

KELLER GUILHERME GUIMARÃES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES
OCORRENTES NA SERRA DO CIPÓ E
ESTUDO FITOQUÍMICO DE
Xyris pterygoblephara KUNTH**

**Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia – UFMG
2007**

KELLER GUILHERME GUIMARÃES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ESPÉCIES
OCORRENTES NA SERRA DO CIPÓ E
ESTUDO FITOQUÍMICO DE
Xyris pterygoblephara KUNTH**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Farmacognosia e fitoquímica.

Orientador: Prof. Fernão Castro Braga

Faculdade de Farmácia, UFMG.

Belo Horizonte

Faculdade de Farmácia – UFMG

2007

Keller Guilherme Guimarães

Mestrando

Prof. Fernão Castro Braga

Orientador

Linha de Pesquisa:

Linha II: Fármacos e Medicamentos

Área de conhecimento:

Farmacognosia e Fitoquímica

Local de realização:

Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, UFMG.

“As condições de um pássaro solitário são cinco:

Primeiro, que ele voe ao ponto mais alto;

Segundo, que não anseie por companhia,

nem a de sua própria espécie;

Terceiro, que dirija seu bico para os céus;

Quarto, que não tenha uma cor definida;

Quinto, que tenha um canto muito suave.”

Juan de Yepes

(San Juan de la Cruz, Dichos de Luz y Amor)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar os meus passos e abrandar meu coração nos momentos de escuridão.

Ao Prof. Fernão Castro Braga, pela oportunidade, pelos ensinamentos, por ser um grande exemplo de profissionalismo e seriedade e, principalmente, pelo apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Prof. José Dias, pela obtenção dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

A todos os professores que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação.

Aos funcionários da FAFAR-UFMG, por nunca se ausentarem dos bastidores do conhecimento.

Aos amigos do Laboratório de Fitoquímica, Jussara, Ydia, Priscilla, Cristiane, Denise, Celinho, Suzan, Patrícia, Gorete, Eliana, Ana Bárbara, Luciana Mota, Luciana Gomes, Raquel e Graça, pela constante ajuda e, especialmente, pelos memoráveis momentos de descontração.

À Vivi, pelo companheirismo, carinho, dedicação e paciência, por suportar com resignação meus inúmeros momentos de mau humor e pela ajuda sem fim.

Aos meus grandes amigos, Iuri, Sebastião e Jorge, que sempre torceram pelo meu sucesso.

À minha família, por acreditar em mim, mesmo sofrendo com o meu isolamento.

Aos meus colegas de trabalho da Universidade Presidente Antônio Carlos, pelas palavras de incentivo e apoio.

Aos meus alunos, por motivarem a minha constante busca pelo conhecimento.

Aos irmãos físicos e espirituais de Unidos Para o Bem, pelos imprescindíveis conselhos e luz disseminados.

Aos *Fratres e Sorores R+C*, companheiros na senda espiritual.

Ao sensei Sérgio (*in memoriam*), pelo inesquecível exemplo de resistência e perseverança, e a todos os meus companheiros de batalha. *Ninpo ikkan!*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados de coleta das espécies em estudo.....	48
Tabela 2 – Rendimentos dos extratos etanólicos obtidos por percolação exaustiva das espécies vegetais em estudo.....	49
Tabela 3 – Massas das frações resultantes da partição do extrato etanólico de <i>Xyris pterygoblephara</i> entre solventes imiscíveis.....	50
Tabela 4 – Massas das frações resultantes da extração com diclorometano do extrato etanólico de <i>Xyris pterygoblephara</i> com diclorometano	51
Tabela 5 – Refracionamento da fração em <i>n</i> -hexano do extrato etanólico de <i>X. pterygoblephara</i> por CCS.....	53
Tabela 6 - Refracionamento da “fração apolar” do extrato etanólico de <i>X. pterygoblephara</i> por CCS.....	56
Tabela 7 - Refracionamento da Fração 5 por CCS <i>flash</i>	57
Tabela 8 - Refracionamento da fração 5E por CCS <i>flash</i>	57
Tabela 9 - Refracionamento da fração 5E2 por CCS.....	58
Tabela 10 - Refracionamento da “fração polar” do extrato etanólico de <i>X. pterygoblephara</i> por CCS.....	59
Tabela 11 - Refracionamento de FP18 por CCS.....	60
Tabela 12 - Refracionamento da fração F em coluna de Sephadex LH20.....	60
Tabela 13 - Refracionamento da fração F6 em coluna de Sephadex LH20.....	61
Tabela 14 - Fracionamento de F6B por CCS.....	61
Tabela 15 – Concentrações das amostras avaliadas nos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar.....	64
Tabela 16 – Drogas antimicrobianas utilizadas como controle positivo nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em ágar.....	65
Tabela 17 – Soluções de antimicrobianos utilizados como padrão nos ensaios de atividade antimicrobiana por microdiluição.....	68
Tabela 18 – Concentrações das amostras no ensaio de microdiluição.....	69
Tabela 19 - Atribuição dos sinais de RMN de ¹³ C para P2A.....	84
Tabela 20 - Atribuição dos principais sinais de RMN de ¹ H para P2A.....	84
Tabela 21 - Atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ¹³ C para a molécula 5E2C.....	96

Tabela 22 - Atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^1H para a molécula 5E2C.....	96
Tabela 23 – Dados do espectro de dicroísmo circular obtido para 5E2C.....	99
Tabela 24 - Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para B2.....	112
Tabela 25 - Atribuição dos sinais de RMN de ^1H para B2.....	113
Tabela 26 – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento de <i>Bacillus subtilis</i> determinados pelo método de difusão em ágar.....	119
Tabela 27 - Atividade antimicrobiana de extratos brutos das espécies em estudo e da substância 5E2C frente aos microrganismos ensaiados.....	121
Tabela 28 – Diâmetros dos halos de inibição de crescimento de fungos dermatófitos, determinados pelo método de difusão em ágar para a substância 5E2C.....	126

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reação de redução do MTT a formazana.....	39
Figura 2 – Cromatograma do extrato etanólico de <i>X. pterygoblephara</i> , obtido por RP-HPLC e espectros de varredura no UV obtidos pelo detector de DAD para os picos majoritários do cromatograma do extrato bruto de <i>X. pterygoblephara</i>	71
Figura 3 – Cromatogramas obtidos por RP-HPLC para as frações resultantes da partição do extrato etanólico bruto de <i>X. pterygoblephara</i> entre solventes imiscíveis.....	72
Figura 4 - Cromatograma obtido por RP-HPLC para a substância P2A.....	74
Figura 5 – Cromatograma obtido para a substância P2A por CCD de sílica gel.....	74
Figura 6 – Cromatogramas, obtidos por RP-HPLC, para as frações resultantes da extração com diclorometano do extrato etanólico de <i>X. pterygoblephara</i>	75
Figura 7 – Cromatograma obtido por RP-HPLC, para a substância 5E2C.....	76
Figura 8 – Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para a substância 5E2C.....	77
Figura 9 - Cromatograma obtido por RP-HPLC para a substância B2.....	78
Figura 10 – Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para a substância B2.....	78
Figura 11 – Espectro no IV (cm^{-1}) obtido para P2A.....	81
Figura 12 – Espectro de RMN de ^{13}C e sub-espectro DEPT-135 obtidos para P2A.....	85
Figura 13 – Espectro de RMN de ^1H e expansão obtidos para P2A.....	86
Figura 14 – Espectro de correlação heteronuclear HMQC obtido para a substância P2A.....	87
Figura 15 – Espectro de NOESY obtido para a substância P2A.....	88
Figura 16 – Correlações de NOESY observadas para o hidrogênio olefínico H-19.....	82
Figura 17 – Espectro de correlação heteronuclear HMBC obtido para a substância P2A.....	89

Figura 18 – Correlações observadas no espectro de HMBC que permitiram localizar a carbonila em C-3.....	83
Figura 19 – Espectro de massas obtido para a substância P2A.....	90
Figura 20 – Espectros de varredura no UV obtidos para a substância 5E2C.....	91
Figura 21 – Espectro no IV (cm ⁻¹) obtido para a substância 5E2C.....	92
Figura 22 – Espectro de RMN de ¹³ C e sub-espectro DEPT-135 obtidos para a substância 5E2C.....	102
Figura 23 – Espectro de RMN de ¹ H obtido para a substância 5E2C.....	103
Figura 24 – Expansões do espectro de RMN de ¹ H obtido para a substância 5E2C.....	104
Figura 25 – Espectro de correlação homonuclear COSY obtido para 5E2C.....	105
Figura 26 – Expansão do espectro de correlação homonuclear COSY obtido para 5E2C.....	106
Figura 27 – Espectro de correlação heteronuclear HMQC obtido para 5E2C.....	107
Figura 28 – Espectro de correlação heteronuclear HMBC obtido para 5E2C.....	108
Figura 29 – Estrutura parcial proposta para 5E2C a partir de correlações heteronucleares observadas no espectro HMBC.....	94
Figura 30 – Correlação homonuclear (COSY) entre H-3 e H-4 e correlações heteronucleares (HMBC) entre C-16 e H-4 e C-16 e H-17.....	94
Figura 31 – Espectro de massas obtido para a substância 5E2C.....	109
Figura 32 – Mapa de correlação espacial homonuclear NOESY obtido para 5E2C.....	110
Figura 33 – Representação espacial da substância 5E2C.....	98
Figura 34 - Espectro de dicroísmo circular obtido para a substância 5E2C.....	99
Figura 35 - Projeção para 5E2C do anel aromático para o anel heterocíclico (conformação semi-cadeira).....	100
Figura 36 - Espectro de dicroísmo circular dos enantiômeros R e S da 6-hidroximeleína.....	100
Figura 37 – Espectro de RMN de ¹³ C obtido para a substância B2.....	114
Figura 38 – Espectro de RMN de ¹ H obtido para B2.....	115
Figura 39 – Expansões do espectro de RMN de ¹ H obtido para B2.....	116
Figura 40 – Espectro de varredura no UV obtido para a substância B2.....	111

Figura 41 – Espectro de correlação homonuclear COSY obtido para B2.....	117
Figura 42 – Espectro de correlação heteronuclear HMQC obtido para B2.....	118
Figura 43 – Avaliação da substância 5E2C no ensaio de difusão em ágar frente a <i>T. mentagrophytes</i>	126
Figura 44 – Avaliação da substância 5E2C no ensaio de difusão em ágar frente a <i>E. floccossum</i>	126
Figura 45 – Avaliação da substância 5E2C no ensaio de difusão em ágar frente a <i>T. rubrum</i>	127

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Curva de log da concentração ($\mu\text{g /ml}$) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de <i>T. laniflora</i> frente a <i>P. aeruginosa</i> , determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI_{50} do extrato.....	121
Gráfico 2 – Curva de log da concentração ($\mu\text{g /ml}$) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de <i>X. peregrina</i> frente a <i>S. aureus</i> , determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI_{50} do extrato.....	121
Gráfico 3 – Curva de log da concentração ($\mu\text{g /ml}$) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de <i>X. longiscapa</i> frente a <i>B. subtilis</i> , determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI_{50} do extrato.....	122
Gráfico 4 – Curva de log da concentração ($\mu\text{g /ml}$) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de <i>X. peregrina</i> frente a <i>C. albicans</i> , determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI_{50} do extrato.....	122
Gráfico 5 – Curva de log da concentração ($\mu\text{g /ml}$) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de <i>X. peregrina</i> frente a <i>A. niger</i> , determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI_{50} do extrato.....	122

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Fracionamento preliminar do extrato etanólico de <i>X. pterygoblephara</i> por partição entre solventes imiscíveis.....	50
Fluxograma 2 – Esquema geral do estudo fitoquímico de <i>X. pterygoblephara</i>	79

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
°C	Centígrados
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCS	Cromatografia em coluna de sílica gel
CCT	Coleção de Culturas Tropicais
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
Conc.	Concentração
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
DCM	Diclorometano
DEPT	<i>Distortionless enhancement by polarization transfer</i>
d.i.	Diâmetro interno
DMSO	Dimetilsulfóxido
δ	Deslocamento químico
EtOAc	Acetato de etila
Fig.	Figura
g	Grama(s)
G(-)	Gram-negativo
G(+)	Gram-positivo
h	Hora(s)
HEX	<i>n</i> -Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear multiple bond coherence</i>
HMQC	<i>Heteronuclear correlation through multiple quantum coherence</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento escalar
l	Litro(s)
λ	Comprimento de onda

mg	Miligrama
MHz	Megahertz
min.	Minuto(s)
ml	Mililitro
μm	Micrômetro(s)
μg	Micrograma(s)
μl	Microlitro(s)
nm	Nanômetro(s)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PF	Ponto de fusão
ppm	Partes por milhão
p/v	Peso/volume
Rf	Fator de retenção
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RP	<i>Reverse Phase</i> (Fase reversa)
rpm	Rotações por minuto
sol.	Solução
T	Transmitância
TMS	Tetrametilsilano
Tr(s)	Tempo(s) de retenção
vis.	Visível
vol.	Volume
v/v	Volume/volume

LISTA DE FÓRMULAS ESTRUTURAIS

(1)	Morfina.....	24
(2)	Tubocurarina.....	24
(3)	Reserpina.....	24
(4)	Gossipol.....	25
(5)	Vimblastina.....	25
(6)	Vincristina.....	25
(7)	Etoposídeo.....	25
(8)	Teniposídeo.....	25
(9)	Paclitaxel.....	26
(10)	Hipericina.....	26
(11)	Crisazina.....	32
(12)	3-metóxi-crisazina.....	32
(13)	Xiridina A.....	32
(14)	Xiridina B.....	32
(15)	Crisoeriol.....	32
(16)	Ramnocitrina-3-O-glicosídeo.....	32
(17)	Luteolina-7-β-D-glicopiranosídeo.....	32
(18)	1,5-diidroxi-3-metoxiantraquinona.....	32
(19)	Apigenina.....	33
(20)	Hispidulina.....	33
(21)	Cirsimaritina.....	33
(22)	Quercetina-3-O-glicosídeo.....	33
(23)	Timol.....	35
(24)	Eugenol.....	35
(25)	Galangenina.....	36
(26)	Pinocembrina.....	36
(27)	Licochalcona.....	36
(28)	Ácido morônico.....	83
(29)	(3R,4R)-(-)-6-metóxi-3,4-diidro-4-acetóxi-5- <i>n</i> -pentil-1H-2-benzopiran-1- ona.....	97
(30)	7-butil-3,6-diidroxi-3(R)-pentilisocroman-1-ona.....	101
(31)	Monocerina.....	101

(32)	Quercetina.....	113
(33)	1H-[2]benzopiran-1-ona.....	125
(34)	8-hidróxi-1H-[2]benzopiran-1-ona.....	125
(35)	6,8-diidróxi-1H-[2]benzopiran-1-ona.....	125
(36)	Monotroumarina.....	125

SUMÁRIO

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de gráficos

Lista de fluxogramas

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

Lista de fórmulas estruturais

Resumo

Abstract

Capítulo 1 Introdução	19
1.1 Um breve histórico do uso de plantas medicinais.....	19
1.2 A importância da pesquisa de Produtos Naturais.....	20
1.3 Produtos naturais bioativos.....	23
1.4 Objetivos.....	27
1.4.1 Objetivo geral.....	27
1.4.2 Objetivos específicos.....	27
Capítulo 2 Revisão da literatura	28
2.1 A flora brasileira.....	28
2.2 Campos rupestres.....	29
2.3 Serra do Cipó.....	30
2.4 O gênero <i>Xyris</i>	30
2.5 O gênero <i>Trembleya</i>	33
2.6 Extratos vegetais e fitoconstituintes com atividade antimicrobiana.....	34
2.7 Métodos para determinação da atividade antimicrobiana.....	37
2.7.1 Difusão em ágar.....	37
2.7.2 Microdiluição.....	38
2.8 Microrganismos utilizados em ensaios no presente trabalho.....	39
Capítulo 3 Parte experimental	41
3.1 Equipamentos.....	41
3.1.1 Reagentes e material de consumo.....	42
3.1.2 Soluções e meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos.....	44

3.1.3	Soluções reveladoras para cromatografia em camada delgada.....	45
3.1.4	Reagentes aditivos para espectrometria no ultravioleta.....	46
3.2	Coleta, identificação e secagem do material vegetal.....	47
3.3	Preparo dos extratos etanólicos.....	48
3.4	Fracionamento cromatográfico.....	49
3.4.1	Fracionamento preliminar do extrato etanólico de <i>Xyris pterygoblephara</i>	49
3.5	Perfis cromatográficos dos extratos e frações por RP-HPLC.....	51
3.5.1	Preparo das amostras.....	51
3.5.2	Condições cromatográficas.....	52
3.6	Fracionamento da fração em <i>n</i> -hexano.....	52
3.6.1	Refracionamento da fração em <i>n</i> -hexano por cromatografia em coluna de sílica gel (CCS).....	52
3.6.2	Purificação da fração 10 por HPLC em escala preparativa.....	53
3.6.3	Purificação da fração 16 por HPLC em escala preparativa.....	54
3.7	Fracionamento da “fração apolar”.....	55
3.7.1	Refracionamento da “fração apolar” de <i>X. pterygoblephara</i> por CCS.....	55
3.7.2	Purificação da fração 5 por CCS.....	56
3.8	Fracionamento da “fração polar”.....	58
3.8.1	Fracionamento da “fração polar” de <i>X. pterygoblephara</i> por CCS....	58
3.9	Métodos físicos para caracterização das substâncias isoladas.....	61
3.10	Ensaio microbiológicos.....	62
3.10.1	Microrganismos.....	62
3.10.2	Método de difusão em ágar.....	63
3.10.2.1	Preparo das amostras.....	63
3.10.2.2	Drogas antimicrobianas utilizadas como controle positivo	64
3.10.2.3	Preparo dos meios de cultura.....	65
3.10.2.4	Preparo dos inóculos.....	65
3.10.2.5	Método.....	66
3.10.3	Método de microdiluição.....	66
3.10.3.1	Preparo das amostras.....	67
3.10.3.2	Drogas antimicrobianas utilizadas como padrão.....	67

3.10.3.3	Preparo do meio de cultura.....	68
3.10.3.4	Preparo dos inóculos.....	68
3.10.3.5	Método.....	69
3.10.3.6	Análise estatística dos ensaios microbiológicos.....	70
Capítulo 4	Estudo fitoquímico de <i>X. pterygoblephara</i>	71
4.1	Estudo fitoquímico de <i>X. pterygoblephara</i>	71
4.1.1	Extrato etanólico.....	71
4.1.2	Frações resultantes da partição do extrato etanólico com solventes imiscíveis.....	72
4.1.2.1	Fração em <i>n</i> -hexano.....	73
4.1.3	Frações resultantes da extração do extrato etanólico bruto de <i>X. pterygoblephara</i> com diclorometano.....	75
4.1.3.1	Fração “apolar”.....	76
4.1.4	Fração “polar”.....	77
4.2	Elucidação estrutural das substâncias isoladas.....	80
4.2.1	Substância P2A.....	80
4.2.2	Substância 5E2C.....	91
4.2.2.1	Determinação da configuração absoluta de 5E2C.....	97
4.2.3	Substância B2.....	111
Capítulo 5	Atividades biológicas	119
5.1	Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos extratos e frações.....	119
5.1.1	Ensaio de difusão em ágar.....	119
5.1.2	Ensaio de microdiluição.....	120
5.1.3	Avaliação da substância 5E2C frente a fungos dermatófitos.....	124
Capítulo 6	Conclusões	128
	Referências bibliográficas	129

Abstract

Serra do Cipó is part of a Brazilian bioma qualified as a “hotspot for conservation priority”, an area featuring exceptional concentrations of endemic species and experiencing exceptional loss of habitat. The *in vitro* antimicrobial activity of seven *Xyris* spp. (*X. cipoensis* L. B. Sm. & Downs, *X. longiscapa* Alb. Nilss., *X. peregrina* Malme, *X. pilosa* Kunth, *X. platystachia* Alb. Nilss., *X. pterygoblephara* Kunth. and *X. tortula* Mart.) along with *Trempleya lanifora* (D. Don) Cogn., species collected in this habitat, was evaluated against 5 microorganism strains, by the microdilution assay. All assayed extracts were active. The ethanol extract from *X. pterygoblephara* aerial parts was selected for phytochemical study. Its fractionation by silica gel column chromatography and partition between immiscible solvents, following purification by semi preparative NP-HPLC and Sephadex LH20 column chromatography, resulted in the isolation of three compounds. The structures were assigned by spectroscopic data (1D and 2D NMR, IR, MS and UV) as moronic acid, quercetin and the new compound (3R,4R)-(-)-6-methoxy-3,4-dihydro-4-acethoxy-5-*n*-pentil-1H-2-benzopyran-1-one (**1**). The absolute configuration of **1** was defined using circular dichroism spectroscopy and by comparison with data previously reported for other dihydroisocoumarins. Assay of **1** (100 µg/disc) by the agar diffusion method against isolates of the dermatophytous fungi *Epidermophyton floccosum*, *Tricophyton mentagrophytes* and *Tricophyton rubrum* revealed similar activity to the positive control amphotericin B (32 µg/disc). Some *Xyris* plants, popularly named “semprevivas” (everlasting plants), are traditionally used to treat eczemas and dermatitis. Therefore, the obtained data might corroborate the ethomedical use of *Xyris* spp. to treat dermatitis.

Resumo

A Serra do Cipó é parte de um bioma classificado como prioritário para conservação (*hotspot for conservation priority*), por reunir uma concentração excepcional de espécies e, também, vivenciar grande perda de hábitat. A atividade antimicrobiana de sete espécies de *Xyris* (*X. cipoensis* L. B. Sm. & Downs, *X. longiscapa* Alb. Nilss., *X. peregrina* Malme, *X. pilosa* Kunth, *X. platystachia* Alb. Nilss., *X. pterygoblephara* Kunth. e *X. tortula* Mart.), bem como de *Trempleya lanifora* (D. Don) Cogn., coletadas na Serra do Cipó, foi avaliada *in vitro* pelo método de microdiluição frente a 5 linhagens de microorganismos. Todos os extratos avaliados foram ativos. O extrato etanólico de partes aéreas de *X. pterygoblephara* foi selecionado para estudo fitoquímico. Este foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica gel e partição entre solventes imiscíveis, seguindo-se purificação por CLAE de fase normal em escala semi-preparativa e cromatografia em coluna de Sepladex LH20, resultando no isolamento de três substâncias. Suas estruturas foram elucidadas a partir de dados espectrométricos como ácido morônico, quercetina e o composto inédito (3R,4R)-(-)-6-metoxi-3,4-diidro-4-acetoxi-5-*n*-pentil-1H-2-benzopiran-1-ona (**1**). A configuração absoluta da substância **1** foi definida por espectroscopia de dicroísmo circular e comparação com dados anteriormente relatados para outras diidroisocumarinas. A atividade do composto **1** (100 µg/disco) frente a isolados dos fungos dermatófitos *Epidermophyton floccossum*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum*, avaliada *in vitro* pelo método de difusão em ágar, foi semelhante à da anfotericina B (32 µg/disco), utilizada como controle positivo. Algumas espécies de *Xyris*, denominadas vulgarmente de “sempre-vivas”, são utilizadas tradicionalmente para tratar eczemas e dermatites. Portanto, os dados obtidos fornecem evidência para corroborar o uso etnomédico de *Xyris* spp. no tratamento de dermatites.

1.1 Um breve histórico do uso de plantas medicinais

Diversas evidências indicam que plantas medicinais representam a mais antiga e difundida forma de medicação. As propriedades curativas de diversas plantas são reconhecidas e utilizadas por diversos primatas, além do homem. Algumas espécies de macacos, chimpanzés e gorilas consomem determinadas espécies vegetais contendo substâncias com ação analgésica, antimicrobiana, antiinflamatória, imunostimulante, antidiarréica e digestiva, entre outras. Este fato é considerado uma evidência evolutiva de que as plantas medicinais eram freqüentemente usadas pelos povos pré-históricos (GLANDER, 1994; HUFFMAN, 1997; BAKER, 1999; PLOTKIN, 2000; HALBERTSTEIN, 2005).

Desde a pré-história, a exploração das plantas medicinais é uma prática difundida em todo o planeta. Em diversas culturas ancestrais, plantas e produtos derivados delas eram ingeridos com objetivos médicos e psicoterapêuticos. Existem coleções sistemáticas de plantas medicinais descritas por antropólogos e etnobotânicos para diversas etnias conhecidas (HALBERTSTEIN, 2005).

Aos antigos egípcios, que viveram entre 6000 e 3000 anos atrás, é creditado o desenvolvimento de elaborados materiais curativos obtidos de fontes naturais. Os médicos egípcios prescreviam sedativos, analgésicos e medicamentos para distúrbios gastrointestinais e para doenças do trato urinário (NUNN, 1996; HALBERTSTEIN, 2005).

Tratamentos terapêuticos baseados em plantas se expandiram, posteriormente, pelos praticantes de cuidados da saúde, na antiga Grécia, entre 3000 e 1500 anos atrás. No século I da era cristã, o grego Dioscórides escreveu o clássico *De Materia Medica*, uma coletânea de 24 livros com descrições detalhadas das propriedades curativas e usos de mais de 600 plantas medicinais (VON STADEN, 1989; HALBERTSTEIN, 2005).

Desenvolvimentos e descobertas adicionais sobre o uso de plantas medicinais resultaram de experimentações em outras culturas antigas, entre 2000 e 1000 anos atrás, na China, Índia e Tibet (HALBERTSTEIN, 2005).

Há cerca de 1000 anos, os curandeiros das culturas maias e astecas, no México e América Central, eram grandes conhecedores das substâncias naturais curativas e alucinógenas (EVANS, 2004; HALBERTSTEIN, 2005).

Um grande avanço na área foi obtido no século XVIII, com o trabalho taxonômico revolucionário do naturalista sueco Carolus Linnaeus, que classificou milhares de espécies vegetais e descreveu estudos sobre as relações históricas e evolutivas das plantas medicinais em diversas partes do mundo (*Systema Naturae*, 1735) (HALBERTSTEIN, 2005).

Na história mais recente, o uso de plantas com finalidades medicinais baseia-se, em parte, no isolamento de compostos ativos, tendo como um dos marcos a obtenção da morfina a partir do ópio, no início do século XIX (KINGHORN, 2001; BALUNAS & KINGHORN, 2005).

1.2 A importância da pesquisa de Produtos Naturais

O desenvolvimento acelerado da química orgânica sintética no período pós 2ª Guerra Mundial resultou na substituição gradativa de produtos naturais por sintéticos para uso terapêutico. As razões para isso foram a facilidade de se obter produtos puros e a possibilidade de realizar modificações estruturais visando produzir drogas mais ativas e seguras, além do poder econômico crescente das companhias farmacêuticas. Além disso, ao longo do desenvolvimento e evolução humana, o uso de produtos naturais esteve freqüentemente associado a um significado mágico-religioso, e os conceitos de saúde e doença variavam muito, segundo cada cultura. Esta visão contrariava o novo modo de vida das sociedades ocidentais industrializadas, nas quais as drogas obtidas de recursos naturais eram consideradas uma opção para pessoas ignorantes, de baixa renda ou, simplesmente, uma superstição religiosa sem valor terapêutico (RATES, 2001).

A busca de produtos naturais como fonte de novos fármacos atingiu o topo na indústria farmacêutica ocidental nas décadas de 1970 e 1980. Das 877 novas

moléculas introduzidas no mercado entre 1981 e 2002, praticamente a metade (49%) era de produtos naturais, análogos semi-sintéticos desses ou drogas sintéticas baseadas em farmacóforos de produtos naturais (NEWMAN *et al*, 2003).

