

Universidade Federal de Santa Catarina
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas



Danieli Kreüch
Aluna

Inês Maria Costa Brighente
Orientadora

Dedicatória

“Depois de algum tempo você aprende que amar não significa apoiar-se,
e que companhia nem sempre significa segurança.
Descobre que as pessoas com que você mais se importa
são tomadas de você muito depressa...
Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós,
mas nós somos responsáveis por nós mesmos.
Aprende que não importa onde já chegou, mas onde está indo,
e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade.
Aprende que paciência requer muita prática.
Aprende que nunca deve dizer a uma criança que seus sonhos são bobagens.
Portanto, plante seu jardim e decore sua alma,
ao invés de esperar que alguém lhe traga flores”.

(Charlie Chaplin, em Aprender; *fragmentos*)

Este trabalho é dedicado a meu pai (*in memoriam*).

Agradecimentos

Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que fez tua rosa tão importante.

(Saint-Exupéry, em O Príncipezinho)

Agradeço a professora Inês e ao professor Moacir pelo espaço cedido e pelas valiosas orientações para que este trabalho pudesse ser realizado;

Agradeço também a galera do LQPN: Karina, Fabiana, Okima, Priscila, Juliana, Verdi, Cristian, Heros, Luciano, Wagner;

Aos professores com quem tive o prazer e o privilégio de aprender;

A todos os amigos: do curso, de infância, de longe e de perto;

A minha mãe, meus irmãos, ao Rodrigo,

E a Luci, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	07
2. INTRODUÇÃO.....	09
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	10
3.1 Gênero <i>Canavalia</i>	10
3.2 <i>Canavalia rosea</i>	12
3.2.1 Classificação taxonômica.....	13
3.3 Testes Biológicos.....	13
3.3.1 Teste de toxicidade frente a <i>Artemia salina</i>	13
3.3.2 Atividade antioxidante.....	15
3.3.3 Teste Alelopático.....	15
4. OBJETIVOS.....	17
4.1 Objetivo Geral.....	17
4.2 Objetivos Específicos.....	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
5.1 Equipamentos.e reagentes.....	18
5.2 Coleta e Identificação da planta.....	18
5.3 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Bruto.....	18
5.4 Particionamento do Extrato Bruto.....	19
5.5 Teste de Toxicidade Frente a <i>Artemia salina</i>	20
5.6 Teste de Atividade Antioxidante.....	20
5.7 Teste Alelopático.....	21
5.8 Estudo Fitoquímico do Extrato de <i>Canavalia rosea</i>	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	23
6.1 Análise do Bioensaio utilizando <i>Artemia salina</i>	23
6.2 Análise do Bioensaio para Atividade Antioxidante.....	23
6.3 Análise do Bioensaio para Atividade Alelopática.....	24
6.4 Análise do Estudo Fitoquímico do Extrato de <i>Canavalia rosea</i>	27
7. CONCLUSÃO.....	31
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
9. ANEXOS.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

EBH	Extrato Bruto Hidroalcoólico
FAe	Fração Acetato de Etila
FBu	Fração n-butanol
FAq	Fração Aquosa
R	Resina
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DL ₅₀	Concentração necessária para provocar 50% de mortalidade das espécies
IC ₅₀	Concentração necessária para provocar 50% de atividade antioxidante
IV	Espectroscopia no Infra-Vermelho
RMN H ¹	Ressonância Magnética Nuclear de Próton
RMN C ¹³	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
Con A	Concanavalina A

LISTA DE FIGURAS E TABELAS**Figuras**

Figura 1: L-Canavanina.....	10
Figura 2: L-Arginina.....	10
Figura 3a: <i>Canavalia rosea</i> , planta herbácea e trepadeira.....	12
Figura 3b: <i>Canavalia rosea</i>	12
Figura 4: Larva de <i>Artemia salina</i> Leach (1812).....	14
Figura 5: Larvas de <i>A. salina</i> no aquário.....	14
Figura 6: Estrutura do DPPH.....	15
Figura 7: Fluxograma do particionamento do extrato bruto de <i>Canavalia rosea</i>	19
Figura 8: Obtenção da dose letal para a fração acetato de etila, frente ao teste de toxicidade com <i>A. salina</i>	20
Figura 9: Obtenção da IC ₅₀ para o n-butanol.....	21
Figura 10: Efeito do extrato e frações de <i>C. rosea</i> sobre a germinação de sementes.....	26
Figura 11: Estrutura da rutina.....	30

Tabelas

Tabela 1: Frações eluídas através de coluna cromatográfica.....	22
Tabela 2: Efeito do extrato bruto e frações de <i>C. rosea</i> frente ao bioensaio com <i>Artemia salina</i>	23
Tabela 3: Atividade antioxidante do extrato bruto e frações de <i>C. rosea</i>	24
Tabela 4: Efeito do extrato e frações de <i>C. rosea</i> sobre a germinação de sementes.....	25
Tabela 5- Dados espectroscópicos de RMN de H ¹ (200 MHz) para rutina (dados experimentais e da literatura) em CD ₃ OD.....	28
Tabela 6: Dados espectroscópicos de RMN de C ¹³ para a rutina (dados experimentais e da literatura) em CD ₃ OD.....	29
Tabela 7: Eluentes usados na CCD e valores de R _f para o padrão rutina e amostra.....	30

1. RESUMO

O gênero *Canavalia* pertence à família das Leguminosas (Fabaceae), que é uma das maiores famílias do reino vegetal. A espécie *Canavalia rosea*, também conhecida como feijão-da-praia, é classificada como uma planta herbácea e trepadeira, que se estende ao longo das dunas da praia e em costões. Seus caules rastejantes e subterrâneos fixam-se ao substrato arenoso impedindo a movimentação da areia, e assim diminuindo a erosão do solo.

Apesar do grande número de estudos realizados com as sementes de plantas do gênero *Canavalia*, não foram relatados nenhum estudo fitoquímico e biológico realizados com a espécie *C. rosea*. Dessa forma, objetiva-se o desenvolvimento de um estudo fitoquímico de *C. rosea*, biomonitorado pelos "bioensaios de bancada" para a avaliação da atividade alelopática, antioxidante e citotóxica.

O extrato bruto hidroalcoólico (EBH) das folhas de *C. rosea* foi particionado com solventes de diferentes polaridades, obtendo-se as frações acetato de etila (FAe), n-butanol (FBu) e aquosa (Aq). Desta última obteve-se ainda a resina (R).

A atividade citotóxica do EBH, resina e frações, foi avaliada frente ao bioensaio que utiliza *Artemia salina*. Às soluções etanólicas dos extratos em diferentes concentrações (100 - 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), adicionou-se larvas de *A. salina*, sendo determinada a mortalidade após 24 horas. Em paralelo utilizou-se um controle positivo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) e um controle negativo (etanol:água). A concentração para matar 50% das larvas, a DL_{50} crônica, foi determinada através de um gráfico de mortalidade (%) em função do logaritmo da dose ministrada. A maior toxicidade frente ao teste foi obtida para a FAe, e em menor proporção para o EBH e a resina. A FBu apresentou baixa atividade citotóxica.

A atividade antioxidante foi avaliada através da mistura de DPPH 0,004% com soluções dos extratos em diferentes concentrações (10 - 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A concentração necessária para obter 50% de atividade, IC_{50} , é determinada através do gráfico de % DPPH versus Concentração do extrato. A IC_{50} não foi alcançada em nenhum dos testes. Pode-se inferir que a atividade antioxidante do EBH, resina e frações são baixas, para a maior concentração testada (200 ppm).

A atividade alelopática foi avaliada a partir da germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) e do crescimento da radícula e hipocótilo. O maior efeito inibidor sobre a germinação das sementes, bem como para o crescimento da radícula e do hipocótilo, foi apresentado pela FAe.

Considerando que na fração acetato de etila concentrou-se atividade alelopática e citotóxica, esta foi escolhida pra um estudo fitoquímico.

A FAe foi cromatografada em coluna de sílica gel e eluída com solventes de gradiente crescente de polaridade: hexano/ acetato de etila/ etanol. Após várias recristalizações das frações cromatográficas, foi isolado o flavonóide glicosilado quercetina-3-O-(6''-O- α -ramnosil)- β -glicosídeo (Rutina). A elucidação estrutural desta substância foi realizada com base nos dados espectroscópicos de IV, RMN H^1 e RMN C^{13} , bem como por comparação com os dados da literatura.

Os resultados preliminares deste estudo são promissores no sentido de procurar compostos fitotóxicos e citotóxicos, principalmente na FAe, que pode servir de modelo para a síntese de substâncias ativas.

2. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais data de milênios, sendo seu intenso emprego descrito por antigas civilizações, como China e Índia. Mesmo hoje, as plantas são praticamente a fonte exclusiva de fármacos para a maioria da população mundial.

As estratégias no estudo de Produtos Naturais, principalmente do metabolismo secundário das plantas, sofreram mudanças substanciais nos últimos anos em função de uma série de fatores que vão desde os avanços tecnológicos, ao interesse específico da indústria química e farmacêutica por novas moléculas, principalmente aquelas que possuem alguma atividade biológica.

Dentro deste contexto, a proposta de inserção de ensaios biológicos simples à rotina dos laboratórios fitoquímicos, acompanhando as metodologias de isolamento e elucidação estrutural, é uma estratégia que contribuiu significativamente para a ciência de produtos naturais, mais especificamente na obtenção de novas moléculas ativas. Essa metodologia, além de encurtar o caminho para obtenção de substâncias bioativas, pode freqüentemente contribuir para o fornecimento de protótipos que serão utilizados nas transformações químicas (CORDEL, 1995; HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991). No entanto, é de suma importância que o bioensaio selecionado consiga acompanhar as características do trabalho fitoquímico, ou seja, o ensaio biológico proposto tem que ser de baixo custo, rápido e reprodutível (McLAUGHLIN et al., 1991).

