



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS



SÔNIA CARINE COVA COSTA

AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS
FRUTOS DE *Xanthium cavanillesii*

FEIRA DE SANTANA - BA
2010

SÔNIA CARINE COVA COSTA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS
FRUTOS DE *Xanthium cavanillesii***

FEIRA DE SANTANA - BA
2010

SÔNIA CARINE COVA COSTA

**AVALIAÇÃO BIOLÓGICA E CONSTITUINTES QUÍMICOS DOS
FRUTOS DE *Xanthium cavanillesii***

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Recursos Genéticos Vegetais da
Universidade Estadual de Feira de
Santana, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em
Recursos Genéticos Vegetais

Orientador: Prof. Dr. Alex G. Taranto
Co-orientador: Prof. Dr. Alexsandro
Branco

FEIRA DE SANTANA - BA
2010

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

Profª Drª Sandra Aparecida de Assis

Professor Dr Alex. G. Taranto
Orientador e Presidente da Banca

FEIRA DE SANTANA - BAHIA
2010

À minha mãe Angela e a Karol, minha irmã, pelo nosso amor incondicional. Meu esposo Gustavo, pelo amor, compreensão e companheirismo. E a minha sobrinha, Duda, sol dos meus dias, lua das minhas noites.

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Professor Alex Taranto pela amizade e confiança depositadas desde os tempos da graduação. Obrigada pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Professor Alexandro Branco por ter me concedido o privilégio de ter dois orientadores. E a oportunidade de conhecê-lo melhor e a aprender, não somente os caminhos da Fitoquímica, mas também aprender a admirá-lo como profissional e pessoa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, em especial ao Professor Raniere pelo apoio sempre que necessitei.

À Professora Miriam Morreira Mussi (UCPel) por me receber tão gentilmente e auxiliar na coleta e identificação da planta, meu muito obrigada.

Aos professores e amigos do curso de Ciências Farmacêutica da UEFS: Carla Branco, Antônio Azeredo e Niljay Patel pelo constante apoio e incentivo

À eterna “Professora” Inalva, sempre amiga em todos os momentos da vida da minha família.

Às amigas que fiz nesta caminhada, Vania e Dayse, por dividirmos as alegrias e angustias.

Aos colegas do Laboratório de Fitoquímica da UEFS.

Ao LETI, Professora Milena Botelho e ao farmacêutico Matheus Sá, por me deixar acompanhar a realização dos ensaios de atividade antimalárica.

Ao Professor Rodrigo Bagueira e Ludmila Costa pela análises de RMN realizadas no Laboratório de RMN, no Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Ao Laboratório de Infravermelho, do Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF) pela realização das análises de infravermelho.

Ao Professor Ângelo Pinto (UFRJ) pelo apoio na realização das análises de RMN.

Ao LAPEM, Carla e Catiane, pela liofilização dos extratos e fornecimento de água miliQ.

Aos Professores Hugo Brandão (UEFS) e Jorge Maurício David (UFBA) pelo fornecimento dos padrões e água miliQ.

À FABESB (Projeto Semi-árido) e CAPES (Procad 2007).

À UEFS por ter me permitido trilhar os caminhos do conhecimento desde a graduação.

Enfim, a *DEUS*, sempre presente, mesmo na vezes que pensei estar só.

E a todos aquelas que contribuíram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho. À todos, meus sinceros agradecimentos.

"Se não puder se destacar pelo talento, vença pelo esforço."
(Dave Weinbaum)

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

δ	Deslocamento químico
(CH ₃ Cl)	Cloreto de metileno
AcOEt	Acetato de etila
ACQ	Ácido clorogênico
APT	Attached Proton Test
CAT	Carboxiatractilosídeo
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cpm	Contagem por minuto
<i>d</i>	dubleto
DAD	Detector de arranjo de diodo
dd	duplo dubleto
DMSO	Dimetilsufóxido
EtOH	Etanol
Frs	Frações
H ₂ O	Água
Hex	Hexano
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
KBr	Brometo de potássio
MeOH	Metanol
MHz	megaHertz
Mod.	Modelo
nm	Nanômetros
PfATP6	ATPase cálcio-dependente
ppm	parte por milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
Tr	Tempo de retenção
<i>s</i>	sinpleto
TG	Tapsigargina
UV	Ultravioleta
$\Delta\delta$	Varição de deslocamento químico
λ_{\max}	Comprimento de onda (nm) de absorção máxima

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Xanthium spp.</i>	5
Figura 2.	<i>Xanthium cavanillesii</i> coletado no município de São Lourenço do Sul/RS.	12
Figura 3.	Áreas de incidência da malária no mundo	24
Figura 4.	Número de casos de malária na Amazônia Legal entre 1999 e 2007	25
Figura 5.	Visão microscópica do <i>Plasmodium falciparum</i>	26
Figura 6.	Mosquito do gênero <i>Anopheles sp.</i>	26
Figura 7.	Artemisinina e seus derivados	29
Figura 8.	Fármacos antimaláricos clássicos	30
Figura 9.	Estrutura tridimensional do modelo de PfATP6 (PDB ID: 1IWO). As regiões vermelhas são as folhas β e as amarelas são as α -hélices.	32
Figura 10.	CL ₅₀ dos extratos de <i>X. cavanillesii</i> que se apresentaram mais ativos frente <i>A. salina</i> .	49
Figura 11.	Nº de cepas de <i>P. falciparum</i> que permaneceram viáveis após tratamento com extrato etanólico, aquoso dos frutos de <i>X. cavanillesii</i> em comparação com controle, que não foi submetido a tratamento.	50
Figura 12.	Porcentagem de cepas de <i>P. falciparum</i> que permaneceram viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico, quando comparado com cepas que não receberam com extratos do <i>X. cavanillesii</i>	50
Figura 13.	Estruturas dos padrões de ácidos hidroxicinâmicos analisados por CLAE-DAD. Ácido caféico (ACQ) (A); Ácido ferúlico (B); Ácido clorogênico (C).	55
Figura 14.	Cromatograma obtido por CLAE-DAD (direita) e espectro de UV (esquerda) do ácido caféico usado como padrão	55
Figura 15.	Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e espectro de UV (abaixo) do ácido ferúlico usado como padrão	56
Figura 16.	Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e espectro de UV (abaixo) do ácido clorogênico usado como padrão	56

- Figura 17.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e 57 espectros de UV (abaixo) da subfração X1
- Figura 18.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e 58 espectros de UV (abaixo) da subfração X3
- Figura 19.** Espectro de UV obtido por CLAE-DAD do pico 4 da 58 subfração X3
- Figura 20.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e 59 espectros de UV (abaixo) da subfração X4
- Figura 21.** Cromatograma da subfração X2; Ácido caféico (14) (Tr = 60 26,3 min.) e ácido ferúlico (15) (Tr = 37,1 min.)
- Figura 22.** Espectros de UV da subfração X2; ácido caféico (14) 60 (λ_{\max} = 235; 324 nm) e ácido ferúlico (15) (λ_{\max} = 234; 323 nm)
- Figura 23.** Cromatograma da subfração X5; ácido caféico (N) (Rt = 61 26,7 min.) e ácido ferúlico (O) (Rt = 37,5 min.)
- Figura 24.** Espectros de UV da subfração X5; ácido caféico (N) 61 (λ_{\max} = 235; 324 nm) e ácido ferúlico (O) (λ_{\max} = 234; 323 nm)
- Figura 25.** Cromatograma da subfração X6; ácido caféico (16) 61 (Rt=25,3 min.) e ácido fenólico (17) (Rt=32,2 min.)
- Figura 26.** Espectros de UV da subfração X6; ácido caféico (16) 61 (λ_{\max} = 234; 323 nm) e ácido fenólico (17) (λ_{\max} = 330 nm.)
- Figura 27.** Cromatograma da subfração X7; ácido fenólico (18) (Tr 62 = 14,0 min.) e ácido caféico (16) (Tr = 25,3 min.)
- Figura 28.** Espectros de UV da subfração X7; ácido fenólico (18) 62 (λ_{\max} = 324 nm) e ácido caféico (16) (λ_{\max} = 234; 323 nm)
- Figura 29.** Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e 63 espectros de UV (abaixo) da subfração X8
- Figura 30.** Deslocamentos químicos dos hidrogênios do ácido 65 caféico (A) e ferúlico (B) descritos na literatura
- Figura 31.** Ampliação do espectro RMN de ^1H correspondente à 68 região de duplas e de aromático característicos de ácidos fenólicos da subfração X2 (DMSO- d_6 , 500 MHz).
- Figura 32.** Ampliação do espectro RMN de ^1H correspondente à 69 região de duplas e de aromático característicos de ácidos fenólicos da subfração X5 (DMSO- d_6 , 500 MHz).
- Figura 33.** Ácido 2β -O- β -D-glucopiranosil 15α -hidroxi-caur-16-eno- 71 18,19-dicarboxílico

Figura 34.	Espectro ESI-MS fração XC10	72
Figura 35.	Ampliação do espectro RMN de indicando sinais ^{13}C correspondentes a região entre 50 a 90 ppm	74
Figura 36.	Ampliação do espectro RMN de indicando sinais ^{13}C correspondentes a região entre 40 a 50 ppm	74
Figura 37.	Ampliação do espectro RMN de indicando sinais ^{13}C correspondentes a região entre 10 a 30 ppm	75
Figura 38.	Estruturas dos modelos da literatura utilizados como referências na caracterizações dos sinais de RMN ^{13}C presentes no espectro da fração XC10	73
Figura 39.	Sinais de RMN ^{13}C do ditepeno caurano glicosilado presente na fração XC10.	75
Figura 40.	Estrutura do modelo da literatura utilizado como referência na caracterização dos sinais de RMN ^{13}C da cadeia alifática presente no espectro da fração XC10	77
Figura 41.	A) Estrutura da PfAPT6 construída onde encontram-se as cores vermelho e azul denotam as alfas hélices e folhas beta; B) Gráfico de Ramachandran da enzima com 87% dos resíduos em regiões permitidas.	78
Figura 42.	Conformação de ligação e sítio ativo da PfATP6. A) curcumina; B) metilcurcumina	80
Figura 43.	A: curcumina e A1: metilcurcumina. As regiões em destaque se mostram muito similares às estruturas dos os ácidos fenólicos.	80
Figura 44.	Estruturas dos ácidos hidroxicinâmicos	79
Figura 45.	A) Conformação de ligação do ácido clorogênico. Vermelho: curcumina; amarelo: metilcurcumina; verde: ácido clorogênico. B) Sítio de ligação do ácido clorogênio com PfATP6.	81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.	Distribuição geográfica das espécies de <i>Xanthium</i>	5
Quadro 2.	Atividades farmacológicas de espécies de <i>Xanthium</i>	7
Quadro 3.	Principais compostos químicos isolados de espécies de <i>Xanthium</i>	11
Quadro 4.	Principais compostos químicos isolados de <i>Xanthium cavanillesii</i>	22
Quadro 5.	Ensaio de citotoxicidade para <i>A. salina</i> dos extratos de <i>X. cavanillesii</i>	48
Quadro 6.	CL ₅₀ dos extratos de <i>X. cavanillesii</i> que apresentaram atividade frente <i>A. salina</i>	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Determinação das concentrações dos extratos	39
Tabela 2.	Frações 10 a 15 purificadas em Sephapex LH-20	43
Tabela 3.	Comparação dos Tr e λ_{\max} dos padrões dos ácidos fenólicos e subfrações X2, X5, X6 e X7	64
Tabela 4.	Deslocamentos químico dos hidrogênios de padrões ácidos caféico e ferúlico descrito em literatura ^a	66
Tabela 5.	Dados de RMN ^1H (500 MHz) da subfração X2 correspondentes à ácidos fenólicos.	67
Tabela 6.	Dados de RMN ^1H (500 MHz) da subfração X5 correspondentes à ácidos fenólicos.	69
Tabela 7.	Deslocamentos químico dos hidrogênios do ácido caféico ^a e subfrações X6 e X7	70
Tabela 8.	Comparação de dados espectrais de ^{13}C (DMSO- d_6 , 500 MHz) do caurano diterpeno glicosilado contido na fração XC10 com dados da literatura.	73
Tabela 9.	Deslocamento dos ^{13}C da cadeia alifática do modelo 1 e sinais de carbono alifático da mistura XC10	76
Tabela 10.	Energia de Ligação (Kcal/mol) da curcumina, metilcurcumina e ácidos fenólicos	79

ANEXOS

Anexo I	Espectro de RMN ^1H da subfração X2	97
Anexo II	Espectro de RMN ^1H da subfração X5	98
Anexo III	Espectro de IV da subfração X2	99
Anexo IV	Espectro de IV da subfração X5	100
Anexo V	Espectro de RMN ^1H da subfração X6	101
Anexo VI	Espectro de RMN ^1H da subfração X7	102
Anexo VII	Ampliação do espectro de RMN DE ^1H da subfração X6 correspondente a região de duplas e aromáticos característicos de ácidos fenólicos	103
Anexo VIII	Ampliação do espectro de RMN DE ^1H da subfração X7 correspondente a região de duplas e aromáticos característicos de ácidos fenólicos	104
Anexo IX	Espectro de IV da subfração X6	105
Anexo X	Espectro de IV da subfração X7	106
Anexo XI	Ampliação do espectro de RMN APT dos sinais ^{13}C correspondente ao diterpeno caurano presente na fração XC10	107
Anexo XII	Ampliação dos espectros de RMN DE ^{13}C e APT da fração XC10 correspondente a unidade glicosídica	109
Anexo XIII	Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C e APT correspondente à região de aromático.	111
Anexo XIV	Espectro de IV da fração XC10	112

RESUMO

O gênero *Xanthium* (família Asteraceae) é encontrado principalmente nas regiões Sul e Sudeste, do Brasil, sendo descritas duas espécies, *X. strumarium* e *X. cavanillesii*, este último conhecido popularmente como carrapicho de carneiro, carrapichão e carrapicho grande. Esta espécie bioproduz lactonas sesquiterpênicas, diterpenos da classe dos cauranos, óleos essenciais, ácidos fenólicos. No *X. cavanillesii* estudos anteriores avaliaram suas propriedades antimicrobiana, antifúngica, diurética, anti-ulcerativa e antiinflamatória-tópica. Em outras espécies também já foi estudada sua propriedade antimalárica. Com o objetivo de conhecer potencial biológico antimalárico e os metabólitos secundários correspondentes foi realizado um estudo fitoquímico do *X. cavanillesii*. Assim extratos das partes aéreas de *X. cavanillesii* foram obtidos por maceração e testados frente a *A. salina*, quanto à toxicidade empregando teste de mortalidade. Os extratos etanólico e aquoso foram testados *in vitro* contra cepas W_2 do *P. falciparum*. O extrato etanólico apresentou atividade superior ao quanto comparado ao extrato aquoso, sendo em seguida fracionado utilizando-se métodos cromatográficos usuais (CC em sílica e permeação em gel de Sephadex LH-20). Análises das frações por CLAE, RMN ^1H e ^{13}C , EM, IV, permitiram a caracterização dos ácidos ferúlico, caféico e um diterpeno caurano, este composto foi semi-purificado. Estudos de ancoragem molecular foram utilizados para explicar o mecanismo de ação contra o modelo do receptor PfATPase6. Como resultado do ensaio *in silico*, o ácido caféico foi o mais ativo da série de ácidos fenólicos estudados, e o ácido ferúlico menos ativo contra PfATPase6.

Palavras chaves: *Xanthium cavanillesii*, ácido fenólico, malária, antimalárico, ancoragem molecular, PfATPase6.

ABSTRACT

The genus *Xanthium* (Asteraceae), in Brazil, is found mainly in South and Southeast, authors described two species, *X. strumarium* and *X. cavanillesii*, this last one is popularly known as “carrapicho de carneiro”, “carrapichão” and “carrapicho grande”. This genus can produce sesquiterpene lactones, sulfonated compounds, diterpenes kauranes, essential oils, phenolic acids. In the *X. cavanillesii* previous studies had evaluated its antimicrobial, antifungic, diuretic, antiulcerative, topic antinflamatory properties. In other species also already its antimalarial property was studied. In order to study the secondary metabolites and the biological potential were a phytochemical studie of *X. cavanillesii*. Thus crude extracts of the aerial parts of *X. cavanillesii* had been gotten by maceration and bioassay front to *Artemia salina* (Brine Shrimp), by the cytotoxicity using mortality testing. As a result, the ethanolic and aqueous extracts showed biological activity and was testing antimalarial activity in vitro using the *P. falciparum* W2 clone. Following, the active extracts were fractionated using standard chromatographic methods (CC on silica gel and permeation by Sephadex LH-20). Analyses by HPLC-DAD, ¹H and ¹³C NMR, MS, IR were used to characterize ferulic acid, caffeic acid, and a semi-purified diterpene kaurane. In addition, molecular docking studies were used to explain the mechanism of action against of PfATPase6 model. The results of *in silico* showed that caffeic acid is the most active of the phenolic acids extracted, while the ferulic acid is the less active compound against PfATPase6.

Keywords: *Xanthium cavanillesii*, phenolic acids, malaria, antimalarial, molecular docking, PfATPase6.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E SIGLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE QUADOS	XIII
LISTA DE TABELAS	XIV
ANEXOS	XV
RESUMO.....	XVI
ABSTRACT	XVII
1. Introdução.....	1
2. Referencial Teórico	4
2.1. Família Asteraceae	4
2.2. Gênero <i>Xanthium</i>	4
2.2.1 Distribuição geográfica	4
2.2.2. Medicina Tradicional.....	7
2.2.3. Atividade farmacológica e toxicidade.....	10
2.2.4. Constituintes químicos isolados de espécies de <i>Xanthium</i>	10
2.3. <i>Xanthium cavanillesii</i>	19
3. Malária	25
3.1. A Doença	27
3.1.2. Terapêutica da malária	28
3.2. Novo alvo Molecular: PFATP6	32
4. Métodos Computacionais.....	34
4.1. Modelagem molecular.....	34
5. Objetivos	35
6. Materiais e Métodos	38
6.1 Obtenção do material vegetal	38
6.2 Obtenção dos extratos	38
6.3 Atividade biológica	39
6.3.1 Ensaio de toxicidade frente <i>Artemia salina</i> L.....	39
6.3.2 Teste antimalárico <i>in vitro</i>	40
6.4 Fracionamento do extrato etanólico dos frutos de <i>X. cavanillesii</i>	42

6.4.1 Purificações dos constituintes do extrato etanólico dos frutos de <i>X. cavanillesii</i>	42
6.5 Análise por CLAE-DAD das frações purificadas do extrato bioativo	44
6.6 Análise espectroscópicas	44
6.6.1 Espectrometria de infravermelho	44
6.6.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN).....	45
6.7 Modelagem molecular.....	45
7. Resultados e discussão.....	47
7.1 Avaliação da atividade biológica dos extratos.....	47
7.1.1 Avaliação da toxicidade frente microcrustáceo <i>Artemia salina</i> L.	47
7.2.2 Avaliação da atividade antimalárica.....	50
7.2 Fracionamento do extrato bioativo	52
7.3 Purificação das frações do extrato bioativo.....	52
7.4 Análise dos constituintes químicos do extrato bioativo	52
7.4.1 Caracterização compostos fenólicos por CLAE-DAD	52
7.4.2 Caracterização dos ácidos fenólicos por RMN ¹ H, IV.....	65
6.4.3 Caracterização parcial do diterpeno caurano glicosilado por ESI-MS, RMN ¹³ C e IV	71
7.5 Modelagem molecular.....	77
Considerações finais	82
Referências	84
Anexos	97

1. Introdução

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se eficientemente que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006)

O conhecimento do potencial fornecimento de um arsenal químico da natureza, pelos povos primitivos e pelos indígenas, pode ser considerado fator fundamental para descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos trouxeram valiosas contribuições para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais, do conhecimento da relação entre a estrutura química de um determinado composto e suas propriedades biológicas. Neste sentido, a natureza forneceu metabólitos secundários que serviram e sevem como modelos moleculares que fundamentaram estudos de relação estrutura-atividade e inspiraram o desenvolvimento da síntese orgânica clássica (VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

A introdução das novas tecnologias tornou a química medicinal mais ampla em sua concepção, ampliando seu caráter interdisciplinar. Em uma visão moderna, a química medicinal dedica-se à compreensão das razões moleculares da ação dos fármacos, da relação entre estrutura química e atividade farmacológica dos mesmos, considerando fatores farmacodinâmicos e farmacocinéticos que se traduzam em propriedades farmacoterapeuticamente úteis e, portanto, represente um novo composto-protótipo, candidato efetivo a novo fármaco (BARREIRO; FRAGA, 2001). Desta forma, podem se planejar, virtualmente, candidatos a novos ligantes de determinados sítios receptores, em três dimensões (3D), através da construção de mapas farmacofóricos. Ocorrendo também o desenvolvimento de métodos

de *screening* biológicos automatizados (YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001; BARREIRO; FRAGA, 2001, VIEGAS Jr.; BOLZANI; BARREIRO, 2006),

Apesar dos avanços tecnológicos observados, os produtos naturais têm sido cada vez mais utilizados como fontes para novos medicamentos. Atualmente, os produtos encontrados na natureza continuam a representar um papel essencial no processo de descoberta e desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (MARINHO et al., 2008).

Vários compostos isolados da natureza vem fortalecendo a pesquisa por otimização de estruturas com atividades terapêuticas, incluindo-se nestes estudos um número grande de produtos naturais com atividade antimalárica. As pesquisas para a descoberta de novos compostos para o tratamento da malária incluem extratos brutos, produtos bioativos marinho naturais, compostos isolados e identificados de plantas, bactérias e fungos (SAXENA et al., 2003)

O Brasil computa 50,6% de todos os casos de malária das Américas, com 60% das infecções causadas por *Plasmodium falciparum*, correspondendo a 564.406 casos confirmados. Os estados com alto índice de infecções são Amazonas, Roraima (ambos com 94 casos por 100/habitantes), Mato Grosso (213 casos por 100/habitantes), Rondônia (183 casos por 100/habitantes), Pará (116 casos por 100habitantes). Também são áreas de risco os estados do Amapá, Acre e Maranhão (SNOW, 2005).

A resistência quimioterápica é um dos maiores problemas no controle da atual epidemia malárica. O princípio da evolução das espécies, onde a presença de fármacos serve como processo de seleção natural dos parasitas resistentes, faz com que a capacidade de adaptação dos parasitas da malária seja evidenciada na rapidez com que se desenvolve. O *P. falciparum* apresenta resistência a praticamente todos os antimaláricos sintéticos desenvolvidos a partir de 1940. (DIAS, FREITAS, 1997; CECHINEL FILHO, YUNES, 1998; FRANÇA, SANTOS, FIGUEROA-VILLAR, 2008). A precocidade do diagnóstico e tratamento são medidas primordiais para interromper a cadeia de tratamento da doença e evitar a evolução para as formas graves de malária

Um novo agente antimalárico foi isolado a partir de uma triagem realizada em drogas tradicionais chinesas, obtendo-se da *Artemisia annua* L.

um composto denominado artemisinina, uma lactona sesquiterpênica que possui como característica estrutural principal um grupamento endoperóxido (MESHNICK, TAYLOR, KAMCHONWONGPAISAN, 1996; KLAYMAN, 1985).

Atualmente a artemisinina é considerada o mais potente antimalárico contra o *P. falciparum* e *P. vivax*. No entanto, focos de resistência a este fármaco e seus derivados começam a ser mencionados entre 2002-2003 onde relatos de resistência do *P. falciparum*, ao arteméter, foram descritos na Guiana Francesa. Em regiões da Ásia, estudos recentes, *in vitro* e *in vivo* com o *P. falciparum* mostraram a redução da sensibilidade dos pacientes à fármacos derivados da artemisinina, como o artesunato, como também à terapias associadas de artesunato-mefloquina (DONDORP et al., 2009). Esta crescente resistência torna a malária o maior problema de saúde pública global causada por parasitas. Isso motiva a busca de novos fármacos com estruturas únicas e novos mecanismos de ação.

A busca de novos fármacos antimaláricos é necessária para que se tenha uma alternativa terapêutica a crescente resistência adquirida pelo parasito, o que levou a malária a ser um problema de saúde pública global. A resistência do *Plasmodium* aos fármacos antimaláricos continua sendo um grande entrave para o controle da epidemia de malária, devido ao processo de evolução natural dos parasitos que sofrem mutações tornando-se mais resistente aos fármacos existentes no mercado (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças parasitárias é bem conhecido e documentado ao longo dos tempos, tempo como exemplo clássico a artemisinina, composto isolado da *Artemisia annua* L (Asteraceae), para o tratamento da malária conhecido na medicina oriental chinesa há muito tempo e isolado pela 1ª vez desde a década de 70. (FRANÇA, SANTOS, FIGUEROA-VILLAR, 2008). Hoje é o mais potente antimalárico contra o *P. falciparum* e *P. vivax*, inclusive contra as cepas resistentes a fármacos tradicionais como a cloroquina, quinina e mefloquina.

2. Referencial Teórico

2.1 Família Asteraceae

A família Asteraceae, também conhecida como Compositae devido a estrutura composta de suas flores. É uma família muito numerosa, compreendendo mais de 1.100 gêneros e ,aproximadamente, entre 20.000 a 25.000 espécies. A família Asteraceae é subdividida em duas subfamílias: Cichorioideae (*Liguliflorae*) e Asteroideae (*Tubiflorae*), as quais se dividem em várias subtribos, o gênero *Xanthium* está incluso na subfamília Asteroideae, tribo Heliantheae (KISSMANN, GROTH, 1992)

Poucas espécies da família são aproveitadas economicamente, mas um grande número é usada como plantas ornamentais. Entretanto, como plantas invasoras, tem grande importância pela sua agressividade (KISSMANN, GROTH, 1992)

2.2. Gênero *Xanthium*

2.2.1. Distribuição geográfica

As plantas do gênero *Xanthium* (família Asteraceae) (Figura 1) sempre tiveram sua origem bastante discutida, entre serem originárias do continente americano, europeu ou região do mediterrâneo. Sabe-se que as variantes da espécie *X. strumarium* apesar de terem origens diversas, algumas, sem dúvida, são nativas do continente americano (KIRTIKAR, BASU, 1933; KISSMANN, GROTH, 1992). Atualmente, o *Xanthium* está disseminado e naturalizado em regiões quentes do mundo e também em muitas regiões temperadas (ROING, 1988; KISSMANN, GROTH, 1992).



Planta em frutificação



Frutos

Figura 1. *Xanthium* spp.

A quadro 1 apresenta a ampla distribuição geográfica das espécies de *Xanthium*, na qual podemos observar que o gênero está bastante distribuído tanto no oriente quanto no ocidente do globo terrestre. Constituem-se em plantas que se propagam facilmente, uma vez que seus frutos são disseminados pelos animais nas pastagens e seu poder germinativo conservado por vários anos, florescendo no verão (BURKAT, 1974).

Quadro 1. Distribuição geográfica das espécies de *Xanthium*

Espécie	Localização	Referência
<i>X. canadense</i> Mill.	Japão	Tanaka et al, 1976
<i>X. cavanillesii</i>	Argentina	Taher, Ubierno, Talenti, 1985; De Riscala et al, 1994; Favier et al., 2005; Davicino, 2007
	Brasil	Manfron, 1997; Driemeier et al., 1999; Loretto et al., 1999, Mussi, 2000
<i>X. catharticum</i>	Equador	Cumanda, Marinoni; 1991

<i>X. indicum</i>	Índia	Bohlmann et al., 1982
<i>X. italicum</i>	Romania	Chirigiu et al., 2003
<i>X. macrocarpum</i>	França	Lavault et al., 2005; Pinel et al., 2007
<i>X. pungens</i>	Egito	Ahmed et al., 1989; Ammar et al., 1992
<i>X. sibiricum</i>	Japão	Sato et al.; 1997 Han et al.; 2009
<i>X. spinosum</i>	Romania	Chirigiu et al., 2003
	Egito	Metwally, Khafagy, El-Naggar, 1974; Abdei-Mogib et al., 1991
	Peru	Piacente et al., 1995
	Brasil	Lorenzi, 1991; Kissmann, Groth, 1992
<i>X. spinosum</i> L.	Argentina	Salinas, Ruiz, Ruiz, 1998
	Valencia	Ginesta-Peris, Garcia-Breijo, Primo-Yúfera, 1994
<i>X.spp</i>	Estados Unidos	Cole et al.,1980, Witte et al. 1990
<i>X. strumarium</i>	Índia e Japão	Malik, Sangwan, Dhindsa, 1992; Talakal, Dwivedi; Sharma; 1995; McMillan et al., 1975(a); McMillan, 1975(b)
	Austrária	McMillan, 1975 (a)
	China	Ma et al., 1997; Han et al., 2007
<i>X. strumarium</i> L.	Grécia	Roussakis et al.; 1994
	Cuba	Nieves et al., 1999

O gênero *Xanthium* produz muitas variantes, isto porque, as opiniões dos botânicos divergem sobre quantas espécies existem. Alguns citam a

Xanthium spinosum e mais cerca de 20 espécies, como *X. cavanillesii*, *X. orientale*, *X. pensylvanicum*, *X. strumarium*, *X. italicum*, *X. echinatum*, *X. chinense*, *X. hybridus*, *X. americanum*, *X. canadense*, entre outras. As espécies *X. spinosum* e *X. strumarium* haviam sido identificadas, exceto a *X. spinosum*, que tem identidade própria, todas as outras foram consideradas como *Xanthium strumarium*, considerando-se 7 complexos: *strumarium*, *cavanillesii*, *oviforme*, *echinatum*, *chinense*, *hybridus* e *orientale*, deste complexo o *strumarium* e *cavanillesii* seriam subespécies (KISSMANN, GROTH 1992).

No Brasil, o *Xanthium* pode ser encontrado principalmente nas regiões Sul e Sudeste, como uma planta daninha muito comum em terrenos baldios e pastos (LORENZI, 1991; KISSMANN, GROTH, 1992). Devido aos seus frutos serem recobertos de espinhos, os quais se prendem aos pêlos dos animais, originou-se o nome vulgar de “carrapicho de carneiro”, tornado o *Xanthium* uma infestação bastante temida nos pastos.

2.2.2 Medicina tradicional

As espécies de *Xanthium* são amplamente usadas na medicina tradicional (Quadro 2).

Quadro 2. Atividades farmacológicas de espécies de *Xanthium*

Espécie	Atividade	Referência
<i>X. canadense</i>	Repelente	Tahara et al., 1980
<i>X. catharticum</i>	Antibacteriana, citotóxica e antitumoral	Cumanda; Marinoni, 1991
<i>X. cavanillesii</i>	Antibacteriana, diurética, anti-ulcerativa	Manfron 1997; Mussi, 2001; Favier et al., 2005; Cerdeiras et al, 2007 (a; b)
<i>X. italicum.</i>	Citotóxicas e antitumoral	Tsankova et al. 1994; Kovács et al., 2009
<i>X. macrocarpum</i>	Antifúngica, anti	Lavault et al., 2005; Pinel,

	leischmania	et al., 2007
<i>X. pungens</i>	Repelente	Mahumoud et al., 1999
<i>X. riparium</i>	Antiinflamatória	Salo et al., 1973; Ammar, Fournier, Shabana, 1992
<i>X. sibiricum</i>	Antibacteriana	Sato et al., 1997
<i>X. spinosum</i> L.	Ademona da próstata, diurético	Kis et al., 1988
	Bactericida, antifúngica, antitumoral	Naidenova et al., 1982; Ginesta-Peris, Garcia-Breijo, Primo-Yúfera, 1994
<i>X. strumarium</i>	Hipoglicêmica	Dhar et al., 1968, Kupiecki et al., 1974; Hsu, Chen, Cheng, 2000
	Antifúngica	Davicino et al., 2007
	Antitumoral	Naidenova et al., 1982; Roussakis et al.; 1994; Ahn et al., 1995
	Repelente	Harada et al., 1985
		Cetnsoy, Tamer, Aydemir, 1998
	Antibacteriana	Jawad et al.; 1988
		Scherer et al., 2009
	Antitripanossomal	Talakat Dwivedi, Sharma 1995
	Antimalária	Joshi et al., 1997; Saxena et al., 2003
	Antiinflamatória	Kim et al., 2005; Han et al., 2007;
Antihemíntica	Sharma et al., 2003	

O uso de *Xanthium* na medicina tradicional é relatado em desordens comuns, como pruridos até patologias mais complexas, como o câncer (ROING, 1988; MUKHEJI, BANERJEE, MITRA, 1970). Entre as diversas atividades terapêuticas, nas quais espécies de *Xanthium* têm sido empregadas, podemos mencionar o tratamento da dor de cabeça, pruridos, urticária, artrite, reumatismo (PHARMACOPOEIA PR CHINA I, 2000), antiinflamatória, digestiva, antiemético, diurético e em enfermidades hepáticas. As folhas são anti-sépticas e cataplasmas são utilizadas para dores de cabeça (SALINAS, RUIZ, RUIZ, 1998). Propriedades anti-febris também são descritas: sudorífera e antipirética (SAXENA, MONDAL, 1994; DEL VITTO, PETENATTI, PETENATTI, 1997, SALINAS, RUIZ, RUIZ, 1998). Em enfermidades mais graves seu uso é descrito contra doenças da próstata e contra câncer (MUKHEJI, BANERJEE, MITRA, 1970; TALAKAL et al., 1995; CUMANDA; MARINONI, 1991; LAVAUULT et al., 2005). São eficientes nas afecções renais, que expulsam os cálculos e pedras renais (ROING, 1988). Em afecções das vias aéreas o *Xanthium* ssp. é usado contra bronquite, rinite crônica, rinite alérgica, antiescrofuloso e sinusite (DEL VITTO, PETENATTI, PETENATTI, 1997; MA et al., 1998; LAVAUULT et al., 2005). Folhas em banhos para retiradas de manchas faciais (MUKHEJI, BANERJEE, MITRA, 1970). As sumidades florais tem propriedades anti-helmintícas. Na medicina tradicional chinesa, os frutos do *X. strumarium* são usados no tratamento da sinusite, dor de cabeça, reumatismo, pruridos cutâneos (MA et al, 1998), bronquite crônica, rinite crônica, rinite alérgica (HAN et al, 2007; KIM et al, 2005). Ainda sobre o *X. strumarium* foi descrito seu uso na medicina tradicional da Argentina como laxante suave, diurético, antiespasmódico, antifebril, antiséptico, antiinflamatório (DAVICINO et al., 2007).

Destaca-se a espécie *Xanthium strumarium* L., na qual suas folhas são aplicadas em casos de febre malárica (NADKARNI, 1954; TALAKAL et al., 1995). A propriedade antimalárica do *X. spinosum* L. também foi mencionada (DICIONÁRIO DE LAS CIENCIAS AGROPECUARIA, 2006; CERDEIRAS et al., 2007a).

2.2.3. Atividade Biológica e Toxicidade

O *Xanthium* possui diversas atividades farmacológicas descritas, muitas destas comprovando seu uso na medicina tradicional, como: diurética, doenças da próstata, antitumorais, antiinflamatória, inclusive antimalárica. Na tabela 2 (p. 6) pode-se observar a descrição das atividades biológicas das espécies de *Xanthium*, na qual pode-se perceber que o *X. strumarium* é uma espécie bastante estudada do ponto de vista farmacológico.

Além de propriedades farmacológicas, as espécies de *Xanthium* também são estudadas do ponto de vista toxicológico, visto que diversas espécies possuem propriedades tóxicas. As espécies que tiveram seus efeitos tóxicos estudados e relatados foram o *X. pungens*, *X. spinosum*, *X. strumarium*, *X. mongolium* e *X. cavanillesii*.

Estudos mostraram o isolamento em espécies de *Xanthium* o carboxiatractilosídeo (CAT), glicosídeo hepatotóxico, principal agente tóxico isolado dos frutos (KUPIECKI, 1974, CRAIG et al., 1976; COLE et al. 1980; STUART, COLE, GOSSER, 1981).

Méndez, Santos, Riete-Correa (1998) mencionaram que o efeito tóxico do CAT se deve a inibição do transporte de ATP e ADP através da membrana mitocondrial, o que inibe a fosforilação oxidativa. Estes efeitos têm sido demonstrados em estudos em ratos e cachorros. As principais manifestações tóxicas são produzidas no fígado e rins, podendo levar à morte (DRIEMEIER et al., 1999; LORETTI et al., 1999; COLODEL; DRIEMEIER; PILATI, 2000).

2.2.4. Constituintes químicos isolados de espécies de *Xanthium*.

Estudos fitoquímicos têm mostrado que o gênero *Xanthium* é bastante uniforme, contendo a presença de diterpenos da classe dos cauranos, xantanolídeos sesquiterpênicos, compostos sulfurados, compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico, óleos essenciais (COLE et al., 1980; RISCALA et al., 1994; TAHER et al., 1995; KIM et al., 2003; HAN et al., 2009, MUSSI, 2001).

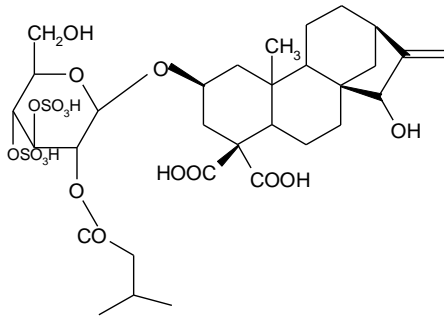
As espécies de *Xanthium* são bastante estudadas do ponto de vista fitoquímico, nos diversos estudos realizados os compostos fitoquímicos

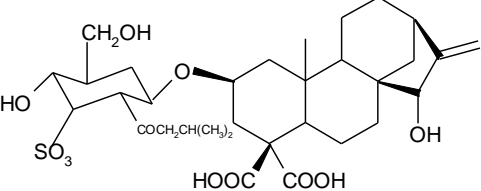
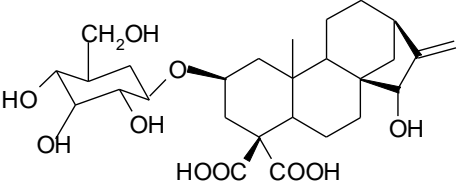
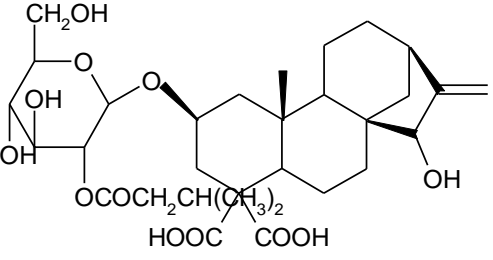
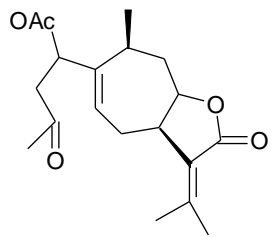
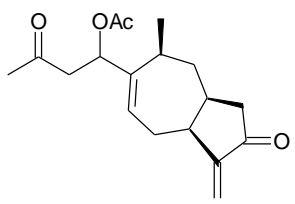
encontrados na espécie foram extraídos das diversas partes da planta. Das partes aéreas foram os xantanolídeos sesquiterpênicos, óleos essenciais (ROUSSAKIS et al., 1994; FAVIER et al., 2005; DE RISCALA et al., 1994; AHMED, 1989; AMMAR et al, 1992), das folhas são descritas a presença de óleos essenciais, fenóis, xantanolídeos sesquiterpênicos (MUSSI, 2001; MANFRON, 1997; MALIK, SANGWAN, DHINDSA, 1993; PINEL et al., 2007; GINESTA-PERIS et al., 1993). Nos frutos e brotação dicotiledônea mencionaram a presença diterpenoides cauranos, em especial o CAT (KUPIECKI et al, 1974; GRAIG et al, 1976; HSU, CHEN, HONG, 1979, COLE et al, 1980; CHANG & BUT 1986; WITTE et al, 1990; MENDEZ, 1998; DRIEMEIER et al., 1999; LORETTI et al., 1999), nos frutos também foram isolados ácidos fenólicos derivados do ácido cinâmico (MA et al. 1998; SHEU et al., 2003; HAN et al. 2007; HAN et al., 2009).

