

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CÂMPUS DE ARARAQUARA

**IDENTIFICAÇÃO DE NITROCOMPOSTO E DI-HIDROFLAVONÓIS, ATIVIDADES  
ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E ANTIVIRAL DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS  
DOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS RAÍZES DE *Heteropteris aphrodisiaca* O.  
Mach., MALPIGHIACEAE,  
NÓ-DE-CACHORRO**

**WALTER ANTÔNIO ROMAN JÚNIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello**

ARARAQUARA - SP

2002

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CAMPUS DE ARARAQUARA

**IDENTIFICAÇÃO DE NITROCOMPOSTO E DI-HIDROFLAVONÓIS, ATIVIDADES  
ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E ANTIVIRAL DE SUBSTÂNCIAS ISOLADAS  
DOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS RAÍZES DE *Heteropteris aphrodisiaca* O.  
Mach., MALPIGHIACEAE,  
NÓ-DE-CACHORRO**

**WALTER ANTÔNIO ROMAN JÚNIOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello**

ARARAQUARA - SP

2002

### Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
UNESP – Campus de Araraquara

R758i Roman Júnior, Walter Antônio  
Identificação de nitrocomposto e di-hidroflavonóis, atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral de substâncias isoladas de *Heteropteris aphrodisiaca* O.Mach., *Malpighiaceae*, nó-de-cachorro. / Walter Antônio Roman Júnior . – Araraquara, 2003.  
132 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Fármacos e Medicamentos.  
Orientadora: João Carlos Palazzo de Mello

1.Heteropteris aphrodisiaca. 2. Malpighiaceae. 3. Nitrocomposto. 4. Hidroflavonóis. 5. Atividade antibacteriana. 6. Atividade antifúngica  
I.Mello, João Carlos Palazzo de, orient. . II. Título.

**CDD: 615.321**

*Dedico este trabalho à minha noiva Fabiane Schönell e a minha Família, pelos momentos de alegria, por todo amor e pelo incentivo nas horas difíceis.*

## TERMO DE APROVAÇÃO

WALTER ANTÔNIO ROMAN JÚNIOR

**IDENTIFICAÇÃO DE NITROCOMPOSTO E DI-HIDROFLAVONÓIS,  
ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA E ANTIVIRAL DE  
SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DOS EXTRATOS LIOFILIZADOS DAS  
RAÍZES DE *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., MALPIGHIACEAE,  
NÓ-DE-CACHORRO**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", pela seguinte banca examinadora:

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello  
UEM – Maringá – PR

Prof. Dr. Wagner Vilegas  
UNESP – Araraquara – SP

Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez  
UEM – Maringá – PR

Araraquara, 23 de janeiro de 2003

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela orientação, amizade e constante apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista-UNESP-Campus Araraquara, pela oportunidade de concretizar este trabalho.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNESP na área de Fármacos e Medicamentos pela formação alcançada.

Ao Departamento de Farmácia e Farmacologia da Universidade Estadual de Maringá, por possibilitar a execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pelo apoio e realização dos ensaios microbiológicos.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Rosa Elisa Carvalho Linhares, pela amizade e realização dos ensaios antivirais.

Ao professor e amigo Wagner Villegas pelo conhecimento repassado durante estágio no laboratório de fitoquímica (Instituto de Química-Unesp), que proporcionou ainda, a oportunidade de fazer amigos como Fábio, Roberta e Júlio.

Aos funcionários do Departamento de Química da Universidade Estadual Maringá, em especial à Ivânia e a Ana pela atenção e apoio técnico recebido, nas determinações de ressonância magnética nuclear das amostras.

Ao Dr. Heinrich Luftmann, do Instituto de Química Orgânica da Universidade de Münster, Alemanha, pelas análises de massas e auxílio na interpretação das amostras deste trabalho.

Ao Laboratórios Biosintética Ltda, na pessoa do Dr. Marcio Falci, pelo apoio pela liberação de recursos para o desenvolvimento desse trabalho.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. Mara Lane Carvalho pelo constante acompanhamento, incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas Cleyton, Karen, Tânia , Andréia, Leila, Elza, Letícia, Patrícia, Ana, Wadilson e Admir pelo auxílio recebido.

Aos amigos Cláudio e Neviton, pelo constante incentivo, aprendizado e companhia nos momentos mais difíceis.

Ao amigo Ernani e Ouvídio Pille (*in memoriam*) que acreditaram e apoiaram na formação profissional.

Aos amigos Omar, Naji, Maurício, e Gilmar pela amizade e companheirismo em todas às horas.

À minha mãe Maria Cecília ao meu pai Walter (*in memoriam*), a minhas irmãs Simone, Raquel, Fabíola, Lia, as sobrinhas Gabriela e Amanda e a minha noiva Fabiane por todo amor, incentivo e presença constante em todos os dias da minha vida.

À Sônia, Helena, Da. Nair, Carlão, Lucílio pela amizade construída durante a realização desse trabalho no período em que cá estive.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*Uma planta pode conter centenas de substâncias diferentes. A descoberta de uma só delas,  
pode ser mais importante para a humanidade do que a de uma nova galáxia.*

*Robert Robson*



### **Apresentações de partes do presente trabalho em Congressos:**

Atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral de nitrocomposto isolado de *Heteropteris aphrodisiaca*. Roman Jr, W.A.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, T.U.; Linhares, R.E.C.; Mello, J.C.P. de. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 3, 2001, Curitiba. **Resumos...**, Curitiba, Paraná, Brasil, de 26 a 28 de setembro de 2001.

Atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral de nitrocomposto isolado de *Heteropteris aphrodisiaca*. Roman Jr, W.A.; Nakamura, C.V.; Dias Filho, B.P.; Nakamura, T.U.; Linhares, R.E.C.; Mello, J.C.P. de. In: Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 3, 2001, Curitiba. Apresentação Oral.

Atividade antiviral dos extratos vegetais do nó-de-cachorro e extrato de mutamba. Felipe, A.M.; Benati, F.J.; Linhares, R.E.C.; Nozawa, C.M.; Roman Jr, W.A.; Mello, J.C.P. de. **Biosaúde**, vol. 3, n. especial, p. 73, 2001. In: Congresso Londrinense de Biologia Aplicada à Saúde, 4, 2001, Londrina, Paraná, Brasil, de 25 a 27 de outubro de 2001.

Antiviral activity of plants extracts to pólio- and herpexvirus. Linhares, R.E.C.; Felipe, A.M.M.; Nozawa, C.; Roman Jr, W.A.; Mello, J.C.P. de. **Revista de Fitoterapia**, vol. 2, suppl. 1, p. 301, 2002. In: Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research, 50, 2002, Barcelona, Espanha, de 8 a 12 de setembro de 2002.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>8</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>10</b>
<b>LISTA DE FLUXOGRAMAS</b> .....	<b>11</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	<b>12</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>13</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 Cerrado brasileiro .....	<b>3</b>
1.2 Família Malpighiaceae .....	<b>5</b>
1.3 Gênero <i>Heteropteris</i> .....	<b>6</b>
1.3.1 <i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O. Mach. ....	<b>7</b>
1.3.2 Aspectos químicos relacionados ao gênero <i>Heteropteris</i> .....	<b>8</b>
1.3.3 Informações biológicas sobre o gênero <i>Heteropteris</i> .....	<b>9</b>
1.4 Atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral de extratos vegetais .....	<b>11</b>
1.5 Informações sobre nitrocompostos .....	<b>15</b>
1.5.1 Aspectos químicos .....	<b>15</b>
1.5.2 Efeitos tóxicos de nitrocompostos.....	<b>17</b>
1.6 Informações sobre di-hidroflavonóis.....	<b>19</b>
1.6.1 Aspectos químicos e biológicos .....	<b>19</b>
1.7 Objetivos.....	<b>21</b>
<b>2. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
2.1 Matéria prima vegetal .....	<b>22</b>
2.2 Solventes, soluções e reagentes .....	<b>22</b>
2.3 Equipamentos .....	<b>23</b>
2.3.1 Análise química preliminar .....	<b>24</b>
2.3.2 Análise cromatográfica .....	<b>24</b>
2.3.3 Cromatografia em camada delgada .....	<b>24</b>
2.3.3.1 Di-hidroflavonóis .....	<b>25</b>
2.3.3.2 Nitrocomposto .....	<b>25</b>
2.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência .....	<b>25</b>

2.4	Preparação dos extratos .....	26
2.4.1	Preparação do extrato BST-0298 .....	26
2.4.2	Obtenção da fração acetato de etila .....	27
2.4.3	Cromatografia em coluna da fração acetato de etila .....	27
2.4.4	Reação de hidrólise para flavonóides glicosilados.....	30
2.4.5	Preparação do extrato BST-0402 .....	30
2.4.6	Fracionamento do extrato BST-0402.....	30
2.4.7	Purificação da subfração 4SP através de recristalização .....	31
2.4.8	Reação de hidrólise para nitrocompostos.....	32
2.5	Ensaio biológicos das substâncias de I à IV .....	32
2.5.1	Avaliação da atividade antibacteriana .....	32
2.5.1.1	Concentração inibitória mínima .....	32
2.5.1.2	Concentração bactericida mínima .....	33
2.5.2	Avaliação da atividade antifúngica .....	34
2.5.2.1	Concentração inibitória mínima .....	34
2.5.2.2	Concentração fungicida mínima .....	35
2.5.3	Avaliação de atividade antiviral .....	35
2.5.3.1	Método TCID <sub>50</sub> .....	35
2.5.3.2	Método PLAQUE .....	36
2.5.3.3	Método de imunofluorescência .....	37
<b>3.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>38</b>
<b>4.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>105</b>
<b>5.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>107</b>

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
1	Indicação das áreas do cerrado. Adaptado por Ferri.....	4
2	Inflorescência e folha de <i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O. Mach. ....	8
3	Aspecto aéreo de <i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O. Mach.....	8
4	Hiptagina isolada de <i>Heteropteris angustifolia</i> Gris. ....	9
5	Astilbina, neoastilbina e isoastilbina isolada das raízes de <i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O. Mach. ....	9
6	Raízes de <i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O. Mach.....	10
7	Estrutura da miserotoxina .....	16
8	CCD das subfrações da fração acetato revelada com FeCl <sub>3</sub>	41
9	CCD da fração acetato revelada com reagente natural .....	41
10	Cromatograma obtido por CLAE da substância I .....	42
11	Espectro no infravermelho da substância I .....	43
12	Espectro de massas da substância I .....	44
13	Espectro de <sup>1</sup> H RMN da substância I .....	45
14	Espectro COSY ( <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H) da substância I .....	47
15	Espectro DEPT da substância I .....	49
16	Espectro de <sup>13</sup> C RMN da substância I .....	50
17	Espectro HETCOR ( <sup>1</sup> H/ <sup>13</sup> C) da substância I .....	52
18	Estrutura química da taxifolina.....	
19	Espectro de dicroísmo circular da substância I em metanol.	55
20	Estrutura da astilbina .....	56
21	CCD da subfração 8 em acetato de etila:ác. fórmico:água...	56
22	Cromatograma obtido por CLAE da substância II .....	57
23	Espectro no infravermelho da substância II .....	58
24	Espectro de <sup>1</sup> H RMN da substância II .....	61
25	Espectro COSY ( <sup>1</sup> H/ <sup>1</sup> H) da substância II .....	62
26	Espectro DEPT da substância II .....	64
27	Espectro de <sup>13</sup> C RMN da substância II.....	65

28	Espectro HETCOR ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) da substância II .....	66
29	Espectro de dicroísmo circular da substância II.....	69
30	Estrutura da neoastilbina .....	70
31	Cromatograma obtido por CLAE da substância III .....	70
32	Espectro no infravermelho da substância III .....	70
33	Espectro de $^1\text{H}$ RMN da substância III .....	75
34	Espectro COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) da substância III .....	76
35	Espectro DEPT da substância III .....	77
36	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN da substância III .....	78
37	Espectro HETCOR ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) da substância III .....	81
38	Estrutura da isoastilbina .....	83
39	Cromatografia em camada delgada das subfrações do extrato BST-0402 .....	90
40	Espectro no infravermelho da substância IV .....	91
41	Espectro de massas da substância IV .....	92
42	Espectro de $^1\text{H}$ RMN da substância IV .....	94
43	Espectro COSY da substância IV .....	95
44	Espectro DEPT da substância IV .....	96
45	Espectro de $^{13}\text{C}$ RMN da substância IV .....	98
46	Espectro HETCOR da substância IV .....	99
47	Estrutura química da substância IV .....	100

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA</b>	<b>TÍTULO</b>	<b>PÁGINA</b>
1	Sistema eluente utilizado nas análises por CLAE para di-hidroflavonóis .....	26
2	Sistema eluente utilizado nas análises por CLAE para nitrocompostos .....	26
3	Eluentes usados na cromatografia em coluna da fração acetato de etila.....	27
4	Subfrações obtidas na cromatografia em coluna da fração acetato de etila .....	28
5	Eluição do extrato BST-0402 por CLV .....	31
6	Identificação de grupos de substâncias através de análise química preliminar .....	39
7	Características do extrato BST-0298.....	40
8	Dados de <sup>1</sup> H RMN da substância I .....	48
9	Dados de <sup>13</sup> C RMN da substância I .....	51
10	Diferentes deslocamentos químicos (ppm) no espectro de <sup>13</sup> C RMN para taxifolina e substância I.....	53
11	Dados de <sup>1</sup> H RMN da substância II .....	60
12	Dados de <sup>13</sup> C RMN da substância II em relação a literatura.....	63
13	Dados de HETCOR da substância II.....	67
14	Diferentes deslocamentos químicos (ppm) no espectro de <sup>13</sup> C RMN para taxifolina e substância II.....	67
15	Dados de <sup>1</sup> H RMN da substância III .....	74
16	Dados de <sup>13</sup> C RMN da substância III .....	79
17	Correlações de <sup>1</sup> H / <sup>13</sup> C da substância III .....	80
18	Diferentes deslocamentos químicos (ppm) no espectro de <sup>13</sup> C RMN para taxifolina e substâncias I,II e III.....	82
19	Concentração inibitória mínima bacteriana da substância I.....	86
20	Concentração inibitória mínima fúngica da substância I ...	86

21	Concentração inibitória mínima bacteriana da substância II .....	87
22	Concentração inibitória mínima fúngica da substância II ..	87
23	Concentração inibitória mínima bacteriana da substância III .....	88
24	Concentração inibitória mínima fúngica da substância III .	88
25	Dados de <sup>1</sup> H RMN da substância IV .....	93
26	Dados de <sup>13</sup> C RMN da substância IV .....	97
27	Correlações de <sup>1</sup> H / <sup>13</sup> C da substância IV .....	97
28	Concentração inibitória mínima bacteriana da substância IV .....	101
29	Concentração bactericida mínima da substância IV .....	102
30	Concentração inibitória mínima fúngica da substância IV .	102
31	Concentração fungicida mínima da substância IV .....	103
32	Resultados da atividade antiviral da substância IV .....	104

## FLUXOGRAMAS

NÚMERO	TÍTULO	PÁGINA
1	Procedimento na produção de extratos e subfrações das raízes de <i>Heteropteris aphrodisiaca</i> O. Mach. ....	29
2	Fracionamento através de cromatografia em coluna da subfração 8 .....	30

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADS	Ágar dextrose sabourand
CBM	Concentração bactericida mínima
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDS	Caldo dextrose sabourand
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLV	Cromatografia líquida a vácuo
CMH	Caldo Mueller-Hinton
<i>d</i>	Dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
<i>dquart</i>	Duplo quarteto
DMSO	Dimetil sulfóxido deuterado
EM	Espectro de massas
FA	Fração acetato de etila
Hetcor	Espectroscopia de correlação heteronuclear
<i>m</i>	Multiplete
$R_f$	Razão de fluxo
$^{13}\text{C}$ RMN-	Ressonância magnética nuclear de carbono
$^1\text{H}$ RMN	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
SM	Solução mãe
Sub. I	Substância I - Isoastilbina
Sub. II	Substância II - Astilbina
Sub. III	Substância III - Neoastilbina
Sub. IV	Substância IV - 2,3,4,6-tetra-O-(nitropropanoil)- $\beta$ -D-glucopiranoside
TMS	Tetra Metilsilano
$T_r$	Tempo de retenção
UFC	Unidade formadora de colônia
UV	Ultravioleta



## RESUMO

O vegetal *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., Malpighiaceae, é conhecido popularmente como “nó-de-cachorro”, um arbusto de 1 a 1,5 m de altura que pode ser encontrado nos cerrados dos estados de Mato Grosso e Goiás. As raízes são irregulares, com rugas e articulações e tem sido amplamente utilizada na medicina popular como afrodisíaco, estimulante, revigorante, antioxidante, hipocolesterolêmico e nas debilidades nervosas. Com as raízes do vegetal, foi produzido extrato, que após a eliminação do solvente orgânico foi concentrado e liofilizado (BST-0298). Esse extrato foi submetido à partição em funil de separação com acetato de etila e após concentração, liofilizado. A fração acetato de etila foi então cromatografada sucessivamente em coluna (Sephadex<sup>®</sup> LH-20), fornecendo três di-hidroflavonóis: astilbina [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-trans-(2R,3R)-taxifolina] (I); neoastilbina [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-trans-(2S,3S)-taxifolina] (II); isoastilbina ou [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-cis-(2R,3S)-taxifolina]-(III). A partir das raízes preparou-se também, o extrato BST-0402, que após eliminação do solvente orgânico, foi concentrado e liofilizado. Esse extrato foi cromatografado em coluna (gel de sílica), e por processo de recristalização, foi obtido o nitrocomposto: 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glucopiranosose (IV) substância inédita. As estruturas das substâncias isoladas (I à IV) foram elucidadas com base na análise dos dados espectrais de IV, EM, RMN 1D (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C) e 2D (DEPT, COSY, HETLR e HETCOR). Os extratos brutos, bem como as substâncias (I à IV) foram avaliadas frente a atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral. O nitrocomposto IV isolado, apresentou CIM em *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* nas concentrações de 250 e 125  $\mu$ g/ml e a CBM resultou em 500  $\mu$ g/ml, respectivamente. A atividade antifúngica resultou CIM na concentração de 125  $\mu$ g/ml frente à *Candida albicans*, *C. parapslosis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. A CFM contra os mesmos organismos mostrou-se ativa na concentração de 250  $\mu$ g/ml. O nitrocomposto IV revelou atividade antiviral pelo método TCID<sub>50</sub> contra Poliovírus Hep2 na concentração de 50  $\mu$ g/ml, apresentando 69% de inibição viral. Avaliou-se essa substância, ainda, quanto a atividade antiviral terapêutica pelo método TCID<sub>50</sub> nas concentrações de 12,5 e 25  $\mu$ g/ml, obtendo-se resultado significativo de 94 e 91 % de inibição viral, respectivamente. Na concentração de 50  $\mu$ g/ml, o resultado

observado foi negativo. As amostras de extrato bruto e di-hidroflavonóis não apresentaram resultados significativos nessas análises.

**Palavras-Chave:** *Heteropteris aphrodisiaca*; Malpighiaceae; nitrocomposto; di-hidroflavonóis; atividade antibacteriana; atividade antifúngica; atividade antiviral.

## ABSTRACT

The vegetable *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., belonging to the family Malpighiaceae popularly is known as "nó-de-cachorro", a bush from 1 to 1,5 m of height that can be found in the savannahs of the states of Mato Grosso and Goiás whose roots are irregular, with wrinkles and articulations and it has been used thoroughly by the popular medicine as aphrodisiac, stimulant, reviver, antioxidant, anticholesterolemic and in the nervous weaknesses. Of the extract BST-0298, it was partitioned with ethyl acetate, and was chromatographed by column was obtained after crystallization three compounds di-hydroflavonols: astilbin [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*trans*-(2*R*,3*R*)-taxifolin]; neoastilbin [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*trans*-(2*S*,3*S*)-taxifolin]; isoastilbin [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*cis*-(2*R*,3*S*)-taxifolin]. Of the extract BST-0402, after column chromatographic and crystallization, it was isolated a nitrocompound: 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoyl)- $\beta$ -D-glucopiranosyl. The structures were elucidated with help the data of IR, MS,  $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, DEPT, COSY, and HETCOR. The isolation of new nitrocompound is significant of the chemotaxonomic point of view. The crude extracts as well as the isolated compounds of *Heteropteris aphrodisiaca* were tested for antibacterial, for antifungic and antiviral activity. The nitrocompound IV presented a MIC against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis* at the concentrations of 250 and 125  $\mu\text{g/ml}$  and MBC resulted in 500  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The antifungic activity resulted MIC at the concentration of 125  $\mu\text{g/ml}$  against *Candida albicans*, *C. parapslosis*, *C. krusei* and *C. tropicalis*. MFC against the same organisms was shown at the concentration of 250  $\mu\text{g/ml}$ . The nitrocompound IV revealed antiviral activity for the method TCID<sub>50</sub> against Poliovirus Hep2 at the concentration of 50 mg/mL, presenting 69% of inhibition viral. The therapeutic antiviral activity by the method TCID<sub>50</sub> at the concentrations of 12.5 and 25 mg/ml, being obtained significant result of 94 and 91% of viral, inhibition respectively. At the concentration of 50 mg/ml, the observed result was negative. The samples of crude extract and di-hydroflavonóis didn't present significant results in those analyses.

**Key-words:** *Heteropteris aphrodisiaca*; Malpighiaceae; nitrocoumpound; di-hydroflavonols; antibacterian activity; antifungic activity; antiviral activity.

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais na terapêutica é muito antigo, e está intimamente relacionado com a própria evolução do homem. Dados revelam a sua utilização já pelo homem de Neanderthal, que usava de suas propriedades mágico-simbólicas quando se deparava com algum tipo de malefício. Para utilizarem as plantas como medicamentos, os homens antigos valiam-se de suas próprias experiências empíricas de acerto e erro, e da observação do uso de plantas pelos animais, além da intervenção divina para determinadas doenças. Em suma, percebe-se que mitos, lendas e tradições apontam para o emprego amplo de plantas medicinais em todos os tempos, em todas as camadas sociais e quase em toda a humanidade (Marques, 1999).

Historicamente, há registros de que no ano 3000 a.C., no oriente, mais exatamente na China, muitas pessoas dedicavam-se ao cultivo e uso de plantas medicinais. Sabe-se, também, que por volta de 2300 a.C. os povos assírios, hebreus e egípcios realizavam o cultivo de diversas plantas medicinais, assim como as traziam de suas diversas expedições. O uso dessas plantas era direcionado para a utilização como purgantes, vermífugos, diuréticos, especiarias para culinária, além de líquidos cosméticos e gomas, utilizados na arte do embalsamamento de múmias (Martins *et al.*, 1998).

O conhecimento das plantas, e suas propriedades medicinais obtiveram um incremento muito grande com o surgimento da escrita e com o aparecimento dos letrados. Assim, no Egito encontrou-se no papiro de Ebers, datado de 1500 a.C., o relato de 150 plantas curativas, havendo ali inclusive, referências a fontes ainda mais antigas (Marques, 1999).

Na Grécia por volta de 460-377 a.C. Hipócrates de Cós (discípulo do fundador da medicina grega, Esculápio) considerado o “Pai da Medicina” consagrou o uso das plantas através de sua famosa obra *Corpus Hipocraticum*, pois essa resumia todos os conhecimentos médicos da época e contemplava centenas de plantas medicinais. Mas, sem dúvida, a obra mais marcante sobre a terapêutica com plantas, foi escrita pelo botânico Pedânios Dioscórides em seu tratado *De Materia Medica* elaborado no século primeiro da era cristã. Essa revelava o uso de cerca de 500 drogas de origem vegetal e foi a última palavra na terapêutica durante cerca de 15 séculos (Martins *et al.*, 1998).

Na Idade Média, o estudo de plantas medicinais, como em outras áreas do conhecimento, teve uma grande estagnação que entre vários fatores, pode ter como pano de fundo, as inúmeras guerras ocorridas, entre as quais a queda do Império Romano e o fortalecimento da Igreja Católica. Desse modo, muitas literaturas perderam-se, e as ciências ficaram restritas a alguns mosteiros da Europa. No seu processo de evolução, a arte de curar teve como grande impulso, a contribuição dos alquimistas e, como um dos seus principais representantes destacou-se Paracelso (1493-1541) que também usava a medicina natural como base para cura de várias enfermidades.

No Brasil, Martins *et al.*, (1998) destacam que, o tratamento de doenças se fundamentou através da contribuição dos indígenas num primeiro momento, e depois com os imigrantes europeus e escravos vindos da África. Os índios utilizavam a fitoterapia dentro de uma visão mística, onde o pajé ou feiticeiro após fazer uso de substâncias entorpecentes, alucinógenas e tóxicas dizia sonhar com um espírito que informava qual a erva ou planta utilizada para se aplicar ao enfermo. Os índios também aprenderam a cura pelas plantas através da observação dos animais que, quando doentes, procuravam por determinadas plantas. Um exemplo dessa prática é a utilização, ainda hoje, pelos índios das raízes de ipecacuanha para disenteria amebiana. A influência africana é de pouco registro, mas não menos importante, uma vez que o enfermo era visto como possuído por um espírito mau, e recebia tratamento por meio de exorcismo e aplicação de drogas vegetais.

A contribuição européia por sua vez, teve início com a vinda ao Brasil dos religiosos da Companhia de Jesus, chefiados por Nóbrega em 1579, sendo que esse se dedicou a descrever os indígenas, seus feitos e em convertê-los. Anchieta foi o religioso que, entre tantas contribuições, interessou-se pela fauna, flora e terapêutica empregada pelos índios. Dentre tantos ofícios, formulavam receitas, nas chamadas *Boticas dos Colégios*, à base de plantas medicinais que eram utilizadas para o tratamento de diversas doenças (Martins *et al.*, 1998; Marques, 1999).

