koenig WA, Kubeczka K-H, Motl O. Sesquiterpenes from the essential oil of *Cyperus alopecuroides*. *Phytochemistry* **45** (7): 1435-1439, 1997; j) Cantalejo MJ. Sensor analyses of volatile components derived from earth-almond *Cyperus esculentus* L. and carob *Ceratonia siliqua* L.. *Zeitschrift fuer Lebensmittel Untersuchung und Forschung A* **208** (5-6): 373-378, 1999; l) Sonwa MM, Koenig WA. Constituents of the essential oil of *Cyperus alopecuroides*. *Phytochemistry* **56** (4): 321-326, 2001; m) Sonwa MM, Koenig WA. Chemical study of the essential oil of *Cyperus rotundus*. *Phytochemistry* **58** (5): 799-810, 2001.

que já foram analisadas quanto à composição dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação dos rizomas.

Propõe-se então estudar os voláteis florais presentes nas inflorescências de *E. elegans* e, para comparação, de *E. sellowiana*, assim como o óleo essencial dos rizomas de *E. elegans*.

II. 2. Materiais e Métodos

Em todas as análises, foi empregado cromatógrafo gasoso HP 6890 acoplado ao espectrômetro de massa HP 5973 Mass Selective Detector, utilizando-se as seguintes condições: injetor a 250°C em sistema *splitless*, coluna HP5 (30m) a uma temperatura inicial de 50°C e razão de aquecimento de 4°C até a temperatura final de 290°C e interface com o espectrômetro a 280°C. Foram também calculados os índices de retenção relativos⁴ das substâncias através da coinjeção das amostras com uma mistura padrão de n-alcanos C₁₁-C₃₀; as substâncias foram identificadas por comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles disponíveis nas bibliotecas eletrônicas Wiley e NIST e dos índices de retenção relativos com aqueles reportados na literatura⁵.

Estes experimentos foram realizados em colaboração com a professora Dra. Anita Joceline Marsaioli e sua aluna de doutoramento Adriana Flach.

⁴ a) Van den Dool H, Kratz PD. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J Chromatog* 2: 464-471, 1963; b) Kovats E. Gas Chromatographic characterization of organic substances in the retention index system. *Adv Chromatogr* 1: 229-247, 1965.

⁵ Adams RP. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, Illinois, USA. 469p. 1995.

II. 2. 1. Material Vegetal

As espécies de *Eleocharis* empregadas no presente projeto foram fornecidas pela Profa. Dra. Maria do Carmo E. do Amaral (Departamento de Botânica - Instituto de Biologia, UNICAMP) e sua aluna de doutoramento Aparecida Donisete de Faria. Espécimes testemunhas encontram-se depositados no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia, UNICAMP (UEC), sob os números:

❖ *Eleocharis elegans*: A. D. Faria & R. Belinello 97/571, UEC 93530;

❖ *Eleocharis sellowiana*: A. D. Faria *et al.* 1000, UEC 103089.

II. 2. 2. Análise dos Voláteis Florais

II. 2. 2. 1. Inserção Direta de Sólidos

Foram introduzidos diretamente no cromatógrafo gasoso, com auxílio de uma agulha (Figura 3), fragmentos das flores de *E. elegans* e de *E. sellowiana* segundo o método descrito por da Silva e colaboradores⁶.

⁶ da Silva UF, Borba EL, Semir J, Marsaioli AJ. A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) volatiles. *Phytochemistry* **50**: 31-34, 1999.

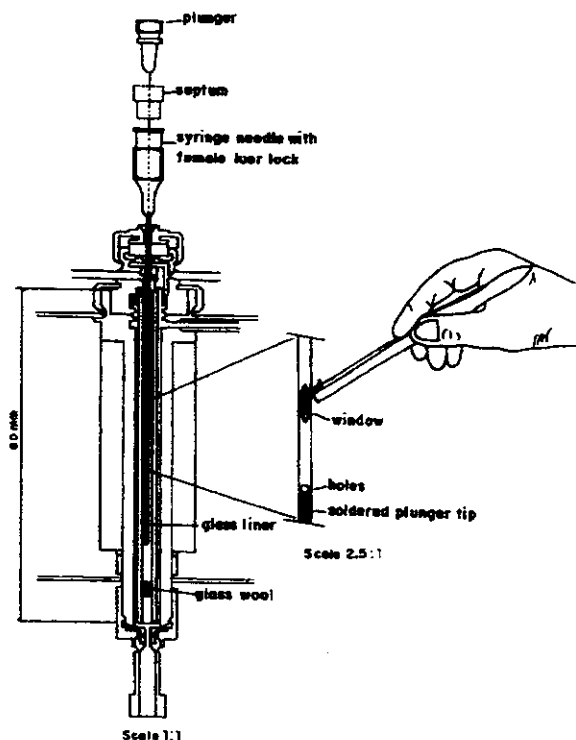


Figura 3: Inserção direta - Metodologia descrita por da Silva e colaboradores⁷.

II. 2. 2. *Headspace* Dinâmico

Toda a inflorescência foi envolvida por um recipiente de vidro em cuja saída foi conectada uma bomba para sucção do ar interno a um fluxo constante de 1 L/h; entre a bomba e a inflorescência foi colocado uma coluna de vidro (5cm comp., 7mm Ø) contendo lã de vidro e adsorvente (Porapak Q) para captação das substâncias voláteis. Esse sistema permaneceu montado por um período médio de 5h, entre 9:00 e 15:00 em dias ensolarados, durante o mês de outubro de 2002 (primavera). Após esse período, os voláteis foram dessorvidos com diclorometano destilado (~ 1 mL) e o volume final foi reduzido, a temp. amb, para 0,5 a 0,3 mL e a solução foi mantida a -20°C, antes da análise em cromatógrafo gasoso. Uma

amostra do ar ambiente, denominada branco, também foi coletada para eliminação de possíveis contaminantes ambientais e do solvente empregado.

Foram analisadas por esta técnica as inflorescências de *E. elegans* e de *E. sellowiana*.

II. 2. 3. Análise do Óleo Essencial dos Rizomas - Hidrodestilação

Os rizomas e raízes de *E. elegans* (7,35g) foram submetidos a hidrodestilação; coletou-se 60 mL de água ao final do condensador procedendo-se então a partição com diclorometano destilado (3 x 20 mL). Após secagem com sulfato de sódio anidro, a solução teve seu volume final reduzido sob nitrogênio e a solução concentrada final foi analisada por CG/EM, juntamente com uma amostra do solvente empregado (branco).

II. 3. Resultados e Discussão

II. 3. 1. Análise dos Voláteis Florais

II.3. 1. 1. Inserção direta de sólidos

De maneira geral, foram obtidos cromatogramas complexos (figuras 4 e 5) tanto das flores de *E. elegans* quanto das de *E. sellowiana*.

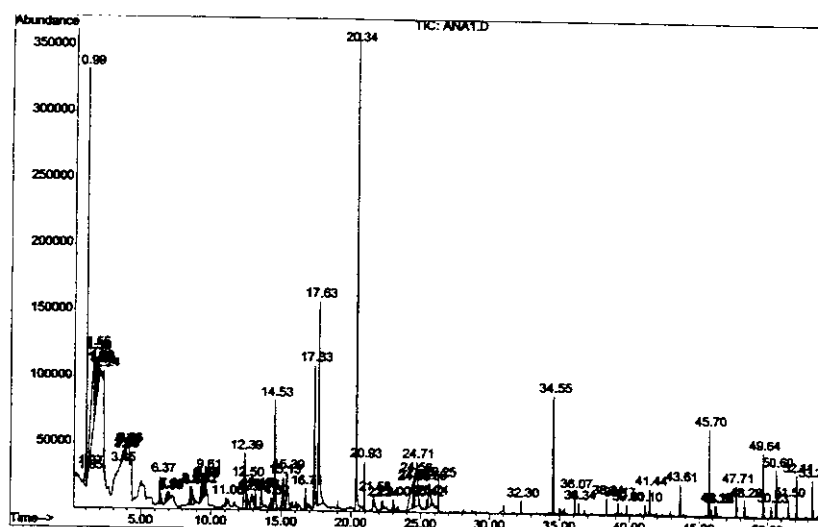


Figura 4: Cromatograma das inflorescências de *E. elegans* - Inserção direta.