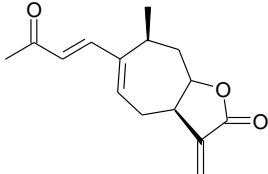
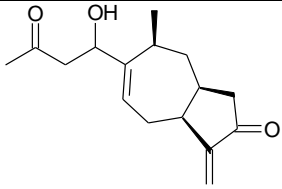
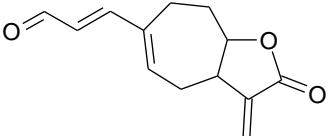
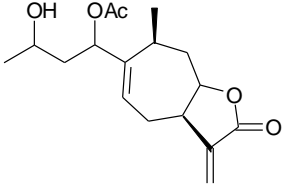
Além dos compostos descritos, a presença de compostos minoritários também é mencionada na literatura em *X. strumarium*, *X. spinosum*, sendo eles: alcalóides, hidroquinona (MA et al., 1998; SALINAS, RUIZ, RUIZ, 1998; HAN et al., 2009).

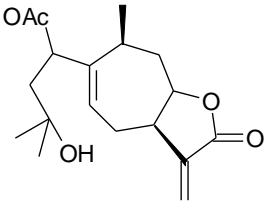
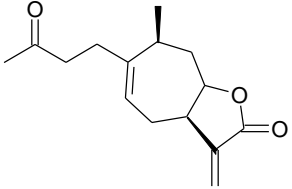
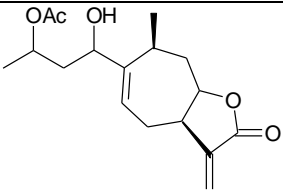
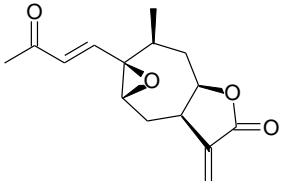
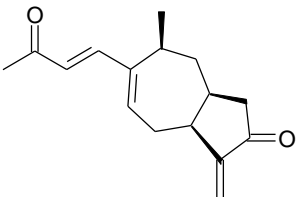
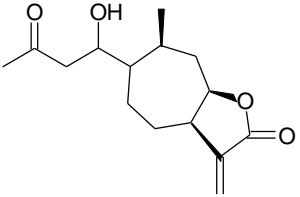
O número e a diversidade dos constituintes dos extratos brutos conduzem às atividades farmacológicas de interesse no organismo humano. Assim, observando-se a diversidade de compostos químicos encontrados em espécies de *Xanthium* correlaciona-se com a variada aplicação na medicina tradicional e estimula o estudo farmacológico da espécie. A quadro 3 mostra compostos isolados de espécies de *Xanthium*.

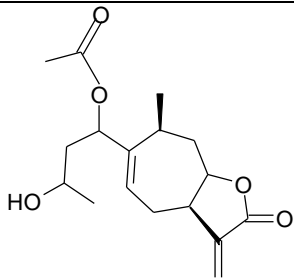
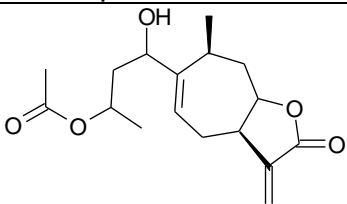
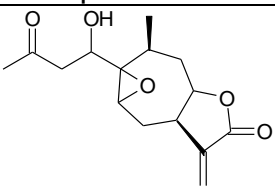
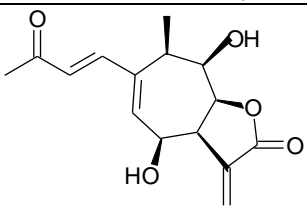
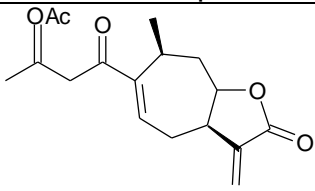
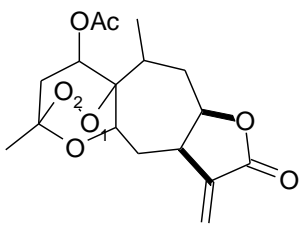
Quadro 3: Principais compostos químicos isolados de espécies de *Xanthium*

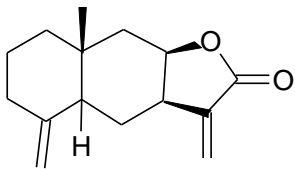
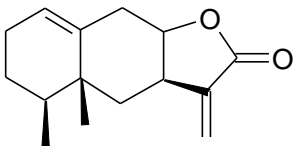
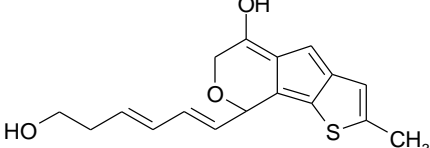
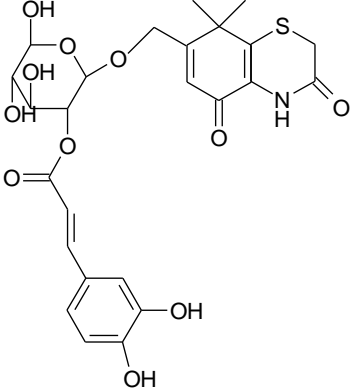
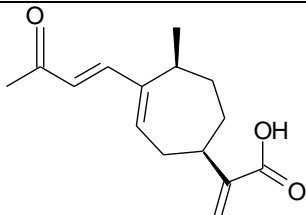
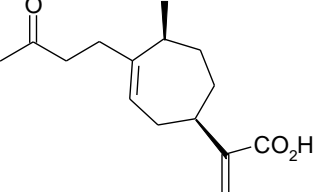
Composto	Espécie	Referência
Diterpenos Cauranos Glicosilados		
 <p>Carboxiatractilosideo (CAT)</p>	<i>Xanthium</i> ssp.	Graig et al, 1976; Hsu, Chen, Hong, 1979, Cole et al, 1980; Chang & But 1986; Witte et al, 1990; Mendez, Ruiz, Ruiz, 1998; Riete-

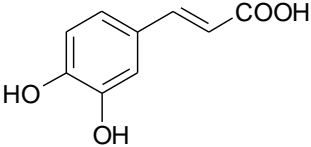
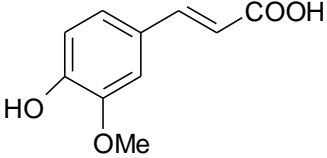
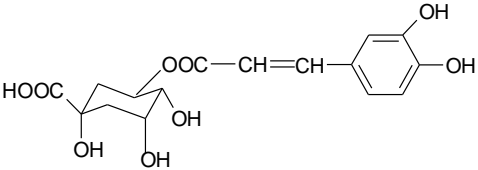
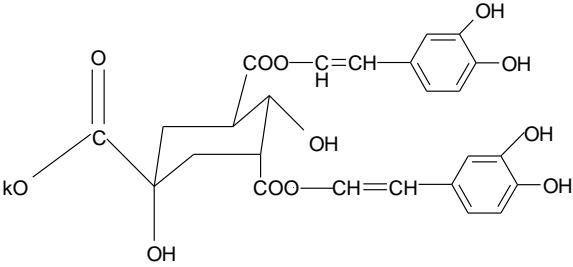
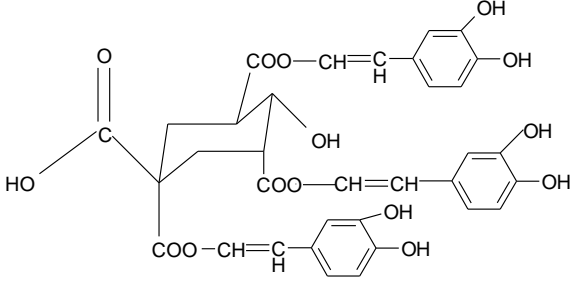
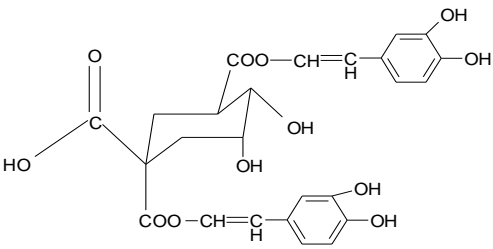
		Correa, 1998
	<i>X. strumarium</i> L.	Kupiecki, 1974
	<i>X. strumarium</i>	Ma et al., 1998
 <p>4'-disulfato-carboxiatractilósido</p>	<i>X. spinosum</i>	Piacente et al, 1995
 <p>Ácido 2β-O-β-D-glucopiranosil 15α-hidroxi-caur-16-eno-18,19-dicarboxílico</p>	<i>X. spinosum</i>	Piacente et al, 1995
 <p>3'4'-didesulfato carboxiatractilósido</p>	<i>X. pungens</i>	Macleod, Moeller, 1990
Xantanólídeos Sesquiterpênicos		
 <p>Xantinina</p>	<i>X. spinosum</i> L.	Metwally, Khafagy, El-Naggar, 1974
	<i>X. strumarium</i> L.	McMillan, 1975(a; b); Roussakis et al., 1994; Harada et al., 1985
	<i>X. macrocarpum</i>	Lavault et al., 2005; Pinel, 2007
 <p>Xantumina</p>	<i>X. spinosum</i> L	Metwally, Khafagy, El-Naggar, 1974
	<i>X. strumarium</i>	Malik, Sangwan, Dhindsa, 1993
	<i>X. strumarium</i> L	McMillan, 1975(a; b)

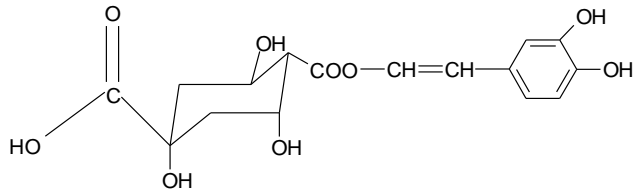
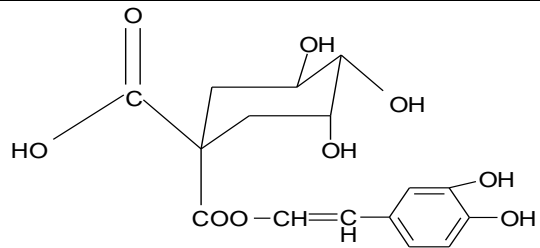
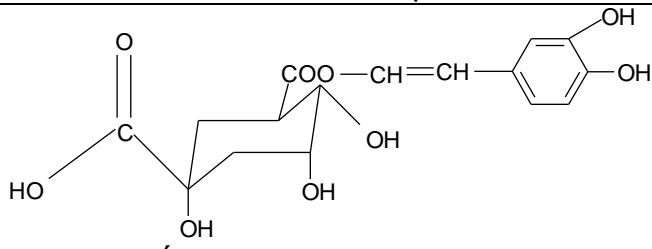
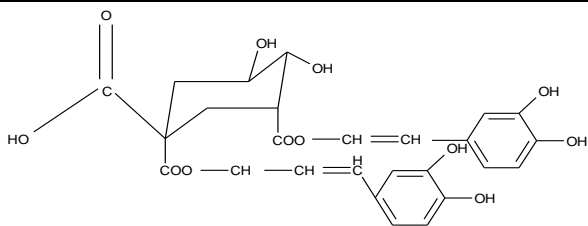
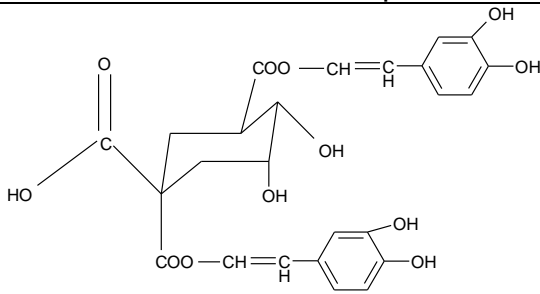
	<i>X. indicum</i>	Bohlmann et al., 1982
	<i>X. macrocarpum</i>	Pinel et al., 2007; Lavault et al, 2005
 <p>Xantantina</p>	<i>X.spinosum L.</i>	Metwally, Khafagy, El-Naggar, 1974
	<i>X .strumarium L.</i>	McMillan, 1975(a; b); Harada et al., 1985
	<i>X. sibiricum</i>	Sato et al., 1997
	<i>X. macrocarpum</i>	Pinel et al., 2007; Lavault et al, 2005
	<i>X. italicum</i>	Kovács et al., 2009
 <p>Tometosina</p>	<i>X .strumarium</i>	McMillan, 1975(a; b); Malik, Sangwan, Dhindsa, 1993
	<i>X. indicum</i>	Bohlmann et al., 1982
 <p>Deacetoxil-xantumina</p>	<i>X .strumarium L.</i>	McMillan, 1975 (a; b)
 <p>Xantanol</p>	<i>X .strumarium L.</i>	McMillan, 1975(a; b); Hsu, Chen, Hong. 1979; Chang, But 1986
	<i>X .strumarium</i>	Malik, Sangwan, Dhindsa, 1993

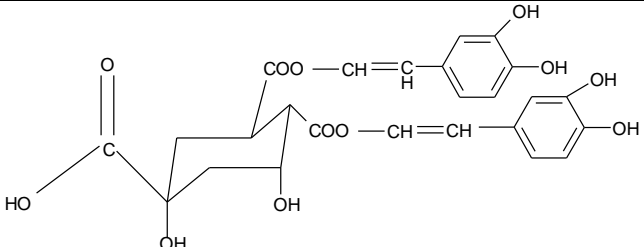
 <p>Xantumanol</p>	<i>X .strumarium</i> L.	McMillan, 1975 (a; b)
 <p>Xantinosina</p>	<i>X .strumarium</i> L.	McMillan, 1975(a; b); Yoon et al., 2008
	<i>X. macrocarpum</i>	Lavault et al, 2005
 <p>Isoxantanol</p>	<i>X .strumarium</i> L.	Hsu, Chen, Hong. 1979; Chang, But 1986;
	<i>X .strumarium</i>	Malik, Sangwan, Dhindsa, 1993
 <p>8-epi-xantantina epóxido</p>	<i>X .strumarium</i> L.	Kin et al., 2003
 <p>8-epi-xantantina</p>	<i>X .strumarium</i> L.	Kim et al., 2003
	<i>X. indicum</i>	Bohlmann, 1982;
	<i>X .strumarium</i>	Malik, Sangwan, Dhindsa, 1993
 <p>Hidroxitomentosina</p>	<i>X. macrocarpum</i>	
	<i>X. indicum</i>	Bohlmann, 1982
	<i>X .strumarium</i>	Malik, Sangwan Dhindsa, 1993
	<i>X. macrocarpum</i>	Pinel et al., 2007; Lavault et al, 2005

 <p>4-epi-isoxantanol</p>	<i>X. italicum</i>	Kovács et al., 2009
 <p>4-epi-xantanol</p>	<i>X. macrocarpum</i>	Pinel et al., 2007; Lavault et al., 2005
 <p>2-hidroxitomentosina-1β,5β-epoxido</p>	<i>X. strumarium</i>	Malik, Sangwan, Dhindsa, 1993
 <p>6β,9β-dihidroxi-8-epi-xantantina</p>	<i>X. strumarium</i>	Saxena, Modal, 1993
 <p>2-oxo-4-acetil-deasacetyl-xantanol</p>	<i>X. spinosum</i>	Abdei-Mogib et al., 1991
 <p>11, 13 diidroguaianolídeo</p>	<i>X. pungens</i>	Ahmed et al., 1989

 <p>Isoalantolactona</p>	<i>X. indicum</i>	Bohlmann et al., 1982
 <p>Xantonidieno</p>	<i>X. indicum</i>	Bohlmann et al., 1982
Compostos Sulfurados		
 <p>Xantienopirano</p>	<i>X. pungens</i>	Ahmed et al., 1995
 <p>7-hidroximetil-8,8-dimetil-4,8-dihidrobenzol-3,5-diona-(2-O-caffeoil)-β-D-glucopiranosídeo</p>	<i>X. strumarium</i> L.	Quin et al., 2006
 <p>Oximetino</p>	<i>X. strumarium</i> L.	Yoon et al., 2008
 <p>Ácido 4-oxo-bedfordia</p>	<i>X. strumarium</i> L.	Yoon et al., 2008;
	<i>X. macrocarpum</i>	Lavault et al., 2005
	<i>X. indicum</i>	Bohlmann et al., 1982
Ácidos Fenólicos		
	<i>X. strumarium</i>	Ma et al., 1998; Han et

 <p>Ácido cafeíco</p>	<p><i>X. sibiricum</i></p>	<p>al., 2007 Sheu et al., 2003; Han et al., 2009</p>
 <p>Ácido ferúlico</p>	<p><i>X. strumarium</i> L. <i>X. sibiricum</i></p>	<p>Ma et al 1998; Han et al., 2007 Sheu et al., 2003; Han et al., 2009</p>
 <p>Ácido clorogênico</p>	<p><i>X. strumarium</i> <i>X. sibiricum</i></p>	<p>Ma et al. 1998; Han et al., 2007 Sheu et al., 2003; Han et al., 2009</p>
 <p>Ácido 3-O cafeoil quinato potássio</p>	<p><i>X. strumarium</i></p>	<p>Ma et al., 1998</p>
 <p>Ácido 1,3,5-tri-O-cafeoilquínico</p>	<p><i>X. strumarium</i> <i>X. sibiricum</i></p>	<p>Ma et al., 1998; Han et al. 2007 Sheu et al., 2003; Han et al., 2009</p>
 <p>Ácido 1,5-di-O-cafeoilquínico</p>	<p><i>X. strumarium</i></p>	<p>Ma et al., 1998; Han et al., 2007</p>

	<i>X. sibiricum</i>	Sheu et al., 2003; Han et al., 2009
 <p>Ácido 4-O-cafeoilquínico</p>	<i>X. strumarium</i> <i>X. sibiricum</i>	Ma et al. 1998; Han et al., 2007 Sheu et al., 2003; Han et al., 2009
 <p>Ácido 1-O-cafeoilquínico</p>	<i>X. sibiricum</i>	Han et al., 2009
 <p>Ácido 5-O-cafeoilquínico</p>	<i>X. sibiricum</i>	Han et al., 2009
 <p>Ácido 1,3-O-dicafeoilquínico</p>	<i>X. sibiricum</i>	Han et al., 2009
 <p>Ácido 1,5-O-dicafeoilquínico</p>	<i>X. sibiricum</i>	Han et al., 2009

 <p style="text-align: center;">Ácido 4,5-O-dicafeoilquínico</p>	<i>X. sibiricum</i>	Han et al., 2009
---	---------------------	---------------------

2.3. *Xanthium cavanillesii*

As espécies vegetais se distribuem de acordo com suas exigências fisiológicas através de zonas climáticas bem definidas. No caso do *Xanthium*, no Brasil, é mencionada a ocorrência de duas espécies, a *X. spinosum* e a *X. cavanillesii* (LORENZI, 1991; KISSMANN, GROTH, 1992), sendo que a espécie de ocorrência no sul do país é a *X. cavanillesii* (CORRÊA, 1984, MANFRON, 1997, MUSSI, 2000). O Rio Grande do Sul, por apresentar clima temperado, solos férteis e trabalhados, é uma região favorável ao aparecimento do *X. cavanillesii* (Figura 2), que também é encontrado nos campos do Uruguai e Argentina (LORENZI, 1991, BACKES, NARDINO, 1990)



Figura 2. *Xanthium cavanillesii* coletado no município de São Lourenço do Sul/RS.

No Brasil, estas plantas são conhecidas popularmente como “carrapicho de carneiro”, “espinho de carneiro”, “carrapicho”, “carrapicho grande” e

“carrapicho de carneiro grande” (GALLO, 1977; GROTH, 1980, DRIEMEIER, 1999). As plantas do gênero *Xanthium* são infestantes de lavouras e quando subprodutos contaminados com os frutos de *Xanthium* sp. são utilizados como alimentos para animais podem trazer prejuízos econômicos (COLODEL, DRIEMEIER, PILATI, 2000). Além da invasão de culturas o *X. cavanillesii* também é temido por causar intoxicação em animais domésticos.

As intoxicações por plantas do gênero *Xanthium* ocorrem em animais domésticos pela ingestão da brotação dicotiledônea, em condições de carência de pastagens (MÉNDEZ et al. 1998), ou pela ingestão de frutos que acidentalmente contaminam a alimentação de animais confinados (WITTE et al. 1990, DRIEMEIER et al. 1999).

Na região sul do Brasil, há relatos de surtos de intoxicação espontânea por *Xanthium* spp em bovinos. Os surtos ocorreram nos municípios de Pelotas, Santa Maria, São Lourenço do Sul (RIET-CORREA et al. 1983, 1984; DRIEMEIER et al., 1999), Casca, Cachoeira (DRIEMEIER et al. 1999) e Pinhal Grande (LORETTI et al. 1999), todos no estado do Rio Grande do Sul.

O *X. cavanillesii* é uma planta que também apresenta diversos fins na terapêutica popular. Relatos indicam que as formas de uso popular são administradas internamente, por via oral e externamente através de compressas, para assepsia de ulcerações de pele (MANFRON, 1997).

X. cavanillesii é utilizado em forma de infusão das folhas na medicina tradicional pelas suas propriedades purgativas e antiespasmódicas. Sendo também usado na lavagem de úlceras e feridas cutâneas, os frutos e raízes são diuréticos (GROTH, 1980). Propriedade purgativa também foi mencionada (NOELLI, 1996). As propriedades contra afecções pulmonares, renais e hepáticas, depurativa e antiespasmódica são mencionadas na medicina tradicional da Argentina (DEL VITTO, PETENATTI, PETENATTI, 1997), além do uso como anti-séptico tópico (CERDEIRAS et al., 2007b). No Brasil, a planta inteira, em forma de infuso e decocção, considerada adstringente, anti-escrofulosa. Usada, especialmente, contra enfermidade cutânea: tumores, gangrena, inclusive câncer (LORENZI, 1991).

O *X. cavanillesii*, quando comparado com outras espécies de *Xanthium*, como o *X. strumarium* e *X. sibiricum*, não foi tão estudado do ponto de vista farmacológico, as principais atividades, investigadas são: antimicrobiana, anti-

ulcerativa, diurética, e estudo recente confirmou a forte ação antiinflamatória tópica do extrato etanólico das partes aéreas de *X. cavanillesii* (SCHMIDT et al., 2009).

Manfron (1997) investigou a atividade antimicrobiana do extrato metanólico de raízes, caules, folhas e frutos de *X. cavanillesii* contra cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Staphylococcus aureus*, nos quais o *Xanthium* apresentou atividade. O efeito diurético das raízes do *X. cavanillesii*, confirmando seu uso tradicional como diurético, foi efetuado por Mussi (2001). Em 2005, estudos de isolamento de lactonas sesquiterpênicas das partes aéreas do *X. cavanillesii* mostraram a atividade anti-ulcerativa em ratos (FAVIER et al., 2005). E mais recentemente, corroborou-se sua atividade antimicrobiana contra cepas de *S. aureus*, atividade esta atribuída ao xantanol, isolado do *X. cavanillesii* e foi avaliada atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CERDEIRAS et al., 2007a;b).

Estudando a composição química de *Xanthium cavanillesii* foram isolados por hidrodestilação, das partes aéreas, componentes de óleos essenciais, tendo como constituinte majoritário o limoneno na concentração de 43,6% e outros constituintes em menor proporção tais como: aromadendreno, α -pineno, α -terpineol, carvono, p-cimeno, cariofileno, β -pineno, mirceno, cariofileno, linalol, α -tujeno, borneol, citronelal, citronelol, δ -cardineno, nerolidol. Ácidos carboxílicos (ácido propiônico, ácido isovalérico, ácido salicílico), ácidos fenólicos (timol, carvacrol, p-cresol, pirocatecol e resocinol). Nesta mesma espécie foram identificados também substâncias como as lactonas, sesquiterpênicas (TAHER et al., 1985).

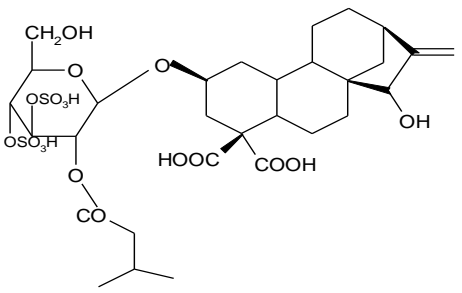
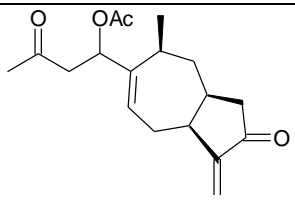
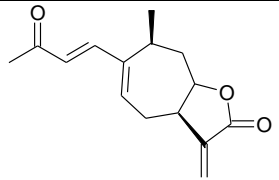
Óleos essenciais também foram identificados nas folhas do *X. cavanillesii* (MUSSI, 2001). Das partes aéreas foram identificados, mais uma vez, óleos essenciais, como também lactonas sesquiterpênicas (AMMAR et al., 1992, DE RISCALA, et al., 1994). E dos frutos e brotação dicotiledônea relataram-se a presença de diterpenóides cauranos glicosilados (LORETTI et al., 1999; DRIEMEIER et al. 1999; COLODEL, DRIEMEIER, PILATI, 2000).

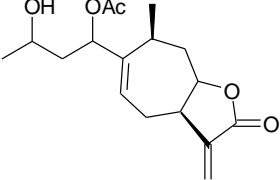
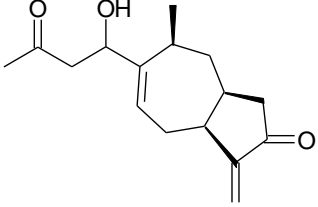
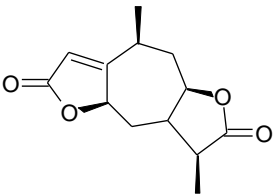
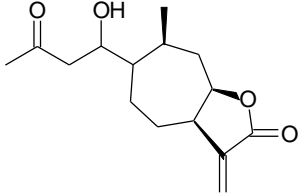
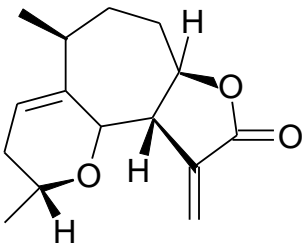
De forma mais abrangente, a composição química geral da espécie *X. cavanillesii* foi estudada, mostrando resultados fortemente positivos para ácidos

orgânicos em geral, ácidos voláteis, alcalóides, amino grupos (extrato etanólico), esteróides e/ou triterpenos, heterosídeos cardiotônicos, nas raízes, caules, folhas e frutos. Resultados positivos para a presença de ácidos fixos (caules e folhas), fenóis *c/ pós. orto e meta* livres (caules e frutos), fenóis com posição *para* livre (folhas e frutos), gomas, mucilagem e taninos (raízes, caules e folhas), osídeos (caules e folhas) (MANFRON, 1997).

E como pode ser observado (Quadro 4) a constituição química de *X. cavanillesii*, engloba as classes de constituintes químicos das demais espécies do gênero *Xanthium*.

Quadro 4: Principais compostos químicos isolados de *Xanthium cavanillesii*

Composto	Parte	Referência
Cauranos Diterpenos		
 <p style="text-align: center;">Carboxiatractilosideo (CAT)</p>	Brotação dicotiledônea e frutos	Loretti et al., 1999 Driemeier et al., 1999. Colodel; Driemeier,; Pilati, 2000
Xantanolídeos Sesquiterpênicos		
 <p style="text-align: center;">Xantumina</p>	Partes aéreas	De Riscala et al., 1994
 <p style="text-align: center;">Xantantina</p>	-	Favier et al., 2005; 2006

 <p>Xantanol</p>	-	Cerdeiras et al 2007 (a)
 <p>11αH,13-dihydroxantiumina</p>	Partes aéreas	De Riscala et al., 1994
 <p>Bis-norxanthanolídeo</p>	Partes aéreas	De Riscala et al., 1994
 <p>Hidroxitomentosina</p>	Partes aéreas	De Riscala et al, 1994
 <p>4β,5α-epoxido-10-αH-xantana-1(2).11-dieno-7β,8β-olideo</p>	Folhas	Olivaro, Vazquez, 2009

Dando continuidade ao estudo químico e biológico de espécies do gênero *Xanthium*, este trabalho apresenta o estudo químico do extrato ativo frente a cepas de *P. falciparum* com o objetivo de avaliar a atividade antimalárica descrita para algumas espécies do gênero.

A seguir, serão abordados alguns aspectos relacionados à malária para melhor contextualizar a relevância do nosso trabalho.

3. Malária

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, com manifestações episódicas de caráter agudo, que aflige milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo. É talvez a mais antiga, a de maior distribuição e a mais conhecida das doenças parasitárias que afligem o homem (VERONESI, 1991, NEVES, 1998, OMS, 2009).

Pelo menos 300 milhões de pessoas contraem malária por ano em todo o mundo. Destas, cerca de 1,5 a 2 milhões morrem. Quase 3 mil crianças morrem por dia de malária na África muito mais que qualquer outra doença infecciosa (CAMARGO, 2003).

A malária está presente, também, em mais de 90 países, embora com prevalência diferente. A malária é tipicamente uma doença do mundo subdesenvolvido. Os países mais comprometidos são Índia, Afeganistão e países asiáticos, além da China e Brasil (cerca de 300 mil casos/ano). Na figura 3, observa-se a abrangência da malária no mundo, onde ela se mostra uma doença pandêmica, devendo ser uma preocupação de todos os governos, inclusive do Brasil (LUM, 2004; LACERDA, 2004).

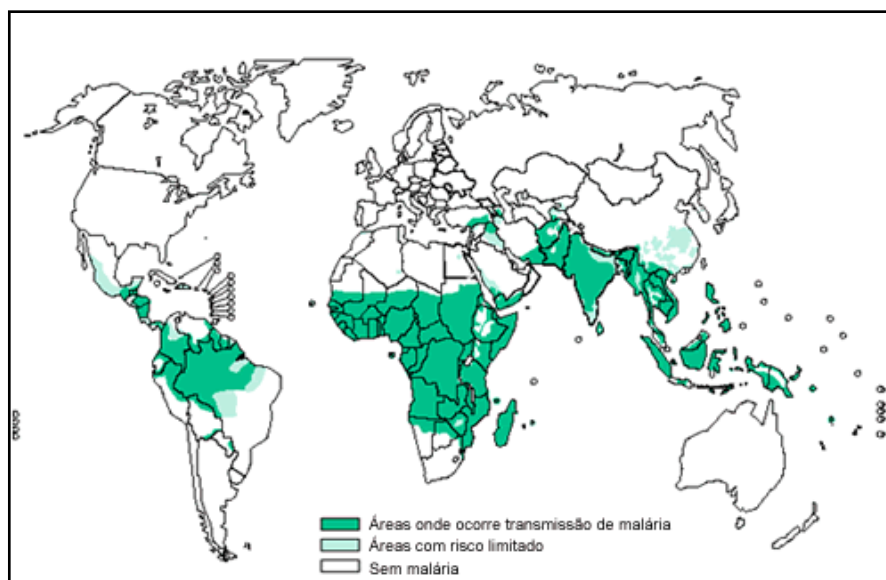


Figura 3. Áreas de incidência da malária no mundo.

Nos últimos anos foi observada uma queda nos números de casos de malária no Brasil. No período de 2000 a 2002 houve redução na notificação de casos. No entanto, essa queda não foi mantida e no período de 2003 a 2005

observou-se crescimento no registro da doença. Porém, nos dois últimos anos, 2006 e 2007, houve uma reversão desta tendência de crescimento, com uma importante redução de 9% em 2006, quando comparado com 2005, e de 17% em 2007 em relação a 2006 (figura 4). O êxito pode ser atribuído a uma série de fatores, dentre os quais: maior investimento de recursos pelas três esferas de governo; mudança no esquema de primeira escolha para tratamento da malária por *P. falciparum*; aprimoramento do trabalho intersetorial e interinstitucional; capacitação dos profissionais de saúde em análise de dados para focalização do problema e tomada de decisão e mobilização do setor político. Com a redução de casos, houve impacto também nas internações, que caíram 45,8% no período avaliado, passando de 2.910 em 2007, para 1.576 em 2008, como informou o Ministério da Saúde (BRASIL, 2008)

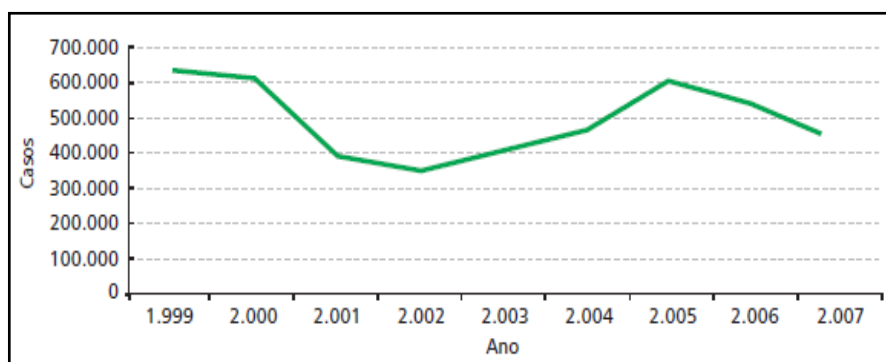


Figura 4. Número de casos de malária na Amazônia Legal, 1999 a 2007

No ano de 2007, em apenas três estados, Amazonas, Rondônia e Pará foram registrados cerca de 354 mil casos, o que correspondeu a 78% das ocorrências. A maioria dos estados da Amazônia Legal apresentou redução, em 2007, na frequência de casos em relação ao ano de 2006, com exceção do Amazonas e Mato Grosso. No Brasil, há transmissão da malária por três espécies de *Plasmodium*, *P. vivax* (76,6%), *P. falciparum* (19,3%) e *P. malariae* (BRASIL, 2008). No entanto, as infecções causadas por *P. vivax* predominam. Houve redução nos casos de malária por *P. falciparum* em praticamente todos os estados, na Amazônia Legal este percentual passou de 25% em 2006, para 19% em 2007. Esta redução pode, em parte, ser atribuída à mudança no tratamento de primeira escolha da malária por *P. falciparum*, passando do esquema terapêutico com quinina e doxiciclina para combinações com derivados da artemisinina (BRASIL, 2008).

3.1. A doença

Na sistemática zoológica, os parasitas da malária humana estão classificados no filo *Protozoa*; classe *Sporozoea*; família *Plasmodiidae*; gênero *Plamodium*, ao qual pertencem quatro espécies que infectam o homem: *P. vivax*; *P. malarie*; *P. ovale* e *P. falciparum* (figura 5) (BRAGA, FONTES, 2005; VERONESI, 1991).

A transmissão ao homem se dá pela picada do mosquito fêmea (infectado) do gênero *Anopheles* (figura 6). Ao nascer, o mosquito fêmea não é transmissor da doença, somente torna-se um disseminador quando alimenta-se do sangue de algum animal ou humano infectado, ingerindo, assim, formas viáveis do parasita (gametócitos), dando início ao ciclo parasitário.

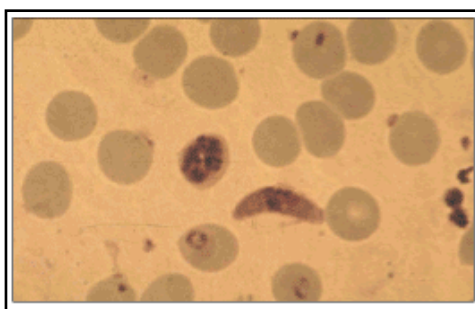


Figura 5. Visão microscópica do *Plasmodium falciparum*.



Figura 6. Mosquito do gênero *Anopheles* sp.

A malária manifesta-se por episódios de calafrios, seguidos de febre alta que duram de 3 a 4 horas. Esses episódios são, em geral, acompanhados de profundo mal-estar, náuseas, cefaléias e dores articulares. Após a crise, o paciente retorna à sua vida habitual. No entanto, depois de um ou dois dias, o quadro calafrio/febre retorna e se repete por semanas até que o paciente, não tratado, sare espontaneamente ou morra em meio a complicações renais e pulmonares e coma cerebral no caso da malária cerebral. Tratado a tempo, só excepcionalmente morre-se de malária (VERONESI, 1991, NEVES, 1998, CAMARGO, 2003).

Dependendo das manifestações clínicas apresentadas a malária pode ser enquadrada em: A) Malária não complicada, na qual os acessos maláricos são acompanhados de intensa debilidade física, náuseas e vômitos e a febre é

referida pela grande maioria dos pacientes, corresponde à maioria dos casos relatados no Brasil (BRASIL, 2001; BRAGA, FONTES, 2005) e B) Malária grave e complicada, observando-se hiperparasitismo, anemia grave, icterícia, hipertermia mantida, distúrbios hidroeletrólíticos e do equilíbrio ácido-base, insuficiência respiratória, insuficiência renal, alteração do nível de consciência, colapso circulatório, distúrbios hemorrágicos e da coagulação, hipoglicemia e coma (BRASIL, 2001; BRAGA, FONTES, 2005).

3.1.1 Terapêutica da malária

A inexistência, até o momento, de um único tratamento igualmente efetivo contra as espécies de plasmódio mais prevalentes no Brasil, *P. vivax* (79,6%) e *P. falciparum*, (19,3%) (BRASIL, 2002), faz com que a quimioterapia específica tenha um papel fundamental no que se refere à assistência às pessoas diagnosticadas como portadoras da infecção pelo plasmódio (BRASIL, 2001).

O tratamento da malária tem como alvo a interrupção da esquizogônia sanguínea do ciclo parasitário, a qual é responsável pela patogenia e manifestações clínicas da infecção. Entretanto, pela diversidade do seu ciclo biológico, é também objetivo da terapêutica proporcionar a erradicação de formas latentes do *P. vivax* no ciclo tecidual, evitando as recaídas (BRASIL 2001, 2002).

