

Artigo

Investigação Fitoquímica, Atividade Antioxidante, Antifúngica e Antibacteriana da Parte Aérea da Macrófita *Paspalum Repens* P. J. Bergius

Wust, K. M.; Cornelius, M. T. F.; Schirmann, J.; Braun, G.; Sarragiotto, M. H.; Olguin, C. F. A.*

Rev. Virtual Quim., 2016, X (X), no prelo. Data de publicação na Web: 19 de setembro de 2016

<http://rvq.sbg.org.br>

The Phytochemical, Antioxidant, Antifungal and Antibacterial Activities of the Aerial Part of Macrophyte *Paspalum Repens* P. J. Bergius

Abstract: The aerial part of *Paspalum repens* was herein chemically and biologically assessed. The rosmarinic acid and a mix of the flavonoids quercetin-3-O- β -D-glucopyranoside and quercetin-3-O- β -D-(6''-E-caffeoyl) glucopyranoside were isolated through chemical investigation. The structures of the isolated compounds were elucidated based on their NMR (1D and 2D) data. The crude extract, hexane, ethyl acetate and *n*-butanol fractions were evaluated for biological activity. The ethyl acetate fraction showed significant DPPH free-radical scavenging activity with CE_{50} 18.88 ± 0.34 mg.mL⁻¹, and total phenols EAT 110.79 mg.mL⁻¹. The crude extract, hexane, ethyl acetate and *n*-butanol fraction were inactive against the following microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. The present study is the first one about the herein assessed aquatic plant.

Keywords: Antimicrobial; Antioxidant; *Paspalum repens*; Phenolic content.

Resumo

Neste trabalho foram realizados estudos químicos e biológicos da parte aérea da macrófita *Paspalum repens*. A partir da investigação fitoquímica foram isolados o ácido rosmarínico e uma mistura dos flavonoides quercetina 3-O- β -D-glicopiranosídeo e quercetina-3-O- β -D-(6''-E-caffeoil) glicopiranosídeo. As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas com base nos seus espectros de RMN de ¹H e ¹³C (1D e 2D). O extrato bruto e as frações hexano, acetato de etila e *n*-butanol foram avaliados biologicamente. A fração acetato de etila mostrou atividade antioxidante significativa frente ao radical DPPH com CE_{50} $18,88 \pm 0,34$ mg.mL⁻¹ e fenóis totais EAT 110,79 mg.mL⁻¹. O extrato bruto e as frações hexânica, acetato de etila e *n*-butanol foram inativos contra os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. O presente estudo é o primeiro sobre esta planta aquática.

Palavras-chave: Antimicrobiano; Antioxidante; *Paspalum repens*; Constituintes fenólicos.

* Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Colegiado de Química, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Toledo, CEP 85903-000 Toledo-PR, Brasil.

✉ cfolguin@gmail.com

DOI:

Investigação Fitoquímica, Atividade Antioxidante, Antifúngica e Antibacteriana da Parte Aérea da Macrófita *Paspalum Repens* P. J. Bergius

Keli Maiara Wust,^a Marli Terezinha F. Cornelius,^b Jéseka Schirmann,^c
Graziela Braun,^b Maria Helena Sarragiotto,^d Conceição de Fátima A.
Olguin^{e,*}

^a Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Química, CEP 97105-900 Santa Maria-RS, Brasil.

^b Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Colegiado do Curso de Farmácia, Centro de Ciências Médicas e Farmacêuticas, *Campus* de Cascavel, CEP 85819-110, Cascavel-PR, Brasil.

^c Universidade Estadual de Londrina, Departamento de Química, CEP 86051-990 Londrina-PR, Brasil.

^d Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Química, CEP 87020-900 Maringá-PR, Brasil.

^e Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Colegiado de Química, Centro de Engenharias e Ciências Exatas, *Campus* de Toledo, CEP 85903-000, Toledo-PR, Brasil.

* cfolguin@gmail.com

Recebido em 24 de novembro de 2015. Aceito para publicação em 12 de setembro de 2016

1. Introdução

2. Procedimentos gerais

2.1. Material Vegetal, Extração e Isolamento

2.2. Atividade biológica

3. Resultados e Discussão

3.1. Isolamento

3.2. Ensaios biológicos

4. Conclusões

1. Introdução

O Brasil é um país marcado por sua imensa biodiversidade, possui cerca de 55 mil espécies vegetais (22% do total registrado no

planeta).¹ Entre essas espécies encontram-se as plantas aquáticas e semiaquáticas.²

Segundo Pompeo e colaboradores,² as macrófitas aquáticas são definidas como vegetais visíveis a olho nu, que apresentam submersão total ou parcial, ou são flutuantes

na água, podendo ser encontradas em águas doces ou salgadas.