Uma vez isolados os compostos ativos e suas estruturas elucidadas, estes podem, em alguns casos, constituir-se em novas substâncias com atividade biológica. Por outro lado, estas "moléculas líderes" poderão ser utilizadas como modelos para a síntese de compostos mais ativos e seletivos.

Assim, na presente proposta foram aplicados bioensaios simples como o teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, atividade antioxidante utilizando o cromóforo radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e o teste de inibição da germinação de sementes para avaliar as atividades citotóxica, antioxidante e alelopática respectivamente, ao extrato das folhas de *Canavalia rosea*, planta esta estudada também sob o ponto de vista fitoquímico.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Gênero *Canavalia*

O gênero *Canavalia*, pertencente à família das Leguminosas, também conhecida como Fabaceae, que é uma das maiores famílias do reino vegetal. As leguminosas são compostas por cerca de 750 gêneros, contendo 16.000 a 19.000 espécies distribuídas pelo mundo (ALLEN & ALLEN, 1981). Apesar do grande número de estudos realizados com as sementes de plantas do gênero *Canavalia*, raros são os estudos fitoquímicos com relação às outras partes da planta como folhas, galhos, cascas, etc.

Nas sementes de diferentes espécies de *Canavalia*, entre elas, *C. paraguayensis*, *C. gladiata* e *C. ensiformis* encontrou-se um aminoácido não-proteico (SCHLUTER & BORDAS, 1972) denominado L-canavanina ou ácido L-2-amino-4-(guanidinooxi) butanóico (Figura 1) considerado um análogo potencialmente tóxico da L-arginina (Figura 2) provocando efeitos antimetabólicos em vírus, bactérias e fungos, assim como em animais e plantas inferiores e superiores (ROSENTHAL, 1991).

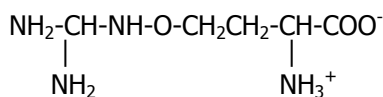


Figura 1: L-Canavanina

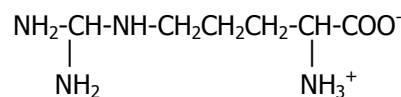


Figura 2: L-Arginina

Acredita-se ainda, que este aminoácido não-proteico tenha função de defesa nas plantas superiores contra herbívoros, predadores e patógenos (ROSENTHAL & BELL, 1979). Portanto, este aminoácido é considerado um aleloquímico protetivo e possui grande importância ecológica (BASS et al., 1995). Por exemplo, o consumo de canavanina pela larva do tabaco, *Manduca sexta*, atenua seu crescimento, produzindo pupas e adultos com aberrações durante o seu desenvolvimento.

Além do aminoácido canavanina, nas sementes de plantas do gênero *Canavalia* encontram-se também proteínas tóxicas, lecitinas, enzima manosidase entre outros compostos (EINHOFF & RÜDIGER, 1989).

A presença de lecitinas, proteínas de armazenamento e proteínas tóxicas em vegetais, particularmente nas sementes de plantas leguminosas, tem sido conhecida por muitas décadas. As proteínas tóxicas estão geralmente associadas com as lecitinas na

mesma semente. Lecitinas são fosfolipoproteínas que ligam-se especificamente a carboidratos. Entre as proteínas tóxicas encontradas em sementes, a primeira a ser isolada e identificada como uma proteína distinta foi a ricina, encontrada em *Receios communis* (mamona), junto com uma lecitina lactose-específica (TAKAHASHI, et al., 1962; NICOLSON, et al., 1974).

Das sementes de *Canavalia ensiformis* (jack-bean), foi isolada uma proteína tóxica chamada canatoxina, diferente da concanavalina A (Con A), uma conhecida lecitina presente nas sementes desta planta (CARLINI & GUIMARAES, 1981). A Con A, quando adicionada a células infectadas com vírus de estomatite vesicular (VSV), previne o amadurecimento do vírus. A concanavalina A reduz também a infecção viral da rubéola e herpes simples (MARCHETTI et al., 1995). Canatoxina é uma proteína neuro-tóxica e letal, à qual se atribuem efeitos farmacológicos. Induz em 24 horas dispnéia, ataxia, hipotermia, coma, convulsão crônica e morte em ratos, quando injetado por via intra-peritoneal com 100-200 mg de proteína/Kg de peso corporal (CARLINI & GUIMARÃES, 1981). A dose letal para matar 50% da população testada (DL₅₀) foi estabelecida em 0,4 a 0,6 mg/Kg e 2 a 3 mg/Kg quando injetada via intra-peritoneal em ratos e camundongos, respectivamente (CARLINI et al., 1984). A canatoxina aumenta a circulação de insulina e induz hipoglicemia em ratos (RIBEIRO-DA SILVA & PRADO, 1993).

A *C. gladiata* (feijão-espada) é uma fonte rica em poliaminas e compostos de guanidino (BACHRACH, 1973). Poliaminas alifáticas possuem um papel importante em vários processos celulares, tanto em plantas como em animais (OSHIMA, 1983). Poliaminas de ocorrência natural incluem as diaminas, triaminas, pentaminas e hexaminas. Cerca de 20 delas são encontradas na natureza. Além das poliaminas comuns tal como putrescina, espermidina e espermina, as sementes de *C. gladiata* contém, mais raramente, poliaminas como homoespermidina [NH₂(CH₂)₄NH(CH₂)₄NH₂] e canavalmina [NH₂(CH₂)₄NH(CH₂)₃NH(CH₂)₄NH₂]. Foram encontradas ainda pentaminas alifáticas, identificadas como derivados aminopropil e aminobutil de canavalmina (HAMANA & MATSUZAKI, 1985; FUJIHARA, et al., 1982; FUJIHARA, et al., 1986).

Leguminosas são ricas em α -glicosidase, uma enzima Zn²⁺ dependente, amplamente distribuída em plantas, bactérias e animais. Funcionalmente, a enzima implicada, em conjunto com outras glicosidases, agem na degradação de polissacarídeos, glicoproteínas e outros glico-conjugados durante a germinação de sementes para prover os nutrientes e energia para o crescimento da mesma (NIYOGI & SINGH, 1988).

3.2 *Canavalia rosea*

Também conhecida como feijão-da-praia, feijão-de-porco, “baybean”, “coastal jackbean”. Pertence a família Fabaceae (Leguminosae).



O feijão-da-praia é uma vegetação típica de restinga, sendo classificado como uma planta herbácea e trepadeira, que se estende ao longo das dunas da praia e da costa litoral (Figura 3a).

Figura 3a: *Canavalia rosea*, planta herbácea e trepadeira

As folhas mais novas dobram-se sob o sol quente do meio-dia. As flores cor-de-rosa são típicas de vagem (Figura 3b). A *Canavalia rosea* floresce no verão e esporadicamente no resto do ano. As vagens são lisas quando novas e enrugadas quando maduras. É conhecida também pelos sinônimos *Canavalia lineata* e *Canavalia marítima*.

A *C. rosea* cresce em praias, dunas e em costões. Seus caules rastejantes e subterrâneos fixam-se ao substrato arenoso impedindo assim a movimentação da areia. Plantas desta espécie, próximas ao mar, sofrem maior influência da salinidade marinha, através de ondas e respingos levados pelo vento.

Esta espécie é usada para controlar a erosão do solo em muitas partes do mundo. As vagens, quando jovens, e as sementes são comestíveis e usadas como alimento no norte da Austrália. As sementes maduras devem ser fervidas ou cozidas antes de serem consumidas como alimentos, pois são consideradas tóxicas.



Figura 3b: Flores de *Canavalia rosea*

3.2.1 Classificação Taxonômica

<i>Canavalia rosea</i>	
Reino	Plantae - vegetais
Sub-reino	Tracheobionta – plantas vasculares
Divisão	Magnoliophyta – angiospermas, e plantas com flores
Classe	Magnoliopsida – dicotiledôneas
Família	Fabaceae/Leguminosae
Gênero	<i>Canavalia</i> Adans - jackbean
Espécie	<i>C. rosea</i> (Sw.) DC. - baybean

3.3 Testes Biológicos

A sugestão de inclusão de ensaios biológicos simples à rotina dos laboratórios fitoquímicos, acompanhando as metodologias de isolamento e elucidação estrutural, contribui muito para a ciência de produtos naturais. É muito importante que o ensaio selecionado consiga acompanhar as características do trabalho fitoquímico, ou seja, o ensaio biológico proposto tem que ser de baixo custo, rápido e reprodutível. Este sincronismo é necessário ao estudo fitoquímico monitorado por ensaios biológicos simples e tem sido muito explorado recentemente na literatura (HAMBURGER et al., 1991; CORDEL, 1995; McLAUGHLIN & HOSTETTMANN, 1991).

Tem-se sugerido diferentes ensaios que podem ser adaptados à rotina de laboratórios de fitoquímica e estes são freqüentemente denominados “ensaio de bancada”. Entre eles destacam-se: Atividade antibacteriana, antifúngica, moluscicida, larvicida, alelopática e citotóxica.

3.3.1 Teste de toxicidade frente a *Artemia salina*

Testes biológicos simples foram desenvolvidos para prever as atividades *in vitro* e *in vivo*. Um “screening” que tem se mostrado eficiente é o que utiliza a *Artemia salina*.

Este bioensaio detecta um amplo espectro de atividade biológica em diferentes estruturas químicas, podendo ser usado como um substituto barato para os testes de citotoxicidade, que utilizam linhagens de células tumorais (McLAUGHLIN & HOSTETTMENN, 1991; McLAUGHLIN et al., 1991; McLAUGHLIN et al., 1993).