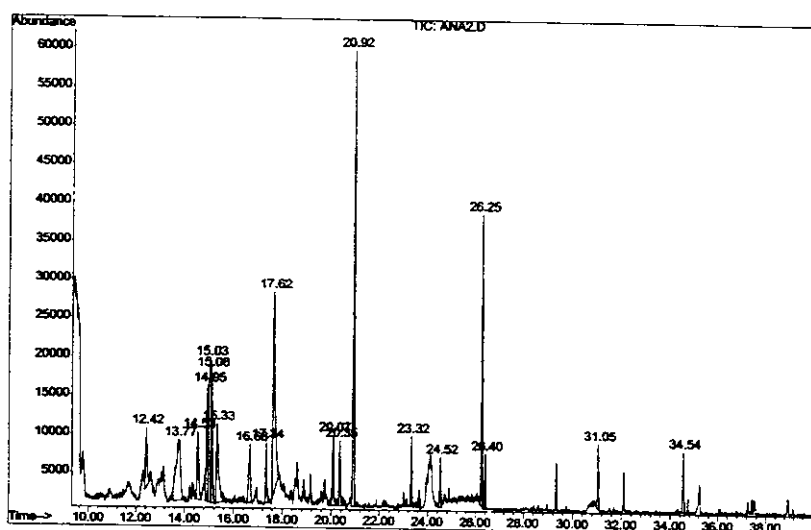


Figura 5: Cromatograma das inflorescências de *E. sellowiana* - Inserção direta.

A análise dos espectros de massas dos principais picos não permitiu concluir claramente quais os compostos presentes. No cromatograma *E. elegans*, pode-se verificar a provável presença dos compostos **50** a **53**, apresentados na figura 6, além de alguns picos entre $t_R = 41$ min e $t_R = 53$ min cujos espectros de massas sugeriram a presença de compostos alifáticos de cadeia longa; como os espectros não apresentaram o íon molecular, não foi possível identificá-los. Já a

partir dos espectros de massas obtidos para *E. sellowiana* foi possível propor a presença do 5-(hidroximetil)-furfural (**51**, $t_R = 17,62$ min) (Figura 6).

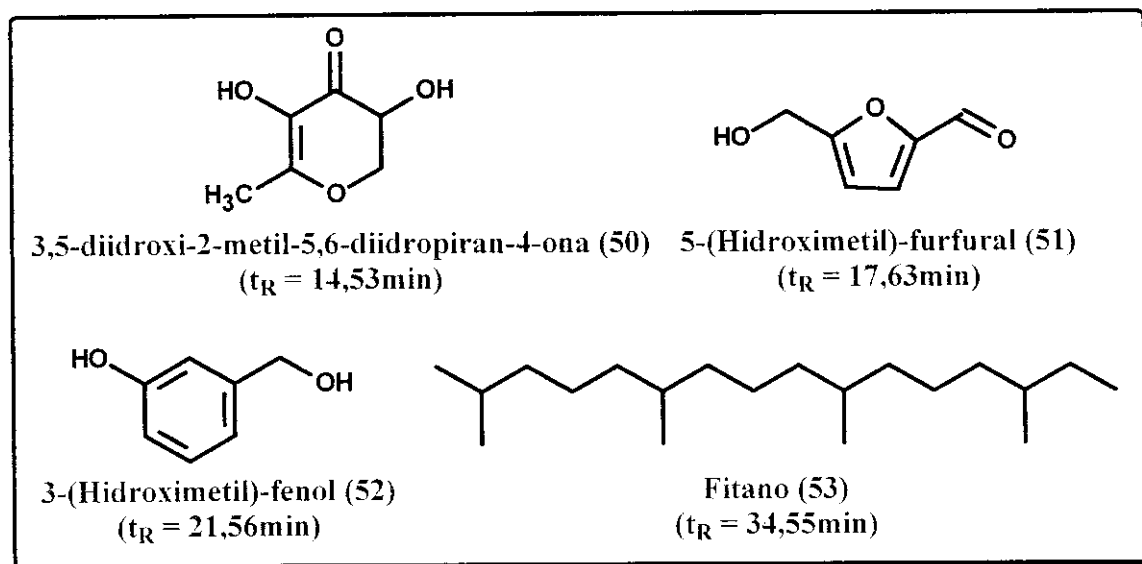


Figura 6: Prováveis compostos presentes nas flores de *E. elegans*.

II. 3. 1. 2. *Headspace* dinâmico

A comparação dos espectros de massas e dos valores dos índices de retenção relativos para o óleo floral obtido por *headspace* dinâmico das inflorescências de *E. elegans* com aqueles presentes na literatura permitiu a identificação dos compostos apresentados na Tabela 1 e na Figura 7.

Já o cromatograma do óleo floral das inflorescências de *E. sellowiana* não apresentou nenhum sinal, além daqueles que também ocorreram no branco.

Tabela 1: Compostos identificados no óleo floral de *E. elegans*.

No.	Composto	I _{RR}		Principais fragmentos (%)
		Exp.	Lit. ⁶	
1	n.i. 1	1308	-	43 (100), 57 (86), 71 (54), 82 (64), 95 (38), 109 (14), 115 (12), 126 (18), 141 (39), 142 (36).
2	δ -Elemeno (54)	1338	1339	41 (22), 53 (15), 77 (23), 93 (64), 105 (26), 121 (100), 136 (62), 161 (35), 189 (10), 204 (a.).
3	n. i. 2	1364	-	43 (100), 57 (82), 70 (62), 77 (37), 85 (84), 91 (35), 97 (25), 105 (72), 119 (46), 133 (62), 148 (16), 161 (48), 204 (34).
4	α -Ylangeno (55)	1371	1372	41 (54), 55 (42), 69 (21), 81 (32), 91 (73), 93 (64), 105 (90), 119 (100), 136 (20), 147 (15), 161 (75), 189 (15), 204 (18).
5	α -Copaeno (56)	1376	1376	41 (22), 55 (15), 69 (10), 77 (20), 81 (22), 93 (45), 105 (90), 119 (96), 133 (12), 147 (6), 161 (100), 189 (8), 204 (20)
6	β -Elemeno (57)	1392	1391	41 (68), 55 (38), 67 (78), 81 (87), 93 (100), 107 (60), 121 (42), 133 (20), 147 (47), 161 (27), 189 (30), 204 (a.).
7	Tetradecano (58)	1402	1399	43 (67), 57 (100), 71 (64), 85 (42), 99 (10), 113 (8), 127 (6), 141 (7), 156 (4), 169 (3), 198 (9).
8	n.i. 3	1409	-	43 (10), 57 (8), 74 (13), 109 (15), 145 (22), 173 (100), 204 (26).
9	Alloaromadendreno (59)	1461	1461	41 (73), 55 (42), 69 (52), 79 (68), 91 (100), 105 (81), 119 (50), 133 (70), 147 (62), 161 (83), 175 (12), 189 (30), 204 (36).
10	Pentadecano (60)	1502	1500	43 (68), 57 (100), 71 (65), 85 (46), 99 (11), 113 (7), 127 (6), 141 (4), 155 (5), 169 (3), 212 (8).
11	n.i. 4	1511	-	43 (98), 57 (100), 69 (54), 82 (63), 96 (52), 111 (22), 123 (24), 138 (12), 154 (14), 179 (26), 281 (16).
12	n.i. 5	1515	-	41 (16), 55 (12), 67 (18), 81 (24), 91 (45), 105 (43), 119 (36), 133 (31), 147 (10), 161 (100), 189 (8), 204 (20).
13	<i>cis</i> -Calameneno (61)	1524	1523	77 (4), 91 (5), 105 (6), 115 (8), 129 (10), 144 (8), 159 (100), 189 (2), 202 (12).
14	Tetradecanal (62)	1613	1614	43 (94), 55 (100), 68 (57), 82 (72), 96 (64), 110 (20).
15	Pentadecanal (63)	1715	1714*	43 (95), 57 (100), 69 (59), 82 (82), 96 (57), 110 (22), 124 (11), 137 (6), 152 (7).
16	Tetradecanoato de isopropila (64)	1829	1827*	43 (100), 60 (63), 73 (36), 83 (22), 102 (62), 129 (30), 143 (6), 171 (9), 185 (15), 211 (45), 228 (64).

n.i. = não identificado, a. = ausente, * Ref. 7.