Apesar deste sucesso, a pesquisa farmacêutica em produtos naturais, conduzida pelas grandes corporações farmacêuticas, passou por um lento declínio durante a década de 1990, justificado pelo grande intervalo de tempo entre a descoberta inicial de uma molécula bioativa e seu lançamento no mercado como produto farmacêutico, normalmente 10 anos ou mais. Isto significa que drogas introduzidas no mercado hoje são, tipicamente, produtos descobertos há pelo menos uma década (KOEHN & CARTER, 2005).

Além disso, outros fatores levaram as indústrias farmacêuticas a reduzirem seu foco de interesse na descoberta de produtos naturais. Primeiro, a busca de moléculas contra alvos biológicos definidos induziu muitas companhias a substituírem suas coleções de moléculas naturais por moléculas sintéticas, em geral estruturalmente muito parecidas entre si. Segundo, o desenvolvimento da química combinatorial, apresentada a princípio como uma abordagem para a obtenção de moléculas mais simples, estruturalmente semelhantes a drogas existentes, e de grande diversidade química, em um período de tempo mais curto. Terceiro, a diminuição do interesse das principais indústrias farmacêuticas pelo tratamento das doenças negligenciadas (como as doenças infecciosas), uma área tradicionalmente forte dos produtos naturais. Por último, as possíveis incertezas quanto à coleta de materiais biológicos, resultado da Convenção da Diversidade Biológica, que ocorreu durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento, no Rio de Janeiro, em 1992 (Rio 92) (KOEHN & CARTER, 2005).

Nas entrelinhas, entende-se que as razões da indústria são muito mais comerciais do que científicas, particularmente no caso da pesquisa de doenças negligenciadas (KOEHN & CARTER, 2005).

No entanto, o fato de que produtos naturais possuem elevada diversidade estrutural, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que os diferenciam de substâncias sintéticas, obtidas pela química combinatorial ou síntese clássica, fez com que o interesse em drogas derivadas de plantas superiores voltasse a

crescer ao longo da última década. Atualmente, as grandes companhias farmacêuticas transnacionais mantêm programas de descoberta de produtos naturais bioativos e, também, apresentam interesse crescente no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos padronizados, com eficácia, segurança e qualidade comprovadas (MACHADO *et al*, 2005; KOEHN & CARTER, 2005).

Uma ampla aceitação dos fitoterápicos e a integração da fitoterapia no conceito de medicina clássica só poderão ser alcançadas se esses produtos apresentarem os mesmos critérios de qualidade dos fármacos sintéticos. Para alcançar este objetivo é fundamental conhecer os principais constituintes ativos das drogas vegetais, assim como realizar ensaios farmacológicos e toxicológicos para sua padronização (MACHADO *et al*, 2005).

No Brasil, a chamada medicina popular é praticada por uma grande parte da população, particularmente por habitantes do interior do país, para prover os cuidados essenciais da saúde física e mental. Diversas espécies vegetais são utilizadas com finalidades medicinais no país, mas apenas uma pequena parte delas já foi estudada cientificamente (LIMA *et al*, 2005).

A aceitação da fitomedicina vem crescendo no Brasil, e esta tem se tornado um importante setor econômico. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS)¹, em 2002 o mercado mundial dos fitomedicamentos movimentou aproximadamente US\$ 20 bilhões, com cerca de US\$ 400 milhões no Brasil. Este setor vem apresentando taxas de crescimento da ordem de 15%, contra apenas 4% dos medicamentos sintéticos (LIMA *et al*, 2005; PATWARDHAN, 2005).

Assim, plantas medicinais vêm sendo intensamente estudadas visando validar seus usos tradicionais, a partir da determinação dos seus efeitos farmacológicos, e garantir a segurança na sua utilização, através de estudos toxicológicos. Observa-se, também, grande preocupação com a conservação destas espécies, que freqüentemente são obtidas de populações nativas, ameaçando sua existência pela coleta predatória (LIMA *et al*, 2005).

No que diz respeito aos biomas a serem investigados, as florestas tropicais primárias ainda são consideradas como as mais promissoras para pesquisa de novos

¹ <http://www.who.org>

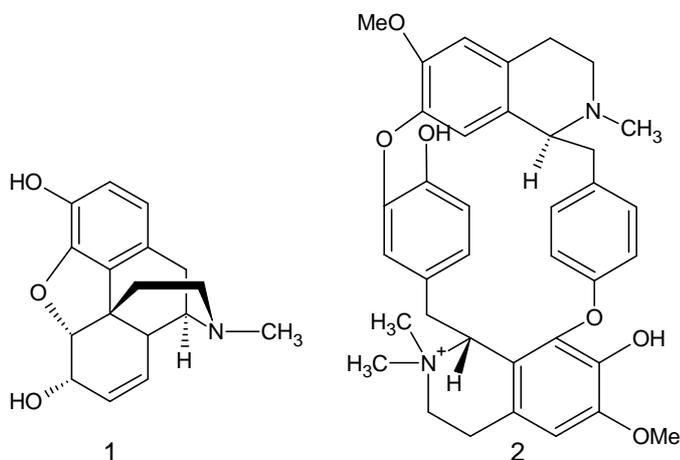
fármacos derivados de produtos naturais, devido à sua grande biodiversidade e endemismo. Muitos pesquisadores têm combinado esta informação com uma abordagem etnofarmacológica na descoberta de drogas, de modo a maximizar a chance de sucesso nesta busca (STEPP, 2004).

1.3 Produtos naturais bioativos

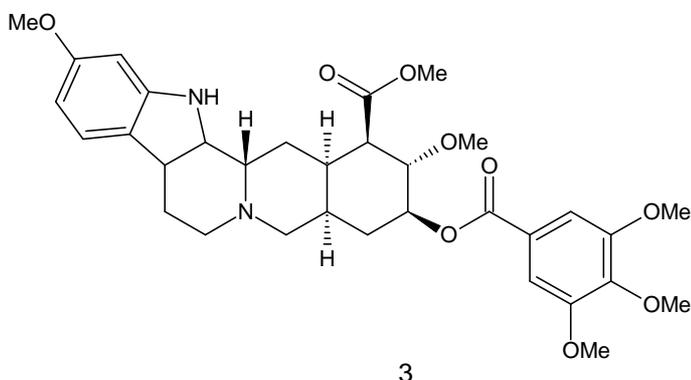
Produtos naturais são entidades químicas selecionadas por pressões evolutivas para interagirem com uma grande variedade de proteínas e outros alvos biológicos com propósitos específicos, e, portanto, diversas dessas substâncias são bioativas e algumas delas resultaram em drogas efetivas para uma variedade de indicações terapêuticas (KOEHN & CARTER, 2005).

O ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum*, tem como constituinte principal a morfina (**1**), isolada e estudada por Séquin e Sertürner no início do século XIX. Estes pesquisadores são considerados pioneiros na busca pela utilização terapêutica de substâncias naturais isoladas (VIEGAS JR *et al*, 2006).

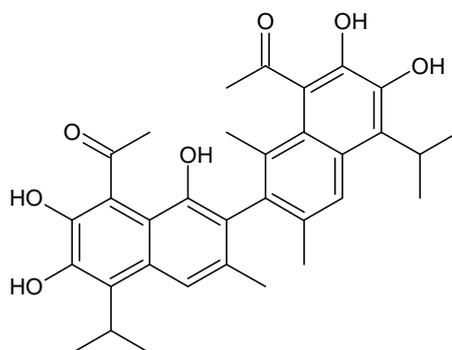
Os curares, venenos utilizados pelos índios da Amazônia em suas flechas para caça e pesca, levaram à identificação de alcalóides importantes como a (+)-tubocurarina (**2**), isolada de *Chondodendron tomentosum* por Boehm, no século XIX. Este alcalóide foi objeto de estudo do primeiro trabalho publicado na área de Química Farmacêutica sobre a relação estrutura química - atividade biológica, em 1869. Ainda hoje, as drogas desenvolvidas a partir dos alcalóides dos curares são amplamente utilizadas como bloqueadores neuromusculares (VIEGAS JR *et al*, 2006).



A reserpina (**3**), um alcalóide indólico extraído de *Rauwolfia serpentina* (L.) Benth. Ex Kurz (Apocynaceae), é um efetivo anti-hipertensivo usado no tratamento de hipertensão leve a moderada em associações com diuréticos e atua reduzindo o nível de catecolaminas no SNC e em outros órgãos (MAGARIAN, 1991; FRASER, 1996; KOEHN & CARTER, 2005).

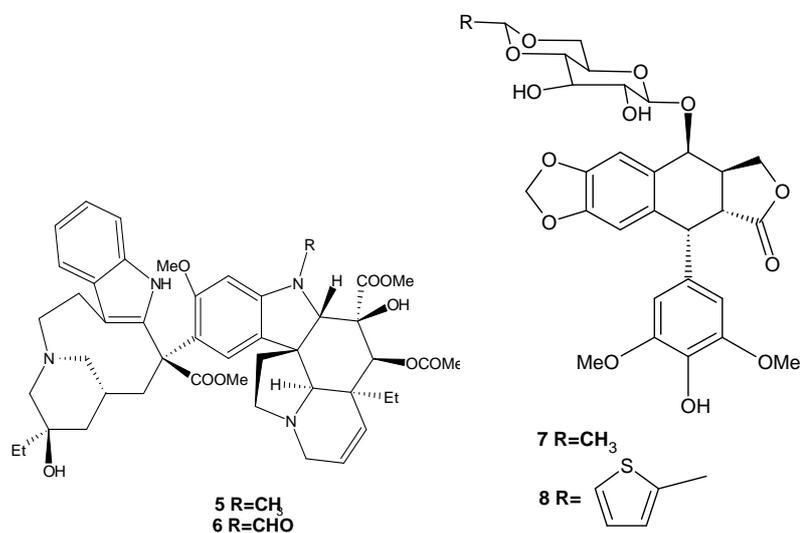


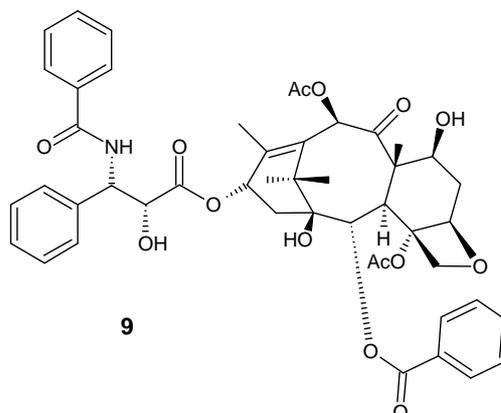
O gossipol (**4**), obtido do óleo de semente de algodoeiro (*Gossypium* sp.), é amplamente utilizado no meio rural da China como contraceptivo masculino, sendo esta propriedade comprovada em 1980 (BARREIRO & FRAGA, 2001).



4

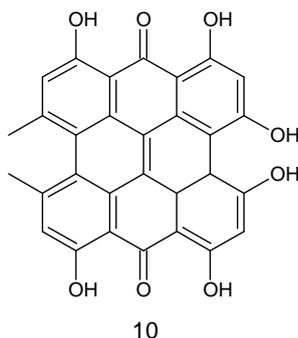
No que diz respeito à terapêutica do câncer, vimblastina (Velban[®], **5**) e vincristina (Oncovin[®], **6**), extraídas de *Cathartus roseus*, etoposídeo (**7**) e teniposídeo (**8**), derivados da podofilotoxina oriunda de *Podophyllum pelatum* e *P. emodi*, e paclitaxel (Taxol[®], **9**), obtido de *Taxus brevifolia*, são importantes fármacos introduzidos na terapêutica nos últimos 20 anos, fundamentais para o renascimento do interesse nos produtos naturais por parte da indústria farmacêutica (VIEGAS JR *et al*, 2006; LEE, 2004).





A hipericina (**10**), isolada de espécies de *Hypericum*, é utilizada como antidepressivo e fitoterápicos à base de *H. perforatum* (erva-de-são-joão) apresentam volumes expressivos de vendas em todo o mundo (TULP & BOHLIN, 2005; VIEGAS JR *et al.*, 2006).

Diversos outros exemplos de PN atualmente utilizados como fitofármacos, ou



que constituíram protótipos para o desenvolvimento de novas drogas, estão disponíveis na literatura. O número de moléculas bioativas já descritas sem perspectiva de utilização terapêutica a médio ou longo prazo é ainda maior.

Grande parte da pesquisa acadêmica atual na área da Fitoquímica concentra-se em estudos biomonitorados visando identificar moléculas ativas frente a diversos alvos biológicos. Neste contexto se insere o presente trabalho, no qual foi realizada a triagem de algumas espécies ocorrentes na Serra do Cipó para atividade antimicrobiana, bem como o estudo fitoquímico de uma delas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo geral

Estudo fitoquímico de uma espécie ocorrente na Serra do Cipó, após triagem preliminar de espécies das famílias Xyridaceae e Melastomataceae, e avaliação *in vitro* das atividades antibacteriana e antifúngica.

1.4.2 Objetivos específicos

- Avaliar *in vitro* as atividades antibacteriana e antifúngica de espécies de Xyris (*X. cipoensis*, *X. longiscapa*, *X. peregrina*, *X. pilosa*, *X. platystachia*, *X. pterygoblephara* e *X. tortula*) e Melastomataceae (*Trembleya laniflora*), ocorrentes na Serra do Cipó.
- Selecionar uma das espécies ativas para estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das frações obtidas e substâncias isoladas.

2.1 A flora brasileira

De acordo com Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)², o Brasil pode ser dividido em sete biomas, a saber, amazônia, caatinga, cerrado, mata atlântica, pampa e pantanal.

O cerrado apresenta fisionomias que englobam formações florestais (cerradão, mata seca e mata ciliar), savânicas (cerrado *strictu sensu*, parque de cerrado e vereda) e campestres (campo sujo, campo limpo e campo rupestre), nas quais ainda há subtipos (FERREIRA, 1980; RIBEIRO & WALTER, 1998; BRANDÃO, 2000).

Esse bioma ocupa aproximadamente 20% do território brasileiro (cerca de 1,8 milhões de km²). Distribuído principalmente no Brasil Central, abrange os estados de Goiás e Tocantins, o Distrito Federal e parte dos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí e Rondônia (RIBEIRO & WALTER, 1998).

Em Minas Gerais, encontram-se áreas de cerrado nas regiões do Alto e Médio Jequitinhonha, Alto e Médio São Francisco, Campo das Vertentes, Zona Metalúrgica, Triângulo e Alto Paranaíba (BRANDÃO, 2000).

Em alguns aspectos, o cerrado apresenta uma cobertura vegetal semelhante, em alguns aspectos, à savana africana, apresentando, entretanto, composição florística peculiar, composta de árvores isoladas, baixas, tortuosas, esgalhadas, geralmente de casca grossa, espessada, gretada, corticosa ou não, de folhas geralmente grandes e coriáceas e de raízes profundas. A parte arbustiva apresenta altura variada; a cobertura subarbustiva-herbácea também é muito diversificada, desaparecendo comumente no período do estio, e rebrotando no início das chuvas (FERREIRA, 1980; BRANDÃO, 2000).

² mapas.ibge.gov.br

2.2 Campos rupestres

No alto da cadeia do Espinhaço, em Minas Gerais e na Bahia, e em algumas partes isoladas das serras de Goiás predomina um tipo de vegetação peculiar, constituindo um ecossistema denominado campo rupestre. Os campos rupestres ocorrem no alto de montanhas, em altitudes superiores a 1.000 m e, em Minas Gerais, estão normalmente rodeados pelo cerrado (GIULIETTI *et al.*, 1997).

A vegetação dos campos rupestres é constituída por uma camada herbácea mais ou menos contínua e por arbustos ou subarbustos dispersos, esclerófilos, sempre verdes, frequentemente com folhas imbricadas ou em roseta, ocorrendo semelhança morfológica em várias famílias (MENEZES & GIULIETTI, 1986).

Cada família de plantas apresenta características anatômicas e morfológicas próprias, que permitem sua sobrevivência mesmo em períodos longos de absoluta carência de água. As folhas em roseta ou decussadas constituem um obstáculo à perda de água (MENEZES & GIULIETTI, 2000).

Algumas famílias, gêneros e espécies são típicos dos solos arenosos ou dos substratos rochosos que formam grande parte dos campos rupestres, ocorrendo frequentemente em grandes e vistosas populações. Destacam-se, entre outras, as famílias Velloziaceae, Eriocaulaceae, Xyridaceae, Asteraceae, Melastomataceae, Lamiaceae, Leguminosae, Rubiaceae, Lythraceae, Myrtaceae, Verbenaceae, Orchidaceae, Bromeliaceae, Cyperaceae e Poaceae. Em locais de drenagem pobre formam-se áreas pantanosas de solo escuro, onde se destacam pequenas espécies das famílias Eriocaulaceae, Xyridaceae, Orchidaceae e Lentibulariaceae, entre outras (MENEZES & GIULIETTI, 2000).

Em razão da pequena área que ocupam e da forte ação do homem através de queimadas, desmatamento e coleta indiscriminada para fins ornamentais, muitas espécies dos campos rupestres estão ameaçadas de extinção e algumas já se encontram extintas (GIULIETTI *et al.*, 1988; MENEZES & GIULIETTI, 2000).

2.3 Serra do Cipó

Uma região de Minas Gerais que se sobressai pela elevada riqueza florística dos campos rupestres é a Serra do Cipó, onde se registrou, em uma área de aproximadamente 200 km², a presença de 1.590 espécies distribuídas em 103 famílias de dicotiledôneas (402 gêneros), 24 famílias de monocotiledôneas (118 gêneros), uma família de gimnospermas, dez famílias de pteridófitas e onze de briófitas. As famílias de dicotiledôneas mais bem representadas são Asteraceae (169 spp.), Leguminosae (107 spp.), Melastomataceae (90 spp), Rubiaceae (47 spp.) e Myrtaceae (45 spp.). Entre as monocotiledôneas, destacam-se as famílias Poaceae (130 spp.), Eriocaulaceae (84 spp.), Orchidaceae (80 spp.), Velloziaceae (58 spp.), Xyridaceae (47 spp.), Bromeliaceae (36 spp.) e Cyperaceae (32 spp.) (GIULIETTI *et al.*, 1987).

A Serra do Cipó é parte de um bioma brasileiro recentemente qualificado como área prioritária para a conservação (MYERS *et al.*, 2000).

O Parque Nacional da Serra do Cipó está localizado na parte central de Minas Gerais, ao sul da Cadeia do Espinhaço, dentro dos municípios de Jaboticatubas, Santana do Riacho, Morro do Pilar e Itambé do Mato Dentro. Sua área total é de 33.800 ha e possui um perímetro de 154 km (CALLISTO *et al.*, 2001).

A vegetação da área é variada, embora seja dominada por cerrado em altitudes inferiores a 1.000 m, e por campos rupestres acima de 1.000 m. A área é muito rica em espécies endêmicas, chegando a 30% do total (CALLISTO *et al.*, 2001).

2.4 O gênero *Xyris*

Este gênero é o maior dentre os cinco pertencentes à família Xyridaceae. É constituído por cerca de 300 espécies distribuídas em regiões tropicais e semitropicais, sendo características de campos rupestres. *Xyris* spp. são monocotiledôneas que, de acordo com o sistema APG, *Angiosperm Phylogeny Group* (BREMER *et al.*, 1998), pertencem ao grupo das Comelinóides. A família

Xyridaceae está posicionada na ordem Poales, com base em dados moleculares (SAJO & RUDALL, 1999).

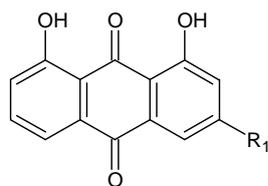
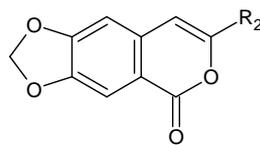
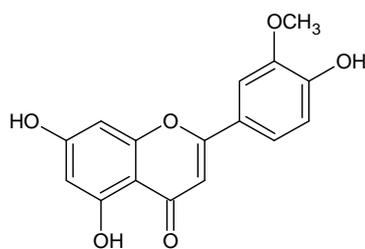
A ocorrência de 152 espécies de *Xyris* foi relatada para o Brasil, e cerca de 90% delas são endêmicas. Um total de 14 espécies ocorre na Serra do Cipó, Minas Gerais (RUANGRUNGSI *et al.*, 1995; SAJO *et al.*, 1997; MYERS *et al.*, 2000; VARANDA *et al.*, 2001).

Xyris são pequenos arbustos e algumas espécies são conhecidas popularmente como sempre-vivas. Algumas delas são coletadas com fins ornamentais. Há relato do uso medicinal, para o tratamento de eczemas e dermatites, das espécies *X. laxifolia* M. (sin. *X. indica* Vell.) e *X. pallida* (PIO CORRÊA & PENNA, 1969). Considerando que não é possível identificar espécies de *Xyris* com base somente em caracteres morfológicos (SAJO *et al.*, 1997), é possível supor que diversas espécies são utilizadas indiscriminadamente pela população, com finalidades medicinais.

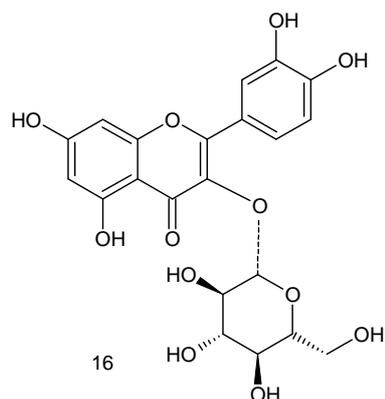
A coleta indiscriminada de *Xyris* spp. tem levado algumas espécies ao risco de extinção (MENEZES & GIULIETTI, 2000). Segundo classificação da “Lista vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais”, *X. cipoensis* e *X. platystachia* encontram-se em “perigo de extinção”, devido à distribuição restrita e coleta predatória experimentada por elas (MENDONÇA & LINS, 2000).

A química e as atividades biológicas de espécies do gênero *Xyris* são muito pouco conhecidas. O estudo fitoquímico de *X. semifuscata* levou à identificação de duas antraquinonas, crisazina (**11**) e 3-metoxi-crisazina (**12**) (FOURNIER *et al.*, 1975). As xiridinas A (**13**) e B (**14**) foram isoladas de *X. indica* (RUANGRUNGSI *et al.*, 1995).

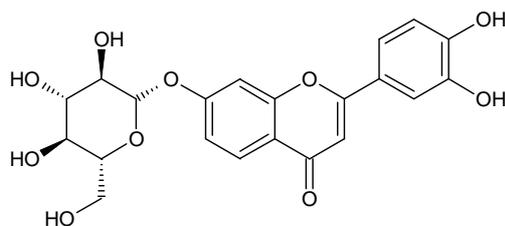
Flavonóides também foram obtidos de espécies de *Xyris*, a saber, crisoeriol (**15**) de *X. itatiayensis*, ramnocitrina-3-O-glicosídeo (**16**) de *X. longiscapa*, e luteolina-7-β-D-glicopiranosídeo (**17**) de *X. itatiaiensis*, *X. longiscapa* e *X. obtusiuscula* (VARANDA *et al.*, 2001).

11 R₁=H12 R₁=OMe13 R₂= CH₂CH₂CH₃14 R₂= COCH₂CH₃

15

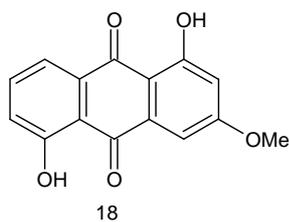


16



17

De *X. pilosa* foram isolados 3-metoxi-crisazina (**12**) e 1,5-dihidroxi-3-metoxiantraquinona (**18**). Ambas as substâncias foram ativas contra *Fusarium oxysporum*, quando avaliadas pelo método de bioautografia direta (COTA *et al.*, 2004).



18

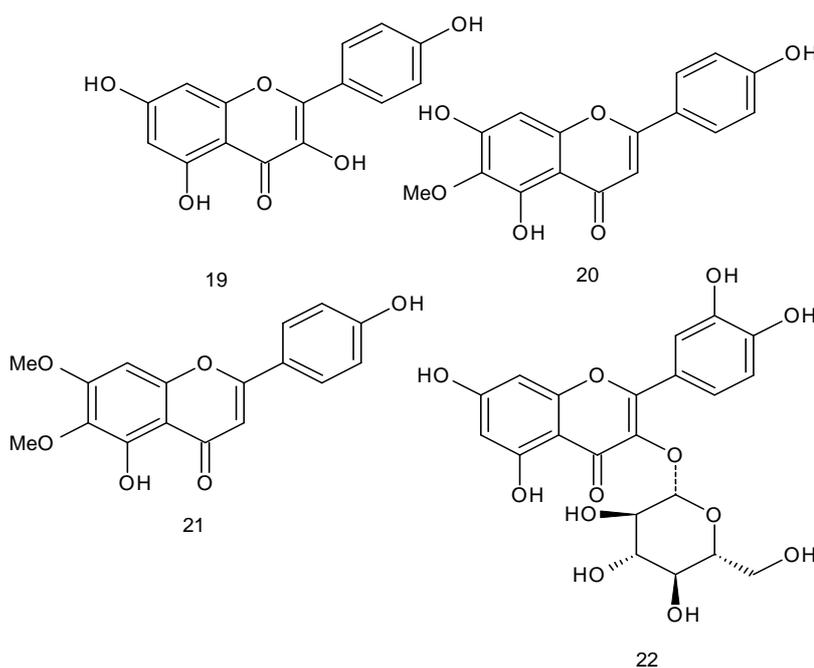
2.5 O gênero *Trembleya*

A família Melastomataceae é constituída por cerca de 200 gêneros, com 4000 espécies descritas, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (HASS & POSER, 1990). O gênero *Trembleya* é o maior da tribo Microliceae e possui muitas espécies nativas no Brasil. Diversas delas ocorrem em campos rupestres e são, na sua maioria, arbustos ou pequenas árvores (BOMFIM-PATRÍCIO *et al.*, 2001).

Em Minas Gerais, algumas espécies de *Trembleya* apresentam riscos variados de extinção. Segundo MENDONÇA & LINS (2000), *T. calycina* Cham. e *T. pityoides* Cham. encontram-se provavelmente extintas, enquanto *T. chamissoana* Naudin foi classificada como em situação vulnerável.

Um extenso estudo quimiotaxonômico foi realizado com três gêneros da família Melastomataceae, incluindo *Trembleya*. Nesse trabalho, diversos flavonóides foram identificados no gênero, incluindo apigenina (**19**) (*T. pentagona*), hispidulina (**20**) (*T. diffusa*), cirsimaritina (**21**) (*T. chamissoana*) e quercetina-3-O-glicosídeo (**22**) (*T. laniflora*) (BOMFIM-PATRÍCIO *et al.*, 2001, VENTURA *et al.*, 2007).

Os extratos etanólicos de *T. laniflora* (caule e folhas) apresentaram atividade *in vitro*, contra *M. luteus* e *S. aureus*, avaliados no ensaio de difusão em ágar, sendo esta a única atividade biológica já relatada para espécies de *Trembleya* (COTA *et al.*, 2002).



2.6 Extratos vegetais e fitoconstituintes com atividade antimicrobiana

Mais de um terço da população mundial sofre ou já sofreu de algum tipo de infecção provocada por bactérias patogênicas e, todos os anos, aproximadamente 2 milhões de óbitos são causados por infecções bacterianas (MONAGHAN & BARRET, 2006).

Infecções humanas fúngicas, especialmente as que envolvem as superfícies da pele e das mucosas, também são um sério problema, principalmente em países subdesenvolvidos de clima tropical e semitropical. Fungos dermatófitos e algumas espécies de *Candida* são os patógenos mais freqüentemente associados a estes problemas (GURGEL *et al*, 2005).