Devido a grande sensibilidade da *A. salina*, este bioensaio está estreitamente relacionado com a atividade biológica em geral, pois todo o composto que possui alguma atividade, também apresenta certa toxicidade (SAM et al., 1993; MEYER et al., 1982). Este bioensaio baseia-se na premissa de que compostos bioativos são tóxicos em altas doses e a letalidade de um organismo simples deve ser usada para monitorar o fracionamento de extratos ativos (McLAUGHLIN & HOSTETTMENN, 1991). Sendo assim, pode-se obter experimentalmente a DL₅₀ (concentração de extrato necessária para provocar óbito na metade das larvas testadas).

O organismo *Artemia salina* Leach (1812), mostrado na Figura 4, é um microcrustáceo marinho comumente conhecido por larva de camarão ou nauplius, pertencente a subclasse Branchiopoda, ordem Anostraca (SAM et al., 1993).



Figura 4: Larva de *Artemia salina* Leach (1812)

Fonte: <http://www.dinamicaespiral.com.br/artemiaframe.html>, 12/12/2003.

Estes animais são ricos em proteínas, sais minerais e vitamina A. Alimentam-se e respiram através de suas pernas, que precisam estar em constante movimentação (Figura 5). Os ovos deste microcrustáceo podem ser facilmente adquiridos em lojas especializadas. As larvas desenvolvem-se facilmente, não exigindo condições estéreis, o que torna a execução deste bioensaio viável em um laboratório clássico de química (HAMBURGER e HOSTETTMANN, 1991), sendo proposto como um substituto mais barato e simples para os ensaios citotóxicos com células (MEYER et al., 1982).

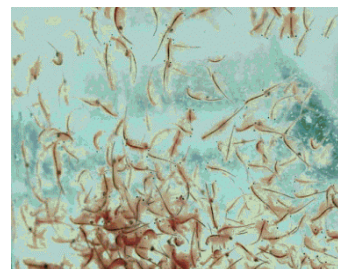


Figura 5: Larvas de *Artemia salina* no aquário.

Fonte: <http://www.armazendomar.com.br/biblioteca/artemia.html>, 18/01/03

3.3.2 Atividade antioxidante

O grande interesse por substâncias antioxidantes se deve principalmente ao fato dos radicais livres estarem envolvidos na etiologia de várias doenças, incluindo asma, inflamações, câncer e o próprio processo de envelhecimento (AMES et al., 1993). As células e os tecidos vivos estão permanentemente expostos a processos oxidativos contra os quais podem ser protegidos pela ação de antioxidantes naturais.

A literatura tem mostrado que inúmeros metabólitos secundários de plantas, tais como flavonóides, taninos ou mesmo extratos vegetais podem ser utilizados como captadores ou inibidores de radicais livres e/ou espécies ativas de oxigênio (BOUCHET et al., 1998). Os radicais livres são de grande interesse no desenvolvimento de novas drogas, levando antioxidantes de origem natural a receber uma atenção especial (POTTERAT, 1997).

Diversos são os modelos para uma avaliação prévia de substâncias e extratos vegetais com possível atividade antioxidante. Dentre eles merece destaque pela simplicidade e facilidade de ser introduzido como ensaio de bancada em laboratórios de Fitoquímica o método espectrofotométrico, utilizando o cromóforo radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) (BOUCHET et al., 1998; CAVIN et al., 1998).

A redução do radical DPPH, cuja estrutura é mostrada na Figura 6, é muito usado para medir a capacidade antioxidante em um tempo relativamente curto comparado com outros métodos. O efeito da ação antioxidante do radical DPPH se deve a sua habilidade de captar hidrogênio.

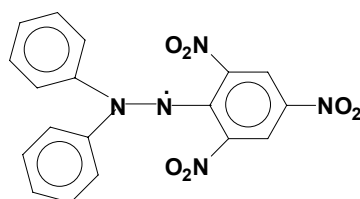


Figura 6: Estrutura do DPPH

3.3.3 Teste Alelopático

A eficiência da agricultura mundial depende do controle de doenças e pestes, especialmente ervas daninhas, já que estas competem com as plantas da colheita por recursos naturais, baixando o rendimento da mesma (VYVYAN, 2002).

Para evitar perdas na agricultura, o uso de insumos químicos, como inseticidas, fungicidas, herbicidas e fertilizantes impulsionou o desenvolvimento de nações predominantemente agrícolas como o Brasil. Os benefícios advindos dessas práticas agrícolas foram muitos, porém, também foram muitos os males causados ao meio ambiente e ao ser humano (COUTINHO, 1996).

Para sua defesa, as plantas sofrem adaptações físicas, e assim produzem um amplo espectro de metabólitos secundários, sendo que alguns destes exercem um efeito direto ou indireto sobre outras plantas, incluindo microorganismos, através da liberação de compostos químicos para o meio. A este fenômeno chamamos de alelopatia (WHITTAKER & FEENY, 1971; RICE, 1984; PUTNAM & TANG, 1986).

A atividade alelopática desempenha um papel relevante no meio ambiente. Os metabólitos secundários ou produtos naturais envolvidos em alelopatia são denominados aleloquímicos, e estes, por sua vez, podem ser liberados através de diferentes mecanismos: volatilização de folhas, exudação de raízes, lixiviação de folhas e restos de plantas até o solo por precipitação (PUTNAM, 1993).

Um bioensaio útil em estabelecer o potencial alelopático de um composto ou extrato de planta é o teste de germinação de sementes e de crescimento da radícula e hipocótilo. Estes bioensaios vem sendo introduzidos com muito sucesso nos laboratórios de fitoquímica para avaliar o potencial alelopático de plantas (BARUAH et al., 1994; MACÍAS et al., 1994; MACÍAS et al., 1996; MATA et al., 1998; MACÍAS et al., 1999; MACÍAS et al., 2000).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo central o desenvolvimento de um estudo fitoquímico de *Canavalia rosea*, biomonitorado pelos “bioensaios de bancada” para a avaliação da atividade alelopática, antioxidante e citotóxica.

4.2 Objetivos Específicos

- i) Preparo do extrato bruto das folhas de *Canavalia rosea*; por maceração em etanol;
- ii) Particionamento do extrato bruto por diferentes solventes, a fim de obter as frações em quantidades expressivas do extrato, para posterior estudo biológico e fitoquímico.
- iii) Aplicação do bioensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* ao extrato bruto e frações a fim de avaliar a atividade citotóxica.
- iv) Aplicação do bioensaio para atividade antioxidante usando DPPH ao extrato bruto e frações.
- v) Aplicação do bioensaio de germinação de sementes para avaliar a atividade alelopática ao extrato bruto e frações.
- vi) Isolamento e determinação estrutural dos possíveis princípios ativos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Equipamentos e reagentes

As vidrarias necessárias para o manuseio da amostra e realização dos testes foram os comuns aos laboratórios de química, como tubos de ensaio, placas de Petri, béqueres, coluna cromatográfica, entre outros. Os solventes utilizados, como etanol, metanol e acetato de etila, foram obtidos comercialmente.

Os cistos de *Artemia salina* e sal marinho foram adquiridos em lojas de aquário e as sementes de alface (*Lactuca sativa*) foram adquiridas em lojas agropecuárias. Tween 80 (polioxietilensorbitano monoleato) e DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) utilizados foram os da marca Aldrich.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em Espectrômetro UV-VIS, Hitache 2000. Para determinação estrutural utilizou-se Espectrômetro Infravermelho, PERKIN ELMER – FT 16 PC, e Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear, BRUKER 200 MHz.

5.2 Coleta e Identificação da planta

A *Canavalia rosea* foi coletada na Praia da Daniela, Florianópolis-SC, em abril de 2003, sendo identificada no Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, pelo professor Daniel de Barcellos Falkenberg.

5.3 Obtenção do Extrato Hidroalcoólico Bruto

Após a coleta, foram separadas as folhas do material vegetal, sendo estas secas em estufa e em seguida trituradas.

Foram obtidas aproximadamente 890 gramas de folhas secas e moídas, a partir do qual se obteve o extrato hidroalcoólico bruto por maceração (quinze dias) em álcool etílico de grau comercial. Logo após, o extrato hidroalcoólico foi filtrado e rotaevaporado

sob pressão reduzida (temperatura aproximada 70° C). A maceração foi repetida três vezes. Obteve-se cerca de 40,11 g do extrato bruto seco.

5.4 Particionamento do extrato bruto

Após obtenção do extrato bruto, adicionou-se água e então submeteu-se a uma extração líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades conforme Figura 7, obtendo-se as frações acetato de etila (**FAe**), n-butanol (**FBu**) e aquosa (**FAq**). Nesta última fração observou-se uma pequena precipitação após alguns dias em repouso, sendo filtrada e obtida a resina (**R**). Todas as frações e resina foram secas e conservadas em câmara fria inferior a 5°C e protegidos da luz.