Atualmente os fármacos antimaláricos são baseados em produtos naturais ou compostos sintéticos produzidos a partir da década de 40. Esses fármacos são específicos para cada etapa do ciclo de vida do *Plasmodium*. Estes podem ser classificados de diferentes formas. A classificação utilizada com maior frequência está baseada na ação do fármaco nos diferentes estágios do ciclo biológico do parasita. Segundo este aspecto, os fármacos antimaláricos podem ser classificados como: agentes esquizonticidas sanguíneos, agentes esquizonticidas teciduais, agentes profiláticos, agentes que bloqueiam a transmissão entre o homem e o mosquito (RANG, 2004; JEFFORD, 1997, FRÉDÉRICH et al., 2002).

Os agentes esquizonticidas sanguíneos, também conhecidos como fármacos para a cura clínica ou supressiva, são usados no tratamento do

ataque agudo, sendo eficazes contra as formas eritrocitárias do parasita. Os fármacos enquadrados nesta classe são os quinolinometanóis (quinina, mefloquina), 4-aminoquinolínicos (cloroquina), fenantreno (halofantrina), agentes que interferem na síntese ou ação do ácido fólico (sulfadoxina, dapsona, pirimetamina). Ainda nesta classe, encontram-se os fármacos antimaláricos mais potentes encontrados no mercado farmacêutico: os endoperóxidos: artemisinina e seus derivados (diidroartemisinina (DQHS), arteéter, arteméter, artemisiteno e artesunato de sódio) (Figura 7) (LUO, SHEN, 1987; BALINT, 2001).

A artemisinina, extraída da *Artemisia annua* L. (Asteraceae), foi isolada pela primeira vez na década de 70, mas pesquisas com extrato de *Artemisia annua* já faziam parte de um projeto militar chinês secreto. O projeto 523, iniciado em 1967 e que tinha como propósito ajudar os militares vietnamitas a combater a malária durante a guerra do Vietnam, obtendo uma vantagem estratégica contra os norte-americanos (FRANÇA, SANTOS, FIGUEROA-VILLAR, 2008).

A artemisinina e seus derivados atraem grande atenção dos pesquisadores, pois hoje é um dos mais potentes antimaláricos contra o *P. falciparum* e *P. vivax*, inclusive contra as cepas resistentes a fármacos tradicionais como, por exemplo, a cloroquina, quinina, mefloquina.

Este fármaco é um composto com uma estrutura química peculiar: um lactona sesquiterpênica contendo uma única ponte endoperóxido, de alta estabilidade térmica, baixa toxicidade e alta eficiência contra *P. falciparum*. A estrutura aparentemente complexa da artemisinina não é condição indispensável para a atividade antimalárica. Nos vários sistemas sintetizados testados, o grupamento fundamental é a ligação peróxido, até então (KLAYMAN *et al*, 1985)

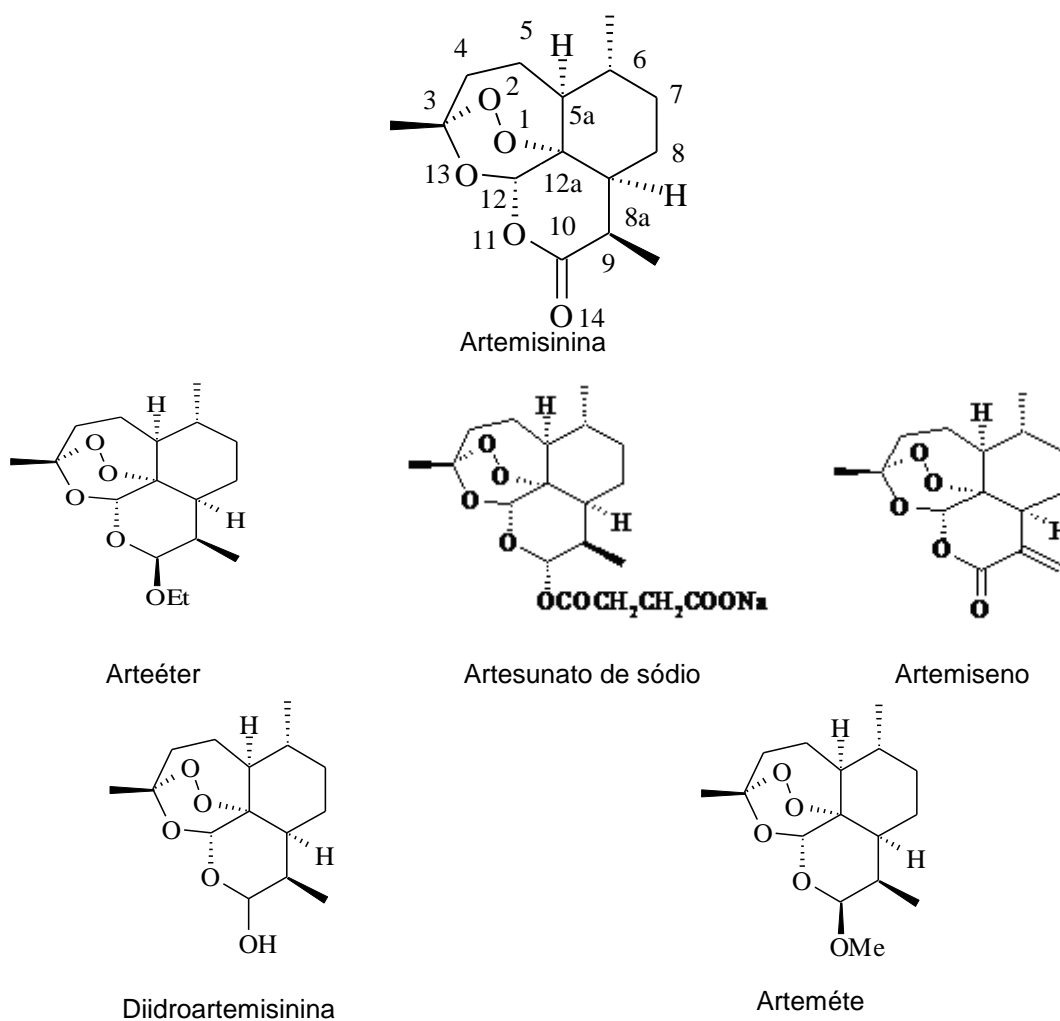


Figura 7. Artemisinina e seus derivados

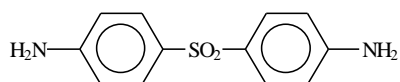
Os agentes esquizotocidas teciduais são eficazes nas formas hepáticas do parasita e em gametas levando à cura radical. Estão incluídos neste grupo os agentes 8-aminoquinolínicos (primaquina) (RANG, 2004).

Os agentes profiláticos bloqueiam a passagem do estágio exoeritrocitário para o eritrocitário, matando o parasita quando este deixa o fígado, conseqüentemente, impedindo os ataques de malária. Alguns fármacos desta classe são cloroquina, mefloquina, proguanil, pirimetamina, dapsona e doxiciclina (RANG, 2004).

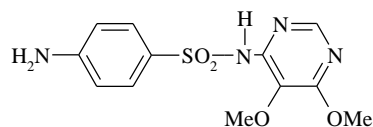
Os fármacos que bloqueiam a transmissão do homem para o mosquito são aqueles que têm a capacidade de destruir os gametócitos, são eles: a primaquina, proguanil e pirimetamina (RANG, 2004).

Vale ressaltar que os fármacos antimaláricos podem atuar contra mais de uma forma do protozoário e serem efetivos contra uma espécie, mas totalmente ineficazes contra outras (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

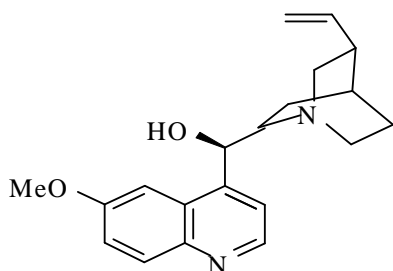
O mecanismo de resistência do plasmódio aos fármacos está correlacionado tanto a fatores ligados ao parasita, ao hospedeiro e às condições sócio-econômicas e, geralmente, ao uso frequente, abusivo e indiscriminado dos medicamentos antimaláricos, o que incrementa a disseminação de cepas resistentes, fazendo-se necessária a busca de medicações alternativas mais eficazes, como a mefloquina (ALECRIM, 1986 (a) e (b); COUTO et al., 1993). Alguns dos fármacos antimaláricos clássicos são mostrados na figura 8



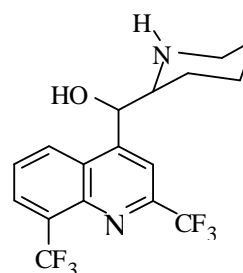
Dapsona



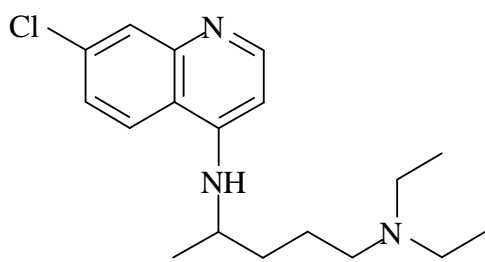
Sulfadoxina



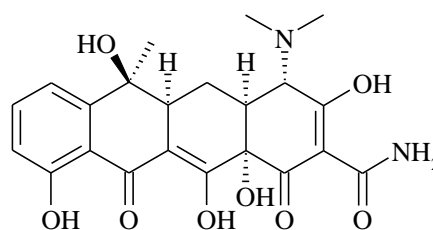
Quinina



Mefloquina



Cloroquina



Tetraciclina

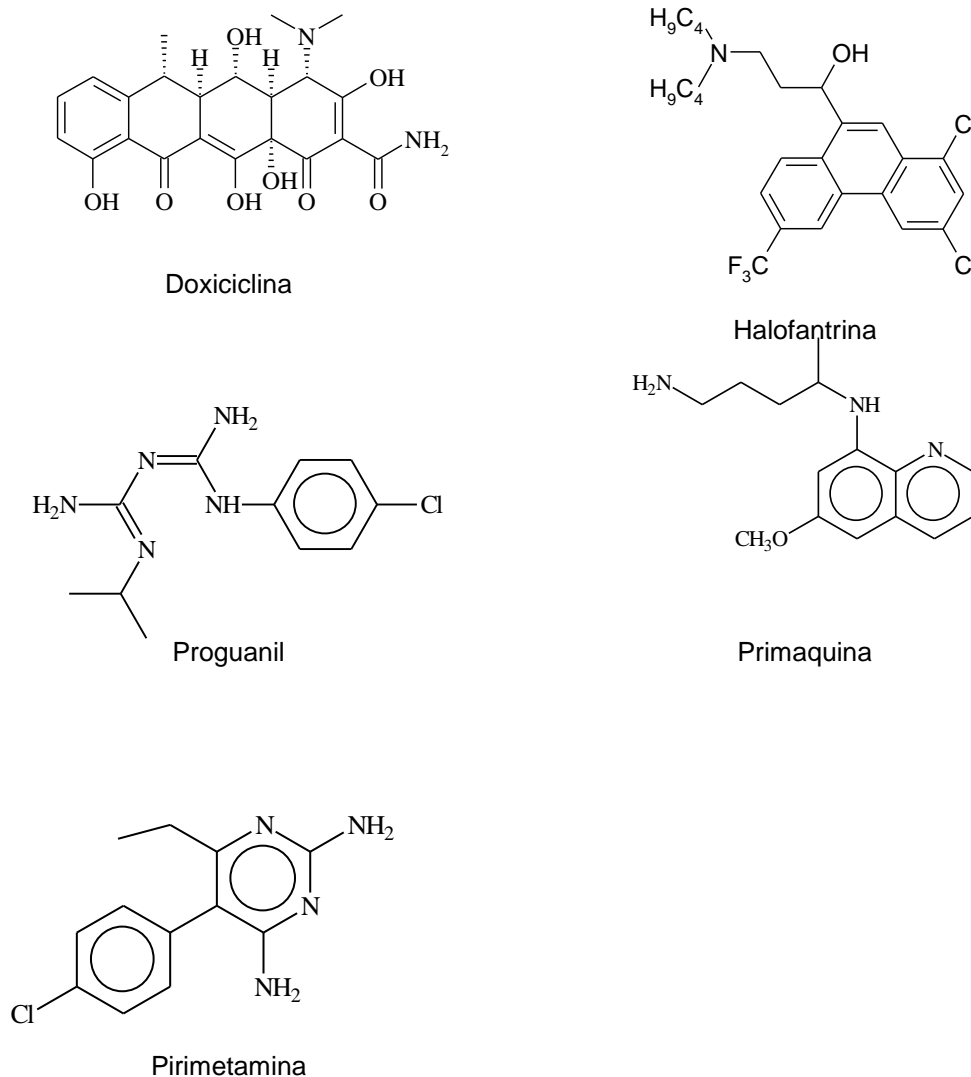


Figura 8. Fármacos antimaláricos clássicos

3.2 Novo alvo molecular: PfATP6

A proposta do mecanismo de ação dos endoperóxidos (artemisinina) mais difundida foi a proposta por Meshnick et al. (1996), na qual eles propõem que a ação antimalárica da artemisinina deve ocorrer em duas etapas, na primeira, a artemisinina é ativada pelo heme ou pelo íon ferro(II) livre, produzindo radicais livres e espécies citotóxicas. Na segunda etapa, estas espécies reagiriam com uma proteína específica associada à membrana do parasita levando-o à morte.

Contudo, trabalhos mais recentes tem demonstrado que além da formação de radicais livres que alquilam várias proteínas, a artemisinina atua inibindo irreversivelmente a enzima ATPase cálcio-dependente (PfATP6)

localizada no retículo endoplasmático do *Plasmodium falciparum* com alta especificidade (ECKSTEIN-LUDWING et AL., 2003).

A PfATP6 (Figura 9) vem se mostrando um potente alvo para a atividade antimalárica da artemisinina e da tapsigargina, ambas lactonas sesquiterpênicas, esta última inibe potencialmente tanto as PfATPase6 presente no retículo endoplasmático rugoso tanto de mamíferos quanto do parasito *Plasmodium* spp. Desse modo, foi hipotetizado que a artemisinina interage com uma região do PfATP6 que liga a tapsigargina, implicando que a diferença entre o padrão de ligação da tapsigargina nas SERCAs do parasito e dos mamíferos são determinantes na suscetibilidade da artemisinina.(JUNG, 2005).

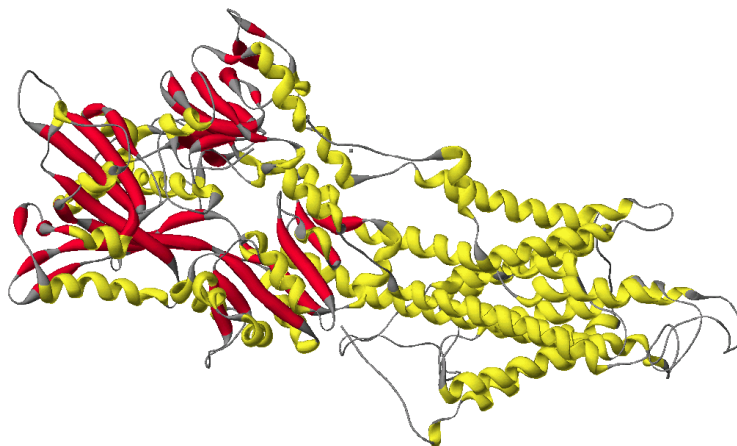


Figura 9: Estrutura tridimensional do modelo de PfATP6 (PDB ID: 1IWO). As regiões vermelhas são as folhas β e as amarelas são as α -hélices.

Adicionalmente, na busca de novos compostos que apresentem alternativas no tratamento da malária, a curcumina e metilcurcumina, que tem suas propriedades antiinflamatória, antioxidante e antitumoral comprovadas, foi testada para atividade antimalárica em ratos infectados com cepas de *Plasmodium berghei*. Mostrando-se ativa, então surgiu a necessidade de se explicar o mecanismo de ação da curcumina. Assim estudos por modelagem molecular tentaram explicar a atividade antimalárica, inibindo a PfATP6 (JI, SHEN, 2009).

4 Métodos computacionais

4.1 Modelagem molecular

A modelagem molecular consiste na geração, manipulação e/ou representação realista de estruturas moleculares e cálculos das propriedades físico-químicas sendo assistida por computadores. O instrumento matemático usado é a química teórica e a computação gráfica são as ferramentas para manusear os modelos biológicos ou não, tais como proteínas, DNA, nanotubos, dentre outros. Atualmente, os sistemas de modelagem molecular estão munidos de poderosas ferramentas para a construção, visualização, análise e armazenamento de modelos de sistemas moleculares complexos que auxiliam na interpretação das relações entre as estruturas químicas e atividade biológica associadas aos compostos investigados. A modelagem molecular possui diversas metodologias que podem ser aplicadas ao desenvolvimento de fármacos, dentre elas destacam-se homologia ou modelagem comparativa e ancoragem molecular (mais conhecido como *docking*) (ANDREI, 2003).

O uso de modelos teóricos que permitam o manuseio de estruturas moleculares, como também, a avaliação do comportamento químico relacionando as propriedades da matéria são os objetivos de estudo de modelagem molecular.

A Modelagem Comparativa é uma ferramenta computacional empregada para determinação estrutural de proteínas a partir de uma ancestral em comum devido a similaridade protéica entre a função e estrutura. (SANTOS-FILHO, ALENCASTRO, 2003). A realização da modelagem por homologia se processa pela sobreposição de seqüências homólogas entre si, onde pelo menos uma possui as estruturas 3D resolvida por métodos experimentais (difração de raio-X ou RMN). Como resultado, um modelo é gerado tendo o arcabouço da estrutura determinada experimentalmente com referência, está é denominada molde. O processo de modelagem molecular possui também a finalidade de otimizar as posições das cadeias laterais, refinar a geometria obtida e validar o modelo construído (GOLDSMITH-FISCHMAN, HONIG, 2003; SANTOS-FILHO, ALENCASTRO, 2003).

De posse da estrutura molecular, ou seja, do receptor, os trabalhos de investigação seguem para os estudos de ancoragem molecular, conhecido como *docking*. Esta metodologia é utilizada para encaixar ligantes no sítio ativo da enzima, com base que os grupamentos complementares do ligante e do receptor possam ser pareados. O programa então move automaticamente a molécula dentro da cavidade no sítio ativo em diferentes conformações, e para cada uma delas a energia de interação é gerada fornecendo como resultado a melhor conformação do ligante no sítio ativo do alvo molecular (PATRICK, 2009).

Um dos primeiros fármacos desenvolvidos por modelagem molecular foi o captopril, amplamente utilizado no tratamento da hipertensão. O captopril é um inibidor da enzima conversora da angiotensina (ECA). O é um análogo sintético de peptídeos isolados de veneno da serpente *Bothrops jararaca*, os quais são inibidores potente da ECA (RANG, 2004).

O planejamento molecular do captopril foi fundamentado, de maneira geral, na construção de unidades peptídicas simples, elaboradas a partir da unidade terminal do substrato natural da enzima ECA, isto é a angiotensina I, em uma estratégia de identificação de um protótipo dirigido ao sítio-ativo. (BARREIRO, FRAGA; 2008).

Ainda com relação a modificação estrutural de um protótipo na descoberta racional de fármacos, tem-se o aciclovir, o qual foi originários dos nucleotídeos substratos de quinases virais que participam da biossíntese de ácidos nucléicos, essenciais ao ciclo evolutivo viral. Então, a partir dos nucleisídeos naturais foram feitas modificações à unidade osídica, alterando o heterociclo de maneira a excluir os centros estereogênicos, promovendo uma simplificação molecular, permitindo, assim, a descoberta do aciclovir e outros antivirais como o fanciclovir e indinavir (BARREIRO, FRAGA; 2008).

Não somente o captopril e o aciclovir são fármacos resultantes de estudos de modelagem molecular, são inúmeros exemplos como a cimetidina e misoprostol (fármacos antiúlceras), propranolol (anti-hipertensivo β bloqueador), haloperidol (neuroléptico) e outros (BARREIRO, FRAGA; 2008).

Em nosso trabalho, a modelagem molecular será aplicada para estudos em classes de compostos químicos isolados do extrato ativo de *X. cavanillesii*,

com o objetivo de propor um mecanismo de ação para esta classe de compostos.

5. Objetivos

5.1. Objetivo geral:

- Avaliar a atividade biológica e investigar a composição química de *Xanthium cavanillesii*.

5.2. Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade biológica de extratos *X. cavanillesii* contra *Artemia salina*;
- Avaliar a atividade biológica de *X. cavanillesii* contra cepas de *P. falciparum*;
- Fracionar o (s) extrato (s) ativo (s) de *X. cavanillesii*;
- Purificar e caracterizar o (s) composto (s) químico (s) presente (s) no (s) extrato (s) bioativo (s) de *X. cavanillesii*;
- Avaliar por modelagem molecular a atividade antimalárica da (s) classe (s) de composto (s) químico (s) encontrado (s)

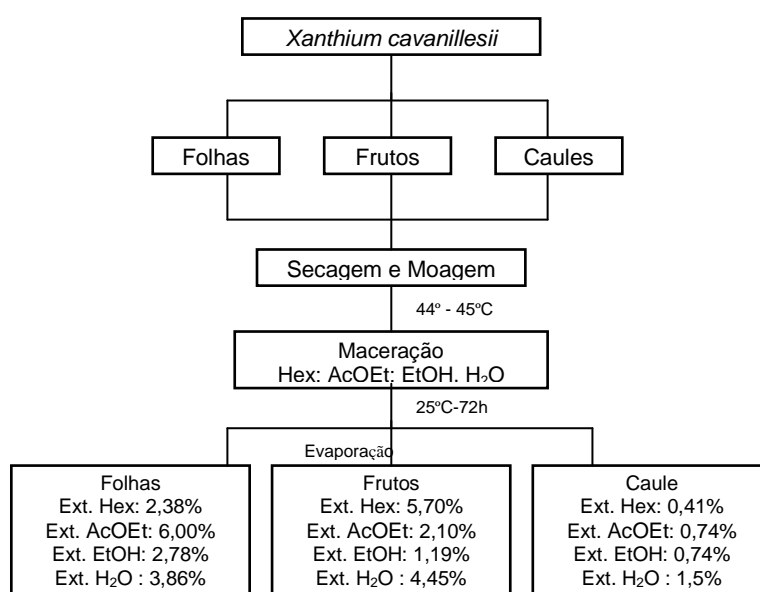
6. Materiais e métodos

6.1 Obtenção do material vegetal

Xanthium cavanillesii foi coletado no município de São Lourenço do Sul/RS, Brasil em abril de 2009. Procurou-se coletar a planta na fase de floração e maturação fisiológica dos frutos, que no Rio Grande do Sul ocorre somente no outono, devido às necessidades de luz do vegetal. A identificação foi feita no Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) e uma exsicata do material foi depositada no herbário desta Universidade sob o número de registro HUEFS 139439.

6.2 Obtenção dos extratos

O *X. cavanillesii* foi separado em folhas, caules e frutos e, em seguida, foram secos em estufa com ventilação forçada a 45-55 °C por 72 h e, posteriormente, moídos em macromoinho de facas (Solab[®]). As partes pulverizadas, 2,9 Kg de cada parte da planta, foram submetidos a maceração por um período de 72 horas, com os seguintes solventes hexano, acetato de etila, etanol e água. Após filtração, os solventes foram evaporados utilizando-se rotaevaporador para fornecer os respectivos extratos. O procedimento geral para a obtenção dos extratos de *X. cavanillesii* está descrito na fluxograma 1.



Fluxograma 1. Procedimento experimental empregado no preparo dos extratos de *X. cavanillesii*

6.3 Atividade biológica

6.3.1 Ensaio de toxicidade frente *Artemia salina* L.

O bioensaio foi desenvolvido adaptando-se a metodologia descrita por Meyer et al. (1982), na qual os cistos liofilizados de *Artemia salina* foram colocados para eclodir em água do mar artificial (solução de NaCl a 3,8%) e deixados em temperatura ambiente por 48 horas. Para o preparo da água marinha, o sal marinho apropriado foi dissolvido em água destilada, mantendo-se o pH entre 8 e 9. Para eclosão dos microcrustáceos, os cistos liofilizados foram colocados em um recipiente contendo divisória, de modo que apenas um dos lados ficasse iluminado para permitir, por fototropismo, a migração das larvas. O sistema montado foi mantido à temperatura ambiente, sob contínua aeração e iluminação artificial (lâmpada de 40 W), durante 48 horas.

Os extratos hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso obtidos das folhas, frutos e caules foram testados nas concentrações de 100; 250; 500; 750; 1000 ppm.

Os extratos brutos foram pesados (50 mg), adicionou-se 1 mL de DMSO (dimetilsufóxido) (1% do volume final, v/v) para facilitar a dissolução do extrato, a seguir adicionou-se água do mar sintética até completar volume de 20 mL de água marinha artificial. Desta solução dos extratos tomaram-se alíquotas de modo a se obter as concentrações a serem testadas, como mostra a tabela 1

Tabela 1: Determinação das concentrações dos extratos

Concentração (ppm)	Solução estoque (mL)	Solução Salina
100	0,2	4,8
250	0,5	4,5
500	1,0	4,0
750	1,5	3,5
1000	2,0	3,0

Após o preparo das diferentes concentrações, adicionou-se 10 larvas de *Artemia salina* em cada um dos tubos de ensaio, juntamente com o extrato e deixou-se incubar a 25 °C por 24 h, sob iluminação artificial constante.

O resultado foi obtido contando-se o número de larvas mortas em cada tubo, por meio de verificação visual. O ensaio foi realizado em quintuplicata. Como controle negativo utilizou-se 1% de DMSO em 5 mL de água do mar artificial.

Os dados obtidos foram tratados estatisticamente, utilizando o fator de correção em relação às mortes observadas no teste controle (Fórmula de Abbot) e calculando a DL₅₀. Para este cálculo foi utilizado, o *software* SPSS For Windows[®], método Probitos. Os extratos foram considerados ativos quando CL₅₀ < 1000 ppm (MEYER et al., 1982).

6.3.2 Teste antimalárico *in vitro*

O teste *in vitro* para atividade antimalárica foi realizado no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI), no Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz/Ba, sob a supervisão da Dr^a Milena Botelho.

Os extratos brutos liofilizados do *X. cavanillesii* foram testados para atividade antimalárica usando cepa W₂ do *P. falciparum*, a qual é sensível a mefloquina e resistente à cloroquina. Os parasitos foram cultivados em eritrócitos humanos (sangue grupo O⁺), meio de cultura RPMI com hipoxantina e suplemento de 10% de plasma humano, adicionando-se mistura de gases [CO₂ (5%), O₂ (5%), N₂ (qsp 100%)] de forma a mimetizar o sangue periférico humano. As cepas foram cultivadas até atingirem uma parasitemia de 1 a 2% e 2,5 % de hematócrito (SÁ et al., 2009).

O extratos etanólico e aquoso, liofilizados, (100 mg) foram solubilizados em 1% de DMSO. Tomou-se uma alíquota de 10 µL do extrato diluído em DMSO, que foi adicionada em 490 µL de meio de cultura RPMI sem hipoxantina, obtendo-se, assim, uma solução 200 µg/mL. A esta solução de concentração 200 µg/mL adicionou-se 100 µL do parasito de modo que obteve-se uma solução de concentração final 100 µg/mL, correspondendo a

concentração inicial do extrato a ser testado. As diluições foram feitas automaticamente em placas de cultura contendo 96 poços.

A placa contendo as cepas de *P. falciparum* tratadas com os extratos foi incubada em estufa a 24°C por um período de 24 hs. Após este período os poços foram marcados com $^3\text{[H]}$ – hipoxantina (20 $\mu\text{Ci/mL}$) por poço, a qual é usada como marcador para avaliação da incorporação da radiação β (SÁ et al., 2009).

Com objetivo de lisar as hemácias, a placa foi submetida à congelamento e após congelamento, as placas ficaram prontas para a etapa de contagem de cepas viáveis. A coleta das hemácias foi feita em coletor de células, no qual as hemácias infectadas pelos *P. falciparum* foram coletadas em placas com filtro de fibra de vidro, também com 96 poços. Os extratos foram descartados.

As hemácias infectadas coletadas foram marcadas com líquido cintilador (50 μL) por poço. A placa foi deixada à temperatura ambiente por 24 h, período necessário para fazer a leitura dos poços marcados.

No aparelho cintilado, a leitura foi feita automaticamente. Quantitativamente indicada pela emissão da fluorescência que ocorre pela interação entre a $^3\text{[H]}$ – hipoxantina com a radiação β emitida pelo aparelho cintilador. A contagem das cepas viáveis foi avaliada pela comparação da emissão de fluorescência pela $^3\text{[H]}$ – hipoxantina de cada poço (SÁ et al., 2009). Todos os teste foram realizados em triplicata.

Os poços que não emitiram fluorescência indicaram o extrato ativo contra *P. falciparum*, sendo este submetido a estudos da concentração inibitória mínima (IC_{50}).

O extrato mais ativo foi submetido ao teste de IC_{50} que foram realizados utilizando-se a Metodologia do Teste Antimalárico *in vitro*, variado-se somente a concentração inicial que no teste *in vitro* é 100 $\mu\text{g/mL}$. No teste de IC_{50} as cepas de *P. falciparum* foram submetidas às concentrações de 100; 33,33; 11,11; 3,70; 1,234 $\mu\text{g/mL}$ (SÁ et al., 2009), sendo também realizado em triplicata.

6.4 Fracionamento do extrato etanólico dos frutos de *X. cavanillesii*

O processo de fracionamento do extrato etanólico foi feito em coluna aberta. Utilizou-se como fase estacionária sílica gel 200-400 mesh (60Å) e sistema de eluente na ordem crescente de polaridade: Hex, AcOEt, EtOH e H₂O. Este procedimento resultou em 15 frações, sendo que a fração 10 forneceu um precipitado (XC 10).

Nos procedimentos de cromatografia em camada delgada (CCD) comparativas foram utilizadas cromatofolhas de alumínio pré-preparadas de sílica 60 F₂₅₄ de procedência Merck®.

Os métodos de revelação utilizados nas CCD consistiram na exposição das placas à radiação, empregando-se gabinete apropriado, lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda 254 e 365 nm. A câmara de luz ultravioleta ($\lambda = 365$ nm) e em solução reveladora de ácido sulfúrico (10%) em metanol, com posterior aquecimento.

6.4.1 Purificação dos constituintes do extrato etanólico dos frutos de *X. cavanillesii*

As 16 frações resultantes da CC do extrato etanólico dos frutos de *X. cavanillesii* foram submetidas a CCD para comparação do perfil cromatográfico. As frações 10 (sobrenadante); 11; 12, 13-15 por apresentarem perfis semelhantes foram purificadas por cromatografia de filtração em coluna por permeação em Sephapex LH-20. Utilizou-se como eluente MeOH. As frações obtidas foram reunidas conforme mostram a tabela 2.

Tabela 2: Frações 10 a 15 purificadas em Sephapex LH-20

Fração	Subfrações resultantes	Subfrações Unidas	Massa (g)	Análises
10 (sobrenadante)	13 frações	Frs 02-03	0,20	-
		Frs 04-05	0,40	-
		Frs 06-07 (X1)	0,35	CLAE-DAD
		Frs 08-09	1,30	-
		Frs 10-11 (X2)	1,20	CLAE-DAD, RMN ¹ H, IV
		Frs 12-13	1,25	-
11	21 frações	Fr 01		-
		Frs 02-04	0,04	-
		Fr 05	0,19	-
		Fr 06	0,44	-
		Frs 07-08	0,65	-
		Fr 09	0,60	-
		Fr 10		-
		Fr-11		-
		Fr 12-13		-
		Fr 14 (X3)	0,12	-
		Fr 15	0,09	-
		Fr 16	0,50	-
		Fr 17	0,05	-
		Fr 18 (X4)	0,05	CLAE-DAD
		Fr 19 (X5) (precipitado)		CLAE-DAD, RMN ¹ H, IV
12	11 frações	Fr 01-03	0,03	
		Fr 04-05	0,08	
		Fr 06	0,29	
		Fr 07 (X6)	0,63	CLAE-DAD, RMN ¹ H, IV
		Fr 08	0,03	
		Fr 09 (X7)	0,49	CLAE-DAD, RMN ¹ H, IV
		Frs 10-11	1,89	
13-15	Precipitado 14 Frações	Frs 02-04	0,12	-
		Fr 05	0,04	
		Frs 06-08	0,01	-
		Frs 09	0,08	-
		Frs 10-13 (X8)	2,20	CLAE-DAD
		Fr 14		-
	Sobrenadante 08 Frações	Frs 02-03	0,25	
		Frs 04-06	1,11	-
		Frs 07 -08	2,71	-

6.5 Análise por CLAE-DAD das frações purificadas do extrato bioativo

As análises de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), foram realizadas no Laboratório de Central de Farmácia, Departamento de Saúde da UEFS

Para a separação e análise qualitativa dos compostos fenólicos por CLAE, utilizou-se o equipamento HPLC EZCHROM ELITE e bomba VRW HITACHI L-2130. A separação cromatográfica foi desenvolvida em coluna Purospher Star (RP8e (25x 4 mm, 5 mm ID) da Merck[®]. A otimização das condições de separação em sistema de gradiente foi obtida pela aplicação de uma fase móvel MeOH (A) e H₂O/H₃PO₄ 0,1% (B) na condição inicial 0 minutos 10%(A) e 90% (B); 10 minutos de 20% (A) e 80% (B), 30 minutos 40% (A) e 60% (B), 60 minutos 40% (A) e 60% (B). A temperatura do forno da coluna foi mantida constante a 25° C, fluxo de 0,8 mL/min., utilizando-se um volume de injeção de 10 µL.

A leitura do detector de arranjo de diodo (DAD) foi realizada na faixa de $\lambda=220$ a 400 nm. A identificação foi conduzida pela comparação dos tempos de retenção e dos gráficos de absorbância no UV correspondente com padrões de ACQ (ácido clorogênico), ácido caféico e ácido ferúlico.

6.6 Análise espectroscópicas

6.6.1 Espectrometria de infravermelho

As análises de infravermelho (IV) foram realizadas no Laboratório de Infravermelho, no Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF).

Os espectros de IV foram registrados em Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (IV-FT), da marca Bomem[®], modelo ABB[®], na faixa de leitura 3500-1000 cm⁻¹.

6.6.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN)

As análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizadas no Laboratório de RMN, no Instituto de Química da Universidade Federal Fluminense (UFF).

As subfrações X2, X5 e a fração XC10 foram solubilizada em DMSO- δ_6 . Subfrações X6 e X7, em MeOH- δ_4 . Foram utilizados 0,6 mL de ambos solventes e transferidas para tubos de RMN (5mm \varnothing interno). Os espectros de RMN foram obtidos em equipamento Varian[®] VnmrJ 2.2 C operando em frequência de 500 MHz para ^1H RMN e 125 para ^{13}C RMN. O tetrametil-silano (TMS) foi usado como padrão interno. Os espectros foram processados utilizando-se o software MestRe-C (versão 4.7.0.0).

6.7 Modelagem molecular

O depósito da seqüência primária do alvo molecular PfATPase6 no projeto genoma do parasita da malária (<http://plasmodb.org/plasmo/>) nos motivou a construir um modelo por modelagem comparativa. O modelo foi construído usando SwissPdb Viewer[®] 3.7 (GUEx, PEITSCH; 1997) seguindo protocolo padrão: i) fornecimento da seqüência da PfATPase6 para o programa; ii) busca de modelos no Protein Data Bank[®]; iii) o alinhamento estrutural entre os modelos e os moldes.

Os cálculos computacionais de modelagem molecular envolvem a minimização de cada estrutura, ou seja, a determinação da estrutura tridimensional dos compostos a partir do desenho bidimensional. A minimização energética das estruturas químicas dos compostos sintetizados é um pré-requisito para qualquer análise estrutural, pois cada técnica proporciona a adequação espacial e termodinâmica de átomos e moléculas. Assim, o modelo resultante foi refinado pelo AMBER 10[®] (CASE et al., 2008) utilizando o campo de força de ff03 (LEE, DUAN; 2004), usando modelo de solvente implícito por 500 ciclos *steep descent* seguido de mais 500 ciclos de gradiente conjugado. A otimização da estrutura foi submetida a simulação dinâmica molecular para o equilíbrio, aquecido de 0° K a 100° K durante 200 ps. O integrador de

velocidade Verlet foi utilizado com uma etapa de integração de 2 fs. Finalmente, a estrutura de equilíbrio foi otimizada 500 ciclos *steep descent* seguido de mais 500 ciclos de gradiente conjugado. O modelo refinado foi avaliado por inspeção visual do sítio ativo, valor do quadrado do desvio padrão das coordenadas atômicas entre molde e modelo (RMSD), e através do gráfico de Ramachandran gerada pelo PROCHECK[®] (LASKOWSKI et al., 1993). Após a etapa de homologia, a metodologia de ancoragem foi realizada utilizando-se o programa AutoDock Vina[®] (TROTT, OLSON; 2009). As estruturas isoladas foram encaixadas contra o sítio ativo da PfATPase6 gerando a energia de ligação correspondente.

7. Resultados e discussão

7.1 Avaliação da atividade biológica dos extratos

7.1.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* L

Os produtos naturais são constantemente referenciados como fonte de compostos bioativos. Atualmente, existe a necessidade de novas investigações científicas que busquem novos compostos com atividade antimalárica, devido à resistência que o *P. falciparum* vem adquirindo, inclusive contra artemisinina, fármaco mais potente encontrado no mercado farmacêutico (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008).

Os laboratórios de Fitoquímica têm usado este teste no intuito de biomonitor e selecionar extratos vegetais para a busca de compostos ativos (NICK, RALI; 1995; SIQUEIRA et al., 2001; RUIZ et al., 2005; LHULLIER, HORTA, FALKENBERG; 2006; SILVA et al., 2007). A avaliação da bioatividade de extratos de plantas, medida pela citotoxicidade frente *Artemia salina* L., pode fornecer informações valiosas ao trabalho de químicos de produtos naturais e farmacólogos, indicando fontes vegetais com importantes atividades biológicas.

Neste contexto, a utilização de bioensaios para o monitoramento da bioatividade de extratos, frações e compostos isolados de plantas vem crescendo consideravelmente nos laboratórios de pesquisa em nível mundial como método alternativo para o uso de animais de laboratório. Adicionalmente, a simplicidade do bioensaio favorece sua utilização, uma vez que consiste em método simples, rápido e de baixo custo para determinação de citotoxicidade (SIQUEIRA et al. 1998, 2001; PAYROL et al., 2001).

Artemia salina L. é um microcrustáceo de água salgada utilizado habitualmente como alimento vivo para peixes. É amplamente conhecido como indicador de citotoxicidade em um bioensaio que utiliza a CL₅₀ (concentração letal média) como parâmetro de avaliação da atividade biológica.

Diversos trabalhos correlacionam a citotoxicidade sobre *Artemia salina* L. com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida,

tripanossomicida, entre outras (SIQUEIRA et al., 1998 e 2001; PAYROL et al., 2000, 2001; KANEGUSUKU et al., 2002; PRETTO, 2005).