Assim, aos trancos e barrancos, foi sendo escrita a história no Brasil, das plantas que curam, até fins do século XVIII, à margem da Coroa portuguesa e à custa dos saberes dos ameríndios (Marques, 1999).

Na contemporaneidade, observa-se que 80% da população mundial vive nos chamados países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos e que apenas 20% da população mundial, que habita os países desenvolvidos, é responsável pelo

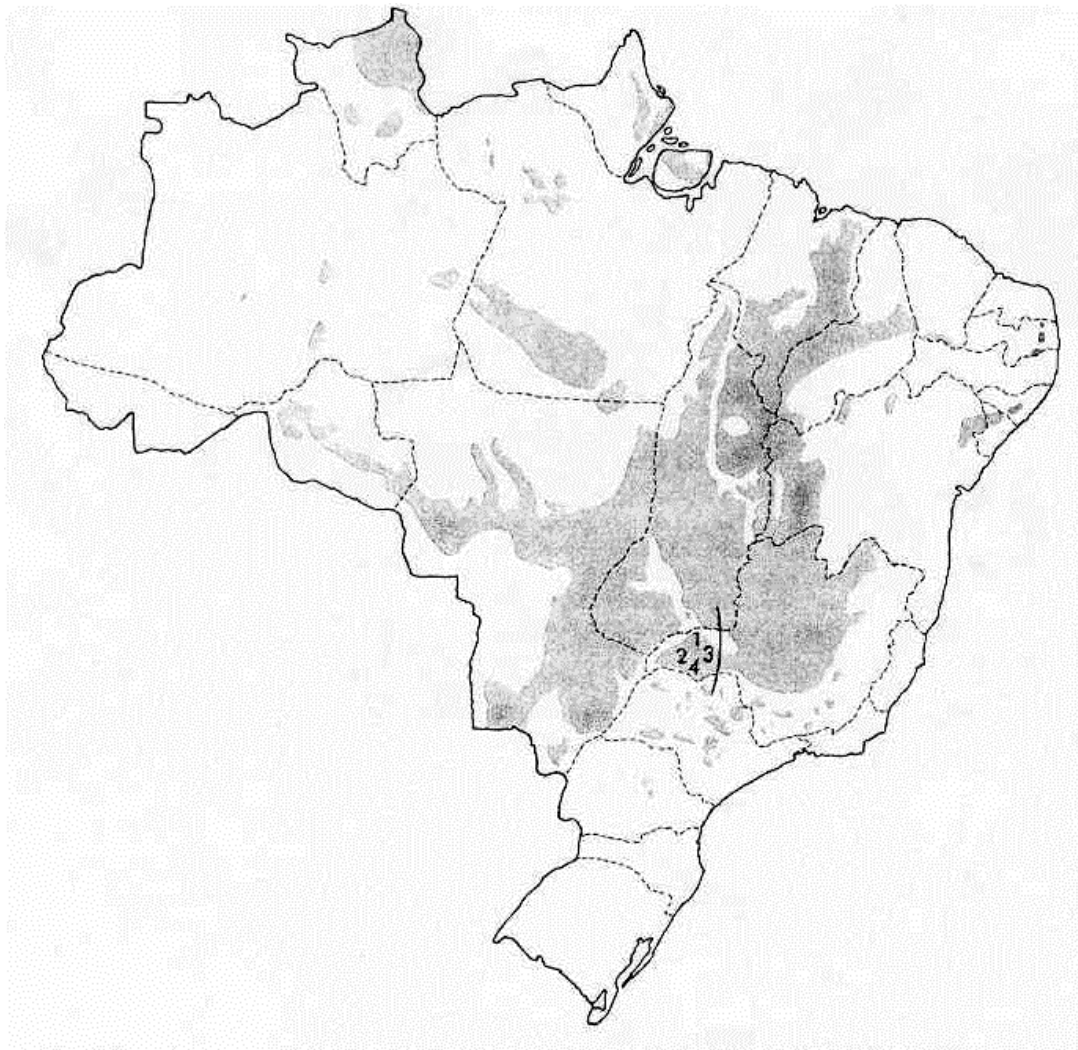
consumo de 85% dos medicamentos industrializados disponíveis no mercado. No Brasil, os dados são semelhantes, 20% de nossa população consome 63% dos medicamentos disponíveis, e o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais a única fonte de recurso terapêutico. Essa situação pode ser melhorada, a partir do momento em que esforços conjuntos forem efetuados no sentido de solucionar os problemas básicos de saúde e contando também com a imensa colaboração das pesquisas com plantas medicinais (Di Stasi, 1996).

### **1.1 Cerrado brasileiro**

A primeira impressão que se tem da região de cerrado não é promissora, sendo bem diferente daquela existente na região amazônica. A vegetação rasteira, com raros arbustos, ou árvores de pouca altura com troncos tortuosos e galhos baixos e retorcidos, levam a pensar num deserto, principalmente se esse for percorrido sob o sol na estação seca e quente que se estende de maio a outubro.

O cerrado é o segundo maior bioma do Brasil, ocupando praticamente todo planalto central brasileiro. Estende-se por mais de dois milhões de quilômetros quadrados distribuídos nos estados de Goiás, Minas Gerais, Tocantins, Bahia, Maranhão, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Pará, Ceará, Rondônia, Amazônia e Distrito Federal (fig. 1). O clima durante o ano varia em média entre 20 e 25 °C, e sua fauna é constituída por insetos, aves, roedores, répteis, caninos e felinos (Vargas e Hungria, 1997).

Para a riqueza da flora do cerrado inicialmente quem chamou atenção do mundo científico, foram os naturalistas viajantes. Destaca-se entre eles Karl Friederich Philipp von Martius (1794-1868) através de sua obra *Flora Brasiliensis* (1840-1906) que continua, até os dias atuais, sendo considerado trabalho de referência (Goodland, 1979).



**Figura 1** - Indicação das áreas de cerrado. Adaptado por Ferri

Cabe destacar o papel das plantas medicinais, que tem sido usada pelos povos indígenas da região e agora estão sendo comercializadas no país. Entre elas destaca-se a sucupira-branca [*Pterodon pubescens* (Benth.) Benth.] que combate infecções, a *Gomphrena officinalis* Mart. conhecida como “ginseng brasileiro”, servindo para tudo e o *Stryphnodendron barbatiman* Mart., barbatimão, como cicatrizante. Atualmente existem, aproximadamente, 119 substâncias químicas extraídas das plantas superiores do cerrado usadas na medicina em todo o mundo. Entretanto, se maiores estudos fossem realizados nessa região do Brasil, no sentido de se buscar novas fontes de fármacos, a flora do cerrado, com mais de 8.000

espécies, certamente representaria um forte potencial para futuros medicamentos fitoterápicos (Caruso, 1997).

## 1.2 Família Malpighiaceae

As Malpighiaceae constituem uma família de plantas quase essencialmente americana que merece atenção. Hoehne (1939) afirmava, ainda, que o total das espécies que representam as Malpighiaceae deveria ultrapassar a 800, e dessas, pelo menos 2/3 seriam americanas e mais de 1/3 brasileiras. Na *Flora Brasiliensis* já eram descritas 250 espécies, e nada menos que 26 gêneros distintos.

Na atualidade sabe-se que a família Malpighiaceae Juss., compreende 63 gêneros, e cerca de 800 espécies pantropicais. No Brasil ocorrem 32 gêneros, com cerca de 300 espécies distribuídas nas diversas regiões (Barroso, 1991).

A caracterização morfológica da família conforme Agarez (1994) “árvores, arbustos, ervas ou trepadeiras com folhas simples opostas, flores actino ou zigomorfas, hermafroditas, diclamídias, pentâmeras, diplostêmones, às vezes com estaminódios. Apresentam sépalas com glândulas externamente, ovário súpero, semi-ífero, tricarpelar e o fruto baga ou esquisocárpico dividindo-se em três sâmaras”. Joly (1998) descreve que a família Malpighiaceae é constituída por plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas, ou mais frequentemente trepadeiras com folhas inteiras, de disposição alterna, sem estípulas. Com flores vistosas de coloração geralmente amarela ou rosada, cíclicas, reunidas em inflorescências paniculadas nas axilas superiores ou terminais. Cálice com característica de 10 glândulas grandes, localizadas na base externa das sépalas, dois em cada sépala. Pétalas em geral fimbriadas, longipedunculadas. Androceu formado por 10 estames, alguns estaminodiais. Ovário súpero, tricarpelar, trilocular. Fruto baciforme ou esquisocárpico, separando-se em frutículos samaróides com a semente localizada na base da sâmara.

Uma característica morfológica importante para a família e que ocorre em vários gêneros como *Galphinia*, *Camarea*, *Benisteria* é a presença de xilópodos mais ou menos profundos, os quais conseguem resistir aos períodos de incêndios e secas prolongadas. Conforme Hoehne (1939), esses órgãos hipógeos deveriam ser



analisados quanto a sua composição química, porque é possível que contenham substâncias ativas para a toxicologia e a medicina.

Outra característica marcante, anotada à época pelo autor, é que alguns gêneros e espécies de Malpighiaceae desenvolvem os célebres pêlos estrelados ou ramosos muito rijos, que delas retiram o seu nome, sendo por isso todos os pêlos semelhantes, *pêlos malpigiáceos*. Esses pêlos das Malpighiaceae seriam responsáveis pela irritação da mucosa e algumas vezes da epiderme. Tais pêlos ao entrar em contato com os olhos poderiam causar danos irreparáveis, tanto para os animais como para o homem (Hoehne, 1939).

A família Malpighiaceae é pouco utilizada, visto que sua estrutura vegetal não permite que seja aproveitada como produtora de madeira, e também na terapêutica. Algumas espécies encontradas na família Malpighiaceae apresentam importância na toxicologia, pois é irrefutável que vários índios na região amazônica as utilizam em rituais com propósito alucinógeno. Basta examinar o *Banisteriopsis caapi* (Spruce) Morton, uma trepadeira que os aborígenes, da região amazônica (brasileira e peruana), conhecem há muitos séculos sob o nome de *Caapi* que possui a qualidade de produzir delírios temporários (Hoehne, 1939). Alguns vegetais representantes dessa família, cujos frutos são comestíveis, são utilizados para elaboração de marmeladas (FAMÍLIA MALPIGHIACEAE..., 2001).

Ainda segundo Hoehne (1939) em excursão na região do Mato Grosso, entre 1908 e 1914, encontrou-se mais de uma espécie de *Tetrapteris* e de *Heteropteris*, apregoadas como tonificante e até afrodisíaca. Algumas são conhecidas por *nó-de-cachorro*. O autor observou que algumas Malpighiaceae poderiam substituir com vantagem a ipecacuanha, como plantas eméticas.

Com relação à posição taxonômica, Barroso (1991) destaca que a família Malpighiaceae na classificação de Cronquist (1968) pertence à ordem Polygalales e compreende sete famílias, com cerca de 1900 espécies. Nos sistemas anteriores, Engler (*apud* Melchior *et al.*, 1964) relacionou as famílias da ordem Polygalales de Cronquist na ordem Rutales e, Dahlgren (1975) as considera parte de uma ordem com o mesmo nome, subordinada a superordem Rutanae.

### 1.3 Gênero *Heteropteris*

O gênero *Heteropteris* é representado por plantas lenhosas, geralmente trepadeiras, raramente sufricosas e eretas, possuem folhas opostas e geralmente com glândulas em sua base, compreende cerca de 100 espécies nativas da América do Sul, com uma espécie no oeste africano. Dentre alguns exemplos podemos destacar: *Heteropteris laurifolia* (L.) A. Juss., conhecida popularmente como mariposa amarela e também a *Heteropteris chrysophylla* HBK (FAMÍLIA MALPIGHIACEAE..., 2001). Segundo Corrêa (1984) existe, ainda, um outro exemplo a se destacar, *Heteropteris anceps* Ndz., encontrada no estado de São Paulo.

#### 1.3.1 *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.

Somente no final da década de 40, através do trabalho realizado por Machado (1949), é que se teve a confirmação de uma nova espécie no gênero *Heteropteris* a espécie *aphrodisiaca*. A planta é conhecida popularmente como jasmim-amarelo, quaró, resedá amarelo, tintureiro, ocinanta-sá-caá (karajá), nó-de-porco (bororó). Em outros idiomas pode-se encontrar nó-de-cachorro com a sinonímia de: no-de-cochera ou no-de-cochero, ou então dog's Knot (ENCICLOPÉDIA..., 2002).

De acordo com Corrêa (1984), o vegetal *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., Malpighiaceae, é um arbusto, de 1 a 1,5 m de altura, subcandente; ramos ferrugíneo-avermelhados, com internódios de 11 a 14 cm de comprimento; folhas com pecíolo canaliculado, grosso, pubérulo, às vezes granuloso, elítico-ovais, ou quase ovais, com margem ciliada, ápice agudo, base arredondada, levemente contraída, providas de 2, raramente 4, glândulas; margem inteira, quando novas tomentosas dos dois lados, depois glabras na página superior e na inferior tomentosas-velutinas; até 12 cm de comprimento e 1 cm de largura; flores com corola amarela e inodora; frutos sâmara (fig. 2 e 3).

Segundo Machado (1949) *Frutex: 1-1,5 m altus, sub-scandens ut uidetur. Radix: (xylopodium?) incrassata, rugoso. Ramuli atroferrufinei; internodiis 11-14 cm longis. Folia elliptico-ovata vel fere ovalis, apice acuta, base rotundata leviter contracta, glandulis dualius rarior quattuor ornata, margine integra et plana, novella*

*utrimque tomentosa, acetate supra glabrescentia, subter velutino-tomentosa. Ciliata, usque ad 12 cm longa et 1 cm lata; petiolis crassis, supra canaliculatis, puberulis, interdum glandulosis, circiter 1 cm longis. Flores fructusque generis. Corolla flava, inodora.*



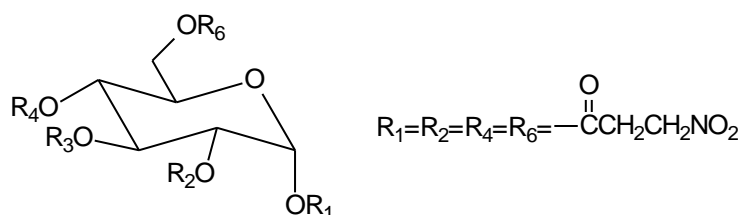
**Figura 2** - Inflorescência e folha de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.



**Figura 3** - Aspecto aéreo de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.

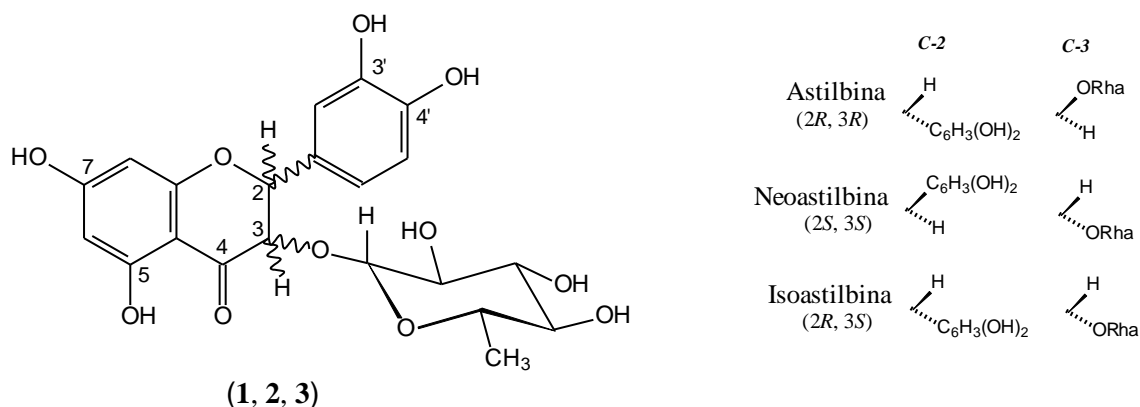
### 1.3.2 Aspectos químicos relacionados ao gênero *Heteropteris*

Stermitz *et al.* (1975) evidenciaram substâncias nitro alifáticas, pelo método de Griess-Ilosvay, através de uma triagem com 124 espécies de 98 gêneros de plantas argentinas. Nesse estudo, isolaram hiptagina (fig. 4) de *Heteropteris angustifolia* Gris. como sendo o maior constituinte nitro.



**Figura 4** – Hiptagina isolada de *Heteropteris angustifolia* Gris.

De Pieri *et al.* (2000) realizaram análises de controle de qualidade da droga vegetal *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. além de terem isolado e identificado três dihidroflavonóis, astilbina, neoastilbina e isoastilbina (fig. 5).



**Figura 5** – Astilbina (1), neoastilbina (2) e isoastilbina (3) isoladas das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.

### 1.3.3 Informações biológicas do gênero *Heteropteris*

Em se tratando da espécie *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., Corrêa (1984) cita que a mesma é encontrada nos Cerrados do Mato Grosso e Goiás (fig.

1, p. 4). As raízes são empregadas pela população nativa como afrodisíaca e para as debilidades nervosas.

O chá preparado com a raiz é empregado nos problemas de visão, como depurativo e ainda no tratamento de disenterias (Guarim Neto, 1987).

A planta preparada na forma de cachaça é, ainda, utilizada popularmente como estimulante das atividades sexuais (afrodisíaca) e como revigorante físico e psicológico, antioxidante, antiulcerogênico, estimulante da memória, hipocolesterolêmico, tônico e vasodilatador. A raiz da *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (fig. 6, p. 10) possui semelhança anatômica com o pênis do cachorro, e daí advém, possivelmente, seu nome popular "nó-de-cachorro". Em testes de laboratório a planta já agiu sobre a função motora e a memória de ratos idosos. Testes em humanos possivelmente estão sendo realizados, prova disso é que a patente do nó-de-cachorro já foi requisitada para a fabricação de medicamentos, cujo principal objetivo é saber se a mesma atua contra a perda da memória. (ENCICLOPÉDIA..., 2002).



**Figura 6** - Raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach.

Palazzo *et al.* (2000) testaram uma pomada de extrato liofilizado de nó-de-cachorro a 1% em feridas abertas em ratos para avaliar o poder de cicatrização da

mesma, comparando-a com pomada de Nebacetin® como controle positivo. Os resultados demonstraram que a pomada teste a 1% apresentou, de forma semelhante, a mesma atividade que as pomadas nas concentrações de 2,5 e 5% e o controle positivo.

Em trabalho recente Mattei *et al.* (2001) investigaram o efeito de um extrato padronizado das raízes de nó-de-cachorro, frente ao estresse oxidativo e defesa antioxidante em ratos jovens e idosos. O teste de lipoperoxidação, *in vitro*, comparando-se o extrato de nó-de-cachorro com butil-hidróxi-tolueno, mostrou uma inibição eficiente da lipoperoxidação. Tratamento crônico com o extrato em ratos jovens e idosos resultou em um aumento significativo na atividade da superóxido dismutase em cérebros de ratos idosos. No entanto, não foram observadas variações significativas nas atividades de enzimas antioxidantes em cérebros de ratos jovens, bem como significativos baixos níveis de lipoperoxidação nos cérebros desses animais. Sugere-se que o extrato de nó-de-cachorro reduz o estresse oxidativo para lipídeos de cérebro.

Recentemente, Galvão *et al.* (2002) testaram o extrato BST0298 em ratos jovens e idosos no aprendizado e memória. Observaram que em ratos idosos tratados com extrato, em determinadas doses por determinado período de tempo foi restaurado o déficit de memória, sem no entanto, aumentar a memória quando foi administrada dose única. Observou-se, ainda, um aumento na capacidade de aprendizado (teste T direita/esquerda) em ratos idosos tratados por longo período de tempo. Assim, concluiu-se que a administração do extrato BST0298 de *Heteropteris ahrodisiaca* O. Mach. por 7 dias ou mais, diminui o déficit de memória e aumenta o aprendizado.

Segundo o Laboratório Klein®, que comercializa o nó-de-cachorro Klein®, não são conhecidos os seus constituintes químicos, e sua utilização advém do conhecimento e práticas indígenas nas debilidades nervosas e afrodisíacas (NÓ DE CACHORRO, 2002).

#### **1.4 Atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais de extratos vegetais**

A investigação sobre o conhecimento de determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido amplamente divulgada no meio científico. Em baixas concentrações essas amostras vegetais, exercem inibição

sobre o crescimento de bactérias tanto Gram positivas como Gram negativas, como por exemplo: *Mycobacterium*, leveduras e fungos filamentosos. Assim, extratos vegetais apresentam perspectivas na produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos que possam ser usados na terapêutica de processos infecciosos (Edeltrudes, 2001).

A tendência atual nas pesquisas de produtos naturais, oriundos de plantas, consiste na obtenção de princípios ativos pelo fato de possuírem alto percentual de diversidade molecular, essencial para a descoberta e produção de novos fármacos (Yunes *et al.*, 2001). Nesse sentido, inúmeros trabalhos são publicados, avaliando a sensibilidade antimicrobiana frente a extrativos vegetais, como os que podem ser observados a seguir.

Substâncias fenólicas presentes nos extratos clorofórmico, acetônico e etéreo do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt apresentaram atividade contra bactérias Gram positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*) (Falcão *et al.*, 2002).

Alguns extratos entre eles, metanólico e acetato de etila, das folhas de *Chukrasia tabularis* Adr. Juss., os quais em análises fitoquímicas revelaram a presença de flavonóides e cumarinas, inibiram o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* e *Aspergillus fumigatus*. Já o extrato éter de petróleo foi ativo contra *A. niger* e *A. fumigatus* (Nagalakshmi *et al.*, 2001).

As substâncias luteolina e 3-metóxi-quercetina, isoladas do extrato metanólico de *Gnaphalium oxyphyllum* Var., inibiram *S.aureus* e *B. cereus* (Villagomes-Ibarra *et al.*, 2001).

Em testes de avaliação antimicrobiana e antiviral, de 19 extratos metanólicos de espécies na região do Togo (oeste da África) 17 apresentaram inibição antibacteriana e 10 revelaram atividade antiviral contra herpes simplex, sindbis (vetor insetos) e poliovírus (Hudson *et al.*, 2000).

O tratamento das infecções fúngicas, especialmente em pacientes imunocomprometidos, representa um grande desafio para a clínica. Os fármacos disponíveis no mercado até o momento, possuem além da toxicidade marcante (não diferencia célula alvo de outras não infectadas), uma tendência a resistência. Essas são razões pelas quais permanentemente está se procurando novos agentes antifúngicos mais potentes, mas sobretudo, menos tóxicos que os utilizados atualmente (Yunes *et al.*, 2001). Seguindo essa linha de raciocínio, verifica-se,

também, em literaturas especializadas nos dois últimos anos, uma gama enorme de pesquisas com extrativos vegetais, brutos e/ou semipurificados, para atividade antifúngica.

Barrero (2000) testou derivados de sesquiterpeno lactonas, cinicina e salonitenolida, isoladas de espécies de *Centaurea* e concluíram que as frações de baixa polaridade apresentaram maior atividade antifúngica.

Três di-prenilisoflavonas (6,8-di-prenilgenisteína, 6,3-di-prenilgenisteína e derris-isoflavona) isoladas de *Derris scandens* (Aubl.) Pittier demonstraram atividade antifúngica contra o patógeno humano *Trychophyton mentagrophytes* (Harborne e Willians, 2000).

Das raízes de *Terminalia alata* W. et A., Srivastava *et al.* (2000) isolaram uma flavanona e uma saponina triterpênica, com atividade antifúngica comparado com padrão griseofulvina.

ELSoqli *et al.* (2000) isolaram das folhas de *Maclura tinctoria* (L.) Gaud uma chalcona que demonstrou atividade antifúngica frente a *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, fungos oportunistas na síndrome da imunodeficiência adquirida.

As pesquisas com antivirais tiveram início na década de 50 (Jones, 1998) mas foi somente em 1960 que dois deles foram testados em humanos e liberados para uso clínico, a idoxuridina para tratamento de ceratite herpética e metisazona para profilaxia de varíola e tratamento de complicações da vacinação (Bauer, 1985).

Após um início lento, o desenvolvimento de novos agentes antivirais entrou recentemente em uma fase acelerada. Atualmente existem mais de trinta drogas oficialmente aprovadas sendo que cerca de metade dessas são utilizadas para o tratamento de infecção pelos vírus da imunodeficiência humana. As outras drogas liberadas são usadas no tratamento de infecções pelos vírus da hepatite B, herpesvírus e vírus influenza. Os principais mecanismos de ação desses antivirais são a inibição dos processos iniciais da replicação viral, inibição de proteases virais, inibição do ácido nucléico viral e inibição da enzima transcriptase reversa. Vários dessas substâncias, principalmente os de uso sistêmicos estão associados a efeitos colaterais adversos além da emergência de cepas resistentes (De Clercq, 2001).



A pesquisa de inibidores virais extraídos de plantas vem aumentando consideravelmente, com um grande número de extratos mostrando atividade antiviral seletiva contra diversos vírus RNA e DNA.

Barbieri *et al.* (1982) estudaram proteínas obtidas de sementes de *Phytolacca americana* L., uma erva perene com raiz venenosa. Duas proteínas, previamente identificadas como PAP e PAP II, foram isoladas das folhas e demonstraram atividade contra vírus de plantas e animais.

Lagrota *et al.* (1983) estudaram o efeito do lapachol, substância obtida do gênero *Tecoma* (Bignoniaceae), sobre diversos vírus constituídos de RNA e DNA, em cultura de células de carcinoma de cérvix humano (HeLa), célula de rim de macaco *Rhesus*, célula de rim de macaco verde Africano (*Vero*) e em ovos embrionados com 9 a 11 dias de incubação. O lapachol mostrou eficácia somente sobre os vírus RNA.

Nagata *et al.* (1990) estudaram a atividade antiviral de frações de *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. sobre o gametófito masculino, em pacientes com câncer gástrico, contra o vírus influenza (RNA de fita simples) e em células de epitélio de rim de cachorro Madin-Darby (MDCK). Os autores mostraram que as frações de *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. não impediram a adsorção dos vírus às células mas inibiram a replicação viral por atuarem sobre a síntese de proteínas virais e a RNA-polimerase associadas ao vírus monitorado pelo ensaio de formação de plaque.