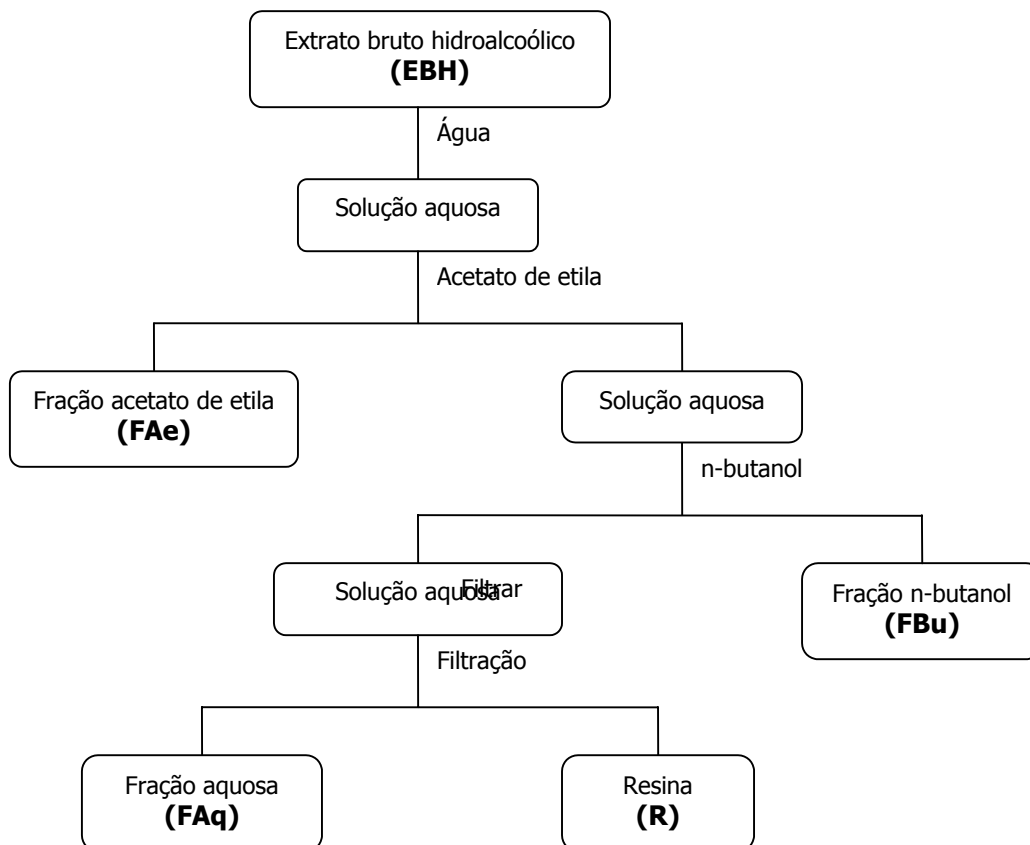


Figura 7: Fluxograma do particionamento do extrato bruto de *Canavalia rosea*.

5.5 Teste de Toxicidade Frente a *Artemia salina*

O extrato bruto e frações foram avaliados pelo teste de toxicidade frente *A. salina* segundo a metodologia de Meyer et al. (1982) com modificações. Estes foram dissolvidos em etanol, a fim de se obter uma concentração de $10.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ que foi diluído nas concentrações desejadas para o teste (100, 200, 500, 700 até $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

A toxicidade do extrato bruto e frações foi medida em solução de água marinha com 1% de tween 80 (v/v). Cada concentração foi feita em triplicata e estas foram acompanhadas do controle positivo ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), cuja toxicidade está entre 20 e 40 ppm segundo a literatura (SAM, 1993), e controle negativo (etanol:água destilada). Entre seis a dez larvas foram usadas em cada teste, sendo os sobreviventes contados após 24 horas em contato com os extratos.

A concentração para matar 50 % das larvas após o tempo de exposição, a DL_{50} , foi determinada através de um gráfico de % mortalidade vs logaritmo da dose, conforme se observa na Figura 8. Para os demais extratos, utilizou-se o mesmo método. Este método é descrito por Reed-Muench (IPSEN & FEIGL, 1970; MIYA et al., 1973).

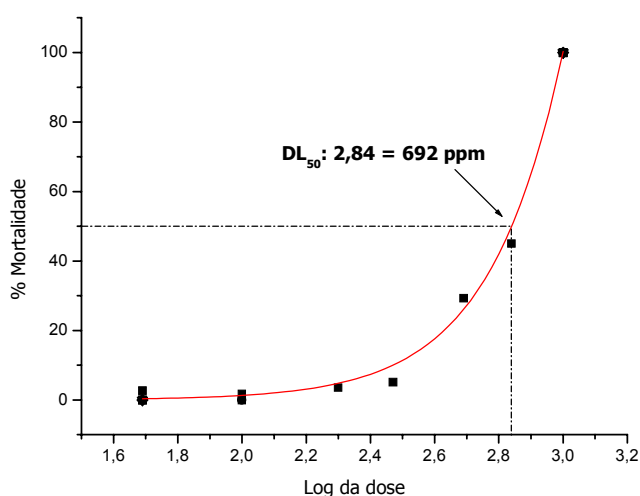


Figura 8: Obtenção da dose letal para a fração acetato de etila, frente ao teste de toxicidade com *A. salina*.

5.6 Teste de Atividade Antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada utilizando o cromóforo DPPH, técnica esta que se baseia no método de CAVIN et al. (1998) e BOUCHET et al. (1998).

Para realização do ensaio, preparou-se uma solução metanólica de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) 0,004 % momentos antes do uso. As amostras do extrato bruto e frações foram preparadas nas concentrações 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A leitura foi feita no espectrofotômetro UV-VIS, em 517 nm. Primeiro determinou-se a absorbância no tempo inicial (A_0) medindo-se a absorbância da mistura de 2mL de DPPH 0,004 % (que é violeta) e 1mL de metanol. Analogamente, a cada uma das soluções dos extratos em análise (1 mL), foram adicionados 2 mL de DPPH. Após 30 minutos iniciou-se as medidas. O teste foi feito em triplicata.

A IC_{50} , concentração necessária para provocar 50 % de decréscimo na absorbância do DPPH, é obtida a partir do gráfico de percentagem de DPPH em função da concentração do extrato, como exemplificado na Figura 9 para o extrato n-butanol.

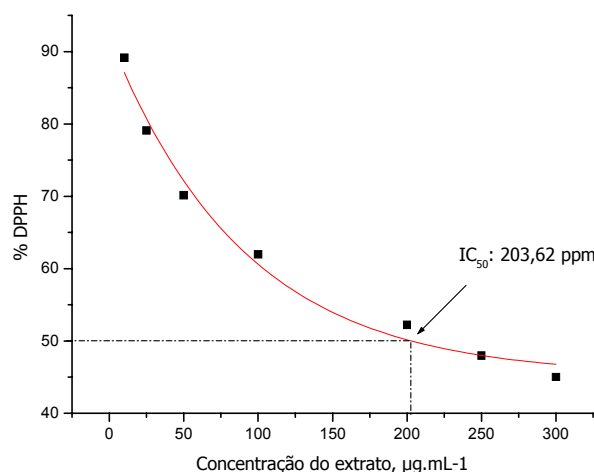


Figura 9: Obtenção da IC_{50} , para o n-butanol.

5.7 Teste Alelopático

Este ensaio biológico consiste na germinação de 25 sementes em placa de Petri, as quais contém discos de papel filtro embebido com 1 mL das soluções do extrato bruto e frações em diferentes concentrações (MACIAS, et al., 1994).

Após aplicação do extrato adiciona-se 1,5 mL de Tween 80 ($100 \mu\text{g.mL}^{-1}$). No dia seguinte ao início do teste as sementes foram semeadas. Após doze horas, iniciaram-se a contagem das sementes que germinaram. A contagem é feita diariamente por cinco dias, e, neste último, avalia-se o crescimento da radícula e hipocótilo, medidos com auxílio de

uma régua. Em paralelo, faz-se o controle com uma testemunha, ou branco, (água destilada). Para cada uma das concentrações o teste é feito em triplicata.

5.8 Estudo Fitoquímico do Extrato de *Canavalia rosea*

A fração acetato de etila (3,9 g), foi submetida a cromatografia em coluna de sílica gel. A eluição foi realizada segundo uma ordem crescente de polaridade de acordo com o sistema hexano/acetato de etila/etanol, conforme Tabela 1.

As sub-frações foram coletadas e concentradas por meio de um evaporador rotativo sob pressão reduzida, e, por fim, transferidas para frascos menores, sendo posteriormente analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD) e reunidas de acordo com resultados.

Tabela 1: Frações eluídas através de coluna cromatográfica.

Hexano %	Acetato de etila %	Etanol %	Frações
100	-	-	1,2
97	3	-	3
95	5	-	4-6
90	10	-	7-12
85	15	-	13-15
80	20	-	16-25
75	25	-	26-30
70	30	-	31-34
60	40	-	35,36
50	50	-	37-41
40	60	-	42-44
30	70	-	45-48
20	80	-	49-53
10	90	-	54-57
-	100	-	58-62
-	95	5	63,64
-	80	20	65-68
-	70	30	69-71
-	60	40	72-75
-	40	60	76,77
-	20	80	78,79
-	-	100	80,81

As frações que apresentaram precipitados foram tratadas a fim de isolar possíveis compostos ativos. Estes foram estudados através da análise conjunta de dados espectroscópicos, como infravermelho (IV), ressonância magnética nuclear de próton (RMN ^1H) e carbono 13 (RMN ^{13}C).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inúmeros são os estudos fitoquímicos realizados com sementes de plantas do gênero *Canavalia*. No entanto a espécie *C. rosea* não tem sido estudada, e, por fazer parte da flora catarinense, torna-se interessante realizar um estudo fitoquímico desta, a fim de isolar possíveis compostos que exibam atividade.

6.1 Análise do Bioensaio utilizando *Artemia salina*

O bioensaio que utiliza *A. salina* tem sido adotado em laboratórios de fitoquímica para avaliar a atividade citotóxica. Este bioensaio apresenta boa correlação com ensaios que utilizam linhagens de células tumorais bem como com outros ensaios biológicos.