⁷ Skaltsa HD, Mavrommati A, Constantinidis T. A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys* subsect. Swainsonianae (Labiatae). *Phytochemistry* **57** (2): 235-244, 2001.

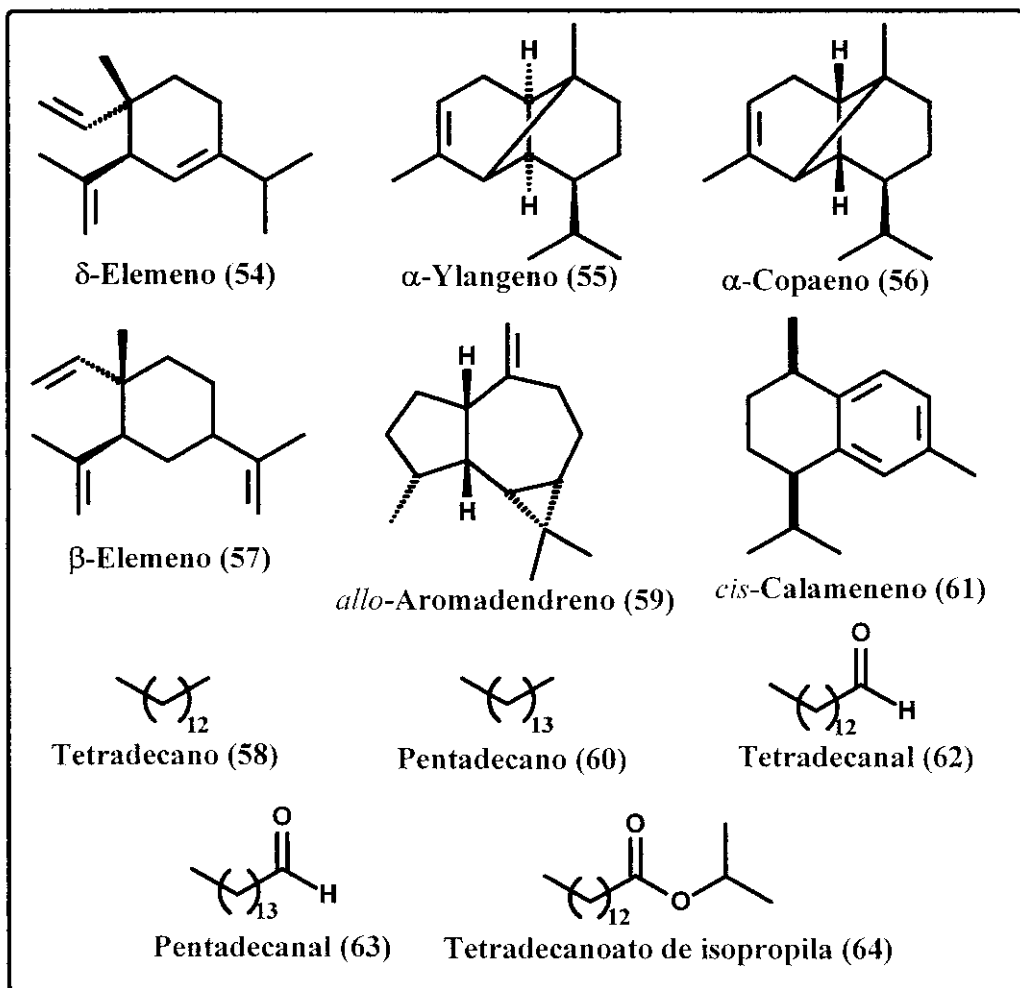


Figura 7: Compostos identificados no óleo floral de *E. elegans*.

II. 3. 2. Análise do Óleo Essencial dos Rizomas - Hidrodestilação

O óleo obtido por hidrodestilação da parte subterrânea de *E. elegans* apresentou um cromatograma bastante complexo. A análise dos espectros de massas dos principais picos indicou a presença de compostos com cadeias alifáticas longas e alguns derivados terpênicos, porém não foi possível identificar nenhuma substância.

CAPÍTULO III - TESTES BIOLÓGICOS

III. 1. Introdução

A busca por novos medicamentos vem despertando um interesse crescente na aplicação de ensaios biológicos preliminares rápidos e simples que possam sinalizar a atividade biológica de extratos e compostos isolados que potencialmente poderiam ser avaliados em ensaios mais específicos¹.

Neste trabalho, os extratos obtidos de quatro espécies de *Eleocharis* foram avaliados quanto aos seus potenciais citotóxico e antimicrobiano (ensaios preliminares de letalidade com *Artemia salina* e de bioautografia) e moluscocida (ensaio de letalidade com *Biomphalaria glabrata*).

III. 2. Letalidade com *Artemia salina*

III. 2. 1. Introdução

A fim de estabelecer a toxicidade de produtos naturais, vários ensaios podem ser utilizados. Um deles é o ensaio de letalidade com *A. salina* que foi desenvolvido para detectar uma potencial atividade tóxica de compostos bioativos em extratos vegetais², sendo essa atividade correlacionada, pelos idealizadores do teste, com atividade antitumoral e/ou inseticida. Mais tarde, outros pesquisadores conseguiram bons índices de correlação deste ensaio com atividade tripanomicida³,

¹ a) McLaughlin JL, Colman-Saizarbortia T, Anderson JE. Tres bioensayos simples para quimicos de productos naturales. *Revista de la Sociedad Venezolana de Quimica* 18 (4): 13-18, 1995; b) McLaughlin JL, Rogers LL. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inf J* 32 (2): 513-524, 1998.

² a) Meyer BN, Ferrigni NR, Putnam JE, Jacobsen LB, Nichols DE, McLaughlin JL. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Med* 45: 31-34, 1982; b) McLaughlin JL, Chang CJ, Smith DL. Simple bench-top bioassays (Brine shrimp and potato disks) for the discovery of plant antitumor compounds - review of recent progress. *ACS Sym Ser* 534: 112-137, 1993;

³ Alves TMA, Silva AF, Brandão M, Grandi TSM, Smânia EFA, Smânia A, Zani, CL 2000. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 367-373.

toxicidade oral aguda⁴, alelopatia⁵ e fototoxicidade⁶, além de também ser usado para expressar a toxicidade de um potencial moluscocida frente a outros organismos que coabitam com os caramujos, como peixes e zooplâncton⁷.

III. 2. 2. Materiais e Métodos

Este teste de avaliação de toxicidade dos extratos foi realizado segundo a metodologia descrita por Meyer e colaboradores² com todos os extratos obtidos.