Serkedjieva e Hay (1998) isolaram um complexo polifenólico de *Geranium sanguineum* L., utilizado para desordens do trato gastrintestinal e diversos processos infecciosos e inflamatórios. Esse complexo apresentou atividade seletiva contra diversas cepas do vírus influenza, *in vitro*, utilizando células MDCK e células primárias de fibroblasto de embrião de galinha (CEF). A concentração inibitória para 50% das células (IC<sub>50</sub>) foi de 64 µg/ml para células MDCK e 72 µg/ml para células CEF. O mesmo complexo quando combinado com rimantadina produziu um efeito protetor sinérgico com um índice de 77,8% de proteção.

A atividade antiviral de um óleo essencial obtido das partes aéreas de *Santolina insularis* L. contra HSV-1 e herpes simples vírus tipo 2 (HSV-2) foi testada em células Vero por Logu *et al.* (2000). A atividade virucida para o HSV-1, foi determinada pelo ensaio de plaque e resultou em uma inibição viral de 50% e 80%

quando o óleo foi utilizado nas concentrações de 0,88 µg/ml e 1,87 µg/ml, respectivamente. Para o HSV-2 a inibição viral correspondente a 50% e 80% foi obtida nas concentrações de 0,7 e 1,25 µg/ml, respectivamente.

Craig *et al.* (2001) testaram uma fração polissacarídica (APS) extraída de folhas de *Cedrela tubiflora* Bert. (Meliaceae) contra os vírus HSV-2, da estomatite vesicular (VSV) e poliovírus em células de rim de macaco. A fração APS inibiu em 56 e 68% a etapa de adsorção dos vírus VSV e HSV-2, respectivamente. No entanto, a fração não afetou o ciclo replicativo do poliovírus.

Glatthaar-Salmüller *et al.* (2001) estudaram a atividade antiviral em vírus RNA (rinovírus, vírus respiratório sincicial e influenza A) e DNA (HSV-1 e adenovírus 5), *in vitro*, a partir de um extrato das sementes de *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. e Maxim.) Maxim. O extrato apresentou efeito antiviral contra os vírus RNA através da redução do número de plaque.

Semple *et al.* (2001) verificaram a atividade do ácido crisofânico obtido das sementes de *Dianella longifolia* R. Br. (Liliaceae) contra poliovírus em células Vero, de rim de macaco verde Búfalo (BGM) e de pulmão embrionário humano (HEL). A substância mostrou-se eficaz contra o poliovírus inibindo as primeiras etapas do ciclo replicativo viral. Foi observada, ainda, uma inibição do efeito citopático de 50% na concentração de 0,25 g/ml, uma concentração bem abaixo da concentração máxima não tóxica para as células testadas (12,5 g/ml).

Com o objetivo de avaliar o potencial antiviral de plantas da flora de Madagascar, Hudson *et al.* (2000) realizaram uma triagem com 10 plantas. Dessas nove apresentaram atividade contra Herpes simples (HSV), quatro foram ativas contra Sindbis vírus. Destacam-se as espécies *Ravensara retusa* e *Terminalia monoceros* com atividade contra HSV na concentração de 25 µg/ml.

## **1.5 Informações sobre nitrocompostos**

### **1.5.1 Aspectos químicos**

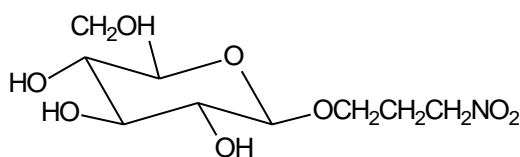
São considerados nitrocompostos alifáticos as substâncias derivadas de hidrocarbonetos alifáticos por meio da substituição do átomo de hidrogênio por um grupo nitro e esse sendo ligado com o átomo de carbono (Amaral, 1980).

O grupo nitro pode ser representado como um híbrido de duas estruturas de ressonância, apresentando carga positiva sobre o átomo de nitrogênio e a correspondente carga negativa distribuída sobre os dois átomos de oxigênio. Essas substâncias são muito pouco solúveis em água, e a partir do nitropropano tornam-se praticamente insolúveis. Possuem, ainda, a característica de apresentar um grande efeito indutivo (-I) do grupo nitro, resultando também em alto momento dipolar, com conseqüente ponto de ebulição elevado (Amaral, 1980)

Os nitrocompostos alifáticos são diferenciados por seus comportamentos frente ao ácido nitroso. Os nitrocompostos primários reagem com ácido nitroso formando  $\alpha$ -hidróxi-amino-nitroalcanos, conhecidos como ácidos nítróicos, os quais se dissolvem em meio alcalino, originando solução com coloração vermelha. Já os nitrocompostos secundários revelam cor azul em meio básico e os terciários não apresentam coloração (Amaral, 1980).

Nitrocompostos de origem natural, parecem possuir como possível precursor biogenético a homoserina, substância intermediária encontrada nas leguminosas (Keeler *et al.*, 1978).

Stermitz *et al.* (1969) relataram a intoxicação de bovinos em conseqüência da ingestão de espécies de *Astragalus* (Leguminosae). Nesse trabalho destaca-se o isolamento de um nitrocomposto alifático ligado a uma molécula de glicose, a miserotoxina (3-nitro-1-propil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo) (fig. 7).



**Figura 7** – Estrutura da miserotoxina

Em 1972 Stermitz e colaboradores isolaram outro nitrocomposto de origem natural, a 1,6-di-O-(3-nitroprapanoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (cibariana), das partes aéreas de *Astragalus cibarius* Sheld.

Majak e Bose (1974) estabeleceram, através de métodos cromatográficos (cromatografia em papel e cromatografia em camada delgada), bem como

espectrometria de massas o isolamento e detecção de nitrocompostos alifáticos em extratos de *Astragalus miser* Douglas ex Hook. var. *serotonius* (timber milkvetch).

Na busca por amostras vegetais positivas para nitrocompostos Stermitz *et al.* (1975) realizaram trabalho na Argentina com 124 espécies de 98 gêneros. Os autores conseguiram isolar de *Heteropteris augustifolia* Gris. um novo nitrocomposto, hiptagina [1,2,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo] (fig. 4, p. 9). A partir desse trabalho, surgiram vários outros que evidenciaram a presença de nitrocompostos em diversas espécies vegetais.

Na década de 80, dois trabalhos tiveram importância no reconhecimento de novas estruturas derivadas da miserotoxina.

Gnanasunderam e Sutherland (1986) isolaram das raízes de *Lotus pedunculatus* Cav. além da hiptagina, a caraquina [1,4,6-tri-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo], a coronariana [2,6-di-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo] e a cibariana [2,6-di-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glicopiranosídeo].

Garcez *et al.* (1989) isolaram das raízes de *Indigofera suffruticosa* Miller a substância 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo.

Em 1992 Majak *et al.* conseguiram isolar três ésteres (3 nitropropanoil) D-glucose, a caraquina, a 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo, e 3,4,6-tri-O-(3-nitropropanoil)- $\alpha$ -D-glicopiranosídeo do vegetal *Indigofera linnaei* Ali.

Majak e Benn (1994) isolaram dos frutos da árvore caraca (*Corynocarpus laevigatus* J.R. e G.Forst.) vários nitrocompostos entre eles: caraquina, cibariana, coronariana, corinocarpina e corolina entre outros. Dentre essas substâncias destaca-se o isolamento inédito de isômeros ( $\alpha$  e  $\beta$  anômeros) de 6-O-(3-nitropropanoil)-D-glicopiranosose.

Benn *et al.* (1995) investigaram vegetais contendo nitrocompostos. Os autores isolaram de *Astragalus canadensis* L. vários derivados nitrocompostos além do ácido 5-oxo-tetra-hidrofuran-3-acético.

### 1.5.2 Efeitos tóxicos de nitrocompostos

Em 1969, Stermitz e colaboradores descreveram um quadro de toxicidade em animais que ingeriram as partes aéreas de espécies de *Astragalus*. Esse efeito, conhecido há muito tempo, foi, então, dividido em três grupos:

- 1) Toxicidade causada pelo acúmulo do selênio.
- 2) Efeito tóxico crônico observado em cavalos onde se relata distúrbios neurológicos.
- 3) Intoxicação aguda causada pela ingestão de diversas espécies que sintetizam nitrocompostos

Na América do Norte existem cerca de 263 espécies de *Astragalus* e todas apresentam nitrocompostos (Williams e Lynn, 1978). Essas substâncias são tóxicas para ruminantes a ponto de levá-los a morte (Stermitz *et al.*, 1969).

Os nitrocompostos são metabolizados no trato digestivo dos ruminantes em 3-nitro-1-propanol (3-NPOH) e ácido 3-nitro-propiónico (3-NPA). Essas substâncias são absorvidas e, através do sistema circulatório, chegam ao sistema nervoso central, principalmente na área do controle da coordenação e as respostas automáticas. Destaca-se que o 3-NPOH é mais rapidamente absorvido no trato digestivo que o 3-NPA. Devido à lenta absorção do trato gastrintestinal (TGI) do 3-NPA, o 3-NPOH torna-se mais tóxico por mg de NO<sub>2</sub> ingerido (Williams e Lynn, 1978).

As substâncias 3-nitro-1-propanol e ácido nitro-propiónico em conjunto com unidade b-D-glucopiranosose (miserotoxina), são produtos tóxicos relatados por inibir o transporte de elétrons na mitocôndria, resultando em debilidade de energia celular. Essas nitro-toxinas induzem a uma degeneração neurológica em ruminantes e humanos, sendo inclusive utilizada em cobaias para modelo da doença de Huntington (Patocka *et al.*, 2000).

Animais que se intoxicam cronicamente pela ingestão de *Astragalus* desenvolvem um quadro de fraqueza nas patas traseiras, tremor, colapso, e finalmente morte por falência cardíaca e respiratória. Em alguns casos de intoxicação aguda os animais podem morrer em tempo de 4-20 horas após se alimentarem desse vegetal. No caso de óbitos, a meta-hemoglobina pode ultrapassar 20% do total de hemoglobina. Isso pode se justificar, pois o nitro grupo em algumas substâncias se complexa com o ferro da hemoglobina para formar meta-hemoglobina (Williams e Lynn, 1978).

Em 1977, Williams *et al.* isolaram das folhas da *Astragalus micchauxii* (O. Kze.) miserotoxina. Essa substância está relacionada com a intoxicação aguda de pintos, quando a quantidade ingerida chegar a 1,7% do peso do animal. Os

sintomas observados foram: depressão, incoordenação, redução da temperatura corporal, alterações da taxa cardíaca e anorexia.

Ouazzani *et al.* (1999) descreveram uma espécie de legume tóxico (*Astragalus lusitanicus* Lam.) que causa intoxicação em pequenos ruminantes, apresentando quadro clínico caracterizado por ciclos de excitação e depressão. Exames macroscópicos nos animais revelaram lesões congestivas, edemas, lesões microscópicas, consistindo principalmente de degeneração vacuolar nos neurônios, hepatócitos e nas células do baço e rins. A glicose e a uréia no sangue também foram incrementadas como resultado da intoxicação. No entanto, essa espécie não forneceu resultado positivo para miserotoxina, e a concentração de selênio é pequena.

## **1.6 Informações sobre di-hidroflavonóis**

### **1.6.1 Aspectos químicos e biológicos**

Os di-hidroflavonóides são biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides. Constituem uma importante classe de polifenóis, e estão presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários dos vegetais.

Como característica comum, essas substâncias possuem uma ligação simples entre os carbonos 2 e 3 da estrutura fundamental dos flavonóides, em consequência disso, apresentam centros de assimetria em suas moléculas. Essas substâncias são obtidos sempre em pequenas quantidades e a estereoquímica é freqüentemente omitida (Zuanazzi, 2001).

Nos di-hidroflavonóis são encontrados dois centros de assimetria (carbonos 2 e 3) e dessa forma, são possíveis quatro isômeros para cada estrutura. Entre 30 di-hidroflavonóis identificados, 25 possuíam a configuração (2*R*:3*R*), três (2*R*:3*S*) e dois (2*S*:3*S*) e nenhum apresentou a configuração (2*S*:3*R*) e muitos dos derivados di-hidroflavonóis foram identificados na forma de heterosídeos (Zuanazzi, 2001).

Essas substâncias heterosídicas, entre eles a astilbina e seus isômeros, possuem fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub> peso molecular de 450,4 e sua forma física é de um pó branco-amarelado (DIHYDROQUERCETIN..., 2002).

Kasai *et al.* (1991) isolaram das folhas de *Engelhardtia crysolepis* Hance. os derivados [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-trans-(2S,3S)] neoastilbina, [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-trans-(2R,3R)] astilbina e [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-cis-(2R,3R)] isoastilbina, e também um novo di-hidroflavonol denominado huanquiosídeo.

Em 1992, Delle Monache e Soares isolaram astilbina dentre outros flavonóides das folhas da espécie vegetal *Petiveria alliacea* L. Da mesma maneira, Inada *et al.* (1992) isolaram astilbina das sementes de *Platycodon grandiflorum* DC.

Somente em 1993, avaliou-se a atividade farmacológica de di-hidroflavonóis. Nesse estudo realizado por Carneiro *et al.* (1993) com as cascas do vegetal *Hymenaea martiana* Hayne (jatobá), os autores avaliaram a astilbina dentre outros, na dor e inflamação, em cobaias.

Trabalho realizado por Kiehlmann e Edmond (1995), revelou o potencial de isomerização das di-hidroquercetinas e seus arranjos nas formas *cis* e *trans*.

De Brito *et al.* (1995) contribuíram ao esclarecimento da quiralidade das agliconas de di-hidroflavonóis. De *Sphaerostephanos arbuscula* Willd. isolaram três di-hidroflavonóis e explicaram o efeito de anisotropia do anel benzeno (B), que altera o deslocamento de prótons de cada isômero no espectro de  $^1\text{H}$  RMN.

A configuração absoluta dos diasterisômeros foi tema do trabalho de Gaffield (1996), reafirmando os resultados de De Brito e colaboradores (1995), com as cascas de *Quintinia serrata* A. Cunn., incluindo análises de dicroísmo circular ao estudo.

Cechinel Filho *et al.* (1998) isolaram, das cascas de *Drimys winteri* J.R. et Forster, entre outras substâncias, a astilbina. Essa foi avaliada quanto à atividade antinociceptiva com resultados pouco expressivos.

Os flavonóides são protetores contra doenças causadas por microorganismos em plantas, podem servir como repelentes de insetos e animais herbívoros, alguns di-hidroflavonóis podem interagir com determinadas enzimas e desse modo interferir em inúmeros processos biológicos (Zuanazzi, 2001).

Sabe-se que os flavonóides [6-hidróxi-canferol 3,7,4'-trimetiléter obtido de *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip.] inibem a cicloxigenase e/ou a 5-lipoxigenase, enzimas da via do ácido araquidônico, responsável pela cascata da inflamação, agindo assim como antiinflamatórios (Harborne e Williams, 2000).

Os flavonóides podem impedir a aderência de placas de gordura nas veias e conseqüentemente diminuir a aterosclerose. Como exemplo cita-se o caso da

2',4',4-tri-hidróxi-3-prenil-chalcona isolada de *Psoralea corylifolia* L. (Harborne e Williams, 2000).

Trabalhos recentes relatam atividade de flavonóides contra bactérias. Prova disso é a retrochalcona (4,4'-di-hidróxi-2'-metóxi-3-prenil) que possui atividade contra *Staphylococcus aureus* com concentração inibitória mínima de 6,25 µg/ml (Harborne e Williams, 2000),

Vários derivados flavonoídicos, como o canferol, são apontados como substâncias naturais que podem impedir o desenvolvimento de tumores no organismo humano (Cutler e Cutler, 1999).

Devido aos fatores expostos, etnobotânicos e etnofarmacológicos, propôs-se a realizar estudo químico de forma biomonitorada, através da avaliação antibacteriana, antifúngica e antiviral de extratos, frações semipurificadas e substâncias isoladas das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (nó-de-cachorro).

## 1.7 Objetivos

- Avaliar a presença dos metabólitos secundários presentes nos extratos das raízes da espécie *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (nó-de-cachorro).
- Isolar e purificar as substâncias químicas principais da espécie vegetal.
- Elucidação estrutural das substâncias isoladas.
- Avaliação da atividade antibacteriana por meio da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima, antifúngica e antiviral de extratos e substâncias isoladas.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Matéria-prima vegetal

A matéria prima vegetal *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. foi coletada em diferentes estações do ano, em Santo Antônio do Leverger, no estado de Mato Grosso (30°28'31" S e 51°35'25" W).



As amostras do vegetal foram identificadas pela Prof. Dra. Miramy Macedo, do Instituto de Botânica da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT). Uma exsicata encontra-se depositada sob o número 22.181 no Herbarium Central da UFMT, Cuiabá.

Foi utilizado como farmacógeno as raízes, que foram parcialmente picadas e secas à temperatura ambiente ( $25 \pm 3$  °C) por um período de 7 dias protegidas da luz solar direta e umidade. Em seguida, as raízes foram moídas em moinho de martelos (Tigre modelo ASN 5) com auxílio de peneira n° 1.

## **2.2 Solventes, soluções e reagentes**

Todo trabalho realizado em laboratório, foi efetuado empregando-se reagentes com grau de pureza pró-análise (p.a.), das marcas Mallinckrodt®, Merck® ou Sigma®, exceto quando especificado.

- Acetato de etila
- Acetona
- Ácido acético
- Ácido fórmico
- Ácido pícrico
- Agar Mueller-Hinton Difco
- Anfoteracina B
- Anidrido acético
- Caldo Mueller-Hinton Difco
- Carbonato de sódio 10%
- Clorofórmio
- DMSO
- DMSO deuterado
- Etanol Carlo Erba®
- Meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
- Metanol
- Metanol deuterado Isotec
- Micostatim ®.
- Mistura etanol-água (1:1; V/V)
- *n*-butanol

- Penicilina
- Reagente Griess-Ilosvay (0,5 g de sulfonilamida, 150 ml de ác. acético 2 N, 0,1 g de N-1-naftil-etil-enediamina, 20 ml de água destilada) (solução B)
- Reagente natural Fluka® artigo nº 42810
- Solução de cloreto férrico 2% em etanol
- Solução salina 0,85%
- Soro fetal bovino Difco
- Tetraciclina
- Tripsina verseno
- Vancomicina
- Sephadex® LH-20 (25-100 µm) Fluka® artigo nº 84952
- Gel de sílica 60 (0,063 – 0,200 mm) para cromatografia em coluna
- Cromatofolha de alumínio gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (20x20 cm)

### 2.3 Equipamentos

- Moinho de martelos Tigre modelo ASN 5 com peneira nº 1
- Evaporador rotatório Büchi Modelo B 480
- Liofilizador Christ Modelo Alpha 1-2
- Balança analítica AND, Modelo HR 200
- Agitador magnético Fisaton modelo 502A
- Lâmpada de ultravioleta 366 e 254 Germetec Modelo Gm 24
- Coletor de frações Isco Modelo 328 e Pharmacia Biotech Frac 200
- Espectrofotômetro de infravermelho JASCO, modelo IR – 700, em pastilha de KBr, na região de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>
- Espectrômetro de massas ESI-MS Quattro LCZ (Micromass, Manchester, UK) com alça de *nanospray*, *Organisch Chemisches Institut* da Universidade de Münster, Alemanha
- Espectrômetro de massas Shimadzu (Tec. Fragmentação) –CG/MS Modelo QP 2000, Universidade Estadual de Maringá
- Espectrômetro de RMN VARIAN modelo Gemini 300BB (<sup>1</sup>H= 300 MHz e <sup>13</sup>C= 75 MHz), Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá
- Polarímetro PERKIN-ELMER Modelo 241, com cubeta de 1 ml, Departamento de Química Orgânica da Universidade Federal de São Carlos

- Ponto de fusão - método *The Thiele Tube* com auxílio de microscópio e instrumentos elétricos

### **2.3.1 Análise química preliminar**

Essas análises objetivaram estabelecer o conhecimento de grupos químicos referenciados no trabalho Galvão (1997). Entre os diferentes ensaios, realizaram-se os seguintes (Harborne, 1984): 1) glicosídeos flavônicos; 2) glicosídeos de núcleo cumarínico; 3) glicosídeos cianogênicos; 4) antracênicos; 5) polifenóis; 6) taninos; 7) glicosídeos cardiotônicos; 8) pesquisa de anel esteroidal; 9) saponinas; 10) mucilagens e 11) alcalóides.

### **2.3.2 Análise cromatográfica**

Para obtenção das diversas frações, semipurificadas, purificadas e para auxiliar no isolamento de substâncias químicas, foram empregados diferentes métodos cromatográficos.

### **2.3.3 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

A cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada para monitoramento das frações oriundas das colunas cromatográficas.

### 2.3.3.1 Di-hidroflavonóis

Para essas substâncias foram realizadas análises por CCD em gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®), e utilizado como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: água (90:5:5 V/V). Após, as placas foram secas em estufa de exaustão e observadas em câmara de UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm e reveladas com solução de cloreto férrico a 2% em etanol ou com reagente natural (2-amino-etil difenil borinato) seguido de visualização sob luz UV 366 nm (Wagner *et al.*, 1984).

### 2.3.3.2 Nitrocomposto

Empregaram-se folhas de alumínio cromatográficas de gel de sílica 60 F<sub>254</sub> (Merck®), e foi utilizado como fase móvel (n-butanol: clorofórmio: metanol 55: 40: 5; V/V), que após o desenvolvimento do cromatograma, foram visualizadas em câmara de UV em 254 nm e borrifadas com NaOH 2 N (solução A) e em seguida com reagente de Griess-Ilosvay (0,5 g de sulfonilamida, 150 ml de ác. acético 2 N, 0,1 g de N-1-naftil-etil-enediamina, 20 ml de água destilada.) (solução B).

### 2.3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Foi usado, para monitoramento das subfrações e substâncias puras, cromatógrafo líquido de alta eficiência, composto de um controlador automático de gradiente Gilson®, com duas bombas modelo Gilson 321; injetor manual Rheodyne com alça de 20 µl; detector UV/VIS Gilson 156; forno para coluna Gilson e Degasser 184. O armazenamento, a manipulação e a interpretação dos dados foram realizados em software Unipoint® LCNT.

Utilizou-se também pré-coluna (c= 4 mm; Ø= 3 mm) e coluna (c= 250 mm; Ø = 4 mm) em fase reversa Lichrospher® C-18 com porosidade de 5 µm.

Para a análise de di-hidroflavonóis foi utilizado o sistema de gradiente binário com água deionizada (5% ácido acético) e metanol com fluxo de 1 ml/min (tab.1).

**Tabela 1** – Sistema eluente utilizado nas análises por CLAE para di-hidroflavonóis

<b>Tempo (min)</b>	<b>Água : ácido acético (5%)</b>	<b>Metanol</b>
0	90	10
15	50	50
20	0	100
35	0	100
40	90	10

As amostras para análise foram previamente dissolvidas em metanol na concentração de 1 mg/ml (substâncias puras) e filtradas em filtro Millipore® (FHLP01300). A temperatura do forno para coluna foi de 30 °C e os cromatogramas foram monitorados nos comprimentos de onda de 278 e 300 nm.

Para a análise do nitrocomposto utilizou-se sistema de gradiente binário contendo: hexano: clorofórmio: acetonitrila (1:5:5; V/V) com fluxo de 1 ml/min (tab. 2).

**Tabela 2** - Sistema eluente utilizado nas análises por CLAE para o nitrocomposto

<b>Tempo (min)</b>	<b>Hexano:clorofórmio (1:5)</b>	<b>Acetonitrila</b>
0	90	10
15	50	50
20	0	100
35	0	100
40	90	10

## **2.4 Preparação dos extratos**

### **2.4.1 Preparação do extrato BST-0298 (extrato total)**

Após secagem em temperatura ambiente, as raízes do “nó-de-cachorro” foram submetidas a processo de moagem em moinho de martelos (Tigre ASN 5). O extrato foi preparado de acordo com a Patente requerida sob sigilo pelos Laboratórios Biosintética Ltda e UNIFESP. O extrato foi congelado em nitrogênio

líquido e submetido ao processo de liofilização e, após, estocado à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.2 Obtenção da fração acetato de etila

Uma amostra (50 g) do extrato bruto liofilizado (BST – 0298) foi solubilizada em água destilada (500 ml). Após, o extrato aquoso foi submetido à partição com acetato de etila em funil de separação (500 ml x 10). As frações acetato de etila foram reunidas e concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório até completa eliminação do solvente orgânico, o mesmo acontecendo com a fração aquosa. Ambos foram congelados e liofilizados. A fração acetato de etila, após liofilização, rendeu 2,7 g. Esse processo foi repetido várias vezes, para que se obtivesse uma quantidade adequada da fração acetato de etila. Armazenaram-se as frações obtidas à temperatura de  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.4.3 Cromatografia em coluna da fração acetato de etila

A fração acetato de etila foi cromatografada em coluna de vidro ( $h=75\text{ x } \varnothing=6\text{ cm}$ ) preenchida com Sephadex® LH-20 como fase estacionária (Cannell, 1998). A mesma foi estabilizada com etanol:água (1:1; V/V). Pesaram-se, a seguir, 15 g da fração acetato de etila, e após ter sido dissolvida, a mesma foi introduzida no topo da coluna. A coluna foi eluída com misturas de solventes e suas respectivas quantidades encontram-se na tabela 3.

**Tabela 3** - Eluentes usados na cromatografia em coluna da fração acetato de etila

Solventes	Quantidade (l)
EtOH : água (1:1; V/V)	4,5
EtOH	3,0
Acetona : água (7:3; V/V)	2,0

Foram recolhidos 10 ml em cada tubo de ensaio em coletor de frações com fluxo de 1 ml/min. Realizou-se acompanhamento através de CCD (seção 2.3.3.1, p. 25).