Foram submetidos a este ensaio o extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *C. rosea*, assim como a resina e frações obtidas a partir deste extrato. Neste bioensaio, considera-se uma planta com atividade citotóxica, quando o valor DL_{50} for menor que 1000 ppm (MEYER et al., 1982). Na Tabela 2 encontram-se os valores da DL_{50} .

Tabela 2: Efeito do extrato bruto e frações de *C. rosea* frente ao bioensaio com *Artemia salina*.

Extrato/fração	DL_{50} , $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
Extrato bruto	906
Fração acetato de etila	692
Fração n-butanol	> 1000
Resina	920

Com base nos resultados, pode-se observar que a fração acetato de etila apresentou maior toxicidade frente ao ensaio com *Artemia salina*. O extrato bruto e a resina também mostraram atividade, no entanto em menor proporção. Já a fração n-butanol não apresentou atividade citotóxica significativa frente a este bioensaio.

6.2 Análise do Bioensaio para Atividade Antioxidante

O bioensaio que utiliza o radical livre DPPH é utilizado para determinar a possível atividade antioxidante de extratos vegetais. Este radical é relativamente estável, de forte

coloração azulada e suficientemente solúvel em álcoois miscíveis em água, como o metanol.

A ação seqüestrante de radicais livres pelo DPPH deve-se a reação deste com compostos, geralmente fenólicos, pela abstração de um radical hidrogênio, de acordo com a seguinte equação:



A solução metanólica de DPPH 0,004% é progressivamente descorada com a adição do extrato, e, quanto maior for a atividade antioxidante do extrato, maior será a descoloração da solução.

A atividade antioxidante do extrato bruto, resina e frações das folhas de *Canavalia rosea* podem ser observadas na Tabela 3.

Tabela 3: Atividade antioxidante do extrato e frações de *C. rosea*.

Concentração do extrato, $\mu\text{g.mL}^{-1}$	% Atividade antioxidante				
	EB	FAe	FBu	FAq	R
10	2,3	13,1	10,9	5,8	4,64
25	8,3	20,8	20,9	6,2	6,89
50	16,8	30,1	29,8	8,5	11,4
100	22,3	37,5	38,0	13,6	18,1
200	27,3	45,3	47,8	20,1	38,9

Em nenhum dos casos pode-se determinar a IC_{50} , que é a concentração necessária para que se obtenha 50 % de atividade. Pode-se inferir que a atividade antioxidante do extrato, resina e frações testadas é baixa, para a maior concentração testada (200 ppm).

6.3 Análise do Bioensaio para Atividade Alelopática

Para realizar o ensaio de germinação de sementes a fim de avaliar a atividade alelopática, foram submetidos ao ensaio: extrato bruto, resina e frações obtidas do particionamento de *C. rosea*. O efeito destes extratos sobre a germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*), assim como sobre o desenvolvimento da plântula, isto é, crescimento da radícula e hipocótilo, estão mostrados na Tabela 4.

Tabela 4: Efeito do extrato e frações de *C. rosea* sobre a germinação de sementes.

Extrato bruto			
[Extrato], g %	% Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,31	101,4	133,7	98,0
0,62	92,9	123,0	102,0
1,25	84,5	50,4	94,0
2,50	46,5	31,3	98,6
5,00	21,1	17,8	82,3
Acetato de etila			
[Extrato], g %	% Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,31	50,0	82,9	46,48
0,62	10,0	54,5	51,7
1,25	NC	-	-
2,50	NC	-	-
5,00	NC	-	-
n-butanol			
[Extrato], g %	% Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,31	105,6	55,5	125,5
0,62	101,4	20,6	103,9
1,25	92,9	18,6	80,4
2,50	69,7	13,9	49,0
5,00	21,1	7,1	54,9
Aquosa			
[Extrato], g %	% Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,31	98,0	21,8	67,8
0,62	98,0	15,0	59,3
1,25	94,0	10,5	52,5
2,50	88,0	9,5	49,1
5,00	52,0	6,8	45,8
Resina			
[Extrato], g %	% Germinação	% Crescimento radicular	% Crescimento hipocótilo
0,15	100,7	86,9	101,4
0,31	96,6	89,9	109,8
0,62	102,8	99,3	109,8
1,25	102,8	91,3	104,2
2,50	88,4	68,5	84,5

NC: não observou-se germinação

Como se pode observar, a fração acetato de etila apresentou a maior atividade alelopática, inibindo em 50 % a germinação das sementes na concentração 0,31 g % e 90% na concentração 0,62 g %. Com esta fração, para concentrações maiores, não houve germinação das sementes. Nesta mesma concentração (0,31 g %) as outras frações não apresentaram inibição na germinação das sementes, com exceção do resíduo aquoso que inibiu apenas 2 %, resultado que pode não ser interessante.

O extrato bruto apresentou um leve estímulo na germinação das sementes na concentração 0,31 g %, porém, aumentando-se a concentração do mesmo, a germinação passa a ser inibida. Na concentração 5,0 g % o efeito inibitório chega a 78,9 % sobre a germinação das sementes. O mesmo efeito se observa para o crescimento radicular, com inibição do crescimento em 82,2 % na concentração 5,0 g %. Para o crescimento do hipocótilo não foram observados grandes efeitos inibitórios.

A fração n-butanol em concentrações mais baixas mostrou um estímulo na germinação das sementes de alface, porém à 5,0 g% apresentou efeito inibitório de 78,9 % das sementes. Seu maior efeito inibitório se mostrou presente no crescimento radicular, apresentando, na concentração 0,31 g%, uma inibição de 44,5 % passando a 92,9 % em 5,0 g %. Quanto ao crescimento do hipocótilo, houve um estímulo em 25,5 % na concentração 0,31 g %, e sua maior inibição (51 %) em 2,5 g % de extrato.

A fração aquosa não apresentou muito efeito sobre a germinação das sementes e sua maior inibição foi de 48 % na concentração 5,0 g %. Assim como a fração n-butanol, seu maior efeito foi sobre o crescimento radicular, inibindo 78,2 % em 0,31 g % de extrato, aumentando a inibição à medida que aumenta a concentração do extrato chegando a inibir em 93,2 % o crescimento da radícula na concentração de 5,0 g %. Este mesmo efeito se observa sobre o crescimento do hipocótilo, porém com menor intensidade, apresentando maior inibição na concentração 5,0 g % onde a inibição foi de 54,2 %. A resina foi a fração que apresentou menor atividade alelopática, podendo ser observado um estímulo em grande parte dos resultados. Os resultados são mostrados na Figura 10.

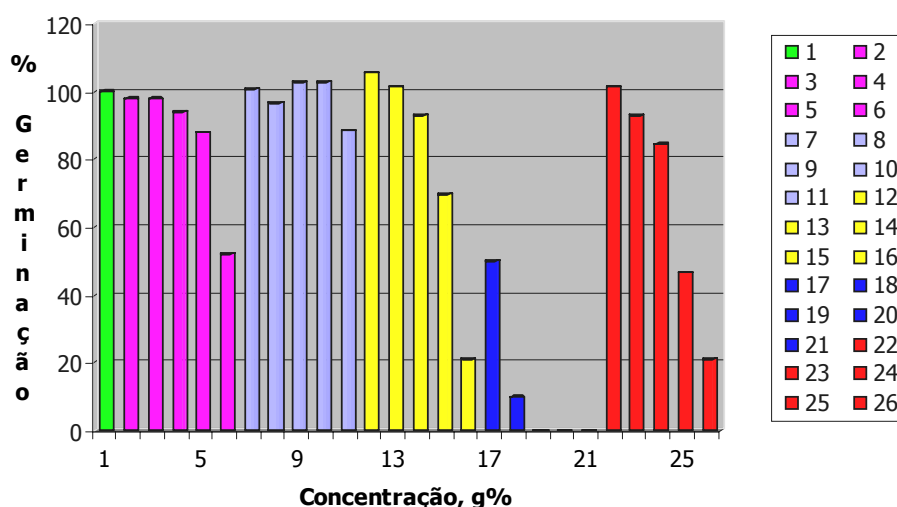


Figura 10: Efeito do extrato e frações das folhas de *C. rosea* sobre a germinação de sementes.

Legenda:

- **1** – Testemunha.
- **2 ao 6** – Resíduo aquoso, concentrações 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 e 5,0 g % respectivamente.
- **7 ao 11** – Resina, concentrações 0,15; 0,31; 0,62; 1,25 e 2,5 g % respectivamente.
- **12 ao 16** – n-butanol, concentrações 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 e 5,0 g % respectivamente.
- **17 ao 21** – Acetato de etila, 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 e 5,0 g % respectivamente.
- **22 ao 26** – Extrato bruto, 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 e 5,0 g % respectivamente.

6.4 Análise do Estudo Fitoquímico do Extrato de *Canavalia rosea*

Por apresentar maior atividade frente aos ensaios biológicos, a fração acetato de etila foi tomada para um estudo fitoquímico preliminar. Vale lembrar que é interessante realizar um estudo mais detalhado com as outras frações, uma vez que são poucos os estudos realizadas com *Canavalia rosea*.

Após fracionamento da fração acetato de etila, através de cromatografia em coluna e análise por cromatografia em camada delgada (CCD) as frações coletadas puderam ser reunidas conforme comportamento frente a CCD.