Neste trabalho, como alternativa para delineamento do estudo da atividade antimalárica dos extratos de *X. cavanillesii*, recorreu-se o ensaio de biomonitoramento de citotoxicidade dos extratos brutos frente à *Artemia salina* como ferramenta para a seleção dos extratos a serem utilizados no ensaio *in vitro* de atividade antimalárica contra cepas de *P. falciparum*.

Devido à diferente constituição química das partes do *X. cavanillesii*, a planta foi segmentada em frutos, folhas e caules. Destas partes foram preparados por maceração extratos de polaridade crescente, hexânico, acetato de etila, etanólico e aquoso, respectivamente. Extratos estes que foram utilizados neste ensaio.

No biomonitoramento utilizando-se a *Artemia salina* foram considerados inativos os extratos com $CL_{50} > 1000$ ppm. Enquanto os extratos que apresentaram $CL_{50} < 1000$ ppm/mL foram considerados ativos, sendo os mesmos submetidos ao ensaio antimalárico. Os extratos que responderam positivamente ao ensaio foram os extratos etanólico e aquoso dos frutos. E dos caules, os extratos hexânico e acetato de etila e das folhas, os extratos hexânico e etanólico, os resultados estão resumidos no Quadro 5.

Quadro 5: Ensaio de citotoxicidade para *A. salina* dos extratos de *X. cavanillesii*

Parte Utilizada	Extrato	CL ₅₀ (ppm/mL)
Frutos	Hexânico	>1000 ppm
	Acetato de etila	>1000 ppm
	Etanólico	<1000 ppm
	Aquoso	<1000 ppm
Caules	Hexânico	<1000 ppm
	Acetato de etila	<1000 ppm
	Etanólico	>1000 ppm
	Aquoso	>1000 ppm
Folhas	Hexânico	<1000 ppm
	Acetato de etila	>1000 ppm
	Etanólico	<1000 ppm
	Aquoso	>1000 ppm

Dos extratos ativos foram determinadas a CL_{50} (figura 10) (Quadro 6) nos frutos, a CL_{50} dos extratos etanólico e aquoso foram 310,16 ppm/mL e 358,43 ppm/mL, respectivamente. A CL_{50} dos extratos acetato de etila e

hexânico dos caules, foram 227,90 ppm/mL e 240,84 ppm/mL. O extrato etanólico das folhas a CL₅₀ foi ativo na concentração 76,95 ppm/mL, enquanto no extrato hexânico da mesma parte do vegetal, a CL₅₀ 709,00 ppm/mL (Quadro 6). Então, percebe-se que toda a planta tem uma citotoxicidade intrínseca e que os extratos que apresentaram uma maior atividade frente aos microcrustáceos foram os extratos etanólico dos frutos e das folhas, o extrato hexânico.

Quadro 6: CL₅₀ dos extratos de *X. cavanillesii* que apresentaram atividade frente *A. salina*

	CL ₅₀ (ppm/mL)	Intervalo de Confiança (95%)*	p**
Fruto (Ext. Etanólico)	310,16	294,65-325,66	0,963
Fruto (Ext. Aquoso)	358,43	376,35-340,51	1,000
Caule (Ext. Hexânico)	240,84	228,80-252,39	0,937
Caule (Ext. Acetato de etila)	227,90	210,50-239,66	0,995
Folha (Ext. Hexânico)	709,00	673,55-743,45	0,981
Folha (Ext. Etanólico)	76,95	80-79-73,11	0,913

* O intervalo de confiança 95% significa que há 95% de probabilidade de que o intervalo calculado contenha o verdadeiro valor do parâmetro estudado

** p= 0,8-1 (forte correlação); p= 0,5-0,8 (correlação moderada); p= 0,2-0,5 (correlação fraca); p= 0 -0,2 (correlação insignificante)

Ainda analisando a CL₅₀ dos extratos bioativos foi estabelecida a correlação (p) entre a citotoxicidade e CL₅₀ (Quadro 6), constatou-se forte correlação entre a atividade dos extratos frente a *A. salina* e suas CL₅₀, visto que a correlação foi entre 0,8-1,0, dados que fortalecem a necessidade de investigação da atividade antimalárica dos extratos ativos.

Contudo, resalta-se que, neste estudo somente os extratos etanólico e aquoso dos frutos foram testados para atividade antimalárica *in vitro* até o presente momento. Os extratos dos caule e folhas estão em fase de finalização para ensaio antimalárico.

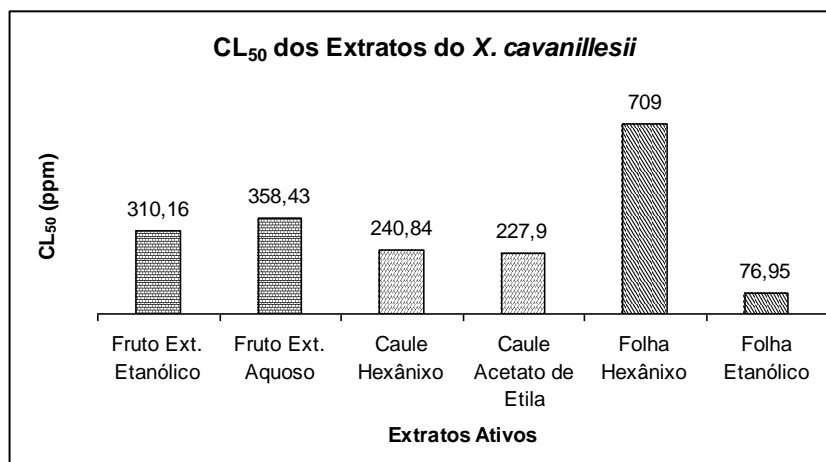


Figura 10. CL₅₀ dos extratos de *X. cavanillesii* que se apresentaram mais ativos frente *A. salina*

7.1.2 Avaliação da atividade antimalárica

O estudo da atividade antimalárica do *X. cavanillesii* deu-se devido à necessidade de comprovação dos relatos do uso na medicina tradicional de *Xanthium* spp. como planta com atividade antimalárica (NADKARNI, 1954; JOSHI, 1997, DICIONÁRIO DE LAS CIENCIAS AGROPECUARIA, 2006; CERDEIRAS et al., 2007). E de estudos de modelagem molecular, no qual cálculos teóricos de modelagem molecular realizados com um composto presente no gênero *Xanthium* apresentaram atividade antimalárica teórica similar à artemisinina (LEITE et al., 2005).

Assim, os extratos etanólico e aquoso dos frutos de *X. cavanillesii* foram os utilizados no desenvolvimento do ensaio de atividade antimalárica *in vitro*. Observa-se que frente à *Artemia salina* L. o extrato etanólico foi mais ativo (CL₅₀ = 310,1 ppm/mL), do que o aquoso (CL₅₀ = 358,4 ppm/mL).

Dado confirmado no ensaio de atividade antimalárica, no qual o extrato etanólico apresentou uma forte atividade antimalárica, matando 92,41% das cepas, enquanto o extrato aquoso apresentou atividade, inferior, matando apenas 2,3% dos *P. falciparum* (Figuras 11 e 12).

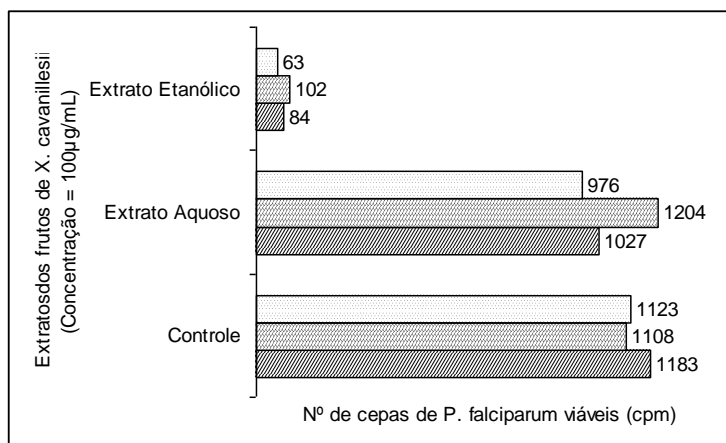


Figura 11. Nº de cepas de *P. falciparum* que permaneceram viáveis após tratamento com extrato etanólico, aquoso dos frutos de *X. cavanillesii* em comparação com controle, que não foi submetido a tratamento.

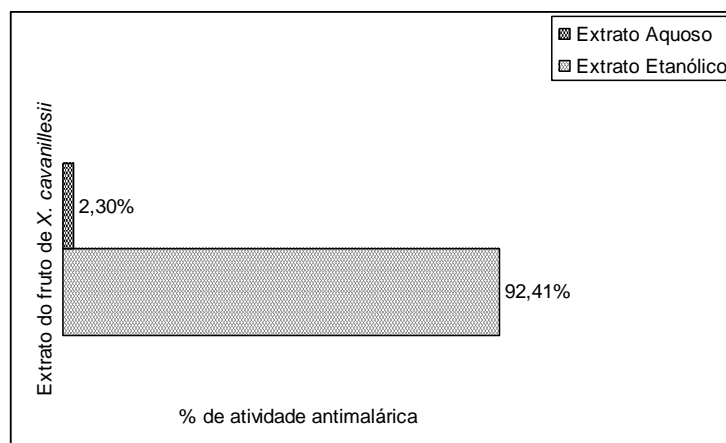


Figura 12. Porcentagem de cepas de *P. falciparum* que permaneceram viáveis após tratamento com diferentes concentrações do extrato etanólico, quando comparado com cepas que não receberam com extratos do *X. cavanillesii*.

Como o extrato etanólico apresentou atividade mais significativa, realizou-se o teste de IC_{50} , com diferentes concentrações do extrato, mostrando que, com o decréscimo das concentrações do extrato não há atividade contra as cepas de *P. falciparum*. Cálculos de IC_{50} demonstraram que a concentração 65,85 µg/mL é responsável pela atividade antimalárica do extrato etanólico dos frutos contra cepas W2 de *P. falciparum* (sensível a mefloquina e resistente à cloroquina).

Os resultados descritos aqui levam a postular que o extrato etanólico dos frutos de *X. cavanillesii* contém composto(s) ativo(s) contra malária.

A literatura descreve que a atividade de compostos fenólicos (3 éster ácido cafeico, ACQ, éster metil ácido 3-O-caffeiolquínico e ácido 5-O-caffeiolsiquímico) apresentam atividade contra cepas de *P. falciparum*. Estes

compostos foram testados contra cepas K1 de *P. falciparum*, resistentes a pirimetamina e estipulou-se a $IC_{50} \leq 50 \mu\text{g/mL}$, os resultados não foram satisfatórios, neste estudo, para atividade antimalárica dos ácidos fenólicos, isto porque os compostos 3 éster ácido cafeíco, ACQ, ácido 5-O-cafeiolsiquímico foram ativos com uma $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ e a estér metil ácido 3-O-cafeiolquínico foi ativo em $IC_{50} = 42,8 \mu\text{g/mL}$. Neste estudo, o fármaco de referência foi a artemisinina, o qual, como era de se esperar foi fortemente ativo ($IC_{50} = 0,0022 \mu\text{g/mL}$) (KIRMIZIBEKMEZ et al., 2004).

Contudo, estes resultados não invalidam a atividade dos ácidos fenólicos contra cepas de *P. falciparum*. Estudos com extratos brutos de diversas espécies vegetais, inclusive o *X. strumarium*. Algumas espécies foram testadas contra cepas W2 de *Plasmodium*, os resultados mostram atividade antimalárica em $IC_{50} \geq 100 \mu\text{g/mL}$ (SAXENA et al., 2003), o que valida os resultados apresentados neste estudo. Adicionalmente, estudos reportam que o potencial biológico dos compostos antimaláricos não está mais tão somente limitado presença dos endoperóxidos antimaláricos presente na artemisinina (PINEL et al., 2007).

Estudos anteriores em espécies de *Xanthium* mostraram que os ácidos fenólicos são encontrados com particular abundância nos frutos e provaram ser constituintes bioativos (HAN et al., 2007), aos quais são atribuídas diversas propriedades farmacológicas podendo ser usada como estimulante estomacal, imuno estimulante, antioxidante e ativos contra bactérias e fungos (JUNG et al., 2005).

Assim, no intuito de conhecer a química do extrato ativo contra malária, o mesmo foi submetido à purificação utilizando métodos cromatográficos.

7.2 Fracionamento do extrato bioativo

O extrato etanólico dos frutos de *X. cavanillesii* foi filtrado por CC (SiO_2), resultando em 15 frações.

As frações iniciais (01 a 09) apresentaram um aspecto visual verde-escuro oleoso, o qual em CCD revelou-se fluorescência alaranjada sob

radiação UV (365 nm), típico de clorofila e seus derivados. Estas frações foram reunidas.

Durante a filtração do extrato, sob o sistema eluente MeOH:H₂O (50:50), na fração 10, obteve-se um precipitado amarelado codificado como XC10.

As frações resultantes 10 (sobrenadante) a 15 foram analisadas por CCD. O sobrenadante da fração 10 e frações 11 e 12 apresentaram perfis cromatográficos distintos, enquanto as frações 13 a 15, por apresentarem o mesmo perfil cromatográfico, foram reunidas. Estas frações foram submetidas à purificação por Sephadex LH20 com eluição em MeOH.

7.3 Purificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD

O sobrenadante da fração 10 e as frações 11 a 15 foram submetidas à purificação, separadamente, por permeação em Sephadex LH20 e eluídas com MeOH.

Na purificação da fração 11, obteve-se também um precipitado (X5).

As subfrações foram submetidas à CCD, reunidas ou codificadas conforme descrito na tabela 2. Estas subfrações indicaram a presença de uma mistura de ácidos fenólicos, comumente biossintetizados pela espécie, às quais foram submetidas a análises CLAE-DAD e espectroscópicas (IV, RMN ¹H e ¹³C) com o objetivo de caracterizar suas estruturas químicas.

7.4 Análise dos constituintes químicos do extrato bioativo

7.4.1 Caracterização dos ácidos fenólicos por CLAE-DAD

As subfrações purificadas do extrato etanólico dos frutos, que foram analisadas por CLAE-DAD, apresentaram espectros de UV característicos de ácidos fenólicos, como ácido clorogênico e seus derivados (ácido 1,3,5-tri-O-cafeoilquínico; ácido 1,5-di-O-tricafeoilquínico; ácido 1-O-cafeoilquínico; ácido 5-O-cafeoilquínico; ácido 4-O-cafeoilquínico; ácido 1,3-O-cafeoilquínico; ácido 1,5-O-cafeoilquínico; ácido 4,5-O-cafeoilquínico; ácido 1,3,5-O-cafeoilquínico), ácido 7-hidroximetil-8, 8-dimetil-4,8-diidrobenzo [1,4] tiazino-3,5-dione, 3-O-

cafeoil quinato potássio, ácido cafeíco e cinarina. Estes compostos já foram descritos em *Xanthium* spp. (MA et al., 1998; HAN et al., 2007; HAN et al. 2009). Em *X. cavanillesii*, no qual estudos fitoquímicos mostram presença de fenóis com posição *orto* e *meta* livre nas raízes, caules, folhas e frutos, fenóis com posição *para* livre nas folhas e frutos e, ainda, fenóis em geral nos frutos (MANFRON, 1997).

A análise tanto de fenóis simples quanto dos ácidos fenólicos pode ser realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia Gasosa (CG) e/ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A CLAE é o método de primeira escolha utilizando-se coluna de fase reversa (C₁₈), sistema de eluente hidroalcoólico e ácidos (fórmico, acético) para impedir a ionização (BRUNETON, 1991).

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos vegetais (SIMÕES et al., 2004). Por serem compostos aromáticos, apresentam intensa absorção na região do UV, são instáveis principalmente quando submetidos a altas temperaturas, em meios básicos e em valores extremos de pH (SIMÕES et al., 2004). Compostos são facilmente detectados por UV visto que apresentam grupos cromóforos: anel benzênico, hidroxila e/ou metoxila (SIMÕES et al., 2004).

Associando-se as informações da literatura, que reporta a presença de ácidos fenólicos em *Xanthium* spp. e CLAE-DAD mostraram a presença de ácidos fenólicos nas frações analisadas. Então, como forma de comprovação, comparou-se os cromatogramas (Tr) e espectros de UV (λ_{max}) de padrões isolados e devidamente identificados de ácido cafeíco (A), ácido ferúlico (B) e ácido clorogênico (ACQ) (C) (Figura 13).

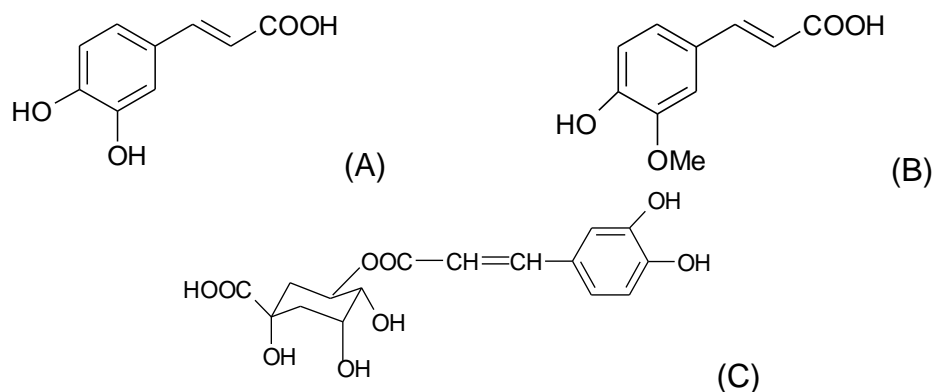


Figura 13. Estruturas dos padrões de ácidos hidroxicinâmicos analisados por CLAE-DAD. ácido caféico (ACQ) (A); ácido ferúlico (B); Ácido clorogênico (C).

As subfrações (tabela 6) analisadas por CLAE-DAD foram submetidas às mesmas condições cromatográficas em que foram analisadas os padrões dos ácidos hidroxicinâmicos. Os cromatogramas e espectros de UV do ácido caféico apresentaram $T_r = 26,0$ min e $\lambda_{max} = 235; 324$ nm (Figura 14), do ácido ACQ, $R_t = 35,0$ min e $\lambda_{max} = 232; 323$ nm (Figura 15) e do ácido ferúlico ($T_r = 37,3$ min e $\lambda_{max} = 235; 322$ nm) (Figura 16), os T_r e λ_{max} destes padrões foram utilizados como valores de referência na caracterização dos ácidos fenólicos presentes na frações avaliadas.

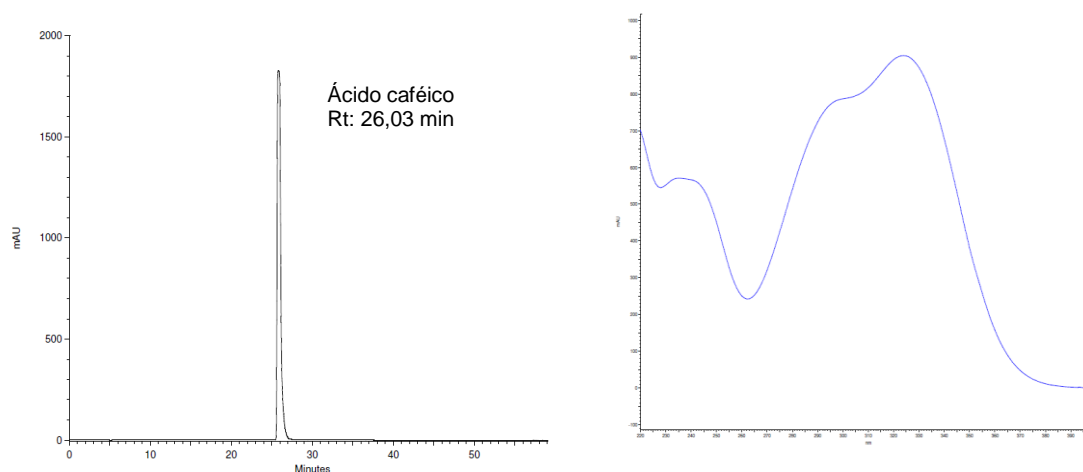


Figura 14. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (direita) e espectro de UV (esquerda) do ácido caféico usado como padrão

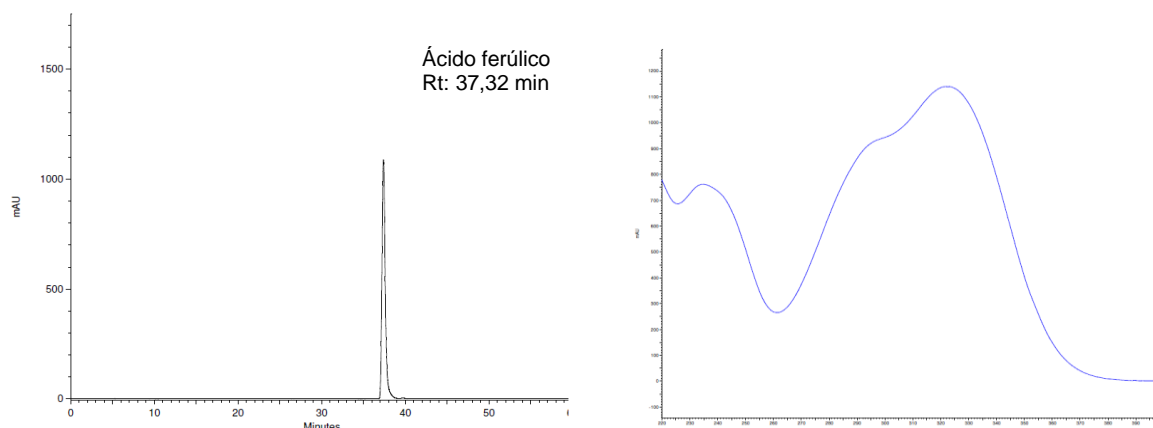


Figura 15. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (esquerda) e espectro de UV (direita) do ácido ferúlico usado como padrão

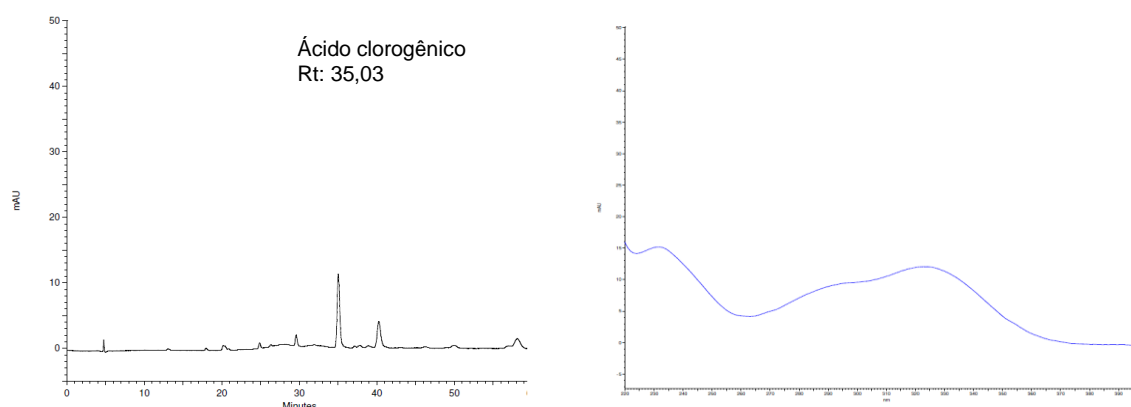


Figura 16. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (esquerda) e espectro de UV (direita) do ácido clorogênico usado como padrão

Como resultado, a análise de CLAE-DAD mostrou a presença de dois picos majoritários na subfração X1 (Figura 17), pico 1 (Rt: 45,4 min e $\lambda_{\max} = 237; 300, 327$ nm) e pico 2 (Tr: 49,4 min e $\lambda_{\max} = 240; 329$ nm) percebe-se claramente pelo espectro de UV a presença de ácido fenólico derivado do ácido cinâmico.

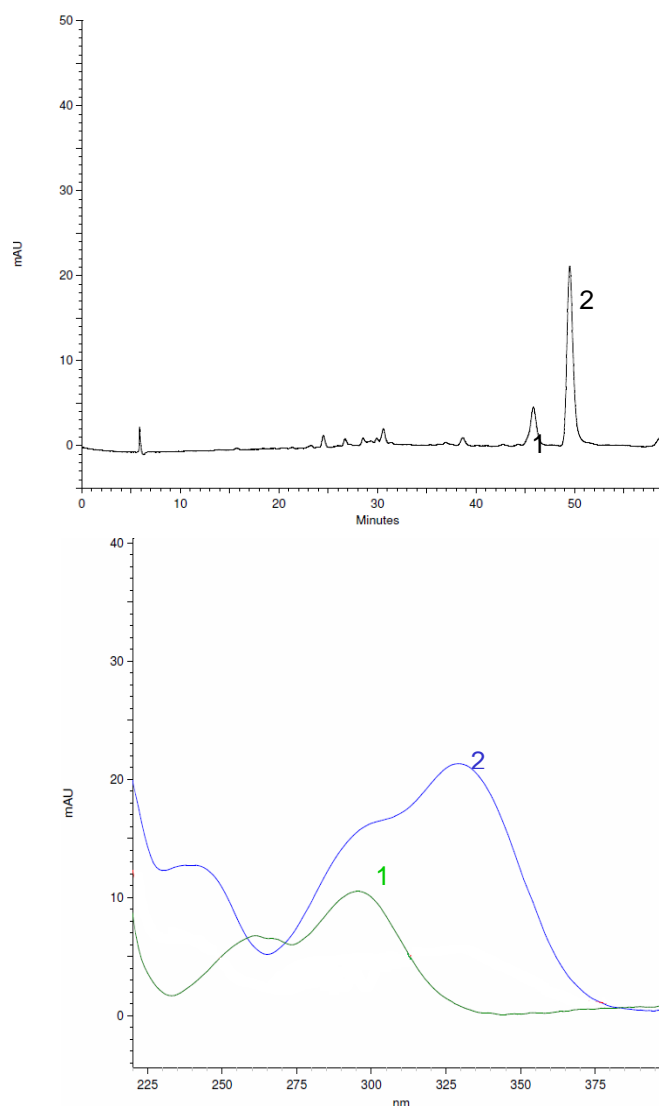


Figura 17. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e espectros de UV (abaixo) da subfração X1

A subfração X3 (Figura 18) também apresentou uma mistura de compostos fenólicos derivados de ácidos cinâmicos como pode ser observado pelos perfis do espectro de UV dos picos 3 (Tr: 23,0 e λ_{\max} = 244; 327 nm), 5 (Tr: 45,6 e λ_{\max} = 228 nm), 6 (Tr: 49,5 e λ_{\max} =242; 329 nm). Enquanto o pico 4 (Tr: 24,4 e λ_{\max} = 252; 343 nm) apresentou espectro de UV distinto dos demais espectros de UV dos ácidos fenólicos, contudo característicos de flavonóides (YAO et al., 2004) (Figura 19), que também tiveram sua presença mencionada anteriormente em *X. cavanillesii* (MANFRON, 1997).

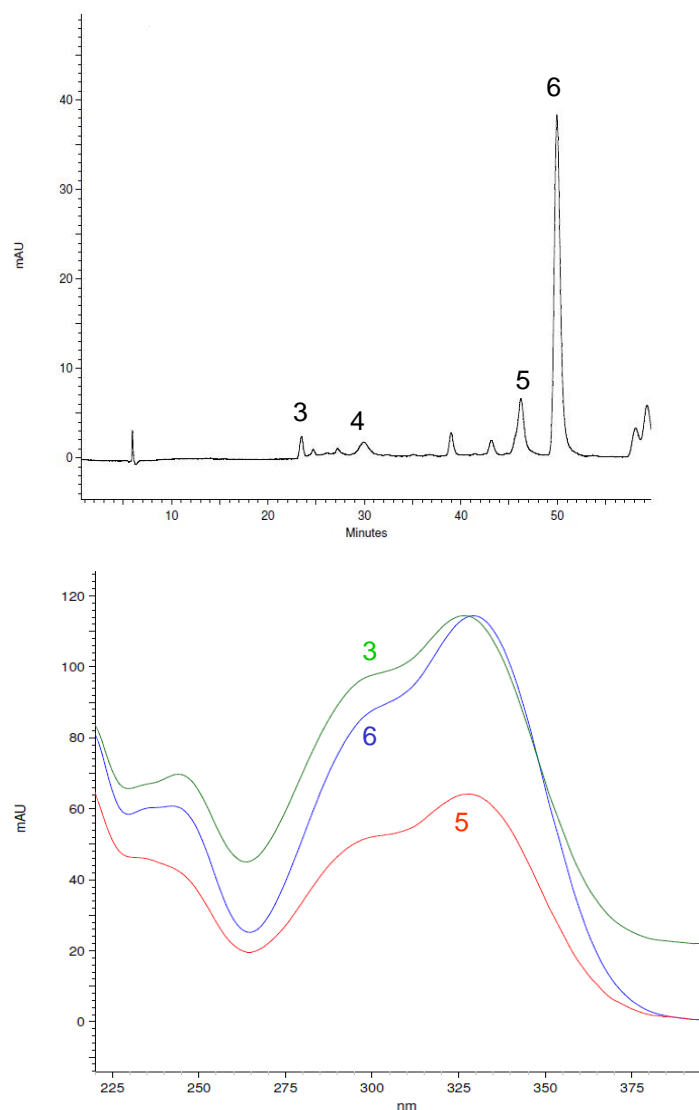


Figura 18. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e espectros de UV (abaixo) da subfração X3

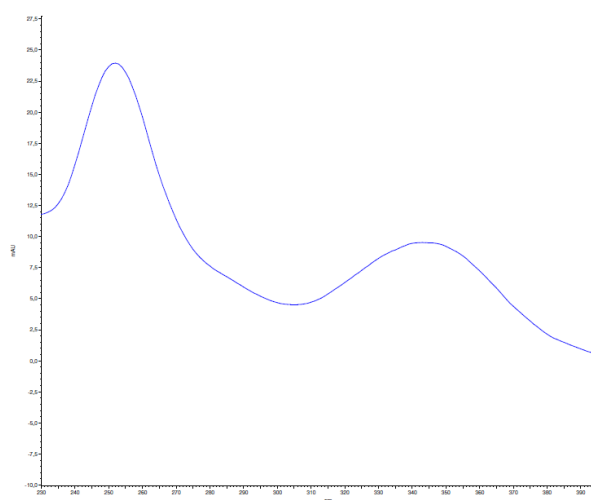


Figura 19. Espectro de UV obtido por CLAE-DAD do pico 4 da subfração X3

A subfração X4 mostrou, no cromatograma obtido por CLAE, sete picos com espectros de UV característicos de uma mistura de ácidos fenólicos com perfis semelhantes (Figura 20). Pico 7 (Tr: 23,3 min e λ_{\max} = 221; 247; 327 nm), 8 (Tr: 27,1 min e λ_{\max} = 300; 324 nm), 9 (Tr: 29,3 min e λ_{\max} = 329 nm), 10 (Tr: 38,9 min e λ_{\max} = 233; 327 nm), 11 (Tr: 43,1 min e λ_{\max} = 233; 325 nm), 12 (Tr: 46,0 min e λ_{\max} = 235; 328 nm), 13 (Tr: 49,9 min e λ_{\max} = 242; 329 nm). Todos esses picos com espectro de UV e λ_{\max} característicos de compostos fenólicos derivados do ácido cinâmico.

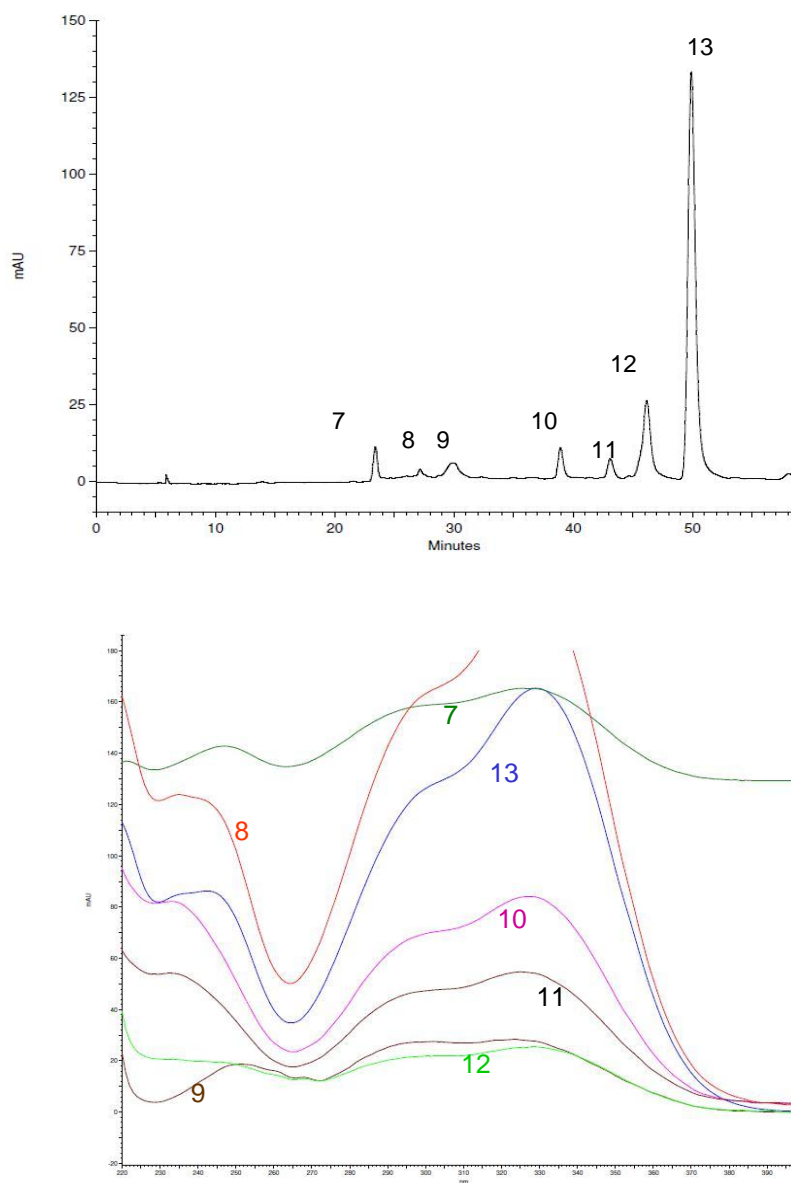


Figura 20. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e espectros de UV (abaixo) da subfração X4

Mais precisamente, acerca dos picos 1 ($\lambda_{\max} = 237; 300, 327 \text{ nm}$), subfração X1 e pico 7 ($\lambda_{\max} = 221; 247; 327 \text{ nm}$), subfração X4 pode-se inferir que são derivados do ACQ por comparação dos λ_{\max} dos espectro de UV com os λ_{\max} destes derivados descritos na literatura (WEISZ, KAMMERER, CARLE, 2009), que caracterizam derivados de ACQ com λ_{\max} bastantes similares como ácido 4-O-cafeoilquínico ($\lambda_{\max} = 237; 303, 326 \text{ nm}$), ácido 5-O-cafeoilquínico ($\lambda_{\max} = 242; 305, 326 \text{ nm}$), ácido 4,5-O-dicafeoilquínico ($\lambda_{\max} = 243; 303, 327 \text{ nm}$), os quais foram encontrados em extrato etanólico dos frutos do *Xanthium* ssp (HAN et al., 2009).

Nas subfrações X1 (pico 2), X3 (pico 6) e X4 (pico 13) observa-se a presença de um pico com dados comum às três subfrações Tr: 49,5 e $\lambda_{\max} = 242; 329 \text{ nm}$, nos quais sugere-se que possa ser um ácido derivado do ácido ferúlico, como ácido 5-O-ferulolquínico ($\lambda_{\max} = 243; 326 \text{ nm}$) (WEISZ, KAMMERER, CARLE, 2009).

Ao analisar as subfrações X2 (Figuras 21 e 22) e X5 (Figuras 23 e 24) observou-se a presença de dois picos majoritários em ambas subfrações, picos estes com Tr e espectros de UV compatíveis com os padrões de ácidos cafeíco e ferúlico utilizados neste estudo. A identificação dos referidos ácidos foi conduzida por compatibilidade dos Tr dos picos 14 e 15, com os Tr dos padrões de ácidos cafeíco e ferúlico, respectivamente. Adicionalmente, a similaridade de λ_{\max} os espectros UV da subfração X2, $\lambda_{\max} = 235; 324 \text{ nm}$ e $\lambda_{\max} = 234; 323 \text{ nm}$, o mesmo sendo observado na subfração X5, $\lambda_{\max} = 235; 324 \text{ nm}$ e $\lambda_{\max} = 234; 323 \text{ nm}$.

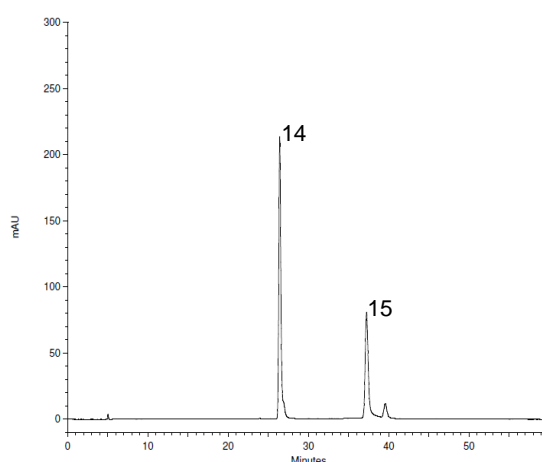


Figura 21: Cromatograma da subfração X2; ácido cafeíco (14) (Tr =

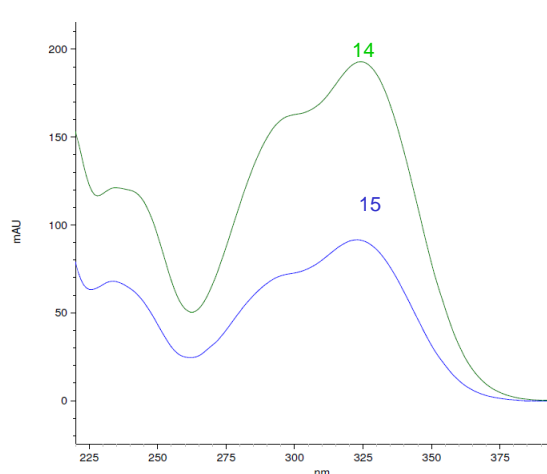


Figura 22: Espectros de UV da subfração X2; ácido cafeíco (14) (λ_{\max}

26,3 min.) e ácido ferúlico (15) ($T_r = 26,3$; $\lambda_{max} = 234$; 324 nm) e ácido ferúlico (15) (37,1 min.) ($\lambda_{max} = 234$; 323 nm)

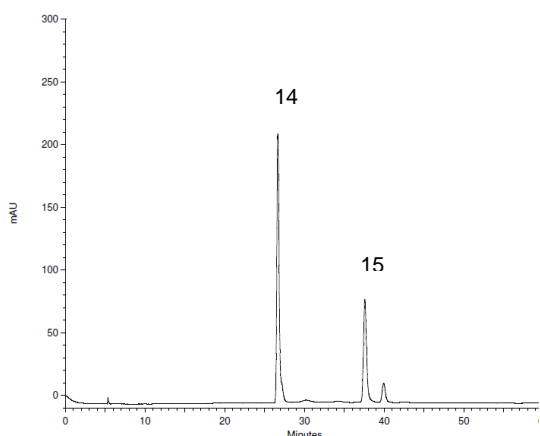


Figura 23: Cromatograma da subfração X5; ácido caféico (14) ($R_t = 26,7$ min.) e ácido ferúlico (15) ($R_t = 37,5$ min.)