Em regiões tropicais as macrófitas aquáticas são abundantes, graças às condições ambientais favoráveis ao seu crescimento. Em nenhuma outra parte do mundo existem tantas espécies aquícolas como no Brasil. No entanto, a bibliografia existente sobre o assunto não condiz com a grande diversidade de macrófitas.³

A importância dessas plantas é muito maior do que se imagina. As plantas aquáticas, incluindo algas, são fundamentais nos ecossistemas, por fornecerem a base da cadeia alimentar de ambientes aquáticos.⁴ Além disso, são capazes de estabelecer uma forte ligação entre o sistema aquático e o ambiente, apresentam eficiência na remoção de íons metálicos e também atuam como

armazenadoras de nutrientes, influenciando as características físico-químicas dos corpos d'água.²⁻⁴ Muitas destas plantas são de interesse econômico, como apícola, ornamental, têxtil, alimentar, forrageiro, medicinal, despoluidor e conservacionista.⁴

Estudos realizados com estas plantas referem-se à atividade alelopática sobre fitoplâncton e algas,^{5,6} à capacidade de remover metais pesados⁷, além de atividade biológica e fitoquímica.⁸

A planta aquática *Paspalum repens* P.J. Bergius (Figura 1), objeto desta pesquisa, pertence à família Poaceae. O gênero *Paspalum* é um dos maiores desta família, e só no Brasil encontram-se cerca de 220 espécies.⁹ A maioria das espécies é terrestre, mas há um grupo particular de espécies aquáticas.¹⁰



Figura 1. Planta aquática *Paspalum repens* P.J. Bergius

Apesar disto, este gênero é pouco estudado do ponto de vista fitoquímico. Dentre os poucos trabalhos já realizados, sabe-se que a espécie *Paspalum maritimum* Trin, considerada uma erva daninha terrestre, apresenta interferência alelopática em outras plantas, da qual já foram isoladas substâncias como o sitosterol, estigmasterol e 3',5'-dimetóxi-7,5,4'-trihidróxi-flavona.¹¹

A espécie *Paspalum repens* é uma gramínea considerada uma erva daninha que se prolifera em ambientes úmidos ou alagados, como várzeas ou a margens de

corpos hídricos em razão do excesso de nutrientes causado pela eutrofização e sedimentação de partículas minerais e orgânicas, depositadas em função da erosão de áreas agrícolas mal manejadas e escoamentos de esgotos.¹² Popularmente esta macrófita é conhecida como fonte de alimento para animais e por suas propriedades diuréticas.¹³

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana, atividade antioxidante e teor de fenóis totais dos extratos da parte aérea da *Paspalum repens*,

além do isolamento dos metabólitos secundários. Este é o primeiro relato de estudo fitoquímico e biológico dessa espécie.

2. Procedimentos gerais

Os solventes utilizados foram de grau P.A. da Vetec. Os reagentes Folin-Ciocalteu, ácido tânico e o MES (ácido 2-morfolino-etanosulfônico) foram adquiridos da Merck, e o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) da Sigma Aldrich. As medidas de absorção foram realizadas em um espectrofotômetro UV-VIST-80 PG Instruments Ltda.

Para cromatografia em coluna (CC) foram utilizadas gel de sílica (Merck and Aldrich) com granulações adequadas e Sephadex® LH-20. Nas análises por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas cromatofolhas de alumínio contendo gel de sílica 60 F₂₅₄ (Merck) e reveladas através de visualização em lâmpada UV (254 e 366 nm), vapores de iodo e aspersão de soluções de vanilina, reagente de Liebermann-Burchard e solução AlCl₃ 1% em etanol. As placas cromatográficas em camada delgada preparativa (CCDP) foram preparadas através de espalhamento (espessura de 1,0 mm) da mistura de gel de sílica 60 G e 60 GF₂₅₄ (Merck) em água destilada numa proporção de 1:2.

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro VARIAN modelo Mercury PlusBB, operando a 300 MHz para RMN ¹H e 75 MHz para RMN ¹³C, com as amostras solubilizadas em D₂O, CD₃OD, ou mistura de CDCl₃/CD₃OD e usando como referência interna o tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos (δ) foram obtidos em parte por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (*J*) foram medidas em Hertz (Hz).

2.1. Material vegetal, Extração e Isolamento

A macrófita *Paspalum repens* P.J. Bergius foi coletada no Lago de Itaipu na região de Santa Helena- PR, em julho de 2011. Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP 6391).

As plantas foram lavadas em água corrente, e a parte aérea separada da raiz. A parte aérea foi seca em estufa de circulação forçada à temperatura de 45 °C, e moída (moinho marca Marconi – MA 048) até a obtenção de um pó semi-fino. O extrato hidroalcoólico da parte aérea (1,14 kg) foi preparado pelo método de maceração a frio com uma solução de EtOH/H₂O (8:2, v/v) durante seis dias e concentrado à pressão reduzida, obtendo-se 54,12 g do extrato bruto (EBA). O EBA foi submetido à partição utilizando-se solventes de polaridades crescentes, hexano (HEX), acetato de etila (AcOEt) e *n*-butanol (BuOH). Ao final, todas as frações foram concentradas em evaporador rotativo e designadas como FHEX (4,84 g), FAcOEt (1,56 g), FBuOH (5,46 g) e FAquo (fração aquosa) (32,56 g).

Parte da fração AcOEt (1,0 g) foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica (CC) em Sephadex® LH-20, tendo como eluentes MeOH/AcOEt (1:1, v/v), fornecendo 90 frações que foram avaliadas por CCDA e agrupadas em 20 sub-frações, denominadas F1 a F20. Da fração F10 foram obtidos 59 mg da substância **1**.

A fração F7 (0,4654 g) foi submetida a um novo fracionamento em CC Sephadex® LH-20, utilizando-se como fase móvel um gradiente de H₂O/MeOH (1:0, 3:1 e 1:1, v/v) obtendo-se 39 sub-frações (F7-1 a F7-39) que após análise por CCDA resultaram em 11 grupos. A fração 5 (69 mg) foi purificado em Sephadex®, usando MeOH 100% como eluente, o que resultou no isolamento da mistura dos compostos **2** e **3** (23 mg).