Dentre as 83 frações recolhidas, foi dada maior atenção às frações 70 a 73. Nestas houve formação um de sólido amarelo-esverdeado, que após diversas recristalizações em metanol, foram analisadas por espectroscopia de Infravermelho. Os espectros permitem deduzir que o composto é o mesmo nas quatro frações. O espectro Infravermelho da fração 71 encontra-se no Anexo 1. Este espectro é característico de flavonóide glicosilado, com uma banda intensa em $3422,57\text{ cm}^{-1}$ correspondente a deformação axial do grupo -OH . A banda em $2934,20\text{ cm}^{-1}$ é característica de vibrações de deformação axial -C-H . Apresenta também intensas bandas na região entre $1600\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. Bandas de absorção na região de $1500\text{ a }1600\text{ cm}^{-1}$ são característicos de vibração da ligação C-C do esqueleto aromático. Absorção relativa ao grupo carbonílico do flavonóide aparece em $1654,48\text{ cm}^{-1}$. A natureza glicosídica do flavonóide é refletida pela banda intensa e larga em $3422,57$ e $1063,96\text{ cm}^{-1}$, referente absorção das hidroxilas e da ligação C-O, respectivamente.

Para confirmar a presença do grupo flavonoídico foi realizado um teste analítico misturando 1 mL da solução da fração 71 com magnésio metálico e HCl. A cor vermelha indicou a presença de flavonóide.

A fração 71 foi também submetida a espectroscopia de RMN de H^1 e C^{13} .

O espectro de RMN de H^1 em CD_3OD (Anexo 2) mostrou sinais característicos da aglicona quercetina, sendo os prótons anoméricos em δ 5,35 e 4,71 ppm são característicos da glicose e ramnose, respectivamente. Os dados referentes a esta análise estão relacionados na Tabela 5 e podem ser discutidos como segue: dois dubletes centrados em 6,39 ppm (d; $J = 1,92$) e em 6,59 ppm (d; $J = 1,92$) correspondentes aos H-6 e H-8 da aglicona, respectivamente. A constante de acoplamento destes hidrogênios indica que os mesmos são meta relacionados. Um outro sinal em 7,06 ppm (d; $J = 8,30$) corresponde a presença de H-5' da quercetina. Outro sinal em 7,80 ppm com integração para dois hidrogênios foi atribuído aos H-2' e H-6'. O sinal para o H do C-6 da ramnose é observado em δ 1,31 ppm como dublete e com constante de acoplamento de 6,1. Os outros sinais relativos aos H-2 a H-6 da glicose e aos H-2 a H-5 da ramnose estão situados na região entre 3,46 a 3,81 ppm.

Tabela 5- Dados espectroscópicos de RMN de H^1 (200 MHz) para rutina (dados experimentais e da literatura) em CD_3OD .

	Literatura ^a	Dados experimentais
Aglicona		
H-6	6,21 (d; 2,0)	6,39 (d; 1,92)
H-8	6,40 (d; 2,0)	6,59 (d; 1,92)
H-2'	7,66 (d; 2,1)	7,80
H-5'	6,87 (d; 8,5)	7,06 (d; 8,30)
H-6'	7,62 (dd; 2,1; 8,5)	7,80
3-Glicosil		
H-1	5,10 (d; 7,7)	5,35
H-2	5,46 (dd; 7,7; 8,9)	
H-3	3,40 (t; 8,9)	
H-4	3,26 (t; 8,9)	
H-5	3,32 (ddd; 1,2; 6,1; 8,9)	
H-6a	3,80 (dd; 1,2; 11,0)	
H-6b	3,38 (dd; 6,1; 11,0)	
6''-Ramosil		
H-1	4,51 (d; 1,5)	4,71
H-2	3,62 (dd; 1,5; 3,4)	
H-3	3,53 (dd; 3,4; 9,6)	
H-4	3,27 (t; 9,6)	
H-5	3,44 (dq; 6,2; 9,6)	
H-6 (CH ₃)	1,11 (d; 6,2)	1,31 (d; 6,10)

^aKAZUMA et al., 2003.

O espectro de RMN de C^{13} (Anexo 3) mostrou sinais correspondendo a aglicona flavonol (quercetina) e sinais correspondentes aos açúcares glicose e ramnose, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Dados espectroscópicos de RMN de C^{13} para a rutina (dados experimentais e da literatura) em CD_3OD .

	Literatura ^a	Dados experimentais
Aglicona		
C-2	158,52	158,80
C-3	135,62	135,89
C-4	179,44	179,70
C-5	162,98	163,27
C-6	99,95	100,22
C-7	166,01	166,37
C-8	94,87	95,14
C-9	159,35	159,63
C-10	105,66	104,97
C-1'	123,15	123,38
C-2'	117,69	117,95
C-3'	145,94	146,14
C-4'	149,81	150,11
C-5'	116,06	116,35
C-6'	123,55	123,82
3-Glicosil		
G-1	104,69	104,98
G-2	75,74	76,01
G-3	78,20	78,44
G-4	71,42	71,67
G-5	77,25	77,49
G-6	68,56	68,83
6''-Ramosil		
R-1	102,42	102,70
R-2	72,12	72,38
R-3	72,26	72,50
R-4	73,94	74,20
R-5	69,71	69,99
R-6	17,87	18,17

^aKAZUMA et al., 2003.

O espectro de RMN C^{13} /DEPT (CD_3OD , 60 MHz) (Anexo 4) mostra a presença de um sinal negativo em 68,80 ppm referente ao $-CH_2$ da glicose.

Desta forma, a quercetina-3-O-(6''-O- α -ramnosil)- β -glicosídeo, também conhecido como quercetina 3-rutinosídeo ou ainda **rutina** (Figura 11), foi estabelecida

para o composto analisado. A rutina é também conhecida como vitamina P. É um fármaco usado no tratamento de insuficiência venosa crônica (REHN et al., 1991). Essa substância é utilizada na fabricação de medicamentos que fortalecem os vasos sanguíneos e capilares, sendo indicada também no tratamento de varizes. Algumas indústrias já acrescentam a rutina em complementos alimentares direcionados à idosos. Entre outros, a suplementação nutricional com rutina demonstrou importante papel na prevenção da aterosclerose, pois induziu elevação significativa da lipoproteína de alta densidade (colesterol-HDL de $35,82 \pm 2,31$ mg/dL para $44,40 \pm 3,11$ mg/dL) (RODRIGUES et al., 2003). Explorada por grandes empresas nacionais e estrangeiras, mediante o pagamento de um preço irrisório pela matéria-prima, a substância volta ao mercado sob a forma de medicamentos, vitaminas e complementos alimentares a preços altos.

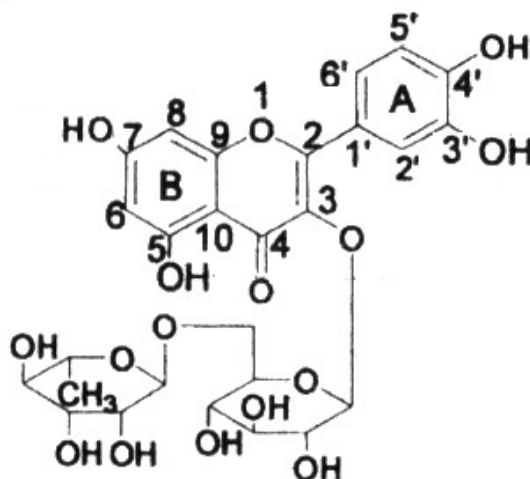


Figura 11: Estrutura da rutina

Finalmente, para total certeza sobre a identidade da amostra, analisou-se através de cromatografia em camada delgada (CCD) em três distintos solventes, a amostra juntamente com rutina (padrão). Os resultados encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7: Eluentes usados na CCD e valores de R_f para o padrão rutina e amostra.

Mistura eluente	R_f Rutina (padrão)	R_f amostra 71
Acetato etila/MetOH 75/25	0,68	0,68
Acetato etila /EtOH 75/25	0,70	0,70
Acetato etila /EtOH 90/10	0,52	0,52

7. CONCLUSÃO

Com o objetivo deste trabalho desenvolveu-se um estudo fitoquímico de *Canavalia rosea*, biomonitorado pelos "bioensaios de bancada" para a avaliação da atividade alelopática, antioxidante e citotóxica.

A atividade citotóxica do extrato bruto, resina e frações foram avaliadas frente ao bioensaio que utiliza *Artemia salina*. A maior toxicidade frente ao teste foi obtida para a fração acetato de etila, e em menor proporção para o extrato bruto e a resina. Já a fração n-butanol apresentou baixa atividade citotóxica.

Quanto à atividade antioxidante, avaliada através do radical livre DPPH, não foi possível determinar a concentração necessária para obter 50% de atividade antioxidante, IC_{50} , em nenhum dos testes. Neste caso, pode-se inferir que a atividade antioxidante do extrato bruto, resina e frações são baixas, para a maior concentração testada (200 ppm).

Dos extratos testados frente ao bioensaio de atividade alelopática, o maior efeito inibidor da germinação de sementes de alface (*Lactuca sativa*) e do crescimento da radícula e hipocótilo, foi apresentado pela fração acetato de etila. O extrato bruto, a fração aquosa e a fração n-butanol em concentrações mais baixas não inibiram a germinação das sementes. A resina apresentou menor atividade alelopática.

Da fração acetato de etila foi isolado o flavonóide glicosilado quercetina-3-O-(6'''-O- α -ramnosil)- β -glicosídeo (Rutina). Os resultados preliminares deste estudo são promissores no sentido de procurar compostos fitotóxicos e citotóxicos, principalmente na fração acetato de etila, e podem servir de modelo para a síntese de substâncias ativas.

É preciso incentivar a pesquisa fitoquímica, direcionada ao isolamento de moléculas com potencial atividade biológica, a fim de conservar as espécies ainda existentes, bem como adquirir dados que possam enriquecer o banco de dados fitoquímico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

<http://www.armazendomar.com.br/biblioteca/artemia.html>, 18/01/04.