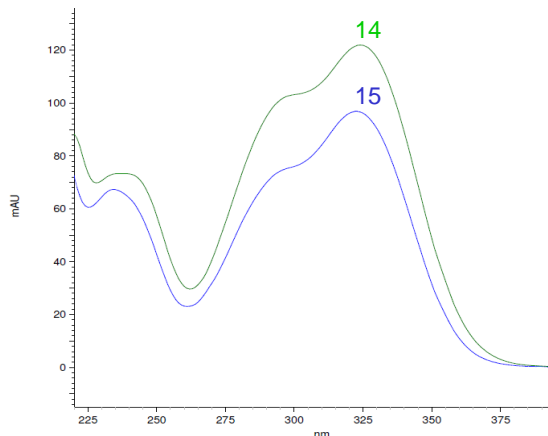


Figura 24: Espectros de UV da subfração X5; ácido caféico (14) ($\lambda_{max} = 235$; 324 nm) e ácido ferúlico (15) ($\lambda_{max} = 234$; 323 nm)

As subfrações X6 (figura 25 e 26) e X7 (figura 27 e 28) apresentaram perfis cromatográficos e espectrais semelhantes, mostrando mais uma vez a presença de ácidos fenólicos, mais precisamente o ácido caféico e um outro derivado dos ácidos cinâmicos. Na subfração X6 têm-se os picos 16 (T_r : 25,3 min e $\lambda_{max} = 234$; 323 nm) e 17 (T_r 32,2 min e $\lambda_{max} = 330$). Na subfração X7, observa-se também o pico 16 (T_r : 25,3 min e $\lambda_{max} = 234$; 323 nm) e pico 18 (T_r : 14,2 min e $\lambda_{max} = 323$ nm)

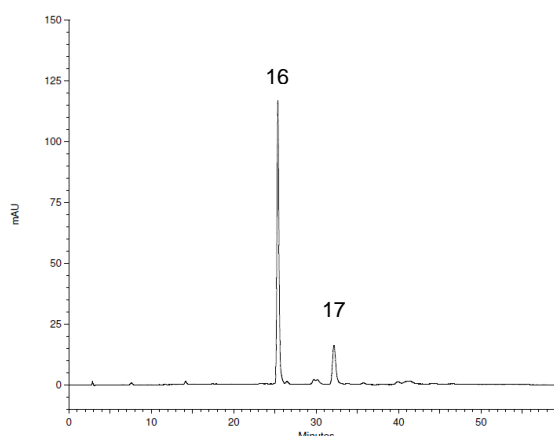


Figura 25: Cromatograma da subfração X6; ácido caféico (16) ($R_t = 25,3$ min.) e ácido fenólico (17) ($R_t = 32,2$ min.)

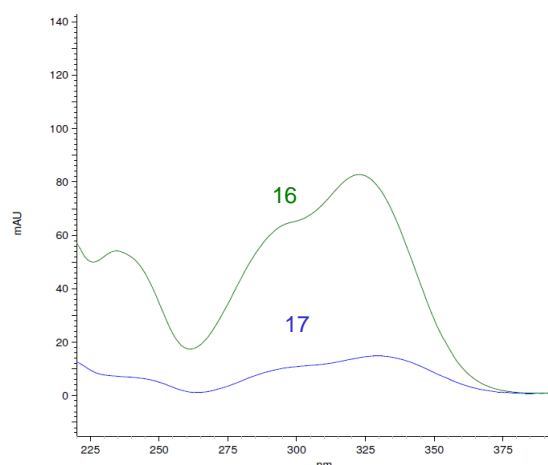


Figura 26: Espectros de UV da subfração X6; ácido caféico (16) ($\lambda_{max} = 234$; 323 nm) e ácido fenólico (17) ($\lambda_{max} = 330$ nm.)

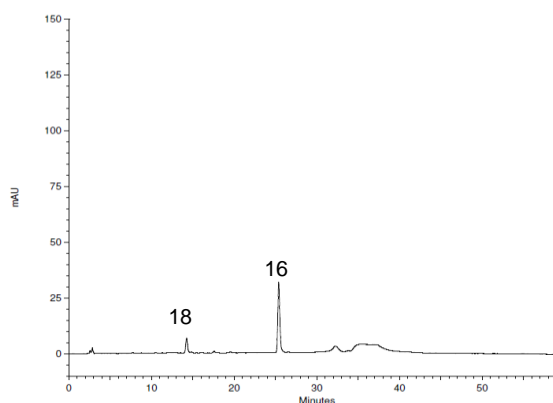


Figura 27: Cromatograma da subfração X7; ácido fenólico (18) (Tr = 14,0 min.) e ácido caféico (16) (Tr = 25,3 min.)

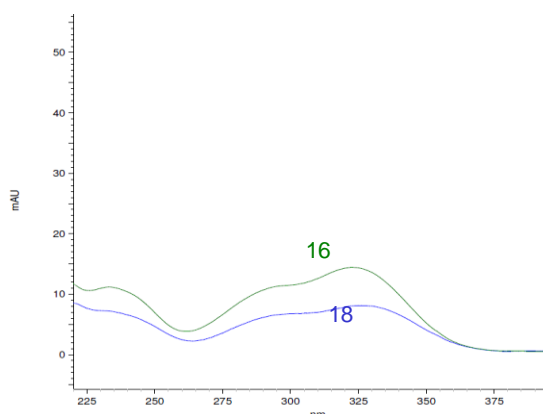


Figura 28: Espectros de UV da subfração X7; ácido fenólico (18) (λ_{\max} = 324 nm) e ácido caféico (16) (λ_{\max} = 234; 323 nm)

A análise da subfração X8 apresentou, assim como a subfração X4, vários picos, que correlacionados com os espectros de UV, há a confirmação da forte presença de ácidos fenólicos no extrato etanólico (Figura 29), foram identificados os picos 19 (Tr: 6,5 min e λ_{\max} = 237; 326 nm), 20 (Tr: 7,6 min e λ_{\max} = 326 nm), 21 (Tr: 8,6 min e λ_{\max} = 323 nm), 22 (Tr: 14,2 min e λ_{\max} = 235, 326 nm), 23 (Tr: 17,5 min e λ_{\max} = 234, 324 nm) e 24 (Tr: 32,2 min e λ_{\max} = 329 nm).

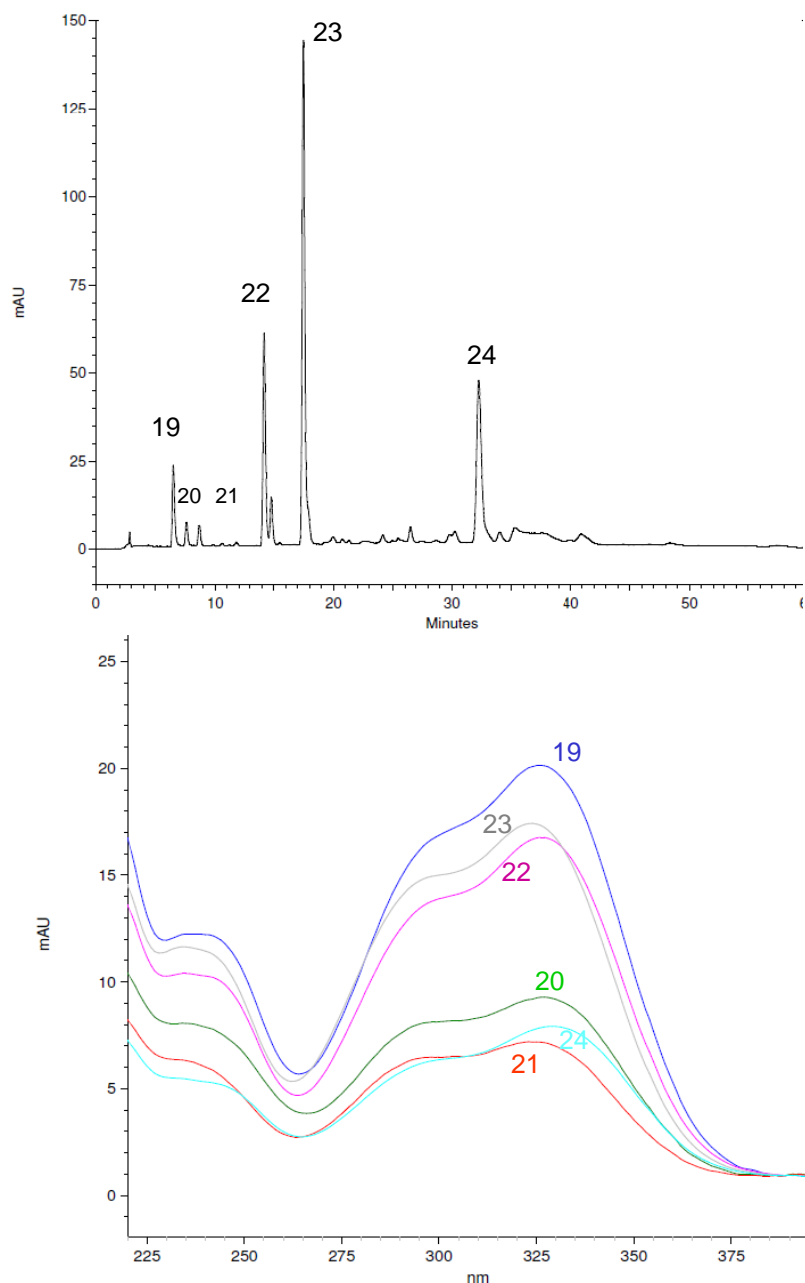


Figura 29. Cromatograma obtido por CLAE-DAD (acima) e espectros de UV (abaixo) da subfração X8

Nos picos em que os Tr e espectros de UV (λ_{\max}) que foram distintos dos padrões são, possivelmente, ácidos fenólicos, pois quando comparados com dados da literatura (YAO et al., 2004; BAILEY, NURSTEN & McDOWELL, 1990) estes apresentam λ_{\max} bastante semelhantes, o que impede de afirmar, na totalidade, quais ácidos fenólicos estão presentes nas subfrações analisadas, pertitindo, assim, somente inferir que os frutos de *X. cavanillesi* são ricos nesta classe de compostos. Contudo, a análise por CLAE-DAD somente

permitiu a caracterização de dois destes ácidos fenólicos: o ácido caféico presentes nas subfrações X2, X5, X6 e X7 e ferúlico, nas subfrações X2, X5. A tabela 3 mostra a caracterização os ácidos fenólicos presentes nas subfrações em estudo por comparação dos Tr e λ_{\max} .

Tabela 3: Comparação dos Tr e λ_{\max} dos padrões dos ácidos fenólicos e subfrações X2, X5, X6 e X7

Pico	Tr (min)	λ_{\max} (nm)
Padrões de Ácidos Fenólicos		
Ácido caféico	26,0	235; 324
ACQ	35,0	232; 323
Ácido ferúlico	37,3	235; 322
Subfração X2		
Pico 1	26,3	235; 324 nm
Pico 2	37,1	234; 323 nm
Subfração X5		
Pico 3	26,7 min	235; 324 nm
Pico 4	37,5 min	234; 323 nm
Subfração X6 e X7		
Pico 16	25,3 min	234, 323 nm

Os ácidos caféicos e ferúlico, além de outros derivados hidroxinâmicos, são importantes protetores contra herbívoros para plantas. Eles possuem também outras atividades biológicas relevantes, tais como antioxidante e seqüestradora de radicais livres (SILVA, 2007).

Os compostos fenólicos hidroxilados como ácido caféico, têm-se mostrado ativos contra microorganismos. O número e a posição dos grupamentos OH no anel fenólico estão relacionados com sua atividade. Existem evidências que o aumento de hidroxilações resulta em aumento da toxicidade para células microbiana e quanto mais oxidados os compostos, maior é o efeito inibitório. Provavelmente, os mecanismos responsáveis pela toxicidade podem atuar inibindo processos enzimáticos através de oxidação (COWAN, 1999).

A busca por medicamentos de origem vegetal tem conduzido a um renovado interesse farmacêutico em ácidos fenólicos, pelo fato destas substâncias demonstrarem atividades farmacológicas potentes e relevantes e serem de baixa toxicidade para mamíferos (SIMÕES et al., 2004).

7.4.2 Caracterização dos ácidos fenólicos por RMN ^1H , IV

Em complemento às análises de CLAE-DAD, as subfrações X2 e X5 foram submetidas à análise por espectroscopia de RMN ^1H , objetivando a confirmação da presença dos ácidos cafeíco e ferúlico nas subfrações em análise.

Inicialmente foi feito o levantamento na literatura dos dados espectrais de RMN ^1H característicos dos ácidos fenólicos identificados por CLAE-DAD nestas subfrações, para posterior comparação destes os sinais de com os dados espectrais das frações em análise. Os valores obtidos na literatura (LU, FOO, 1997; TAVARES e FERREIRA, 2006; REGASINI et al., 2008; DOBHAL et al., 1999) estão descritos na Figura 30 e tabela 4.

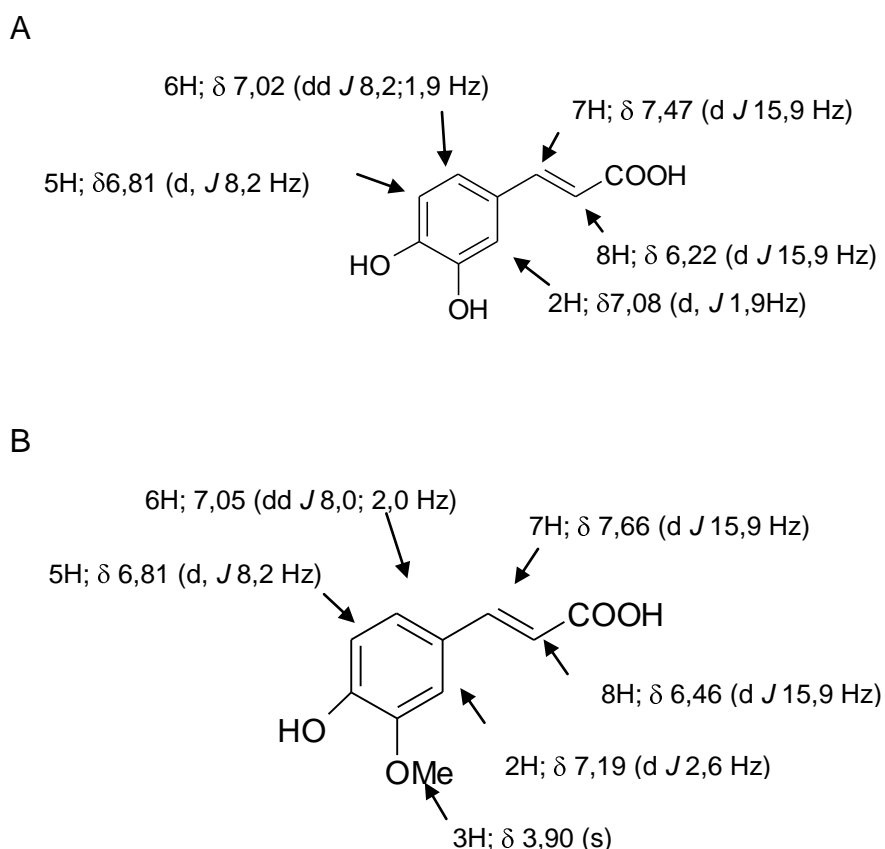


Figura 30. Deslocamentos químicos dos hidrogênios do ácido cafeíco (A) e ferúlico (B) descritos na literatura.

Tabela 4: Deslocamentos químico dos hidrogênios de padrões ácidos caféico e ferúlico descrito em literatura^a.

H	Ácido caféico (δ ppm)	Ácido ferúlico (δ ppm)	$\Delta \delta$
H-2	7,08 (d, J 1,9 Hz)	7,19 (d, J 2,6 Hz)	0,11
H-3	-	3,90 (s) ^	-
H-5	6,81 (d, J 8,2 Hz)	6,96 (d, J 8,3 Hz)	0,15
H-6	7,02 (dd J 8,2; 1,9 Hz)	7,05 (dd J 8,0; 2,0 Hz) ^	0,03
H-7	7,47 (d J 15,9 Hz)	7,66 (d J 15,9 Hz)	0,19
H-8	6,22 (d J 15,9 Hz)	6,46 (d J 15,9 Hz)	0,24

^aLU, FOO, 1997; TAVARES, FERREIRA, 2006; REGASINI et al., 2008.

^DOBHALL et al., 1999

A análise do espectro da subfração X2 (Anexo I) e da subfração X5 (Anexo II) permitiu caracterizar as subfrações X2 e X5 como derivados do ácido cinâmico. O espectro de RMN ¹H, mostrou uma feição comum caracterizada por um par de dubletos entre as regiões (5,8- 8,5 ppm), sinais de hidrogênios característicos de anel aromático ppm com valores de J típicos do sistema *trans*-alceno de derivados aromáticos C₆-C₃ demonstram diferenças sutis nas subfrações X2 e X5. Quando comparados os sinais do δ ¹H das duas frações com os sinais da literatura (tabela 4), pode-se correlacionar os δ ¹H sinais das frações estudadas com os ácidos caféico (A) e ferúlico (B) como pode ser observado na Tabela 4 (LU, FOO, 1997; TAVARES, FERREIRA, 2006; REGASINI et al., 2008).

A ampliação do espectro de RMN de ¹H da subfração X2 apresentou perfil espectroscópico semelhante à subfração X5, revelando, também, uma mistura de ácidos fenólicos que pode ser percebida pela sutil diferença nos δ ¹H. Tanto nas subfrações X2 e X5 os dados de RMN de ¹H sugerem a presença de anel aromático 1,3,4 trissubstituído derivados do ácido cinâmico.

Os sinais dos ácidos fenólicos da subfração X2 indicaram a presença de um ácido fenólico (I) que corresponde aos sinais ¹H: δ 7,45 (d; J 15,5 Hz) correspondente a região de dupla *trans* (H-7); δ 7,02 (dd, J 8,5Hz, J 2,5 Hz) região de aromático (H-2 e H-6), δ 7,02 (d; J 2,5 Hz) região de aromático (H-2), δ 6,75 (d; J 8,0 Hz) região de aromático (H-5), δ 6,18 (d; J 16,0 Hz) região de dupla *trans* (H-8). E outro ácido fenólico (II) foi caracterizado pelos deslocamentos ¹H δ 7,44 (d; J 15,5 Hz) correspondente a região de dupla *trans* (H-7); δ 7,02 (dd, J 8,5Hz, J 2,5Hz) região de aromático (H-2 e H-6), δ 7,02 (d; J

2,5 Hz) região de aromático (H-2), δ 6,97 (d; J 8,5 Hz) região de aromático (H-5), δ 6,18 (d; J 16,0 Hz) região de dupla *trans* (H-8), como pode ser visto na Figura 31 e tabela 5.

Percebe-se que o espectro RMN ^1H da subfração X2 apresentou duas regiões com o mesmo perfil de sinais, exceto pela presença do singlete em δ 3,34 (H-3) atribuído a uma metoxila (OCH_3) ligada ao anel aromático. Este sinal permitiu inferir que um dos ácidos fenólicos presentes na mistura subfração X2 é o ácido ferúlico (REGASINI et al., 2008) e o outro é ácido caféico. Assim, os dados espectrais de RMN ^1H , confirmam os picos do cromatograma obtido através da análise de CLAE-DAD, o qual apresentou um pico correspondente ao ácido caféico (14) ($\text{Tr} = 26,7$ min.) e ácido ferúlico (15) ($\text{Tr} = 37,5$ min.).

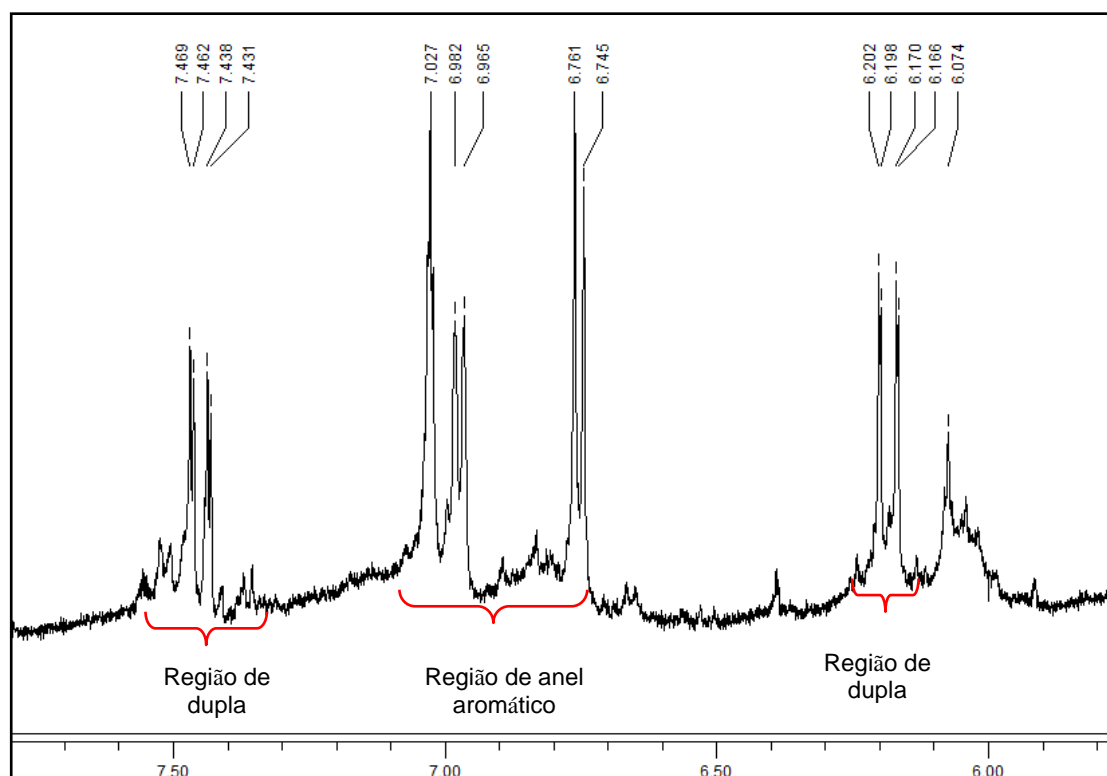


Figura 31. Ampliação do espectro RMN de ^1H correspondente à região de duplas e de aromático característicos de ácidos fenólicos da subfração X2

Tabela 5: Dados de RMN ^1H (500 MHz) da subfração X2 correspondentes à ácidos fenólicos I e II

H	I (δ ppm)	II (δ ppm)	$\Delta \delta$
H-2	7,02 (d; J 2,5 Hz)	7,02 (d; J 2,5 Hz)	0,00
H-5	6,75 (d, J 8,0 Hz)	6,97 (d, J 8,5 Hz)	0,00
H-6	7,02 (dd J 8,5; 2,5 Hz)	7,02 (dd, J 8,5Hz, J 2,5Hz)	0,00
H-7	7,45 (d J 15,5 Hz)	7,44 (d 15,5 Hz)	0,04
H-8	6,18 (d J 16 Hz)	6,18 (d J 16 Hz)	0,03

O espectro de IV da subfração X2 (Anexo III) mostrou banda larga referente a deformação axial de O-H em 3411 cm^{-1} , deformação axial de C-H em 2925 e 2856 cm^{-1} , e deformação axial de ligação do anel C=C, 1454 cm^{-1} . Observou-se bandas de deformação angular fora do plano de O-H de ácido em 1035 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2007).

Na ampliação do espectro de RMN de ^1H da subfração X5 foram observadas regiões características de ácidos fenólicos representados pelas regiões de ligações duplas e anel aromático como pode ser visto na figura 32. Esta expansão indicou a presença de dois ácidos fenólicos, sendo que os dados sugerem a presença de anel aromático 1,3,4-trissubstituído derivado do ácido cinâmico.

Os sinais dos ácidos fenólicos da subfração X5 indicaram a presença de um dubleto em $\delta 7,47$ (d; $J 16\text{ Hz}$) correspondente a região de hidrogênio de dupla (7H); um dubleto (2H) em $\delta 7,05$ (d; $J 2,0\text{ Hz}$), um duplo dubleto em $\delta 7,05$ (dd $J 9,0 2,0\text{ Hz}$) aromático (2H e 6H) e também $\delta 6,78$ (d; $J 8,5\text{ Hz}$) região de aromático (5H), e outro dubleto em $\delta 6,22$ (d; $J 14,5\text{ Hz}$) região de dupla (8H). Juntamente com os sinais descritos anteriormente, foi verificado dubleto em $\delta 7,43$ (d; $J 16,0\text{ Hz}$) correspondente à região de hidrogênio de dupla (7H); um dubleto (2H) em $\delta 7,04$ (d; $J 0,0\text{ Hz}$), um duplo dubleto em $7,02$ (dd, $J 8,5\text{Hz}$, $J 2,5\text{Hz}$) aromático (2H e 6H) e também $\delta 6,78$ (d; $J 8,5\text{ Hz}$) região de aromático (5H), e outro dubleto em $\delta 6,19$ (d; $J 16\text{ Hz}$) região de dupla (8H) correspondendo ao composto fenólico II, presente na mistura. Como pode ser observado na figura 21 e Tabela 6.

O espectro RMN ^1H da subfração X5 apresentou duas regiões com o mesmo perfil de sinais, exceto pela presença do singlete em $\delta 3,32$ (3H) atribuído a uma metoxila (OCH_3) ligada ao anel aromático. Este sinal permitiu inferir que um dos ácidos fenólicos presentes na mistura da subfração X5 é o ácido ferúlico (REGASINI et al., 2008) e o outro é ácido caféico. Assim dos dados espectrais de RMN ^1H , confirmam os picos do cromatograma obtido através da análise de CLAE-DAD, o qual apresentou um pico correspondente ao ácido caféico (14) ($\text{Tr} = 26,7\text{ min.}$) e ácido ferúlico (15) ($\text{Tr} = 37,5\text{ min.}$).

A comparação dos dados de δ obtidos com espectro de RMN ^1H , com dados obtidos da literatura (LU, FOO, 1997; TAVARES, FERREIRA, 2006;

REGASINI et al., 2008; LIU; LI; SUN, 2004) permitiu a percepção de diferenças sutis entre os dois ácidos fenólicos presentes na subfração X5.

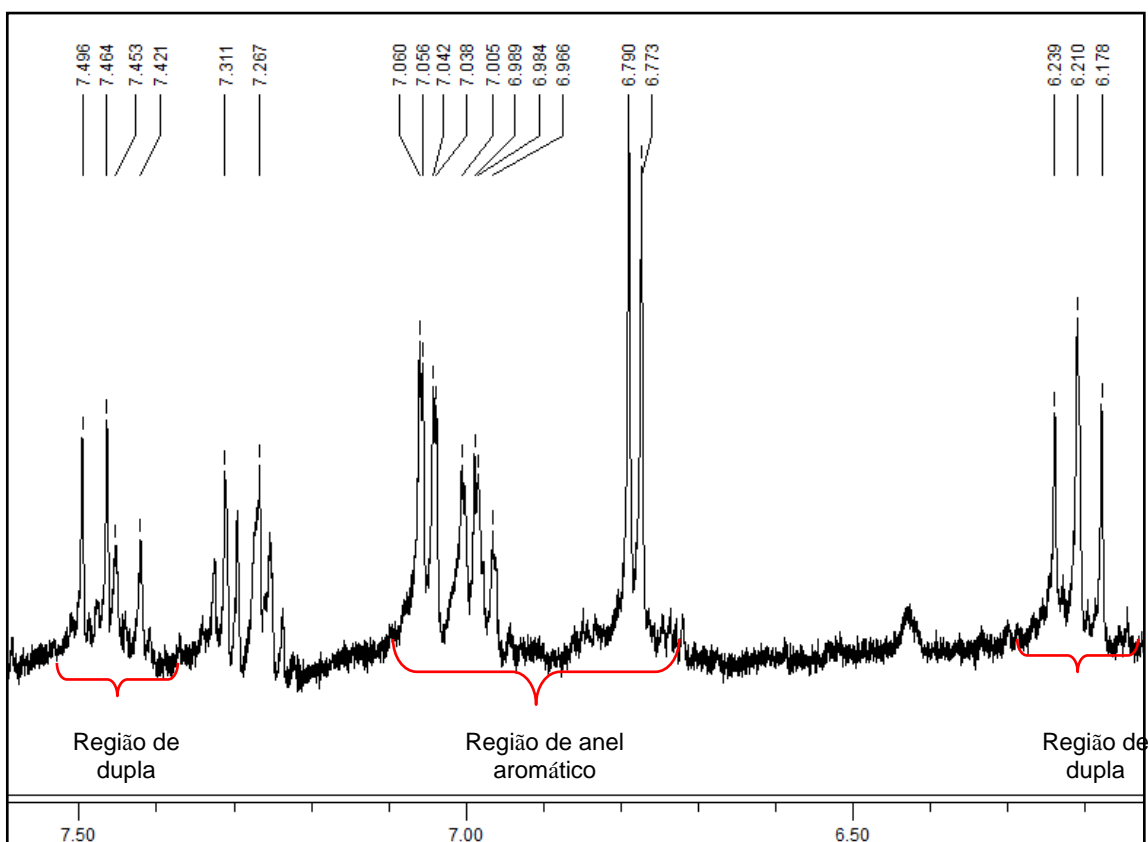


Figura 32. Ampliação do espectro RMN de ^1H correspondente à região de duplas e de aromático característicos de ácidos fenólicos da subfração X5

Tabela 6: Dados de RMN ^1H (500 MHz) da subfração X5 correspondentes a ácidos fenólicos I e II

H	I (δ ppm)	II (δ ppm)	$\Delta \delta$
H-2	7,05 (d, J 2 Hz)	7,04 (d, J 0 Hz)	0,01
H-5	6,78 (d, J 8,5 Hz)	6,78 (d, J 8,5 Hz)	0,00
H-6	7,05 (dd J 9,0 2,0 Hz)	7,02 (dd, J 8,5Hz, J 2,5Hz)	0,03
H-7	7,47 (d J 16,0 Hz)	7,43 (d J 16,0 Hz)	0,04
H-8	6,22 (d J 14,5 Hz)	6,19 (d J 16,0 Hz)	0,03

O espectro de IV da subfração X5 (Anexo IV) mostrou banda larga referente a deformação axial de O-H em 3412 cm^{-1} , deformação angular no plano O-H, 1378 cm^{-1} . Deformação axial de ligação do anel C=C, 1454 cm^{-1} , e estiramento de olefinas C=C em 1625 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2007).

As subfrações X6 e X7 quando analisadas por CLAE-DAD mostraram uma mistura de ácidos fenólicos, sendo um deles o ácido caféico. Então, na

análise de RMN ^1H das subfrações X6 (Anexo V) e X7 (Anexo VI) buscaram-se os deslocamentos RMN ^1H característicos do ácido ferúlico, subtraindo-se os demais sinais. Os δ (ppm) encontrados nas frações foram comparados com dados espectrais descritos anteriormente (LU, FOO, 1997; TAVARES e FERREIRA, 2006;) podendo-se observar a presença do ácido ferúlico também nestas frações (Tabela 7).

Na subfração X6 os deslocamentos de RMN ^1H δ 7,55 (d; J 13 Hz) correspondente à região de dupla trans (H-7); um dubleto (2H) em δ 7,03 (d; J 2,5 Hz), um duplo dubleto em δ 6,92 (dd J 8,5; 1,5 Hz) aromático (2H e 6H), δ 7,10 (d; J 8,5 Hz) região de aromático (H-5), δ 6,27 (d; J 16Hz) região de dupla trans (H-8) (Anexo VII). A subfração X7 apresenta os deslocamentos semelhantes à fração X6, ^1H δ 7,55 (d; J 15,5 Hz) correspondente à região de dupla *trans* (H-7); um dubleto (2H) em δ 7,03 (d; J 2,5 Hz), um duplo dubleto em δ 6,92 (dd J 8,5; 1,5 Hz) aromático (2H e 6H), δ 7,10 (d; J 8,5 Hz) região de aromático (H-5), δ 6,26 (d; J 16Hz) região de dupla trans (H-8) (Anexo VIII).

Tabela 7: Deslocamentos químico dos hidrogênios do ácido caféico^a e subfrações X6 e X7

H	Ácido caféico (δ ppm)	X6 (δ ppm)	X7 (δ ppm)
H-2	7,08 (d, J 1,9 Hz)	7,03 (d, J 2,5 Hz)	7,03 (d, J 2,0 Hz)
H-5	6,81 (d, J 8,2 Hz)	δ 7,10 (d; J 8,5 Hz)	δ 7,10 (d; J 8,5 Hz)
H-6	7,02 (dd J 8,2; 1,9 Hz)	6,92 (dd J 8,5; 1,5 Hz)	
H-7	7,47 (d J 15,9 Hz)	7,55 (d; J 13,0 Hz)	δ 7,55 (d; J 15,5 Hz)
H-8	6,22 (d J 15,9 Hz)	δ 6,27 (d; J 16,0 Hz)	δ 6,26 (d; J 16,0 Hz)

^a LU, FOO, 1997; TAVARES, FERREIRA, 2006

O espectro de IV da subfração X6 (Anexo IX) mostrou deformação axial de C-H em 3056 e 2987 cm^{-1} . Deformação axial de anel C=C, 1422 cm^{-1} e 1265 cm^{-1} . O espectro de IV da subfração X7 (Anexo X) mostrou deformação axial de C-H em 3055 e 2897 cm^{-1} . Deformação axial de anel C=C, 1433 cm^{-1} . E estiramento de olefinas C=C em 1625 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2007).

Assim as análises espectrais de RMN ^1H confirmam a presença dos ácidos caféico e ferúlico, previamente detectados neste estudo por CLAE-DAD, como também confirmam as informações da literatura que relataram a presença de ácidos fenólicos em espécies de *Xanthium*, inclusive no *X. cavanillesii*.

7.4.3 Caracterização parcial do diterpeno caurano glicosilado por ESI-MS, RMN ^{13}C e IV

A classe dos diterpenos cauranos glicosilados são compostos, frequentemente, isolados dos frutos de espécies de *Xanthium*. Estudos descreveram a presença do carboxiatractilosídeo (CAT) (CRAIG et al, 1976; HSU, CHEN, HONG, 1979, COLE et al, 1980; WITTE et al, 1990; MENDEZ, RUIZ, RUIZ, 1998; RIETE-CORREA, 1998, KUPIECKI, 1974, MA et al., 1998), 4'-disulfato-carboxiatractilosídeo, ácido $2\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glucopiranosil } 15\alpha\text{-hidroxi-caur-16-eno-18,19-dicarboxílico}$ (PIACENTE et al, 1995) e do 3'4'-didesulfato carboxiatractilosídeo (MACLEOD, MOELLER, 1990). A estrutura química do ácido $2\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glucopiranosil } 15\alpha\text{-hidroxi-caur-16-en-18,19-dicarboxílico}$ com as respectivas numerações de carbono pode ser vista na figura 33.

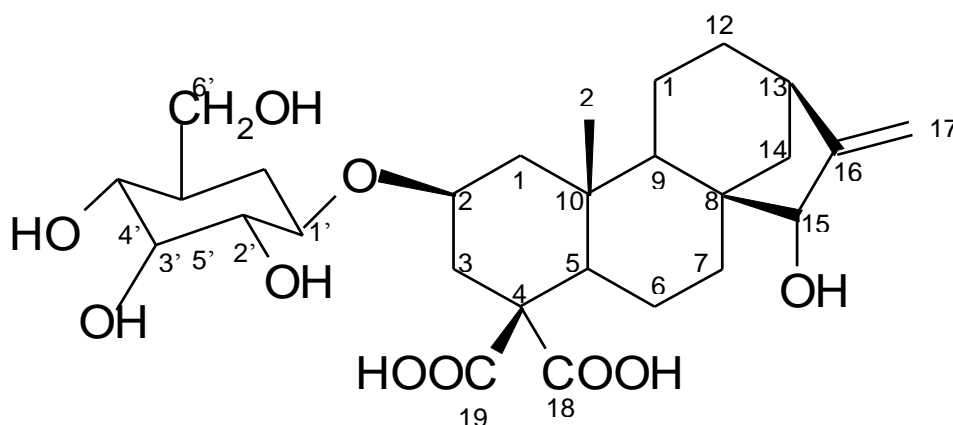


Figura 33. Ácido $2\beta\text{-O-}\beta\text{-D-glucopiranosil } 15\alpha\text{-hidroxi-caur-16-eno-18,19-dicarboxílico}$

A fração XC10 (precipitado) foi obtida por fracionamento em CC em sílica gel da fração 10 do extrato etanólico dos frutos de *X. cavanillesii*.

A análise de espectrometria de massas por inserção direta do precipitado (XC10) obtido da fração 10 mostrou-se uma mistura complexa de compostos contendo peso molecular entre 609 e 621 da (Figura 34). Esta faixa de massa molecular é característica da classe dos diterpenos cauranos glicosilados. Neste sentido, o íon molecular 609 pode ser caracterizado como o 3'4'-didesulfato carboxiatractilosídeo (MACLEOD, MOELLER, 1990). Adicionalmente, análise dos espectros de RMN ^{13}C e RMN ^{13}C utilizando a técnica APT confirmaram a presença de diterpenos cauranos nesta mistura

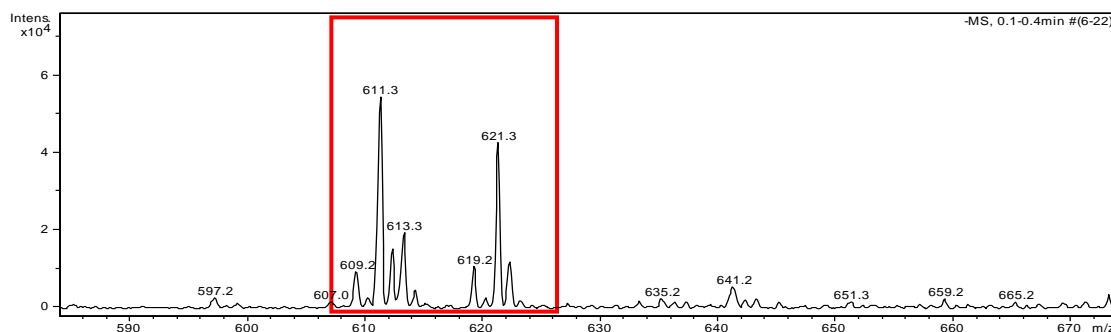


Figura 34. Espectro ESI-MS fração XC10

A ampliação do espectros de RMN ^{13}C (figuras 35, 36 e 37) e APT (Anexo XI) da fração XC10 permitiu a observação de dezoito sinais de ^{13}C característicos de diterpeno caurano glicosilado, sendo três sinais de carbonos metilínicos, oito sinais de carbonos metilênicos, cinco sinais de carbonos metínicos e dois sinais de carbonos não hidrogenados. Assim, pelo espectro foi possível propor que XC10 tratava-se de um derivado diterpeno caurano glicosilado. A caracterização do esqueleto básico deu-se por comparação dos sinais RMN ^{13}C da fração XC10 com dados descritos na literatura (MACLEOD, MOELLER, 1990; BATISTA, BRAGA, OLIVEIRA, 2005). Os sinais utilizados como referência foram os $\delta^{13}\text{C}$ do núcleo diterpeno caurano glicosilado isolado dos frutos de *X. pungens* e do ácido caurenóico, isolado de *Wedwlia papulosa* D.C., sendo estes descritos na tabela 8, seguida das suas respectivas estruturas (Figura 38).