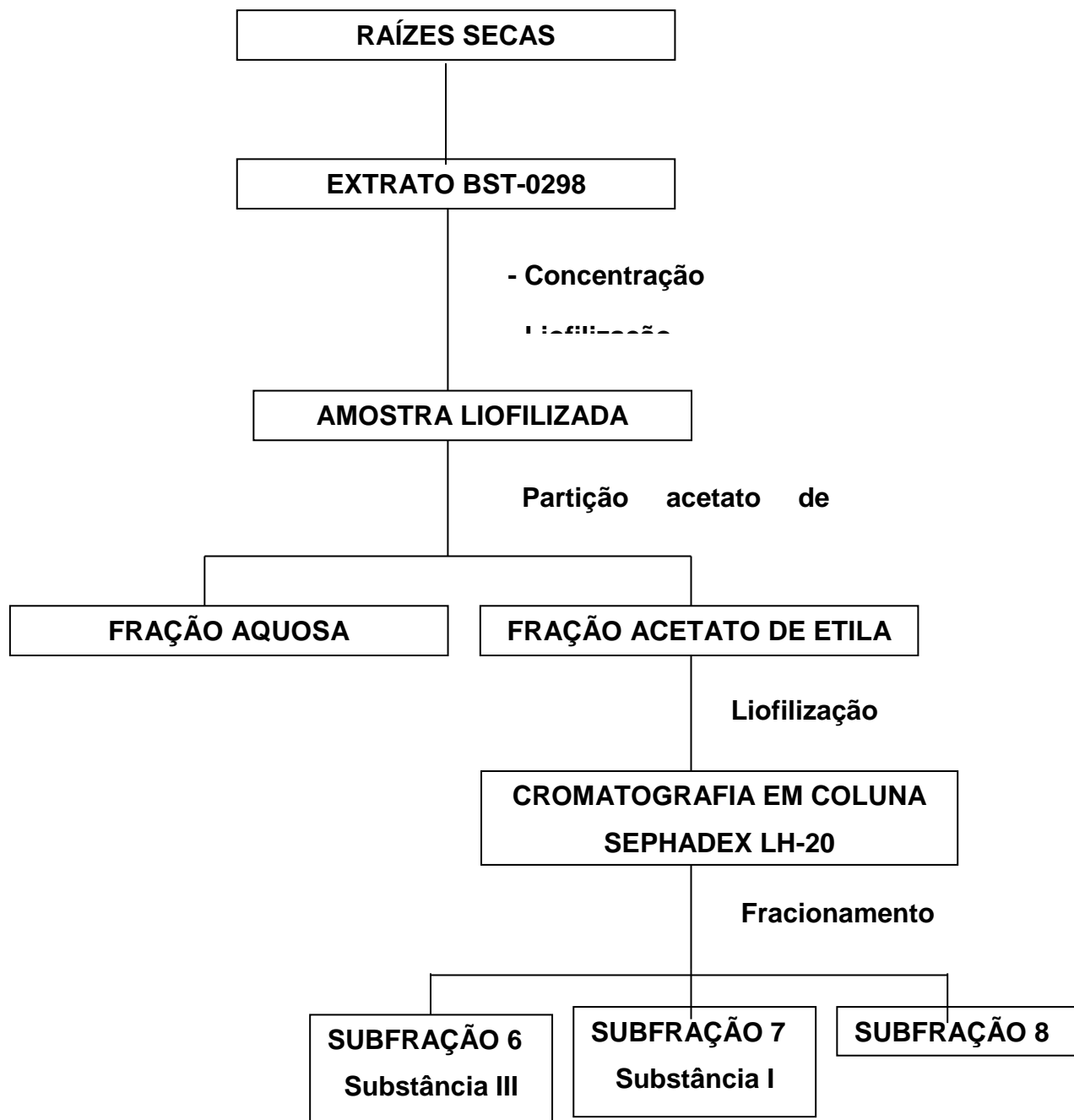
As subfrações (total de 10; tab. 4) foram reunidas por semelhança cromatográfica, concentradas em evaporador rotatório, liofilizadas e armazenadas em freezer à temperatura de -20 °C.

**Tabela 4** – Subfrações obtidas da CC da fração acetato de etila

<b>Código</b>	<b>Frações</b>	<b>Quantidade (g)</b>	<b>% do Total</b>
FA-1	1 – 120	2,9399	19,60
FA-2	121 – 154	0,1842	1,23
FA-3	155 – 244	0,2500	1,67
FA-4	245 – 274	0,0396	0,27
FA-5	275 – 344	0,1200	0,80
FA-6	345 – 424	0,2515	1,68
FA-7	425 – 514	2,3003	15,33
FA-8	515 – 604	1,0954	7,30
FA-9	605 – 710	0,5738	3,82
FA-10	711 – 800	2,0288	13,52
<b>Total</b>		<b>9,7835</b>	<b>65,22</b>

Uma visão mais didática do processo de obtenção dos extratos e frações, incluindo o isolamento inicial da fração acetato de etila, pode ser observada no fluxograma 1.

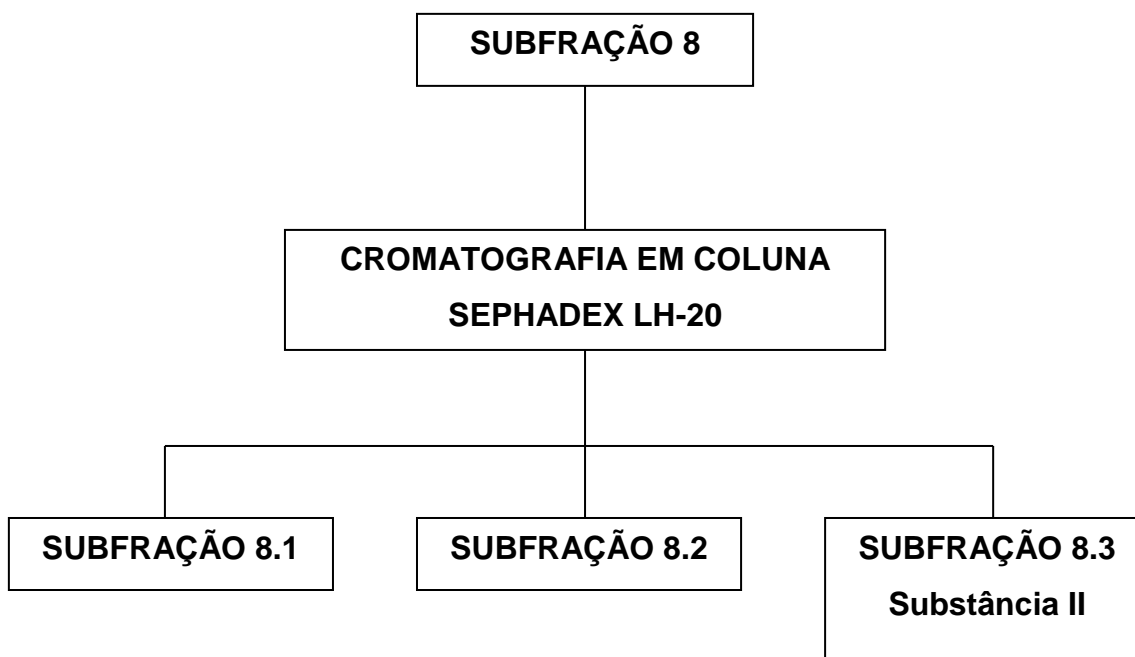
Da subfração 6 originou a denominada **substância III**, enquanto a subfração 7, após processo de recristalização forneceu a **substância I**.



**Fluxograma 1** - Procedimento na produção de extratos e subfrações das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca*

A fração FA-8 foi recromatografada em coluna (h= 50 x Ø= 3,5 cm), com Sephadex® LH-20, sistema eluente etanol:água (1:1; V/V), com volume total de 2000 ml. Os tubos de ensaio foram monitorados por CCD (seção 2.3.3.1, p. 25) fornecendo as subfrações 8.1, 8.2 e 8.3. A subfração 8.3 originou a **Substância II** (fluxograma 2).





**Fluxograma 2** – Fracionamento através de cromatografia em coluna da subfração 8

#### **2.4.4 Reação de hidrólise para flavonóides glicosilados**

A reação de hidrólise para estas substâncias foi realizada sob refluxo (60 min) com adição de HCl 3%. Na seqüência, efetuou-se partição com acetato de etila, realizando-se CCD (gel de sílica F<sub>254</sub>) com a parte aquosa com o sistema eluente clorofórmio:metanol:água (64:36:8; V/V), empregando-se como padrão L-ramnose.

#### **2.4.5 Preparação do extrato BST-0402**

Preparou-se o extrato BST-0402 (Patente requerida sob sigilo – Laboratórios Biosintética Ltda e UEM) com a droga vegetal *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. que após eliminação do solvente orgânico foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, congelado e liofilizado.

#### **2.4.6 Fracionamento do extrato BST-0402**

Uma amostra de 10 g do extrato BST-0402 foi adicionada no topo da coluna cromatográfica (c= 300 x Ø= 70 mm) contendo 300 g de gel de sílica (0,063–0,200 mm). O fracionamento foi realizado empregando-se o método da cromatografia

líquida a vácuo (CLV); volume de 600 ml para cada fração eluída; sob pressão negativa de 600 mmHg (Mello e Petrovick, 2000). Com o sistema eluente obteve-se 13 frações como pode ser observado na tabela 5.

**Tabela 5** - Eluição do extrato BST-0402 por CLV

Fração nº	Eluente (V/V)	Volume (ml)	Quantidade (g)	% do Total
1	Tolueno (100)	600	N/C	0,00
2	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (97: 3)	600	N/C	0,00
3	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (19: 1)	600	0,3791	4,25
4	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (9: 1)	600	5,5285	61,99
5	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (17: 3)	600	1,0230	11,47
6	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (1: 1)	600	0,9343	10,48
7	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (3:17)	600	0,2057	2,31
8	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (1: 9)	600	0,1082	1,21
9	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (1: 19)	600	0,0573	0,64
10	CHCl <sub>3</sub> : MeOH (3: 97)	600	N/C	0,00
11	MeOH (100)	600	0,1570	1,76
12	MeOH : H <sub>2</sub> O (50: 50)	600	0,3141	3,52
13	H <sub>2</sub> O (100)	600	0,2110	2,37
<b>Total</b>			8,9182	100,0

N/C= sem rendimento

Cada uma das frações obtidas (13) foi monitorada com reagente de Griess-Ilosvay, para compostos nitrosos, e por CCD, de acordo com a seção 2.3.3.2 (p. 25). Todas as frações obtidas foram concentradas até completa eliminação do solvente orgânico, liofilizadas e armazenadas em freezer a -20 °C.

A subfração 4, positiva para Griess-Ilosvay, foi eluída exaustivamente com 600 ml [6000 ml de CHCl<sub>3</sub>:MeOH (9:1; V/V)] até reação negativa para Griess Ilosvay, reunida, concentrada e liofilizada, fornecendo a **subfração 4SP**.

#### 2.4.7 Purificação da subfração 4SP através de recristalização

Introduziu-se 1 g da **subfração 4SP** em erlenmeyer, adicionando-se MeOH (200 ml ) sob agitação por 30 min, com formação de um precipitado branco. Esse foi

separado do sobrenadante, de coloração amarelada, por centrifugação. Após, o sobrenadante e o precipitado foram concentrados e liofilizados. Foi realizado acompanhamento cromatográfico por CCD (seção 2.3.3.2, p. 25). O precipitado foi denominado de **substância IV**.

O sobrenadante foi recristalizado utilizando-se várias alíquotas de uma solução MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1; V/V), e o precipitado obtido foi guardado para futuras análises.

#### **2.4.8 Reação de hidrólise para nitrocompostos**

A reação de hidrólise para nitrocompostos foi realizada com NaOH 1 *M*. Os hidrolizados foram neutralizados com CMC (carboximetil celulose), acidificados com HCl 2 *N* e particionados com acetato de etila. A parte aquosa foi submetida a CCD com fase móvel acetato de etila:metanol:ác. acético:água (3:3:2,5:1,5; V/V). Como padrão utilizou-se amostra de glicose.

### **2.5 Ensaio biológicos das substâncias I a IV**

#### **2.5.1 Avaliação de atividade antibacteriana**

##### **2.5.1.1 Concentração inibitória mínima (CIM)**

A droga teste (10 mg), foi diluída em DMSO e água (1:1), filtrada e novamente diluída em 1/5 em caldo Mueller-Hinton (CMH), resultando em uma concentração final de 2 mg/ml (Solução-Mãe-SM). Foi utilizado placa de microdiluição com 96 poços, contendo em cada poço 100 µl de CMH.

Adicionaram-se 100 µl de SM ao primeiro poço (1 mg/ml). Homogeneizou e transferiram-se 100 µl do primeiro para o segundo poço (500 µg/ml), e, assim, sucessivamente até o sétimo poço. As concentrações finais, do primeiro até o sétimo poço, respectivamente, ficaram determinadas como segue: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,62 µg/ml. O último poço (oitavo) é destinado ao controle positivo, onde se encontram CMH e o microrganismo a ser testado. A todos os poços foram adicionados 5 µl da suspensão de microrganismos teste padronizada e, em seguida a placa foi incubada a 37 °C em estufa bacteriológica durante 24 h.

A inibição do crescimento microbiano (CIM) foi evidenciada pela ausência de crescimento no poço da placa de microdiluição, onde houve a menor concentração da droga teste.

Os microrganismos, da *American Type and Culture Collection* (ATCC), utilizados no teste antibacteriano foram: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6623) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) (Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá).

Na padronização dos microrganismos, foram acrescentadas alíquotas de caldo Mueller-Hinton a um tubo de ensaio contendo solução salina até obtenção de turvação igual à solução referência (escala McFarland: suspensão de BaSO<sub>4</sub> 1,5 x 10<sup>8</sup> UFC/ml). O passo seguinte à preparação foi diluir 100 µl da solução salina em 900 µl de caldo Mueller-Hinton.

Os antibióticos de referência utilizados foram: 1) penicilina para *S. aureus*: colocou-se 1 mg de penicilina em 200 µl de água destilada (solução A: 5 mg/ml). A seguir a solução A foi diluída 1:100 em água destilada (solução B: 0,05 mg/ml). A solução B foi novamente diluída 1:10 em caldo Mueller-Hinton, onde conseguiu-se concentração final de 5 µg/ml e 2) tetraciclina e vancomicina para *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*: diluíram-se 5 mg em 200 µl de água destilada (solução A). A solução A foi diluída 1/100 em água destilada (solução B). Diluiu-se 1/10 da solução B em CMH (solução C). Transferiram-se 100 µl da solução C para o primeiro poço da microplaca de diluição (25 µg/ml).

### **2.5.1.2 Concentração bactericida mínima (CBM)**

A concentração bactericida mínima foi realizada após a observação da inibição do crescimento microbiano (MIC) ter sido evidenciada pela ausência de crescimento no poço da microplaca de diluição, na menor concentração da droga. O passo seguinte foi realizar plaqueamento da concentração da droga teste, com o poço que apresentou a menor CIM. e de dois poços posteriores sem crescimento microbiano, em placa com meio ágar Mueller-Hinton (AMH). Para tanto foi transferido com auxílio de alça de semeadura cerca de 10 µl de amostra do poço isento de crescimento para placa de petri com meio nutriente. Após incubação da placa em estufa bacteriológica por 24 h a 37 °C, foi realizada leitura da mesma

considerando a Concentração Bactericida Mínima (CBM), observando-se quando ocorre inibição de 99,9% do microrganismo.

## **2.5.2 Avaliação da atividade antifúngica**

### **2.5.2.1 Concentração inibitória mínima (CIM)**

A droga teste pesada (10 mg) foi diluída em solvente adequado (DMSO: salina 1:1; V/V), e em seguida novamente diluída em caldo dextrose Sabourand (CDS), originando uma concentração final de 2 mg/ml (Solução-Mãe-SM). A todos os 96 poços da placa de microdiluição foram adicionados 100 µl de CDS. Na seqüência foram adicionados 100 µl da SM para o primeiro poço contendo 100 µl de CDS. A partir daí foi realizada homogeneização e transferidos 100 µl para o segundo poço (500 µg/ml) e, assim, sucessivamente até o sétimo poço obtendo-se as respectivas concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 µg/ml. O último poço é destinado ao controle positivo, onde se encontram apenas o CDS e o microrganismo teste. Em todos os poços foram adicionados 5 µl da suspensão de microrganismos padronizada, e em seguida a placa foi incubada a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 h.

A inibição do crescimento microbiano (CIM) pode ser observada após o período de tempo, pela ausência de crescimento no poço da microplaca de diluição na menor concentração da droga.

Os microrganismos utilizados no teste antifúngico foram: *Candida albicans*; *Candida parapsilosis*; *Candida krusei* e *Candida tropicalis*, fornecidas pelo Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Maringá.

Para a padronização dos microrganismos as amostras foram cultivadas em CDS por 24 h a 37 °C, a partir de colônia isolada em placa de petri. Foi realizada padronização do tubo a 0,5 da escala Mcfarland  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml (para leveduras equivale a  $1,5 \times 10^6$  UFC/ml) e conseqüente diluição 1/10 (V/V) da suspensão de fungos em CDS.

Para a padronização dos antibióticos utilizou-se Micostatin® (Nistatina). Pesou-se 1 mg de Micostatin e diluiu-se em 50 µl de DMSO acrescentando-se 950 µl de água destilada, denominada de solução A (concentração de 1 mg/ml). A solução A foi novamente diluída 1/20 (V/V) em CDS originando a solução B

(concentração de 50 µg/ml). A solução B foi diluída 1/2 (V/V) no poço, com concentração de 25 µg/ml. Micostatin® (Nistatina) possui valor de referência para MIC de 1,56.

### **2.5.2.2 Concentração fungicida mínima (CFM)**

A concentração fungicida mínima é determinada pela subcultura do poço sem crescimento no teste de determinação do CIM, que foi transferida com auxílio de uma alça de semeadura (cerca de 10 µl) para placa de petri contendo ágar dextrose Sabourand (ADS). As amostras foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 48 h. Considerou-se a concentração mínima fungicida quando essa subcultura com amostra mata 99,9% do microrganismo.

### **2.5.3 Avaliação de atividade antiviral**

#### **2.5.3.1 Método TCID<sub>50</sub>**

Iniciou-se a cultura com células Hep2 (células epitelióides de carcinoma de laringe humano) que foram cultivadas em meio modificado de Dulbecco (DMEM). Esse foi suplementado com 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2,5 µg/ml de fungizona e 8% de soro fetal bovino (SFB), e estocados a 37 °C em garrafas do tipo Milk para fins de estoque celular. As células Hep2 foram subcultivadas quando as culturas-mãe apresentavam confluência do tapete celular em 100%, o meio foi descartado e o tapete de células (fixado no fundo das garrafas) lavado com tampão salina (pH 7,3) e SFB. Em seguida foi adicionado volume suficiente de solução de tripsina-verseno, previamente aquecida a 37 °C, e mantida em contato por 1 min para dispersão celular. Ao final desse período, o excesso da solução dispersante foi removido e o tapete celular desfeito com movimentos bruscos. À solução de células assim obtida, foi adicionado meio de cultura fresco com densidade de aproximadamente 10<sup>6</sup> células/ml e semeada em outros frascos. A suspensão obtida foi mantida em sistema fechado com rolha de borracha e mantida em estufa a 37 °C.

A amostra de poliovírus tipo-1, do *American Type and Culture Collection* (ATCC), foi fornecida pelo Departamento de Virologia do Instituto de Microbiologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (DV-IMPPG-UFRJ).

Com finalidade de reativação viral, essas amostras foram inoculadas em culturas de células Hep2 e após o aparecimento de efeito citopático característico, evidenciado pela completa degeneração da monocamada de células, onde se observa regiões claras entre as células, essas culturas puderam então ser submetidas a ciclos de congelamento e descongelamento com a finalidade de se manter os estoques virais.

O teste de citotoxicidade das substâncias I, II, III e IV foi realizado em cultura de células Hep2 crescidas 48 h em placas de 96 poços. Após confluência de 70% do tapete celular foi inoculado 0,1 ml de meio DMEM tratado com várias concentrações das substâncias: 5; 6,25, 10, 12,5, 20, 25 e 50 µg/ml. Paralelamente fez-se controle de células e vírus sendo mantida em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. A leitura foi realizada diariamente com o objetivo de observar alterações morfológicas nas células até o sétimo dia, onde se encerrou o teste, conforme a metodologia utilizada.

A titulação viral pelo método de dose infecciosa em cultura de células (TCID<sub>50</sub>), foi realizada com titulações virais em microplacas de 24 poços. Os vírus utilizados nos experimentos foram diluídos 1/10 em meio de cultura de células a partir de 10<sup>-1</sup> até 10<sup>-11</sup>. O volume de 0,1 ml de cada diluição foi inoculado em uma série de 6 repetições: para controle de células (n= 6 poços), para controle de vírus da atividade terapêutica ou virucida (n= 6 poços) e orifícios destinados ao teste com as substâncias I, II, III e IV, já padronizada pelo teste de citotoxicidade (n= 6 poços). A seguir as amostras foram estocadas em estufa por um período de 7 dias e, ao término da leitura, os dados foram computados pelo cálculo do título viral (Nishimura *et al.*,1977).

### **2.5.3.2 Método PLAQUE**

O ensaio de PLAQUE foi realizado em cultura de células Hep2 confluentes cultivadas em placas com 24 poços. Seguiu-se à retirada do inóculo dos poços da placa com auxílio de uma micropipeta. Após confluência do tapete e retirada do meio de crescimento dos poços, foi inoculado 0,5 ml do décimo de diluição viral

estabelecido para o vírus e respectivos controles de células e substâncias teste e mantido a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub> por 30 min de adsorção para poliovírus. Após a incubação, o excesso de inóculo foi descartado e aplicou-se em cada poço 1 ml de uma mistura: meio nutriente (Cl<sub>3</sub>Mg 25 milimolar) e agarose 1,5% (previamente fundida e mantida a 45 °C) na proporção 1:1 deixando-se solidificar por 30 min em estufa a 37 °C com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 h foi aplicado 1,5 ml de formol a 10% em SFB em cada orifício e deixado a microplaca à temperatura ambiente protegido da luz. Depois desse tempo foi retirado o formol, e com auxílio de uma espátula foi retirada a camada nutriente solidificada de cada poço e aplicado corante cristal violeta a 5% em solução de etanol a 20%, adicionado de 5% de formalina. Assim, verificaram-se os espaços de inibição viral na placa.

### **2.5.3.3 Método de imunofluorescência**

O teste de imunofluorescência foi realizado em cultura de células Hep2 em tubos de Leighton de vidro, adicionado de 1,5 ml de amostras das substâncias teste, e meio DMEM com amostras virais (na concentração de 10<sup>-1</sup> e 10<sup>-2</sup>) e, nos tubos controle viral e controle de células. Esses tubos foram colocados em estufa a 37 °C por 24 h. A seguir foram introduzidas ao tubo lamínulas com acetona gelada (-20 °C) por 10 min. Após, retirou-se a lamínula do tubo e acrescentaram-se 25 µl do soro de humanos previamente imunizados contra o poliovírus (1:20; V/V) diluído em SFB estéril. Em seguida essas lamínulas foram incubadas por 30 min a 37 °C em câmara úmida. Após o tempo, as lamínulas foram lavadas com SFB e adicionaram-se 25 µl de soro de coelho (1:200 V/V) antiglobulina humana conjugado com isotiocianato com fluoresceína (ITCF), seguida de incubação a 37 °C por 30 min em câmara úmida e escura. Na seqüência as lamínulas foram lavadas por 3 vezes com soro SFB, secas ao ar, montadas em lâminas de vidro com glicerina tamponada em pH 7,3 e observadas em microscópio Nikon®-Labobhot-2 com filtro de fluorescência para fluoresceína com foco de 40 vezes de aumento, realizando-se a contagem de vírus em área de 1 cm.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sabe-se que mais de 25% dos produtos farmacêuticos em uso hoje no mundo são derivados de produtos naturais. Devido a esse dado, o interesse por pesquisas nessa área permanece muito grande. As indústrias farmacêuticas estão investindo maciçamente em sistemas de triagem em alta escala na procura de novos fármacos, seja através da síntese por química combinatória, em inventários automatizados de compostos, entre outros. Acredita-se que essa busca fundamentada na quantidade e não em estudos dirigidos por resultados, condicione as indústrias a um trabalho árduo e de custo muito elevado. Assim, encontrar uma molécula importante com propriedades de um fármaco em potencial é uma tarefa das mais difíceis, ou como relatam os autores: "... é quase como achar uma agulha no deserto". Esse, entre outros motivos, levou muitas indústrias farmacêuticas e os cientistas a procurarem moléculas protótipos nas plantas medicinais, que possuem uma informação histórica importante: aquela da medicina popular (Williams e Lenke, 2002).

Atualmente existe uma grande quantidade de pesquisas em busca de moléculas ativas nas plantas, organismos marinhos, insetos e microrganismos. Isso pode ser evidenciado tanto na área acadêmica como industrial, demonstrando que existe uma ligação ou retroalimentação entre ambas. Nessa área científica, pode-se simplesmente observar nas novas e velhas revistas o incremento das publicações científicas orientadas para essa área. Já na área industrial, das 42 moléculas novas com importantes atividades biológicas descobertas em 1992, um total de 18 eram oriundas de produtos naturais ou derivados (Yunes *et al.*, 2001).

A diversidade molecular é um fator importante para a procura em plantas de novas moléculas. Isso significa, também, substâncias com diferentes propriedades físico-químicas, que representam um desafio para o químico ou farmacêutico que pretende isolar e determinar a estrutura de compostos ativos, uma vez que um extrato de determinada planta pode conter centenas ou milhares de compostos (Barreiro, 2000).