Ácido rosmarínico (**1**): RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ ppm (mult.; J em Hz; H): δ 7,70 (d; 2,1; H-2'); 6,85 (d; 8,7; H-5'); 7,56 (m, H-6'); 6,19 (sl; H-6); 6,38 (sl; H-8); 5,24 (d; 7,5; H-1''); 3,45 (m; H-2''); 3,42 (t; 9,0; H-3''); 3,34 (t, 9,3; H-4''); 3,23 (m; H-5''); 3,57 (dd; 12,0; 5,1; H-6''a); 3,71 (dd, 11,7; 2,1; H-6''b). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ ppm: 126,53 (C-1); 113,63 (C-2); 148,00 (C-3); 145,30 (C-4); 115,02 (C-5); 121,49 (C-6); 145,20 (C-7); 114,23 (C-8); 167,73 (C-9); 129,84 (C-1'); 116,05 (C-2'); 144,49 (C-3'); 143,33 (C-4'); 114,74 (C-5'); 120,32 (C-6'); 37,42 (C-7'); 76,43 (C-8'); 176,36 (C-9').

Quercetina 3-*O*- β -D-glicosídeo (**2**) RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ ppm (mult.; J em Hz; H): δ 7,70 (d; 2,1; H-2'); 6,85 (d; 8,7; H-5'); 7,56 (m, H-6'); 6,19 (sl; H-6); 6,38 (sl; H-8); 5,24 (d; 7,5; H-1''); 3,45 (m; H-2''); 3,42 (t; 9,0; H-3''); 3,34 (t, 9,3; H-4''); 3,23 (m; H-5''); 3,57 (dd; 12,0; 5,1; H-6''a); 3,71 (dd, 11,7; 2,1; H-6''b). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ ppm: 158,97 (C-2); 135,59 (C-3); 179,45 (C-4); 163,00 (C-5); 99,93 (C-6); 166,18 (C-7); 94,75 (C-8); 158,45 (C-9); 105,61 (C-10); 123,18 (C-1'); 117,53 (C-2'); 145,89 (C-3'); 149,85 (C-4'); 115,99 (C-5'); 123,04 (C-6'); 104,29 (C-1''); 75,70 (C-2''); 78,37 (C-3''); 71,17 (C-4''); 78,08 (C-5''); 62,50 (C-6'').

Quercetina 3-*O*-(6''-*O*-(*E*)-cafeoil)- β -D-glicosídeo (**3**) RMN ^1H (300 MHz, CD_3OD) δ ppm (mult.; J em Hz; H): δ 7,59 (d; 1,8; H-2'); 6,79 (d; 8,7; H-5'); 7,57 (dd; 8,7; 2,1; H-6'); 6,12 (d; 2,1; H-6); 6,29 (d; 1,8; H-8); 5,23 (d; 7,2; H-1''); 3,45 (m; H-2''); 3,42 (t; 9,0; H-3''); 3,34 (t, 9,3; H-4''); 3,23 (m; H-5''); 4,31 (dd; 10,65; 2,1; H-6''a); 4,19 (m; H-6''b); 6,04 (d; 15,9; H-8'''); 7,33 (d; 15,9; H-7'''); 6,90 (d; 2,0; H-2'''''); 6,56 (d, 8,3; H-5'''''); 6,74 (dd; 8,3; 2,0; H-6'''''). RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) δ ppm: 158,97 (C-2); 135,23 (C-3); 179,40 (C-4); 163,00 (C-5); 99,93 (C-6); 166,07 (C-7); 94,75 (C-8); 158,40 (C-9); 105,50 (C-10); 123,10 (C-1'); 117,35 (C-2'); 145,89 (C-3'); 149,85 (C-4'); 115,99 (C-5'); 123,04 (C-6'); 104,29 (C-1''); 75,70 (C-2''); 78,37 (C-3''); 71,63 (C-4''); 77,90 (C-5''); 64,20 (C-6''); 127,68 (C-1'''); 115,14 (C-2'''); 149,80 (C-3'''); 146,96 (C-4'''); 116,45 (C-5'''); 123,18 (C-6'''); 146,96 (C-7'''); 115,13 (C-8'''); 168,95 (C-9''').

2.2. Testes biológicos

A atividade antimicrobiana dos extratos foi determinada segundo a técnica de difusão em ágar.^{14,15} Foram empregadas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, ATCC 25922 e 33591; *Bacillus subtilis*, ATCC 6633) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, ATCC 8739; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 3686). O teste também foi realizado frente ao fungo *Candida albicans* (ATCC 10231).

Em condições estéreis ao meio, e com auxílio de um swab de algodão, as bactérias foram depositadas na superfície de placas de agar Muller Hinton, de modo a obter um crescimento uniforme e confluyente. Depois disso, adicionou-se 50 μL do extrato diluído em MeOH (20 mg/mL) em um orifício de 7 mm de diâmetro feitos previamente na superfície do meio de cultura. Em seguida, as bactérias foram incubadas a 35 °C por 24 horas, e 48 horas para a *Candida albicans*. Foi utilizado como controle positivo, o antibiótico cloranfenicol para as bactérias e cetoconazol para o fungo e como controle negativo foi usado o solvente MeOH. A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada observando-se a formação de halos de inibição ao redor das cavidades. O teste foi realizado em duplicata com os extratos EBA, FHEX, FAcOEt e FBuOH.