A resistência aos agentes antimicrobianos vem crescendo rapidamente e está se tornando um problema global. Dos dois milhões de casos de infecções bacterianas registradas anualmente em hospitais americanos, aproximadamente 70% envolvem cepas que são resistentes a pelo menos um antibiótico (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Modificações estruturais nos antimicrobianos para os quais foi desenvolvida resistência são realizadas, na tentativa de prolongar a vida útil de suas classes terapêuticas. No entanto, apesar do esforço de pesquisa dispendido nessa área, as alterações estruturais realizadas no leque atual de drogas antimicrobianas dificilmente resultam em aumento significativo de atividade, sendo necessário o desenvolvimento de novas classes, estruturalmente distintas das atuais, e com novos sítios e mecanismos de ação (CUSHNIE & LAMB, 2005).

Muito antes da descoberta de existência de microrganismos, a idéia de que certas plantas possuíam um potencial curativo já era aceita e, desde a antigüidade, tais plantas eram utilizadas no tratamento de doenças infecciosas (RÍOS & RECIO, 2005).

Apesar de fontes vegetais não terem gerado antibióticos clinicamente relevantes até o presente, muitos extratos brutos, frações e produtos naturais isolados de plantas apresentam atividade antimicrobiana significativa quando avaliados em modelos *in vitro* e *in vivo*. Há, ainda, aqueles que possuem um efeito sinérgico quando associados a antibióticos já conhecidos. Essas propriedades geram novas perspectivas para o tratamento de doenças infecciosas, principalmente

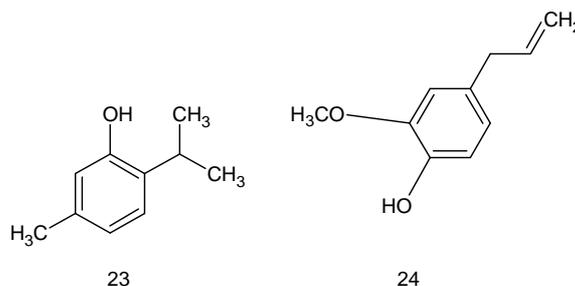
aquelas causadas por bactérias multirresistentes, justificando, portanto, a pesquisa de espécies utilizadas tradicionalmente para o tratamento de infecções microbianas. (NASCIMENTO *et al*, 2000; DUARTE *et al.*, 2005; SINGH & BARRET, 2006).

Existem diversos exemplos que ilustram o que foi mencionado anteriormente. Extratos hidroalcoólicos (1:1) de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Syzygium cumini* (jambolão), *Punica granatum* (romã) e *Ocimum basilicum* (manjerição) apresentam atividade, pelo método clássico de difusão em ágar, frente a *Pseudomonas aeruginosa* resistente a 19 antibióticos (NASCIMENTO *et al*, 2000).

Pycnogenol[®] é um extrato padronizado de cascas de *Pinus pinaster* Ait., constituído por procianidinas monoméricas e oligoméricas, e ácidos fenólicos derivados dos ácidos benzóico e cinâmico. Este produto, usado terapeuticamente como antioxidante, apresentou CIM *in vitro* de 20µg/ml frente a *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*, e de 30µg/ml contra *Clostridium perfringens* (TORRAS *et al*, 2005).

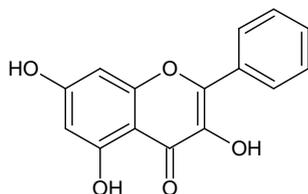
Os óleos essenciais de *Thymus eriocalyx* e de *T. x-porlock*, cujo principal componente é o timol (**23**), apresentam concentração inibitória mínima (CIM) frente ao *Aspergillus niger*, em ensaios *in vitro*, de 125 e 250µg/ml, respectivamente (RASOOLI *et al*, 2006).

O eugenol (**24**), um composto fenólico extraído do óleo essencial de cravo-da-índia, apresenta CIM de 20 µg/ml frente a *Klebsiella pneumoniae* 10 µg/ml frente a *Shigella* spp. e *Proteus* spp., todos resistentes a antibióticos. Além disso, a adição de 5 µg/ml de eugenol a soluções à 50 µg/ml de tetraciclina, ampicilina e cloranfenicol torna tais concentrações ativas, o que não é observado para as mesmas soluções sem a presença do eugenol, caracterizando sinergismo entre eles (NASCIMENTO *et al*, 2000).

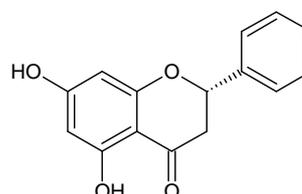


Os flavonóides são compostos que vêm despertando interesse no que diz

respeito à atividade antimicrobiana. O própolis, cujo uso contra doenças infecciosas é relatado até no Antigo Testamento, tem sua atividade antimicrobiana atribuída ao seu elevado teor de flavonóides, principalmente a galangina (**25**) e a pinocembrina (**26**) (GRANGE & DAVEY, 1990; HEGAZI *et al*, 2000; CUSHNIE & LAMB, 2005).

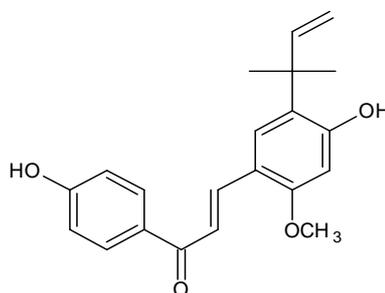


25



26

A atividade antibacteriana de chalconas também vem sendo frequentemente relatada. Seus efeitos antibacterianos são atribuídos à habilidade da carbonila α,β -insaturada sofrer uma adição conjugada de grupos nucleofílicos, como um grupo tiol de uma proteína essencial. A licochalcona A (**27**) apresentou CIMs entre 2 e 15 $\mu\text{g/ml}$ frente a bactérias Gram positivas, incluindo bactérias formadoras de esporos, como *Bacillus coagulans*, *B. subtilis* e *B. stearothermophilus*, assim como *Clostridium sporogenes* (8 $\mu\text{g/ml}$), e bactérias produtoras de toxinas, como *B. cereus* (3 $\mu\text{g/ml}$). Esta chalcona ainda foi efetiva contra *Lactobacillus acidophilus* e *L. plantarum*, ambos com CIM igual a 5 $\mu\text{g/ml}$, assim como *Enterococcus faecalis* e *E. faecium*, ambos com CIM igual a 6 $\mu\text{g/ml}$. Quando ensaiada frente a *Streptococcus lactis* e *Staphylococcus mutans*, a licochalcona A apresentou CIM de 8 e 5 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente (TSUKIYAMA *et al*, 2002; NOWAKOWSKA, 2006).



27

2.7 Métodos para determinação da atividade antimicrobiana

2.7.1 Difusão em ágar

No método de difusão em ágar ocorre a difusão da substância ensaiada em um meio de cultura sólido, inoculado com o microrganismo contra o qual a substância está sendo testada. A atividade antimicrobiana, caso ocorra, é detectada pela formação de um halo de inibição, onde não há crescimento microbiano. Este efeito é mensurável e o diâmetro do halo é expresso em milímetros. É um método mais simples que as técnicas de diluição (BERGUE & VLIETINCK, 1991).

Para a aplicação da amostra nas placas pode-se utilizar discos estéreis de papel, cilindros de aço inoxidável, alumínio e porcelana, ou pode-se perfurar o meio de cultura, obtendo-se orifícios (BERGUE & VLIETINCK, 1991).

O uso de discos de papel estéreis é ideal para se testar extratos e compostos solúveis em solventes orgânicos, bastando, para tanto, evaporar o solvente dos discos antes que estes sejam colocados nas placas. Nesse método, a substância ensaiada não precisa ser estéril. Uma outra vantagem é que o volume de solução necessário para saturar o disco é muito pequeno, apenas 20 μ l (GAVIN, 1957; BERGUE & VLIETINCK, 1991).

No entanto, esse método apresenta como inconveniente a sensibilidade inferior aos métodos de orifícios e cilindros e, também, possibilidade de precipitação de substâncias, que pode alterar sua difusão no ágar (GAVIN, 1957; BERGUE & VLIETINCK, 1991).

Variáveis como pH das soluções e meios de cultura, densidade dos inóculos, tempo e temperatura de incubação dos microrganismos devem ser controlados, visando padronizar os experimentos e diminuir sua interferência nos resultados (COLE, 1994; GAVIN, 1957).

2.7.2 Microdiluição

Como alternativa ao método de difusão em ágar, a técnica mais frequentemente usada para avaliação da atividade antimicrobiana é a diluição serial dos extratos em tubos de ensaio contendo meio de cultura, inoculado com o microrganismo teste. A concentração inibitória mínima (CIM) é determinada pela ausência de turbidez nos tubos, ou seja, pela ausência de crescimento microbiano. Porém, esta técnica requer quantidades relativamente grandes de amostra e, por isso, tem aplicação limitada em fracionamentos biomonitorados (ELOFF, 1998).

O método de microdiluição pode ser usado para avaliar quantitativamente a atividade antimicrobiana de uma substância frente a um microrganismo isolado. Para realizar o ensaio, uma série de placas é preparada com um meio de cultura líquido, onde diferentes concentrações da substância a ser avaliada são adicionadas. As placas são inoculadas com uma suspensão padronizada do microrganismo e, após o período de incubação, o crescimento microbiano é analisado e a CIM e/ou CI_{50} (concentração inibitória de 50% dos microrganismos) é determinada (NCCLS M7-A5, 2000).

A técnica pode ser usada, com sucesso, para comparar a atividade de diferentes extratos, para determinar a atividade de frações obtidas por diferentes técnicas de separação (partição, percolação, cromatografia em coluna de sílica ou HPLC), e para determinar a atividade de substâncias isoladas (ZGODA & PORTER, 2001; ELOFF, 1998).

O método é robusto, de baixo custo, produz resultados reprodutíveis, é até 30 vezes mais sensível que outros métodos descritos na literatura, requer uma quantidade pequena das amostras, diversas amostras podem ser avaliadas simultaneamente, não requer grande treinamento do analista, os resultados são registrados pelo equipamento e o tempo de execução é curto (ELOFF, 1998).

Na técnica de microdiluição, utilizam-se sais de tetrazólio como reagentes colorimétricos, para detecção dos resultados. Estes são frequentemente usados para indicar atividade biológica porque agem como aceptores de hidretos e são reduzidos a produtos coloridos por organismos biologicamente ativos (Figura 1) (ELOFF, 1998; TWENTYMAN & LUSCOMBE, 1987).

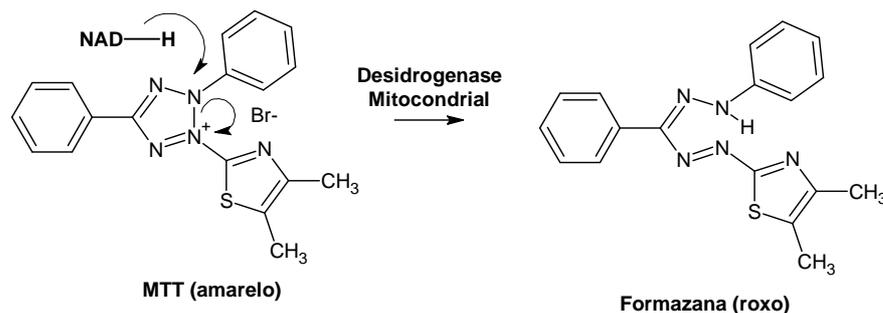


Figura 1 – Reação de redução do MTT a formazana.

2.8 Microrganismos utilizados em ensaios no presente trabalho

Os bacilos Gram-positivos formadores de esporos são constituídos pelos gêneros *Bacillus* e *Clostridium*. O gênero *Bacillus* inclui grandes bastonetes Gram-positivos aeróbios. A maioria das espécies desse gênero são saprófitas, encontradas no solo, água, ar e vegetação, tais como *B. cereus* e *B. subtilis*. Alguns são patógenos de insetos. Em determinadas circunstâncias, esses microrganismos podem produzir doenças em seres humanos imunocomprometidos, causando meningite, endocardite, endoftalmite, conjuntivite ou gastroenterite aguda (JAWETZ, 2000).

Os dermatófitos constituem um grupo de fungos que, em vida parasitária, têm a capacidade de invadir tecidos queratinizados de humanos e outros animais, causando infecções denominadas dermatofitoses. As dermatofitoses, cujos agentes etiológicos pertencem aos gêneros *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, constituem um dos grupos de infecções fúngicas mais freqüentes na prática dermatológica. Condições climáticas favoráveis à implantação das mesmas são observadas em diversas regiões do Brasil. A maioria dessas infecções encontra-se primariamente concentrada em regiões tropicais, onde persiste um clima quente e úmido, constituindo problema de saúde pública (SIQUEIRA *et al*, 2006; MURRAY *et al*, 1995).

S. aureus é frequentemente encontrada na pele, nas mucosas, nas vias aéreas superiores e, às vezes, na boca, intestino, glândulas mamárias e trato urinário. É responsável por doenças de pele como furúnculos, celulite bacteriana e impetigo. Pode causar infecções mais profundas como bacteremia, pneumonia,

osteomielite, endocardite aguda, miocardite, pericardite, cervicite, meningite, abscessos do músculo e do trato urogenital (MURRAY *et al*, 1995).

P. aeruginosa é responsável por foliculites e otites adquiridas em piscinas, por lesões na córnea devido ao uso de lentes de contato contaminadas, por osteomielites em crianças, endocardites por usuários de drogas intravenosas, infecções pulmonares crônicas em pacientes com fibrose cística, e é o principal agente causador de infecções respiratórias hospitalares (MURRAY *et al*, 1995).

Leveduras do gênero *Candida* causam infecções superficiais que lesam a pele, boca, garganta e genitais, conhecidas como candidíases. *C. albicans* é a espécie mais frequentemente isolada do trato gastrointestinal do homem (CARDENAS *et al*, 1999).

A. niger é um fungo de distribuição ubíqua, sendo encontrado no solo, na água, no ar e no homem. Pode causar aspergilose, doença caracterizada por nódulos pulmonares, tosse, hemoptise (expectoração de sangue), dispnéia, perda de peso, fadiga, dor torácica, podendo afetar até o SNC. Espécies de *Aspergillus* produzem aflatoxinas, substâncias carcinogênicas que contaminam alimentos, sendo um sério risco para a saúde (RASOOLI *et al*, 2006).

3.1 Equipamentos

- ❖ Agitador de tubos Marconi MA 162.
- ❖ Aparelho de ponto de fusão MQAPF -301, Microquímica.
- ❖ Aparelho de Ahdehauer.
- ❖ Autoclave Phoenix, modelo AV 50.
- ❖ Balança analítica Mettler Toledo modelo AB204.
- ❖ Balança semi-analítica Núcleo.
- ❖ Banho de ultra-som Thornton, modelo T14.
- ❖ Banho-maria para sorologia e inativação Fanem, modelo 100.
- ❖ Bomba de vácuo Fabbe.
- ❖ Capela de fluxo laminar Veco, modelo VLF 512, com luz germicida.
- ❖ Capela para exaustão de vapores Engelab.
- ❖ Centrífuga Fanem, modelo 205N.
- ❖ Chapa aquecedora e agitadora Corning, modelo V-092.
- ❖ Despertador digital Herweg, modelo 2504.
- ❖ Espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo Lambda 20.
- ❖ Espectrofotômetro de RMN Bruker Avance DRX 400.
- ❖ Espectrofotômetro IV Shimatzu, modelo IR-400.
- ❖ Espectrofotômetro Perkin Elmer, modelo FT-IR.
- ❖ Estufa para cultura bacteriológica Fanem, modelo 502A/4.
- ❖ Estufa ventilada para secagem de material vegetal Fanem, modelo 501A.
- ❖ Evaporador rotativo Büchi, modelo 480.
- ❖ Lâmpada UV Spectroline, modelo 997 C (254 e 366nm).
- ❖ Leitor de ELISA Bio-Rad, modelo 550.
- ❖ Medidor de pH Marconi, modelo PA200.
- ❖ Microcentrífuga Cientec, modelo 14000D.
- ❖ Micropipetas Oxford, volume ajustável de 200 µl -1 ml.
- ❖ Micropipetas Transferpette- Brand, volume ajustável de 5-50 µl, e de 20 a 200 µl.
- ❖ Moinho de facas Marconi, modelo 6294.

- ❖ Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Merck-Hitachi, constituído de injetor automático, modelo AS-2000A; detector UV-VIS, modelo L-4250, bomba modelo L-6200A; integrador, modelo C-R4A.
- ❖ Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Waters, constituído de injetor automático, modelo 2695; detector UV-*photo diode array* (DAD), modelo 2996.
- ❖ Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência, Shimadzu, constituído de sistema de controle de bomba, modelo SCL-8 A; detector UV-VIS, modelo SPD-6AV, bombas modelo LC-8 A; integrador, modelo C-R4A.
- ❖ Sistema de filtração de água Milli-Q, Milli-Q Plus.
- ❖ Soprador serigráfico Sternel, modelo HL 500.

3.1.1 Reagentes e material de consumo

- ❖ Acetato de etila P.A., Quimex.
- ❖ Acetato de sódio cristalino P.A., Merck.
- ❖ Acetona P.A., Quimex.
- ❖ Acetonitrila, grau HPLC, Merck.
- ❖ Ácido acético glacial P.A., Merck.
- ❖ Ácido bórico P.A., Reagen.
- ❖ Ácido clorídrico P.A., Merck.
- ❖ Ácido sulfúrico P.A., Quimex.
- ❖ Álcool etílico 96 °GL e absoluto, Quimex.
- ❖ Álcool isopropílico P.A., Quimex.
- ❖ Anisaldeído, Sigma.
- ❖ Cloranfenicol, Sigma.
- ❖ Cloreto de alumínio, Riedel.
- ❖ Cloreto de sódio, ACS.
- ❖ Cloreto férrico, Ecibra.
- ❖ Clorofórmio P.A., Quimex.

- ❖ Coluna cromatográfica Lichrospher 100 RP-18 (partículas de 5 μm , 250 x 4 mm, d.i.), Merck.
- ❖ Colunas cromatográficas de vidro de tamanhos variados.
- ❖ Cromatofolhas (AI) de sílica gel 60, Merck.
- ❖ Cubas cromatográficas.
- ❖ Diclorometano P.A., Quimex.
- ❖ Discos de papel estéreis.
- ❖ Frascos Ependorff, Sigma.
- ❖ Hexano P.A., Quimex.
- ❖ Hidróxido de sódio P.A., Quimex.
- ❖ Metanol, grau HPLC, Merck.
- ❖ Microplacas de poliestireno TPP-PE, 96 poços, fundo chato.
- ❖ Pistola de secagem Pyrex, 800 ml.
- ❖ Placas de Petri, em vidro, dimensões de 90 x 20 mm.
- ❖ Ponteiras, Corning.
- ❖ SephadexTM LH-20, GE Healthcare Life Sciences.
- ❖ Sílica gel 60G para CCD, Merck.
- ❖ Sílica gel para coluna (70-230 mesh), Merck.
- ❖ Sulfato de sódio anidro P.A., Quimex.
- ❖ Tritisol tampão pH 4,00, Merck.
- ❖ Tritisol tampão pH 7,00, Merck.
- ❖ Tubos de ensaio, em vidro, dimensões de 15 x 180 mm.
- ❖ Vials para HPLC com tampas e septos de silicone e politetrafluoretileno, Merck.

3.1.2 Soluções e meios de cultura utilizados nos ensaios microbiológicos

❖ **Ágar antibiótico n.º 1, Merck.**

Composição (g/l):	Extrato de carne	1,5
	Extrato de levedura	3,0
	Peptona de caseína	4,0
	Peptona de carne	6,0
	D (+) glicose	1,0
	Ágar-ágar	15,0

❖ **Salina peptonada**

Composição (g%):	Cloreto de sódio	0,9
	Peptona bacteriológica	0,1

❖ **Ágar Sabouraud dextrosado, Merck.**

Composição (g/l):	Peptona	10,0
	D(+) glicose	40,0
	Ágar-ágar	15,0

❖ **Caldo Mueller-Hinton Broth (MHB), Merck.**

Composição (g/l):	Infuso de carne	2,0
	Caseína	17,5
	Amido	1,5

❖ **Ágar nutriente**

Composição (g/l):	Peptona bacteriológica	5,0
	Extrato de carne	3,0
	Ágar-ágar	15,0

❖ Meio para congelamento de sais minerais e glicerol

Composição (g/l):	Proteose peptona	13,5
	Fosfato de potássio dibásico anidro	3,6
	Fosfato de potássio monobásico	0,90
	Cloreto de sódio	4,5
	Glicerina P.A.	90 ml

Todos os meios de cultura foram preparados de acordo com as instruções dos fabricantes, esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos, e conservados em geladeira a 4 °C por até 7 dias.

3.1.3 Soluções reveladoras para cromatografia em camada delgada**Reagente de Liebermann-Buchard (WAGNER *et al.*, 1984)**

Adicionaram-se 5 ml de anidrido acético e 5 ml de ácido sulfúrico a 98% v/v a 50 ml de álcool etílico absoluto, sob resfriamento. A solução foi preparada extemporaneamente.

Anisaldeído (WAGNER *et al.*, 1984)

Misturaram-se 0,5 ml de anisaldeído, 10 ml de ácido acético glacial, 85 ml de metanol e 5 ml de ácido sulfúrico a 98% v/v, nesta ordem, sob resfriamento. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 4 °C.

Sulfato cérico (MORITA & ASSUMPÇÃO, 1972)

Adicionaram-se 6 g de sulfato cérico e 20 ml de ácido sulfúrico a 98% v/v a 200 ml de água destilada. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 4 °C.

Cloreto de alumínio a 1% (WAGNER *et al.*, 1984)

Dissolveu-se 1 g de cloreto de alumínio em 100 ml de álcool etílico, sob resfriamento. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 4 °C.

Reagente de Dragendorff (WAGNER *et al.*, 1984)

Dissolveu-se 0,85 g de nitrato básico de bismuto em 40 ml de água destilada e 10 ml de ácido acético glacial, seguido da adição de 8 g de iodeto de potássio previamente dissolvidos em 20 ml de água destilada. A solução foi armazenada, até o momento de uso, a 4 °C.

3.1.4 Reagentes aditivos para espectrometria no ultravioleta**Solução de hidróxido de sódio a 2,5% p/v (MABRY *et al.*, 1970)**

Dissolveram-se 2,5 g de hidróxido de sódio em 100 ml de metanol, sob resfriamento. Armazenou-se a 4 °C por, no máximo, 6 meses.

Solução de cloreto de alumínio a 5% (MABRY *et al.*, 1970)

Dissolveram-se 5 g de cloreto de alumínio em 100 ml de metanol, sob resfriamento. Armazenou-se a 4 °C por, no máximo, 6 meses.

Solução de ácido clorídrico a 50% v/v (MABRY *et al.*, 1970)

Adicionaram-se 50 ml de ácido clorídrico a 100 ml de água destilada. Armazenou-se a 4 °C por, no máximo, 6 meses.

Solução saturada de ácido bórico (MABRY *et al.*, 1970)

Saturou-se, a temperatura ambiente, um total de 100 ml de metanol com ácido bórico. Armazenou-se a 4 °C por, no máximo, 6 meses.

3.2 Coleta, identificação e secagem do material vegetal

A coleta e identificação das espécies de *Xyris* em estudo (Tabela 1), bem como de *Trembleya laniflora* (D. Don) Cogn., foi realizada pela equipe de botânicos da Fundação Zoo-Botânica da Prefeitura Municipal de Belo Horizonte (Míriam Pimentel Mendonça, Inês Ribeiro de Andrade e Maria Guadalupe Carvalho Fernandes). As coletas foram realizadas no Parque Nacional da Serra do Cipó e na Área de Proteção Ambiental (APA) do Morro da Pedreira, no município de Santana do Riacho (MG). Todos os pontos de coleta foram demarcados com equipamento de GPS. Exsicatas das espécies coletadas estão depositadas no herbário da Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte (Tabela 1).

Após a coleta, o material vegetal foi lavado em água corrente e submetido à secagem em estufa ventilada, individualmente, à temperatura de aproximadamente 40°C. Após seco, o material vegetal foi pulverizado em moinho de facas.

Tabela 1 – Dados de coleta das espécies em estudo

Família	Espécie	Partes coletadas	Data de coleta	Altitude (m)	Coordenadas
Melastomataceae	<i>Trembleya laniflora</i> (D. Don) Cogn.	Caule e folhas	31/05/00	1180	19°17'35"S 43°35'23"W
	<i>Xyris cipoensis</i> L. B. Sm. & Downs	Aéreas	10/08/99	1326	19°15'28"S 43°33'11"W
	<i>Xyris longiscapa</i> Alb. Nilss.	Aéreas	26/05/99	1320	19°14'51"S 43°30'42"W
	<i>Xyris peregrina</i> Malme	Aéreas	26/04/00	1438	18°15'29"S 43°32'20"W
Xyridaceae	<i>Xyris pilosa</i> Kunth	Aéreas	27/04/00	1180	19°17'35"S 43°35'23"W
	<i>Xyris platystachia</i> Alb. Nilss.	Aéreas	26/04/00	1326	19°15'28"S 43°33'11"W
	<i>Xyris pterygoblephara</i> Kunth.	Aéreas	22/03/00	1320	19°14'51"S 43°30'42"W
	<i>Xyris tortula</i> Mart.	Aéreas	22/03/00	1326	19°15'28"S 43°33'11"W

3.3 Preparo dos extratos etanólicos

Os extratos foram preparados por percolação exaustiva do material vegetal pulverizado com etanol 96 °G.L. As soluções etanólicas foram concentradas em evaporador rotatório, à temperatura de aproximadamente 40 °C, e sob pressão reduzida. Os extratos foram transferidos para frascos tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo, por no mínimo 72 horas. Os extratos secos foram pesados e os rendimentos em extrativos foram calculados (Tabela 2).