Resumidamente, o ensaio consistiu na exposição de 10 larvas na fase nauplii, 48h após a eclosão, de *A. salina* a uma solução aquosa de sal marinho (38g/L, $V_F = 5\text{mL}$) contendo a amostra em análise, em diferentes concentrações, e uma gota de DMSO. Foram testadas concentrações de 1000, 100 e 10 $\mu\text{g/mL}$, sempre em triplicata. Após um período de exposição de 24h, foi realizada a contagem dos sobreviventes e calculada a CL_{50} através do método estatístico de Probit⁸.

⁴ Parra AL, Yhebra RS, Sardinias IG, Buelas LI. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD_{50} value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine* 8 (5): 395-400, 2001.

⁵ Ohira T, Yatagai M. Allelopathic compounds produced by forest plants. 2. The relationships between the inhibition effects on plant-growth and killing activities of brine shrimp on phenolic-compounds. *Mokuzai Gakkaishi* 40 (5): 541-548, 1994.

⁶ Ojala T, Vuorela P, Kiviranta J, Vuorela H, Hiltunen R. A bioassay using *Artemia salina* for detecting phototoxicity of plant coumarins. *Planta Med* 65 (8): 715-718, 1999.

⁷ a) Lima NMF, dos Santos AF, Porfírio Z, Goulart MOF, Sant'Ana AEG. Toxicity of lapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotica*. *Acta Trop* 83: 43-47, 2002. b) Oliveira-Filho EC, Paumgarten FJR. Toxicity of *Euphorbia milii* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicol Environ Saf* 46: 342-350, 2000.

⁸ Haddad M de L, de Moraes RCB. Modelos bioestatísticos aplicados à entomologia - MOBAE – Análise de Probit. Aplicativo desenvolvido no Departamento de Entomologia – ESALQ/USP, 1996.

III. 2. 3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos mostraram que foi necessária uma concentração muito maior ($CL_{50} \gg 10^3 \mu\text{g/mL}$) de quase todos os extratos do que aquela considerada promissora para uma atividade antitumoral, inseticida, tripanomicida ou alelopática ($CL_{50} \leq 10^3 \mu\text{g/mL}$), exceção feita ao extrato EaSFH que apresentou $CL_{50} = 476 \mu\text{g/mL}$. Por outro lado, estes resultados ($CL_{50} \gg 10^3 \mu\text{g/mL}$) sugeriram que os extratos apresentavam baixa toxicidade, inclusive para os seres humanos, uma vez que já havia sido constatada uma boa correlação deste ensaio com o de toxicidade oral aguda.

III. 3. Bioautografia

III. 3. 1. Introdução

Este ensaio detecta a presença de compostos com atividade antimicrobiana presentes nos extratos vegetais em análise de maneira simples e sensível⁹. Graças a essa sensibilidade, esta técnica pode ser utilizada também para a detecção de resíduos de antibióticos em leite¹⁰, plantas e água¹¹.

⁹ a) Rahalison L, Hamburger M, Hostettmann K, Monod M, Frenk E. A bioautographic agar overlay method for the detection of fungal compounds from higher plants. *Phytochemical Analysis* 2 (5): 199-203, 1991; b) Muhammad I, Mossa JS, Elferaly FS. Antibacterial diterpenes from the leaves and seeds of *Juniperus excelsa* Bieb, M. *Phytother Res* 6 (5): 261-264, 1992; c) Hostettmann K, Terreaux C, Martson A, Potterat O. The role of planar chromatography in the rapid screening and isolation of bioactive compounds from medicinal plants. *JPC - J Planar Chromat* 10 (4): 251-257, 1997; d) Eloff JN. Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. subsp. *Caffra* (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves. *J Ethnopharmacol* 76 (3): 305-308, 2001.

¹⁰ Choma I, Choma A, Staszczuk K. Direct bioautography-thin-layer chromatography of flumequine and doxycycline in milk. *JPC - J Planar Chromat* 15 (3): 187-191, 2002

¹¹ Balinova A. Extension of the bioautograph technique for multiresidue determination of fungicide in plants and water. *Anal Chim Acta* 311 (3): 423-427, 1995.

III. 3. 2. Materiais e Métodos

Todos os extratos, assim como os compostos **1**, **2-4**, **5**, **10**, **34**, **35**, **36**, **41** e **42**, foram submetidos ao ensaio de bioautografia segundo a metodologia proposta por Saxena e modificada por Magalhães e colaboradores¹². Basicamente, o método consistiu na preparação de duas placa de CCDA contendo quatro *spots* sendo um do antibiótico padrão (10 µg, ciclopirox olamina (XXXX) para fungos e cloranfenicol (XXXXI) para bactérias, Figura 1), e três de amostras em análise (20 µg). Após desenvolvimento das placas em fase móvel adequada e evaporação total do solvente, uma delas foi colocada no fundo de uma placa de Petri, sobre a qual verteu-se o meio de cultura adequado, enquanto a segunda foi mantida como placa testemunha. Após solidificação e resfriamento do meio, procedeu-se a inoculação do microrganismo (100µL, suspensão a 10⁶ células/mL). Foi preparada também uma placa de Petri apenas com meio de cultura e o microrganismo (branco). Depois de um período de incubação verificou-se a formação dos halos de inibição de crescimento e procedeu-se a revelação da placa de CCDA testemunha.

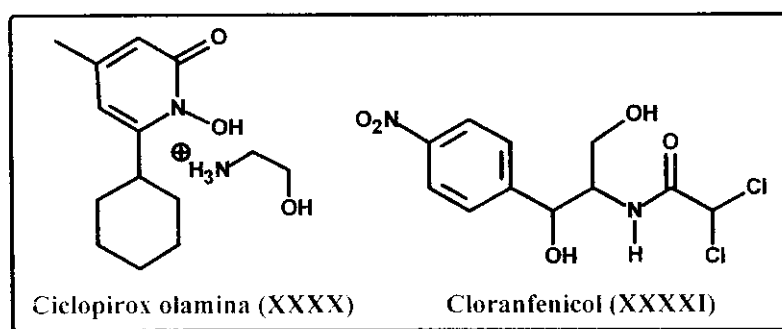


Figura 1: Antibióticos padrões empregados.

Foram empregados os seguintes microorganismos:

¹² Magalhães AF, Tozzi AMA, Magalhães EG, Nogueira MA, Roncancio VJF. 1998. Biological assays with root extracts of *Lonchocarpus latifolius* (Willd) D.C. and of a newly isolated dibenzoylmethane derivative. *Rev CERES* 45: 351-358.

⇒ Fungos: *Aspergillus niger* (CCT 1435), *Penicillium funiculosum* (CCT 0490), *Fusarium oxysporum* (CCT 3244), *Rhizopus orizae* (CCT 4964), *Alternaria alternata* (CCT 1250), *Aspergillus fumigatus* (CCT 01277), *Cladosporium cladosporioides* (CCT 5039) e *Candida albicans* (CCT 0776) - incubados durante 2 a 3 dias, a 27°C, exceto *C. albicans* que exigiu 24h a 37°C, em meio MA (Malte Ágar: extrato de malte 20,0g, ágar 20,0g e água destilada 1000mL);

⇒ Bactérias: *Bacillus subtilis* (CCT 0089), *Staphylococcus aureus* (CCT 4295), *Salmonella typhimurium* (CCT 0528), *Micrococcus luteus* (CCT 2720), *Escherichia coli* (CCT 5050) e *Streptococcus mutans* (CCT 3440) – incubados durante 24h a 37°C em meio NA (Ágar Nutriente: peptona 5,0g, extrato de carne 3,0g, ágar 15g e água destilada 1000 mL).

Todos os meios de cultura e microrganismos foram adquiridos junto à Fundação “André Tosello” (Coleção de Culturas Tropical - CCT).

III. 3. 3. Resultados e Discussão

Dos extratos testados, apenas o extrato EsSFH apresentou atividade contra o fungo *Alternaria alternata*. A observação da placa teste (Figura 2) mostrou que a atividade está relacionada com as substâncias mais polares deste extrato ($R_f < 0,5$); vale ressaltar que desta região foi isolado o novo derivado esteroidal estigmasta-22-eno-3 β ,6 β ,9 α -triol (**42**).