Entre os métodos utilizados para a determinação da atividade antioxidante de produtos naturais, encontra-se o método espectrofotométrico baseado na redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil).¹⁶ Primeiramente foi preparada a solução estoque de DPPH em metanol na concentração 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mantida a temperatura ambiente e protegida da luz. A partir desta foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A curva de calibração foi construída a partir dos valores de absorbância a 515 nm de todas as soluções (1 a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), medidas em cubeta de vidro com percurso ótico de 1 cm e tendo como "branco" o metanol. As medidas foram realizadas em triplicata e com intervalos de 1 minuto entre cada leitura. A equação da curva de calibração do DPPH foi $C = 1,29 + 91,3A$; sendo C a concentração de DPPH no

meio, **A** a absorbância medida em 517 nm e o coeficiente de correlação $R=0,9989$.

Soluções dos extratos em metanol e controles positivos BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metil-fenol) e ácido ascórbico foram preparadas nas concentrações de 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Estas foram diluídas nas concentrações 125, 50, 25, 10 e 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL das soluções das amostras e 2,7 mL de solução estoque de DPPH 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram feitas após 30 minutos de reação a 517 nm. As medidas foram

realizadas em triplicata para os extratos e duplicata para os controles com intervalos de 1 minuto entre cada leitura. A mistura metanol (2,7 mL) e solução estoque do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco.^{16,17}

A partir da equação da curva de calibração do DPPH e dos valores de absorbância após 30 minutos de reação para cada concentração, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes ($\%DPPH_{rem}$), conforme Equação 2:

$$\% DPPH_{rem} = \frac{DPPH_{T=1}}{DPPH_{T=0}} \quad (2)$$

Sendo que $[DPPH]_{T=1}$ corresponde à concentração de DPPH no meio após os 30 minutos de reação, e $[DPPH]_{T=0}$ a concentração de DPPH inicial (40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$).

A concentração eficiente (CE_{50}), quantidade necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, foi

determinada a partir de uma curva exponencial de primeira ordem. Para converter os valores das absorbâncias em todas as concentrações testadas em porcentagem de atividade antioxidante ($\%AA$), utilizou-se Equação 3:

$$\%AA = \frac{Abs_{controle} - Abs_{amostra}}{Abs_{controle}} \times 100 \quad (3)$$

Sendo $Abs_{controle}$ a absorbância inicial da solução de DPPH e $Abs_{amostra}$ a absorbância da mistura. Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando-se o Minitab 14 e Excel® 2010.

A quantificação espectrométrica de fenóis pode ser realizada de várias maneiras, porém o método mais usual é o que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu (F-C). Inicialmente foram preparadas soluções estoque dos extratos na concentração 0,15 mg/mL. Em uma alíquota de 1 mL das soluções, adicionou-se 0,5 mL de Folin-Ciocalteu 10 %, agitou-se e manteve-se a solução em repouso por 5 minutos. Adicionou-se 2 mL de solução

de Na_2CO_3 20% seguido de agitação e repouso por 60 minutos. Fez-se a leitura das absorbâncias das amostras a 760 nm. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com ácido tânico (10 a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e expressos em mg EAT (equivalente de ácido tânico) por mL de extrato. A equação da curva de calibração do ácido tânico foi $A=0,0106C + 0,2636$, sendo **C** a concentração de ácido tânico, e **A** absorbância das amostras a 760 nm, e o coeficiente de correlação $R= 0,9944$.¹⁶⁻¹⁸ O teste foi realizado em duplicata.

3. Resultados e Discussão

3.1. Isolamento

O fracionamento do extrato FAcOEt levou ao isolamento do ácido rosmarínico (**1**) e de uma mistura de flavonoides glicosilados (**2** e **3**) (Figura 2), que tiveram suas estruturas determinadas por RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D) (disponíveis no material suplementar) e por comparação com dados da literatura.

O composto (**1**), obtido da coluna cromatográfica de FAcOEt, apresentou no espectro de RMN ^1H sinais característicos de

anel aromático na região entre δ_{H} 6,0 e 7,0 ppm. O conjunto de sinais em δ_{H} 7,49 (H7) e 6,26 (H8) ppm, ambos com constante de acoplamento $J = 15,9$ Hz, foi atribuído a um sistema olefínico de configuração *trans*. Os mapas de contornos HSQC e HMBC permitiram correlacionar estes sinais aos carbonos em δ_{C} 145,20 (C7) e 114,23 (C8) ppm, respectivamente. Além disso, correlacionou-se o carbono em 37,42 (C7') ppm aos hidrogênios em 2,91 (H7'a) e 3,07 (H7'b) ppm, o carbono em 76,43 (H8') ppm, ao hidrogênio em 5,06 (H8') ppm. Os dados espectrais obtidos para este composto, quando comparados com a literatura estão consistentes com o ácido rosmarínico.^{19,20}