Assim, entre os métodos iniciais para se conhecer melhor uma droga vegetal, além do estabelecimento do controle de qualidade, a realização de análise química preliminar é uma outra possibilidade para estabelecer o direcionamento correto para os estudos

químicos. Vários estudos têm sido realizados nesse sentido (Souza, 1991).

As reações de identificação de grupos químicos realizados com as raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. revelaram a presença de diferentes grupos como pode ser observado na tabela 6.

**Tabela 6** - Identificação de grupos de substâncias através de análise fitoquímica preliminar

<b>Grupo químico</b>	<b>Resultado</b>
Flavonóides	(+)
Polifenóis	(+)
Taninos	(+)
Saponinas	(+)
Gomas e Mucilagens	(+)
Esteróides	(+)
Alcalóides	(+)
Antracênicos	(+)
Cianogênicos	(-)
Antocianinas	(-)
Cumarinas	(-)

(+) = positivo; (-) = negativo

Uma outra forma de avaliar uma droga vegetal ou seus extratos é através de outras propriedades tais como: características organolépticas, visualização de coloração e cálculo do teor de extrativos dos extratos. Essas características são comuns de serem observadas nas monografias farmacopéicas de drogas vegetais (Farmacopéia, 1988). Essas características do extrato BST-0298, preparado a partir das raízes do nó-de-cachorro, podem ser observadas na tabela 7.

**Tabela 7** - Características do extrato BST-0298

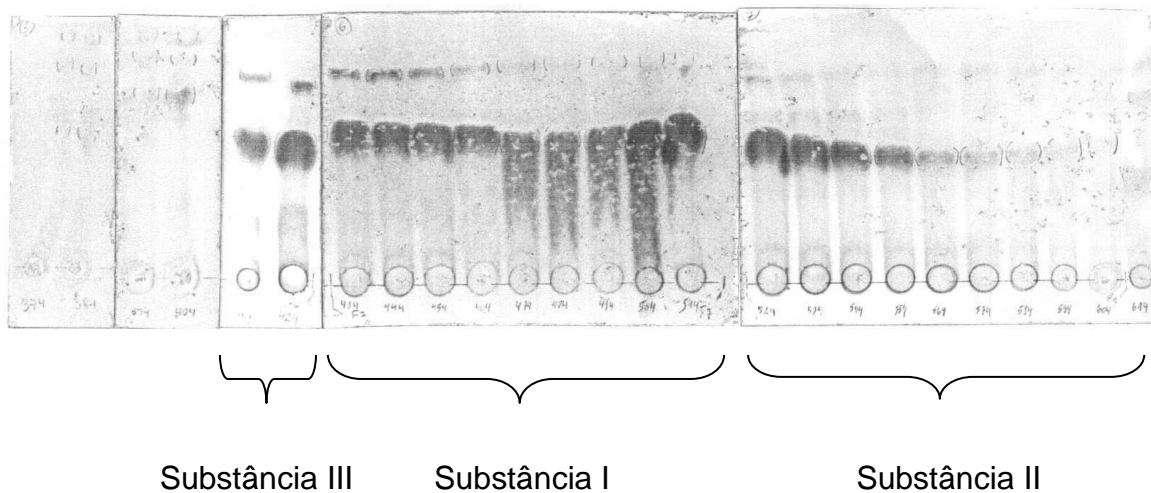
<b>Análise</b>	<b>Característica observada</b>
Cor	Roxo-avermelhado
Sabor	Adstringente e amargo
Rendimento de extrativos n= 3	33 %

Ressalta-se que poucos estudos químicos foram realizados até o momento com as raízes da droga vegetal *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., exceto o trabalho de De Pieri *et al.* (2000) que isolaram e identificaram três compostos flavonoídicos glicosilados isoméricos (astilbina, neoastilbina e isoastilbina). Assim, a possibilidade de se isolar novas substâncias é uma realidade, empregando-se metodologia similar ou mesmo modificando-a.

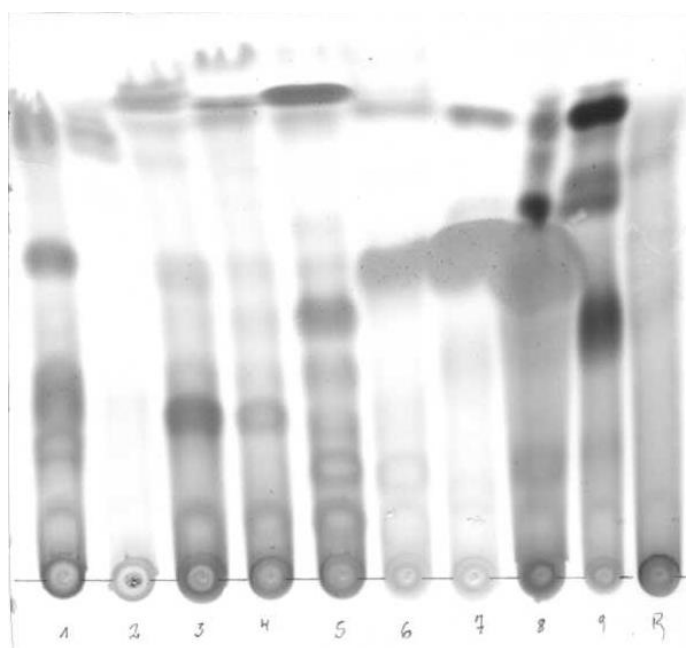
O estudo químico dos extratos BST-0298 e BST-0402 obtidos das raízes do vegetal *H. aphrodisiaca* O. Mach., com base nos trabalhos realizados até o momento juntamente com a literatura consultada, foram direcionados, para dois grupos químicos diferenciados, derivados de flavonóides (De Pieri *et al.*, 2000) e nitrocompostos (Stermitz *et al.*, 1975).

A tabela 6 apresenta positividade para compostos fenólicos, os quais foram observados através de uma análise cromatográfica (seção 2.3.3.1, p. 25) com aplicação e revelação no cromatograma do extrato BST-0298.

A fração acetato de etila foi fracionada por cromatografia em coluna e detectou-se substâncias fenólicas, por cromatografia em camada delgada (CCD, seção 2.3.3.1, p. 25). A figura 8 mostra, inicialmente, sob luz UV 254 nm extinção de fluorescência e coloração intensa e escura (azul a preto), quando revelados com FeCl<sub>3</sub>, característica de compostos polifenóis (Wagner *et al.*, 1984). As zonas apresentaram-se com valores de R<sub>f</sub> na faixa de 0,65 (fig. 8). Já a revelação do cromatograma com o reagente natural seguido de visualização sob luz UV 366 nm forneceu manchas características de flavonóides, de coloração amarela intensamente fluorescente, com valor de R<sub>f</sub> de 0,65 (fig. 9) (Wagner *et al.*, 1984).



**Figura 8** – CCD das subfrações da fração acetato revelada com  $\text{FeCl}_3$  (2.3.3.1; 40  $\mu\text{l}$ )

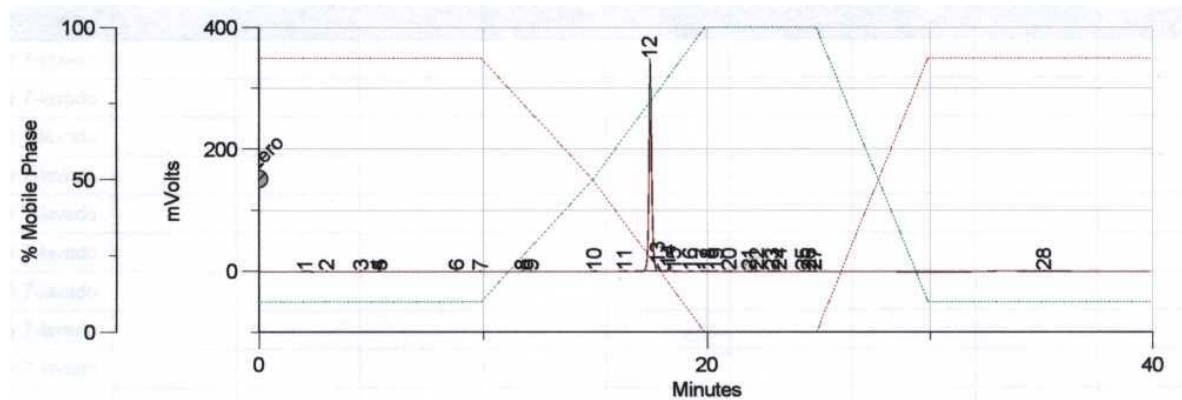


**Figura 9** – CCD das subfrações da fração acetato revelada com reagente natural (2.3.3.1; 40  $\mu\text{l}$ )

A fração acetato de etila (fracionamento em coluna Sephadex® LH-20) forneceu 10 subfrações (tab 4; p. 28), de acordo com a similaridade cromatográfica. O cromatograma da subfração 7, com  $R_f=0,60$  e coloração cinza escuro (revelação com  $\text{FeCl}_3$ ), poderia referir-se a um composto do tipo fenólico.

A subfração 7, denominada de **substância I**, foi submetida a processo de recristalização com MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1; V/V), filtrada, liofilizada e submetida às análises espectroscópicas no infravermelho, de massas, <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN, COSY, HETCOR, DEPT, dicroísmo circular e atividade óptica.

Com essa substância realizou-se, também, análise por CLAE, cujo pico (número 12) apresentou tempo de retenção de 17,46 min (fig. 10).

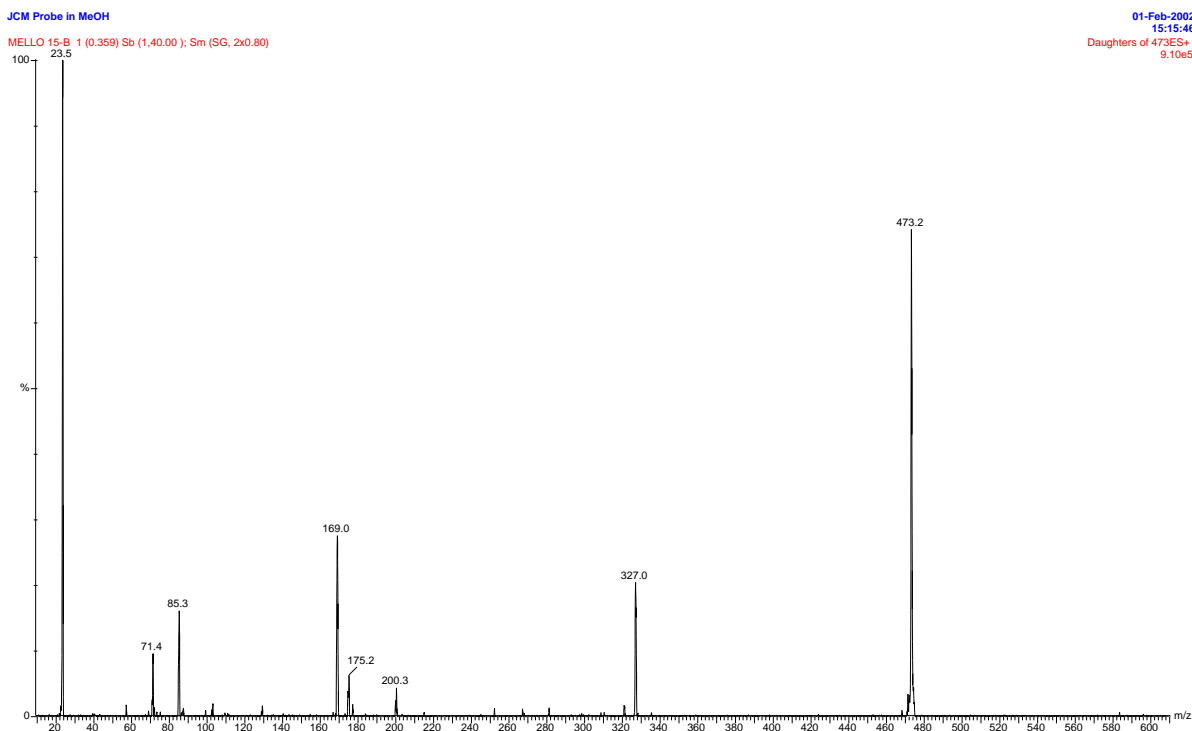


**Figura 10** – Cromatograma obtido por CLAE da **substância I**

No espectro no infravermelho da **substância I** (fig. 11) observou-se banda em 3397 cm<sup>-1</sup> atribuída a vibração de grupo –OH característica de hidroxilas. Uma banda em 1647 cm<sup>-1</sup> referente ao estiramento C=O, supostamente no caso da **substância I** relacionada ao anel heterocíclico de flavonóides, ou ainda a carbonilas  $\alpha,\beta$  insaturadas. Observam-se, também, bandas de estiramento C=C entre 1450 cm<sup>-1</sup> a 1647 cm<sup>-1</sup> que nesse caso podem estar relacionadas à presença de anel aromático. Esses dados conferem com aqueles obtidos por Tschesche *et al.* (1979).

**Figura 11 - Espectro no infravermelho da substância I**

O espectro de massas foi medido no modo positivo em Quattro LCZ e forneceu um íon pseudo molecular  $[M+Na]^+$  473, conforme se observa na figura 12, bem como seus fragmentos. A primeira fragmentação revela perda de 146 unidades de massa atômica, que evidencia uma unidade de deóxi-hexose, importante para evidenciar estrutura fundamental di-hidroflavonol e unidade de açúcar na substância.



**Figura 12** – Espectro de massas da **substância I**  $[M+23]^+$

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN da **substância I** (fig. 13) revela sinais na região de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,94, 6,83 e 6,79 (ppm) referentes a um sistema do tipo AMX, característicos de di-hidroxilação no anel B atribuídos aos hidrogênios H-2', H-6', H-5' (tab. 8), respectivamente. Na região aromática observa-se a presença de dois dubletos com deslocamentos de  $\delta$  5,90 e 5,88 (ppm) estabelecidos para H-6(A) e H-8(A) (tab. 7) do anel A de flavonóides.

No espectro COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) (fig. 14) percebe-se uma correlação entre os hidrogênios em  $\delta$  5,06 e 4,56 (ppm) dubletos com constante de acoplamento de 10,8 Hz, correspondendo aos hidrogênios alifáticos H-2 e H-3 (anel C), respectivamente. Com essas constantes de acoplamento deduz-se a inexistência de dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3 e pode-se estabelecer o tipo de configuração relativa, se *cis* ou *trans* (De Britto *et al.*, 1995).

**Figura 13** – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da **substância I** ( $\nu=300$  MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  relativo para TMS)



Através das constantes de acoplamento de  $J_{H_2-H_3} = 10,8$  Hz observadas no espectro pode-se afirmar que o composto possui uma configuração relativa do tipo 2,3-*trans*. A constante de acoplamento entre H-2 e H-3 igual ou inferior a 2 Hz, caracteriza a configuração relativa do tipo 2,3-*cis* (Mello *et al.*, 1996). Com base nesses dados, conclui-se que a substância I pertence à classe dos flavonóides tipo di-hidroflavonóis, derivados da quercetina (Zuanazzi, 2001).

Outros sinais são correlacionados no espectro COSY ( $^1H/^1H$ ) (fig. 14) sendo característicos de porção açúcar (Inada *et al.*, 1992).

Quanto aos sinais de hidrogênios atribuídos a parte açúcar no espectro de  $^1H$  RMN pode-se destacar, em  $\delta$  4,03 (ppm) um dubleto com constante de acoplamento  $J=1,2$  Hz, relativo ao hidrogênio H-1" (anomérico), ressaltando conformação espacial  $\alpha$ . Correlações entre o H-1" (anomérico; dubleto) com H-2" (duplo dubleto) pode ser observada no COSY, e verifica-se o acoplamento  $\delta$  4,03 e 3,52 (ppm), respectivamente. A presença de um dubleto ( $J= 6,3$  Hz) em  $\delta$  1,17 (ppm) evidencia presença de grupo metila ( $-CH_3$ ). Conforme correlação sugerida pelo COSY, o mesmo refere-se ao hidrogênio H-6". Outros hidrogênios da **substância I** foram correlacionados e suas respectivas constantes de acoplamento, bem como multiplicidade e deslocamentos podem ser observados na tabela 8.

Dados espectrais de DEPT (fig. 15) confirmam em deslocamento  $\delta$  17,78 (ppm) a presença de grupamento  $-CH_3$ , se comparado com espectro de  $^1H$  RMN com relação ao mesmo grupo em  $\delta$  1,17 (ppm).

Dados de  $^{13}C$  RMN (fig. 16) constantes na tabela 9, estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (De Britto *et al.*, 1995).

**Figura 14** – Espectro COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) da **substância I** ( $\nu=300$  MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  relativo para TMS)

**Tabela 8** - Dados de  $^1\text{H}$  RMN da **substância I** ( $\nu=300$  MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  relativo para TMS)

hidrogênio	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
2	5,06	d	10,8
3	4,56	d	10,8
8	5,88	d	2,1
6	5,90	d	2,1
2'	6,94	d	1,8
5'	6,79	d	8,1
6'	6,83	dd	8,4;1,8
1''	4,03	d	1,2
2''	3,52	dd	3,3;1,8
3''	3,65	dd	9,6;3,3
4''	3,29	dd	9,9;9,9
5''	4,24	dquart	9,9;6,2
6''	1,17	d	6,3

**Figura 15** - Espectro DEPT da **substância I** em CD<sub>3</sub>OD

**Figura 16** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz) da **substância I** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

**Tabela 9** - Dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da **substância I** em  $\text{CD}_3\text{OD}$ .

Carbono	$\delta$ (ppm)
2	84,02
3	78,62
4	196,25
5	168,84
6	97,45
7	165,73
8	96,35
9	164,32
10	102,57
1'	129,32
2'	115,59
3'	146,72
4'	147,55
5'	116,42
6'	120,61
1''	102,28
2''	71,82
3''	72,20
4''	73,84
5''	70,55
6''	17,78

Pela análise do espectro HETCOR da **substância I** (fig. 17) estabeleceram-se as devidas correlações diretas entre  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ . Desse modo, pode-se atribuir inequivocadamente cada sinal de  $^1\text{H}$  a seu respectivo  $^{13}\text{C}$ , facilitando a comprovação do resíduo de açúcar da substância.

**Figura 17 - Espectro HETCOR ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) da substância I em  $\text{CD}_3\text{OD}$**

Estudos dos deslocamentos químicos no espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da parte aglicônica de di-hidroflavonóis (por exemplo, a taxifolina, fig. 18), quando comparados com o heterosídeo, serviram como base para identificação do açúcar majoritário e o sítio de ligação no C-3. Mendez *et al.* (1994) isolaram 5,7,2',5'-tetra-hidróxi-di-hidroflavonol-3-ramnosídeo de *Plinia pinnata* L. Os autores destacam que as principais mudanças acontecem nos deslocamentos C-4 (2,0 ppm) e C-2 (1,8 ppm) para campo mais alto e, para campo mais baixo observa-se deslocamento no C-3 com diferença de 4,0 ppm. Outro trabalho, que sustenta essa hipótese é de Timbola *et al.* (2002). Os di-hidroflavonóis glicosilados de *Eugenia jambolana* Larmark demonstraram mudanças nos deslocamentos dos carbonos C-2, C-3 e C-4 observados no  $^{13}\text{C}$  RMN, justificando a posição do açúcar em C-3.

Entretanto, a confirmação do açúcar ramnose na posição C-3 pode ser observada em Agrawal *et al.* (1981). Os deslocamentos químicos em  $^{13}\text{C}$  RMN são semelhantes aos observados para a **substância I**, através dos valores de C-2, C-3 e C-4, como podem ser visualizados na tabela 10, com deslocamento superior a 5 ppm entre a taxifolina e a **substância I** em relação ao C-3. De acordo com a avaliação dos dados obtidos e, com a literatura consultada (Itokawa *et al.*, 1981) afirma-se que o açúcar encontra-se posicionado em C-3.

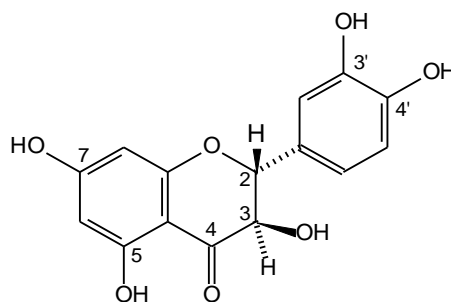


Figura 18 – Estrutura química da taxifolina

**Tabela 10** - Diferentes deslocamentos químicos (ppm) no espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para taxifolina e **substância I** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

Carbono	Taxifolina	Substância I
C-2	84,68	84,02
C-3	73,24	78,62
C-4	197,89	196,25



Com objetivo de comprovar a parte glicosídica da **substância I** como ramnose, foi realizada reação de hidrólise (seção 2.4.4, p. 30) empregando-se padrão L-ramnose. Confirmou-se tratar da ramnose pela semelhança no valor de  $R_f=0,64$ .

A quiralidade da aglicona da **substância I** pode ser sustentada através de dados fornecidos pelas análises nos espectros de dicroísmo circular (CD), confirmando a configuração absoluta como sendo do tipo (2*R*,3*R*). Através desse método de análise, a **substância I** apresentou curva em 290 nm (efeito *Cotton* negativo) e ainda curva em 330 nm (efeito *Cotton* positivo) (fig. 19). Esses dados conferem com os fornecidos pela literatura, apresentando um efeito *Cotton* negativo em 294 nm de 43000° em MeOH (De Britto *et al.*, 1995), ao mesmo tempo em que Kasai *et al.* (1991) fornece o espectro dessa substância com o mesmo efeito *Cotton* negativo na região de 290 nm e um efeito *Cotton* positivo na região de 330 nm.

Sabe-se que substâncias orgânicas possuem propriedades de desviar o plano da luz polarizada. Essas substâncias são chamadas, então, de opticamente ativas e podem ser dextrógiras (+) ou levógiras (-). A atividade ótica é função da estrutura química da substância e de sua concentração, e a determinação do poder rotatório serve tanto para estabelecer a identidade quanto a pureza de uma substância (Farmacopéia Brasileira, 1988).

A densidade ótica é dada pela seguinte equação:  $\alpha = [\alpha]_D^{20} \cdot \ell \cdot c$

Onde:  $[\alpha]_D^{20}$  = comprimento de onda da raia D de sódio (589,3 nm), à temperatura de 20 °C

$\ell$  = comprimento da cubeta(dm)

$c$  = concentração (g/ml)

$\alpha$  = valor observado ao desvio no plano da luz polarizada

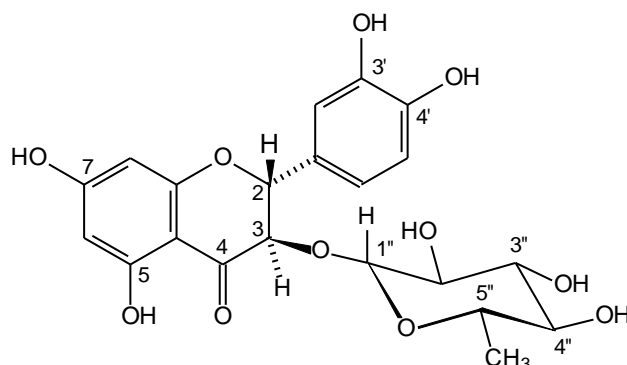
A **substância I** apresentou valor médio (n= 10) de  $[\alpha]_D^{20} = -20,2^\circ$ , em metanol na concentração de 10,4 mg, semelhante à referência consultada De Britto *et al.* (1995), que obtiveram um valor de  $[\alpha]_D^{20} = -13,6^\circ$  (c= 0,5, MeOH).

A **substância I** fundiu entre 175 e 176 °C por análise do ponto de fusão, demonstrando um grau de pureza elevado. Esses dados conferem com os valores

da literatura que estabelece para essa substância valores entre 179 e 180 °C (Cruz *et al.*, 1973).

**Figura 19** – Espectro de dicroísmo circular da **substância I** em metanol

Dessa forma confirma-se que a configuração relativa é 2,3-*trans* e 3,1''-*cis*, concluindo-se a **substância I** como sendo **ASTILBINA [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*trans*-(2*R*,3*R*)-taxifolina]** (fig. 20).



**Figura 20** – Estrutura da astilbina

A subfração 8 obtida através do fracionamento da fração acetato de etila (fig. 8, p. 41) foi submetida novamente a processo de fracionamento (Sephadex® LH-20) resultando em 3 subfrações (fluxograma 2). Através da observação cromatográfica (CCD) (fig. 21) e visualização sob UV 254 nm, verificou-se que a subfração 8.3 apresentava características de composto polifenólico (coloração escura) com valores de  $R_f = 0,70$ .

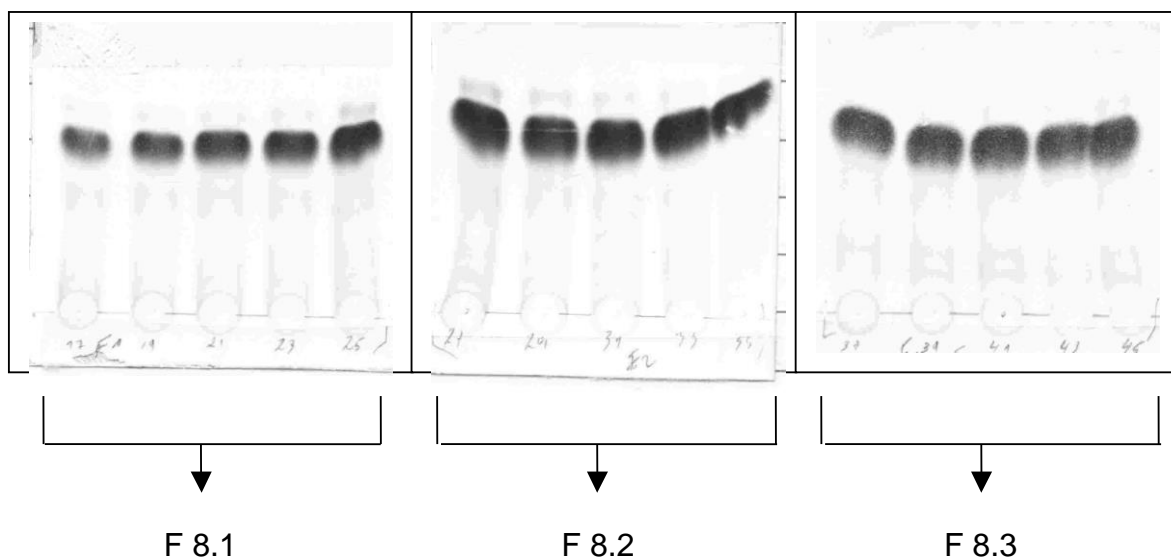


Figura 21 - CCD da subfração 8 em acetato de etila:ác. fórmico:água (90:5:5; V/V)

Essa subfração 8.3, denominada de **substância II**, foi analisada com auxílio de espectroscopia no infravermelho, de massas,  $^1\text{H}$  RMN,  $^{13}\text{C}$  RMN, COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ), HETCOR, DEPT, dicroísmo circular e atividade óptica.