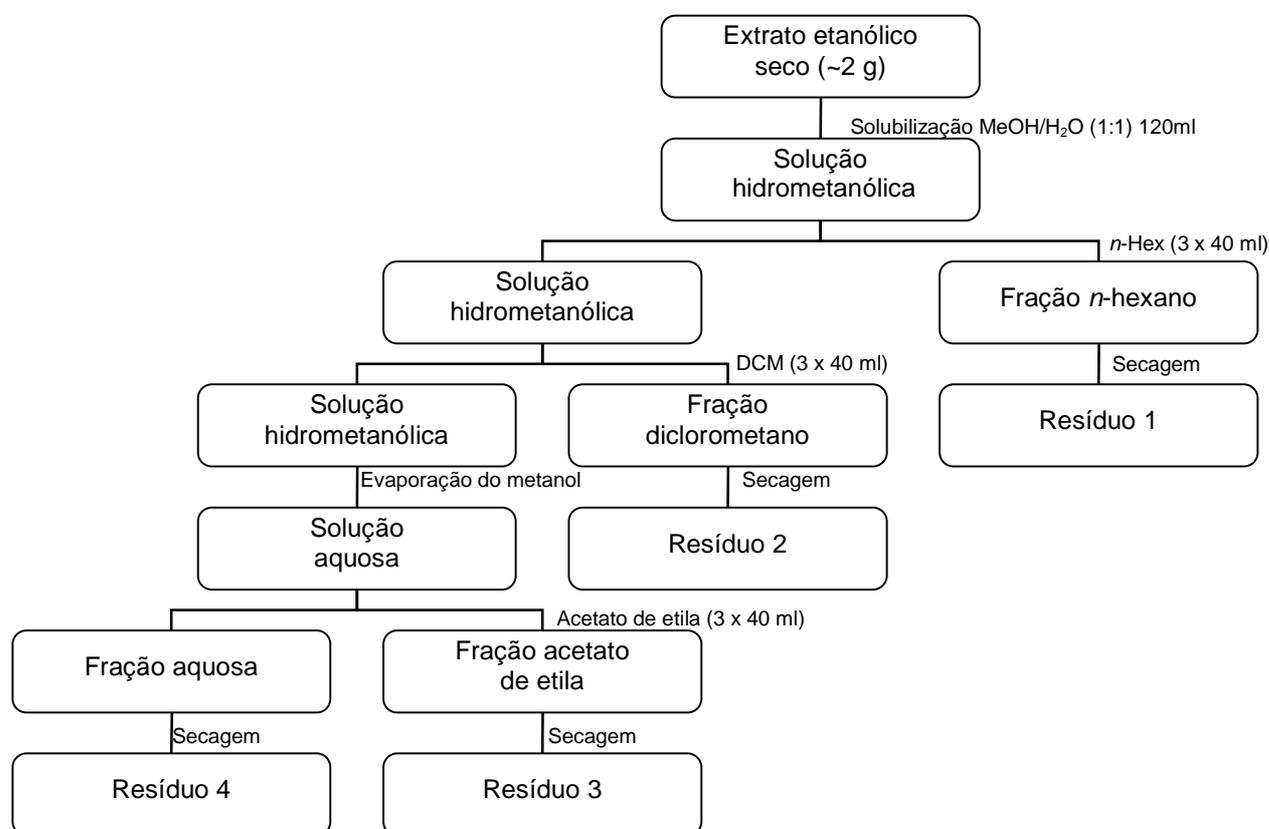
Tabela 2 – Rendimentos dos extratos etanólicos obtidos por percolação exaustiva das espécies vegetais em estudo

Família	Espécie	Parte da planta	Massa do material vegetal (g)	Massa de extrato obtido (g)	Extrativos (%)
Melastomataceae	<i>Trembleya laniflora</i>	folhas	200	28,5	14,2
	<i>Trembleya laniflora</i>	caule	100	15,3	15,3
Xiridaceae	<i>Xyris cipoensis</i>	partes aéreas	65	5,9	9,1
	<i>Xyris longiscapa</i>	partes aéreas	60	17,5	29,2
	<i>Xyris peregrina</i>	partes aéreas	81	11,0	13,6
	<i>Xyris pilosa</i>	partes aéreas	71	3,7	5,2
	<i>Xyris platystachia</i>	partes aéreas	100	15,7	15,7
	<i>Xyris pterygoblephara</i>	partes aéreas	48	7,1	14,8
	<i>Xyris tortula</i>	partes aéreas	57	5,2	9,1

3.4 Fracionamento cromatográfico

3.4.1 Fracionamento preliminar do extrato etanólico de *Xyris pterygoblephara*

O fracionamento preliminar do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* foi realizado por dois métodos diferentes. No primeiro, cerca de 2 g de extrato seco foram solubilizados em 120 ml de uma solução de metanol / água (1:1), em banho de ultrassom. Em seguida, realizou-se a partição seqüencial com solventes imiscíveis, com alíquotas de mesmo volume (3 x 40 ml) de *n*-hexano e diclorometano. A solução hidrometanólica foi, então, reduzida a 50% do volume inicial, por aquecimento, para evaporação do metanol. A solução aquosa restante foi particionada com acetato de etila (3 x 40 ml). Os procedimentos adotados na seqüência de partição estão representados no Fluxograma 1.



Fluxograma 1 – Fracionamento preliminar do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* por partição entre solventes imiscíveis.

As quatro frações resultantes foram secas até resíduo em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperatura máxima de 45 °C. Os resíduos foram transferidos para frascos tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo, até peso constante. As massas das frações obtidas estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3 – Massas das frações resultantes da partição do extrato etanólico de *Xyris pterygoblephara* entre solventes imiscíveis

Espécie vegetal	Massas das frações (mg)				
	<i>n</i> -Hexano	DCM	Acetato de etila	Água	Total
<i>Xyris pterygoblephara</i>	566,9	223,3	244,6	852,1	1886,9

No segundo método de fracionamento preliminar, uma porção do extrato etanólico seco de *X. pterygoblephara* (aproximadamente 5 g) foi extraída com

diclorometano (3 X 20 ml), em banho de ultra-som, obtendo-se duas frações, denominadas de “apolar” (fração diclorometânica) e “polar” (torta). As frações obtidas foram secas até resíduo, em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperatura máxima de 45 °C. Os resíduos foram transferidos para frascos tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo, até peso constante. As massas das frações obtidas se encontram listadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Massas das frações resultantes da extração com diclorometano do extrato etanólico de *Xyris pterygoblephara* com diclorometano

Espécie vegetal	Massas dos resíduos obtidos (mg)		
	Fração apolar (DCM)	Fração polar (resíduo restante)	Total
<i>Xyris pterygoblephara</i>	1699,7	3218,0	4917,7

3.5 Perfis cromatográficos dos extratos e frações por RP-HPLC

3.5.1 Preparo das amostras

Porções dos extratos etanólicos secos (10 mg) e das frações obtidas por partição (5 mg) foram solubilizadas em 1,0 ml de metanol grau HPLC. As amostras foram mantidas em banho de ultra-som por 15 min e, na seqüência, a solução foi centrifugada por 5 min, a 10.000 rpm. Os sobrenadantes obtidos foram utilizados nas análises por RP-HPLC.

3.5.2 Condições cromatográficas

- ❖ Eluição em gradiente de água (A) e acetonitrila (B): 0 min 90% A, 10% B; 65 min 10% A, 90% B; 70 min 10% A, 90% B; 80 min 90% A, 10% B; 85 min 90% A, 10% B.
- ❖ Coluna: Lichrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm, d.i.), com partículas de 5 µm de diâmetro.
- ❖ Temperatura: 40 °C.
- ❖ Detecção: UV 210 nm e 254 nm.
- ❖ Concentração das amostras: extratos, 10,0 mg/ml; frações 5,0 mg/ml.
- ❖ Fluxo: 1,0 ml/min.
- ❖ Volume injetado: variável, entre 10,0 e 20,0 µL. As amostras foram injetadas de modo automático.

Em todas as análises foi utilizada acetonitrila grau HPLC e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q. O ar dos eluentes foi retirado por sonicação durante 30 minutos, com auxílio de vácuo.

3.6 Fracionamento da fração em *n*-hexano

3.6.1 Refracionamento da fração em *n*-hexano por cromatografia em coluna de sílica gel (CCS)

Inicialmente, 547,4 mg da fração (item 3.4.1) foram incorporados em 2,74 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm; Merck), sendo depositados no topo de uma coluna com 40 cm de altura e 1,5 cm de diâmetro interno, empacotada com 16,4 g de sílica-gel.

Procedeu-se, então, à eluição com solventes de polaridade crescente e suas respectivas misturas (Tabela 5). Foram recolhidas 246 frações, com volumes variáveis

entre 50 e 550 ml. Estas foram reunidas de acordo com seus perfis por CCD de sílica-gel, resultando num total de 22 frações (Tabela 5).

Tabela 5 – Refracionamento da fração em *n*-hexano do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* por CCS

Fração	Eluente	Volume (ml)	Massa (mg)
1	<i>n</i> -hex	300	10,5
2	<i>n</i> -hex/DCM (85:15)	200	18,2
3	<i>n</i> -hex/DCM (80:20)	350	2,4
4	<i>n</i> -hex/DCM (75:25)	50	0,8
5	<i>n</i> -hex/DCM (75:25)	50	1,7
6	<i>n</i> -hex/DCM (70:30)	50	1,3
7	<i>n</i> -hex/DCM (70:30)	200	4,2
8	<i>n</i> -hex/DCM (70:30)	150	2,6
9	<i>n</i> -hex/DCM (65:35)	300	14,0
10	<i>n</i> -hex/DCM (65:35)	60	38,5
11	<i>n</i> -hex/DCM (10:90)	525	205,5
12	<i>n</i> -hex/DCM (05:95)	75	4,5
13	DCM	100	42,9
14	DCM/EtOAc (95:05)	150	8,1
15	DCM/EtOAc (9:1)	50	8,8
16	DCM/EtOAc (55:45)	550	44,1
17	DCM/EtOAc (25:75)	300	9,8
18	DCM/EtOAc (05:95)	200	13,0
19	EtOAc/MeOH (95:05)	50	6,8
20	EtOAc/MeOH (65:35)	550	28,6
21	EtOAc/MeOH (55:45)	150	3,0
22	MeOH	100	8,7
Total	-	4510	478,0

3.6.2 Purificação da fração 10 por HPLC em escala preparativa

A fração 10, resultante do refracionamento da fração *n*-hexano por CCS (item 3.6), foi purificada por HPLC em escala preparativa.

Condições cromatográficas:

- ❖ Coluna: Shim-pack preparativa de sílica (H) KIT, (250 x 20 mm) n.º 20250044.
- ❖ Eluente: *n*-hexano/diclorometano (35:65).
- ❖ Fluxo: 5 ml/min.
- ❖ Detecção: UV 254 nm.

❖ Injeção: 3 porções de 10 mg e uma porção de 8,5 mg solubilizadas em 1 ml do eluente.

❖ Massa total injetada: 38,5 mg.

Obtiveram-se 9,9 mg de uma substância oleosa, de coloração branca denominada 10P4. A análise de 10P4 por CCD de sílica gel, utilizando-se *n*-hexano/diclorometano (1:9) como eluente, e anisaldeído como revelador, indicou a presença de uma mancha branca majoritária ($R_f = 0,5$) e um contaminante, de coloração avermelhada ($R_f = 0,61$).

3.6.3 Purificação da fração 16 por HPLC em escala preparativa

A fração 16, resultante do refractionamento da fração *n*-hexano por CCS (item 3.6), foi purificada por HPLC em escala preparativa.

Condições cromatográficas:

❖ Coluna: Shim-pack preparativa de sílica (H) KIT, (250 x 20 mm) n.º 20250044.

❖ Eluente: *n*-hexano/clorofórmio (5:95).

❖ Fluxo: 5 ml/min.

❖ Detecção: UV 254 nm.

❖ Injeção: 4 porções de 10 mg solubilizadas em 1 ml do eluente e uma porção de 4,1 mg solubilizada em 0,5 ml do eluente.

❖ Massa total injetada: 44,1 mg.

Obtiveram-se 17,7 mg de um sólido branco, cuja análise por CCD de sílica gel, utilizando-se clorofórmio/acetato de etila (9:1) como eluente, e anisaldeído como revelador, indicou uma mancha majoritária de coloração roxa ($R_f = 0,75$), e um contaminante de coloração castanha ($R_f = 0,33$).

Esse sólido foi posteriormente purificado por filtração em sílica gel, utilizando-se clorofórmio/acetato de etila (9:1) como eluente. Foram, então, obtidos 10,2 mg de um sólido branco, cuja análise por CCD de sílica gel, nas condições anteriormente

descritas, revelou apenas uma mancha roxa ($R_f = 0,75$). O sólido branco, denominado P2A, apresentou faixa de fusão de 163,5 – 165,2 °C.

3.7 Fracionamento da “fração apolar”

3.7.1 Refracionamento da “fração apolar” de *X. pterygoblephara* por CCS

Aproximadamente 1,7 g da “fração apolar”, resultante da extração do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* com diclorometano (item 3.4.1), foram incorporados em 10 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm; Merck). Este material foi depositado no topo de uma coluna de vidro (70 x 2,5 cm) empacotada com 117 g da mesma sílica gel.

Procedeu-se, então, a eluição com solventes de polaridade crescente e suas respectivas misturas (Tabela 6). Foram obtidas 39 frações, com volumes variáveis entre 50 e 300 ml, que foram reunidas de acordo com seus perfis em CCD de sílica gel, resultando num total de 12 frações. Essas foram transferidas para frascos de penicilina previamente tarados e deixadas em dessecador, sob vácuo, até peso constante (Tabela 6).

Tabela 6 - Refracionamento da “fração apolar” do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* por CCS

Fração	Eluente	Volume (ml)	Massa (mg)
1	<i>n</i> -hex	250	7,4
2	<i>n</i> -hex/DCM (9:1)	250	2,5
3	<i>n</i> -hex/DCM (1:1)	650	26,9
4	<i>n</i> -hex/DCM (1:9)	300	133,1
5	DCM/EtOAc (9:1)	500	528,9
6	DCM/EtOAc (8:2)	250	232,9
7	DCM/EtOAc (7:3)	150	84,4
8	DCM/EtOAc (6:4)	150	59,2
9	DCM/EtOAc (1:1)	850	104,0
10	EtOAc/MeOH (1:1)	500	275,9
11	EtOAc/MeOH (2:8)	600	90,7
12	MeOH	1500	47,9
Total	-	5950	1593,8

3.7.2 Purificação da fração 5 por CCS

A fração 5 (528,9 mg), resultante do fracionamento da “fração apolar” do extrato de *X. pterygoblephara* (item 3.8), foi incorporada em 3,1 g de sílica gel (0,063 – 0,200 mm; Merck). O material foi depositado no topo de uma coluna de vidro (40 x 1,5 cm) empacotada com 22,8 g da mesma sílica.

Procedeu-se, então, a eluição com solventes de polaridade crescente e suas respectivas misturas (Tabela 7), com o auxílio de pressão positiva (cromatografia *flash*). Foram coletadas 33 frações com volumes de 16 ml, as quais foram reunidas segundo seus perfis em CCD de sílica gel, resultando em 10 frações. Essas foram transferidas para frascos de vidro previamente tarados, e deixadas em dessecador, sob vácuo, até massa constante (Tabela 7).

Tabela 7 - Refracionamento da Fração 5 por CCS *flash*

Fração	Eluente	Volume (ml)	Massa (mg)
5A	<i>n</i> -hex	32	1,3
5B	<i>n</i> -hex/DCM (8:2)	32	1,8
5C	<i>n</i> -hex/DCM (3:7)	80	1,7
5D	DCM	32	1,4
5E	DCM/EtOAc (7:3)	64	416,2
5F	DCM/EtOAc (1:1)	32	79,3
5G	DCM/EtOAc (1:9)	48	3,7
5H	EtOAc/MeOH (7:3)	64	1,5
5I	EtOAc/MeOH (1:9)	80	4,3
5J	MeOH	64	2,9
Total	-	528	514,1

Em seguida, a fração 5E (416,2 mg) foi recromatografada em coluna de sílica gel. A fração, após incorporada em 2,4 g de sílica gel (0,063 – 0,200 mm; Merck), foi depositada no topo de uma coluna (40 x 1,5 cm) empacotada com 15,9 g da mesma sílica. Utilizou-se a série eluotrópica descrita na Tabela 8, sendo a eluição realizada sob pressão positiva (cromatografia *flash*).

Foram obtidas 26 frações com volumes de 16 ml, que resultaram em 7 frações reunidas após análise por CCD de sílica gel. Estas foram transferidas para frascos de vidro, previamente tarados, e deixadas em dessecador, sob vácuo, até peso constante (Tabela 8).

Tabela 8 - Refracionamento da fração 5E por CCS *flash*

Fração	Eluente	Volume (ml)	Massa (mg)
5E1	<i>n</i> -hex/DCM (1:9)	48	0,8
5E2	DCM	128	395,6
5E3	DCM/EtOAc (8:2)	48	2,3
5E4	DCM/EtOAc (7:3)	16	0,3
5E5	DCM/EtOAc (4:6)	64	0,6
5E6	EtOAc	96	0,1
5E7	EtOAc/MeOH (9:1)	16	15,1
Total	-	416	414,8

Na seqüência, a fração 5E2 (395,6 mg) foi purificada por CCS, utilizando-se 2,3 g de sílica gel (0,040 – 0,063 mm; Merck) para incorporar a amostra, e 15,25 g para empacotar a coluna (40 x 1,5 cm). Utilizou-se eluição isocrática de *n*-hexano/acetona (9:1). Foram coletadas 26 frações, com volumes de 10 ml, reunidas em 7 grupos, após análise dos perfis por CCD de sílica gel (Tabela 9).

Tabela 9 - Refracionamento da fração 5E2 por CCS

Fração	Eluentes	Volumes (ml)	Massa (mg)
5E2A	<i>n</i> -hexano/acetona (9:1)	10	2,3
5E2B	<i>n</i> -hexano/acetona (9:1)	10	9,4
5E2C	<i>n</i> -hexano/acetona (9:1)	10	355,7
5E2D	<i>n</i> -hexano/acetona (9:1)	10	4,2
5E2F	<i>n</i> -hexano/acetona (9:1)	10	5,8
5E2G	<i>n</i> -hexano/acetona (9:1)	10	3,9
5E2H	<i>n</i> -hexano/acetona (9:1)	10	5,6
Total	-	70	386,9

A análise de 5E2C por CCD de sílica gel, utilizando-se *n*-hexano/acetona (85:15) como eluente, e reagente de Dragendorff como revelador, mostrou uma única mancha alaranjada ($R_f=0,35$). Sua análise por RP-HPLC (itens 3.5.1 e 3.5.2), revelou um único pico, com tempo de retenção de aproximadamente 34 minutos. Esta substância apresentou-se como um óleo incolor e viscoso.

3.8 Fracionamento da “fração polar”

3.8.1 Fracionamento da “fração polar” de *X. pterygoblephara* por CCS

Aproximadamente 3,2 da “fração polar”, resíduo resultante da extração do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* com diclorometano (item 3.4.1), foram incorporados em 16 g de sílica gel 60 (0,063 – 0,200 mm; Merck). Este material foi cromatografado em uma coluna de vidro (70 x 2,5 cm) empacotada com 96,5 g da mesma sílica gel.

Procedeu-se, então, à eluição com a série descrita na Tabela 10. Foram obtidas 137 frações, com volumes variáveis entre 150 e 600 ml, que foram reunidas de acordo com seus perfis em CCD de sílica gel e resultaram em 26 frações. Essas foram transferidas para frascos de penicilina previamente tarados e deixadas em dessecador, sob vácuo, até peso constante (Tabela 10).

Tabela 10 - Refracionamento da “fração polar” do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* por CCS

Fração	Eluentes	Volumes (ml)	Massa (mg)
FP1	<i>n</i> -hex/DCM (8:2)	900	12,1
FP2	<i>n</i> -hex/DCM (6:4)	450	44,3
FP3	<i>n</i> -hex/DCM (1:1)	450	40,7
FP4	<i>n</i> -hex/DCM (4:6)	900	92,9
FP5	<i>n</i> -hex/DCM (3:7)	1050	86,8
FP6	<i>n</i> -hex/DCM (1:9)	750	51,8
FP7	DCM	600	89,4
FP8	DCM	300	49,9
FP9	DCM/EtOAc (9:1)	150	52,6
FP10	DCM/EtOAc (9:1)	150	54,1
FP11	DCM/EtOAc (8:2)	600	88,7
FP12	DCM/EtOAc (6:4)	600	77,6
FP13	DCM/EtOAc (1:1)	300	43,8
FP14	DCM/EtOAc (2:8)	900	86,8
FP15	EtOAc	3000	78,1
FP16	EtOAc/MeOH (9:1)	150	61,1
FP17	EtOAc/MeOH (8:2)	600	75,4
FP18	EtOAc/MeOH (7:3)	900	730,8
FP19	EtOAc/MeOH (6:4)	900	101,1
FP20	EtOAc/MeOH (4:6)	900	92,7
FP21	EtOAc/MeOH (2:8)	600	47,2
FP22	EtOAc/MeOH (1:9)	900	98,9
FP23	MeOH	900	84,3
FP24	MeOH	600	74,7
FP25	HAc à 5% em MeOH	1050	112,1
FP26	HAc à 5% em MeOH	1800	465,1
Total	-	20400	2893,2

Na seqüência, as frações FP18 e FP26 foram recromatografadas. Devido a sua complexidade e à elevada polaridade de seus constituintes, o trabalho com a fração FP26 não resultou no isolamento de nenhuma substância.

A fração FP18 (730,8 mg) foi recromatografada em CCS, utilizando-se 3,6 g de sílica gel (0,040 – 0,063 mm; Merck) para incorporar a amostra e 73 g para empacotar a coluna (70 x 1,5 cm). Procedeu-se a eluição com a série descrita na Tabela 11. Foram obtidas 60 frações, com volumes de 17 ml, que foram reunidas de acordo com seus perfis em CCD de sílica gel, resultando em 8 frações. Essas foram transferidas para frascos de penicilina, previamente tarados, e deixadas em dessecador, sob vácuo, até peso constante (Tabela 11).

Tabela 11 - Refracionamento de FP18 por CCS

Fração	Eluentes	Volumes (ml)	Massa (mg)
A	EtOAc	68	1,2
B	EtOAc/MeOH (1:1)	51	8,6
C	EtOAc/MeOH (3:7)	85	3,0
D	MeOH	34	31,4
E	EtOAc/ac. fórmico/ac. acético glacial/acetona (100:11:11:27)	119	66,0
F	EtOAc/ac. fórmico/ac. acético glacial/metanol (100:11:11:27)	476	535,3
G	EtOAc/ac. fórmico/ac. acético glacial/água(100:11:11:27)	374	9,0
H	EtOAc/ac. fórmico/ac. acético glacial/água (100:11:11:27)	204	11,4
Total	-	1411	665,9

Em seguida, a fração F foi recromatografada em Sephadex LH20, em uma coluna de vidro de 70 x 1,5 cm. A amostra foi solubilizada em metanol e centrifugada por 5 minutos, a 10000 rpm. A massa que foi solubilizada e aplicada na coluna foi de 483,2 mg. Utilizou-se metanol como eluente, sendo obtidas 48 frações, com volumes de 17 ml. Essas foram reunidas de acordo com seus perfis em CCD de sílica gel, resultando em 6 frações, que foram transferidas para frascos de penicilina previamente tarados e deixadas em dessecador, sob vácuo, até peso constante (Tabela 12).

Tabela 12 - Refracionamento da fração F em coluna de Sephadex LH20.

Fração	Eluentes	Volumes (ml)	Massa (mg)
F1	MeOH	34	40,7
F2	MeOH	119	50,6
F3	MeOH	136	62,9
F4	MeOH	187	45,1
F5	MeOH	136	53,6
F6	MeOH	204	230,3
Total	-	816	483,2

Na seqüência, a fração F6 foi recromatografada em coluna de Sephadex LH20 (70 x 1,5 cm). A amostra foi solubilizada em metanol e centrifugada por 5 minutos, a 10000 rpm, sendo aplicados na coluna 218 mg (massa solubilizada). Utilizou-se metanol como eluente. Foram obtidas 22 frações (17 ml), que foram reunidas de acordo com seus perfis em CCD de sílica gel, resultando em 2 frações. Essas foram transferidas para frascos de penicilina previamente tarados e deixadas em dessecador, sob vácuo, até peso constante (Tabela 13).

Tabela 13 - Refracionamento da fração F6 em coluna de Sephadex LH20

Fração	Eluentes	Volumes (ml)	Massa (mg)
F6A	MeOH	34	145,7
F6B	MeOH	289	72,3
Total	-	374	218,0

Devido a sua composição complexa, o fracionamento de F6B não levou a nenhum resultado relevante.

A fração F6B (72,3 mg) foi recromatografada em CCS, utilizando-se 360 mg de sílica gel (0,040 – 0,063 mm; Merck) para incorporar a amostra e 7,23 g para empacotar a coluna (40 x 1,5 cm). Procedeu-se a eluição com a série descrita na Tabela 14. Foram obtidas 18 frações, com volumes de 17 ml, que foram reunidas de acordo com seus perfis em CCD de sílica gel, resultando em 3 frações. Essas foram transferidas para frascos de penicilina previamente tarados e deixadas em dessecador, sob vácuo, até peso constante (Tabela 14).

Tabela 14 - Fracionamento de F6B por CCS

Fração	Eluentes	Volumes (ml)	Massa (mg)
B1	EtOAc/MeOH (1:1)	34	34,0
B2	MeOH	68	5,6
B3	MeOH/H ₂ O (1:1)	187	23,5
Total	-	289	63,1

A análise de B2 por CCD de sílica gel, empregando metanol como eluente, e solução etanólica de cloreto de alumínio a 1% como revelador, indicou uma única mancha amarela ($R_f = 0,86$). Esta substância foi obtida como um sólido amorfo amarelo.

3.9 Métodos físicos para caracterização das substâncias isoladas

Os critérios de pureza adotados foram a observação de mancha única em CCD de sílica gel, faixa de fusão (no caso de substâncias sólidas) e análise de cromatograma obtido por RP-HPLC (itens 3.5.1 e 3.5.2).

A elucidação estrutural das substâncias foi feita utilizando-se métodos espectrométricos usuais (UV-VIS, IV, RMN de ^1H e de ^{13}C e EM).

Os espectros de RMN foram obtidos no Departamento de Química, ICEX, UFMG, em equipamento Bruker Avance DRX400, a 25 °C, utilizando-se tetrametilsilano (TMS) como referência interna. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio ou dimetilsulfóxido (DMSO) deuterados.

Os espectros de massas foram gentilmente obtidos pelo Prof. José Maria del Corral, na Faculdade de Farmácia Universidade de Salamanca, Espanha.

Os espectros de IV foram registrados em espectrofotômetro Perkin Elmer FT-IR.

3.10 Ensaios microbiológicos

3.10.1 Microrganismos

a) Bactérias Gram-positivas:

Bacillus subtilis ATCC 19659

Staphylococcus aureus ATCC 25923

b) Bactéria Gram-negativa:

Pseudomonas aeruginosa ATCC 25619

c) Levedura:

Candida albicans ATCC 10231

d) Fungos filamentosos:

Aspergillus niger ATCC 16404

Epidermophyton floccosum

Mycrosporium canis

Tricophyton mentagrophytes

Tricophyton rubrum

As culturas padronizadas foram cedidas pelo Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro; Coleção de Culturas Tropicais (CCT), Fundação André Tosello, Campinas, SP; Laboratório de Biologia Geral, ICB, UFMG; Laboratório de Ecologia e Microbiologia, ICB, UFMG; Laboratório de Controle de Qualidade Biológico, FAFAR, UFMG.

Os fungos dermatófitos (*E. floccosum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*) foram isolados de pacientes do Hospital Soccor, em Belo Horizonte, entre fevereiro e março de 2006, e as suas culturas foram cedidas pelo farmacêutico Fabrizio Resende Guglielmi.

As culturas foram mantidas em geladeira, a 4 °C, com repiques mensais em meios sólidos e líquidos para sua manutenção.

3.10.2 Método de difusão em ágar

Este método foi utilizado nos ensaios com *Bacillus subtilis*, *Epidermophyton floccosum*, *Mycrosporium canis*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum*.

3.10.2.1 Preparo das amostras

Os extratos etanólicos brutos de partes aéreas de *Xyris cipoensis*, *X. ongiscapa*, *X. eregrina*, *X. pilosa*, *X. platystachia*, *X. pterygoblephara*, *X. tortula* e *Trembleya laniflora* (folhas e caule), as frações em *n*-hexano, acetato de etila e aquosa de *Xyris pterygoblephara*, e a substância 5E2C tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada

por este método frente a *B. subtilis*. Apenas a substância 5E2C foi testada por este método contra os fungos dermatófitos.

Pesaram-se 100 mg dos extratos secos, 50 mg das frações e 5 mg da substância isolada, que foram solubilizados em 1,0 ml dos solventes apropriados: metanol para os extratos brutos, água para a fração aquosa, *n*-hexano para a fração em *n*-hexano, acetato de etila para a fração em acetato de etila, e diclorometano para a substância 5E2C.

As soluções foram deixadas em banho de ultra-som por 15 min e, na seqüência, centrifugadas a 10.000 rpm, por 5 min. Os sobrenadantes foram utilizados para impregnação dos discos (TAYLOR *et al.*, 1996).

Na Tabela 15 estão dispostas as concentrações das amostras ensaiadas e os volumes das mesmas utilizados para impregnar os discos de papel estéreis.