Como os nove compostos testados foram inativos frente às bactérias e aos fungos, nas condições empregadas, a possibilidade do novo esteróide (**42**) ser o responsável pela atividade observada no extrato EsSFH fica descartada.

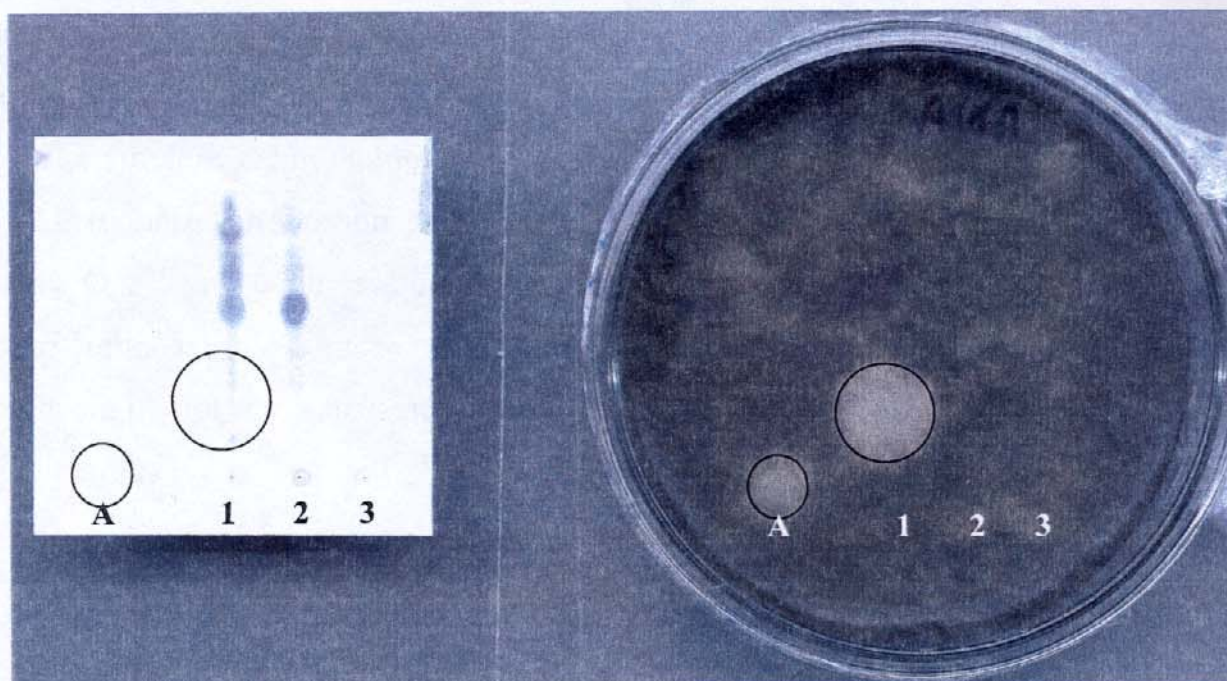


Figura 2: Bioautografia – *E. sellowiana* parte subterrânea fresca

Fungo: *Alternaria alternata*; A: Ciclopirox olamina; 1: EsSFH; 2: EsSFC; 3: EsSFHE.

III. 4. Letalidade com *Biomphalaria glabrata*

III. 4. 1. Introdução

Esquistossomíase, também conhecida como esquistossomose e popularmente como barriga-d'água, é uma doença endêmica relevante no Brasil e em muitos outros países tropicais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), nas áreas tropicais e subtropicais, a esquistossomíase só é superada pela malária em termos de importância sócio-econômica e de saúde pública. A doença tem presença constante em mais de 74 países (praticamente todos subdesenvolvidos), de 500 a 600 milhões de pessoas correm riscos de contaminação e mais de 200 milhões são infectadas a cada ano.

A doença é causada por vermes do gênero *Schistosoma*, que parasitam as veias do homem e de outros animais, onde se fixam por meio de ventosas. Dentre as diversas espécies, destacam-se o *S. haematobium* (mais comum na África e no Mediterrâneo), o *S. japonicum* (mais presente no sudeste asiático) e o *S. mansoni* (presente, sobretudo, em países americanos, como o Brasil). O verme pertence à família dos trematódeos e pode chegar a medir um centímetro de comprimento. Os organismos têm sexo separado e apresentam um forte dimorfismo sexual (Figura 3).

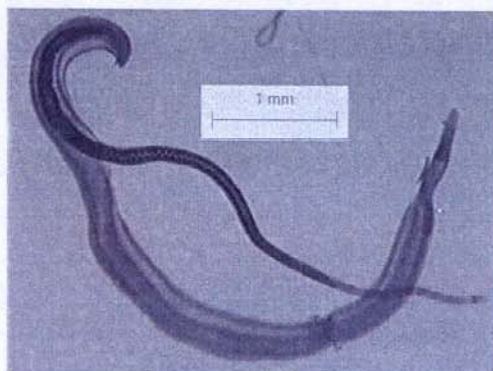


Figura 3: Casal de *S. mansoni*.

O verme mais fino é a fêmea.

O ciclo de evolução da esquistossomíase começa quando fezes infectadas entram em contato com a água. Os ovos (Figura 4a) germinam e liberam a primeira forma larval do *S. mansoni*, conhecida como miracídio (Figura 4b). Este busca um hospedeiro intermediário, representado no Brasil por caramujos do gênero *Biomphalaria*, onde se multiplica e se transforma em cercárias (Figura 4c), que são a forma infectante do parasita. Um único caramujo é capaz de liberar milhares de cercárias em um só dia. Uma vez na água, a cercária nada em busca do hospedeiro definitivo. Após penetrar no corpo humano, a cercária migra através da corrente sanguínea em direção ao fígado onde se instala nas veias do sistema porta-

hepático. Em média após o quadragésimo dia de infecção, já é possível encontrar ovos de *S. mansoni* nas fezes do paciente¹³.

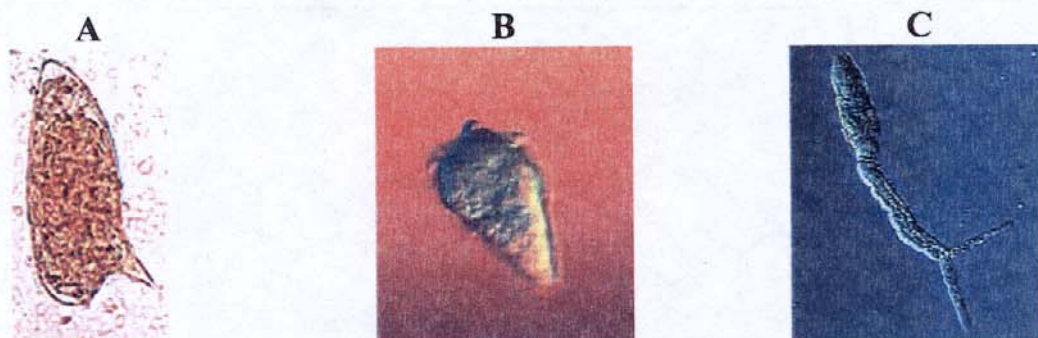


Figura 4: Diferentes fases evolutivas do *S. mansoni*.

A) Ovo; B) Miracídio; C) Cercaria.

O caramujo *B. glabrata* é o principal vetor nas Américas Central e do Sul; de acordo com Paraense & Correa¹⁴, este caramujo é considerado um modelo de agente transmissor, provavelmente por causa de adaptações fisiológicas entre o molusco e as cepas de parasitas presente nas Américas.