A unidade glicosídica foi caracterizada por comparação dos sinais espectrais do RMN ^{13}C e APT (Anexo XII) da referida fração com dados da literatura (MACLEOD, MOELLER, 1990). Foram observados a presença de cinco carbonos metínicos e um carbono oximetilênico. Os sinais de ^{13}C que permitiram a caracterização da unidade glicosídica estão descritos na tabela 8.

Tabela 8: Comparação de dados espectrais de ^{13}C do caurano diterpeno glicosilado contido na fração XC10 com dados da literatura

C	Diterpeno Caurano da Fração XC10	Mod. 1 ^b	Mod. 2 ^b	Mod. 3 ^c
C-1	49,7	48,3	48,3	40,7
C-2	73,5	74,8	73,1	19,1
C-3	40,8	40,8	40,9	37,7
C-4	61,2	59,8	62,0	43,2
C-5	56,2	57,1	49,5	57,1
C-6	23,9	24,0	26,3	21,8
C-7	36,6	36,2	35,9	41,3
C-8	49,7	47,8	48,0	44,2
C-9	55,5	54,0	53,4	55,1
C-10	41,9	41,2	40,9	39,7
C-11	18,7	18,6	18,4	18,4
C-12	33,4	32,9	32,8	33,1
C-13	41,8	42,7	42,7	43,8
C-14	35,6	36,7	36,6	39,7
C-15	50,6	50,3	82,6	48,9
C-16	-	161,5	161,0	155,9
C-17	-	107,0	107,0	103,0
C-18	29,3	176,7	178,0	29,0
C-19	28,8	176,5	178,0	184,8
C-20	18,5	17,5	16,9	15,6
C-1'	100,8	100,8	100,7	-
C-2'	76,9	74,5	75,2	-
C-3'	76,8	74,8	76,3	-
C-4'	70,2	70,6	71,8	-
C-5'	77,0	76,7	78,5	-
C-6'	63,0	62,3	62,3	-

^b MACLEOD, MOELLER, 1990; ^cBATISTA, BRAGA, OLIVEIRA, 2005

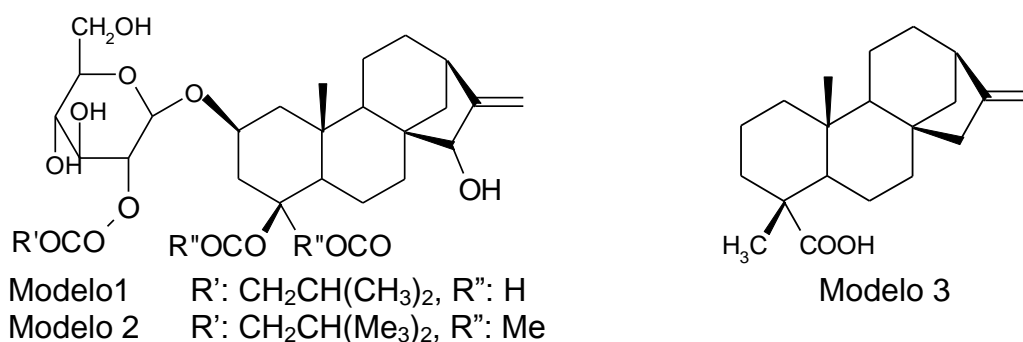


Figura 38: Estruturas dos modelos da literatura utilizados como referências na caracterização dos sinais de RMN ^{13}C presentes no espectro da fração XC10

Resalta-se que os carbonos do grupo carboxila, C-18 (δ 176,7 ppm) e C-19 (δ 176,5 ppm) não foram encontrados na fração em estudo. Sendo sugerido

que as unidades carboxilas estejam substituídas por metilas pelos sinais de carbono metilínico em δ 29,3 ppm (C-18) e δ 28,8 ppm (C-19). Não foram observados os sinais dos carbonos C-16 (161,5 ppm) e C-17 (107,0 ppm) neste espectro. Os sinais de carbono RMN ^{13}C no espectro da fração XC10 estão sinalizados na figura 39.

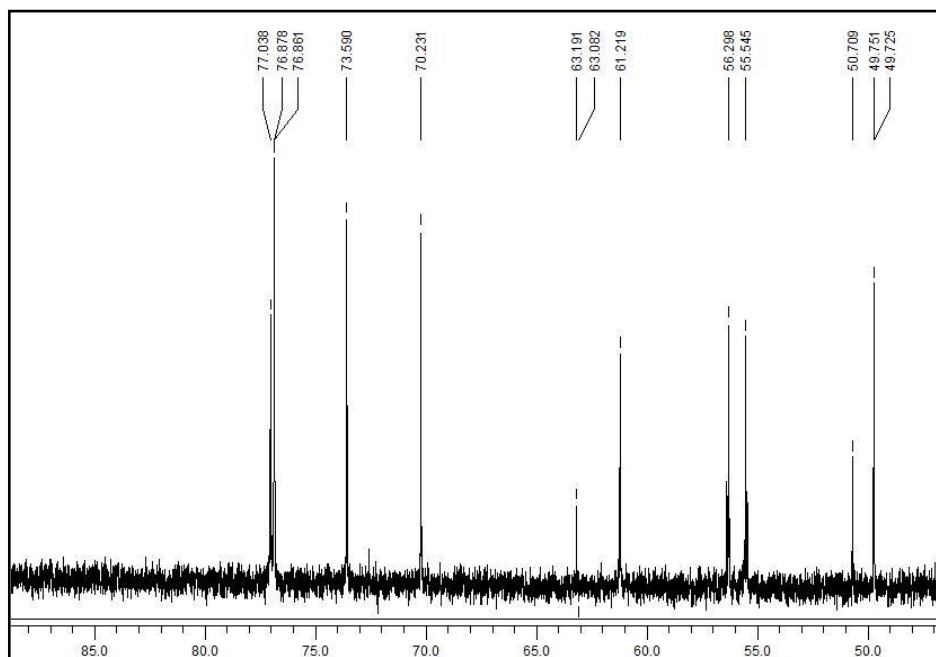


Figura 35. Ampliação do espectro RMN de indicando sinais ^{13}C correspondentes a região entre 50 a 90 ppm

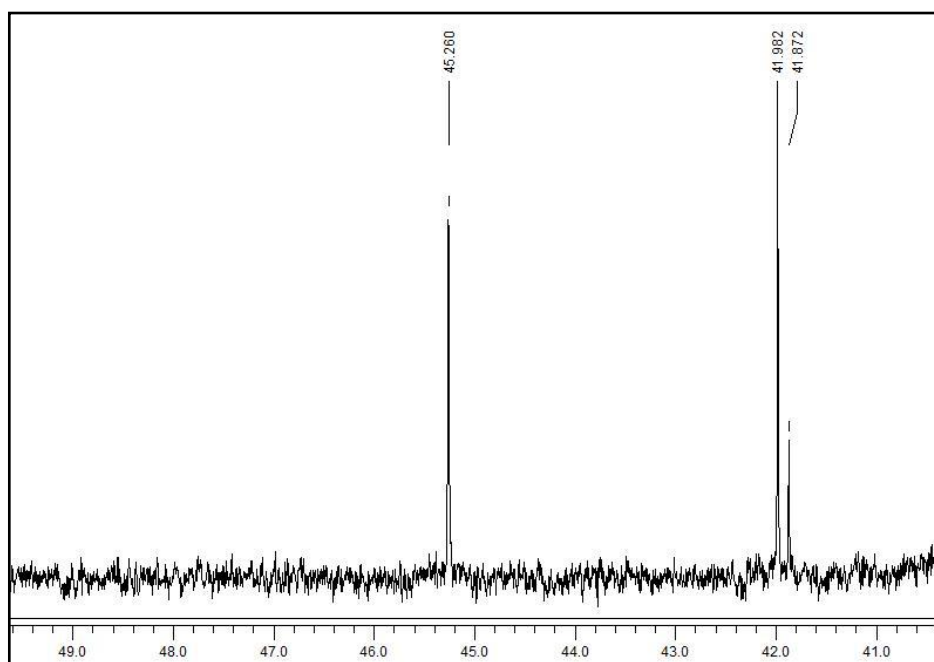


Figura 36. Ampliação do espectro RMN de indicando sinais ^{13}C correspondentes a região entre 40 a 50 ppm

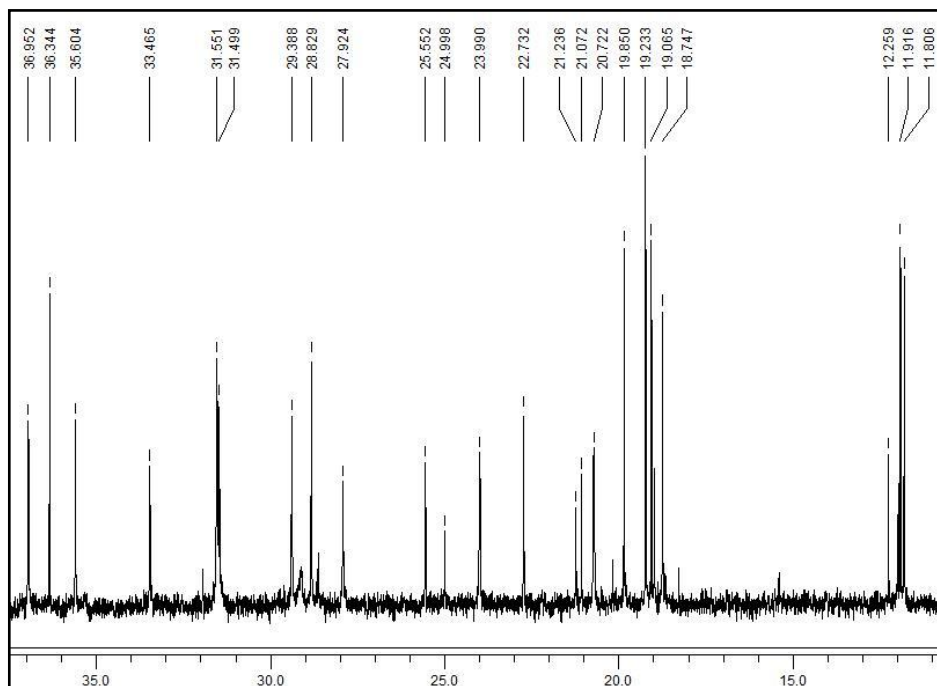


Figura 37. Ampliação do espectro RMN de ^{13}C de indicando sinais correspondentes a região entre 10 a 30 ppm

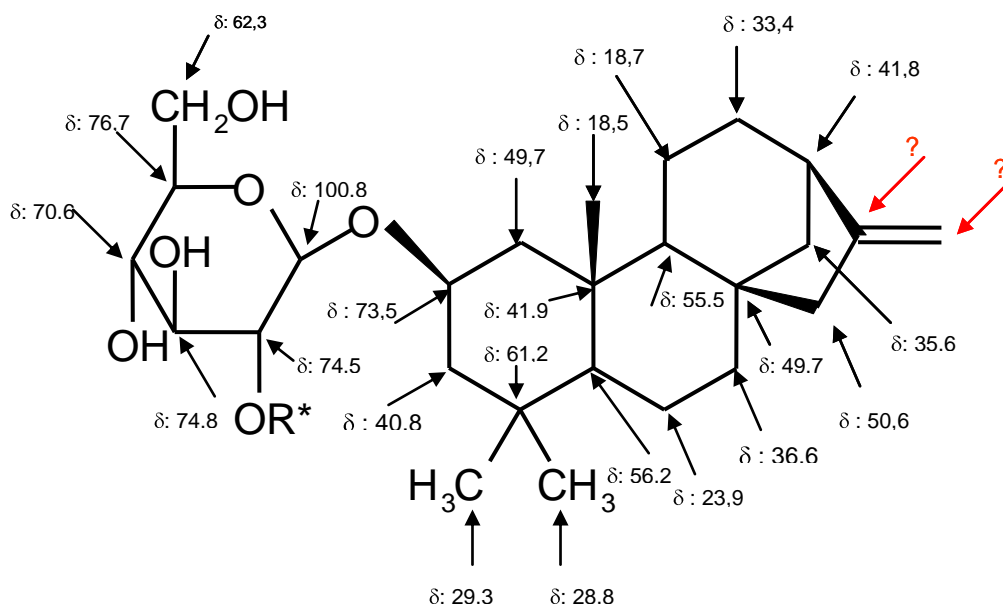


Figura 39. Sinais de RMN ^{13}C do diterpeno caurano glicosilado presente na fração XC10.

Na análise da ampliação do espectro de RMN ^{13}C foram observados sinais que podem sugerir que esta fração contém uma mistura de diterpeno caurano glicosilado com ramificações no carbono C-2'. A diferença pode ser

sugerida com uma cadeia alifática em um composto e um anel aromático em outro composto. A tabela 9 e figura 40 apresentam os deslocamentos químicos dos ^{13}C da cadeia alifática do modelo 1 (MACLEOD, MOELLER, 1990) e sinais de carbono alifáticos que podem ser atribuídos ao composto da mistura XC10.

Tabela 9: Deslocamentos ^{13}C da cadeia alifática do modelo 1 e sinais de carbono alifático da mistura XC10

C	Mod. 1 ^b	XC10
C-7'	172,5	-
C-8'	41,9	-
C-9'	32,2	31,5
C-10'	29,5	29,3
C-11'	11,5	11,7
C-12'	19,4	19,2

^bMACLEOD, MOELLER, 1990;

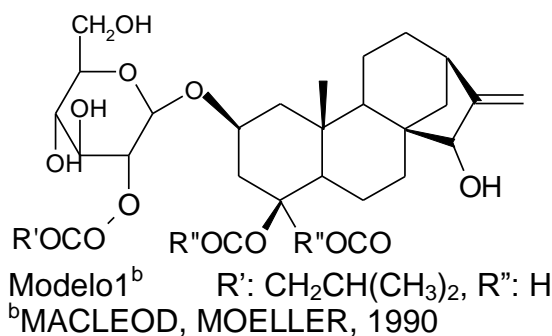


Figura 40. Estrutura do modelo da literatura utilizado como referência na caracterização dos sinais de RMN ^{13}C da cadeia alifática presente no espectro da fração XC10

Adicionalmente, o espectro de espectro de RMN ^{13}C (Anexo XIII) também mostrou picos com δ característicos de anel aromático correspondente aos δ (ppm) em 138,1 (CH), 129,4 (CH), 129,3 (CH), 128,5 (CH), 128,2 (CH), 121, 3 (CH), sugere-se que o anel benzênico possa está ligado ao esqueleto principal, mas não foi possível precisar o posicionamento desta ligação.

O espectro de IV da fração XC10 (Anexo XIV) mostrou banda larga referente a deformação axial de O-H em 3406 cm^{-1} , deformação axial de C-H em 2933 cm^{-1} e a deformação axial de ligação do anel C=C em 1461 cm^{-1} (SILVERSTEIN, WEBSTER, 2007).

Devido a complexidade estrutural e por se está em mistura, a elucidação estrutural do composto será realizada em etapa posterior por espectroscopia de RMN ^1H e bidimensionais.

7.5. Modelagem molecular

A busca por moldes para a construção da PfATP6 levou a obtenção de 2O9J (MONCOQ, TRIEBER, YOUNG, 2007) e 3BA6 (OLESEN et al., 2007), com 43% e 49% de identidade com a enzima PfATP6, respectivamente. Modelos iniciais da enzima PfATP6 usaram a 1IWO (WU, KWONG, HENDRICKSON; 1997), com 43,5% de identidade, a qual também foi incluída na construção. O alinhamento entre a seqüência e os moldes de PfATPase6 mostrou uma região com baixa similaridade. Por este motivo, esta região, entre 375 e 707, foi removida na seqüência de PfATPase6. Este modelo refinado foi avaliado pelo valor do desvio de *root-mean-square* (RMSD) das coordenadas de C α e do gráfico de Ramachandran gerados pelo software de PROCHECK; ambos os métodos de encontro a 1IWO mostrando um valor de RMSD de 1,61 Å, e 87,0% dos resíduos nas regiões permitidas (Figura 41), enquanto a estrutura cristalina 1IWO apresenta 77,3% dos resíduos nas regiões permitidas. Este modelo é composto por três domínios citoplasmáticos: fosforilação, ligamento nucleotídeo e segmentos trans membrana (M1 a M10).

Depois que a PfATPase6 foi modelada por homologia, um docking foi realizado entre a artemisinina e a enzima no mesmo local ativo da taspigargina (TG), uma outra lactona sesquiterpênica com atividade antimalárica que atua inibindo a enzima PfATP6, usando o software de AutoDock Vina.

Na validação do nosso sistema, a curcumina e metilcurcumina foram encaixadas no sítio ativo da PfATPase6. Como resultado, curcumina e metilcurcumina interagiram no mesmo sítio de ligação, definido a partir de 4 Å do ligante, sendo formado pelos aminoácidos: ASN55, GLN56, ASP59, LEU61, VAL62, ASN101, GLN108, GLN248, ILE251 e ASP252. Contudo, diferentemente do local de ligação da TG. Essa diferença pode ser devido à necessidade de otimização do complexo.

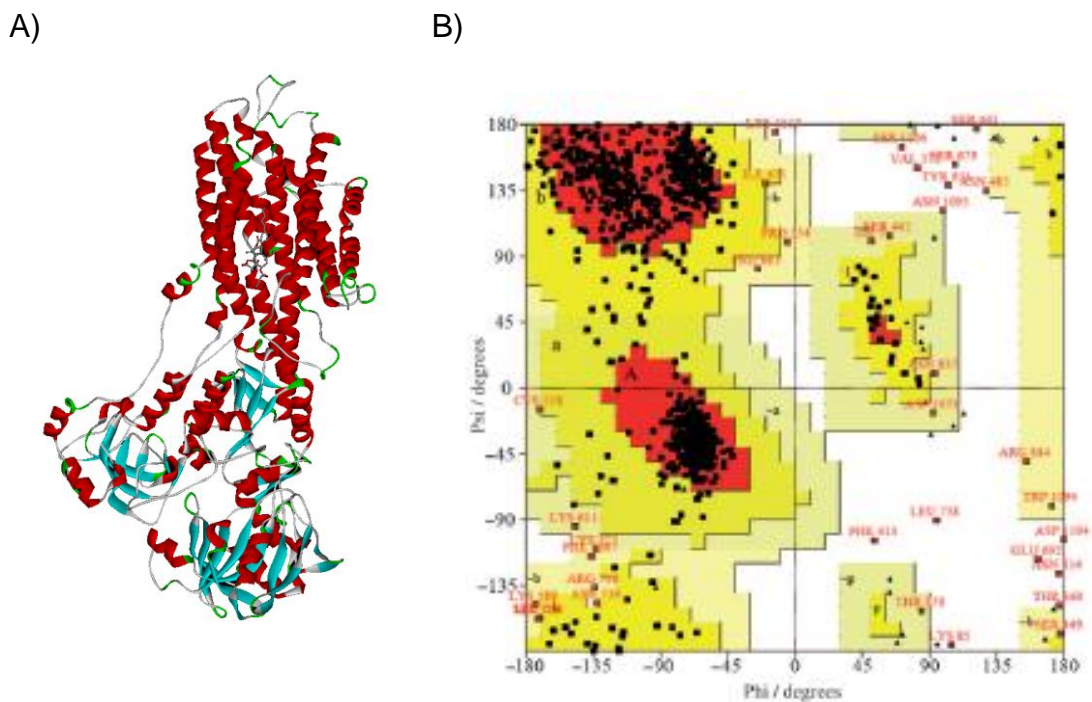


Figura 41. A) Estrutura da PfAPT6 construída onde encontram-se as cores vermelho e azul denotam as alfas hélices e folhas beta; B) Gráfico de Ramachandran da enzima com 87% dos resíduos em regiões permitidas.

Embora curcumina e metilcurcumina não se sobrepuseram da mesma forma do que a TG, o AutoDock Vina foi capaz de estimar curcumina como mais ativa do que metilcurcumina por $-0,4$ Kcal/mol, conforme mostra a tabela 10. A pequena diferença em atividade é devido a formação de uma ligação hidrogênio entre a hidroxila catecólica da curcumina com a GLN56, o que não ocorre com a metilcurcumina (Figura 42). Este resultado está em conformidade com os estudos experimentais, respeitando a atividade biológica destes compostos (JI, SHEN, 2009).

Como o extrato etanólico dos frutos de *X. cavanillesii* apresentou significativa atividade *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* e as análises de CLAE-DAD e RMN ^1H indicaram a presença de ácidos fenólicos resolveu-se estudar, por modelagem molecular, o possível mecanismo de ação dos ácidos fenólicos contra as cepas de *P. falciparum* utilizando-se a mesma metodologia descrita para a curcumina (A) e metilcurcumina (A1) (Figura 43). (JI, SHEN, 2009) haja vista a similaridade estrutural entre estes dois compostos e os ácidos fenólicos (Figura 44), em especial ao ácido caféico e ferúlico encontrados no presente estudo de *X. cavanillesii*.

Tabela 10: Energia de Ligação (Kcal/mol) da curcumina, metilcurcumina e ácidos fenólicos

Composto	Energia de Ligação (Kcal/mol)
Curcumina	-7,8
Metilcurcumina	-7,4
Ácido caféico ¹	-6,6
Ácido cinâmico ²	-6,4
Ácido <i>p</i> -cumárico ³	-6,3
Ácido clorogênico ⁴	-6,2
Ácido ferúlico ⁵	-6,1

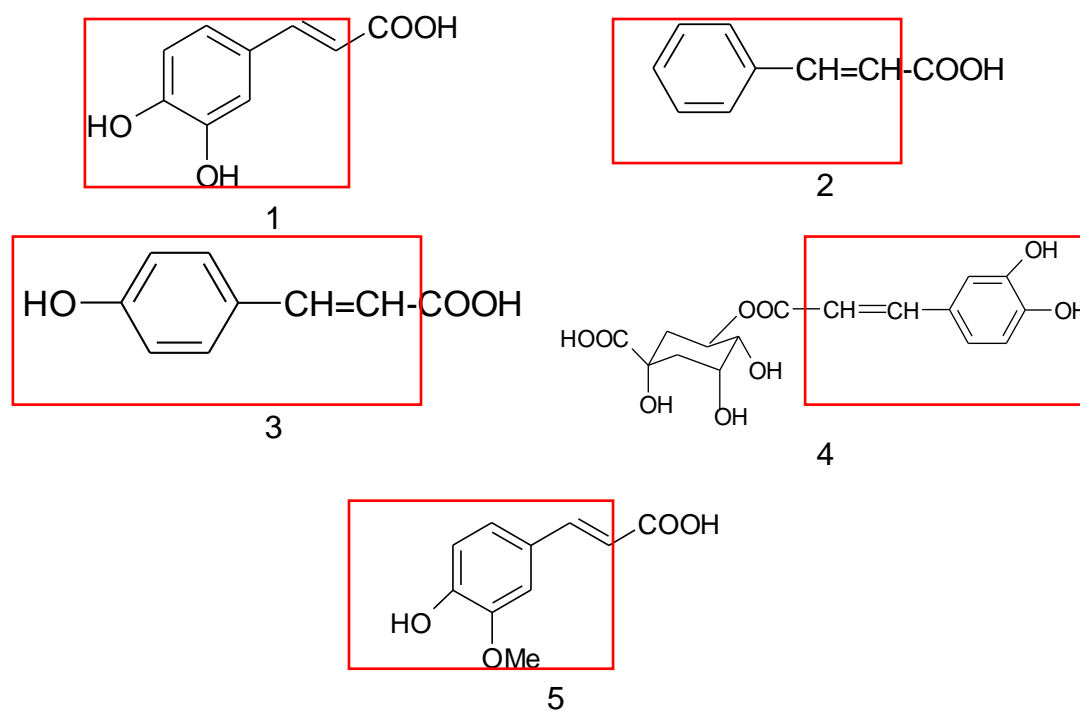


Figura 44. Estruturas dos ácidos hidroxicinâmicos

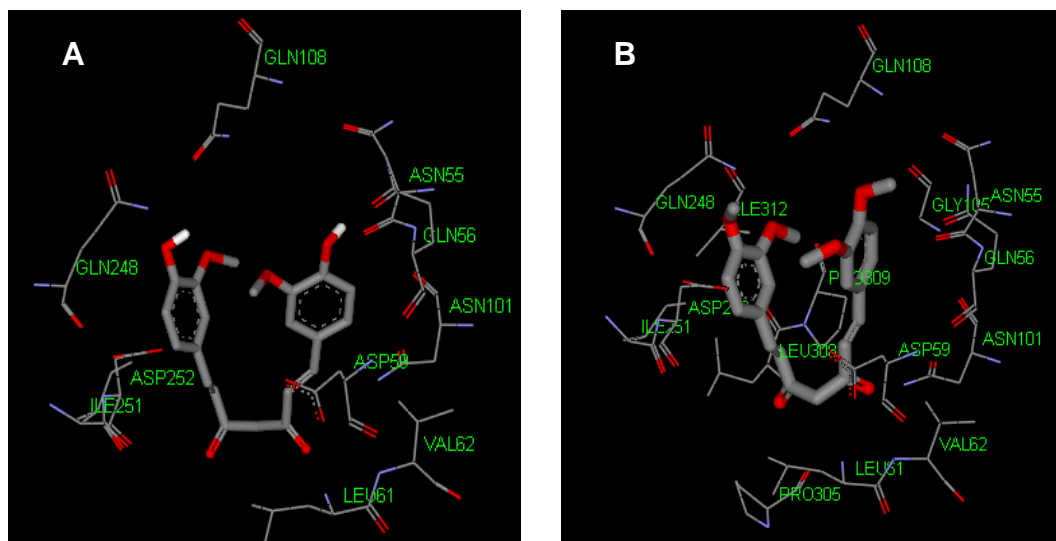


Figura 42. Conformação de ligação e sítio ativo da PfATP6. A) curcumina; B) metilcurcumina

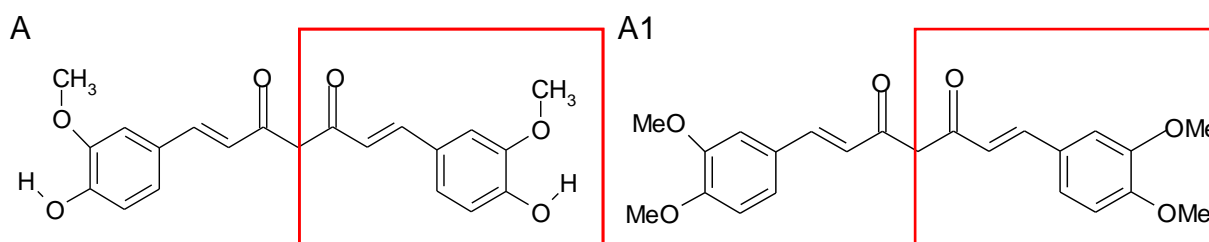


Figura 43. A: curcumina e A1: metilcurcumina. As regiões em destaque se mostram muito similares às estruturas dos os ácidos fenólicos.

Os ácidos fenólicos extraídos do *X. cavanillesii*, possuem valores de atividades preditos muito próximos entre si tabela 10, contudo, todos menos ativos do que curcumina e metilcurcumina. Dentre estes, o ácido caféico foi o mais ativo da série, e o ácido ferúlico menos ativo. Todos os compostos extraídos complexaram-se em locais distantes da curcumina, exceto o ácido clorogênico. A figura 45 mostra o local de ligação do ácido clorogênico. Como pode ser observado, este liga-se em local semelhante à curcumina e metilcurcumina. O respectivo sítio de ligação é composto pelos aminoácidos ASP59, LEU61, VAL62, LEU65, ASN101, ILE251, ASP252, ILE304, PRO305, GLU306, LEU308 e PRO309. Neste sítio de ligação há a formação de uma ligação hidrogênio entre o hidrogênio carboxílico do ácido clorogênico com a carbonila da GLU306. Adicionalmente, também ocorrem interações hidrofóbicas entre o anel aromático com as prolinas PRO305 e PRO309.

Comparando todas as estruturas calculadas, pode-se observar que o grupamento catecólico é o grupamento farmacofórico destes compostos. Sugere-se então que o mecanismo de ação dos ácidos fenólicos, contra cepas de *P. falciparum*, pode ser embasado nos fatos destes compostos possuírem hidroxilas catecólicas substituídas por grupamento metoxila ou por hidrogênio que se ligam ao receptor, mesmo que de maneira menos efetiva. Estudos também mostraram que as hidroxilas fenólicas são importantes para a ligação da curcumina e, conseqüentemente, dos ácidos fenólicos à PfATPase6 (JI; SHEN, 2009).

Estes resultados sugerem que os compostos identificados no extrato etanólico dos frutos de *X. cavanillesii*, e os demais, como o ácido clorogênico são capazes de inibir a PfATP6, embora menos efetivamente do que a curcumina e metilcurcumina.

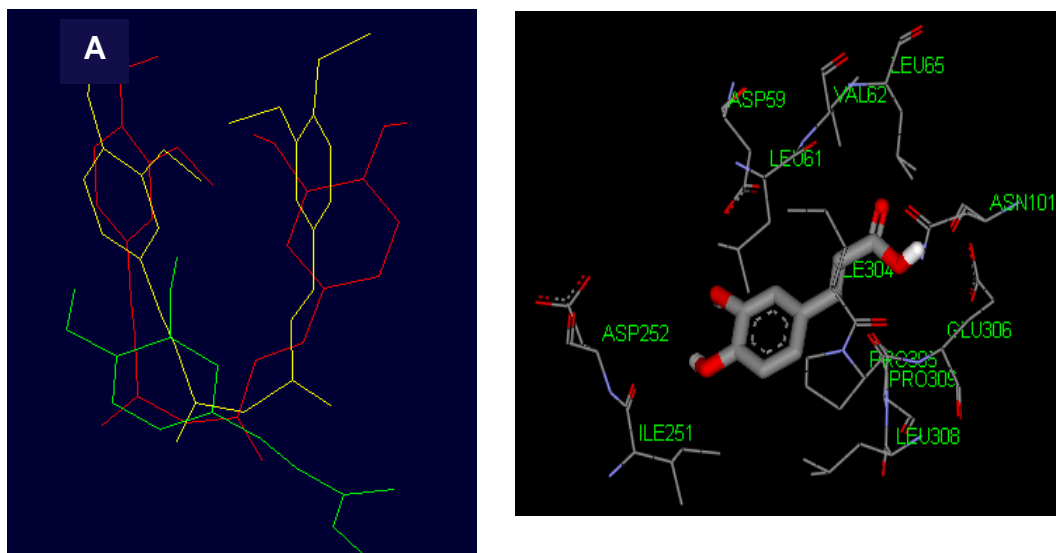


Figura 45. A) Conformação de ligação do ácido clorogênico. Vermelho: curcumina; amarelo: metilcurcumina; verde: ácido clorogênico. B) Sítio de ligação do ácido clorogênico com PfATP6.

Considerações finais

Historicamente, compostos químicos obtidos da natureza representam a maior fonte de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos para as mais variadas doenças. Tais fatos têm motivado vários grupos a explorarem extratos brutos e compostos isolados de plantas, bactérias, fungos, e organismos marinhos. Com isso, uma ampla variedade de grupos químicos tais como alcalóides, terpenos, quassinóides, flavonóides, limonóides, chalconas, peptídeos, xantonas, quinonas, cumarinas, dentre outras (SAXENA et al., 2003), vêm sendo testados na terapia antimalárica com expectativa de retardar o desenvolvimento da resistência aos fármacos pelo *P. falciparum*. Sendo os mais conhecidos a diidroartemisinina (DQHS), arteéter, arteméter, artemisiteno e artesunato de sódio e do desenvolvido recentemente: dipepdil vinil sulfona, Mu-Leu-hPhe-VSPH (CAPELA et al., 2009).

Assim, o presente estudo é uma tentativa de somar esforços para o controle da malária. Este vem sendo executado de forma racional, onde inicialmente, uma série de estudos teóricos foram executados para tentar elucidar os mecanismos de interação da artemisinina com o seu receptor, o grupo heme, e os produtos obtidos desta interação. (TARANTO et al., 2001, 2005, 2006 (a), 2006 (b), 2007, 2008, TARANTO, 2002, 2003). A nível teórico, foi observado que espécies de *Xanthium* contém uma lactona sesquiterpênica, com grupamento endoperóxido, o 11,13-diidroguaianolido, cuja distribuição eletrônica é similar à apresentada pela artemisinina. (LEITE et al., 2005). Estes dados, acrescidos de relatos do uso popular como antimalárico (NADKARNI, 1954; TALAKAL et al., 1995; DICIONÁRIO DE LAS CIENCIAS AGROPECUARIA, 2006; CERDEIRAS et al., 2007) e ensaios experimentais *in vitro* contra cepas de *P. falciparum* (JOSHI et al., 1997; SAXENA et al., 2003) das variadas espécies de *Xanthium* motivaram o estudo experimental da atividade antimalárica desta planta.

Neste estudo foram realizados, utilizando-se o *X. cavanillesii*, ensaios de citotoxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina* como artifício para seleção dos extratos bioativos. Então um dos extratos que se mostrou ativo, o etanólico dos frutos, neste biomonitoramento foi submetidos a estudos fitoquímicos, espectroscópicos, modelagem molecular e relação estrutura atividade (REA)

que mostram que os compostos extraídos, ácidos fenólicos e identificados: ácidos caféico e ferúlico possuem atividade antimalárica, sugerindo assim o uso de ácidos fenólicos como novos compostos protótipos, que por modificações estruturais podem vir a se tornar mais um grupo químico candidato à antimalárico. Adicionalmente, este trabalho sugere, por modelagem molecular, um possível modo de ação dos ácidos fenólicos, através da inibição da enzima PfATP6.

Este trabalho também contribui para o conhecimento do acervo natural de vegetais, pois relata a biodiversidade estrutural de compostos orgânicos naturais de uma espécie vegetal, sugerindo-a como fonte renovável para o surgimento e desenvolvimento de um novo fármaco. Este fato fornece uma pequena contribuição para o desenvolvimento sustentável do país (FILHO, 2010).

A busca de novos fármacos antimaláricos é necessária para que se tenha uma alternativa terapêutica à crescente resistência adquirida pelo parasito, o que levou a malária a ser um problema de saúde pública global. A resistência do *Plasmodium* aos fármacos antimaláricos continua sendo um grande entrave para o controle da epidemia de malária, devido ao processo de evolução natural dos parasitos que sofrem mutações tornando-se mais resistente aos fármacos existentes no mercado (FRANÇA; SANTOS; FIGUEROA-VILLAR, 2008). Desta forma, a busca por novos agentes antimaláricos é de suma importância, haja vista que a malária mata cerca de duas vezes mais que a AIDS (WORLD MALARIA REPORT, 2008).

REFERÊNCIAS

- ABDEI-MOGIB, M. et al. Xanthanolides from *Xanthium Spinosum*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 10, p. 3461-3462, 1991.
- AHMED A.A. et al., Sesquiterpene lactones from *Xanthium pungens*. **Phytochemistry**, v. 2, n. 7, p. 2211-2215, 1990.
- AHN J.W. et al. Isolation of Cytotoxic Compound from the Leaves of *Xanthium strumarium* L. **Natural Product Science**, v.1, n. 1, p. 1-4, 1995.
- ALECRIM, M.G.C. et al. Fracasso no Tratamento da Malária (*P. falciparum*) com Novas Drogas Antimaláricas In: RESUMOS DO XXII CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 1986.(b). Uberaba, **Anais. Uberaba** p. 91.
- ALECRIM, M.G.C. Resistance to *in vivo* and *in vitro* Chemotherapies in the Brazilian Amazonia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, p.153-157, 1986(a).
- AMMAR, N.; FOURNIER. G.C.; SHABANA, W.M. A Study of the Volatile Oil Content of *Xanthium pungens*, Compositae. **Journal Academy of Sciences**, v.5, n. 2, p. 79-80, 1992.
- BACKES, A.; NARDINO, M. **Nomes populares e científicos de plantas do Rio Grande do Sul**. 1 ed. Porto Alegre: Unisinos, 1999. 201 p.
- BAILEY, R.G., NURSTEN, H.E. & McDOWELL. Use of an HPLC photodiode-array detector in a study of the nature of a black tea liquor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.52, p. 509-525, 2004.
- BALINT, G. A. Artemisinin and its derivatives. An important new class of antimalarial agents. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 90, p. 261-265, 2001.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C.A.M. **Química Medicinal: as bases moleculares da ao dos fármacos**. 2 ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- BATISTA, R., BRAGA, F.C., OLIVEIRA, A.B. Quantitative determinacion by HPLC os *ent*-kaurenoic acid grandiflorenic acids in areial pats of *Wedelia paludosa* D.C. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 15, v. 2, p. 119-124, 2005
- BOHLMANN, F. et al. Naturally Occurring Terpene Derivates Xanthanolides from *Xanthium indicum*. **Phytochemistry**, n. 21, v. 6, p. 1441-1443, 1982.
- BRAGA, E.M.; FONTES, C.J.F. *Plasmodium* – Malária, In: NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde. **Situação Epidemiológica da Malária no Brasil**, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de terapêutica da malária. Brasília: **Fundação Nacional de Saúde**, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Ações de controle de endemias: malária: manual para agentes comunitários de saúde e agentes de controle de endemias. Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991. 594p.

BURKAT, A. **Flora Ilustrada de Entre Rios (Argentina)**. Colección Científica del I.N.T.A.. Tomo IV. Buenos Aires. 1974, p. 328-330.

CAMARGO, E.P. Malária, Maleita, Paludismo. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, p. 26-30, 2003.

CAPELA, R. et al. Artemisinin-dipeptidyl vinyl sulfone hybrid molecules: Design, synthesis and preliminary SAR for antiplasmodial activity and falcipain-2 inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 12, p. 3229-3232, 2009.

CASE, D.A. et al. AMBER 10, University of California, San Francisco, 2008.