<http://hidricos.mg.gov.br/vazareal/volume1.1/4541.htm>, 25/08/03.

http://www.floridata.com/ref/C/cana_ros.cfm, 25/08/03.

<http://epoca.globo.com/edic/19980810/ciencia8.htm>, 18/01/04.

<http://www.radiobras.gov.br>, 18/01/04.

<http://www.sbgq.org.br/ranteriores/23/resumos/1282-1>, 18/01/04.

http://colfarma.com.ar/afb/revistas/trabajos/22_1/04_nagem_oliveira.pdf, 18/01/04.

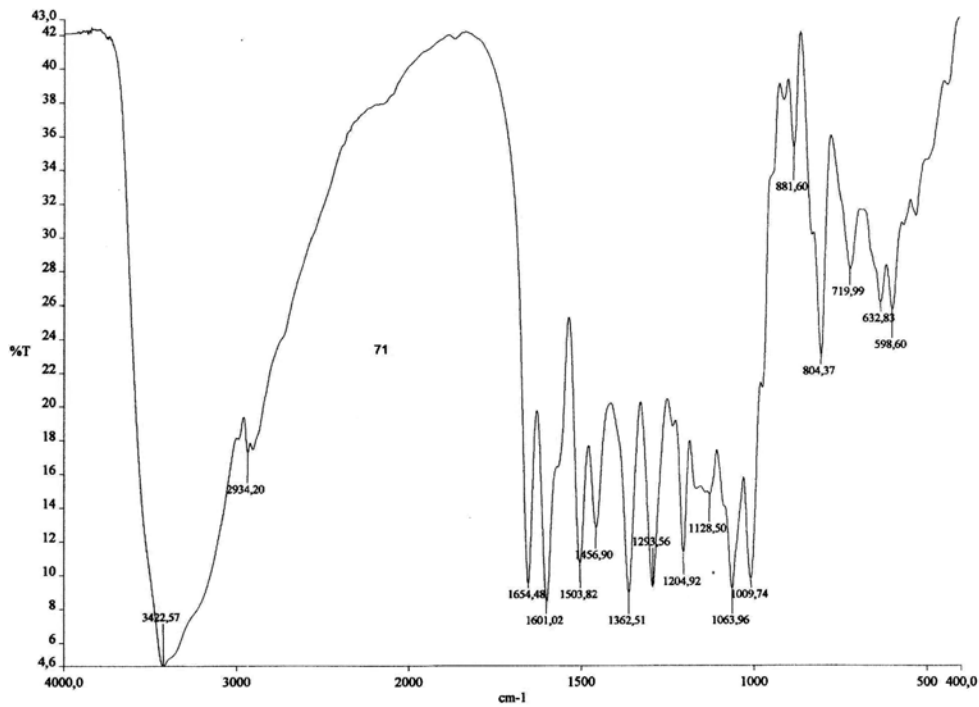
- Ames et al., 1993; Auroma, 1998; Jacob & Burri, 1996; Steinberg, 1991; Maxwell & Lip, 1997; Pratico & Delantiy, 2000; Wang et al., 1996.
- Allen, O.N. and Allen, E.K., **The Leguminosae: A source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation**, University of Wisconsin Press, Madison, 1981.
- Bass, M., Harper, L., Rosenthal, G.A., Phuket, S. N. and Crookst, P.A., **Large-scale Production and Chemical Characterization of the Protective Higher Plant Allelochemicals: L-Canavanine and L-Canaline**, *Biochemical Systematics and Ecology*, **23** (7/8), 717-721, 1995.
- Bachrach, U., *Function of Naturally occurring Polyamines*. Academic Press, New York, 1973.
- Baruah, N.C., Sarma, J.C., Barua, N.C., Sarma, S. and Sharma, R.P., *Phytochemistry*, **36** (1), 29-36, 1994.
- BOUCHET et al., *Phytotherapy research*, **12**, 159, 1998.
- Carlini, C.R. and Guimaraes, J.A., **Isolation of a Toxic Protein from *Canavalia Ensiformis* (Jack Bean) Seeds, Distinct from Concanavalin A**, *Toxicon*, **19** (5), 667-675, 1981.
- Carlini, C.R., Guimaraes, J.A., *Toxicon*, **19**, 667, 1981.
- Carlini, C.R., Guimaraes, J.A., Gomes, C.B., Markus, R.P., Sato, H. and Trolin, G., **Central nervous effect of the convulsant protein canatoxin**, *Acta pharmacol, Toxicon*, **54**, 161-166, 1984.
- Cavin, A., Potterat, O., Wolfender, J.L., Hostettmann, K., **LC-UV-MS and LC-NMR of an anti-oxidant fraction from *Orophea enneandra* and the isolation of a polyacetylene, lignans and a tocopherol derivative**, *Journal of Natural Products*, **61**, 1497, 1998.

- Cordel, G.A., *Phytochemistry*, **40**, 6 e 1585, 1995.
- Coutinho, H.L.C., **Diversidade Microbiana e Agricultura Sustentável** [online], CNPS/EMBRAPA, 1996
Disponível em : www.bdt.org.br/~marinez/padct.bio/cap9/1/heitor.html , capturado em 10/07/2003.
- Einhoff, W. and Rüdger, H., **Leguminous glycosidases: Hydrophobic and Lectin Binding Properties**, *Phytochemistry*, Printed in Great Britain, **28**, 355-357, 1989.
- Feskanich, D., Ziegler, R.G., Michaud, D.S., Giovannuci, E.L., Speizer, F.E., Willett, W.C. and Colditz, G.A., **Journal of the National Cancer Institute**, **92**, 1812-1823, 2000.
- Fujihara, S., Nakashima, T. and Kurogochi, Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **107**, 403, 1982.
- Fujihara, S., Nakashima, T., Kurogochi, Y. and Yamaguchi, M., *Plant. Physiol.*, **82**, 795, 1986.
- Haegele, A.D., Gillette, C., O'neill, C., Wolf, P., Heimendinger, J., Sedlacek, S., and Thompson, H.J., **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, **9**, 421-425, 2000.
- Hamana, K. and Matsuzaki, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 46, 1985.
- Hamburger, M. and Hostettmann, K., **Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine**, *Phytochemistry*, **30**, 1991.
- Hofstetter, M., Nyiredy, Sz., Meier B. and Sticher, O., **Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of the tetrameric lectin concanavalin A from *Canavalia ensiformis***, *Journal of Chromatography*, **407**, 319-323, 1987.
- Ipsen, J. and Feigl, P., **Bancroft to Biostatistics**, 2nd ed., Harper & Row, New York, Cap. 15, 1970.
- Kazuma, K., Noda, N. And Suzuki, M., **Malonylated flavonol glycosides from the petals of *Clitoria ternatea***, *Phytochemistry*, **62**, 229-237, 2003.
- Macias, F.A., Simonet, A.M. and Esteban, M.D., *Phytochemistry*, **36** (6), 1369-1379, 1994.
- Macias, F.A., Torres, A., Molinillo, J.M.G., Varela, R.M., Castellano, D., *Phytochemistry*, **43** (6), 1205-1215, 1996.
- Macias, F.A., Galindo, J.C.G., Castellano, D. and Velasco, J.M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **47**, 4407-4414, 1999.