A análise cromatográfica por CLAE da **substância II** revela pico isolado (número 13) com tempo de retenção de 17,32 min (fig. 22).

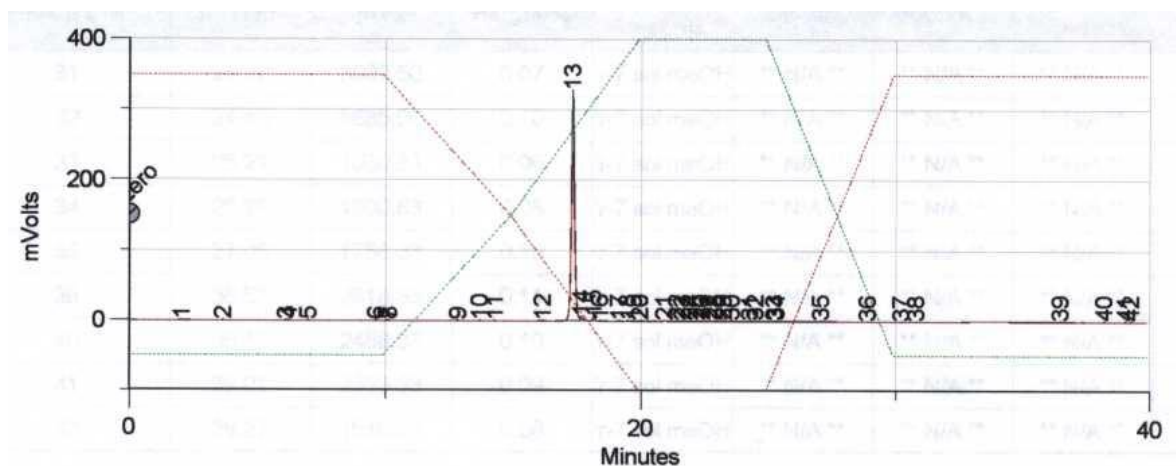


Figura 22 – Cromatograma obtido por CLAE da **substância II**

O espectro no infravermelho da **substância II** (fig. 23) exibe banda larga em  $3402\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento  $-\text{OH}$ , característico de hidroxilas. Banda em  $1644\text{ cm}^{-1}$ , atribuída ao estiramento  $\text{C}=\text{O}$ , provavelmente refere-se ao anel heterocíclico de flavonóides, ou ainda a carbonilas  $\alpha,\beta$  insaturadas. Observam-se bandas entre  $1450\text{ cm}^{-1}$  a  $1644\text{ cm}^{-1}$  relativas ao estiramento  $\text{C}=\text{C}$  confirmando a

presença de anel aromático. Essas informações conferem com a literatura Tschesche *et al.* (1979).

**Figura 23 - Espectro no infravermelho da substância II**

O espectro de massas forneceu  $m/z$  de 450  $\{[M+Na]^+ 473\}$ , exatamente idêntico ao da figura 12 (p. 44), sugerindo semelhança entre essa substância e a **substância I**.

O espectro de  $^1H$  RMN da **substância II** (fig. 24) apresenta sinais na região dos hidrogênios aromáticos, e esse conjunto sugere tratar-se de um composto tipo flavonóide semelhante ao composto anterior (**astilbina, substância I**).

Os deslocamentos de hidrogênios entre  $\delta$  6,96 e 6,79 (ppm) referem-se a um sistema do tipo AMX, característico de di-hidroxilação no anel B e são atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' (tab. 11). Na região aromática observa-se os deslocamentos de  $\delta$  5,90 e 5,87 (ppm) referentes aos hidrogênios H-8 e H-6, respectivamente (tab. 11).

No espectro COSY  $^1H/^1H$  (fig. 25) observa-se correlação entre os hidrogênios  $\delta$  4,98 e 4,63 (ppm), dubletos, com constante de acoplamento idêntica de 11,4 Hz que correspondem aos hidrogênios alifáticos do anel heterocíclico (C) de flavonóides. Esses valores de acoplamento entre H-2 e H-3 tornam evidente a inexistência de ligação dupla entre C-2 e C-3 e confere à substância a possibilidade de configuração relativa *cis* ou *trans* (Mello *et al.*, 1996).

Pelos valores medidos no espectro de  $^1H$  RMN ( $J_{H_2-H_3}$  11,4 Hz), pode-se afirmar que a **substância II** possui configuração relativa do tipo 2,3-*trans*. Nesse contexto trata-se de flavonóide do tipo di-hidroflavonol, derivados de di-hidroquercetina (Zuanazzi, 2001).

O espectro COSY ( $^1H/^1H$ ) (fig 25) revela, além dos sinais da parte aglicônica, alguns outros correlacionados característicos de resíduo de açúcar (Inada *et al.*, 1992).

Observam-se sinais no  $^1H$  RMN de hidrogênios atribuídos a parte glicosídica da substância. Pode-se observar, por exemplo, no deslocamento  $\delta$  5,14 (ppm), dubleto para H-1'' (anomérico) com constante de acoplamento  $J= 1,5$  Hz, o que sugere conformação espacial em  $\alpha$  (De Britto *et al.*, 1995). A correlação entre o H-1'' e o H-2'' pode ser observada no COSY, através do deslocamento  $\delta$  5,14 e 4,0 (ppm), respectivamente. Um dubleto com  $J= 6$  Hz sugere presença de um grupo metila ( $CH_3$ ). Através do espectro de COSY sugere-se que o mesmo possa tratar do hidrogênio H-6''. Os deslocamentos, multiplicidade e constante de acoplamento para os demais hidrogênios da substância podem ser observados na tabela 11.

**Tabela 11** - Dados de  $^1\text{H}$  RMN da **substância II** ( $\nu=300$  MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  relativo para TMS)

Hidrogênio	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
2	4,98	d	11,4
3	4,63	d	11,4
8	5,90	d	2,1
6	5,87	d	2,1
2'	6,96	s	-
6'	6,79	s	-
5'	6,79	s	-
1''	5,14	d	1,5
2''	4,00	dd	1,8;3,3
3''	3,37	dd	3,3;9,6
4''	3,18	dd	9,6;9,6
5''	2,28	dquart	9,3;6,0
6''	0,89	d	6,0



**Figura 24** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da **substância II** ( $\nu=300$  MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  relativo para TMS)

**Figura 25** - Espectro COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) da **substância II** ( $\nu=300$  MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  relativo para TMS)

O espectro DEPT (fig. 26) demonstra em  $\delta$  17,82 (ppm) um grupo  $-\text{CH}_3$ , confirmando o espectro  $^1\text{H}$  RMN, com relação ao mesmo grupamento em  $\delta$  0,89.

Os dados de  $^{13}\text{C}$  RMN (fig. 27) constantes na tabela 12 estão em pleno acordo com a literatura (De Britto *et al.*, 1995).

No espectro HETCOR (fig. 28) a **substância II** reafirma seguramente as correlações diretas entre  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ , podendo-se observar com clareza além dos hidrogênios da região aromática os hidrogênios da parte glucosídica (tab. 13).

**Tabela 12** – Dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da **substância II** em relação à De Britto *et al.* (1995) em  $\text{CD}_3\text{OD}$

Substância II		De Britto <i>et al.</i>	
Carbono	$\delta$ (ppm)	Carbono	$\delta$ (ppm)
2	83,73	2	83,7
3	76,95	3	76,9
4	197,92	4	197,7
5	165,70	5	165,4
6	97,53	6	97,5
7	169,09	7	168,9
8	96,38	8	96,3
9	164,52	9	164,3
10	102,13	10	102,1
1'	130,10	1'	130,0
2'	115,59	2'	116,3
3'	146,81	3'	146,7
4'	147,63	4'	147,4
5'	116,39	5'	115,5
6'	121,10	6'	121,0
1''	102,95	1''	102,8
2''	71,96	2''	71,9
3''	71,96	3''	72,0
4''	73,46	4''	73,5
5''	70,33	5''	70,4

6"	17,82	6"	17,9
----	-------	----	------

**Figura 26** – Espectro DEPT da substância II em CD<sub>3</sub>OD

**Figura 27** – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da **substância II** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

**Figura 28** – Espectro HETCOR ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) da **substância II** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

**Tabela 13** – Dados de HETCOR da **substância II** em CD<sub>3</sub>OD

Hidrogênio (ppm)	Carbono (ppm)
6,96	115,59
6,79	116,39
6,79	121,10
5,90	96,38
5,87	97,53
4,98	83,73
4,63	76,95
5,14	102,95
4,00	71,96
3,37	71,96
3,18	73,46
2,28	70,33
0,89	17,82

Também nesse caso, o trabalho de Agrawal *et al.* (1981) confirmou a molécula de ramnose na posição C-3. Observam-se diferentes valores para deslocamentos em <sup>13</sup>C RMN para os carbonos C-2, C-3 e C-4 quando comparados com a taxifolina (tab. 14). De forma semelhante à **substância I**, o deslocamento observado em C-3, entre a parte aglicônica (taxifolina) e a **substância II**, é superior a 6 ppm. Através dos dados analisados anteriormente, e através da literatura consultada (De Britto *et al.*, 1995), é possível afirmar, dessa maneira, que o açúcar encontra-se posicionado em C-3. Assim sendo, estabelece-se que a configuração relativa dos hidrogênios H-2 e H-3 é *trans* e H-3 e H-1” é *cis*.

**Tabela 14** - Diferentes deslocamentos químicos (ppm) no espectro de <sup>13</sup>C RMN para taxifolina e **substância II** em CD<sub>3</sub>OD

Carbono	Taxifolina	Substância II
C-2	84,68	83,73
C-3	73,24	76,95
C-4	197,89	197,92

A comprovação do açúcar da **substância II**, a exemplo da **substância I**, foi realizada através de reação de hidrólise (seção 2.4.4, p.30). Empregou-se padrão L-ramnose, confirmado pela semelhança do valor de  $R_f=0,64$  em CCD. Esse resultado foi idêntico ao mensurado na primeira análise.

Quanto à confirmação da quiralidade da aglicona da **substância II** (2S,3S) observou-se, através de dados fornecidos pelas análises nos espectros de dicroísmo circular (CD), que a **substância II** apresentou curva em 290 nm (efeito *Cotton* positivo) e ainda curva em 330 nm (efeito *Cotton* negativo) (fig. 29). Esses dados conferem com os obtidos por De Britto *et al.* (1991) que encontraram um valor de  $+39000^\circ$  (MeOH) na região de 290 nm. A densidade ótica é dada pela seguinte equação:  $\alpha = [\alpha]_D^{20} \cdot l \cdot c$ .

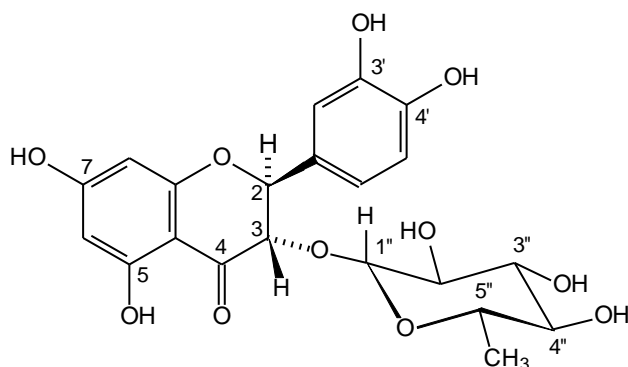
Para a **substância II** em questão na concentração de 10,0 mg (n=10) em metanol a densidade ótica observada foi  $[\alpha]_D^{20} = +1226$ , além de ter sido comparada com a literatura (De Britto *et al.*, 1995).

Foi determinado o ponto de fusão dessa substância, que apresentou valores entre 175-177 °C, demonstrando haver um elevado grau de pureza.



**Figura 29** – Espectro de dicroísmo circular da **substância II** em metanol

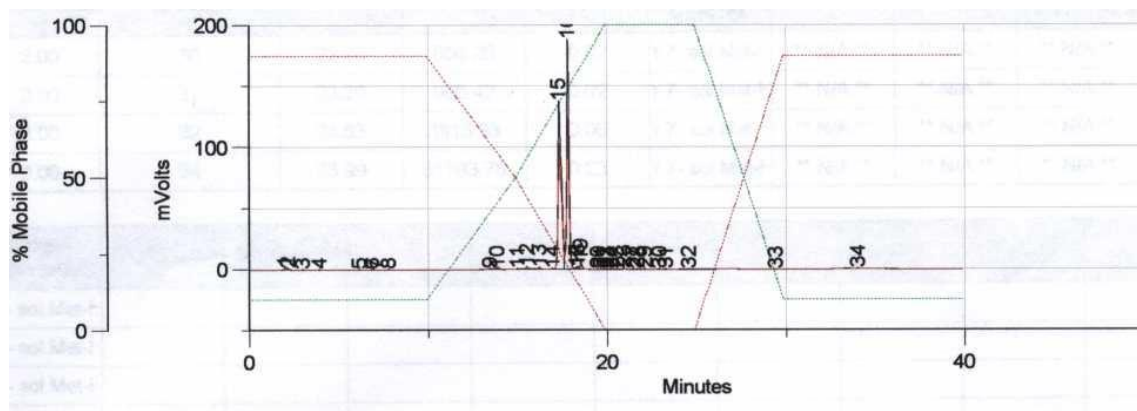
Define-se, portanto, a **substância II** como sendo **NEOASTILBINA** [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*trans*-(2S,3S)-taxifolina] (fig. 30), flavonóide pertencente a classe dos dihidroflavonóis.



**Figura 30** – Estrutura da neoastilbina

O fracionamento da fração acetato de etila por cromatografia em coluna (Sephadex® LH-20), forneceu 10 subfrações (tab. 4). O cromatograma da subfração 6 apresentou uma mancha com valor de R<sub>f</sub> 0,65 e coloração intensa azul-preta após revelação com solução de cloreto férrico a 2%, sugerindo tratar-se de um composto parcialmente purificado e do tipo fenólico. Para fins didáticos a subfração 6 foi denominada de **substância III**.

Amostra da **substância III** submetida à análise por CLAE (seção 2.3.4, p. 25) apresentou um pico, número 17, com tempo de retenção de 18,27 min conforme pode ser observado na figura 31.



**Figura 31** – Cromatograma obtido por CLAE da **substância III**

A **substância III** foi analisada com auxílio de espectroscopia no infravermelho, de massas, RMN 1D ( $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) e 2D ( $^1\text{H}/^1\text{H}$  COSY, HETCOR e DEPT).

O espectro no infravermelho (fig. 32) exibe uma banda larga de absorção em  $3393\text{ cm}^{-1}$  atribuída à vibração de estiramento de grupo  $-\text{OH}$ , característica de hidroxilas. A banda em  $1644\text{ cm}^{-1}$  é característica de estiramento  $\text{C}=\text{O}$ , no caso da **substância III**, poderia ser, provavelmente, relacionada ao anel heterocíclico (anel C) de flavonóides ou, ainda, a carbonilas  $\alpha,\beta$  insaturadas. Essa informação é comprovada por Dübeler *et al.* (1997). Já as bandas na região entre  $1450\text{ cm}^{-1}$  a  $1650\text{ cm}^{-1}$  referem-se a estiramento  $\text{C}=\text{C}$  confirmando a presença de anel aromático.

**Figura 32 – Espectro no infravermelho da substância III**

O espectro de massas forneceu  $m/z$  de 450  $\{[M+Na]^+ 473\}$ , idêntico ao da figura 12 (p. 44), e encontra-se de acordo para um composto semelhante às **substâncias I e II**.

O espectro de  $^1H$  RMN da **substância III** (fig. 33) mostra sinais na região de hidrogênios aromáticos e o conjunto de sinais sugere tratar-se de um composto do tipo flavonóide (Dübeler *et al.*, 1997).

Os hidrogênios em  $\delta$  6,93, 6,83 e 6,80 (ppm) referem-se a um sistema do tipo AMX, característicos de di-hidroxilação no anel B, atribuídos aos hidrogênios H-2', H-5' e H-6' (tab. 15). Ainda na região aromática, observa-se a presença de dois dubletos com deslocamento de  $\delta$  5,88 e 5,91 (ppm), estabelecendo-se os hidrogênios H-6(A) e H-8(A) (tab. 15), respectivamente.

Observou-se no espectro COSY ( $^1H/^1H$ ) (fig. 34) uma correlação entre os sinais em  $\delta$  5,41 e 4,18 (ppm), dubletos, e com constante de acoplamento de 2,4 e 2,1 Hz, respectivamente, correspondendo aos hidrogênios alifáticos (H-2 e H-3) do anel heterocíclico (anel C). O valor da constante de acoplamento em torno de 2,0 Hz, para hidrogênios alifáticos, assemelham-se àqueles de taninos condensados monoméricos, denominados flavan-3-ol. Para esses tipos de compostos, a ausência de dupla ligação entre os carbonos C-2 e C-3, com conseqüente existência de hidrogênios, denota a possibilidade de uma configuração relativa do tipo *cis* ou *trans* (Mello *et al.*, 1996). Pelos dados medidos de  $J_{H_2-H_3} \leq 2,0$ , no espectro de  $^1H$  RMN, pode-se afirmar que o composto em questão possui uma configuração relativa do tipo 2,3-*cis*. Nessa situação trata-se de flavonóides do tipo di-hidroflavonóis, derivados da di-hidro-quercetina (Zuanazzi, 2001).

Além dos sinais referentes à parte aglicônica, discutida anteriormente, observa-se ainda, outros sinais correlacionados entre si ( $^1H/^1H$  COSY, fig. 34), característicos de um resíduo de açúcar (Inada *et al.*, 1992).

Nos sinais de hidrogênios,  $^1H$  RMN, atribuídos ao açúcar, pode-se observar o  $\delta$  4,95 (ppm), dubleto, para H-1" (anomérico) com  $J = 1,2$  Hz (dubleto), sugerindo uma conformação espacial em  $\alpha$ . A correlação entre o H-1" (dubleto) e o H-2" (duplo dubleto) pode ser observada, no COSY, determinando-se a posição em  $\delta$  4,95 e 3,66 (ppm), respectivamente. O dubleto com  $J = 6$  Hz sugere a presença de um grupamento metila (-CH<sub>3</sub>). De acordo com as correlações observadas no COSY, o mesmo trata-se do hidrogênio H-6". Os outros hidrogênios foram diretamente

correlacionados e os seus deslocamentos, multiplicidade e constante de acoplamento podem ser observados na tabela 14.

O espectro DEPT (fig. 35) confirma em  $\delta$  21,8 (ppm) a presença de um grupamento CH<sub>3</sub>, confirmando o espectro de <sup>1</sup>H RMN, com relação ao mesmo grupo em  $\delta$  0,92 (ppm).

Os dados de <sup>13</sup>C RMN (fig. 36) constantes da tabela 16 estão de acordo com aqueles encontrados na literatura (De Britto *et al.*, 1995).

**Tabela 15** – Dados de <sup>1</sup>H RMN da **substância III** ( $\nu$ = 300 MHz; CD<sub>3</sub>OD)

Hidrogênio	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
2	5,41	d	2,4
3	4,18	d	2,1
8	5,96	d	2,1
6	5,91	d	2,1
2'	6,93	d	1,8
5'	6,83	d	8,4
6'	6,80	dd	8,4;1,8
1''	4,95	d	1,8
2''	3,66	dd	3,3;1,8
3''	3,44	dd	9,3;3,3
4''	3,20	t	9,5
5''	2,45	dquart	9,6;6,3
6''	0,92	d	6,0

**Figura 33** - Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da **substância III** ( $\nu=300$  MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  relativo para TMS)

**Figura 34** - Espectro COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) da **substância III** ( $\nu=300$  MHz;  $\text{CD}_3\text{OD}$  relativo para TMS)



**Figura 35** - Espectro DEPT da substância III em CD<sub>3</sub>OD

**Figura 36** - Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN (75 MHz) da **substância III** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

**Tabela 16** - Dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da **substância III**

<b>Carbono</b>	<b><math>\delta</math> (ppm)</b>
2	82,13
3	75,58
4	194,60
5	168,90
6	97,44
7	166,37
8	96,33
9	164,32
10	102,20
1'	128,81
2'	115,32
3'	146,72
4'	146,81
5'	116,42
6'	119,48
1''	100,20
2''	72,08
3''	71,96
4''	73,35
5''	70,42
6''	17,72

No espectro HETCOR da **substância III** (fig. 37), pode-se estabelecer com segurança a correlação entre  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ . Desse modo, pode-se atribuir inequivocadamente cada sinal de  $^1\text{H}$  a seu respectivo  $^{13}\text{C}$ , facilitando a comprovação do resíduo de açúcar da substância.

**Tabela 17** - Correlações de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  da **substância III** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

<b>Hidrogênio (ppm)</b>	<b>Carbono (ppm)</b>
6,93	115,32
6,83	116,42
6,80	119,48
5,91	96,33
5,88	97,44
5,41	82,13
4,95	100,25
4,18	75,58
3,66	72,08
3,44	71,96
3,20	73,35
2,45	70,42
0,92	17,72

**Figura 37** - Espectro de HETCOR ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) da **substância III** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

Comprovou-se a parte glicosídica da **substância III** como ramnose, através da realização de reação de hidrólise (seção 2.4.4, p. 30), empregando-se padrão L-ramnose. Confirmou-se tratar da ramnose como parte glicosídica da substância pela semelhança do valor de  $R_f=0,64$ , por CCD, de forma semelhante às outras duas **substâncias I e II**.

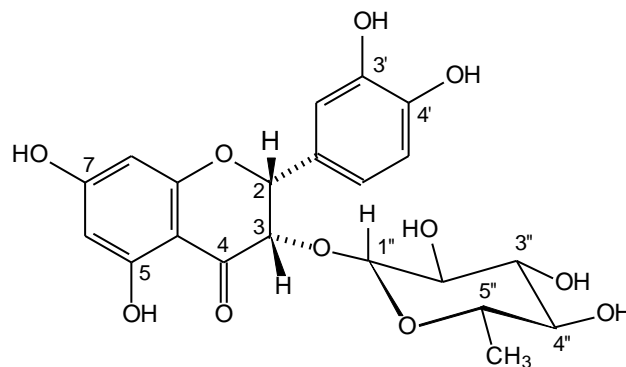
Foi determinado o ponto de fusão, obtendo-se valores entre 175-177 °C, que confere com dados da literatura (De Britto *et al.*, 1995).

De acordo com todos os dados analisados anteriormente, e comparado com a literatura De Britto *et al.* (1995) e Agrawal *et al.* (1981), foi possível confirmar a molécula de ramnose na posição C-3, como também estabelecer a quiralidade da aglicona. Observou-se desse modo diferentes valores para deslocamentos no espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para os carbonos C-2, C-3 e C-4 em relação à taxifolina (tab. 18). Nesse caso, além dos dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da **substância III**, reuniu-se os dados das **substâncias I e II** para uma perfeita observação de seus deslocamentos. Confirma-se, assim, que o açúcar encontra-se posicionado em C-3, e que a configuração relativa dos hidrogênios H-2 e H-3 é *cis* (2*R*,3*S*). Dessa forma estabelece-se que a configuração relativa é 2,3-*cis* e 3,1"-*cis*, apresentado pelo efeito anisotrópico do anel B causando deslocamentos para campos mais altos (desprotegido) dos H-5" e H-6" (De Britto *et al.*, 1995).

**Tabela 18** - Diferentes deslocamentos químicos (ppm) no espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN para taxifolina e **substâncias I, II e III** em  $\text{CD}_3\text{OD}$

Carbono	Taxifolina	Substância I	Substância II	Substância III
C-2	84,68	84,03	83,73	82,13
C-3	73,24	78,63	76,95	75,58
C-4	197,89	196,26	197,92	194,60

Com base em todas as análises citadas, conclui-se a **substância III** como sendo **ISOASTILBINA [3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*cis*-(2*R*,3*S*)-taxifolina]** (fig. 38).



**Figura 38** – Estrutura da isoastilbina

A história do desenvolvimento e uso de substâncias antimicrobianas na prática médica antecedeu a descoberta das espécies microbianas. Essa informação pode ser confirmada, uma vez que Hipócrates (450-337 a.C.) já recomendava a lavagem de ferimentos com vinho para impedir o processo infeccioso. Encontram-se, também, dados de que há cerca de 3000 anos, alguns povos como chineses e indianos, utilizavam o mofo de pão, e papa de soja no tratamento de lesões infectadas e em processos inflamatórios. Durante a idade média há relatos do uso de cloreto de mercúrio na prática médica como agente antibacteriano. Posteriormente, com a descoberta da etiologia microbiana das infecções por Louis Pasteur e Robert Koch, o estudo de substâncias com atividade antimicrobiana foi conduzido de forma científica (Edeltrudes, 2001).

As bactérias são microrganismos classificados em Gram positivos ou Gram negativos, com base em reações de coloração característica pelo método de Gram.