Além do tratamento de indivíduos infectados com drogas anti-helmínticas, como o praziquantel (XXXXII) e a oxamniquina (XXXXIII) (Figura 5), o saneamento básico e o controle da população de caramujos através do uso de agentes moluscocidas são medidas profiláticas para reduzir o risco de transmissão da esquistossomíase.

O moluscocida recomendado pela OMS, a niclosamida (XXXXIV) (Figura 6), é mais ativo e menos tóxico para o ambiente e para seres humanos do que outros moluscocidas sintéticos e/ou inorgânicos. Porém, o alto custo envolvido

¹³ Ferreira P. Glossário de Doenças. <http://www.fiocruz.br/ccs/glossario/esquistossomose.htm>

¹⁴ Paraense WL, Correa LR. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 5: 15-22, 1963.

no emprego de niclosamida em grandes extensões territoriais torna o seu uso proibitivo para a maioria dos países em desenvolvimento¹⁵.

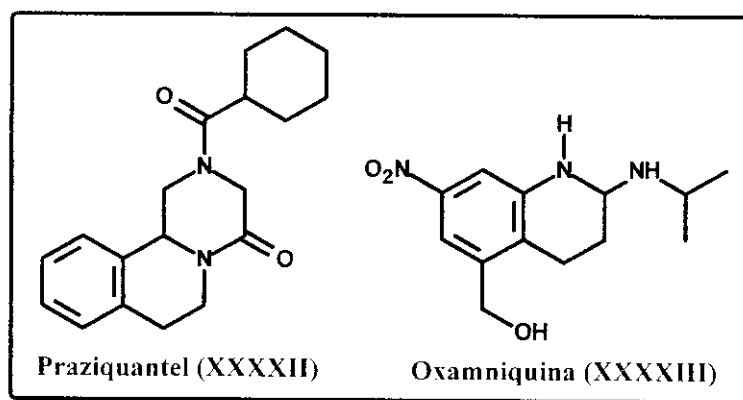


Figura 5: Fármacos empregados no tratamento da esquistossomíase.

Oxamniquina é mais específica contra *S. mansoni*.

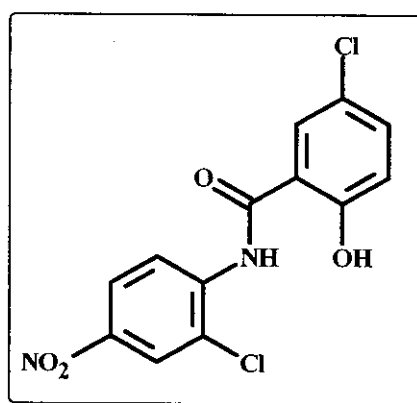


Figura 6: Moluscocida niclosamida (XXXXIV).

Nesse contexto, a busca por produtos naturais com atividade moluscocida a partir de plantas regionais tem ganhado novo interesse na esperança de se encontrar produtos mais baratos, biodegradáveis, seguros e que sejam uma alternativa local para o controle do caramujo^{5b}. Uma importante faceta da

¹⁵ Clark TE, Appleton CC, Drewes SE. A semi-quantitative approach to the selection of appropriate candidate plant molluscicides – a South African application. *J Ethnopharmacol* 56: 1-13, 1997.

bioatividade de qualquer moluscocida eficiente é a sua atividade ovicida frente às desovas de caramujos¹⁶.

III. 4. 2. Materiais e Métodos

Todos os extratos hidro-etanólicos e metanólicos, sendo hidrossolúveis, foram testados contra indivíduos adultos e desovas de caramujos *B. glabrata* seguindo a metodologia descrita pela literatura^{17, 18}.

De maneira simplificada, estes ensaios com caramujos consistiram em expor indivíduos (adultos com aproximadamente 10 a 14 mm de diâmetro, Figura 7, e desovas com 25 ovos em média) a uma solução de concentração conhecida do extrato ou substância em teste. Após 24h de contato, os indivíduos foram lavados em água decolorada e observados. Nos caramujos adultos, a morte foi evidenciada pela ausência de batimentos cardíacos - o que pode ser observado com auxílio de um microscópio estereoscópio - e, em alguns casos, pela perda de hemolinfa no recipiente onde o ensaio foi realizado.



Figura 7: Caramujo adulto *B. glabrata*.

¹⁶ Tang SSH, Whitfield PJ, Perrett S. Activity of the molluscicidal plant *Milletia thonningii* (Leguminosae) toward *Biomphalaria glabrata* eggs. *J Parasitol* **81**: 833-835, 1995.

¹⁷ a) Nick A, Rali T, Sticher O. 1995. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. *J Ethnopharmacol* **49**: 147-156. b) Ref. 2.

¹⁸ a) Ref. 15. b) Okazaki K, Andrade Junior HF, Kawano T. 1996. Effect of ⁶⁰Co gamma radiation on *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Gastropoda) embryos: mortality, malformation and hatching. *Braz J Med Biol Res* **29**: 1057-1067.

Já as desovas foram observadas em microscópio ótico durante 15 dias - tempo necessário para o seu desenvolvimento (Figura 8) - a fim de verificar se a substância ou extrato provocou más-formações e/ou morte dos embriões, que impediriam a sua eclosão. Após a contagem dos sobreviventes, procedeu-se o cálculo de CL_{50} através do método estatístico de Probit⁸.