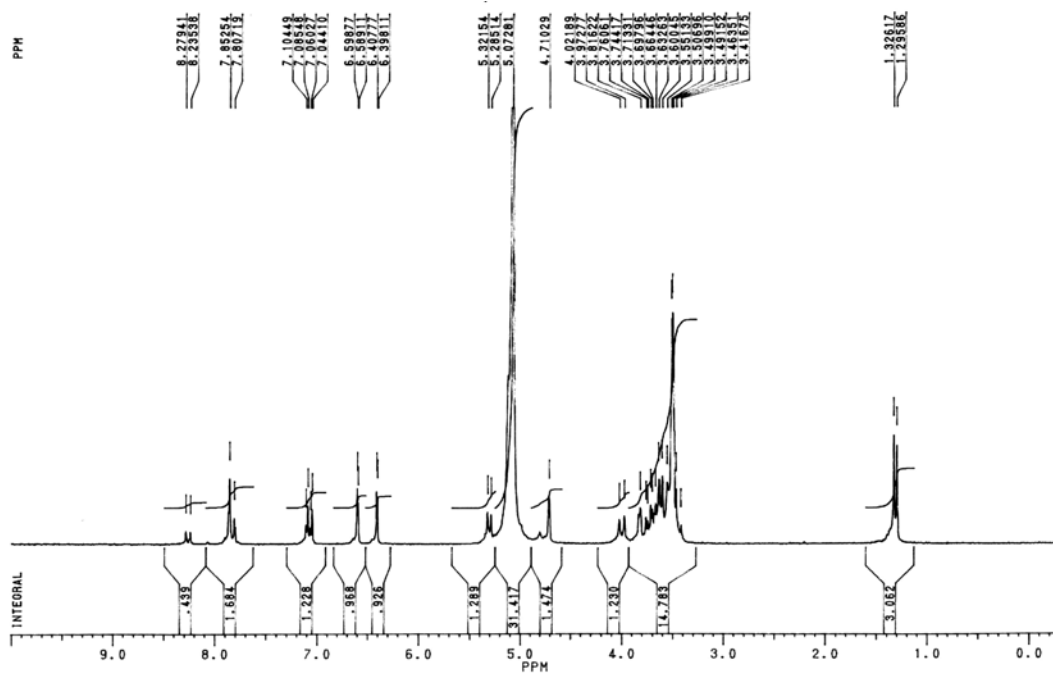
- Macias, F.A., Castellano, D. and Molinello, J.M., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48** (6), 2512-2521, 2000.
- Mata, R., Macias, M.L., Rojas, I.S., Lotina-Hennsen, B., Toscazo, R.A. and Anaya, A.L., *Phytochemistry*, **49** (2), 441-449, 1998.
- Marchetti, M., Mastromarino, P., Rieti, S., Seganti, L. and Orsi, N., **Inhibition of Herpes Simplex, Rabies and Rubella Viruses by Lectins with Different Specificities**, *Res. Virol.*, **146**, 211-215, 1995.
- Matsuzaki, S., Hamana, K., Okada, M., Niitsu, M. and Samejima, K., **Aliphatic Pentaamines Found in *Canavalia Gladiata***, *Phytochemistry*, **29** (4), 1311-1312, 1990.
- McLaughlin, J.L and Hostettmann, K., **Methods in Plant Biochemistry**, Ed. Academic Press, London, **6**, 1991.
- McLaughlin, J.L., Chang, C-J. and Smith, D.L., **"Bench-top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: An Update in Studies in Natural Products Chemistry**, Ed. Atta-ur-Rhman, Elsevier, Science Publishers B.V., Amsterdam, **9**, 1991.
- McLaughlin, J.L., Chang, C-J. and Smith, D.L., **Simple bench-top bioassays (Brine Shrimp and Potato Disk) for the discovery of antitumor compounds – Review of recent progress – in Human Medicinal Agents from Plants**, Ed. Kinghorn and Balandrini, 1993.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.F., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E., McLaughlin, J.L., **Brine Shrimp a convenient general bioassay for active plant constituents**, *Planta Médica*, **45**, 31, 1982.
- Miya, T.S., Holck, H.G.O., Yim, G.K.M., Mennear, J.H., Spratto, G.R., *Laboratory Guide in Pharmacology*, 4^a ed., Burgess Publishing, Minneapolis, 127, 1973.
- Nicolson, G.L., Blaustein, J. and Etzler, M., *Biochemistry*, **13**, 196, 1974.
- Niyogo, K. and Singh, M., **An Immunologically Distinct form of A-D-Mannosidase in *Canavalia Ensiformis* Leaf**, *Phytochemistry*, **27** (9), 2737-2741, 1988.
- Oshima, T., *Advances in Polyamine Research*, (Bachrach, U., Kaye, A. and Chayan, R., eds), **4**, 479, Raven Press, New York, 1983.
- Potterat, O., **Antioxidants and free radical scavengers of natural origin**, *Current Organic Chemistry*, **1**, 415, 1997.
- Putnam, A.R. & Tang, C.S., *The Science of Allelopathy*, New York, 1-22, 1986.
- Putnam, A.R., *Chem. Eng. News*, **61** (14), 34-45, 1983.

- Rehn, D., Hennings, G., Nocker, W. And Diebschlag, W., *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **40**, 625, 1991.
- Ribeiro-DaSilva, G. and Prado, J.F., **Increased Insulin Circulating Levels Induced by Canatoxin in Rats**, *Toxicon*, **31** (9), 1131-1136, 1993.
- Rice, E.L., *Allelopathy*, 2nd ed., Academic New York, 1-7, 1984.
- Rodrigues, H. G.; DINIZ, Y. S., FAINE, L. A. *et al.* **Suplementação nutricional com antioxidantes naturais: efeito da rutina na concentração de colesterol-HDL**, *Rev. Nutr.*, **16** (3), 315-320, jul./set. 2003.
- Rosenthal, Gerald A., **The Biochemical Basis for the Deleterious Effects of L-Canavanine**, *Phytochemistry*, **30**, 1055-1058, 1991.
- Rosenthal, G.A. and Bell, E.A., **Herbivores – Their Interaction with Secondary Plant Metabolites**, Academic Press, 353-385, 1979.
- Sam, T.W., Colegata, S.M. and Molyneuse, R.J., **Toxicity testing using the brine shrimp: *Artemia salina***, *Bioactive natural products*, Ed. CRC Press, 1993.
- Schlüter, M. and Bordas, E., **Canavanina in *Canavalia paraguayensis*, *C. gladiata* and *Dioclea paraguayensis***, *Phytochemistry*, **11**, 3533-3534, December 1972.
- Takahashi, T., Funatsu, G. and Funatsu, M., *J. Biochem* , **52**, 50, Tokio, 1962.
- Vyvyan, J.R., *Tetrahedron*, **58**, 1631-1646, 2002.
- Whittaker, R.H. and Feeney, P.P., *Science*, **171**, 757-770, 1970.

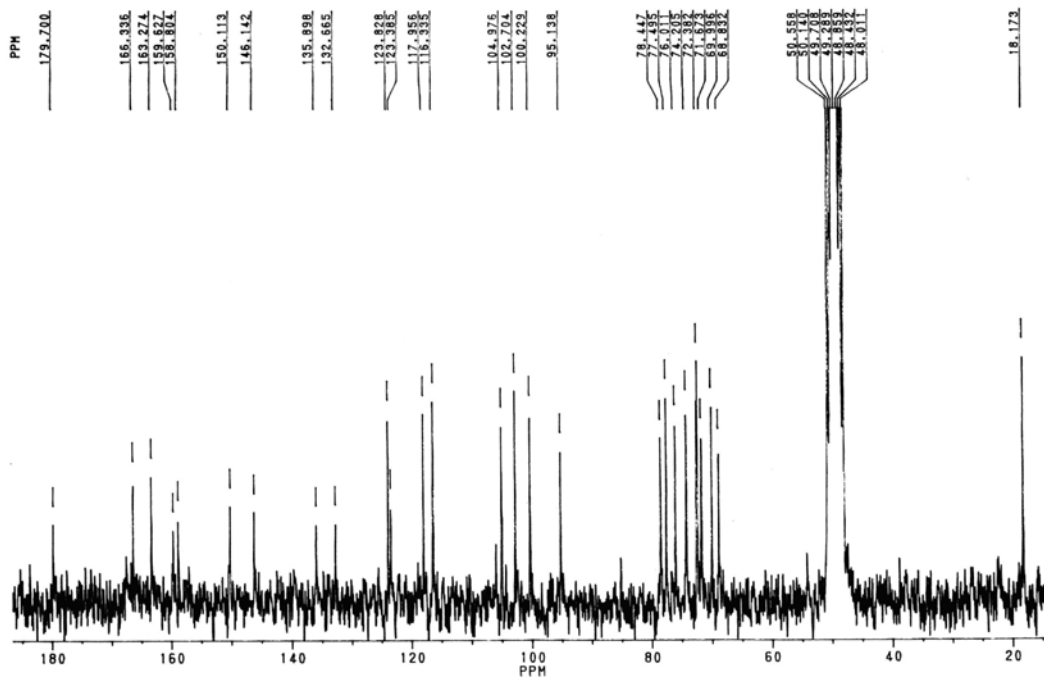
9. ANEXOS



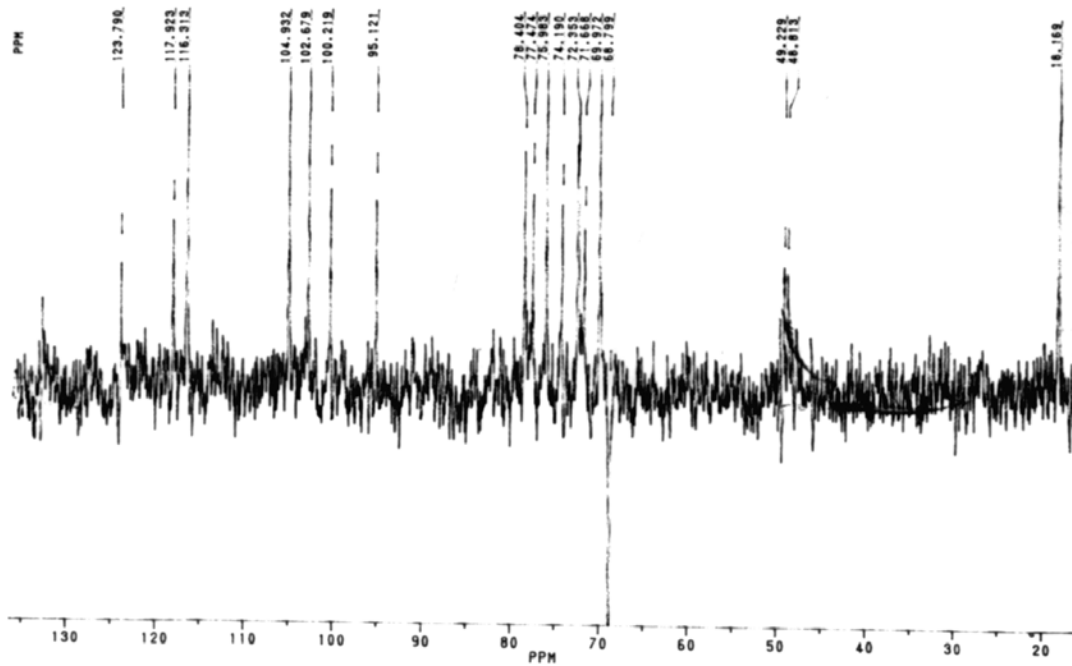
Anexo 1 – Espectro de Infravermelho da fração 71, obtida do fracionamento cromatográfico da *Canavalia rosea* com acetato de etila.



Anexo 2 – Espectro de RMN H^1 da fração 71, obtida do fracionamento cromatográfico da *Canavalia rosea* com acetato de etila.



Anexo 3 – Espectro de RMN C^{13} da fração 71, obtida do fracionamento cromatográfico da *Canavalia rosea* com acetato de etila.



Anexo 4 – Espectro de RMN C^{13} /DEPT da fração 71, obtida do fracionamento cromatográfico da *Canavalia rosea* com acetato de etila.