Tabela 15 – Concentrações das amostras avaliadas nos ensaios de atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar

Amostras	Concentração (mg/ml)	Volume impregnado (µL)	Massa/disco (mg)
Extratos brutos	100	20	2
Frações	50	20	1
5E2C	5	20	0,1

3.10.2.2 Drogas antimicrobianas utilizadas como controle positivo

Os controles positivos utilizados nos ensaios foram gentamicina para *P. aeruginosa*, e cloranfenicol para as demais bactérias. Anfotericina B foi utilizada nos ensaios com os fungos.

Na Tabela 16 estão listadas informações sobre as soluções dos controles positivos utilizados nos ensaios.

Tabela 16 – Drogas antimicrobianas utilizadas como controle positivo nos ensaios de atividade antimicrobiana por difusão em ágar

Substância	Solvente	Conc. da solução (mg/ml)	Validade da solução (dias)	Volume impregnado nos discos (µL)	Massa/disco (µg)
Cloranfenicol	Água	0,3	30	10	3
Anfotericina B	DMSO	3,2	7	10	32

3.10.2.3 Preparo dos meios de cultura

Os meios de cultura utilizados foram: PDA, para os fungos, e ágar antibiótico n.º1, para *B. subtilis*. Todos os meios foram preparados de acordo com instruções do fabricante, utilizando-se água destilada e filtrada em sistema Milli-Q, e autoclavados por 15 min, a 121 °C.

3.10.2.4 Preparo dos inóculos

Os inóculos de *B. subtilis* foram preparados utilizando-se culturas com crescimento de 24 h, suspensas em salina peptonada estéril. Estes foram padronizados por espectrofotometria no UV-VIS, no comprimento de onda de 580 nm, com transmitância de $50 \pm 1,0\%$, utilizando-se salina peptonada como branco (THE UNITED..., 1995).

Para os fungos dermatófitos, utilizaram-se culturas com diferentes tempos de crescimento, a saber, 5 dias a 30 °C para *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccossum*, e 12 dias, a 30 °C, para *M. canis*. Os inóculos foram padronizados nas mesmas condições descritas para as bactérias.

As suspensões foram diluídas com salina peptonada na proporção de 1:10 e, em seguida, adicionadas ao meio de superfície ainda líquido, a 48 °C, na concentração de 0,05% v/v (100 µL/20 ml).

3.10.2.5 Método

As amostras foram ensaiadas em triplicata, utilizando-se o método convencional de difusão em ágar descrito por Gavin (1957). Discos de papel estéreis de 6 mm de diâmetro foram impregnados com 20 µl de solução das amostras. Os discos contendo os antimicrobianos utilizados como controle positivo foram impregnados com 10 µl de suas respectivas soluções.

Discos impregnados com os solventes usados para solubilização das amostras foram empregados como controle negativo.

Após impregnação, os discos foram deixados em estufa, a 37 °C, até completa evaporação dos solventes.

Nas placas de Petri, adicionaram-se 20 ml do meio base e, após solidificação, 5 ml do meio de superfície contendo os respectivos inóculos. Após a solidificação deste meio, os discos impregnados foram depositados, com auxílio de uma pinça, na seguinte proporção: 2 discos com amostras, 2 discos com controle positivo e 1 disco com o controle negativo.

As placas foram deixadas por 1 h, à temperatura ambiente, para difusão. Em seguida, estas foram incubadas por 24 h, a 37 °C, para *B. subtilis*, por 5 dias a 30 °C para *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *E. floccossum*, e por 12 dias, a 30 °C, para *M. canis*.

As leituras dos halos de inibição foram feitas com régua e os resultados são expressos em milímetros seguidos dos valores de desvio padrão das triplicatas.

3.10.3 Método de microdiluição

Os extratos etanólicos brutos de partes aéreas de *X. cipoensis*, *X. longiscapa*, *X. peregrina*, *X. pilosa*, *X. platystachia*, *X. pterygoblephara*, *X. tortula* e *T. laniflora* (folhas e caule), as frações em *n*-hexano, acetato de etila e aquosa de *Xyris pterygoblephara*, e a

substância 5E2C tiveram sua atividade antimicrobiana avaliada pelo método de microdiluição frente a *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Aspergillus niger*.

A fração em diclorometano de *X. pterygoblephara*, devido à pequena massa disponível, foi ensaiada apenas contra *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

3.10.3.1 Preparo das amostras

Os extratos brutos e frações foram suspensos em solução aquosa de Tween 80 a 1%, na concentração de 2 mg/ml. As suspensões foram deixadas em banho de ultrassom por 30 minutos, esterilizadas por luz UV durante 2 horas, e estocadas em geladeira, a 4 °C, por até 30 dias.

A substância 5E2C seguiu os mesmos procedimentos; porém, a suspensão foi obtida para concentração de 1 mg/ml.

3.10.3.2 Drogas antimicrobianas utilizadas como padrão

Os padrões utilizados nos ensaios foram gentamicina, para *P. aeruginosa*, e cloranfenicol para as demais bactérias. Fluconazol foi utilizado nos ensaios com os fungos.

Na Tabela 17 estão listadas informações sobre as soluções dos controles positivos utilizados nos ensaios.

Tabela 17 – Soluções de antimicrobianos utilizados como padrão nos ensaios de atividade antimicrobiana por microdiluição

Antimicrobiano	Concentração da solução estoque ($\mu\text{g/ml}$)	Volumes usados no ensaio (μl)	Concentrações finais no ensaio ($\mu\text{g/ml}$)
Cloranfenicol	160	5	4
Gentamicina	160	5	4
Fluconazol	160 ^a ; 2560 ^b	5	4 ^a ; 64 ^b

a: Concentrações usadas no ensaio contra *C. albicans*;

b: Concentrações usadas no ensaio contra *A. niger*.

3.10.3.3 Preparo do meio de cultura

O meio de cultura utilizado foi o caldo Mueller-Hinton (*Mueller-Hinton Broth*), que foi preparado de acordo com instruções do fabricante, utilizando-se água destilada e filtrada em sistema Milli-Q, e autoclavados por 15 min, a 121°C.

3.10.3.4 Preparo dos inóculos

Os inóculos de bactérias e leveduras foram preparados utilizando-se culturas com crescimento de 24 h, suspensas em salina peptonada estéril. Estes foram padronizados por espectrofotometria no UV-VIS, no comprimento de onda de 580 nm, com transmitância de $50 \pm 1,0\%$, utilizando-se salina peptonada como branco (THE UNITED..., 1995).

Para *A. niger*, utilizou-se cultura com crescimento de 40 h, a 36 °C. Os inóculos foram padronizados nas mesmas condições descritas para as bactérias (THE UNITED..., 1995).

As suspensões foram diluídas em salina peptonada, na proporção de 1:10, para se obter inóculos finais de 5×10^5 UFC/ml (CROCKETT *et al.*, 1992).

3.10.3.5 Método

Para o ensaio, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços. Cada amostra foi testada em 7 concentrações diferentes, a saber, 1000, 750, 500, 300, 150, 100 e 50 µg/ml, para extratos brutos e frações, e 500, 375, 250, 150, 75, 50 e 25 µg/ml para a substância 5E2C. As amostras foram ensaiadas em triplicata, para cada concentração.

Em cada poço da placa foram adicionados volumes correspondentes da amostra para alcançar a concentração final (entre 100 e 5 µl), solução aquosa estéril de Tween 80 à 1% para completar o volume de 100 µl, 95 µl do meio de cultura e 5µl do inóculo. Nos poços correspondentes ao controle negativo, onde não deveria haver crescimento microbiano, foram adicionados 100 µl de solução aquosa estéril de Tween 80 a 1% e 100 µl do meio de cultura. Já nos poços do controle positivo, onde deveria haver 100% de crescimento microbiano, foram adicionados 100 µl de solução aquosa estéril de Tween 80 a 1%, 95 µl do meio de cultura e 5 µl do inóculo. Para o antimicrobiano padrão, foram adicionados 5 µl da solução da droga correspondente, 95 µl de solução aquosa estéril de Tween 80 a 1% , 95 µl do meio de cultura, e 5 µl do inóculo.

A Tabela 18 mostra as concentrações utilizadas no ensaio, assim como a distribuição na placa de microtitulação.

Tabela 18 – Concentrações das amostras no ensaio de microdiluição

Amostra	01	01	01	02	02	02	03	03	03	04	04	04
Poços	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Concentração (µg/ml)	A	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
	B	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750	750
	C	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500	500
	D	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300	300
	E	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150	150
	F	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	G	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
	H	CN	CN	CN	CN	CP	CP	CP	CP	PA	PA	PA

CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; PA: Padrão.

Após a adição de todos os reagentes, assim como dos inóculos, as placas foram cobertas e agitadas em plataforma orbital, a 200 rpm, por 10 minutos, à temperatura ambiente e, em seguida, incubadas em estufa por 24 h, a 37 °C, para bactérias e leveduras, e por 48 h, a 36 °C, para *A. niger*.

Ao final do período de incubação foram adicionados, a cada poço, 20 µl de solução aquosa de MTT a 5 mg/ml. As placas foram novamente cobertas e agitadas em plataforma orbital, a 200 rpm, por 10 min, à temperatura ambiente, e incubadas por 1 h. Em seguida, as absorbâncias foram lidas em leitor de ELISA, à 595 nm.

Para cada concentração das amostras ensaiadas foi feito um branco, em triplicata, seguindo os mesmos procedimentos utilizados no ensaio, excetuando-se a inoculação dos microrganismos. O valor do branco utilizado nos cálculos foi a média dessas triplicatas.

Para o cálculo da porcentagem de inibição foi empregada a equação a seguir:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(Ac - At)}{Ac} \times 100,$$

onde:

Ac = absorbância do controle positivo;

At = absorbância corrigida da amostra (leitura da absorbância da amostra – branco).

3.10.3.6 Análise estatística dos ensaios microbiológicos

Foi determinada a concentração inibitória a 50% (CI₅₀) das amostras ensaiadas. Os valores foram calculados utilizando-se o programa GraphPad Prism 3 (GraphPad Software). Foram construídas curvas de concentração/resposta utilizando-se o logaritmo das concentrações ensaiadas e as porcentagens de inibição correspondentes, calculadas a partir das triplicatas das leituras obtidas no ensaio.

4.1 Estudo fitoquímico de *X. pterygoblephara*

4.1.1 Extrato etanólico

O perfil cromatográfico do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* foi obtido por RP-HPLC (Figura 2). Esse perfil é denominado de “impressão digital” e tem por objetivo registrar a composição química qualitativa de uma determinada espécie, possibilitando identificar variações oriundas de fatores edafoclimáticos em amostras obtidas de coletas posteriores.

Para esta análise, foi utilizada uma corrida exploratória, empregando gradiente de acetonitrila/água como eluente (item 3.5.2). Observa-se, nesse cromatograma, o predomínio de picos com tempos de retenção entre 10 – 35 minutos, correspondentes a substâncias de média polaridade.

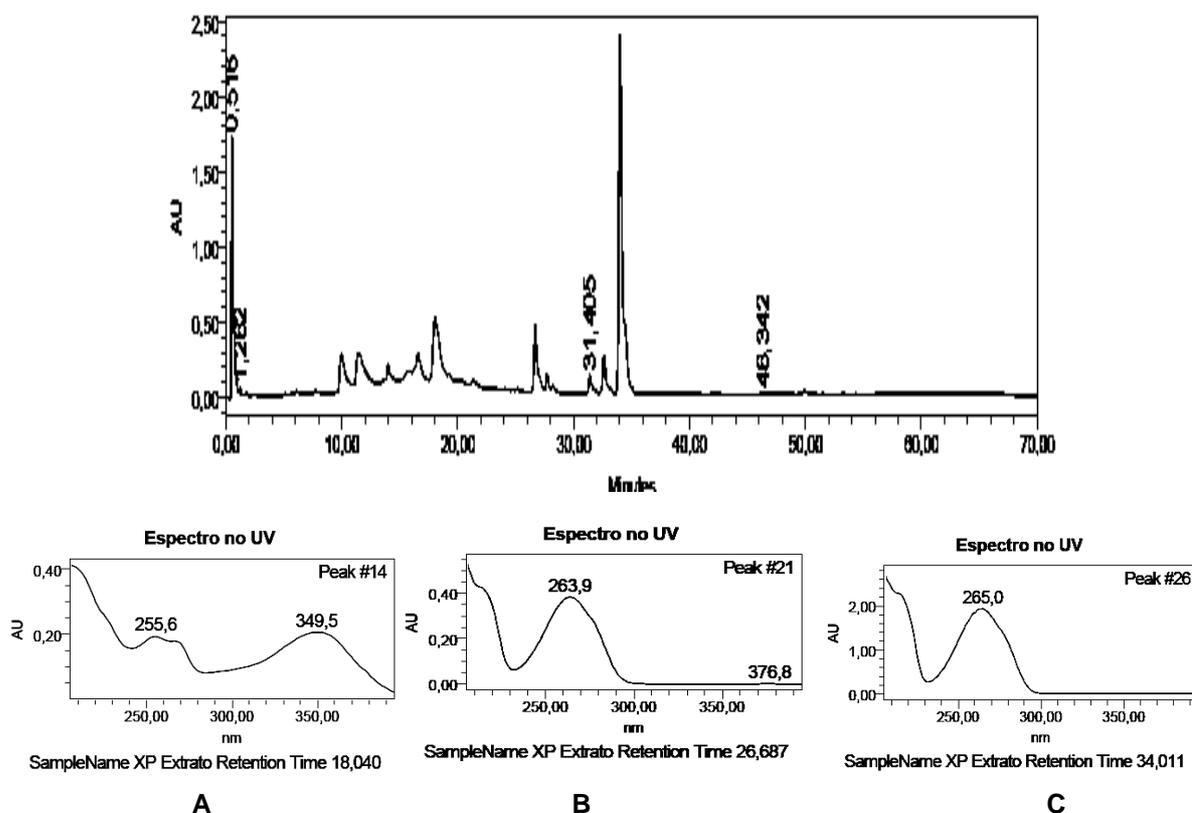


Figura 2 – Cromatograma do extrato etanólico de *X. pterygoblephara*, obtido por RP-HPLC. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 3.5.2; e espectros de varredura no UV obtidos pelo detector de DAD para os picos majoritários do cromatograma do extrato bruto de *X. pterygoblephara*. **A**, TR=18,04 min; **B**, TR=26,69 min; **C**, TR=34,01 min.

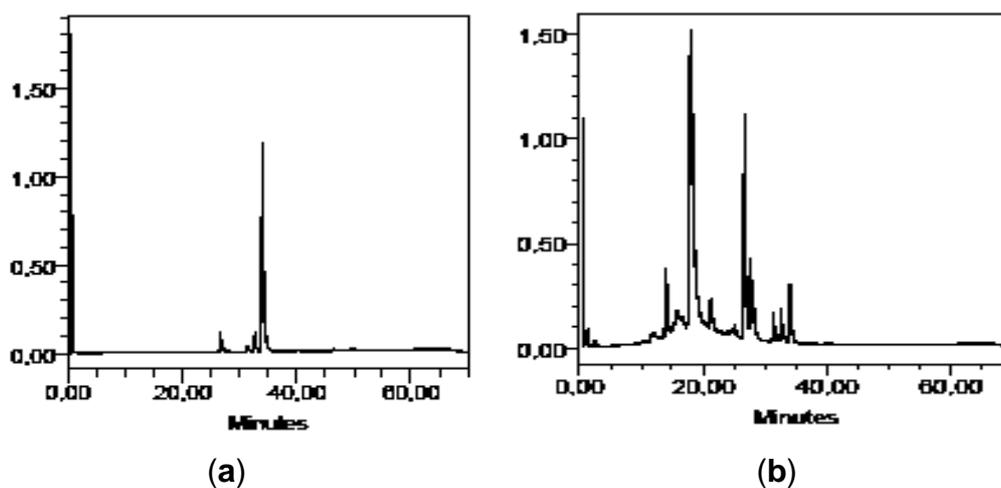
Os espectros no UV obtidos “on line” para os picos majoritários do cromatograma, utilizando detector de DAD, sugerem a presença de substâncias aromáticas, tais como compostos fenólicos e seus derivados (Figura 2).

O estudo fitoquímico do extrato etanólico bruto de *X. pterygoblephara* compreendeu o fracionamento preliminar do extrato por duas metodologias distintas: partição seriada com solventes de polaridade crescente (item 4.1.2) e extração do extrato com DCM (item 4.1.3). Os fracionamentos posteriores e a purificação das substâncias isoladas foram realizados por técnicas cromatográficas variadas, incluindo CCS e HPLC em escala preparativa.

No Fluxograma 2 (pág. 79) estão resumidos os procedimentos utilizados, principais frações trabalhadas e substâncias isoladas no estudo fitoquímico de *X. pterygoblephara*.

4.1.2 Frações resultantes da partição do extrato etanólico com solventes imiscíveis

A fim de avaliar a eficiência do fracionamento do extrato bruto por partição entre solventes imiscíveis, as frações obtidas em *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e água foram analisadas por RP-HPLC, utilizando-se as mesmas condições empregadas para o extrato etanólico bruto (item 3.5.2). Os cromatogramas obtidos estão representados na Figura 3.



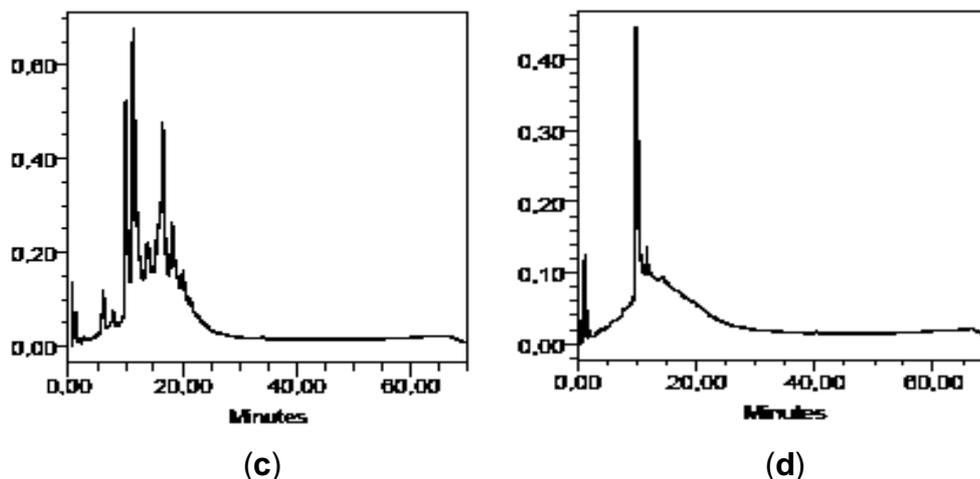


Figura 3 – Cromatogramas obtidos por RP-HPLC para as frações resultantes da partição do extrato etanólico bruto de *X. pterygoblephara* entre solventes imiscíveis. Frações em (a) *n*-hexano, (b) diclorometano, (c) acetato de etila e (d) água. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 3.5.2.

Os perfis cromatográficos obtidos atestam a eficiência do processo de fracionamento, observando-se, em cada fração, o predomínio de picos correspondentes a substâncias com polaridades relacionadas aos solventes empregados na partição (Figura 3). Cabe destacar a composição bastante simplificada da fração em *n*-hexano, constituída por um pico majoritário com $T_r = 34$ min (Figura 3a).

4.1.2.1 Fração em *n*-hexano

A fração em *n*-hexano foi selecionada para fracionamento posterior devido ao seu perfil cromatográfico simplificado (Figura 4a).

O refractionamento dessa fração resultou em 22 frações, sendo que as de número 10, 11, 13 e 16 foram selecionadas para novo fracionamento devido à sua massa disponível. No entanto, a sua complexidade e a presença de clorofilas nas frações 11 e 13 não resultou no isolamento de nenhuma substância.

O estudo da fração 10 levou ao isolamento da substância 10P4. Este fracionamento realizado por HPLC em escala preparativa está descrito no item 3.6.2 e esquematizado no Fluxograma 2 (pág. 79).

A análise dos cromatogramas de CCD de sílica gel e RP-HPLC da substância 10P4, e de seus dados espectrais de UV e IV mostrou tratar-se da substância 5E2C, isolada da “fração polar” (item 4.1.3.1). 5E2C foi isolada com pureza cromatográfica superior, e com maior massa, sendo utilizada para elucidação estrutural e para os ensaios biológicos.

Da fração 16 foi isolada a substância P2A. O isolamento dessa substância está descrito no item 3.6.3 e esquematizado no Fluxograma 2 (pág. 79). A análise de P2A por RP-HPLC indicou um pico com TR = 50 minutos (Figura 4) e seu perfil por CCD de sílica gel evidenciou a presença de mancha única, com coloração vermelha após revelação com reagente de Liebermann-Buchard (Figura 5). Devido à pequena quantidade isolada, não foram realizados ensaios biológicos com essa substância.

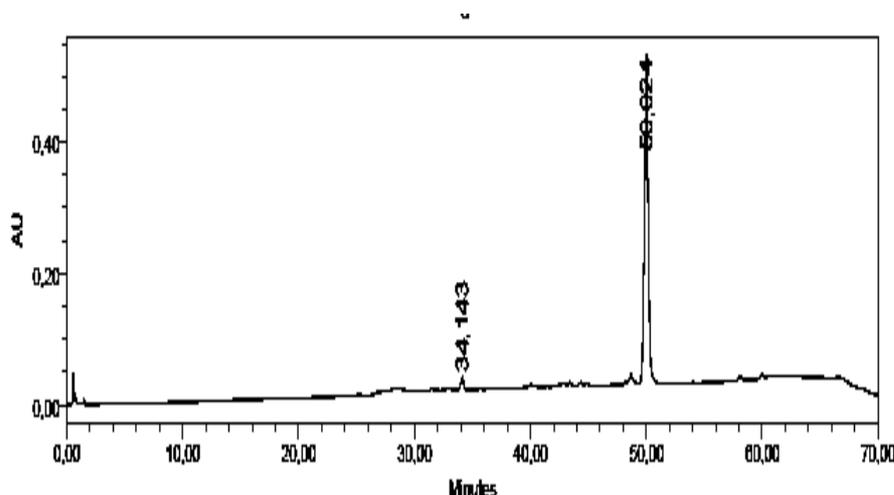


Figura 4 - Cromatograma obtido por RP-HPLC para a substância P2A. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 3.5.2.



Figura 5 – Cromatograma obtido para a substância P2A por CCD de sílica gel. Eluente: clorofórmio/acetato de etila (9:1). Revelador: Liebermann-Buchard.

4.1.3 Frações resultantes da extração do extrato etanólico bruto de *X. pterygoblephara* com diclorometano

Para avaliar a eficiência do fracionamento do extrato etanólico bruto de *X. pterygoblephara* por extração com diclorometano, as frações “apolar” (fração diclorometânica) e “polar” (resíduo da extração) foram analisadas por RP-HPLC nas mesmas condições empregadas para o extrato etanólico (item 3.5.2).

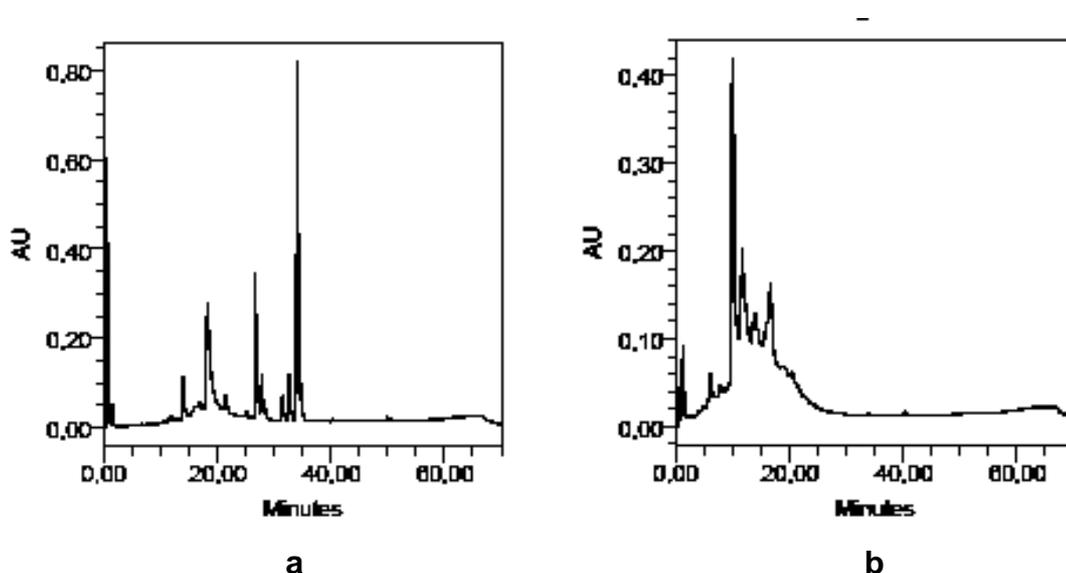


Figura 6 – Cromatogramas, obtidos por RP-HPLC, para as frações resultantes da extração com diclorometano do extrato etanólico de *X. pterygoblephara*. (a) Fração “apolar”, (b) fração “polar”. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 3.5.2.

Os cromatogramas das frações apresentam uma composição qualitativa mais simples que o extrato etanólico de partida (Figura 6), conforme esperado. Portanto, o método de extração com DCM se mostrou adequado para o fracionamento do extrato bruto de *X. pterygoblephara*.

Como foi observado na Figura 6, há uma grande concentração de substâncias de baixa e média polaridade, divididas entre as frações em *n*-hexano e DCM (Fig. 3a e 3b). A extração do extrato bruto com DCM permitiu concentrar essas substâncias em uma única fração, menos complexa que as frações mais polares e, devido à baixa polaridade, mais fácil de ser trabalhada.

4.1.3.1 Fração “apolar”

O fracionamento inicial dessa fração por CCS resultou em 12 frações, sendo que as de número 5, 6 e 10 foram selecionadas para refracionamento devido à disponibilidade massa.

Por apresentarem uma composição complexa, o refracionamento das frações 6 e 10 por CCS não resultou no isolamento de nenhuma substância. Da fração 5 foi isolada a substância 5E2C (item 3.7 ; Fluxograma 2).

A análise da substância 5E2C por RP-HPLC indicou um pico com TR = 34 minutos (Figura 7). Sua análise por CCD de sílica gel evidenciou a presença de mancha única, com coloração alaranjada após revelação com reagente de Dragendorff (Figura 8).

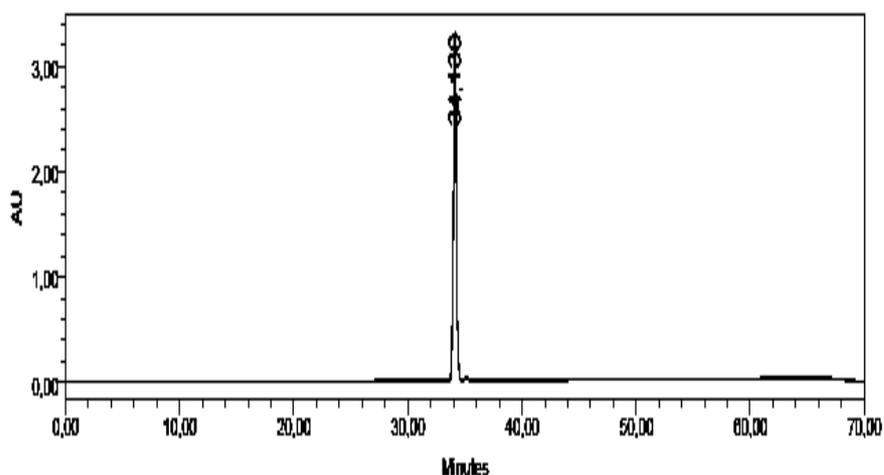


Figura 7 – Cromatograma obtido por RP-HPLC, para a substância 5E2C. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 3.5.2.