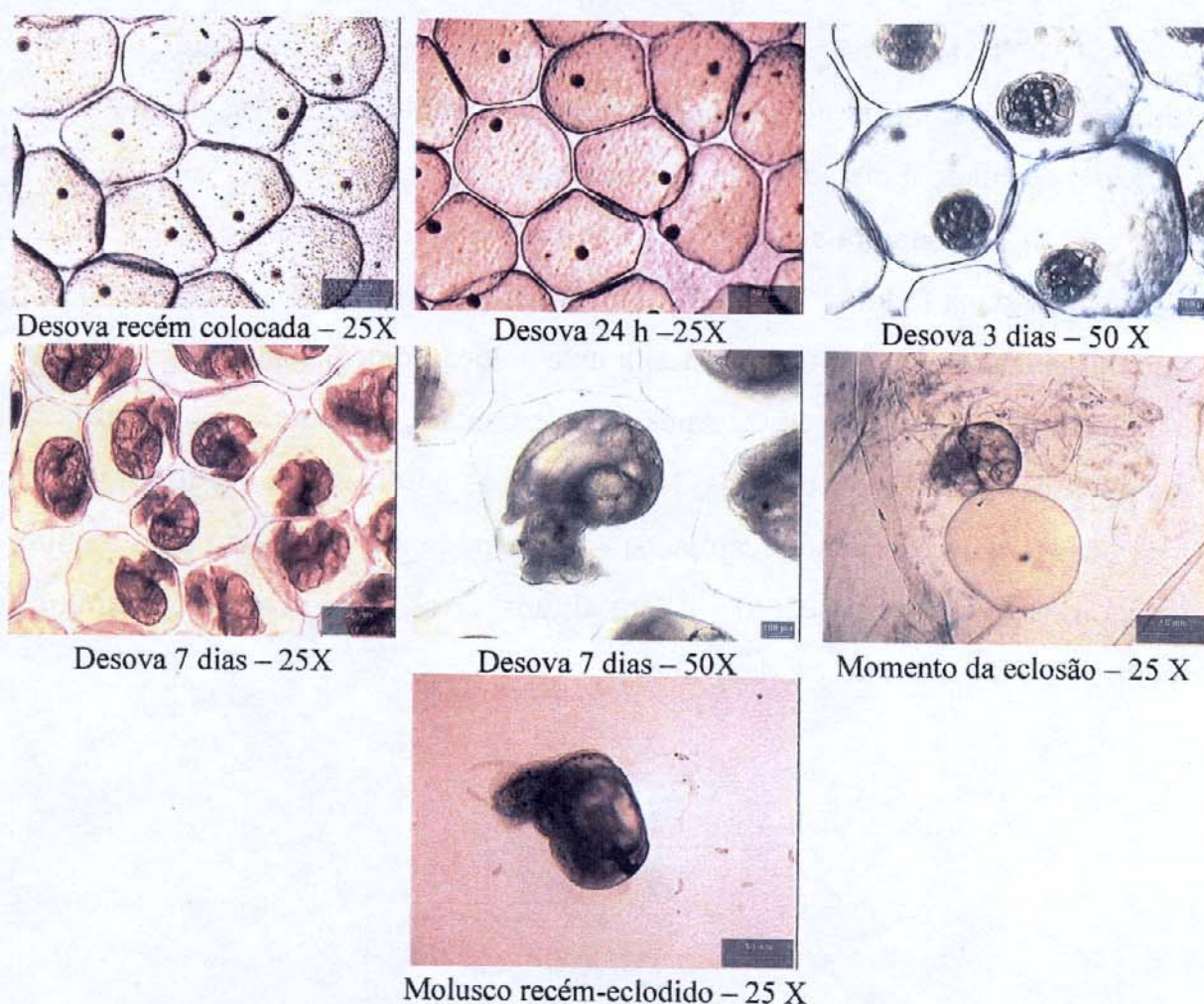


Figura 8: Desenvolvimento da desova no ensaio controle.

Uma vez que o extrato EsSFHE apresentou atividade contra as desovas e levando-se em conta o ambiente natural de ambas as espécies, isto é, tanto a planta quanto o caramujo ocorrerem em margens de lagos e rios, imaginou-se que poderia haver um controle natural de *E. sellowiana* sobre a população de caramujos

Biomphalaria. Para verificar tal hipótese, realizou-se um pequeno ensaio a fim de observar o desenvolvimento das desovas na presença da planta. Em um aquário de vidro, foram plantadas algumas mudas de *E. sellowiana*, previamente lavadas, e em seguida foram colocados neste mesmo aquário, desovas do caramujo. O experimento foi acompanhado durante 15 dias e feito em duplicata, dois aquários testes e dois brancos, onde apenas desovas foram colocadas. Durante todo o período, as desovas foram observadas e contadas em todos os aquários.

Os ensaios de atividade moluscocida foram realizados no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia pelos professores Dr. Luiz Eduardo Magalhães e Dra. Eliana Maria Zanotti-Magalhães e por sua aluna de doutorado Deborah Regina Serrano.

III. 4. 3. Resultados e Discussão

Todos os extratos testados mostraram-se inativos frente aos caramujos adultos (Tabela 1).

Tabela 1: Atividade moluscocida (caramujos adultos *B. glabrata*).

Extrato	n.º moluscos utilizados	Após 24h de exposição	
		vivos	mortos
EsSFHE – 250ppm	05	04	01
EsAFHE – 250ppm	05	05	00
EsASM – 250 ppm	05	05	00
EmASM – 250ppm	05	03	02
125ppm	05	05	00
EmAFHE – 250ppm	05	05	00
EiAFHE – 250ppm	05	05	00
EaAFHE 250ppm	05	03	02
EaSFHE – 250ppm	05	04	01
Controle	05	05	00

Frente às desovas (atividade ovicida), o extrato EsSFHE mostrou-se ativo com $CL_{50} = 24,27 \mu\text{g/mL}$, o que é um resultado promissor (tabelas 2 e 3).

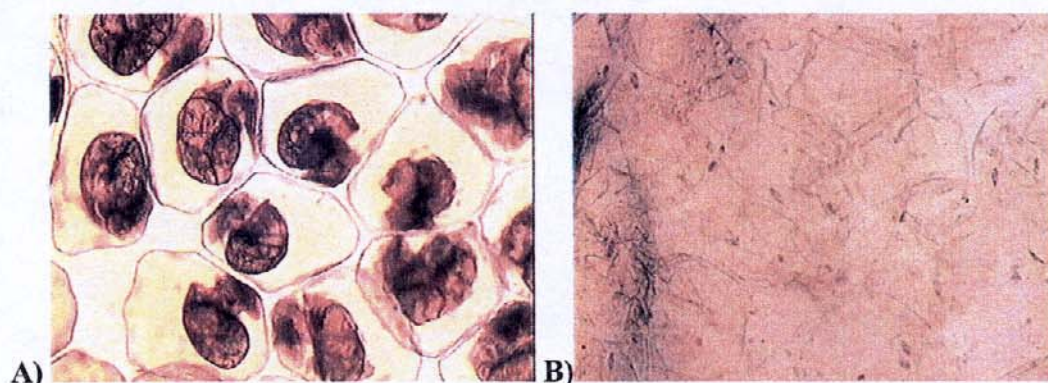
Tabela 2: Atividade ovicida de EsSFHE.

Extrato	EsSFHE				
Concentração ($\mu\text{g/mL}$)	250	25	10	7,5	5
Viáveis (início)	219	143	127	195	139
Mortos (após 15 dias)	174	125	113	13	7
CL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	24,27				

Tabela 3: Atividade ovicida dos demais extratos (250 $\mu\text{g/mL}$).

Extrato	Viáveis (início)	Mortos (após 15 dias)
EsAFHE	164	6
EsASM	112	13
EmASM	184	3
EmAFHE	185	0
EiAFHE	175	0
EaAFHE	126	2
EaSFHE	159	0
Controle	184	25

Outra observação interessante foi o fato das substâncias ativas deste extrato penetrarem o interior dos ovos alterando o desenvolvimento dos embriões e provocando sua morte entre o 3º e o 7º dia de vida (Figura 9), pois as taxas de mortalidade das desovas apresentaram uma grande elevação após uma semana da exposição ao extrato.

**Figura 9:** Atividade ovicida.

A) Desovas com 7 dias – ensaio controle, B) Desovas com 7 dias – após contato com EsSFHE.

Já os dados obtidos a partir da observação do desenvolvimento das desovas na presença de plantas cultivadas de *E. sellowiana* indicam que não há um controle da planta sobre o caramujo, uma vez que não houve diferença de mortalidade entre as desovas que se desenvolveram em contato com as plantas e aquelas que se desenvolveram no aquário branco (Tabela 4).

Tabela 4: Desenvolvimento das desovas de *B. glabrata* na presença e ausência de *E. sellowiana*.

	Ovos Viáveis			
	Na presença de <i>E. sellowiana</i>		Na ausência de <i>E. sellowiana</i>	
	vivos	mortos	vivos	mortos
Início	236	0	237	0
Depois de 24 h	236	0	237	0
Depois de 3 dias	236	0	235	2
Depois de 7 dias	236	0	232	5
Depois de 15 dias	225	11	230	7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise fitoquímica de seis extratos provenientes de três espécies diferentes (*E. acutangula*, *E. interstincta* e *E. sellowiana*) permitiu a identificação de 49 compostos dos quais 46 são relatados pela primeira vez no gênero *Eleocharis*, destacando-se os compostos neohopa-13(18)-eno-3 α -ol (40), 3 α -hidroxi-13 α ,17 α ,21 α -hopano-15,19-diona (41) e estigmasta-22-eno-3 β ,6 β ,9 α -triol (42) que são compostos inéditos na literatura.

Os resultados obtidos do estudo fitoquímico de *Eleocharis acutangula*, *E. interstincta* e principalmente de *E. sellowiana* indicam um predomínio de metabólitos das rotas do acetato e do mevalonato¹ (Figura 1), enquanto que nas espécies já descritas na literatura (Tabela 1, Introdução Geral) ocorrem também metabólitos provenientes da rota mista, como os flavonóides. Outra observação importante é a ocorrência de derivados triterpenoidais de núcleo hopano que são muito comuns em samambaias (pteridófitas), mas ocorrem em poucas espécies de angiospermas.