CASTEEL, D. A. Natural Peroxides. **Natural Product Reports**. v, 16, p. 55-73, 1999.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a Obtenção de Compostos Farmacologicamente Ativos a partir de Plantas Medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

CERDEIRAS M. P. et al. Antimicrobial activity of *Xanthium cavanillesii* extracts **Pharmaceutical Biology**, v. 45, n. 3, p. 251-254, 2007(b).

CERDEIRAS M. P. et al. Estudio de los Metabolitos Antimicrobianos de *Xanthium cavanillesii*. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 6, n. 6, p. 334, 2007(a).

CETNSOY, S.; TAMER, A.; AYDEMIR, M. Investigations on repellent and insecticidal effects of *Xanthium strumarium* L. on Colorado potato beetle *Leptinotarsa decemlineata* say (Col: Chrysomelidae). **Turkish Journal. of Agricultural And Forestry**, v. 22, n. 6, p. 543-552, 1998.

CHANG, H.M; BUT, P.P.H. **Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica**. v. 1. Singapore: World Scientific, 1986, p. 589.

CHIRIGIU, L. et al. Content of metals in the seeds of *Xanthium spinosum* and *Xanthium italicum*. **Fitoterapia**, n. 74, p. 168-169, 2003.

COLE R.J. et al. Isolation and redefinition of the toxic agent from cocklebur (*Xanthium strumarium*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.28, n. 6, p.1330-1332, 1980.

COLODEL E. M., DRIEMEIER D., PILATI C. Intoxicação experimental pelos frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 20, n.1, p. 31-38, 2000.

CORRÊA, M.P. & PENNA, L.A. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. v. 6, 1984. p. 255.

COUTO, A.A. et al. Resistência *in vitro* de Cepas do *P. falciparum* Isoladas no Sul do Estado do Pará, Diferentes Períodos: emergência de casos de multirresistência. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 26, p. 5-9, 1993.

COWAN, M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 4, n. 4, p. 564-582, 1999.

CRAIG JC. et al, Isolation and Identification of the Hypoglycemic Agent, Carboxyatractylate from *Xanthium strumarium*. **Phytochemistry**, v. 15, n. 7, p. 1178, 1976.

CUMANDA, J.; MARINONI, G. New Sesquiterpenes from *Xanthium catharticum*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 460-465, 1991.

DAVICINO, R. et al. Actividad antifungica de extratos de plantas usadas em medicina popular na Argentina. **Revista Peruana de Biología**, v. 14, n. 2, p 247-251, 2007

DE RISCALA E.C. et al. Xanthanolides and a bis-norxanthanolide from *Xanthium cavanillesii*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 1588-1589, 1994.

DEL VITTO L.A.; PETENATTI, E.M.; PETENATTI, M.E. Recursos Herbolarios de San Luis (Republica Argentina). **Multequina**, n.6, p. 49-66, 1997

DHAR et al. Screening of Indian Plants for Biological Activity. Part I, **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 6, p. 232-247, 1968.

DIAS, L. R. S.; FREITAS, A. C. C. Malária: uma revisão, **Bio-ciência/Bio-Science-Revista Científica do CCM**, n. 9, p. 39-44, 1997.

Diccionario de las Ciencias Agropecuarias, 1 ed. Córdoba: Encuentro Grupo Editor, 2006. 496p.

DOBHAL et al., Ferulic acid esters from *Plumeria bicolor*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 319-321, 1999.

DONDORP A.M. et al. Artemisinin Resistance in Plasmodiumfalciparum Malaria. **The New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 5, p. 455-467, 2009.

DRIEMEIER, D. et al. Spontaneous Poisoning by the Burs of *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) in Cattle in Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 12-18, 1999.

ECKSTEIN-LUDWIG U. et al., Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 424, p. 957-960, 2003.

FAVIER, L.S. et al. Anti-Ulcerogenic Activity of Xanthanolide Sesquiterpenes from *Xanthium cavanillesii* in Rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n.3, p. 260-267, 2005.

FAVIER, L.S. et al. Determination and assay validation of the bioactive sesquiterpene lactone xanthantin isolated from *Xanthium cavanillesii*. **Pharmazie**, v. 61, n. 12, p. 981-984, 2006.

FENNER R et al. Plantas Utilizadas na Medicina Popular Brasileira com Potencial Atividade Antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 1-26, 2006.

FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, n. 1, p. 229-239, 2010.

FRANÇA, T. C. C.; SANTOS, M. G dos; FIGUEROA-VILLAR. J. D. Malária. Aspectos Históricos e Quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1271-1278, 2008.

FRÉDÉRICH, M.; DOGNÉ, J. M.; ANGENOT, L.; MOL, P. D. New Trends in Anti-Malarial Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 9, p 1435-1456, 2002.

GALLO, G.G. **Plantas Tóxicas para el Ganado en Cone Sur de América**. Argentina: Buenos Aires Ed. Hemisfério Sur. S.A, 1977.

GINESTA-PERIS E.; GARCIA-BREIJO F.J.; PRIMO-YÚFERA E. Antimicrobial Activity of Xanthantin from *Xanthium spinosum* L. **Letters in Applied Microbiology**, v. 18, n. 206, p. 206-208, 1994.

GOLDSMITH-FSCHMAN, S.; HONIG, B. Structural genomics: computational methods for structure analyses. **Protein Science**. v. 12, p. 1813-1821, 2003.

GROTH, D. Identificação Botânica de Plantas e Sementes de Espécies Invasoras na Cultura da Soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 2, n. 3, p. 59-95, 1980.

GUEx, N.; PEITSCH, M.C.; SWISS-MODEL and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v.18, n. 15, p. 2714-27-23, 1997.

HAN, T. et al. Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of *Xanthium* fruit (Cang-Er-Zi) by high-performance liquid chromatography-diode-array detection tandem mass spectrometry method. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, p. 272-278, 2009.

HAN, T. et al. Authentication and quantitative analysis on the chemical profile of *Xanthium* fruit (Cang-Er-Zi) by high-performance liquid chromatography-diode-array detection tandem mass spectrometry method. **Analytica Chimica Acta**, v. 634, n. 2, p. 272-278, 2009.

HAN, T. et al.: Bioactivity-Guided Fractionation for Anti-Inflammatory and Analgesic Properties and Constituents of *Xanthium strumarium* L. **Phytomedicine**, v.14, n. 12, p. 825-8294, 2007.

HARADA et al. Isolation and Identification of Xanthanin as an Anti-Attaching Repellent Against Blue Mussel, **Agricultural Biological Chemistry**, v.49, n. 6, p. 1887-1888, 1985.

HSU FL.; CHEN, YC.; CHENG J-T. Caffeic acid as active principle from the fruit of *Xanthium strumarium* to lower plasma glucose in diabetic rats. **Planta Medica**, v, 66, p. 228-230, 2000.

HSU, H.Y.; CHEN, Y.P.; HONG, M. **Chemistry of Chinese Herb Drug**, Vol. 2. Taipei: Brion Research Intitute, 1979, p. 859

JAWAD, A.L.M.; MAHMOUD, M.J.; AL-NAIB, A. Antimicrobial Activity of *Xanthium strumarium* Extracts. **Fitoterapia**, v. 50, n.3, p. 220-221, 1988.

JEFFORD C. W. Peroxidic Antimalarials. In: **Advances in Drug Research**, v. 29, p. 271-325, 1997.

JI H-F., SHEN L. Interactions of curcumin with the PfATP6 model and the implications for its antimalarial mechanism. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 9, p. 2453-2455, 2009.

JOSHI, S.P.; ROJATKAR, S.R.; NAGASAMPAGI, B.A. Antimalarial Activity of *Xanthium strumarium*. **Journal of Medical and Aromatic Plants Science**, v. 19, n. 2, p. 366-368, 1997.

JUNG, M.; KIM, H.; NAM, K. Y.; NO, K. T. Three-dimensional structure of Plasmodium falciparum Ca²⁺-ATPase (PfATP6) and docking of artemisinin derivatives to PfATP6. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 12, p. 2994-2997, 2005.

KANEGUSUKU et al. Cytotoxic, hypoglycemic activity and phytochemical analysis of *Rubus imperialis* (Rosaceae). **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 57c, p. 272-276, 2002.

KAWASU, K., NAKAJIMA, S., ARIWA, M. Xanthumin and 8-epi-xanthantin as insect development inhibitors from *Xanthium canadense* Mill. **Experientia**, v. 35, n. 10, p. 1294-1295, 1979.

KHAFAGY, S.M.; METWALLY, A.M. Isolation of a Crystalline Sesquiterpenic ketilactone from *Xanthium occidentale*. **Planta Medica**, v. 18, n. 4, p. 318-325, 1970.

KIM Y.S. et al., Two Cytotoxic Sesquiterpene Lactones from the Leaves of *Xanthium strumarium* and their in vitro Inhibitory Activity on Farnesyltransferase. **Planta Medica**, v. 69, p. 375-377, 2003.

KIM, In-Tae, et al. Methanol Extract of *Xanthium strumarium* L. Possesses Anti-Inflammatory and Anti-Nociceptive Activities. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n.1, p. 94-100, 2005.

KIRMIZIBEKMEZ et al. Inhibiting Activities of the Secondary Metabolites of *Phlomis brunneogaleata* against Parasitic Protozoa and Plasmodial Enoyl-ACP Redutase, A. Crucial Enzyme in Fatty Acid Biosynthesis, **Planta Medica**, v. 70, p. 711-717, 2004.

KIRTIKAR, R.B.; BASU, B.D. *Xanthium strumarium*. **Indian Medical Plants II**. p. 1356, 1933.

KIS, I.; RACZ, G.; Glycoside Contents of Sitosterol from Leaves of *Xanthium spinosum* and *Xanthium italicum*. **Farmacia-Bucharest (Farmacia)**, v. 36, n. 1, p. 55-62, 1988.

KISSMANN, K.G. & GROTH, D. **Plantas infestantes e nocivas**. São Paulo: BASF-Indústrias Químicas, São Paulo, v.2, 798 p. 1992.

KLAYMAN, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): an antimalarial drug from China. **Science**, v. 228, p. 1049-1055, 1985.

KOVÁCS, A. et al. Xanthanolides with antitumor activity from *Xanthium italicum*. **Z. Naturforsch**, v. 64c, p. 343-349, 2009

KUPIECKI, F.P.; OGZEWALLA, C.D.; SCHELL, F.M. Isolation and Charaterization of a Hypoglycemic Agent from *Xanthium strumarium*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 63, n. 7, p. 1166-1167, 1974.

LACERDA, M.V.G. Idiopathic Thrombocytopenic Purpura Due to *vivax* Malaria in the Brazilian Amazon. **Acta Tropical** .v. 90, p. 187-190, 2004.

LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**.v, 26, p. 283-291, 1993.

LAVAUULT, M. et al. Antileishmanial and Antifungal Activities of Xanthanolides Isolated from *Xanthium macrocarpum*. **Fitoterapia**. v. 7, n. 3-4, p. 363-366, 2005.

LEE, M.C.; DUAN, Y. Distinguish protein decoys by using a scoring function based on a new AMBER force field, short molecular dynamics simulations, and the generalized born solvent model. **Proteins**, v. 55, n. 3, p. 620-634, 2004

LEITE, F. H. A. et al. **Natural peroxides from brazilian flora**: conformational analysis and complexation with heme. In: XIII Simpósio Brasileiro de Química Teórica, 2005.

LHULLIER, C.; HORTA, P.A.; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158-163, 2006

LIU, R.; LI, A.; SUN, A. Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Baill. by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1052, n. 1-2, p. 217-221, 2004.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais**. São Paulo, 1991, 441 p.

LORETTI A.P. et al. Intoxicação Experimental pelos Frutos de *Xanthium cavanillesii* (Asteraceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 19, v. 2, p. 71-78, 1998.

LU, Y. & FOO L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 187-194, 1997.

LUM, J. K. Malaria Dispersal among Islandhuman Mediated from *Plasmodium falciparum* gene flow in Vanuatu. Melanesia. **Acta Tropica**, v. 90, p. 181-185, 2004.

LUO, X. D.; SHEN, C. C. The Chemistry, Pharmacology, and Clinical Applications of Qinghaosu (Artemisinin) and Its Derivatives. **Medicinal research reviews**, v. 7, p. 29-52, 1987.

MA, Ying-Tsun, et al. Thiazinedione from *Xanthium strumarium*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 6, p. 1083-1085, 1998.

MACLEOD, J.K., MOLLER, P.D.R. Two toxic kaurene glycosides from the burrs of *Xanthium pungens*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 4, p. 451-455, 1990.

MAHMOUD, A.A. Xanthanolides and Xanthane Epoxi derives from *Xanthium strumarium*. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 724-727, 1998.

MALIK, M.S.; SANGWAN, N.K.; DHINDSA, K.S. Xantonolides from *Xanthium Strumarium*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 1, p. 206-207, 1993.

MANFRON, M. P. ***Xanthium cavanillesii* Schouw (carrapicho): avaliação fitoquímica, determinação da toxicidade e da atividade antimicrobiana**. 1997. 91p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, 1997.

MARINHO, V. M. C.; SEIDL, P. R.; LONGO, W. P.. O papel governamental como ator essencial para a P&D de medicamentos um estudo de caso. **Química Nova**, n. 31, n. 7, p. 1912-1917, 2008.

MCMILLAN C. Experimental Hybridization of *Xanthium-Strumarium* Compositae from Asia and America Part 1 Responses of F-1 Hybrids to Photoperiod and Temperature. **American Journal of Botany**, v. 62, p. 41-47, 1975b.

MCMILLAN C. The *Xanthium-Strumarium* Complexes in Australia. **Australian Journal of Botany** , v. 23, p. 173-92, 1975a

McMILLAN et al., Systematic implication of the sesquiterpene lactones in the strumarium morphological complex (*Xanthium strumarium*, Asteraceae). **Biochemical. Systematics and Ecology**. v.2, p. 181-184, 1975.

MÉNDEZ, M. del C.; dos SANTOS, R.C.; RIETE-CORREA, F. Intoxication by *Xanthium cavanillesii* in the Cattle and Sheep in Southern Brazil. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 40, n. 3, p. 144-148, 1998.

MESHNICK, S. R. et al. Second-generation Antimalarial Endoperoxides. **Parasitology Today**, v. 12, p.79-82, 1996.

METWALLY, A.M., KHAFAGY, S.M., EL-NAGGAR, S.F. Phytochemical investigation of *Xanthium spinosum* L. *Pharmazie*, v. 29, n. 6, p. 415-417, 1974.

MEYER, B.N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MONCOQ, K.; TRIEBER, C. A.; YOUNG, H. S. The Molecular Basis for Cyclopiazonic Acid Inhibition of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 282, n. 13, p. 9748-9757, 2007.

MUKHEJI, S.; BANERJEE, A.K., MITRA, B.M. Plant Antitumor Agents, **Indian Meterin Medica**, vol. 1., Bombay: Popular Prakashan, 1970, 1298p.

MUSSI, M.M. **Estudio Químico y Evaluación Farmacológica de *Xanthium cavanillesii* Schouw**. 2001. 47p. Dissertação (Mestrado em Química Farmacéutica). Universidad de La Habana. Habana, 2001.

NADKARNI, A. K. *Xanthium strumarium*. **Indian Materia Medica**, Vol. I. Bombay: Popular Prakashan, 1954, 1298 p.

NAIDENOVA et al.; Sesquiterpene Lactones in *Xanthium strumarium* Asteraceae (Compositae). **Probl. Farm.** v. 10, p. 39-45, 1982.

NEVES, P. D. **Parasitologia Humana**. Rio de Janeiro: Livraria Atheneu Editora, 1998.

NICK, A.; RALI, T. O. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 49, v.3, p.147-156, 1995.

NIEVES et al., Efecto diurético del *Xanthium strumarium* L. (guizajo de caballo). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 4, n. 1, p. 22-25, 1999.

NOELLI, F.S. **Múltiplos usos de espécies vegetais pela farmacologia guarani através de informações históricas**. In: I Simpósio de Etnobiologia e Etnoecologia, 1996.

OLESEN, C. et al. The structural basis of calcium transport by the calcium pump. **Nature**, v. 10, p. 1036-1044, 2007.

OLIVARO, C., VAZQUEZ, A. A new bioactive xanthonolide from *Xanthium cavanillesii*. **Natural Product Research**, v. 23, n. 4, p. 388-392, 2009.

Organização Mundial de Saúde (OMS). Disponível em: <<http://www.who.int/inf-fs/en/fact094.html>>. Acesso em: 05 de fevereiro 2009.

PATRICK, G.L., **An Introduction to Medicinal Chemistry**, 4ª ed., Oxford, 2009.

PAYROL, J.A. *et al.* Actividad farmacológica preliminar del fruto de *Bromelia pinguim* L. (piña de ratón). **Revista Cubana Farmacêutica**, v. 35, n.1, p.56-60, 2001.

PEDERSEN, B.P. *et al.*, Crystal structure of the plasma membrane proton pump. **Nature**, v. 450, n. 13, p. 1111-1115, 2007.

Pharmacopoeia PR China I (English Edition), Beijing: Chemical Industry Press, p. 91-92, 2000.

PIACENTE, S. *et al.* Sesquiterpene and Diterpene Glycosides from *Xanthium spinosum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 5, p. 1357-1360, 1996.

PINEL *et al.*, Multi-Grams Scale Purification of Xanthalolides from *Xanthium macrocarpum*. Centrifugal Particion Chromatography versus Silica Gel Chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1151, p. 14-19, 2007.

PRETTO, J.B. **Potencial Antimicrobiano de Extratos, Frações e Compostos Puros Obtidos de Algumas Plantas da Flora Catarinense**. 2005. 74p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de Vale do Itajaí, 2005.

QUIN, L. *et al.* A New Thiazinedione from *Xanthium strumarium*. **Fitoterapia**, v.77, p. 245-246, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

REGASINI, L. O. *et al.* Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química. Nova**, v. 31, n. 4, p. 802-806, 2008.

RIET-CORREA F. *et al.* **Atividade do Laboratório Regional de Diagnostico e Doenças da área de Influenza no Período 1978-1982**. Documento 4. Editora da Universidade de Pelotas, Pelotas, p. 87-88, 1983.

RISCALA, E. C. *de et al.*, Xanthonolides and Bis-norxanthalolides from *Xanthium cavanillesii*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 6, p. 1588-1589, 1994.

ROING, J.T. **Plantas Mediciniais, Aromáticas ou Venenosas de Cuba**. La Habana: Ed.Cientifico-Tecnica, p. 495-497, 1998.

ROUSSAKIS et al. Cytotoxic of Xanthantin and Crude Extracts of *Xanthium strumarium*. **Planta Medica**, v.60, p. 473-474, 1994.

RUIZ, A.L.T.G et al.. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 2005

SÁ et al. Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives in vitro against *Plasmodium falciparum* and in vivo in *P. berghei*-infected mice. **Parasitology Researche**, v. 105, n. 1, p. 275-279, 2009.

SALINAS, A.; RUIZ, R. E. L. de; RUIZ. Esteroles, Flavonoides y Lactonas Sesquiterpénicas Aisladas de *Xanthium spinosum* (L.) Cronquist (Asteraceae). **Acta Farm. Bonaerense**, v.17, n.4, p. 297-300, 1998.

SALO, D.P.; PASHCHENKO,M.M.; PIVNENKO, G.P. Medicinal Forms from the Plant of *Xanthium riparicum* and Preliminary Data of their Experimental study. **Farmatsevtichnii Zhurnal (Kiev)**, v. 28, n.1, p. 68-70, 1973.

SANTOS FILHO, O.A.; ALENCASTRO, R.B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

SATO et al.; A Xanthanolate with Potent Antibacterial Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, n. 10, p. 1042-1044, 1997.

SAXENA et al. Antimarial Agents from *P Sources*. **Current Science**, v. 85, n.9, p. 1314-1329, 2003.

SAXENA, V.K.; MONDAL, S.K. A Xantonolide from *Xanthium strumarium*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1880-1882, 1994.

SCHERER, R. et al. *Xanthium strumarium* L. antimicrobial activity and carboxyatractyloside analysis through electrospray ionization mass spectrometry. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.11, n. 2, p. 159-163, 2009

SCHMIDT, C. et al. Biological studies on Brazilian plants in wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 523 -532, 2009.

SHARMA, S. R. et al. Anthelmintic activity of *Xanthium strumarium* against *Haemonchus contortus* infection in sheep. **Journal of Animal Science**, v. 73, n. 4, p. 342-422, 2003.

SHEU S-J et al. Determination of Xanthii Constituents by High-Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 11, n. 1, p. 76-71, 2003.

SILVA, T.M.S. Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n 1, p. 35-38, 2007

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFSC/UFRGS, 2004. 1102p.

SIQUEIRA, J.M. et al. Estudo Fitoquímico das Casca do Caule de *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, Biomonitorado pelo Ensaio de Toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v.24, n.2, p. 185-187, 2001.

SIQUEIRA, J.M. et al. Estudo fitoquímico de Unoposis lindmanii Annonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de das casca do caule de *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v.21, n.5, p. 557-559, 1998.

STUART, B.P.; COLE, R.J.; GOSSER, H.S. Cocklebur (*Xanthium strumarium* var. *strumarium*) Intoxication in Swine: review and redefinition of the toxic principle. **Veterinary Pathology**, v. 18, p. 368-383, 1981.

TAHARA, T. et al. Structures of xantanolides A and B, two new guaianolides from *Xanthium canadense* Mill. **Tetrahedron Letters**, v. 21, n. 19, p. 1861-1862, 1980.

TAHER H.; UBIERGO, G.; TALENTI E.C.J. Constituents of the Essential Oil of *Xanthium cavanillesii*. **Journal of Natural Products**, v. 48, p. 857, 1985.

TALAKAL T.S.; DWIVEDI S.K., SHARMA S.R. J.. *In vitro* and *in vivo* anti-trypanosomal activity of *Xanthium strumarium* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 141-145, 1995.

TANAKA, N et al., Chemische Untersuchungem der Inhaltsstoffe von *Xanthium canadense* Mill. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 24, n. 6, p. 1419-1421, 1976.

TARANTO, A. .G.; CARNEIRO, J. W. M.; OLIVEIRA, F. G.; ARAUJO, M. T.; CORREA, C. R. The role of C-centered radicals on the mechanism of action of artemisinin. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, n. 580, p. 207-215, 2002.

TARANTO, A. G. ; CARNEIRO, J.W. de M.; ARAUJO, M.T de ; LEITE, F.H.A. Interaction between artemisinin and heme. A Density Functional Theory study of structures and interaction energies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 5021-5029, 2008.

TARANTO, A. G. ; CARNEIRO, J.W. de M.; ARAUJO, M.T. de . DFT study of the reductive decomposition of artemisinin. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**,v. 14, n. 5, p. 1546-1557, 2006. (b)

TARANTO, A. G. ; CARNEIRO, J.W. de M.; ARAUJO, M.T. de . Estudo sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos. Parte II. **Sitientibus. Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana**, 2007.

TARANTO, A. G. ; CARNEIRO, J.W. de M.; ARAUJO, M.T. de; SILVA, B.G.M. Estudo sobre o mecanismo de ação da artemisinina e dos endoperóxidos, a mais nova classe de agentes antimaláricos. **Sitientibus. Revista da Universidade Estadual de Feira de Santana**, v. 34, p. 47-58, 2006 (a).

TARANTO, A. G. ; CARNEIRO, José Walkimar de Mesquita ; OLIVEIRA, F. G. . MNDO/d calculations on the interaction between artemisinin and heme. **Journal of Molecular Structure (Theochem)**, v. 539, n. APR, p. 267-272, 2001.

TARANTO, A. G. **Estudo do mecanismo de fragmentação da artemisinina**, 2003. 150 f. Tese de doutorado. Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro.

TAVARES, L. A. e FERREIRA, A. G. Análises Quali- e Quantitativa de Cafés Comerciais Via Ressonância Magnética Nuclear. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 911-915, 2006.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC Ed., 2007. 460p

The World Health Report 2002: reducing risks, promoting healthy life. Geneva, **World Health Organization (WHO)**, 2002.

TROTT, O., OLSON, A.J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**.v. 31, n.2, p. 455-461, 2009.

TSANKOVA, E.T. et al. Xanthanolides of *Xanthium italicum* Moretti and their Biological Activity. **Journal of Biosciences**, v. 49, n. 1-2, p. 154-155, 1994.

VERONESI, R. **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WEISZ, G.M., KAMMERER, D.R., CARLE, R. Identification and quantification of phenolic compounds from sunflower (*Helianthus annuus* L.) kernels and shells by HPLC-DAD/ESI-MSⁿ. **Food Chemistry**, v.115, p. 758-765, 2009.

WHO.**World Malaria Report**, 2008.

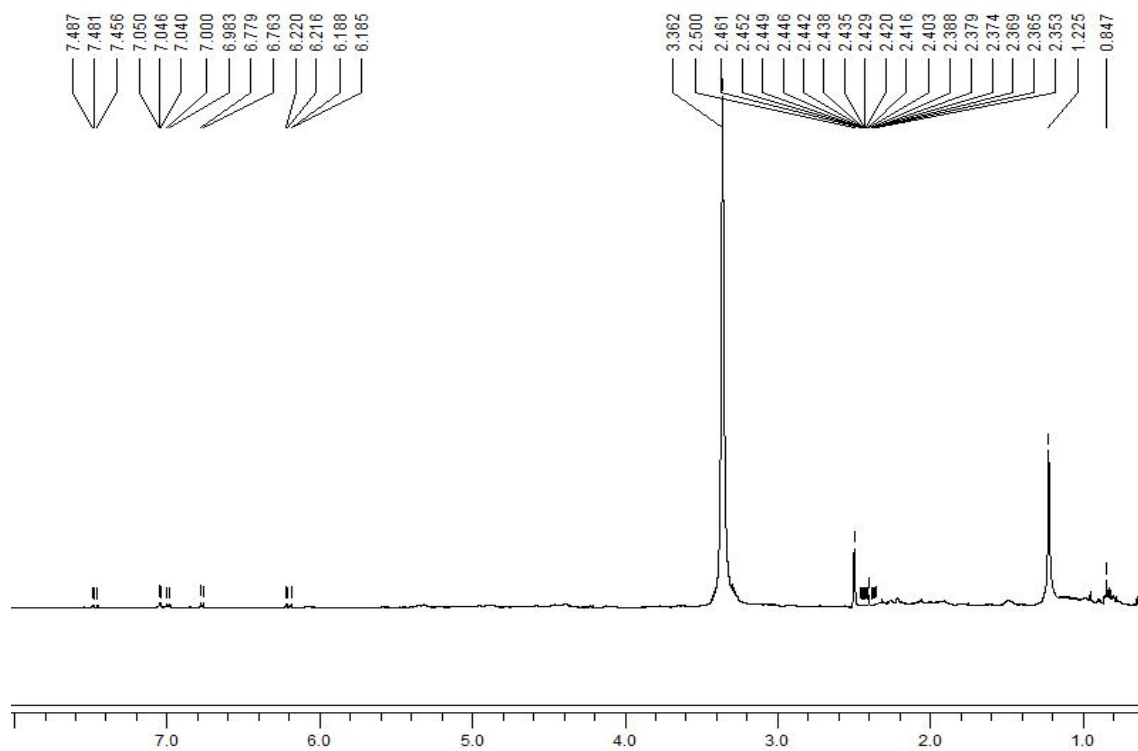
WITTE, S.T et al. Cocklebur Toxicosis in Cattle Associated with theC of mature *Xanthium strumarium*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 2, n. 4, p. 263-267, 1990.

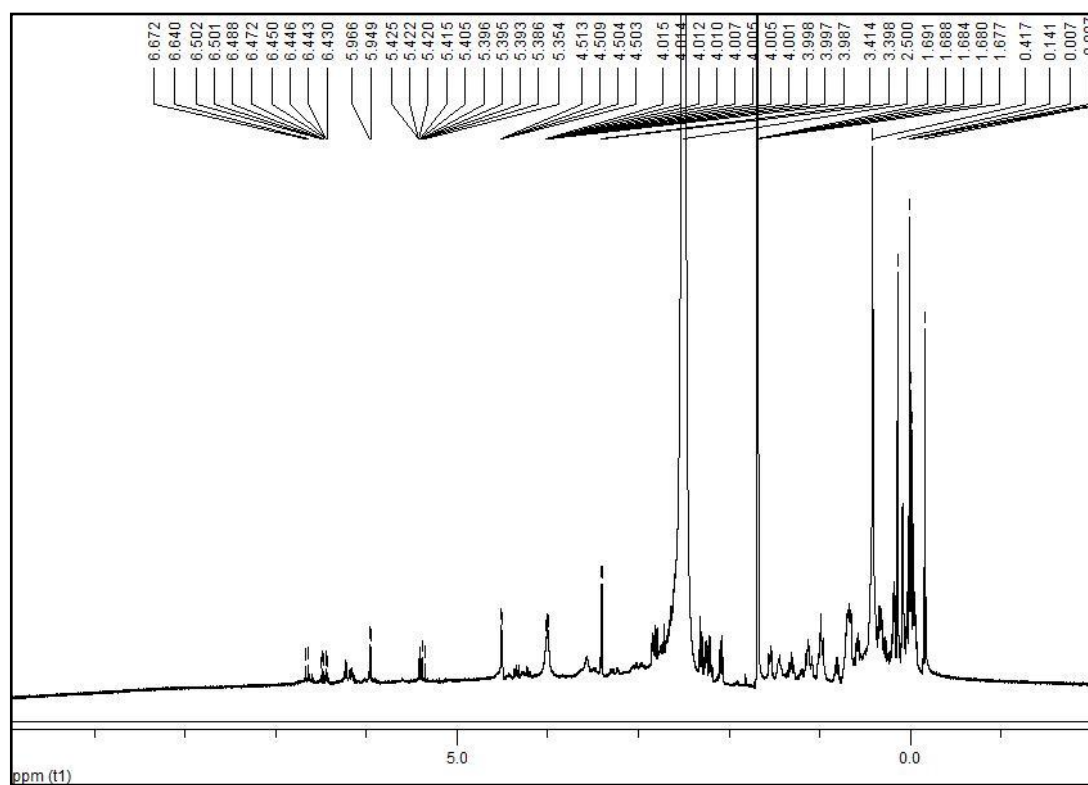
WU, H.; KWONG, P.D.; HENDRICKSON, W.A. Dimeric association and segmental variability in the structure of human CD4. **Nature**. v. 387, p. 527-530, 1997.

YAO L. et al. HPLC Analyses of Flavonols and phenolic acids in the Fresh Young Shoots of Tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. **Food Chemistry**, n. 84, p. 253-663, 2004.

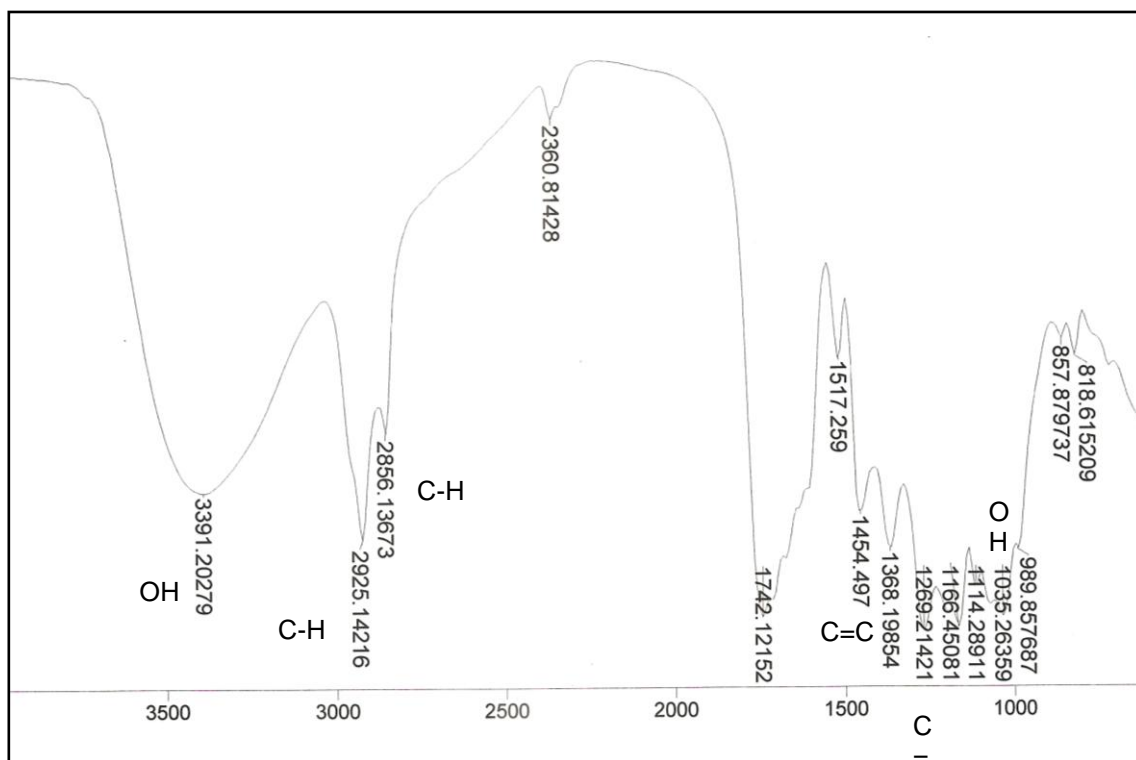
YOON, J.H. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by xanthanolides isolated from *Xanthim strumarium*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 2179-2182, 2008.