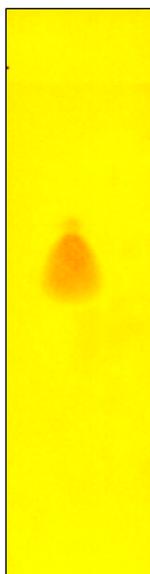


Figura 8 – Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para a substância 5E2C. Eluente: *n*-hexano/acetona (85:15). Revelador: Dragendorff.

4.1.4 Fração “polar”

O fracionamento inicial dessa fração por CCS resultou em 26 frações, sendo as frações FP18 e FP26 selecionadas para refracionamento devido à disponibilidade de massa. Devido a sua elevada polaridade e complexidade, o fracionamento de FP26 por CCS não resultou no isolamento de nenhuma substância.

Por sua vez, o fracionamento de FP18 resultou na obtenção da substância B2 (item 3.8; Fluxograma 2).

A análise da substância B2 por RP-HPLC indicou um pico com TR = 17 minutos (Figura 9). Sua análise por CCD de sílica gel evidenciou a presença de mancha única, com coloração amarela após revelação com solução metanólica de cloreto de alumínio (Figura 10), apresentando, também, forte fluorescência amarelada sob luz UV (365 nm). Devido à pequena quantidade isolada, não foram realizados ensaios biológicos com essa substância.

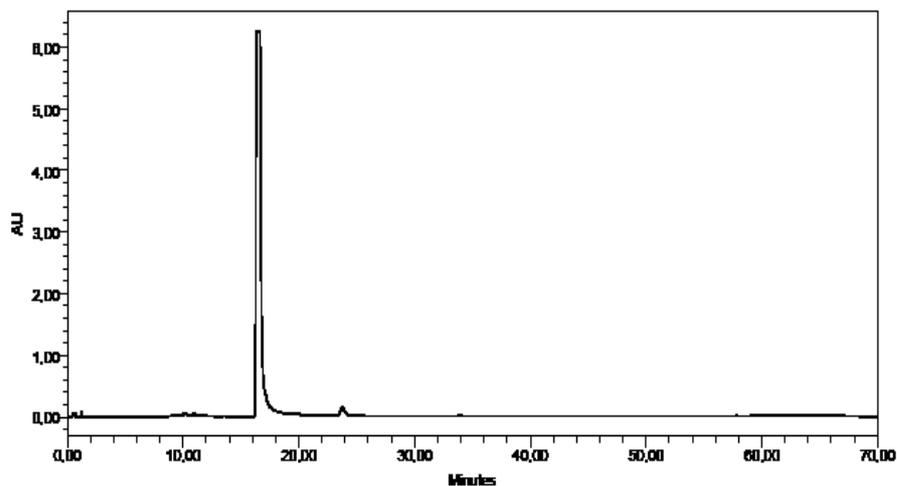


Figura 9 - Cromatograma obtido por RP-HPLC para a substância B2. Condições cromatográficas: vide parte experimental, item 3.5.2.



Figura 10 – Cromatograma obtido por CCD de sílica gel para a substância B2. Eluente:metanol. Revelador: cloreto de alumínio.

4.2 Elucidação estrutural das substâncias isoladas

4.2.1 Substância P2A

P2A, isolado da fração em *n*-hexano do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* (itens 3.5 e 3.7), apresentou-se como um sólido amorfo, de coloração branca, com faixa de fusão de 163,5 – 165,2 °C.

A análise de P2A por CCD de sílica gel sugeriu tratar-se de um triterpeno, evidenciado pelo desenvolvimento de mancha vermelha, com $R_f = 0,56$, após revelação com Liebermann-Burchard (Figura 5, item 4.1.2.1).

O espectro no IV obtido para P2A (Figura 11) revelou a natureza alifática do composto, pela presença de absorções em 2929 cm^{-1} e 2865 cm^{-1} , atribuídas a estiramento C-H, e ausência de absorções características de compostos aromáticos, na região entre 1600 – 1450 cm^{-1} . Uma banda intensa em 1686 cm^{-1} foi atribuída a estiramento C=O de grupo carbonila de cetona cíclica. Uma banda de intensidade média em aproximadamente 1700 cm^{-1} (parcialmente sobreposta à banda em 1686 cm^{-1}) foi atribuída a outra carbonila, de ácido carboxílico. Porém, não se observou nenhuma banda característica de OH na região entre 3500-3100 cm^{-1} . A banda em 1453 cm^{-1} foi atribuída à deformação assimétrica de C-H alifático, e aquela em 1376 cm^{-1} à deformação simétrica de C-H alifático.

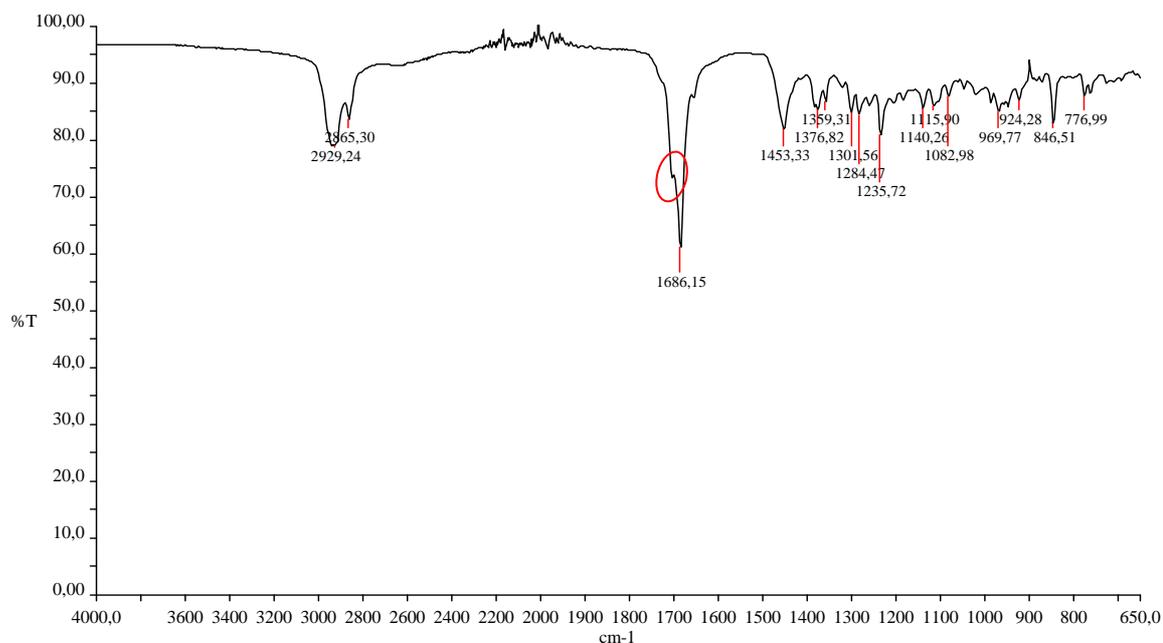


Figura 11 – Espectro no IV (cm^{-1}) obtido para P2A. O círculo mostra a banda de carbonila em aproximadamente 1700 cm^{-1} .

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado obtido para a substância P2A (100 MHz, CDCl_3 , δ) apresentou sinais característicos que permitiram confirmar sua natureza triterpênica pentacíclica (Fig. 12). Foram observados sinais correspondentes a 30 carbonos, cuja análise do sub-espectro DEPT-135 (Fig. 12) revelou tratar-se de 7 CH_3 , 10 CH_2 , 4 CH e 9 C não hidrogenados.

Como esperado, espectro de RMN de ^1H obtido para P2A (400 MHz, CDCl_3 , δ) (Fig. 13) não apresentou sinais com deslocamento químico na região de aromáticos (δ 6,0 a 9,0 ppm). A presença de 7 simpletos (δ 0,79; 0,95; 0,98; 1,00; 1,03; 1,04 e 1,08 ppm), com integral de 3 hidrogênios cada, indica que a molécula possui 7 grupos metila ligados a carbonos não hidrogenados. Um simpleto em δ 5,17 ppm, com integral de 1 hidrogênio, foi atribuído a hidrogênio olefínico vizinho a carbonos não hidrogenados.

Os sinais em δ 136,60 e 133,32 ppm foram atribuídos, respectivamente, aos carbonos olefínicos C-18 e C-19 do esqueleto triterpênico, indicando a localização da insaturação nesta posição. O espectro de HMQC (Fig. 14) mostra a correlação entre C-19 e o simpleto em δ 5,17 ppm, cujo espectro 1D revelou integral de um único hidrogênio. A confirmação da localização da dupla ligação entre C-18 e C-19 foi fornecida pelo espectro obtido no experimento NOESY (Fig. 15). Neste espectro observam-se manchas de correlação entre H-19 e H-13 (duplete duplo em δ 2,2

ppm), CH_2 -21 (duplete duplo em δ 2,48 ppm) e CH_3 -29 (simpleto em δ 1,00 ppm). Essas correlações estão representadas na Figura 16.

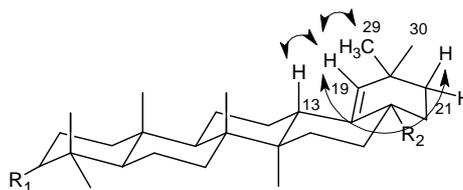


Figura 16 – Correlações de NOESY observadas para o hidrogênio olefínico H-19.

Definida a localização da insaturação entre C-18 e C-19, P2A foi classificado como triterpeno pentacíclico da série olean-18-eno. Os valores de deslocamentos químicos para estes dois carbonos em compostos desta série são, normalmente, em torno de δ 142 ppm para C-18, e δ 129 ppm para C-19. Porém, a presença de um grupo carboxila em C-28, localizado na posição γ em relação a C-18, e δ a C-19, confere uma proteção de cerca de 5,9 ppm para C-18, e desprotege C-19 em aproximadamente 2,5 ppm (MAHATO e KUNDU, 1994), explicando os valores encontrados para P2A, respectivamente δ 136,60 e 133,32 ppm. Esses dados possibilitaram localizar o grupo carboxila em C-28.

No espectro de RMN de ^{13}C observa-se um sinal em δ 181,86 ppm, característico de carbonila de ácidos e ésteres. A possibilidade do composto ser um éster foi descartada pelo número de sinais de carbono encontrados, assim como pela ausência de grupos OCH_3 ou OCH_2CH_3 . Havia, ainda, a possibilidade da carboxila em C-28 ser de sal. Essa possibilidade também foi descartada, pois a simulação do espectro de RMN de ^{13}C considerando o íon carboxilato apresentou um sinal em δ aproximadamente 189 ppm para C-28.

O sinal em δ 218 ppm no espectro de RMN de ^{13}C foi atribuído à carbonila cetônica e sua posição no esqueleto triterpênico foi definida a partir do experimento HMBC (Fig. 17) como sendo C-3. Assim, observou-se a correlação entre o sinal em δ 218 ppm com sinais dos hidrogênios em δ 1,08 e δ 1,02 ppm, atribuídos, respectivamente, aos hidrogênios metílicos em C-23 e C-24. Observou-se, também, a correlação entre C-3 (δ 218 ppm) e os hidrogênios metínicos em C-1 (δ 1,96 ppm), além da correlação entre C-3 e o hidrogênio em C-5 (δ 2,48 ppm) (Fig. 18).

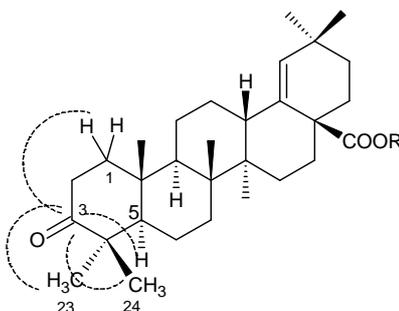
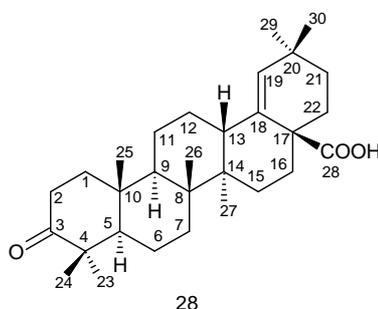


Figura 18 – Correlações observadas no espectro de HMBC que permitiram localizar a carbonila em C-3.

Uma vez definida a posição dos substituintes no esqueleto do triterpeno, restava definir a natureza da carbonila em C-28, cujos dados espectrais já haviam descartado a possibilidade de tratar-se de sal de ácido carboxílico ou éster.

Para tanto, procedeu-se à análise do espectro de massas obtido para P2A (Fig. 19). O espectro de TOF MS apresentou um pico do íon quasimolecular m/z 477,3349 ($[M + 23]^+$ ou $[M + Na]^+$), e um pico em m/z 455,3532 ($[M + 1]^+$ ou $[M + H]^+$), ou seja, M é aproximadamente m/z 454, o que leva à fórmula molecular $C_{30}H_{46}O_3$. Esses dados sugerem que a carboxila em C-28 seja de um ácido carboxílico.

O levantamento da literatura levou ao ácido morônico (**28**), um triterpeno pentacíclico isolado pela primeira vez de *Roylea elegans* por MAJUMDER *et al.* (1979). Apesar espectro de IV do composto isolado no presente trabalho não apresentar uma banda relativa ao estiramento O-H de ácido carboxílico, o mesmo também não foi observado nas referências obtidas na literatura (MAJUMDER *et al.*, 1979; AHASAN *et al.*, 1994). A comparação dos dados obtidos nos espectros de RMN de ^{13}C e de 1H com os dados da literatura não deixam dúvidas de que o composto P2A seja realmente o ácido morônico. Não há relatos anteriores da presença de triterpenos pentacíclicos em espécies de *Xyris*.



As demais atribuições do espectro de RMN de ^{13}C de P2A foram, então, obtidas por comparação com os dados disponíveis na literatura para o ácido

morônico e estão dispostos na Tabela 19. Na Tabela 20 estão listadas as atribuições dos principais sinais do espectro de RMN de ^1H para P2A.

Tabela 19 - Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para P2A

Carbono	$^1\text{P2A}$ (δ, ppm)	$^2\text{Ácido morônico}$ (δ, ppm)
C-1	39,9	39,7
C-2	34,1	33,9
C-3	217,5	218,3
C-4	47,3	47,1
C-5	54,9	54,7
C-6	21,4	19,5
C-7	29,4	33,4
C-8	40,6	40,4
C-9	50,5	50,3
C-10	36,9	36,8
C-11	21,1	21,4
C-12	26,0	25,9
C-13	41,5	41,3
C-14	42,6	42,4
C-15	29,7	29,2
C-16	33,8	33,6
C-17	48,0	47,8
C-18	136,6	136,4
C-19	133,3	133,0
C-20	32,1	31,9
C-21	33,5	33,3
C-22	33,3	33,2
C-23	26,8	26,7
C-24	20,9	20,8
C-25	16,5	16,4
C-26	15,9	15,7
C-27	14,8	14,7
C-28	181,9	182,8
C-29	30,4	30,2
C-30	29,1	29,0

1 - Dados obtidos no presente trabalho (CDCl_3 , 100 MHz).

2 - Dados relatados por MAJUMDER *et al.*, 1979 (CDCl_3 , 100 MHz).

Tabela 20 - Atribuição dos principais sinais de RMN de ^1H para P2A

Hidrogênio	$^1\text{P2A}$ (δ, ppm)	$^2\text{Ácido morônico}$ (δ, ppm)
H-19	5,17 s	5,15 s
H-23	1,08 s	1,07 s
H-24	1,03 s	1,02 s
H-25	0,95 s	0,94 s
H-26	1,02 s	1,01 s
H-27	0,79 s	0,78 s
H-29	1,00 s	0,99 s
H-30	0,98 s	0,97 s

1 - Dados obtidos no presente trabalho (CDCl_3 , 400 MHz).

2 - Dados relatados por MAJUMDER *et al.*, 1979, (CDCl_3 , 400 MHz).

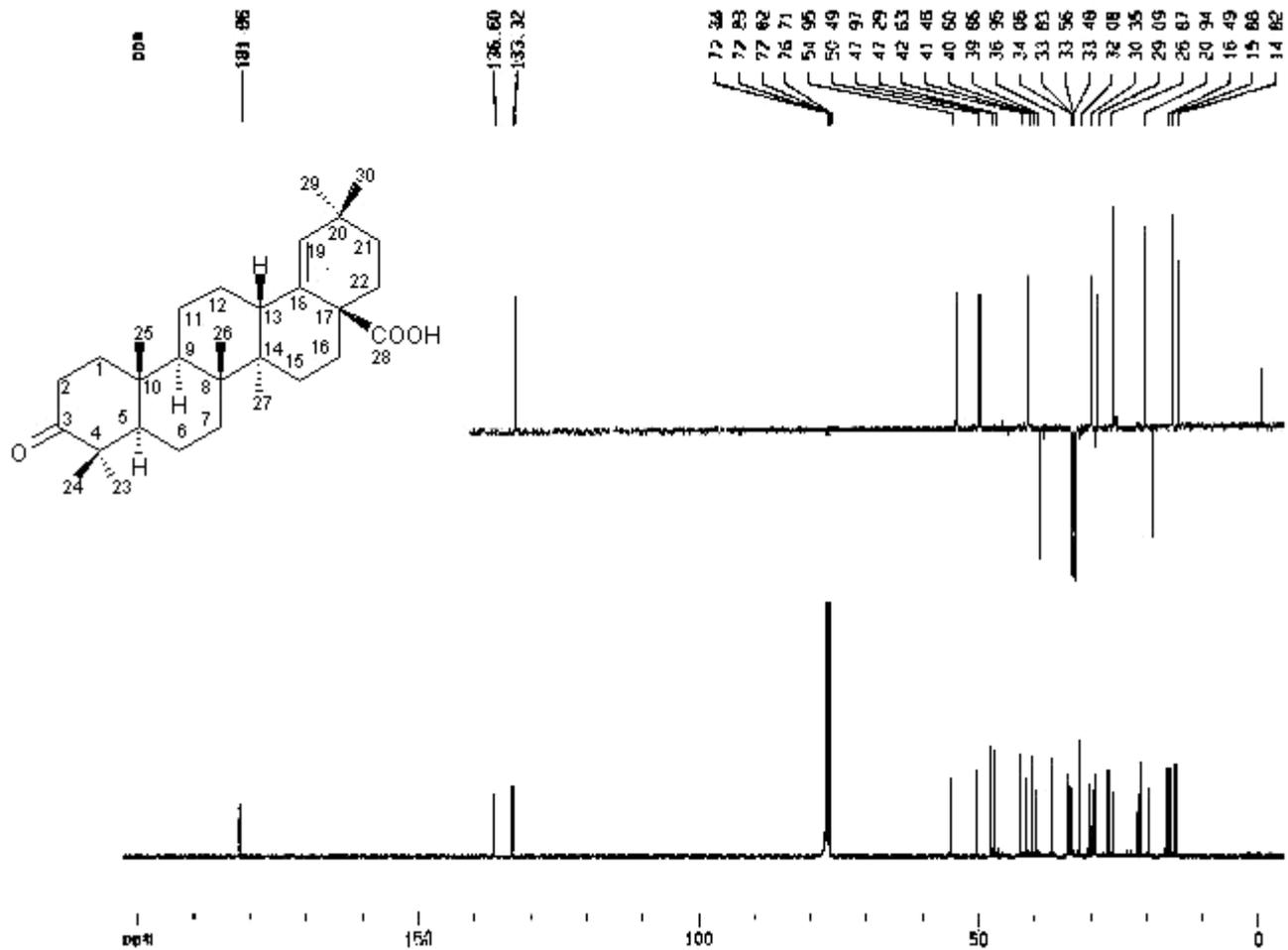


Figura 12 – Espectro de RMN de ¹³C e sub-espectro DEPT-135 obtidos para P2A (CDCl₃, 100 MHz).

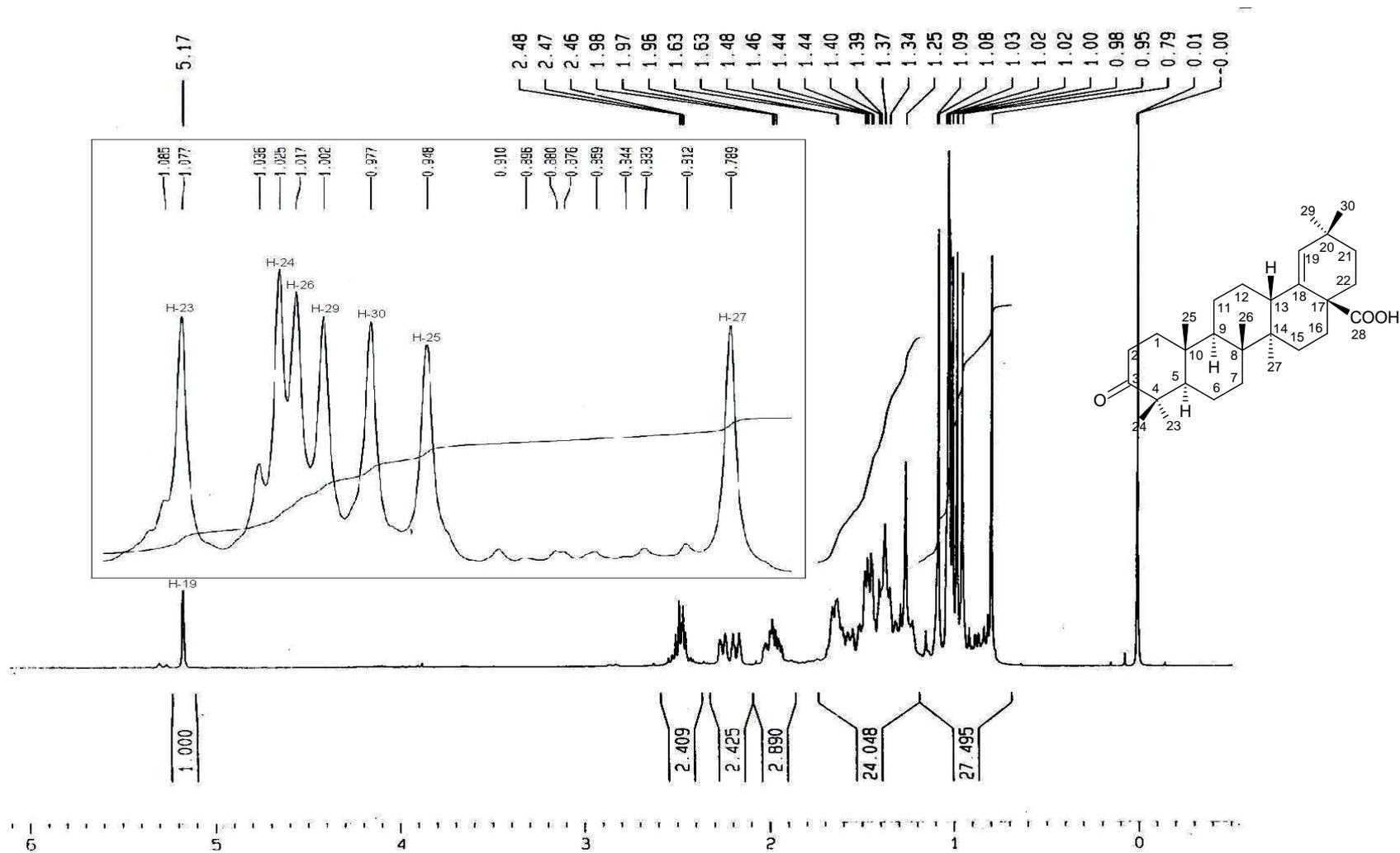


Figura 13 – Espectro de RMN de ¹H e expansão obtidos para P2A (CDCl₃, 400 MHz).

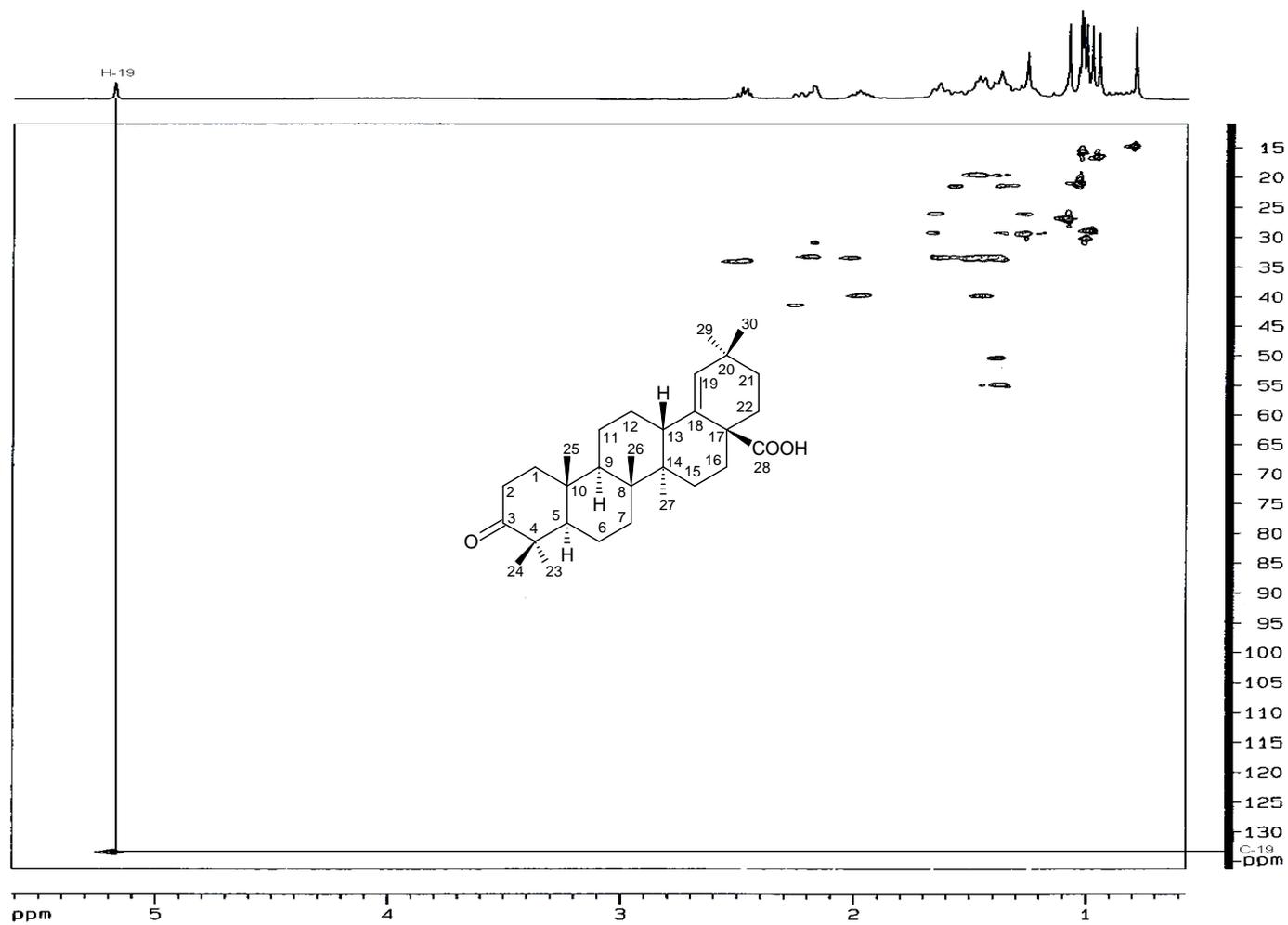


Figura 14 – Espectro de correlação heteronuclear HMQC obtido para a substância P2A.