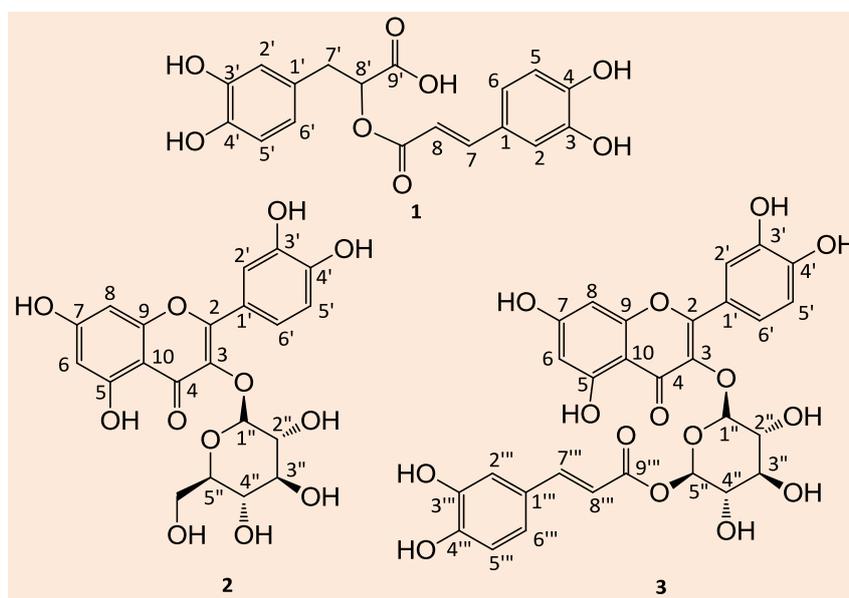


Figura 2. Estrutura dos compostos isolados da *Paspalum repens*: (**1**) ácido rosmarínico; (**2**) quercetina 3-*O*- β -D-glicosídeo; (**3**) quercetina 3-*O*-(6''-*O*-(*E*)-cafeoil)- β -D-glicosídeo

A purificação da fração 7 obtida da partição da fração AcOEt, levou a obtenção de uma mistura de flavonoides glicosilados (**2** e **3**), confirmada pela presença de sinais no espectro de RMN ^1H na região de aromáticos entre δ_{H} 7,70 e 6,12 ppm, além dos sinais na região de δ_{H} 4,30 a 3,80 ppm, correspondentes a hidrogênios carbinólicos e do sinal do hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,25 ppm, indicando a presença de uma unidade glicosídica.

A unidade aglicônica do composto majoritário (**2**) foi reconhecida como quercetina, através da análise de RMN ^1H , no qual foram reconhecidos os sinais correspondentes aos hidrogênios aromáticos ligados ao anel A em δ_{H} 6,19 (H6, dl) e 6,38 (H8, dl) e anel C em 7,70 (H2', d, $J = 2,1$ Hz), 6,85 (H5', d, $J = 8,7$ Hz) e 7,56 (H6', dd, $J = 8,7; 2,1$ Hz). O espectro também apresenta um duplete em δ_{H} 5,24 ppm com constante de acoplamento de 7,5 Hz, característico de acoplamento axial-axial atribuído ao

hidrogênio (H1'') ligado ao carbono anomérico da unidade glicosídica. Os demais sinais da unidade glicosídica foram evidenciados pelo mapa de contornos HSQC, que permitiu correlacionar os carbonos localizados entre δ 62,50 e 78 ppm aos hidrogênios entre δ 3,2 e 3,7 ppm, além do sinal em 104,29 ppm (C1'') que foi correlacionado a 5,24 ppm. A unidade glicosídica foi identificada como a glicopiranosose devido ao acoplamento *trans* diaxial entre H2'' (δ 3,45, dd, $J = 9,0; 8,4$ Hz) e H3'' (δ 3,42, dd, $J = 9,0; 8,4$ Hz), H3'' e H4'' (δ 3,34, t, $J = 9,3$ Hz), consistente com a glicose. Os dados obtidos foram comparados com a literatura, confirmando a estrutura do constituinte majoritário identificado como a quercetina 3-O- β -D-glicopiranosídeo.^{21,22}

O composto minoritário (3) presente na mistura, apresenta o mesmo conjunto de sinais no espectro de RMN de ^1H e ^{13}C observados para o composto majoritário, indicando a mesma unidade quercetina. O dublete em δ 5,23 ppm foi atribuído ao hidrogênio anomérico da outra unidade glicosídica de configuração β devido a constante de acoplamento de 7,2 Hz para o H1'' Um sistema do tipo AB foi observado em campo baixo em δ 7,33 (H7''') e 6,04 (H8''') ppm, este sistema foi assinalado como um sistema olefínico *trans* devido a constante de acoplamento de 15,9 Hz. A estes sinais foram correlacionados os carbonos em δ 146,96 (C7''') e 115,13 (C8''') ppm. Também foram observados sinais referentes a anel aromático 1,3,4-trissubstituído em δ 6,9 ppm (H2'', d, $J = 2,0$ Hz), 6,56 ppm (H5'', d, $J = 8,3$ Hz), 6,74 ppm (H6'', dd, $J = 8,3; 2,0$ Hz). Este substituinte foi atribuído a um grupo cafeoila.^{23,24} O sinal em δ 64,20 ppm foi atribuído ao carbono C6'' que no mapa de contorno HSQC foi correlacionado aos hidrogênios em δ 4,30 e 4,19 ppm. A desproteção do carbono e hidrogênios sugerem que o substituinte cafeoil está ligado ao carbono C6'' da unidade glicosídica, conforme observado na literatura.^{21,25-27} A partir dos dados obtidos, bem como a comparação com a literatura foi possível identificar este composto como a

quercetina 3-O-(6''-O-(E)-cafeoil)- β -glicopiranosídeo.