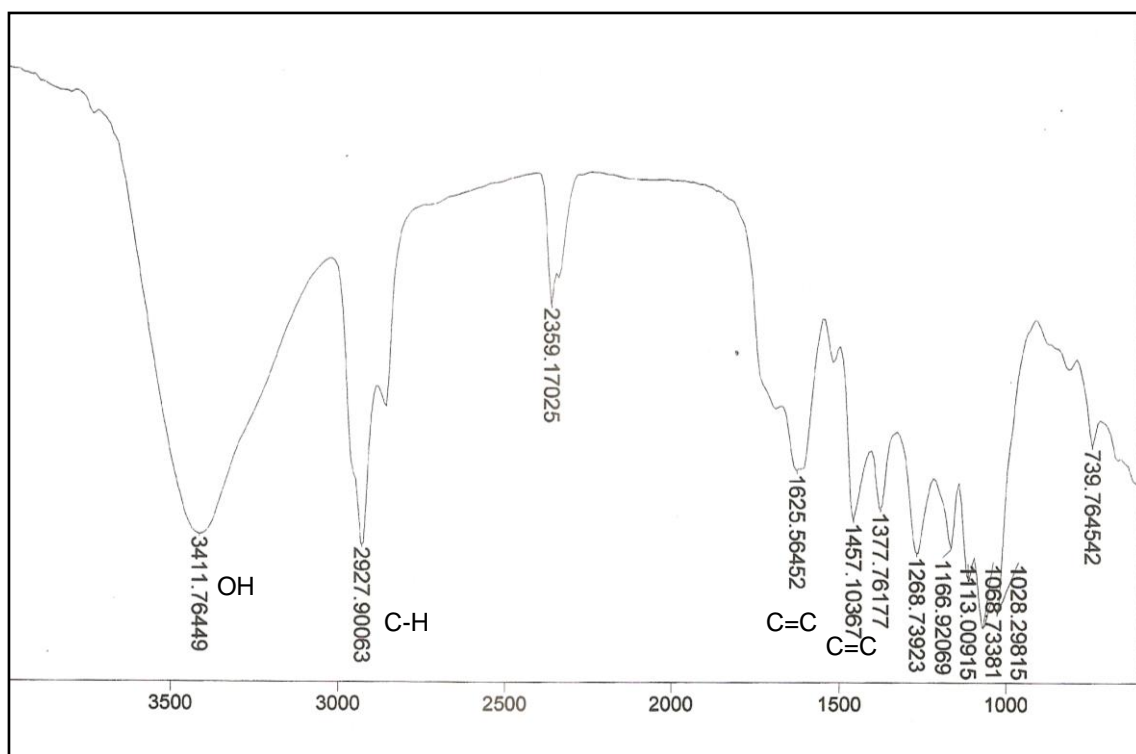
ANEXOS

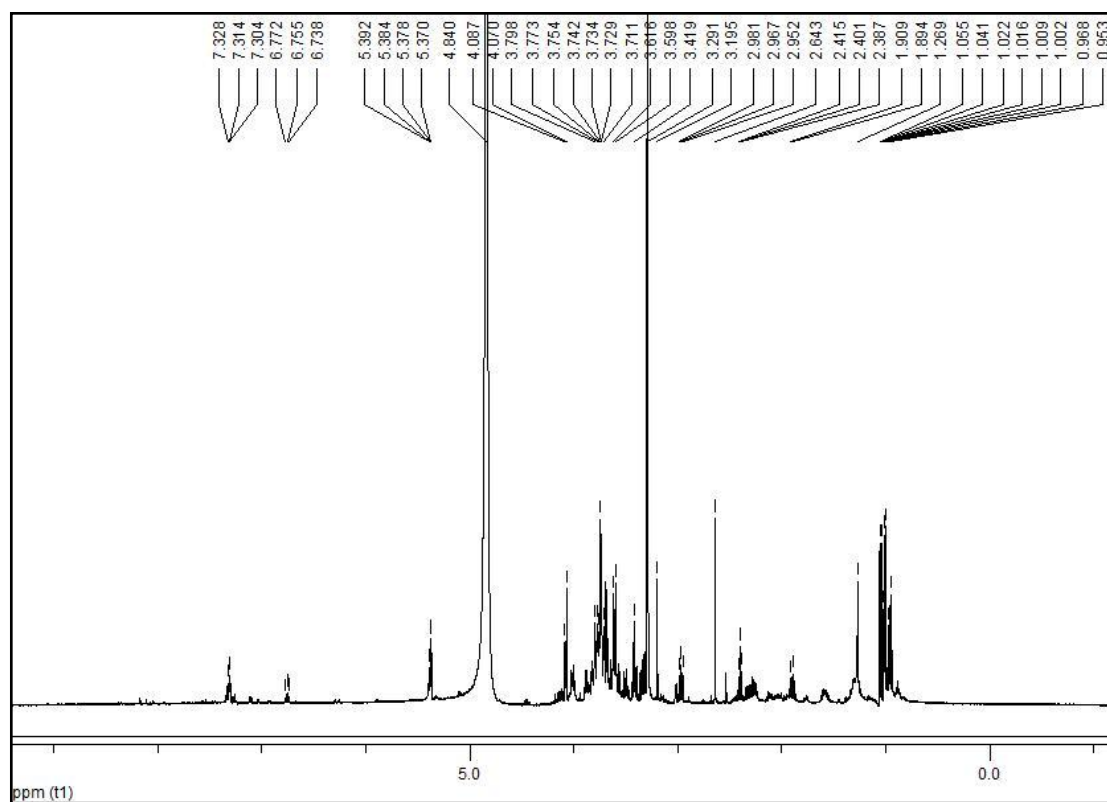
ANEXO I: Espectro de RMN ^1H da subfração X2

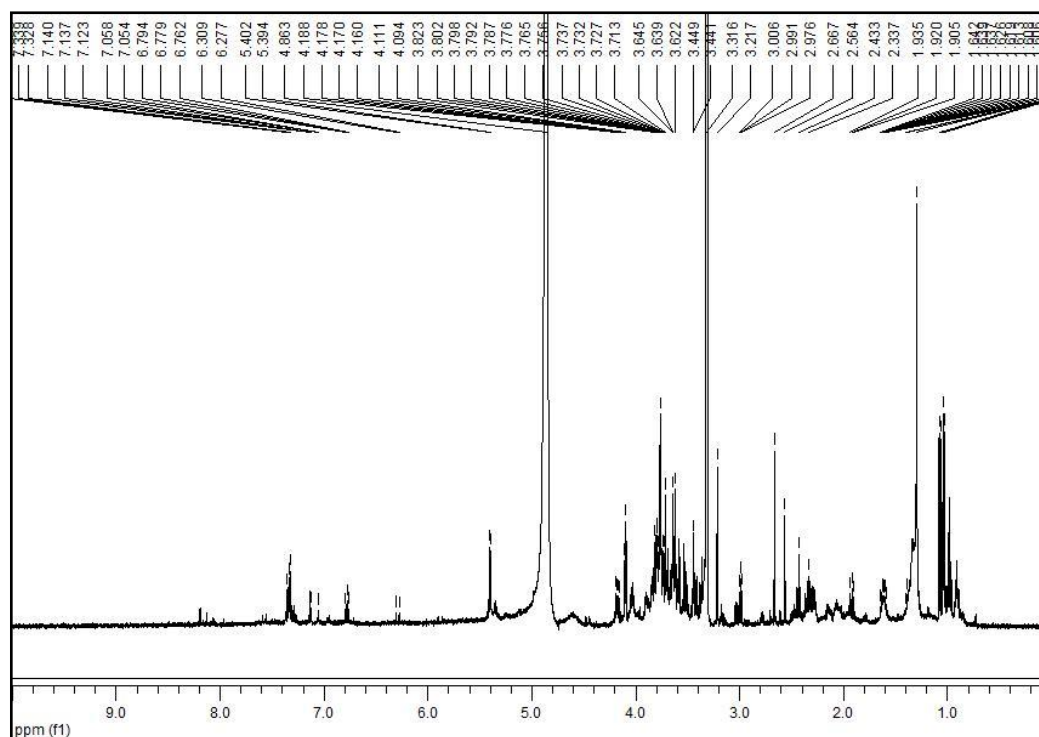
ANEXO II: Espectro de RMN ^1H da subfração X5

ANEXO III: Espectro de IV da subfração X2

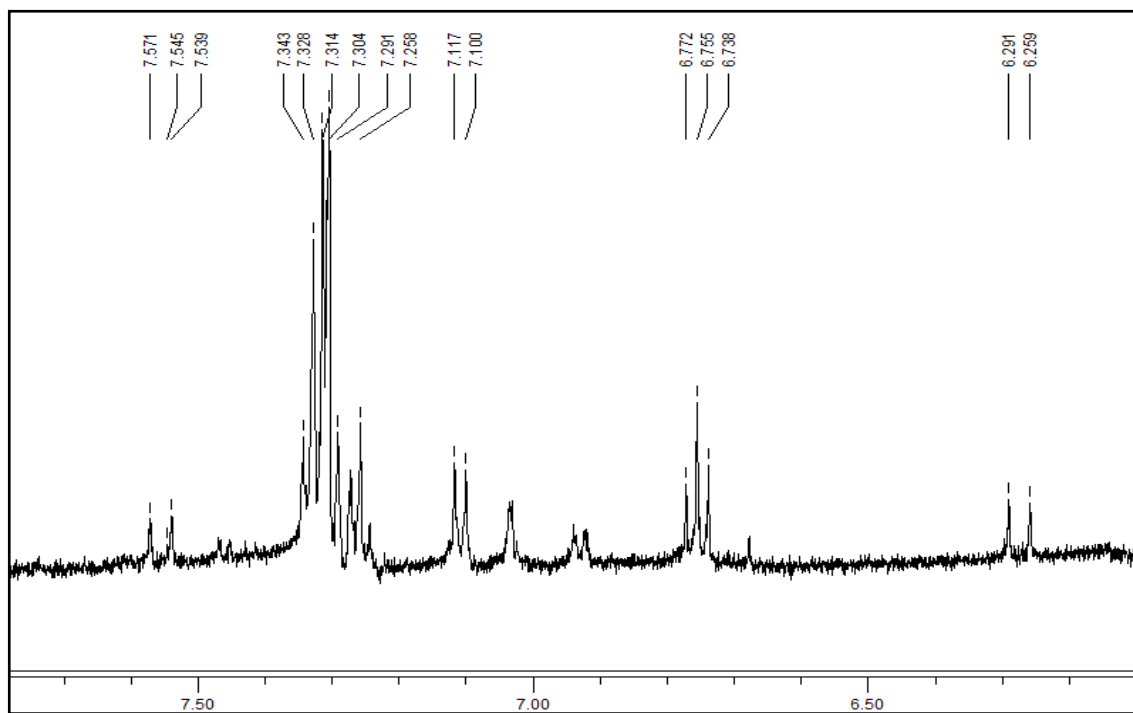


ANEXO IV: Espectro de IV da subfração X5

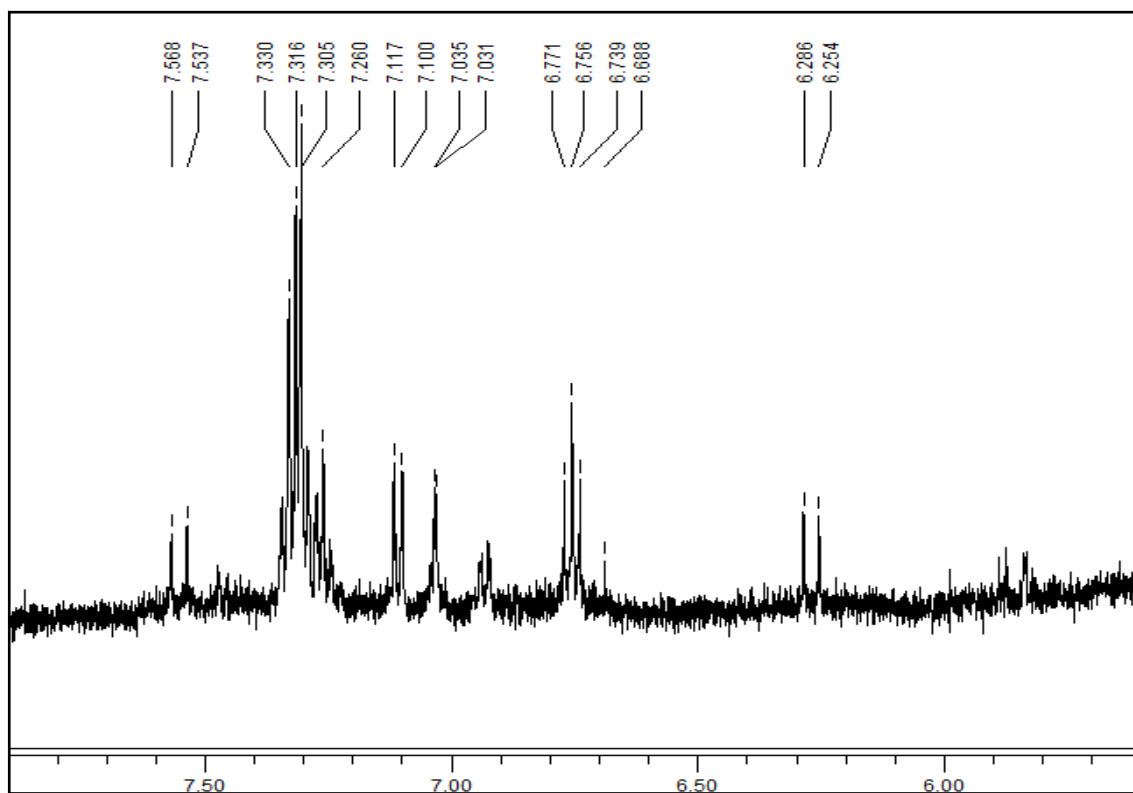
ANEXO V: Espectro de RMN ^1H da subfração X6

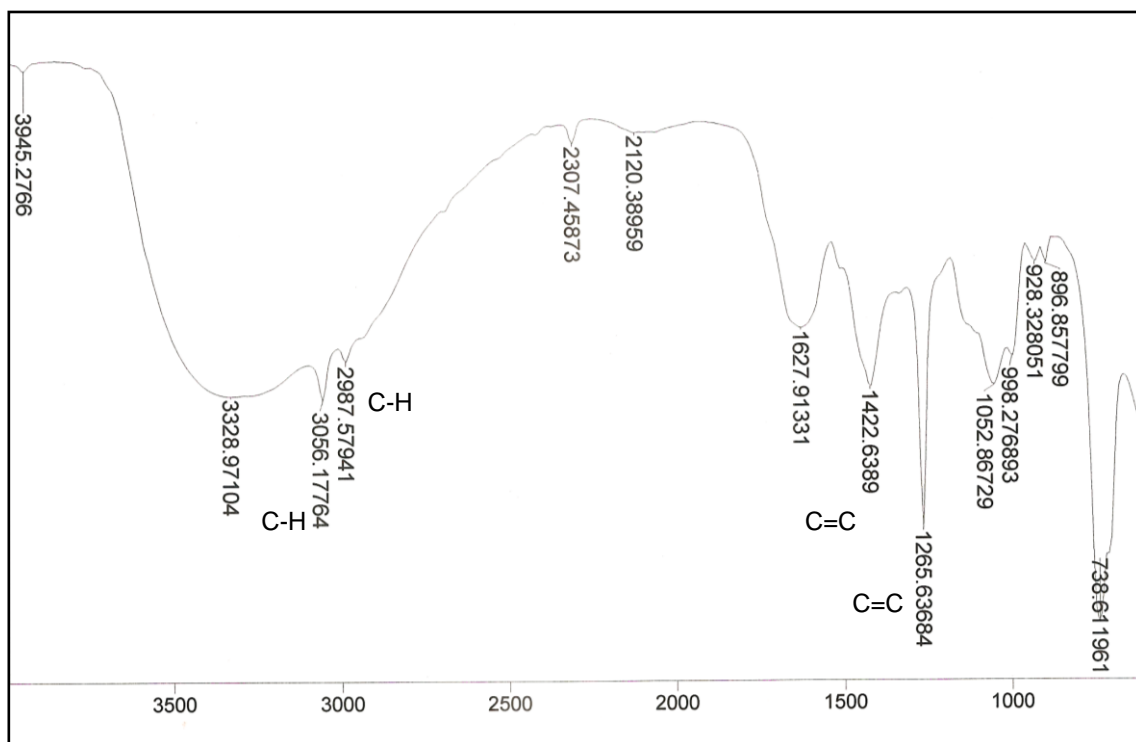
ANEXO VI: Espectro de RMN ^1H da subfração X7

ANEXO VII: Ampliação do espectro de RMN DE ^1H da subfração X6 correspondente a região de duplas e aromáticos característicos de ácidos fenólicos

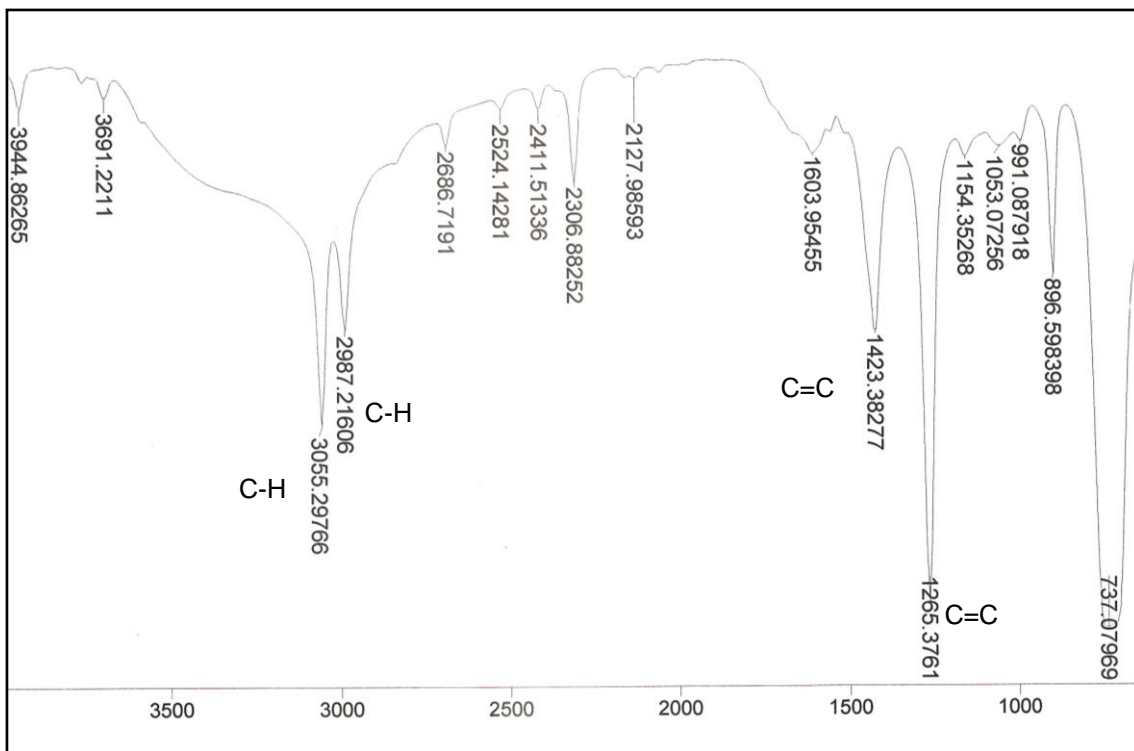


ANEXO VIII: Ampliação do espectro de RMN DE ^1H da subfração X7 correspondente a região de duplas e aromáticos característicos de ácidos fenólicos

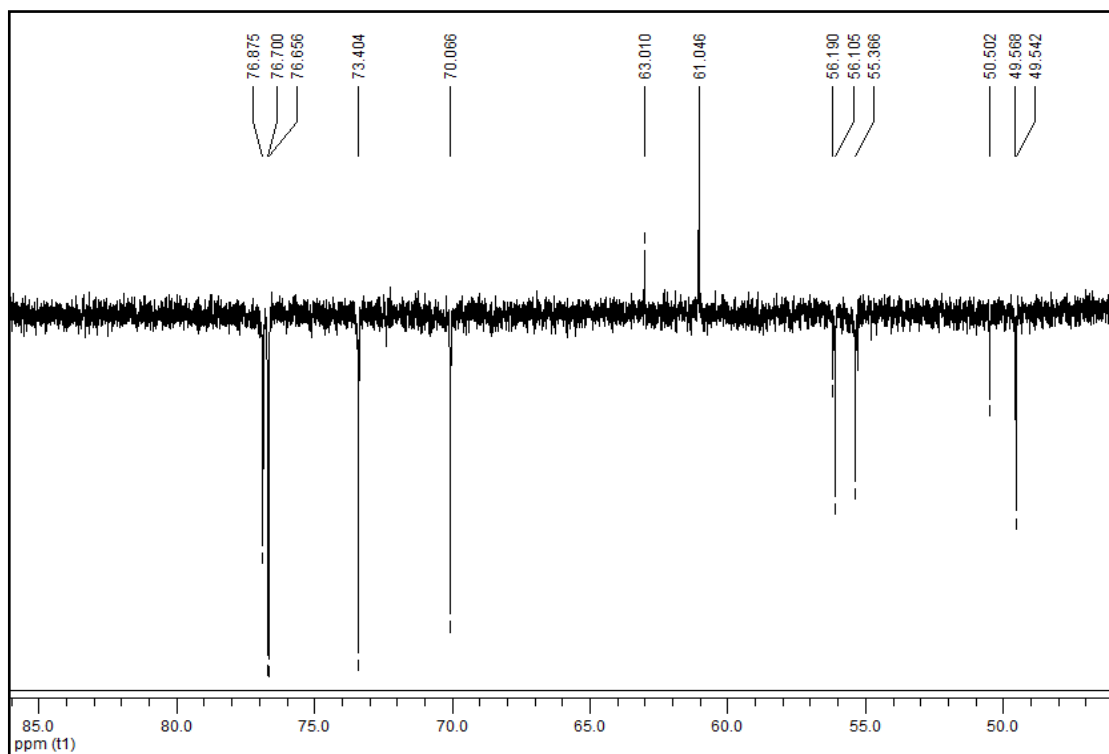


ANEXO IX: Espectro de IV da subfração X6

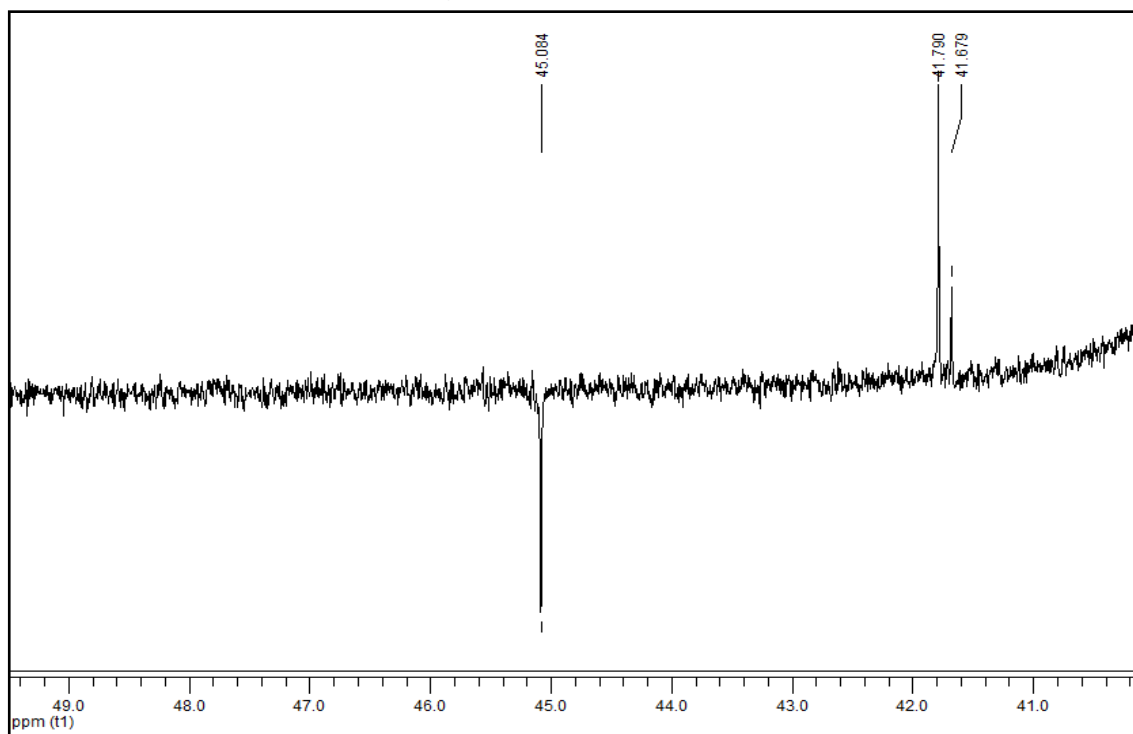
ANEXO X: Espectro de IV da subfração X7



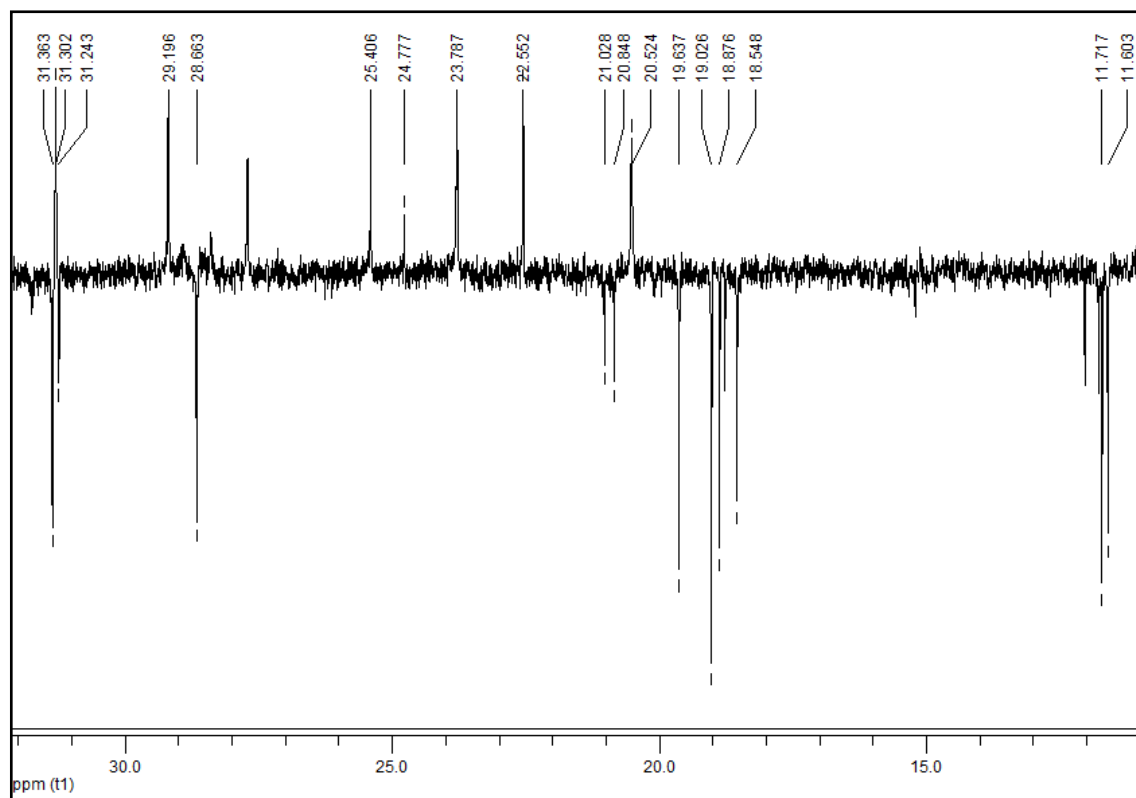
ANEXO XI: Ampliação do espectro de RMN APT dos sinais ^{13}C correspondente ao diterpeno caurano presente na fração XC10



Ampliação do espectro RMN APT indicando sinais ^{13}C correspondentes a região entre 50-90 ppm

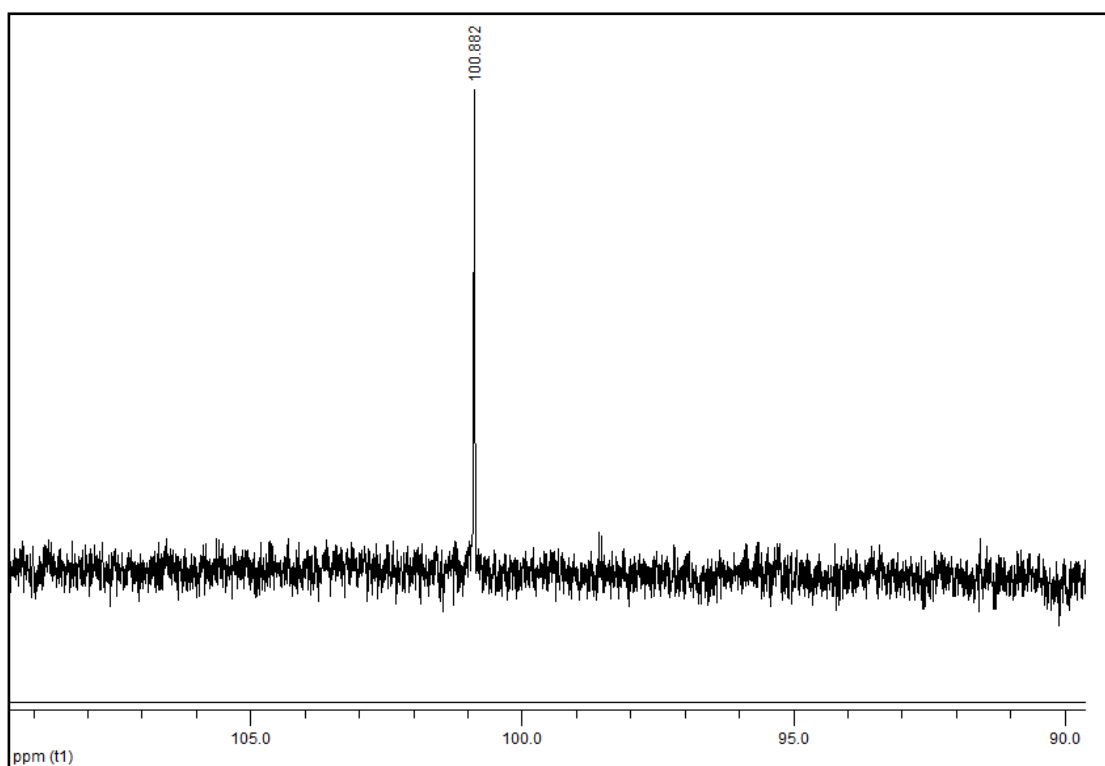
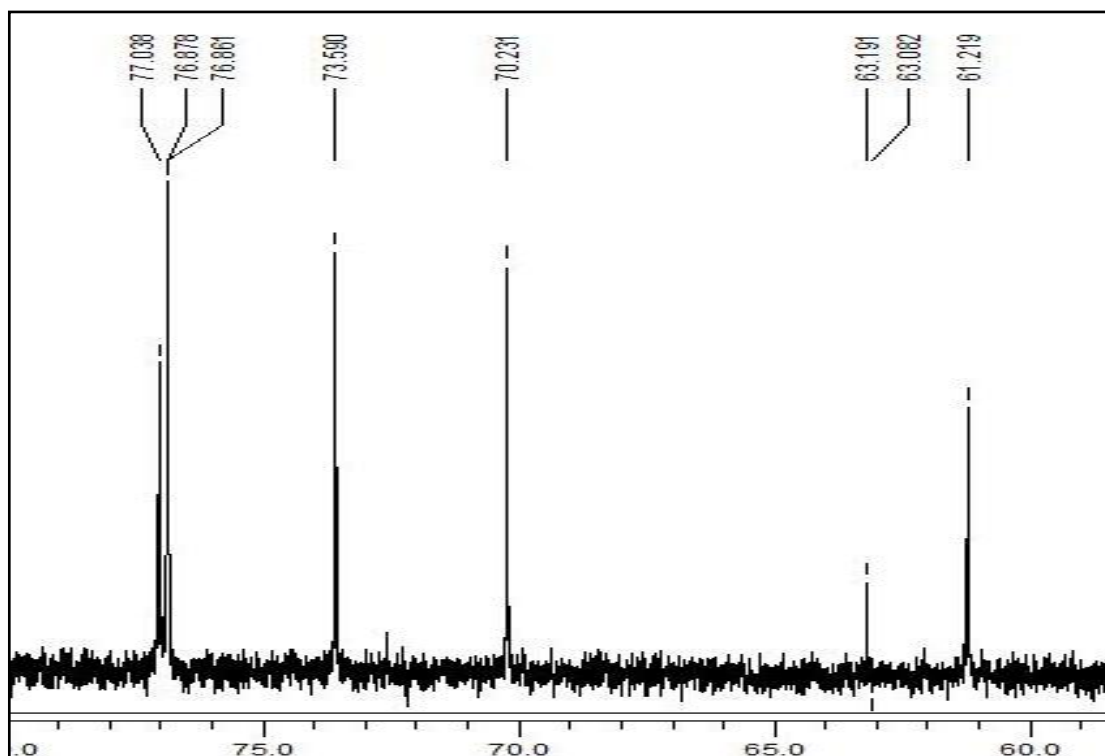


Ampliação do espectro RMN APT indicando sinais ^{13}C correspondentes a região entre 40-50 ppm

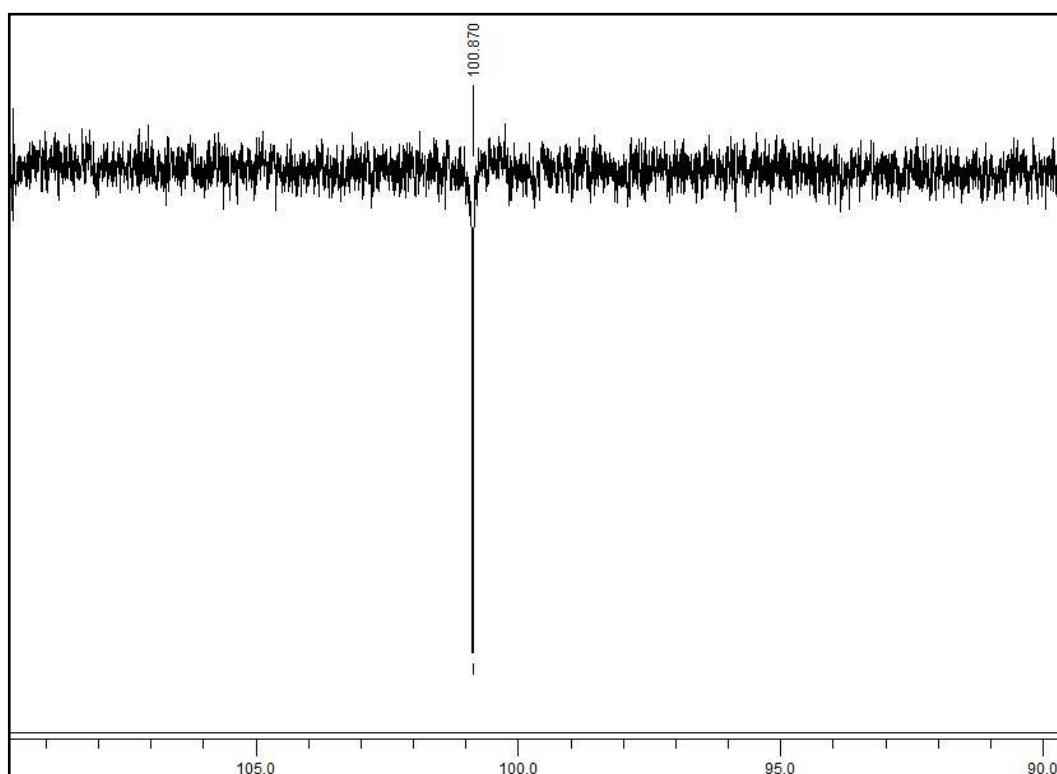
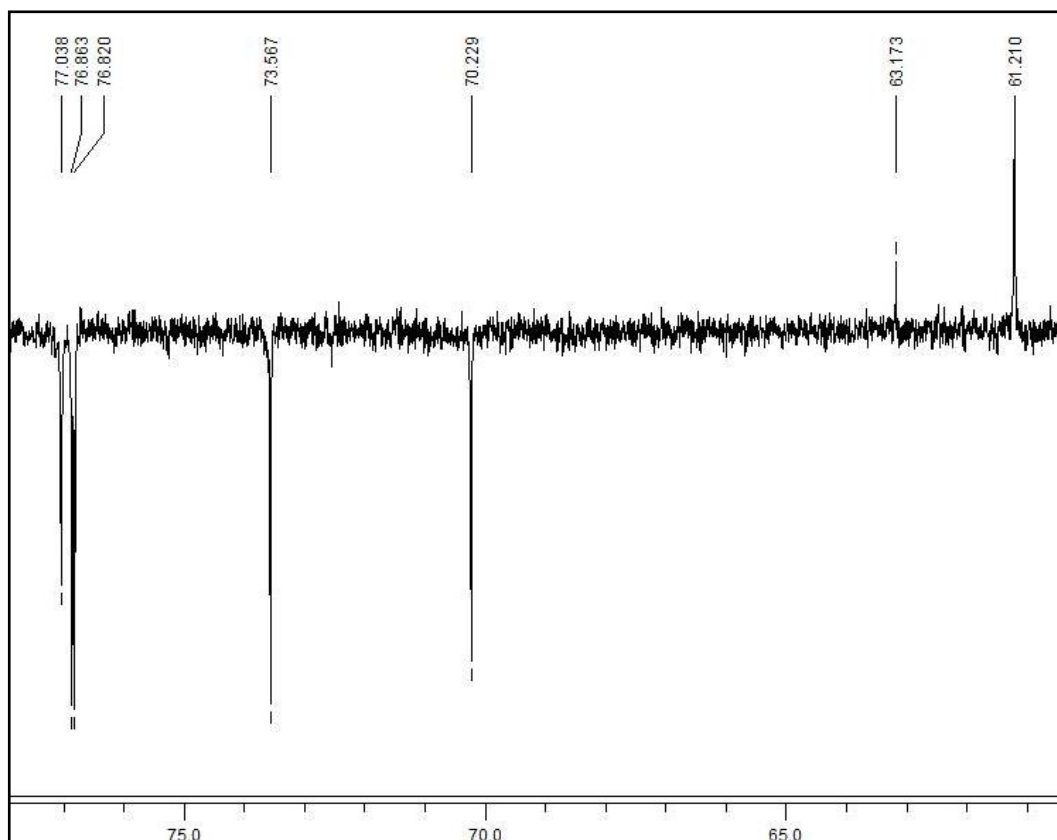


Ampliação do espectro RMN APT indicando sinais ¹³C correspondentes a região entre 30 a 10 ppm

ANEXO XII: Ampliação dos espectros de RMN DE ^{13}C e APT da fração XC10 correspondente a unidade glicosídica

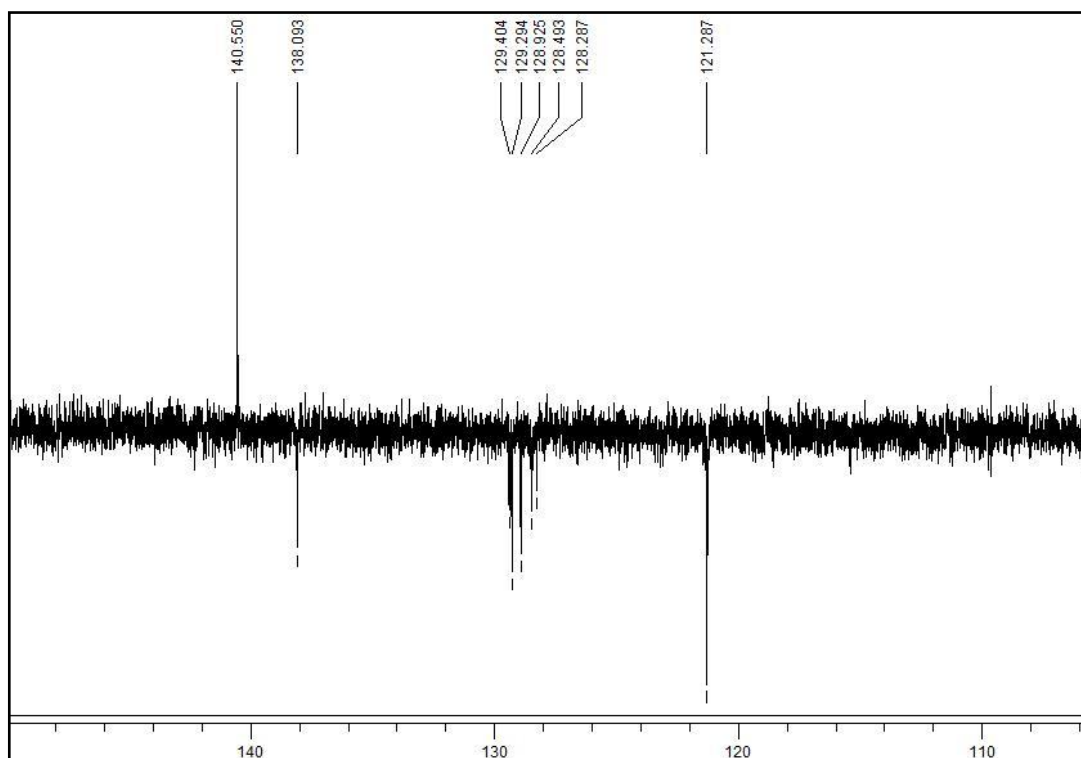
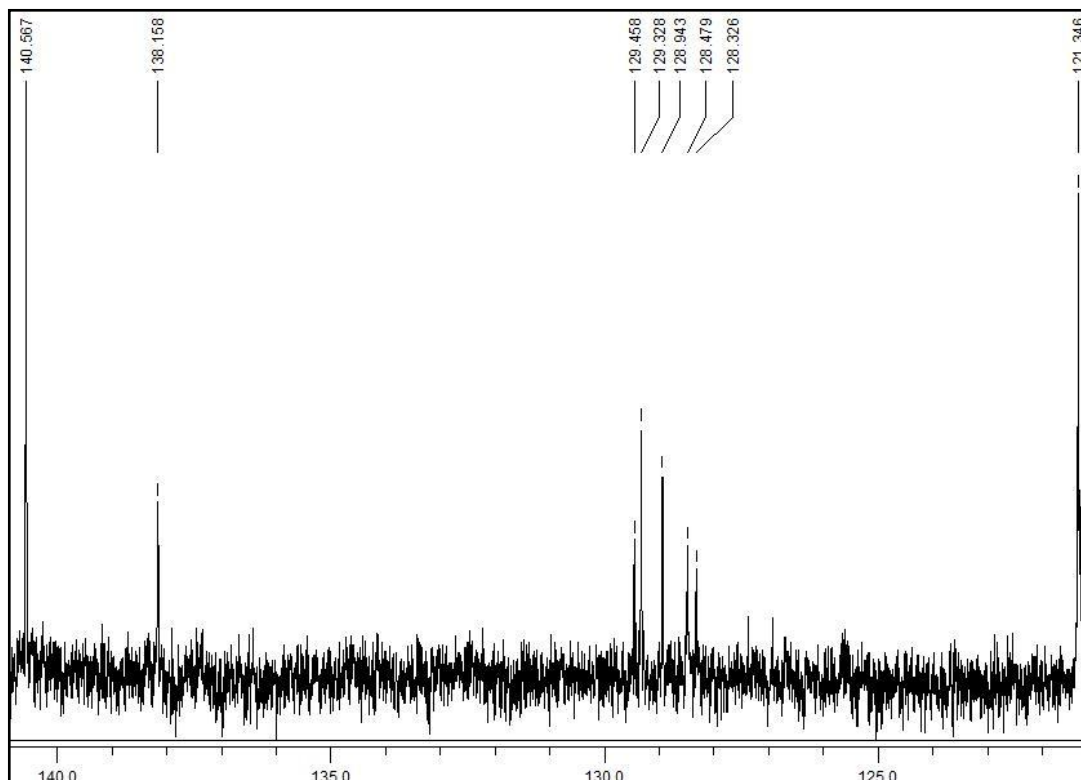


Ampliação do espectro RMN de ^{13}C correspondente à unidade glicosídica do diterpeno caurano



Ampliação do espectro RMN de ^{13}C APT correspondente à unidade glicosídica do diterpeno caurano

ANEXO XIII: Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C e APT correspondente à região de aromático.



ANEXO XIV: Espectro de IV da fração XC10