Quanto à taxonomia, os dados obtidos não permitem ainda uma correlação entre o comportamento químico e os dados morfológicos a fim de auxiliar na elucidação da classificação infragenérica; com os resultados obtidos neste trabalho foi possível elevar para 8 o número de espécies de *Eleocharis* estudadas quanto à sua composição química, o que ainda representa muito pouco em um universo de cerca de 200 espécies. Infelizmente não foi possível estabelecer uma metodologia de análise dos extratos por CLAE que permitisse uma avaliação qualitativa de extratos de um maior número de espécies, o que possibilitaria inferir dados quimiotaxonômicos mais conclusivos. As técnicas de CCD e CC mostraram-se adequadas ao isolamento dos compostos, porém foi preciso primeiro encontrar uma maneira de separar a clorofila.

¹ dos Santos RI. In Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, de Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia, da planta ao medicamento. Editora da UFSC e Editora da Universidade (UFRGS), Florianópolis, Porto Alegre. Segunda edição, Capítulo 16: 323-354, 2000.

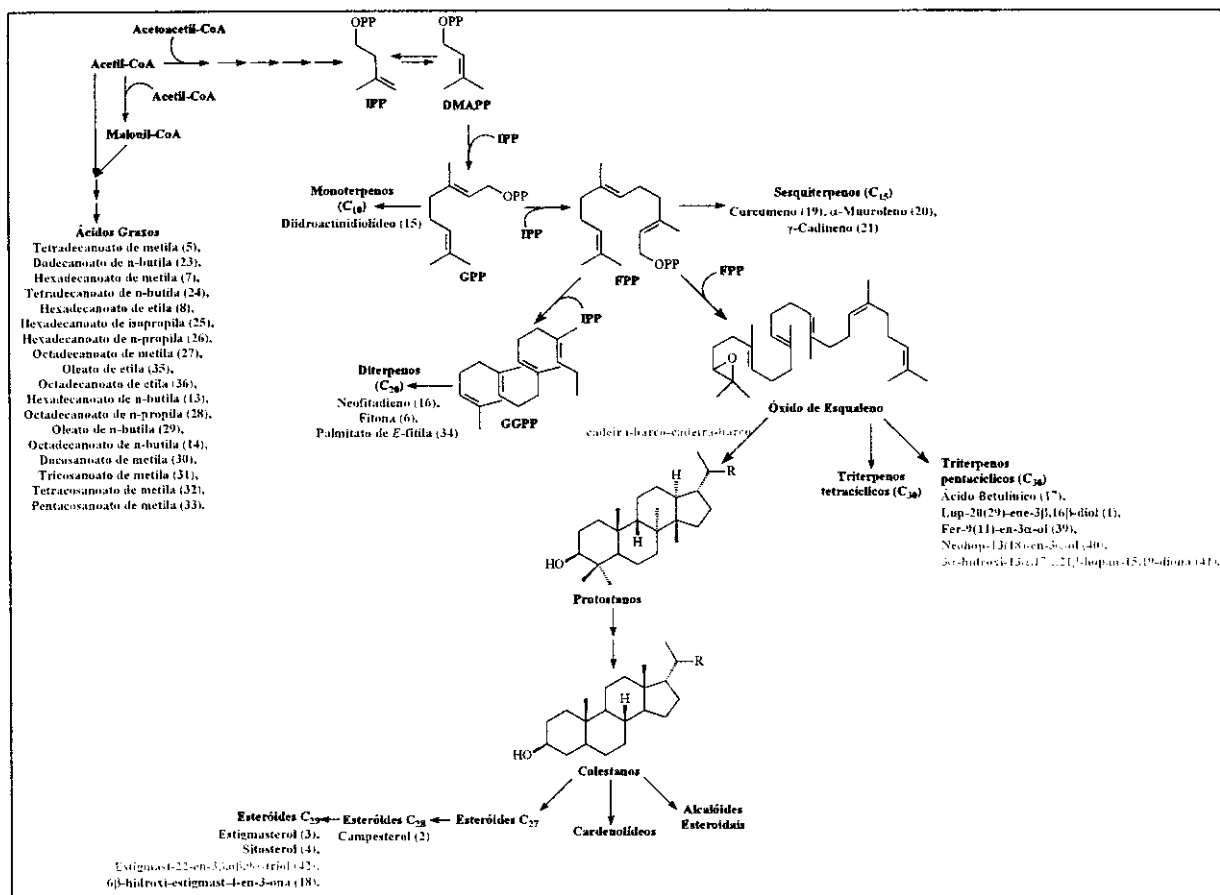


Figura 1: Compostos identificados distribuídos segundo o caminho biogênico.

Este é o primeiro relato da composição de voláteis florais de uma espécie pertencente à família Cyperaceae. Quanto à metodologia de análise, o método por *headspace* dinâmico forneceu os melhores resultados, permitindo a identificação de seis sesquiterpenos (54 - 57, 59 e 61), dois alcanos de cadeia longa (58 e 60), dois aldeídos de cadeia longa (62 e 63) e um éster de ácido graxo (64) como constituintes do aroma da inflorescência de *E. elegans*.

Dos compostos que foram identificados através da técnica de inserção direta de sólidos em CG/EM vale a pena ressaltar que o compostos 5-

(hydroximetil)-furfural (**51**) deve ser um artefato formado pelo aquecimento de moléculas de açúcares presentes originalmente na amostra vegetal².

Um detalhado estudo de morfologia e histologia realizado pela doutoranda Aparecida D. de Faria, sob orientação da Profa. Dra. Maria do Carmo E. do Amaral (Depto. Botânica, IB, Unicamp)³, revelou que as flores de *E. elegans* apresentam bolsas de óleos em suas anteras, onde provavelmente são acumulados os compostos **54** a **64**.

Com respeito às atividades biológicas, esta é a primeira vez que espécies do gênero *Eleocharis* são submetidas aos ensaios de letalidade com *A. salina* e de atividade moluscocida com caramujos *B. glabrata*.

Quanto à atividade antimicrobiana, este é o primeiro relato de atividade antifúngica para o gênero *Eleocharis* uma vez que foi observada a inibição de crescimento do fungo *Alternaria alternata* promovida pelo extrato hexânico da parte subterrânea fresca de *E. sellowiana* (EsSFH). Como apresentado na Introdução Geral, já foi observada atividade antibacteriana para os extratos de *E. tuberosa*.

O ensaio de letalidade com *A. salina* indicou que o extrato hexânico da parte subterrânea fresca de *E. acutangula* (EaSFH, CL₅₀ = 476 µg/mL) apresenta uma potencial citotoxicidade (CL₅₀ < 10³ µg/mL). Por outro lado, o resultado obtido para os extratos hidro-etanólicos e metanólicos (CL₅₀ >> 10³ µg/mL) indicam uma baixa toxicidade, uma característica interessante para a utilização destes extratos no controle das populações de caramujos *B. glabrata*. É importante observar que a niclosamida mostrou-se tóxica para crustáceos do zooplâncton e peixes (Referência 7b, capítulo III).

² Uobe K, Nishida K, Inoue H, Isutsui M. Thermal degradation of sugars in a gás chromatografic injector port. *J Chromatogr* **193**, 83-88, 1980.

³ Comunicação pessoal.

Assim, a atividade ovicida observada para o extrato EsSFHE ($CL_{50} = 24,27 \mu\text{g/mL}$), aliada à baixa toxicidade, indica que este extrato poderia ser utilizado no controle da população de *B. glabrata* na natureza, uma vez que o extrato pode ser facilmente preparado, apresentando boa solubilidade em água. Além disso, *E. sellowiana* é amplamente distribuída no estado de São Paulo, assim como no Brasil, e seu cultivo é bastante simples. Estas são algumas das características importantes para escolha de um moluscocida de origem vegetal (Referências 7 e 15, capítulo III).