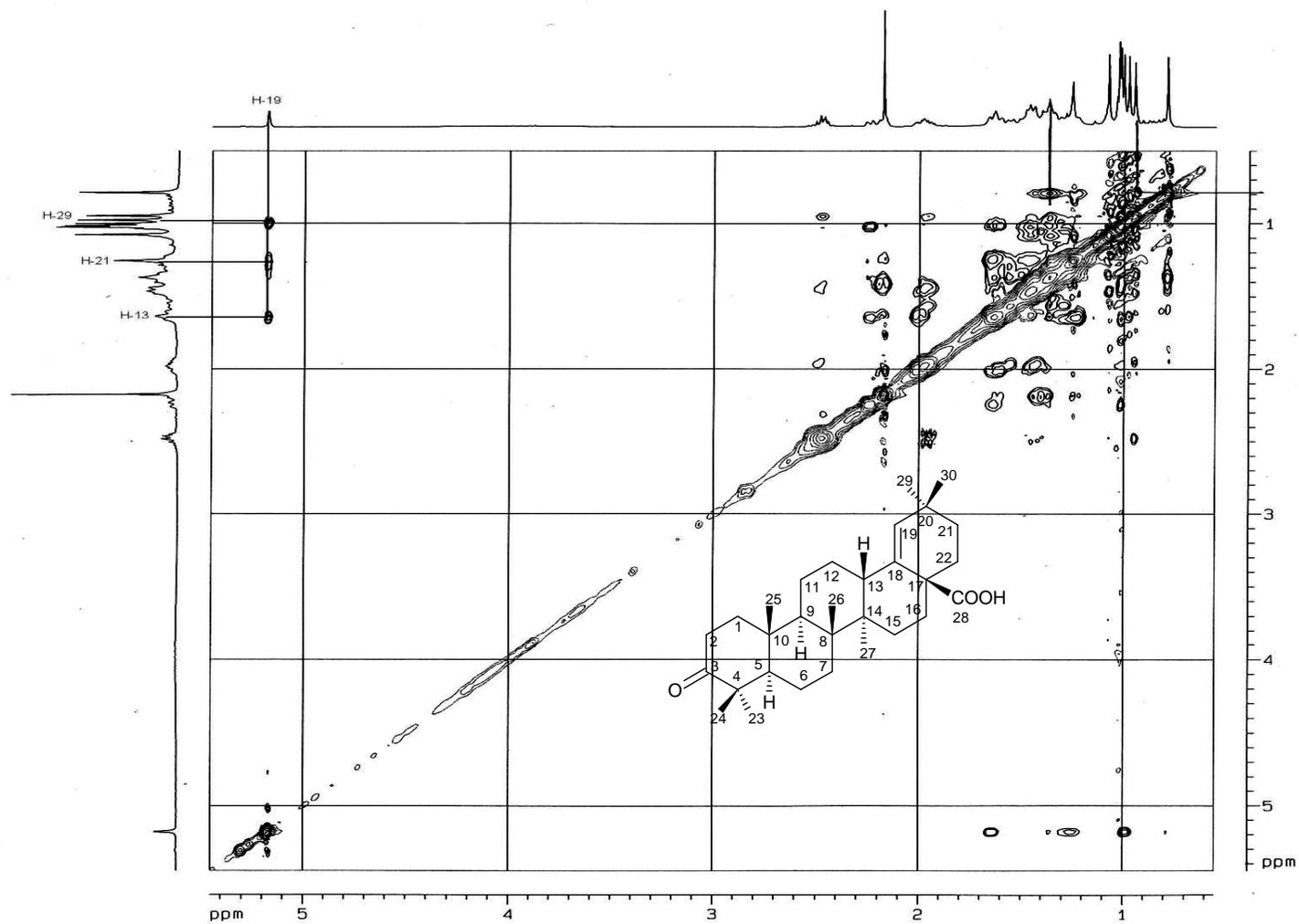


Figura 15 – Espectro de NOESY obtido para a substância P2A.

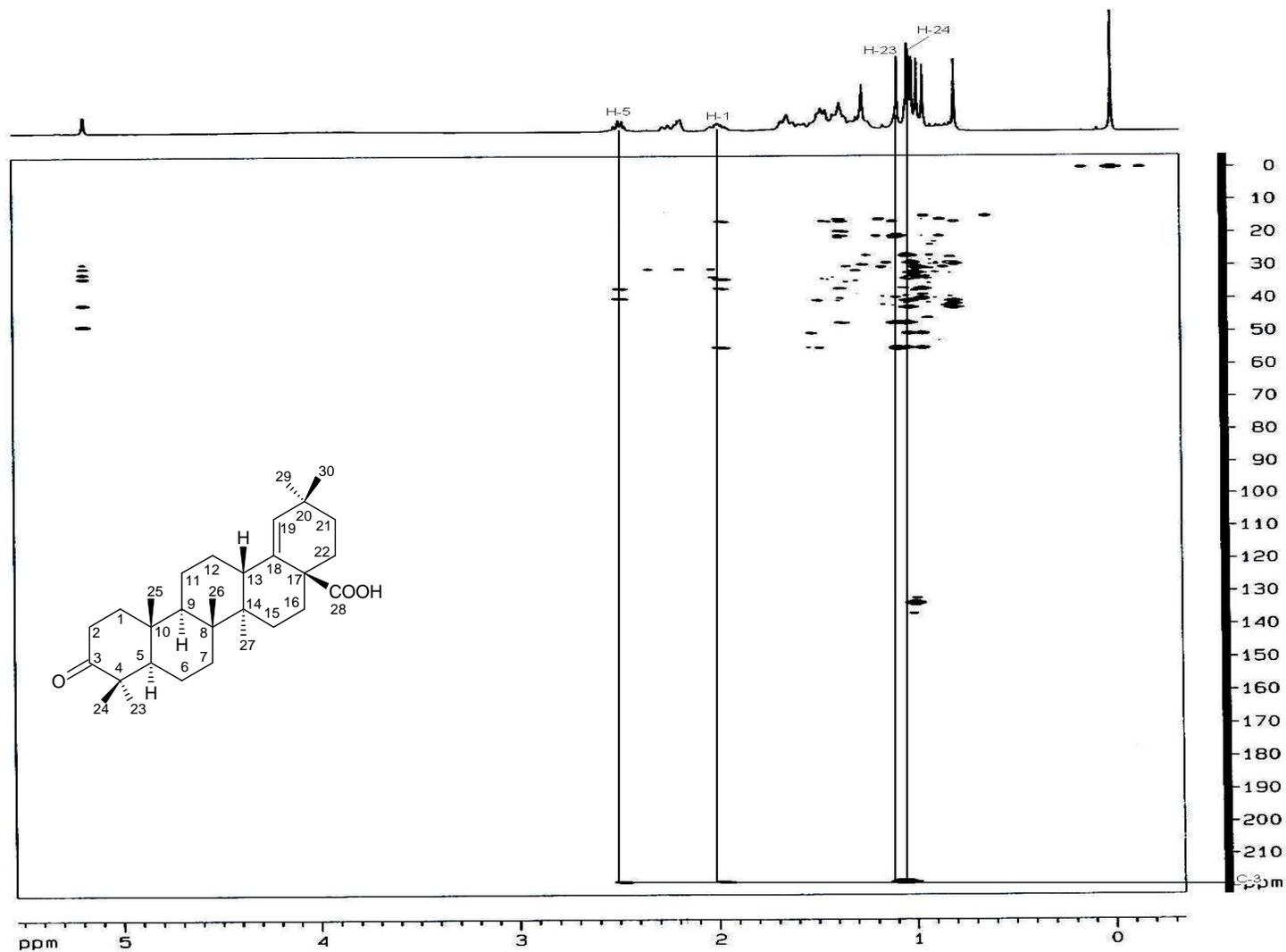


Figura 17 – Espectro de correlação heteronuclear HMBC obtido para a substância P2A.

+TOF MS: 0.233 min from Sample 3 (fcb2) of jul280511.wiff
a=3.56433672989811090e-004, t0=-1.54310274846466200e+001 R.: subtracted (0.017 to 0.067 ...

Max. 657.0 coun

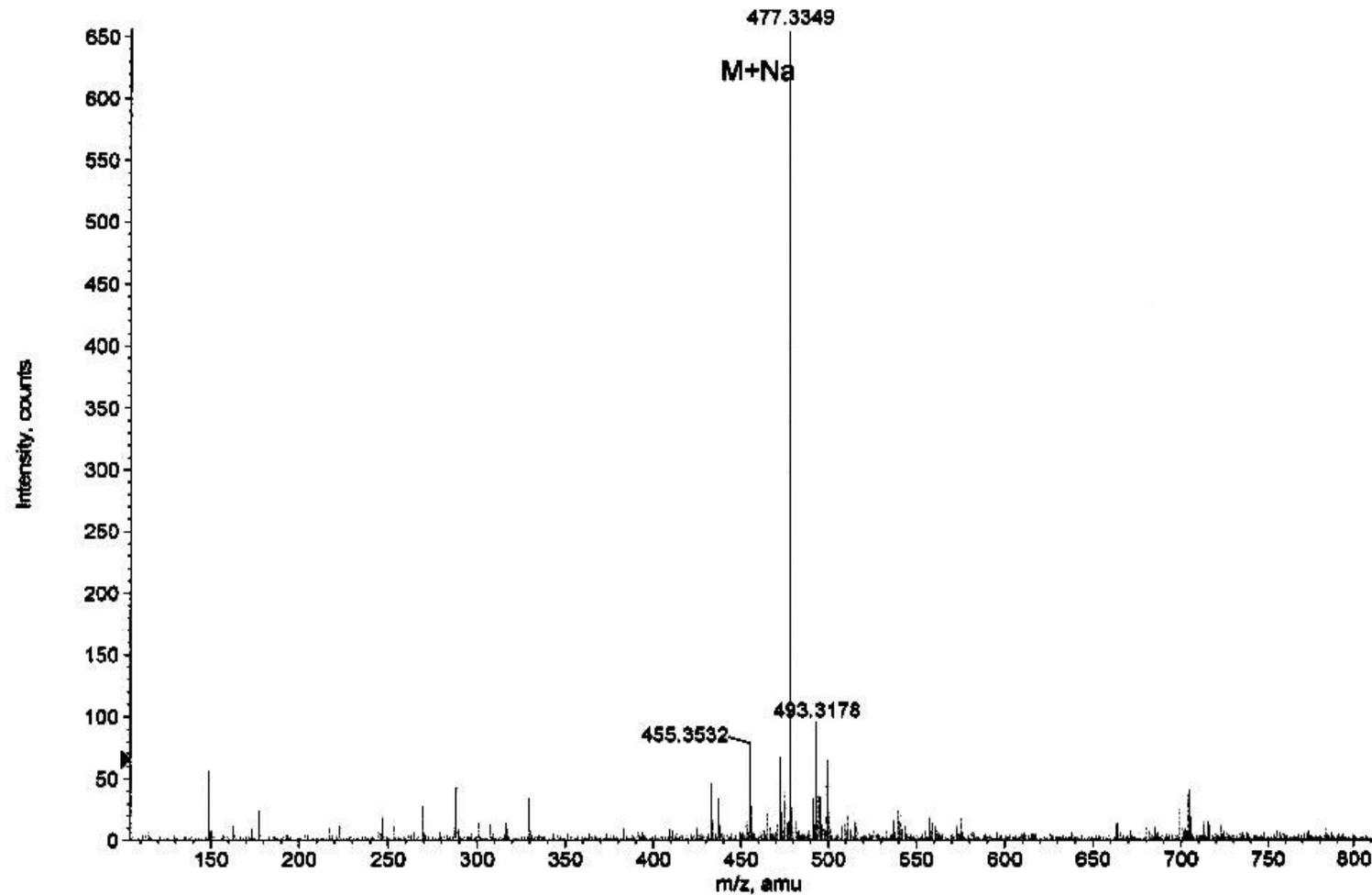


Figura 19 – Espectro de massas obtido para a substância P2A (FAB, TOF MS).

4.2.2 Substância 5E2C

A substância 5E2C, isolada da “fração apolar” do extrato etanólico de *X. pterygolephara* (itens 3.8 e 3.9), é incolor e tem aspecto oleoso.

O espectro de varredura no UV obtido para 5E2C (Figura 20 a) revelou máximos de absorção nos comprimentos de onda de 265,0, 268,8 e 271,6 nm, sugerindo a presença de anel benzênico substituído. Após a adição de seis gotas de solução de NaOH a 0,5 mol/l à cubeta contendo solução metanólica de 5E2C (0,5% p/v) não foi observado deslocamento batocrômico, indicando que a molécula não apresenta hidroxilas fenólicas ou grupos ácidos (Figura 20 b).

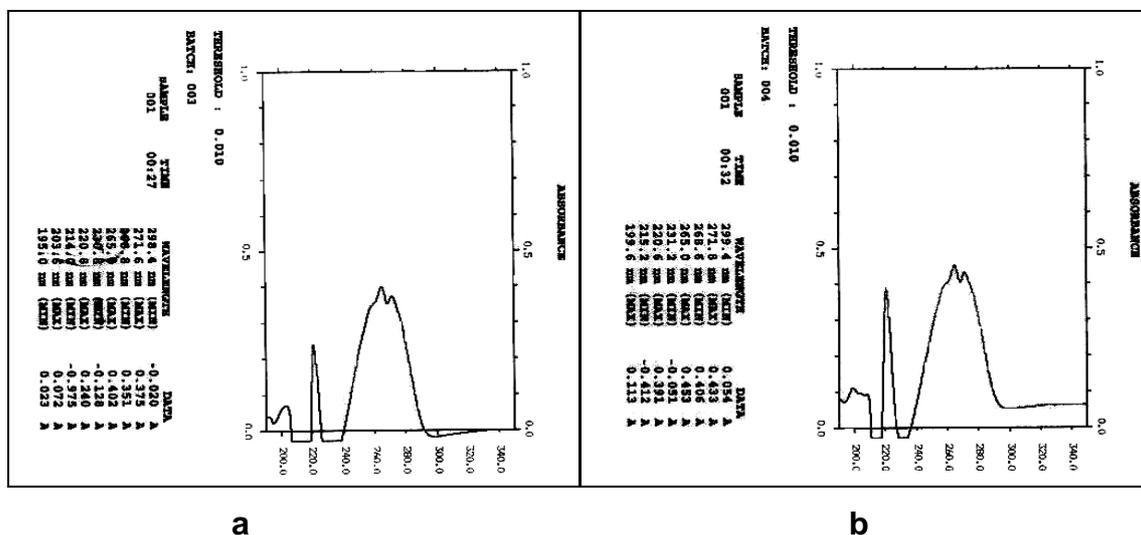


Figura 20 – Espectros de varredura no UV obtidos para a substância 5E2C. (a) Espectro da solução metanólica; (b) espectro da solução metanólica após a adição de NaOH.

O espectro no IV obtido para 5E2C (Figura 21) confirmou a natureza aromática da substância, evidenciado pela presença das bandas em aproximadamente 1605, 1500 e 1461 cm^{-1} , relativas ao estiramento C=C de aromático. O espectro mostra, também, a presença de grupos alifáticos evidenciados pelas bandas de estiramento C-H em 2954, 2932 e 2861 cm^{-1} . Observa-se, ainda, uma banda intensa em 1720 cm^{-1} , atribuída a estiramento C=O de grupo carbonila de éster, além de uma banda de intensidade média a forte em 1606 cm^{-1} , atribuída a estiramento C=O de carbonila de lactona ligada a anel aromático. As bandas em 1267 e 1219 cm^{-1} foram atribuídas a estiramento assimétrico C-O-C de éster, enquanto aquelas em 1116 cm^{-1} e 1093 cm^{-1} correspondem a estiramento simétrico C-O-C de éster.

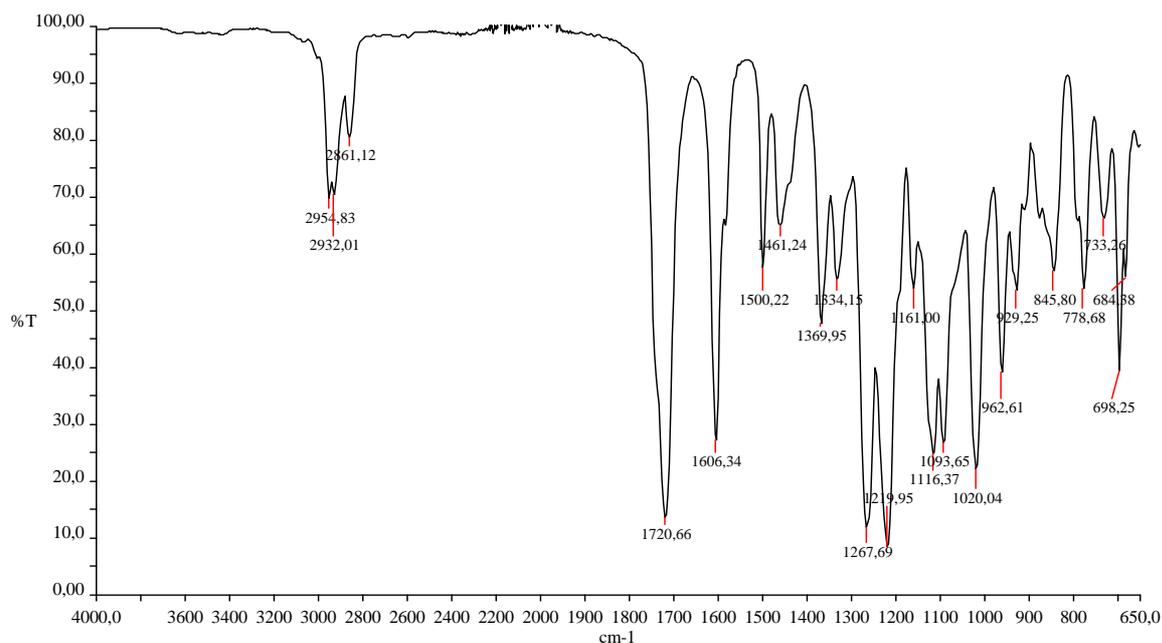


Figura 21 – Espectro no IV (cm^{-1}) obtido para a substância 5E2C.

O espectro de RMN de ^{13}C desacoplado obtido para a substância 5E2C (100 MHz, CDCl_3 , δ) (Fig. 22) apresentou sinais correspondentes a 17 carbonos, cuja análise do sub-espectro DEPT-135 (Fig. 22) revelou tratar-se de 3 CH_3 , 4 CH_2 , 5 CH e 5 C não hidrogenados.

O espectro de RMN de ^1H (Fig. 23 e 24) obtido para 5E2C (400 MHz, CDCl_3 , δ) apresenta sinais correspondentes a 3 hidrogênios aromáticos, sendo um duplete duplo centrado em δ 7,03 ppm ($J = 7,2$ e $2,8$ Hz), um duplete em δ 7,02 ppm ($J = 2,8$ Hz), e um duplete em δ 8,09 ppm ($J = 7,2$ ppm), revelando que o anel aromático é trissubstituído.

Os valores de J obtidos indicam acoplamento *orto* entre dois hidrogênios ($J = 7,2$ Hz) e acoplamento *meta* de um deles com o terceiro hidrogênio ($J = 2,8$ Hz). Esses dados sugerem o padrão de substituição 1,2,4 para o anel aromático.

O espectro de correlação homonuclear COSY (Fig. 25 e 26) mostra que há correlação entre o duplete duplo em δ 7,03 ppm e o sinal em δ 8,09 ppm, confirmando a relação *orto* entre esses dois hidrogênios. A análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMQC (Fig. 27) mostra as correlações entre o sinal em δ 7,02 ppm com o sinal de C em δ 113,33 ppm (C-5), entre o H em δ 7,03 ppm com o C em δ 116,33 ppm (C-7) e entre o H em δ 8,09 ppm com o C em

δ 132,54 ppm (C-8). Essas correlações possibilitaram a atribuição dos deslocamentos químicos dos sinais de carbonos aromáticos hidrogenados.

O espectro de correlação heteronuclear HMBC (Fig. 28) mostra que há correlação entre C-5 e H-7, e também indica correlação de C-5 com um duplete em δ 5,87 ppm ($J = 2,0$ Hz), hidrogênio esse que está ligado ao carbono em δ 67,03 ppm, atribuído a C-4 pelo espectro de HMQC, sendo que este se encontra fora do anel aromático. O H-7 apresenta ainda, no espectro de HMBC, correlação com um carbono aromático e não hidrogenado em δ 117,63 ppm, atribuído a C-9. Este sinal de carbono também apresenta correlação com C-4 no espectro de HMBC.

O espectro HMBC mostra, ainda, que há correlação entre H-8 e três sinais de carbono: um sinal em δ 138,69 ppm foi atribuído a C-10, um carbono aromático não hidrogenado, segundo a análise do sub-espectro DEPT-135. Os outros dois sinais de carbono que apresentam correlação com H-8 estão em δ 164,44 e 163,97 ppm, valores de deslocamentos químicos muito semelhantes, que podem ser atribuídos à carbonila de éster ou de lactona ligada a anel aromático, assim como podem ser atribuídos a carbono aromático ligado a grupo metoxila. A presença de grupo metoxila foi evidenciada pelo sinal no espectro de RMN de ^{13}C em δ 55,72 ppm, que apresenta correlação no espectro de HMQC com o simpleto em δ 3,88 ppm, com integral de 3 H. Para atribuição desses sinais foi utilizado o programa de simulação de espectro ACD/ChemSketch[®]. Assim, atribuiu-se o sinal de carbono em δ 164,44 ppm à carbonila ligada ao anel aromático (C-1), e o sinal em δ 163,97 ppm ao C aromático ligado a grupo metoxila (C-6). O espectro de HMBC mostra, também, que há correlação entre esse sinal de carbono (δ 163,97 ppm) e um simpleto em δ 3,88 ppm com integral de 3 H, característico de grupo CH_3 de metoxila, confirmando a atribuição. De posse desses dados, obteve-se a estrutura parcial da molécula, representada na Figura 29.

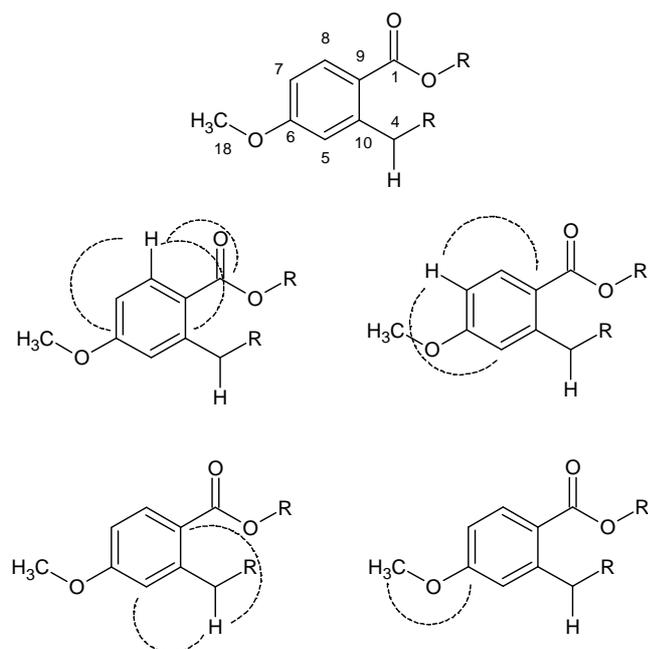


Figura 29 – Estrutura parcial proposta para 5E2C a partir de correlações heteronucleares observadas no espectro HMBC.

O valor de deslocamento químico de C-4 (δ 67,03 ppm) é característico de carbono ligado a oxigênio e, pelo espectro de HMBC, observa-se uma correlação entre o duplete atribuído a H-4 (δ 5,87 ppm, $J = 2,0$ Hz, 1 H) e o sinal de carbono em δ 170,40 ppm, valor característico de carbonila de éster, sendo este atribuído à C-16. O COSY mostra uma correlação entre H-4 e um multiplete em δ 4,53 ppm, sendo este atribuído a H-3. Por sua vez, o espectro HMQC indicou a correlação entre H-3 e um sinal em δ 79,29 ppm, atribuído a C-3. A vizinhança entre C-3 e C-4 permite concluir que existe um segundo anel na molécula; portanto, um anel lactônico (Fig. 30). O HMBC indica, também, o sinal atribuído à correlação entre C-16 e um simpleto em δ 2,07 ppm, característico de CH₃ de grupo acetoxila. Por sua vez, esses hidrogênios estão ligados ao sinal em δ 20,84 ppm, atribuído a C-17, segundo dados do espectro HMQC.

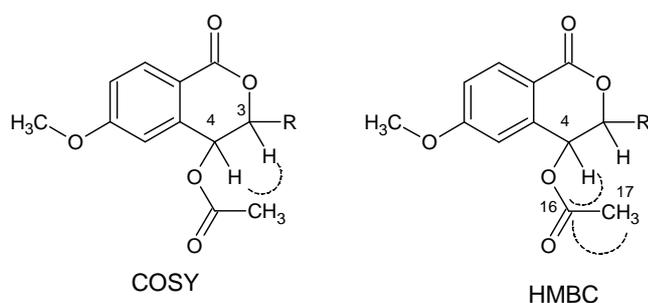


Figura 30 – Correlação homonuclear (COSY) entre H-3 e H-4 e correlações heteronucleares (HMBC) entre C-16 e H-4 e C-16 e H-17.

O sinal atribuído a H-3 apresenta uma correlação com um multipletto em δ 1,91 ppm, segundo indicado pelo espectro COSY. O espectro de HMQC mostra que este multipletto está ligado ao sinal em δ 31,47 ppm, atribuído a C-11, cujo sub-espectro DEPT-135 indica ser um CH₂.

A análise do espectro COSY indica a conectividade do sistema de spins dos hidrogênios que compõem a cadeia alifática substituinte ligada a C-3. Assim, o multipletto atribuído a H-11 (δ 1,91 ppm) está ligado a outro multipletto (H-12, δ 1,70 ppm, 2 H), que também se conecta ao sinal em δ 1,35 ppm (4 H, m). O espectro de HMQC mostra que esses hidrogênios (δ 1,35 ppm) estão ligados a dois carbonos (δ 30,51 e 22,43 ppm), cujo análise do subespectro DEPT-135 indicou tratar-se de grupo CH₂.

O espectro COSY indica, ainda, que o multipletto em δ 1,35 ppm está conectado ao tripleto em δ 0,90 ppm, com integral de 3 H, sinal característico de grupo CH₃ terminal de cadeia alifática. Esses dados permitem concluir que a cadeia alifática substituinte em C-3 é um grupo *n*-pentila. A atribuição dos valores de deslocamento químico dos sinais de carbono dessa cadeia foi feito com base nas correlações heteronucleares observadas no espectro HMQC. No caso de C-13 e C-14, também foi utilizada a simulação do espectro no programa ACD/ChemSketch[®]. As atribuições dos espectros de RMN de ¹³C e de ¹H para a substância 5E2C estão dispostas nas Tabelas 21 e 22, respectivamente.

Tabela 21 - Atribuições dos sinais dos espectros de RMN de ^{13}C para a molécula 5E2C

Carbono	Valor de C (δ , ppm)	DEPT-135
C-1	164,4	C
C-3	79,3	CH
C-4	67,0	CH
C-5	113,3	CH
C-6	163,9	C
C-7	116,3	CH
C-8	132,5	CH
C-9	117,6	C
C-10	138,7	C
C-11	31,5	CH ₂
C-12	24,6	CH ₂
C-13	30,5	CH ₂
C-14	22,4	CH ₂
C-15	13,9	CH ₃
C-16	170,4	C
C-17	20,8	CH ₃
C-18	55,7	CH ₃

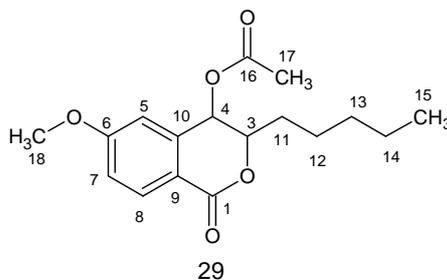
Dados obtidos em CDCl_3 , 100 MHz.