3.2. Ensaios Biológicos

O teste de poços por difusão em ágar, também chamado de difusão em placas, é um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólida. Este ensaio relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo desafiado com a concentração da substância em teste.^{28,29} É considerado produto ativo o extrato que apresenta um halo de inibição de crescimento independente do seu tamanho. Neste ensaio, verificou-se que os extratos não foram capazes de inibir o crescimento das bactérias e do fungo *Candida albicans*. Embora os resultados obtidos não tenham sido positivos, trabalhos sobre a atividade antimicrobiana de extratos de plantas aquáticas mostram o grande potencial das macrófitas como agentes antimicrobianos.³⁰⁻³³

A avaliação antioxidante do extrato bruto (EBA) e das frações provenientes de partição foi realizada frente ao DPPH, por ser um radical livre estável e potencialmente reativo com substâncias capazes de doar um átomo de hidrogênio.³⁴

A quantidade de extrato bruto necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%, CE_{50} (Tabela 1) foi 80,41 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Quanto às frações, observou-se que a FAcOEt apresenta uma pronunciada atividade antioxidante ($\text{CE}_{50} = 18,88 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) quando comparada aos controles BHT (10,33 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e ácido ascórbico (16,80 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). A fração FBUOH apresentou uma atividade moderada ($\text{CE}_{50} = 61,18$) e os demais extratos apresentaram valores de CE_{50} muito superiores aos controles, sendo considerados com baixa atividade. A maior atividade para o extrato acetato de etila deve-se provavelmente a presença de compostos

fenólicos nesta fração, uma vez que, dentre as diversas classes de antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vivo*.¹⁶

Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante (%AA) dos extratos e dos controles positivos estão apresentados na Figura 3.

Tabela 1. Atividade antioxidante (CE_{50})^a e teor de fenóis totais (FT) dos extratos da parte aérea da *Paspalum repens* e dos padrões BHT e ácido ascórbico

Extratos	$CE_{50} \pm DP$ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	FT $\pm DP$ (mg EAT ^b /mL de extrato)
EBA	80,41 \pm 0,82	34,14 \pm 2,50
FHEX	701,81 \pm 3,40	13,34 \pm 0,94
FAcOEt	18,88 \pm 0,34	110,79 \pm 0,47
FBuOH	61,18 \pm 2,49	55,32 \pm 0,09
FAquo	694,0 \pm 5,71	9,14 \pm 1,46
BHT	10,33 \pm 0,27	-
Ác. Ascórbico	16,80 \pm 0,71	-

^a CE_{50} =concentração eficiente; ^bEAT=equivalente ácido tânico; DP = desvio padrão da média.

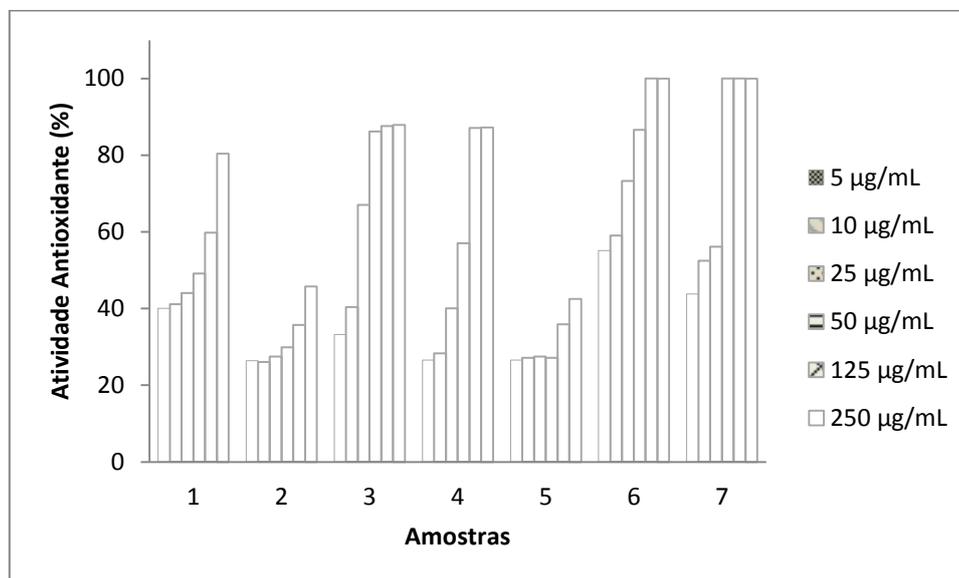


Figura 3. Porcentagem de atividade antioxidante. 1. EBA; 2. FHEX; 3. FAcOEt; 4. FBuOH; 5. FAquo; 6. BHT; 7. Ácido ascórbico

Pode ser observado que o extrato da parte aérea apresenta atividade antioxidante máxima de 80,41 \pm 0,82 %, já o fracionado AcOEt 87,94 \pm 0,26 %, sugerindo que os

metabólitos presentes na fração acetato de etila são os principais responsáveis pela atividade do extrato bruto.