A parede celular dos microrganismos Gram positivos é uma estrutura relativamente simples, com espessura de 15-50 nm e constituída por cerca de 50% de peptidoglicano e cerca de 40-45% de polímero ácido, o que torna a superfície celular altamente polar, e faz com que tenha uma carga negativa. Essa camada de polímeros fortemente polar influencia a entrada de moléculas ionizadas e favorece a penetração na célula de compostos de carga positiva. Já a estrutura celular das bactérias Gram negativas é muito mais complexa e envolve a presença além de uma parede celular externa, de uma membrana formada por uma dupla camada lipídica. Isso explica a dificuldade em penetrar nessa

complexa camada externa e constitui, provavelmente a razão pela qual alguns antibióticos são menos ativos contra Gram negativos (Rang e Dale, 1991).

As substâncias antibióticas ou antimicrobianas, representam talvez o maior avanço da farmacoterapia nas últimas cinco décadas, com progressos sem limites na terapêutica medicamentosa (Robbers *et al.*, 1997). Os antibióticos constituem um grupo especial de agentes terapêuticos, geralmente produzidos e obtidos a partir de organismos vivos. São substâncias que em pequenas concentrações podem possuir várias propriedades como: atividade letal ou inibitória contra muitas espécies microbianas, prevenir o desenvolvimento de organismos resistentes, ausência de efeitos indesejáveis ao hospedeiro, estabilidade química entre outras (Edeltrudes, 2001).

Embora a presença de substâncias antimicrobianas nos vegetais superiores não seja um fato recente, a busca das mesmas teve um impulso após a descoberta da penicilina. As plantas são possuidoras de várias vias metabólicas secundárias que dão origem a vários compostos como: alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas entre tantos outros, e por vezes específicos a famílias e gêneros cujas funções até pouco tempo eram desconhecidas (Simões *et al.*, 2001).

O conhecimento sobre determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem sido amplamente discutido. Em revisão sobre plantas medicinais, os especialistas listam inúmeras substâncias isoladas de plantas que em baixas concentrações exerceram inibição sobre diversos microrganismos como bactérias, fungos e vírus. Confirmam, assim, a importância dos metabólitos de plantas como matéria-prima para futuros medicamentos (Yunes *et al.*, 2001).

Aos flavonóides são relacionadas diversas atividades biológicas como atividades antioxidantes, inibidores da liberação de histamina, vasodilatadores, tônico venosos, inibidores da ECA, e até mesmo atividade antiviral contra HSV. Mas poucos têm sido os estudos avaliando atividade antibacteriana e antifúngica destes compostos (Ng *et al.*, 1996).

Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Rao *et al.* (1999) que isolou um novo flavonóide prenilado de *Mundulea suberosa* Benth., o qual revelou atividade antibacteriana através do método de discos de papel contra *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*.



Báez *et al.* (1998) trabalharam com extratos diclorometano e acetato de etila ricos em flavonóides rutina e isoquercetrina do vegetal *Chromolaena moritziana* King e Robin. Observaram nesses, atividade antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus*.

No trabalho de Ng *et al.* (1996) verificou-se atividade de três flavonóides naringina, baicalina e rutina frente a *Staphylococcus Aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e o fungo *Coriolus versicolor* na concentração de 128 µg/ml.

No estudo realizado por Xu e Lee (2001) 38 diferentes tipos de flavonóides foram testados contra bactérias resistentes causadoras de infecções em ambientes hospitalares. Desses quatro flavonóis, datiscetina, canferol, miricetina e quercetina, mostraram atividade contra MRSA. Nenhum dos nove flavonóides glicosilados testados revelaram atividade antibacteriana. Somente o flavonóide miricetina exibiu atividade frente às bactérias Gram negativas como *Bacillus cepacia* e *Klebsiela pneumoniae*.

Hernandez *et al.* (2000) testaram vários extratos brutos de plantas medicinais ricos em flavonóides utilizados na medicina popular como cicatrizantes. Quatro espécies vegetais demonstraram atividade contra os diversos microrganismos testados. No entanto, os autores concluíram que a baixa atividade antibacteriana, ou mesmo a inexistência da mesma, está relacionada quando compostos 3-O- e 7-O-glucosídeos coexistem no extrato juntamente com outros tipos de flavonóides.

Nessa perspectiva, avaliou-se as atividades antimicrobiana e antifúngica das **substâncias I, II e III**. Nenhuma dessas amostras apresentou resultados expressivos de inibição contra os microrganismos testados até a concentração de 1000 µg/ml, conforme pode-se observar nas tabelas 19, 20, 21, 22, 23 e 24.

Esses resultados, onde não se observou atividade antibacteriana para as **substâncias I, II e III**, pode ser parcialmente respaldado pelo trabalho de Basile *et al.* (1999). Compararam a atividade antibacteriana da apigenina e apigenina 7-O-glucosídeo e verificaram que a primeira substância possui maior atividade. Isso é possível, garantem os autores, pois a glucosilação da apigenina causa redução da atividade antibacteriana devido à redução na lipofilia e conseqüente diminuição da capacidade da molécula para penetrar na membrana da bactéria.



**Tabela 19 – Concentração inibitória mínima bacteriana da substância I**

Concentração µg/ml	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1000	+	+	+	+
500	+	+	+	+
250	+	+	+	+
125	+	+	+	+
62.5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15.6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

+ = Crescimento de bactérias

**Tabela 20 – Concentração inibitória mínima fúngica da substância I**

Concentração µg/ml	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
1000	+	+	+	+
500	+	+	+	+
250	+	+	+	+
125	+	+	+	+
62.5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15.6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

+ = Crescimento de fungos

**Tabela 21 – Concentração inibitória mínima bacteriana da substância II**

Concentração µg/ml	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1000	+	+	+	+
500	+	+	+	+
250	+	+	+	+
125	+	+	+	+
62.5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15.6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

+ = Crescimento de bactérias

**Tabela 22 – Concentração inibitória mínima fúngica da substância II**

Concentração µg/ml	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
1000	+	+	+	+
500	+	+	+	+
250	+	+	+	+
125	+	+	+	+
62.5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15.6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

+ = Crescimento de fungos

**Tabela 23 – Concentração inibitória mínima bacteriana da substância III**

Concentração µg/ml	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1000	+	+	+	+
500	+	+	+	+
250	+	+	+	+
125	+	+	+	+
62.5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15.6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

+ = Crescimento de bactérias

**Tabela 24 – Concentração inibitória mínima fúngica da substância III**

Concentração µg/ml	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
1000	+	+	+	+
500	+	+	+	+
250	+	+	+	+
125	+	+	+	+
62.5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15.6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

+ = Crescimento de fungos

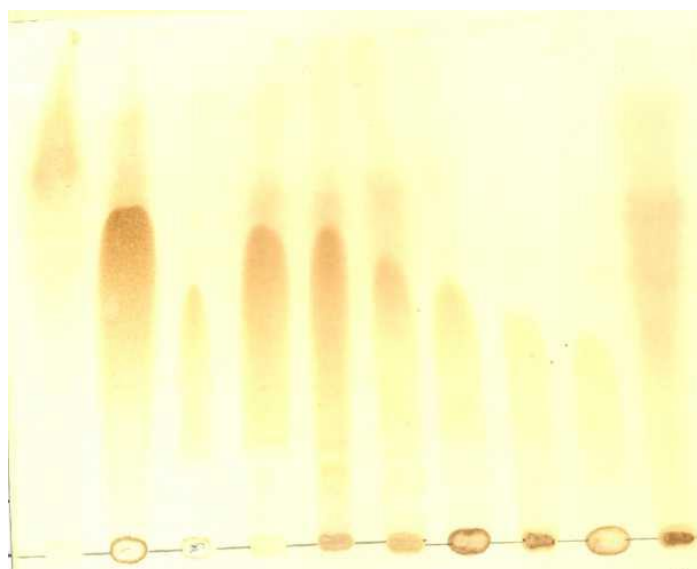
O organismo vivo pode ser considerado um verdadeiro laboratório biossintético. Não só no que se refere aos constituintes químicos presentes (carboidratos, proteínas, gorduras) utilizados como alimento pelos seres humanos e pelos animais, mas também no que se refere a

uma infinidade de outros compostos (glicosídeos, alcalóides, terpenóides) extraídos de vegetais que podem exercer diversos efeitos biológicos. São esses que podem conferir propriedades terapêuticas e são chamados de princípios ativos extraídos de plantas e animais (Robbers *et al.*, 1997).

A composição química das espécies vegetais, especialmente de plantas encontradas nas florestas tropicais, ainda está longe de ser descrita em sua totalidade. Um enorme arsenal de constituintes naturais ainda não foi isolado e estudado do ponto vista químico. Por outro lado, uma grande quantidade de substâncias já isolada e com estrutura química definida ainda não foi estudada quanto às suas atividades biológicas com respeito ao potencial, especialmente de interesse terapêutico. Apenas um grupo restrito de substâncias possui suas funções e atividades determinadas. Está longe de se elucidar o papel desses compostos e muito mais distante de completar o quadro de substâncias químicas disponíveis nas espécies vegetais (Di Stasi, 1996).

No sentido de colaborar para o conhecimento das substâncias químicas presentes nos vegetais e testá-las quanto à atividade biológica, preparou-se o extrato BST-0402 (seção 2.4.5, p. 30) que foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica preenchida com gel de sílica.

Inicialmente foi realizada cromatografia em coluna (gel de sílica) com auxílio de vácuo com amostra do extrato BST-0402. As subfrações obtidas, num total de 13, foram cromatografadas em CCD e observadas sob luz UV a 254 nm, apresentando extinção de fluorescência. Essas subfrações foram também monitoradas pelo reagente de Griess-Ilosvay e o cromatograma foi revelado pelo mesmo reagente, apresentando positividade para nitrocompostos, através do desenvolvimento de coloração vermelha. Essa informação foi obtida, através da positividade dessa classe de compostos em *Heteropteris angustifolia* Gris., levando ao teste com a espécie em análise, *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. (Majak e Bose, 1974; Stermitz *et al.*, 1975). Na figura 39 é possível observar a CCD dessas subfrações.



**Figura 39** – Cromatografia em camada delgada das subfrações do extrato BST-0402

A análise do cromatograma (fig. 39), referente ao fracionamento do extrato BST-0402, mostrou a subfração 4,  $R_f=0,64$ , com coloração amarela-avermelhada, sugerindo tratar-se de uma substância parcialmente pura do tipo nitrocomposto. Essa subfração 4, denominada de **substância IV**, foi submetida a processo de recristalização com MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1; V/V), em seguida concentrada, liofilizada e analisada com auxílio de espectroscopia no infravermelho, de massas, <sup>1</sup>H RMN, <sup>13</sup>C RMN, COSY (<sup>1</sup>H/<sup>1</sup>H), HETCOR e DEPT, e atividade óptica.

O espectro no infravermelho da **substância IV** (fig. 40) exibiu bandas largas de absorção em 3399 cm<sup>-1</sup>, atribuídas a vibração do estiramento do grupo –OH, característica de hidroxilas. Banda em 1747 cm<sup>-1</sup> característica de estiramento C=O e observou-se nos comprimentos de onda 1553 cm<sup>-1</sup> e 1385 cm<sup>-1</sup> bandas muito intensas características de grupos nitro. Esses dados conferem com os dados encontrados por Stermitz *et al.*,(1969).

**Figura 40 - Espectro no infravermelho da substância IV**



O espectro de massas foi realizado em Quattro LCZ (Firma Micromass, Manchester, UK.) com alça de nano-spray, com ionização por eletro-spray modo positivo. O pseudo íon molecular foi de 584, em ES-MS como  $m/z$  607  $[M+Na]^+$  e  $m/z$  602  $[M+NH_4]^+$ , conforme figura 41. A análise do espectro demonstra o que segue: da MS-MS de  $m/z$  607 reconhece-se em  $[M+Na-119]^+$  o pico em  $m/z$  488 (100%) correspondendo à perda de uma unidade de ácido nitropropiónico; em  $m/z$  441 observa-se a perda de uma molécula de  $HNO_2$ ; interessante é o que pode ser observado no MS-MS com aduto de amônio, onde se observa a perda de 4 unidades de ácido nitropropiónico  $m/z$  127, além de uma diferença de 47 Da correspondente a uma molécula de  $HNO_2$ ; outra diferença, é a que corresponde a uma unidade de ácido nitropropiónico e uma molécula de  $NH_3$  em  $m/z$  466.

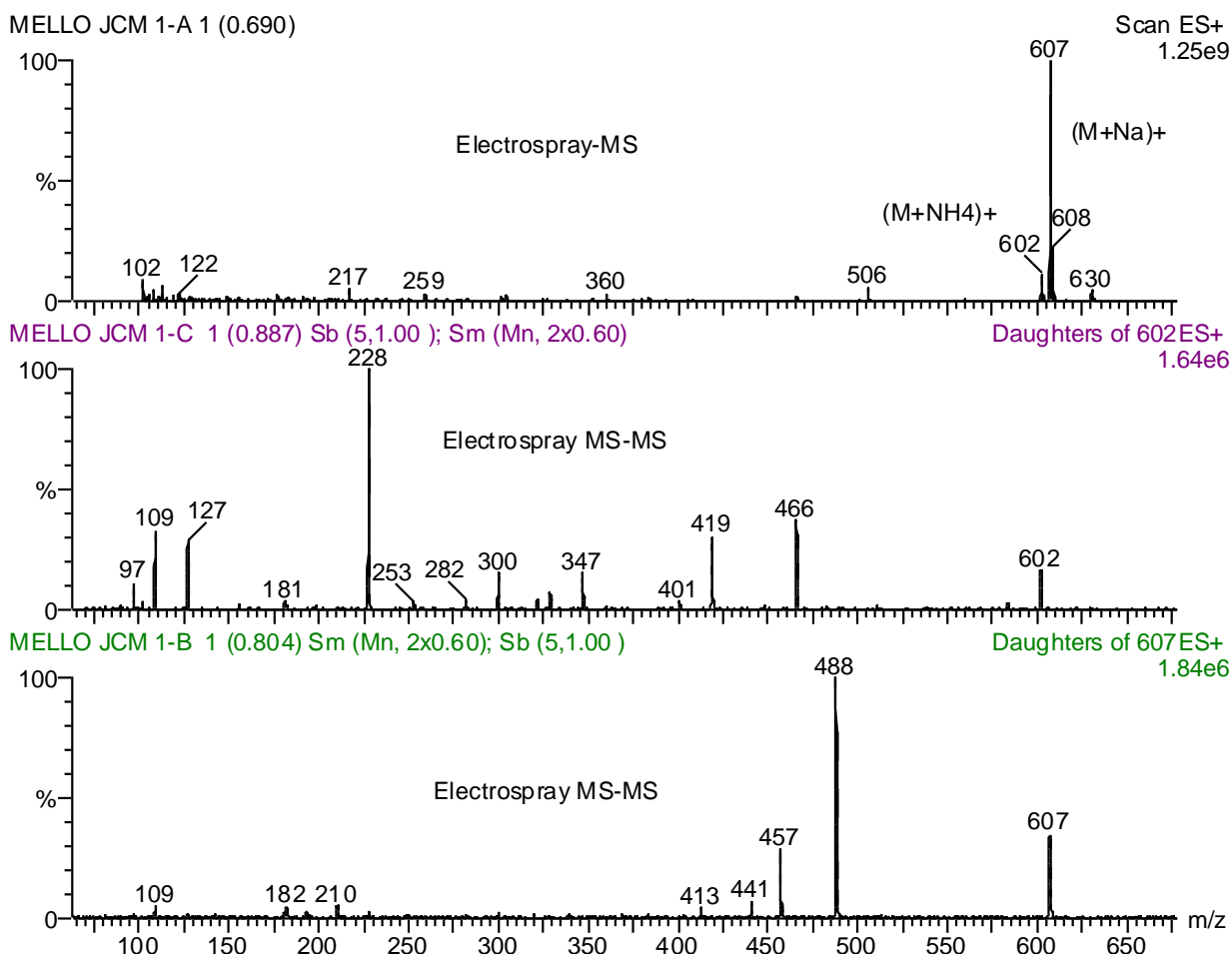


Figura 41 – Espectro de massas da substância IV  $[M+Na]^+$

A análise do espectro de  $^1\text{H}$  RMN da **substância IV** (fig. 42) indicou a presença de molécula de glicose nos deslocamentos  $\delta$  3,92 – 4,08 (ppm). O carbono anomérico é observado em  $\delta$  5,82 (ppm). A presença de hidrogênio ligado ao grupo nitro é evidenciada em  $\delta$  4,73 – 4,83 (ppm) (Benn *et al.*, 1995). O restante dos sinais de  $^1\text{H}$  RMN pode ser observado na tabela 25.

Observou-se no espectro COSY ( $^1\text{H}/^1\text{H}$ ) (fig. 43) uma correlação entre o hidrogênio anomérico (H-1'') em  $\delta$  5,82 (ppm) com H-2'' em  $\delta$  4,77 (ppm) com constante de acoplamento  $J = 8,1$  Hz. Esses dados indicam que o hidrogênio anomérico encontra-se em configuração  $\beta$  (Garcez *et al.*, 1989). É possível verificar também acoplamento entre  $\text{CH}_2$  da glicose em  $\delta$  4,08 (ppm) e o grupamento nitro em  $\delta$  4,73 (ppm) confirmando o grupamento nitro na posição 6 da substância.

O espectro DEPT (fig. 44) destacou um sinal referente a grupo  $\text{CH}_2$ , presente na substância, confirmando assim a molécula de glicose. Foi possível também confirmar a parte  $\text{CH}_2$  alifática no composto, responsável pela ligação do grupo nitro à molécula de glicose.

**Tabela 25** – Dados de  $^1\text{H}$  RMN da **substância IV** em  $\text{DMSO-d}_6$  relativo para TMS

Hidrogênio	$\delta$ (ppm)	Multiplicidade	J (Hz)
1''	5,82	d	8,1
2''	4,78	m	
3''	4,05	m	
4''	4,83	dd	9,3;6,9
5''	3,92	ddd	9,3; 9,5; 5,6
6''	4,08	d	4,5
1'	4,80	m	
2'	2,85;3,05;3,08;2,97	m	

**Figura 42** – Espectro de  $^1\text{H}$  RMN da **substância IV** em  $\text{DMSO-d}_6$  relativo para TMS

**Figura 43** – Espectro COSY da **substância IV** em DMSO-d<sub>6</sub> relativo para TMS

**Figura 44** - Espectro DEPT da substância IV em DMSO-d<sub>6</sub>

Os dados de  $^{13}\text{C}$  RMN (fig. 45) constantes na tabela 26, confirmam estrutura a glicosídica, seguida de tetra substituição por grupos nitro ésteres (Majak *et al.*, 1992).

**Tabela 26** – Dados de  $^{13}\text{C}$  RMN da **substância IV** DMSO- $\text{d}_6$  relativo para TMS

Carbono	$\delta$ (ppm)
C-1''	91,87
C-2''	73,10
C-3''	71,89
C-4''	70,92
C-5''	70,48
C-6''	62,74
C-1' x 4	70,10; 70,34; 70,40
C-2' x 4	30,85; 30,74; 30,65; 30,65
C-3' x 4	169,20; 169,58; 169,83; 170,23

O espectro HETCOR (fig. 46) exibe um deslocamento  $\delta$  2,97 (ppm), referente ao grupo metino ligado a carbonila em espectro de  $^1\text{H}$  RMN, com o respectivo deslocamento em  $\delta$  30,66 (ppm) no espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN. Observa-se, também, em  $\delta$  4,08 (ppm) no  $^1\text{H}$  RMN e com o respectivo deslocamento de  $\delta$  62,74 (ppm) em  $^{13}\text{C}$  RMN, relação com o grupo  $\text{CH}_2$  da molécula de glicose. Outros dados dessa análise podem ser observados na tabela 27.

**Tabela 27** – Correlações de  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$  da **substância IV** em DMSO- $\text{d}_6$  relativo para TMS

Hidrogênio (ppm)	Carbono (ppm)
2,97 (m)	30,66; 30,75; 30,85
4,08 (m)	62,74
4,74	70,10; 70,34; 70,40
3,92	70,48
4,80	70,92; 73,10
5,82	91,88

Foi realizada reação de hidrólise de acordo com a seção 2.4.8 (p.32). Utilizou-se como padrão amostra de glicose. Observou-se ao final, valores de  $R_f$  próximos a 0,5 (Majak *et al.*, 1992).

**Figura 45** – Espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN da substância IV em DMSO- $d_6$  relativo para TMS

**Figura 46** – Espectro HETCOR da **substância IV** em DMSO-d<sub>6</sub> relativo para TMS



Com a **substância IV** determinou-se o ponto de fusão, estabelecido entre 111 – 113 °C, demonstrando um elevado grau de pureza, que pode ser confirmado pela análise da subfração 4 por CLAE, com tempo de retenção de 4,2 min (seção 2.3.4, p. 25).

A densidade ótica é dada pela seguinte equação:  $\alpha = [\alpha]_D^{20} \cdot l \cdot c$

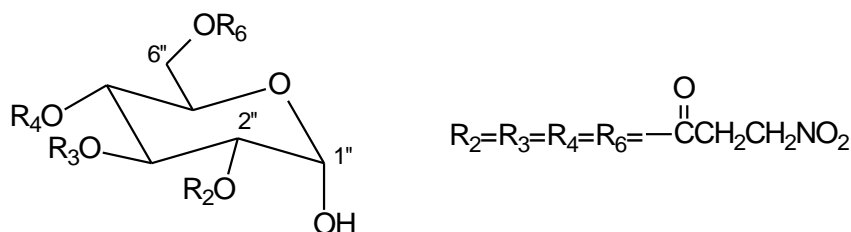
Onde:  $[\alpha]_D^{20}$  = comprimento de onda da raia D de sódio (589,3 nm), à temperatura de 20 °C

$l$  = comprimento da cubeta (0,1 dm)

$c$  = concentração (g/ml)

$\alpha$  = valor observado ao desvio no plano da luz polarizada

A **substância IV** foi analisada (n=10) em acetona, grau espectroscópico, na concentração de 10,0 mg, e a densidade ótica observada foi  $[\alpha]_D^{20} = +24$ . Baseados nos dados referidos e de acordo com a literatura (Garcez *et al.*, 1989; Majak *et al.*, 1992) é possível admitir que a **substância IV** possui uma molécula de glicose com 4 substituições de grupos nitro ésteres. Os deslocamentos referentes aos carbonos, 2,3,4 e 6 são definidos por Garcez *et al.* (1989), porém com o hidrogênio anomérico em conformação  $\alpha$ , diferentemente dessa substância, que encontra-se em  $\beta$ . Desse modo define-se essa substância como sendo **2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glucopirranose** (fig. 47), sendo a primeira vez que a mesma é relatada, isolada de produto natural.



**Figura 47** – Estrutura química da **substância IV**

Antes de 1932, não existiam drogas efetivas para o tratamento das infecções bacterianas sistêmicas e freqüentemente tais infecções eram fatais. Nesse ano descobriu-se que um pigmento azo vermelho chamado *prontosil* curava pacientes de certas infecções sistêmicas. Essa descoberta foi um marco da quimioterapia (Allinger *et al.*, 1979).

Diversos fatos indicam que as plantas vasculares produzem substâncias específicas para certos microrganismos, com propriedades análogas às dos antibióticos.

Já foram observadas em diversas regiões das plantas mais de um constituinte ativo e que revelaram, pelos métodos microbiológicos, atuar de maneira desigual sobre as várias bactérias e fungos utilizadas nos ensaios (Williams e Lenke, 2002).

As pesquisas com antivirais tiveram início nas décadas de 50 e 60 (Jones, 1998) e hoje é bem mais sintomático o estudo pelo aumento excessivo no número de pessoas infectadas com os mais variados tipos de vírus existentes. Assim como com as substâncias sintéticas, os produtos de origem natural, sejam eles, extrato bruto, fração semipurificada ou mesmo substâncias puras, começaram a ser testadas mais recentemente (Simões *et al.*, 2001).

Roman Jr *et al.* (2001) avaliaram o nitrocomposto inédito, 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glucopiranoose, isolado das raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach., frente à atividade antiviral.

Essa substância como pode ser observado na tabela 28, inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* pelo método CIM nas concentrações de 250 e 125  $\mu$ g/ml, respectivamente.

**Tabela 28– Concentração inibitória mínima bacteriana da substância IV**

Concentração $\mu$ g/ml	<b>S. aureus</b>	<i>E. coli</i>	<b>B. subtilis</b>	<i>P. aeruginosa</i>
1000	-	+	-	+
500	-	+	-	+
250	-	+	-	+
125	+	+	-	+
62,5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15,6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

- = não crescimento; + = crescimento

Com a inibição do crescimento dos microrganismos Gram positivos, a **substância IV** foi submetida à avaliação da atividade bactericida pelo método CBM. Objetivou-se avaliar se essa substância, além de inibir o crescimento, é capaz de matar os microrganismos testados. Os resultados encontram-se expressos na tabela 29.

**Tabela 29 – Concentração bactericida mínima da substância IV**

Concentração µg/ml	<i>S. aureus</i>	<b>E. coli</b>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>
1000	-	+	-	+
500	-	+	-	+
250	+	+	-	+
125	+	+	+	+
62,5	+	+	+	+
31,2	+	+	+	+
15,6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

- = não crescimento; + = crescimento

Verificou-se que a **substância IV**, além de inibir o crescimento bacteriano foi capaz de matar *B. subtilis* na concentração de 250 µg/ml, já para *S. aureus* foi necessário uma concentração de 500 µg/ml.

As tabelas 30 e 31 representam a atividade da **substância IV** frente a várias leveduras. Esse composto repete resultado significativo tanto de inibição do crescimento desses fungos, como também na capacidade de matá-los, avaliado pelos métodos CIM e Concentração fungicida mínima (CFM).