Os resultados obtidos na determinação de fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu estão apresentados na Tabela 1. Pode-se verificar uma relação positiva entre fenóis totais e CE_{50} no EBA, FAcOET e FBUOH, uma vez que estes apresentaram a maior atividade antioxidante e também a maior porcentagem de fenóis totais.

O potencial antioxidante observado para a *P. repens* demonstra a importância do estudo químico desta espécie. Há relatos sobre a capacidade antioxidante de outras espécies de plantas aquáticas como, por exemplo, o trabalho referente a *Lemna minor* cujos extratos aquoso e etanólico mostraram-se tão eficazes quanto os compostos antioxidantes sintéticos.³⁰ Em outro relato, constatou-se o potencial antioxidante da *Ludwigia octovalvis*.³⁵ Estes dados, além de outros existentes na literatura, motivam a continuação de estudos químicos e biológicos relacionados a plantas aquáticas.

4. Conclusões

O trabalho contribuiu com a caracterização fitoquímica e biológica da planta *Paspalum repens*, ressaltando que este é o primeiro trabalho realizado com esta espécie. Na análise fitoquímica foram isolados o ácido rosmarínico e a mistura dos flavonoides glicosilados quercetina 3-O- β -D-glicosídeo e quercetina 3-O-(6''-O-(E)-cafeoil)- β -D-glicosídeo. Em relação à atividade biológica, os extratos fracionados não apresentaram atividade antimicrobiana frente aos micro-organismos testados. Quanto à atividade antioxidante, constatou-se que as frações FAcOEt ($18,88 \pm 0,34\%$) e FBUOH ($61,18 \pm 2,49\%$) foram as mais promissoras, destacando-se FAcOEt, cuja atividade foi muito próxima aos padrões BHT ($10,33 \pm 0,27\%$) e ácido ascórbico ($16,80 \pm 0,71\%$).

Agradecimentos

Os autores agradecem a profa. Dra. Livia Godinho Temponi do Colegiado de Ciências Biológicas da Botânica da Universidade Estadual do Oeste do Paraná pela identificação da planta, ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá pela realização dos espectros de RMN.

Referências Bibliográficas

- ¹ Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova* **2002**, *25*, 45. [CrossRef]
- ² Pompêo M.; Moschini-Carlos, V.; Nishimura, P. Y.; Silva, S. C.; Doval, J. C. L. Ecologia de reservatórios e interfaces. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 2015. [Link]
- ³ Pott, V. J.; Pott, A. Plantas Aquáticas do Pantanal. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2002. [Link]
- ⁴ Cervi, A. C.; Bona, C.; Moço, M. C. C.; von Linsigen, L. Macrófitas aquáticas do Município de General Carneiro, Paraná, Brasil. *Biota Neotropicana* **2009**, *9*, 215. [CrossRef]
- ⁵ Xiao, X.; Lou, L. P.; Li, H.; Chen, Y. X. Algal control ability of allelopathically active submerged macrophytes: a review. *Yingyong Shengtai Xuebao* **2009**, *20*, 705. [PubMed]
- ⁶ Addisie, Y.; Medellin, A. C. Allelopathy in aquatic macrophytes: Effects on growth and physiology of phytoplanktons. *African Journal of Plant Science* **2012**, *6*, 270. [Link]
- ⁷ Kubilay, S.; Gurkan, R.; Savran, A.; Sahan, T. Removal of Cu(II), Zn(II) and Co(II) ions from aqueous solutions by adsorption onto natural bentonite. *Adsorption* **2007**, *13*, 41. [CrossRef]

- ⁸ Jani, M.; Shah, S.; Prajapati, S. Antibacterial screening and qualitative phytochemical estimation of selected aquatic plants. *International Journal Research in Pharmaceutical Science*, **2011**, *2*, 648. [[Link](#)]
- ⁹ Maciel, J. R.; Oliveira, R. C.; Alves, M.; Padrões de distribuição das espécies de *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae) ocorrentes em Pernambuco, Brasil. *Revista Brasileira Botânica*, **2009**, *32*, 597. [[CrossRef](#)]
- ¹⁰ Morrone, O.; Veja, A. S.; Zuloaga, F. O. Revisión de las especies del género *Paspalum* L. (Poaceae: Panicoideae: Paniceae), grupo *Dissecta* (s. str.). *Candollea* **1996**, *51*, 103. [[Link](#)]
- ¹¹ Corrêa, M. J. C. *Paspalum maritimum* Trin.: Estudo químico, isolamento de endofíticos, biotransformações, sínteses e atividade alelopática. *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Pará, Brasil, **2010**. [[Link](#)]
- ¹² Carbonari, C. A.; Martins, D.; Terra, M. A.; Marchi, S. R. Controle químico de *Panicum repens* e *Paspalum repens*. *Planta Daninha* **2004**, *22*, 453. [[CrossRef](#)]
- ¹³ Velasquez, J. *Plantas acuáticas vasculares de Venezuela*. Caracas: Universidad Central de Venezuela, **1994**.
- ¹⁴ Benvindo, R. G.; Braun, G.; Carvalho, A. R.; Bertolini, G. R. F. Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de lasers de baixa potência em bactérias *in vitro*. *Fisioterapia e Pesquisa* **2008**, *15*, 53. [[CrossRef](#)]
- ¹⁵ CLSI. *Padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos por disco-difusão*. Norma aprovada: 8ª edição. NCCLS documento M2-A8. Pennsylvania, **2003**, *23*, n.1 [[Link](#)]
- ¹⁶ Souza, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr, G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova* **2007**, *30*, 351. [[CrossRef](#)]
- ¹⁷ Duarte-Almeida, J. M.; Santos, R. J.; Genovense, M. I.; Lajolo, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando Sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2006**, *26*, 446. [[CrossRef](#)]
- ¹⁸ Monteiro, J. M.; Neto, E. M. F. L.; Amorim, E. L. C.; Strattman, R. R.; Araújo, E. L.; Albuquerque, U. P. Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga. *Revista Árvore* **2005**, *29*, 999. [[CrossRef](#)]
- ¹⁹ Kuhnt, M.; Rimpler, H.; Heinrich, M. Lignans and other compounds from the mixe indian medicinal plant *Hyptis verticillata*. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 485. [[CrossRef](#)]
- ²⁰ Lu, Y.; Foo, L. Y. Rosmarinic acid derivatives from *Salvia officinalis*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 91. [[CrossRef](#)]
- ²¹ Costa, D. A.; Silva, D. A.; Cavalcanti, A. C.; Medeiros, M. A. A.; Lima, J. T.; Cavalcante, J. M. S.; Silva, B. A.; Agra, M. F.; Souza, M. F. V. Chemical constituents from *Bakeridesia pickelii* Monteiro (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O- β -D-(6-E-p-coumaroyl) glucopyranoside on guinea-pig ileum. *Química Nova* **2007**, *30*, 901. [[CrossRef](#)]
- ²² Silva, N. L.; Zobiroleb, N. N.; Silva, D. B.; Sartorid, A. L. B.; Oliveira, R. J.; Pinto, M. E. A.; Santos, F. J. L.; Siqueira, J. M. Constituintes químicos e atividade fitotóxica das folhas de *Annona nutans*. *Química Nova* **2015**, *38*, 640. [[CrossRef](#)].
- ²³ Batista, J. C.; Santana, S. M. O.; Schuquela, I. T. A.; Arrudab, L. L. M.; Bersani-Amadob, C. A.; Oliveira, C. M. A.; Katoc, L.; Ferreira, H. D.; Silva, C. C. Constituintes químicos e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória das raízes de *Sabicea brasiliensis* Wernh (Rubiaceae). *Química Nova* **2014**, *37*, 638. [[CrossRef](#)]
- ²⁴ Albach, D. C.; Grayer, R. J.; Jensen, S. R.; Özgökce, F.; Veitch, N. C.; Acylated flavone glycosides from *Veronica*. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 1295. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

- ²⁵ Matsuura, H.; Amano, M.; Kawabata, J.; Mizutani, J. Isolation and Measurement of Quercetin Glucosides in Flower Buds of Japanese Butterbur (*Petasites japonicus* subsp. *gigantea* Kitam.) *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **2002**, *66*, 1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁶ Vvedenskaya, I. O.; Rosen, R. T.; Guido, J. E.; Russel, D. J.; Mills, K. A.; Vorsa, N. Characterization of flavonols in cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. *Journal of Agricultural Food Chemicals* **2004**, *52*, 188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁷ Zhu, Y.; Liu, Y.; Zhan, Y.; Liu, L.; Xu, Y.; Xu, T.; Li, T. Preparative isolation and purification of five flavonoid glycosides and one benzophenone galloyl glycoside from *Psidium guajava* by high-speed counter-current chromatography (HSCCC). *Molecules* **2013**, *18*, 15648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ²⁸ Ostrosky, E. A.; Mizumoto, M. K.; Lima, M. E. L.; Kaneko, T. M.; Nishikawa, S. O.; Freitas, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 301. [[CrossRef](#)]
- ²⁹ Ponzi, E. A. C.; Oliveira, T. L.; Morais, I. A. F.; Silva Jr, J. J.; Gerbi, M. M.; Souza, I. A.; Psiottano, M. N. C.; Xavier, H. S. Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. *Revista de Cirurgia e Traumatologia buco-maxilo-facial* **2010**, *10*, 89. [[Link](#)]
- ³⁰ Gulcin, I.; Kirecci, E.; Akkemik, E.; Topal, F.; Hisar, O. Antioxidant, antibacterial and anticandidal activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L. Lemnaceae). *Turkish Journal of Biology* **2010**, *34*, 175. [[Link](#)]
- ³¹ Shanab, M. M.; Shalaby, E. A.; Lightfoot, D. A.; El-Shemy, H. A. *PLoS One* **2010**, *5*, 13200. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³² Jani, M.; Shah, S.; Prajapati, S. Antibacterial screening and qualitative phytochemical estimation of selected aquatic plants. *Advanced Biology Research* **2012**, *6*, 19. [[Link](#)]
- ³³ Fareed, M. F.; Haroon, A. M.; Rabeh, S. A. Antimicrobial activity of some macrophytes from Lake Manzalah (Egypt). *Pakistan Journal Biological Sciences* **2008**, *11*, 2454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- ³⁴ Alves, C. Q.; David, J. M.; David, J. P.; Bahia, M. V.; Aguiar, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova* **2010**, *10*, 2202. [[CrossRef](#)]
- ³⁵ Jing, Y.; Xiuwei, Y. Studies on the chemical constituents in herb of *Ludwigia octovalvis*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* **2005**, *30*, 1923. [[Link](#)]