**Tabela 30** – Concentração inibitória mínima fúngica da **substância IV**

Concentração µg/ml	<i>C. albicans</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<b>C. krusei</b>	<i>C. tropicalis</i>
1000	-	-	-	-
500	-	-	-	-
250	-	-	-	-
125	-	-	-	-
62,5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15,6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

- = não crescimento; + = crescimento

**Tabela 31** – Concentração fungicida mínima da **substância IV**

Concentração µg/ml	<b>C. albicans</b>	<b>C. parapsilosis</b>	<i>C. krusei</i>	<i>C. tropicalis</i>
1000	-	-	-	-
500	-	-	-	-
250	-	-	-	-
125	+	+	+	+
62,5	+	+	+	+
31.2	+	+	+	+
15,6	+	+	+	+
Controle	+	+	+	+

- = não crescimento; + = crescimento

Na atividade antiviral, é importante a realização de teste preliminar nas células que serão utilizadas na infecção viral, para se ter certeza de que as mesmas não serão alteradas morfológicamente, somente pelo uso da substância teste.

Assim, foram avaliadas as **substâncias I e IV**. A **substância I** avaliada frente à atividade antiviral, pelo método de imunofluorescência, demonstrou nenhuma atividade (0% de inibição viral). As outras substâncias flavonoídicas isoladas (**substâncias II e III**) não foram avaliadas para essa metodologia.

A **substância IV** foi avaliada quanto à citotoxicidade em células Hep2, nas concentrações de até 1000 µg/ml não apresentando sinal de toxicidade.

Essa substância foi testada quanto à atividade antiviral pelo método TCID<sub>50</sub> apresentando atividade virucida diretamente contra Poliovírus Hep2 na concentração de 50 µg/ml, observando-se 69% de inibição viral.

Avaliou-se essa substância, ainda, quanto à atividade antiviral terapêutica, em células sadias Hep2, pelo método TCID<sub>50</sub> nas concentrações de 12,5 µg/ml e 25 µg/ml, obtendo-se um resultado significativo de 94% e 91% de inibição viral, respectivamente. Na concentração de 50 µg/ml o resultado observado foi negativo, sem inibição viral. Esses resultados encontram-se postulados na tabela 32.

Com esses resultados promissores, essa substância foi testada pelo método de PLAQUE (poliovírus Hep2), no qual foi impossível, ao final do experimento, realizar contagem da inibição, devido às limitações da própria técnica.

A **substância IV** foi avaliada, ainda, pela técnica de imunofluorescência, observando-se atividade antiviral (poliovírus Hep2) dessa molécula com 46,1% de inibição viral.

Em testes com extratos etanólicos de várias espécies vegetais, Hudson *et al.* (2000) conseguiram obter cinco desses extratos com atividade antiviral em condições semelhantes a metodologia aplicada para **substância IV**. Esses foram ativos contra HSV nas concentrações até 25 µg/ml.

Em trabalho semelhante Anani *et al.* (2000) testaram 20 extratos metanólicos de diferentes plantas contra poliovírus, e conseguiram atividade antiviral para cinco extratos. Desses, *Mitracarpus villosus* (SW.) DC. e *Conyza aegyptiaca* (L.) Aiton, apresentaram atividade na concentração de 500 µg/ml. As espécies *Ficus ovata* Vhal., *Palisota hirsuta* (Thunb.) K. Shum. e *Adansonia digitata* L. demonstraram atividade antiviral na concentração de 250 µg/ml.

Com base nesses resultados comprova-se a eficiência da **substância IV** quanto a atividade antiviral (poliovírus).

**Tabela 32 – Resultados da atividade antiviral da substância IV**

<b>Substância IV</b> (µg/ml)	<b>Atividade terapêutica</b> (% inibição viral) poliovírus	Atividade viruscida (% inibição viral) poliovírus
12,5	94	
25	91	
50	Negativo	69

#### 4. CONCLUSÃO

Nesse trabalho foi realizado estudo com as raízes da *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. isolando-se e determinando-se a estrutura química dos principais constituintes dessa espécie vegetal, além de testá-los biologicamente.

Os ensaios fitoquímicos preliminares indicaram, ainda, a presença de saponinas, gomas e mucilagens, taninos, esteróides, alcalóides e antraquinonas.

O estudo químico resultou no isolamento de três derivados di-hidroflavonóis (**substâncias I, II e III**), além da **substância IV** inédita. A partir da análise dos dados espectroscópicos obtidos e com base na literatura, as substâncias isoladas foram identificadas como:

**Substância I** : *ASTILBINA* ou 3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*trans*-(2*R*,3*R*)-taxifolina.

**Substância II**: *NEOASTILBINA* ou 3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*trans*-(2*S*,3*S*)-taxifolina.

**Substância III**: *ISOASTILBINA* ou 3-O- $\alpha$ -L-ramnosil-*cis*-(2*R*,3*S*)-taxifolina.

**Substância IV**: 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glucopiranosose.

A presença de derivados di-hidroflavonóis e nitrocompostos em *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. é significativo, não somente do ponto de vista de suas atividades biológicas, mas também porque vem acrescentar dados quimiotaxonômicos importantes ao que vem sendo estudado com a família Malpighiaceae e ao gênero *Heteropteris*.

A substância inédita 2,3,4,6-tetra-O-(3-nitropropanoil)- $\beta$ -D-glucopiranosose apresentou efeito inibitório e bactericida frente a *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, além de apresentar atividade antiviral (inibição viral), frente a Poliovírus.

Em face dessas informações, em trabalhos futuros, poder-se-á dar continuidade ao estudo químico com as raízes de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. visando o isolamento de outras classes de substâncias ou mesmo de outros derivados di-hidroflavonóis e nitrocompostos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELAKUN, E. A. V.; FIMBAR, S. E. A.; MAKINDE, A. A. Antimicrobial activity of *Boswellia dalzielii*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 822-824, 2001.

AGAREZ, F. V. *Botânica: Chaves para determinação das famílias*. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 2 ed., 1994. 256 p.

AGRAWAL, P. K.; AGARWAL, S. K.; RASTOGI, R. P.; OSTERDAHAL, B. G. Dihydroflavanonols from *Cedrus deodara*, a <sup>13</sup>C NMR study. *Planta medica*, v. 43, p. 82-85, 1981.

ALLINGUER, N. L.; CAVA, M. P.; DE JONGH, DON C.; JOHNSON, R. K.; LEBEL, N. A.; STEVENS, C. L. *Química Orgânica*. Rio de Janeiro: Ed. LTC livros, 1976. 961 p.

AMARAL, L. F. P. *Fundamentos de química orgânica*. São Paulo: Edgard Blücher: Ed. da Universidade de São Paulo, 1980. 245 p.

ANANI, K.; HUDSON, J. B.; DE SOUZA, C.; AKPAGANA, K. TOWER, G. H. N. ARNASON, J. T.; GBEASSOR, M. Investigation of medicinal plants of Togo for antiviral and antimicrobial activities. *Pharmaceutical Biology*, v. 38, n. 1, p. 40-45, 2000.

BÁEZ, D. H.; RIOS, C. D. L.; CRESCENTE, O.; CASERTA, A. Antibacterial and chemical evaluation of *Cromolaena moritziana*, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 59, p. 203-206, 1998.

BARBIERI, L.; ARON, G. M.; IRVIN, J. D.; STIRPE, F. Purification and partial characterization of another form of the antiviral protein from seeds of *Phytolacca americana* L. (pokeweed). *Biochemical Journal*, n. 203, p. 55-59, 1982.

BARREIRO, E. J. *Química medicinal: as bases moleculares para ação dos fármacos*. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2000. 243 p.



BARRERO, F. A. New sources and antifungal activity of sesquiterpene lactones. *Fitoterapia*, v. 71, p. 60-64, 2000.

BARROSO, G. M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. Viçosa: UFV, Impr.Univ., v. 2, 1991.472 p.

BAUER, D. J. A history of the discovery and clinical applications of antiviral drugs. *British Medical Bulletin*, v. 41, n. 4, p. 309-314, 1985.

BASILE, A.; GIORDANO, S.; LÓPEZ-SÁEZ, J. A.; COBIANCHI, R. C. Antibacterial activity of pure flavonoids isolated from mocees. *Phytochemistry*, v. 52, p. 1479-1482, 1999.

BENN, M.; BAI, Y.; MAJAK, W. Aliphatic nitro-compounds in *Astragalus Canadensis*. *Phytochemistry*, v. 40, n. 6, p. 1629-1631, 1995.

CANNELL, R. J. P. *Natural products isolation*. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc, 1998. 473 p.

CARNEIRO, E.; CALIXTO, J. B.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A. Isolation, Chemical identification and pharmacological evaluation of eucryfin, astilbin and engelitin obtained from the Bark of *Hymenaea martiana*. *International Journal of Pharmacognosy*, v. 31, p. 38-46, 1993.

CARUSO, R. *Cerrado brasileiro: desenvolvimento, preservação e sustentabilidade*. Campinas: Fundação Cargill, 1997. 112 p.

CECHINEL FILHO, V.; SCHLEMPER, V.; SANTOS, A. R. S.; PINHEIRO, T. R.; YUNES, R. A.; MENDES, G. L.; CALIXTO, J. B.; DELLE MONACHE, F. Isolation and identification of active compounds from *Drimys winteri* barks. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 62, p. 223-227, 1998.

CORRÊA, M. P. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa nacional. v. 6, 1984.

CRAIG, M. I.; BENENCIA, F.; COULOMBIÉ, F. C. Antiviral activity of an acidic polysaccharides fraction extracted from *Cedrela tubiflora* leaves. *Fitoterapia*, v. 72, p. 113-119, 2001.

CUTLER, S. J.; CUTLER, H. G. *Biologically Active natural products: Pharmaceuticals*. New York: CRC Press, 1999, 251 p.

DE BRITTO, J.; MANICKAM, V. S.; GOPALAKRISHNAN, S.; USHIODA, T.; TANAKA, N. Determination of aglycone chirality in dihydroflavonol 3-O- $\alpha$ -L-rhamnosides by  $^1\text{H}$ -NMR spectroscopy. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 43, n. 2, p. 338-339, 1995.

DE CLERCQ, E. Antiviral drugs: current state of the art. *Journal of Clinical Virology*, v. 22, p. 73-89, 2001.

DE PIERI, C.; RABELO E SILVA, P. E.; MUNDO, S. R.; BORGES, J. C.; CARDOSO, M. L. C.; MARQUES, L. C.; MELLO, J. C. P. de. Análise farmacognóstica e identificação de dihidroflavonóis em liofilizados de *Heteropteris aphrodisiaca*. In: XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Recife, PE. *Programa e Resumos...* p. 183, Recife, PE, 2000.

DELLE MONACHE, D. F.; SUARES, L. E. C. 6-C-formyl and 6-C-hydroxymethyl flavanones from *Petiveria alliacea*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, p.2481-2482, 1992.

DI STASI, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996. 230 p.

DIHYDROQUERCETIN. Disponível em: <http://chemWeb.com/ccd>. Acessado em 17 jun 2002.

DUBELER, A.; VOLTMER, G.; GORA, V.; LUNDERSTADT, J.; ZEECK, A. Phenols from *Fagus sylvatica* and their role in defense against *Cryptococcus fagisuga*. *Phytochemistry*, v. 35, n. 1, p. 51-57, 1997.

EDELTRUDES O. L. Plantas e suas propriedades antimicrobianas. In: YUNES, R. A. *et al. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Ed. Argos, 2001, p. 481-493.

ELSOHLY, H. N.; JOSHI, A. S.; NINROD, A. C.; WALKER, L. A. CLARK, A. M. Antifungal chalcones from *Mallura tinctoria*. *Planta Medica*, v. 67, p. 87-89, 2001.

ENCICLOPÉDIA das plantas. Disponível em: <http://ervasdositio.com.br/index.htm#plantas>. Acessado em 12 maio 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, Quarta edição, Parte I: Ed. Atheneu. São Paulo, 1988.

FALCÃO, E. P. S. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquem *Heterodermia leucomela* (L) Poelt. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 21, n.1, p. 43-49, 2002.

FAMÍLIA MALPIGHIACEAE. Disponível em: <http://buscaplantas.com.br/malpighiaceae/index.htm#fitoterapia>. Acessado em 23 jan.2001.

GALVÃO, S. M. P. *Estudo farmacológico e toxicológico de Heteropteris aphrodisiaca O. Mach. Malpighiaceae (NÓ DE CACHORRO) em roedores jovens e idosos*. 1997. 107 f. Dissertação (Mestrado em Psicobiologia) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1997.

GALVÃO, S. M. P.; MARQUES, L. C.; OLIVEIRA, M. G. M.; CARLINI, E. A. *Heteropteris aphrodisiaca* (extract BST 0298): a Brazilian plant that improves memory in aged rats. *Phytotherapy Research*, v.79, p.305-311, 2002.

GAFFIELD, W. Absolute configurations of the *cis*-dihydroquercetin-3-O- $\beta$ -L-rhamnosides isoastilbin and neoisoastilbin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 44, n. 5 p. 1102-1103, 1996.

GARCEZ, S. W.; GARCEZ, F.R.; HONDA, N. K.; DA SILVA, A. J. R. A Nitropropanoyl-Glucopyranoside from *Indigofera suffruticosa*. *Phytochemistry*, v. 28, n. 4, p.1251-1252, 1989.

GLATTHAAR-SALMÜLLER, B.; SACHER, F.; ESPERESTER, A. Antiviral activity of an derived from roots of *Eleutherococcus senticosus*. *Antiviral Research*, v. 50, p. 223-228, 2001

GNANASUNDERAM, C.; SUTHERLAND, O. R. W. Hiptagin and other aliphatic nitro esters in *Lotus pedunculatus*. *Phytochemistry*, v. 25, n. 2, p.409-410, 1986.

GOODLAND, R. J. A. *Ecologia do cerrado*. Belo Horizonte: Itatiaia, São Paulo: Ed. Universidade de SP, 1979. 112 p.

GUARIM NETO, G. *Plantas utilizadas na medicina popular do estado de Mato grosso*. Brasília: CNPQ, Acessoria Editorial, 1987. 58 p.

HARBORNE, J. B. *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 2. ed. New York: Ed. Chapman and Hall, 1984. 287 p.

HARBORNE, J. B. ; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid since 1992. *Phytochemistry*, v. 55, p. 481-504, 2000.

HERNÁNDEZ, N. E.; TERESCHUK, M. L.; ABDALA, L. R. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafí del Vale (Tucumán, Argentina). *Journal of Ethnofarmacology*, v. 63, p. 317-322, 2000.

HOEHNE, F. C. *Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais*. São Paulo: Graphicar, 1939, 355 p.

HÜBNER, G.; WRAY, V.; NAHRSTEDT, A. Flavonol oligosaccharides from the seeds of *Aesculus hippocastanum*. *Planta Medica*, v. 65, p. 635-641, 1999.

HUDSON, J. B.; LEE, M. K.; RASOANAIVO, P. Further investigations on the antiviral activities of medicinal plants of Togo. *Pharmaceutical Biology*, v. 31, n. 1, p. 46-50, 2000.

INADA, A.; HIROKO, M.; MIDORI, S.; NAKANISHI, T. Phytochemical studies of seeds of medicinal plants. II. A New dihydroflavonol glycoside and a New 3-methyl-1-butanol glycoside from seeds of *Platycodon grandiflorum* A. De Candolle. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 40, n.11, p. 3081-3083, 1992.

ITOKAWA, H.; OSHIDA, Y.; IKUTA, A.; INATOMI, H.; IKEGAMI, S. Flavonol from the flowers of *Cucurbita pepo*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 10, p. 2421-2422, 1981.

JOHNSON, D. L. Excretion of miserotoxin and detoxification of the aglycone by grasshoppers (*Orthoptera: Acrididae*). *Phytochemistry*, v. 58, p. 739-742, 2001.

JOLY, A. B. *Botanica: introdução à taxonomia vegetal*. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 12. ed. v. 4. 1998. 512 p.

JONES, P. S. Strategies for antiviral drug discovery. *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, v. 9, p. 283-302, 1998.

KASAI, R.; OMOTO, T.; SHIMOMURA, K.; KOICHIRO, S. An Additional sweet dihydroflavonol glycoside from leaves of *Engelhardtia chrysolepis*, a Chinese Folk Medicine, Huang-qi. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 39, n. 7, p. 1871-1872, 1991.

KEELER, R. F.; KAMPEN, V. R. K.; LYNN, F. J. *Effects of poisonous plants on livestock*. New York: Ed. Academic press, 1978. 512 p.

KIEHLMANN, E.; EDMOND, P. M. L. Isomerization of dihydroquercetin. *Journal of Natural Products*, v. 58, n. 3, p. 450-455, 1995.

LOGU, A. D.; LOY, G.; PELLERANO, M. L.; BONSIGNORE, L.; SCHIVO, M. L. Inactivation of HSV-1 and HSV-2 and prevention of cell virus spread by *Santolina insularis* essential oil. *Antiviral Research*, v. 48, p. 117-185, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, v. 227, p. 680-685, 1970

LAGROTA, M. H. C.; WIGG, M. D.; PEREIRA, L. O. B.; FONSECA, M. E. F.; PEREIRA, N. A.; GUIMARÃES, J. C. Atividade antivirótica do lapachol. *Revista de Microbiologia*, v. 14, p. 21-26, 1983.

MACHADO, O. X. B. Nova espécie do gênero *H.* Kunth. *Rodriguésia*, v. 11-12, n. 22-23, p. 113-119, 1949.

MAJAK, W.; BOSE, R. J. Chromatographic methods for the isolation of miserotoxin and detection of aliphatic nitro compounds. *Phytochemistry*, v. 13, p.1005-1010, 1974.

MAJAK, W.; BENN, M.; MCEWAN, D.; PASS, M. A. Three nitropropanoyl esters of glucose from *Indigofera linnaei*. *Phytochemistry*, v. 31, n. 7, p. 2393-2395, 1992.

MAJAK, W.; BENN, M. Additional Esters of 3-nitropropanoic acid and glucose from fruit of the new Zealand karaka tree, *Corynocarpus laevigatus*. *Phytochemistry*, v. 35, p. 901-903, 1994.

MARQUES, V. R. B. *Natureza em boiões: medicinas e boticários no Brasil setecentista*. Campinas: Ed. Unicamp, 1999, 225 p.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELANI, D. C.; DIAS, J. E. *Plantas Medicinais*. Viçosa: UVF, Imprensa Universitária, 1998, 220 p.

MATTEI, R.; BARROS, M. P.; GALVÃO, S. M. P.; BECHARA, E. J. H.; CARLINI, E. L. A. *Heteropteris aphrodisiaca* O. Machado: effects of extract BST 0298 on the oxidative stress of young and old rat brains. *Phytotherapy Research*, v. 15, n. 7, 604-607, 2001.

MELLO, J. C. P. de; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and Prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 807-813, 1996.

MELLO, J. C. P.; PETROVICK, P. R. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC. (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. *Acta Farmacéutica Bonaerense*, v. 19, n. 3, p. 211-215, 2000.

MENDEZ, J.; HASEGAWA, M.; BILIA, A. R.; MORELI, I. 5,7,2',5'-tetrahydroxydihydroflavonol-3-rhamnoside from *Plinia pinnata*. *Phytochemistry*, v. 36, n. 4, p. 1087-1088, 1994.

NAGALAKSHMI, M. A. H.; THANGADURAI, D.; RAO, D. M.; PULLAIAH, T. Phytochemical and antimicrobial study of *Chuckrasia tabularis* leaves. *Fitoterapia*, v. 72, p. 62-64, 2001.

NAGATA, K.; SAKAGAMI, H.; HARADA, H.; NONOYAMA, M.; ISHIHAMA, A.; KONNO, K. Inhibition of influenza virus infection by pine cone antitumor substances. *Antiviral Research*, v. 13, p. 11-22, 1990.

NG, T. B.; LING, J. M. L.; WANG, Z. T.; CAI, J. N.; XU, G. J. Examination of coumarins, flavonoids and polysaccharopeptide for antibacterial activity. *General Pharmacology*, v. 37, n. 7, p. 1237-1240, 1996.

NISHIMURA, T.; TOKU, H.; FUKUYASU, H.; Antiviral compounds. Antiviral activity of amidinihydrazones of alkoxyphenyl-substituted carbonyl compounds against influenza virus in eggs and mice. *The Kitasato Archives of Experimental Medicine*, v. 50, p. 39-46, 1977.

NÓ DE CACHORRO Klein *Heteropteris aphrodisiaca*. Disponível em: <http://laboratório.klein.com.br/produtos>. Acessado em 12 abr. 2002.

OUAZZANI, N.; LAMNAOUER, D.; ABDENNEBI, E. H. Toxicology of *Astragalus lusitanicus* Lam. *Therapie*, v. 54, n. 6, p. 707-710, 1999.

PALAZZO, F.; PEREIRA, L. C. M. S.; LEITE-MELLO, E. V. S.; MELLO, J. C. P. Cicatrização de feridas cutâneas com aplicação de pomada de *Heteropteris aphrodisiaca* O. Mach. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16., 2000, Recife. *Programa e Resumos...Recife*, 2000. p. 283.

PATOCKA, J.; BIELAVSKY, J.; FUSEK, J. 3-Nitropropionic acid and similar nitrotoxins. *Acta Medica*, v. 43, n. 1, p. 9-13, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M. *Farmacologia*, 2. ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan, 1991. 595 p.

RAO, V. E.; SRIDHAR, P.; RAO, N. B. V. L.; ELLAIAH, P. A prenylated dihydroflavonol from *Mundulea suberosa*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 1417-1418, 1999.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M.; TYLER, V. E. *Farmacognosia e farmacobiotecnologia*. São Paulo: Premier, 1997. 189 p.

ROMAN JÚNIOR, W. A.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, T. U.; LINHARES, R. E. C.; MELLO, J. C. P. de. Atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral de nitrocomposto isolado de *Heteropteris aphrodisiaca*. In: III Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, Curitiba, *Programa e Resumos...* p. AO-3, Curitiba, 2001.

ROVOZZO, G. C.; BURKE, C. N. *A Manual of Basic Virological Techniques*, 1<sup>st</sup> edn. Prentice Hall Inc., Englewood Cliffs, N. Jersey, 1973, p. 150-163.



SEMPLE, S. J.; PYKE, S. M.; REYNOLDS, G. D.; FLOWER, R. L. P. *In vitro* antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. *Antiviral Research*, v. 49, p. 169-178, 2001.

SERKEDJIEVA, J.; HAY, A. J. *In vitro* anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. *Antiviral Research*, v. 37, p. 121-130, 1998.

SOUZA, M. P. *Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras*. Fortaleza: edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, 1991, 416 p.

SRIVASTAVA, S. K.; SRIVASTAVA, S. D.; CHOUKSEY, B. K. New antifungal constituents from *Terminalia alata*. *Fitoterapia*, v. 72, p. 106-112, 2001.

STERMITZ, F. R.; HNATYSZYN, O.; BANDONI, A. L.; RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. Screening of Argentine plants for aliphatic nitro compounds: hiptagin from *Heteropteris angustifolia*. *Phytochemistry*, v. 14, n. 14, p. 1341-1345, 1975.

STEMITZ, F. R.; NORRIS, F. A.; WILLIAMS, M. C. Miserotoxin, a new naturally occurring nitro compound. *Journal of the American Chemical Society*, v. 91, p. 4599-4600, 1969.

STERMITZ, F. R.; LOWRY, W. T.; UBBEN, E.; SHARIFI, I. 1,6-di-3-nitropropanoyl- $\beta$ -D-Glucopyranoside from *Astragalus cibarius*. *Phytochemistry*, v. 11, p. 3525-3527, 1972.

TIMBOLA, A. K.; SZPOGANICZ, B.; BRANCO, A.; MONACHE F. D.; PIZZOLATTI, M. G. A new flavonol from leaves of *Eugenia jambolana*. *Fitoterapia*, v. 73, 174-176, 2000.

TSCHESCHE, R.; DELHVI, S.; SEPULVEDA, S.; BREITMAIER, E. Eucriphin, a new chromone rhamnoside from the bark of *Eucryphia cordifolia*. *Phytochemistry*, v. 18, p. 867-869, 1979.

VARGAS, M. A. T.; HUNGRIA, M. *Biologia dos solos dos cerrados*. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1997. 524 p.

VILLAGÓMES-IBARRA, J. R.; SÁNCHEZ, M.; ESPEJO, O.; ZÚÑIGA-ESTRADA, A.; TORRES-VALENCIA, J. M.; JOSEPH-NATHAN, P. Antimicrobial activity of tree mexican *Gnaphalium* species. *Fitoterapia*, v. 72, p. 692-694, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. *Drogenanalyse: dünnenschichtchromatograph*: Berlin: Ed. Springer-Verlag, 1984. 220 p.

WILLIAMS, D. A.; LENKE, T. L. *Principles of medicinal chemistry*, 5. ed. Philadelphia: ed. Lippincott, 2002. 1114 p.

WILLIAMS, M. C.; LYNN, F. J. Livestock poisoning from nitro-bearing *Astragalus*. In: KEELER, R. F.; KAMPEN, V. R. K.; LYNN, F. J. *Effects of poisonous plants on livestock*. New York: Ed. Academic press, 1978. 512 p. cap 6, p. 379-390.

WILLIAMS, M. C.; YOST, G. S.; STERMITZ, F. Miserotoxin, a toxic compound in *Astragalus michauxii*. *Phytochemistry*, v. 16, p. 1438-1439, 1977.

WILLIAMS, M. C.; STERMITZ, F. R.; THOMAS, R. D. Nitro compounds in *Astragalus* species. *Phytochemistry*, v. 14, p. 2306-2308, 1975.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, W.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal*. Chapecó: Ed. Argos, 2001, 500 p.

XU, X. H.; LEE, S. F. Activity of plant flavonoids against antibiotic resistant bacteria. *Phytotherapy Research*, v. 15, p. 39-43, 2001.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 4 ed. Porto Alegre/Florianópolis: ed. UFRGS/UFSC, 2001. cap. 23, p. 489-516.