Tabela 22 - Atribuições dos sinais do espectro de RMN de ^1H para a molécula 5E2C

Hidrogênio	Atribuição (δ , ppm)
H-3	4,53 <i>m</i>
H-4	5,87 <i>d</i> (2,0 Hz)
H-5	7,02 <i>d</i> (2,8 Hz)
H-7	7,03 <i>dd</i> (2,8 e 7,2 Hz)
H-8	8,09 <i>d</i> (7,2 Hz)
H-11	1,91 <i>m</i>
H-12	1,70 <i>m</i>
H-13	1,35 <i>m</i>
H-14	1,35 <i>m</i>
H-15	0,90 <i>t</i> (7,2 Hz)
H-17	2,07 <i>s</i>
H-18	3,88 <i>s</i>

Dados obtidos em CDCl_3 , 400 MHz.

Os dados espectrais analisados possibilitaram propor a estrutura representada abaixo (**29**).

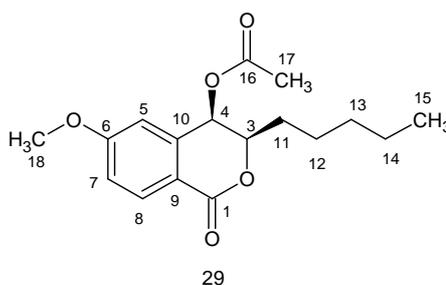


Trata-se de uma diidroisocumarina, de nome 6-metóxi-3,4-dihidro-4-acetóxi-5-*n*-pentil-1H-2-benzopirano-1-ona. A estrutura proposta tem massa molecular

calculada de 306,35358 Da, e é condizente com os dados do espectro de massa (Fig. 31), no qual se observou o pico do íon quasi-molecular m/z 329,1299 ($[M + 23]^+$ ou $[M + Na]^+$) e um pico m/z 307,1513 ($[M + 1]^+$ ou $[M + H]^+$), sugerindo M em m/z 306.

4.2.2.1 Determinação da configuração absoluta de 5E2C

A diidroisocumarina 5E2C (**29**) possui dois centros quirais, (C-3 e C-4) e, portanto, faz-se necessário determinar sua configuração absoluta. Inicialmente foram analisados os dados espectrais de RMN obtidos para a substância, que forneceram uma indicação da configuração relativa desses centros.



O espectro de RMN de ^1H de 5E2C forneceu um $J_{3,4}$ de 2,0 Hz que é condizente com acoplamento do tipo axial-equatorial ou equatorial-equatorial, mas não compatível com acoplamento *trans*-diaxial, que apresenta J típico de 8-10 Hz (SILVERSTEIN *et al*, 1994).

O mapa de correlação espacial NOESY (Fig. 32) não apresenta correlação alguma entre os hidrogênios metílicos H-17 (δ 2,07 ppm) e outros hidrogênios da molécula, sugerindo a localização do grupo acetoxila no anel heterocíclico. O mesmo acontece para o grupo *n*-pentila, substituinte de C-3. Esses resultados são confirmados pelos deslocamentos químicos de C-3, C-4. Por sua vez, o espectro NOESY apresenta uma correlação bastante definida entre H-3 (δ 4,53 ppm) e H-4 (δ 5,87 ppm), indicando a proximidade espacial desses hidrogênios, demonstrando sua relação *syn* (Fig. 33).

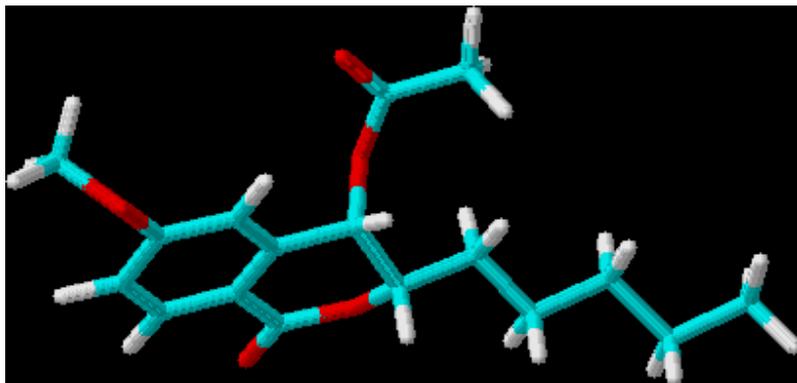


Figura 33 – Representação espacial da substância 5E2C.

A determinação da configuração absoluta de diidroisocumarinas é usualmente realizada a partir de dados espectrais de dicroísmo circular. Na região de absorção de uma determinada banda espectral, a luz polarizada circular orientada para a direita e a luz polarizada circular orientada para a esquerda propagam-se com velocidades diferentes e são absorvidas em extensões distintas (SNATZKE, 1968). Este comportamento é denominado “dicroísmo circular” e pode ser descrito de forma simplificada pela diferença nos coeficientes de absorção molar da luz polarizada circular orientada para a direita (d) e para a esquerda (e), conforme representado na equação a seguir (KOCK, 2005).

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_d - \varepsilon_e$$

O espectro de dicroísmo circular (DC) é característico para um determinado cromóforo. Diidroisocumarinas possuem um cromóforo benzenolida cujas propriedades quiro-ópticas já foram sistematicamente investigadas (ANTUS *et al.*, 1983). Para substâncias dessa classe, sabe-se que o efeito Cotton resultante da transição $n \rightarrow \pi^*$ pode ser utilizado de maneira satisfatória para estabelecer a configuração absoluta do carbono quiral do anel heterocíclico, uma vez que o sinal do efeito Cotton é independente do padrão de substituição do anel aromático (KROHN *et al.*, 1997).

Assim, a fim de determinar a configuração absoluta de 5E2C foi registrado seu espectro de dicroísmo circular na região entre 220-300 nm (Figura 34; Tabela 23).

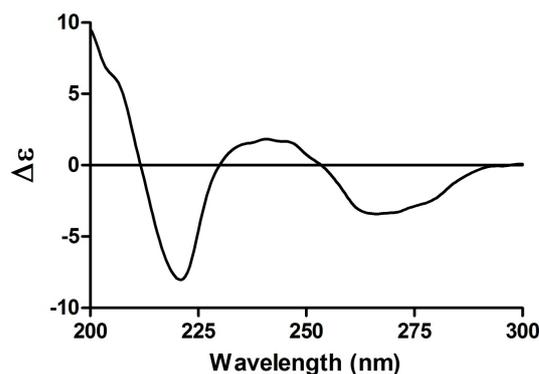


Figura 34 - Espectro de dicroísmo circular obtido para a substância 5E2C (dados obtidos em metanol, na concentração de 0,02 mg/ml).

No espectro de DC obtido foram observadas três bandas de efeito Cotton. A banda com sinal negativo em 266,5 nm foi atribuída à transição $n \rightarrow \pi^*$. Essa atribuição baseou-se na comparação com dados espectrais de DC relatados para outras diidroisocumarinas, sendo o valor de absorção da banda bastante característico para essa transição.

Tabela 23 – Dados do espectro de dicroísmo circular obtido para 5E2C

λ (nm)	$\Delta\epsilon$
294,5	0
266,5	-3,48
253,5	0
240,0	1,90
230,0	0
221,5*	-8,11

De acordo com a regra da helicidade do cromóforo benzenolida, baseada no sinal da banda para a transição $n \rightarrow \pi^*$ de derivados de diidroisocumarinas com conformação fixa (ANTUS et al., 1983), o anel heterocíclico de 5E2C deve adotar uma conformação semi-cadeira (cadeira não é possível), na qual o grupo *n*-pentila ocupa a posição pseudo-equatorial, que gera menor compressão estérica (Figura 35).

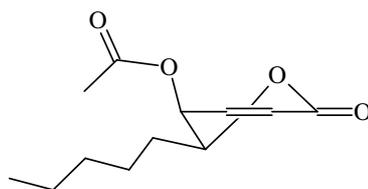


Figura 35 - Projeção para 5E2C do anel aromático para o anel heterocíclico (conformação semi-cadeira).

O sinal do efeito Cotton (Fig. 34) da banda correspondente à transição a transição $n \rightarrow \pi^*$ é utilizado para determinar a estereoquímica absoluta de C-3 (R para banda com sinal negativo e S para banda com sinal positivo), conforme relatado anteriormente para a 6-hidroxi-meleína e diversas outras diidroisocumarinas (Fig. 36) (KROHN *et al.*, 1997; SCHLINGMANN & ROLL, 2005).

Assim, o valor negativo do efeito Cotton da banda em 266,5 nm ($\Delta\epsilon = -3,48$) registrado para 5E2C indica a estereoquímica R para o centro quiral C-3. Na Figura 39 encontra-se reproduzido o espectro de DC relatado para os dois enantiômeros da 6-hidroxi-meleína e é possível comparar a semelhança do espectro obtido para 5E2C com aquele do enantiômero R. Considerando a relação *cis* entre os substituintes de C-3 e C-4 de 5R2C, respectivamente os grupos *n*-pentila e a acetoxila, demonstrada pelos dados de RMN de ^1H e NOESY, pôde-se determinar a configuração absoluta de C-4 como sendo R. Com base nesses dados, a estrutura de 5E2C foi proposta como sendo (3R,4R)-(-)-6-metóxi-3,4-diidro-4-acetóxi-5-*n*-pentil-1H-2-benzopirran-1-ona.

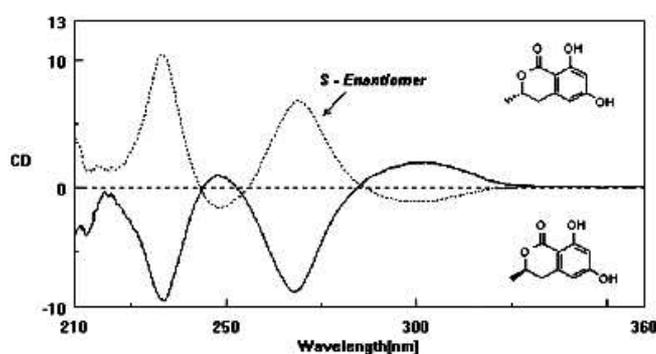
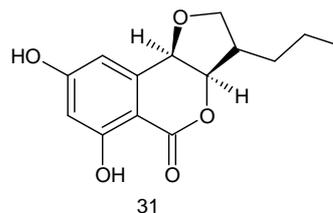
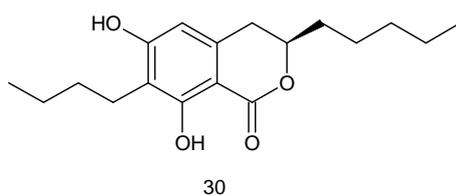


Figura 36 - Espectro de dicroísmo circular dos enantiômeros R e S da 6-hidroxi-meleína (Fonte: SCHLINGMANN & ROLL, 2005).

Na revisão da literatura não foram encontrados relatos sobre a ocorrência dessa substância como produto natural ou sintético. A maioria das diidroisocumarinas já descrita apresenta substituintes em C-3, e um composto (7-butiril-6,3-diidróxi-3(R)-pentilisocroman-1-ona) (**30**) contendo o grupo *n*-pentila nessa posição foi isolado do fungo endofítico *Ceotrichum* sp. (KONGSAEREE *et al.*, 2003). A ocorrência de diidroisocumarinas com substituintes em C-3 e C-4 é ainda menos usual. Entre as substâncias já relatadas cabe destacar a monocerina (**31**), inicialmente isolada de *Helminthosporium monoceras* e posteriormente de diversos

fungos, cuja estereoquímica absoluta também foi determinada como sendo 3R,4R (GROVE & POPLE, 1979).

Cabe destacar que esse é o primeiro relato de ocorrência de uma diidroisocumarina em uma espécie de *Xyris*, e também na família Xyridaceae. Por outro lado, duas isocumarinas denominadas xyridinas A (**13**) e B (**14**) foram previamente isoladas de *Xyris indica* (FOURNIER *et al.*, 1975; RUANGRUNGSI *et al.*, 1995).



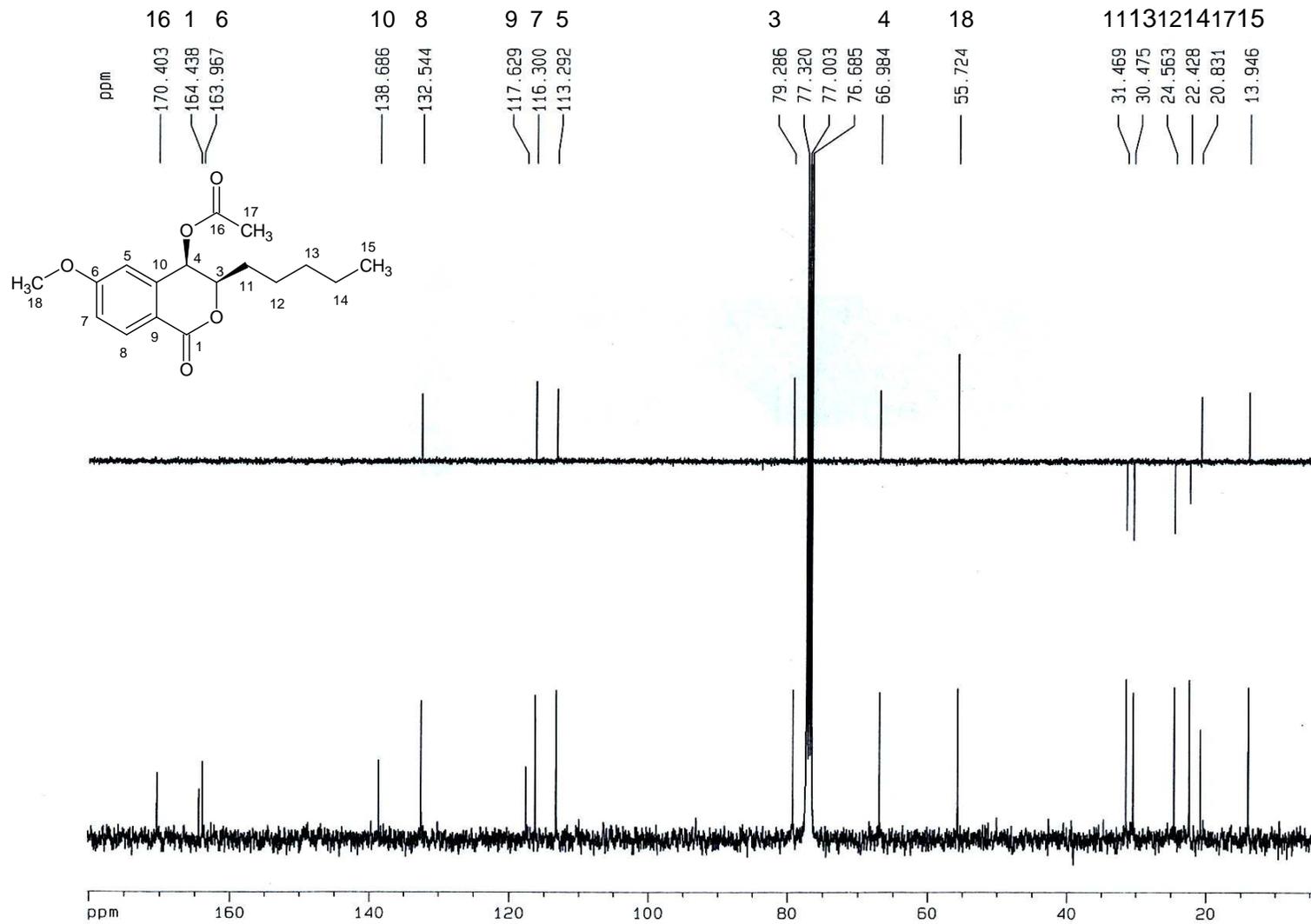


Figura 22 – Espectro de RMN de ¹³C e sub-espectro DEPT-135 obtidos para a substância 5E2C (CDCl₃, 100 MHz).

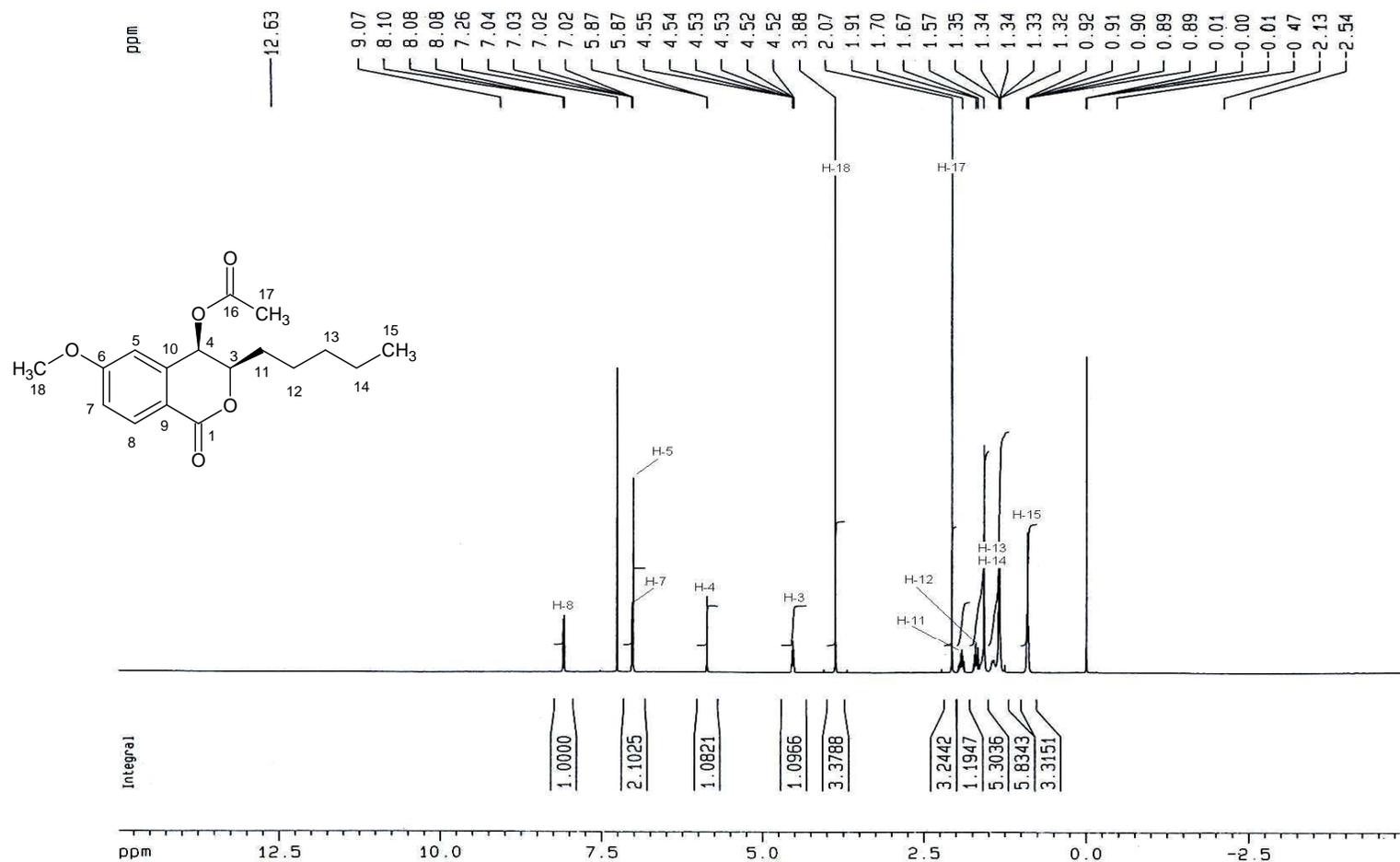


Figura 23 – Espectro de RMN de ¹H obtido para a substância 5E2C (CDCl₃, 400 MHz).

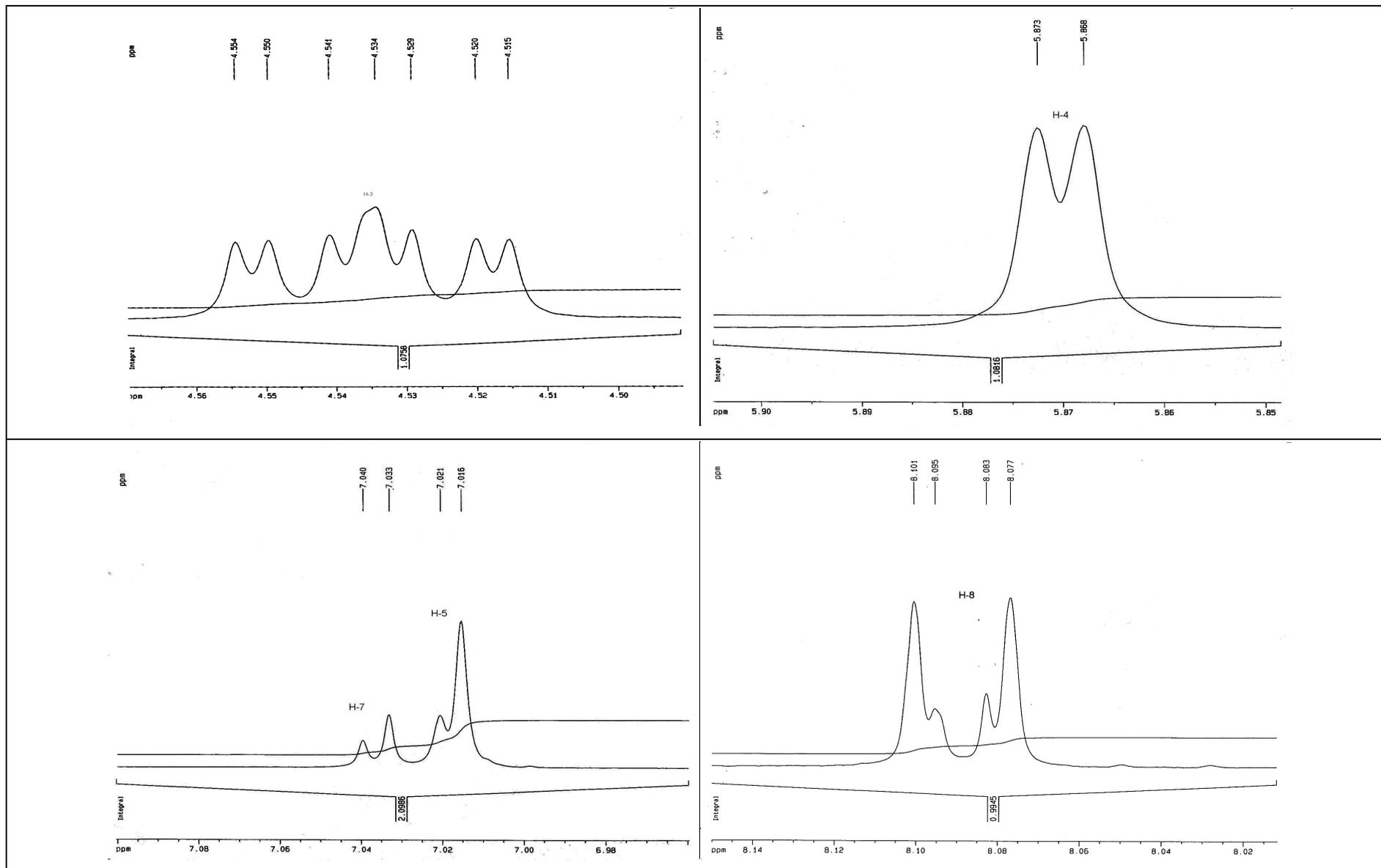


Figura 24 – Expansões do espectro de RMN de ¹H obtido para a substância 5E2C (CDCl₃, 400 MHz).

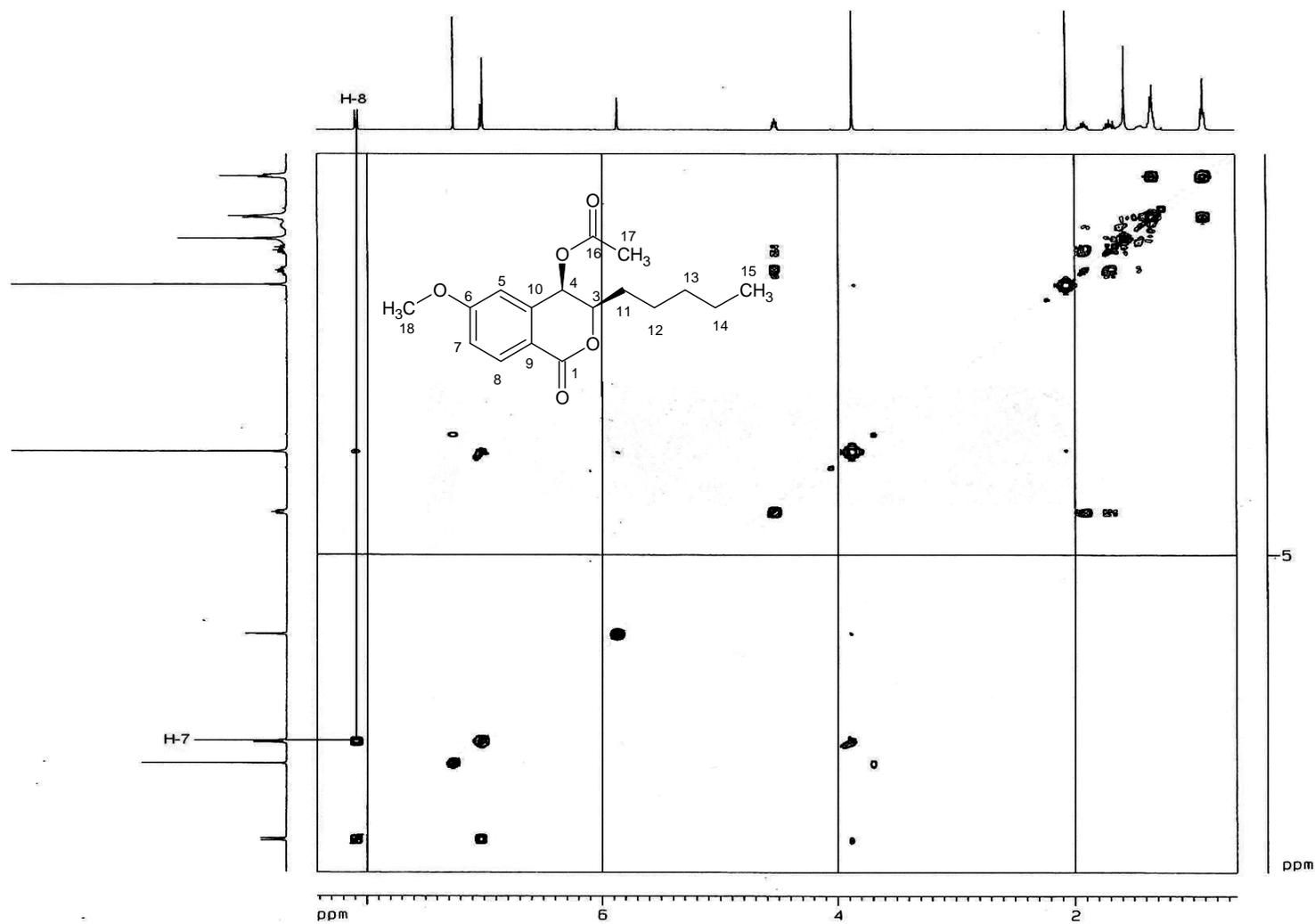


Figura 25 – Espectro de correlação homonuclear COSY obtido para 5E2C.

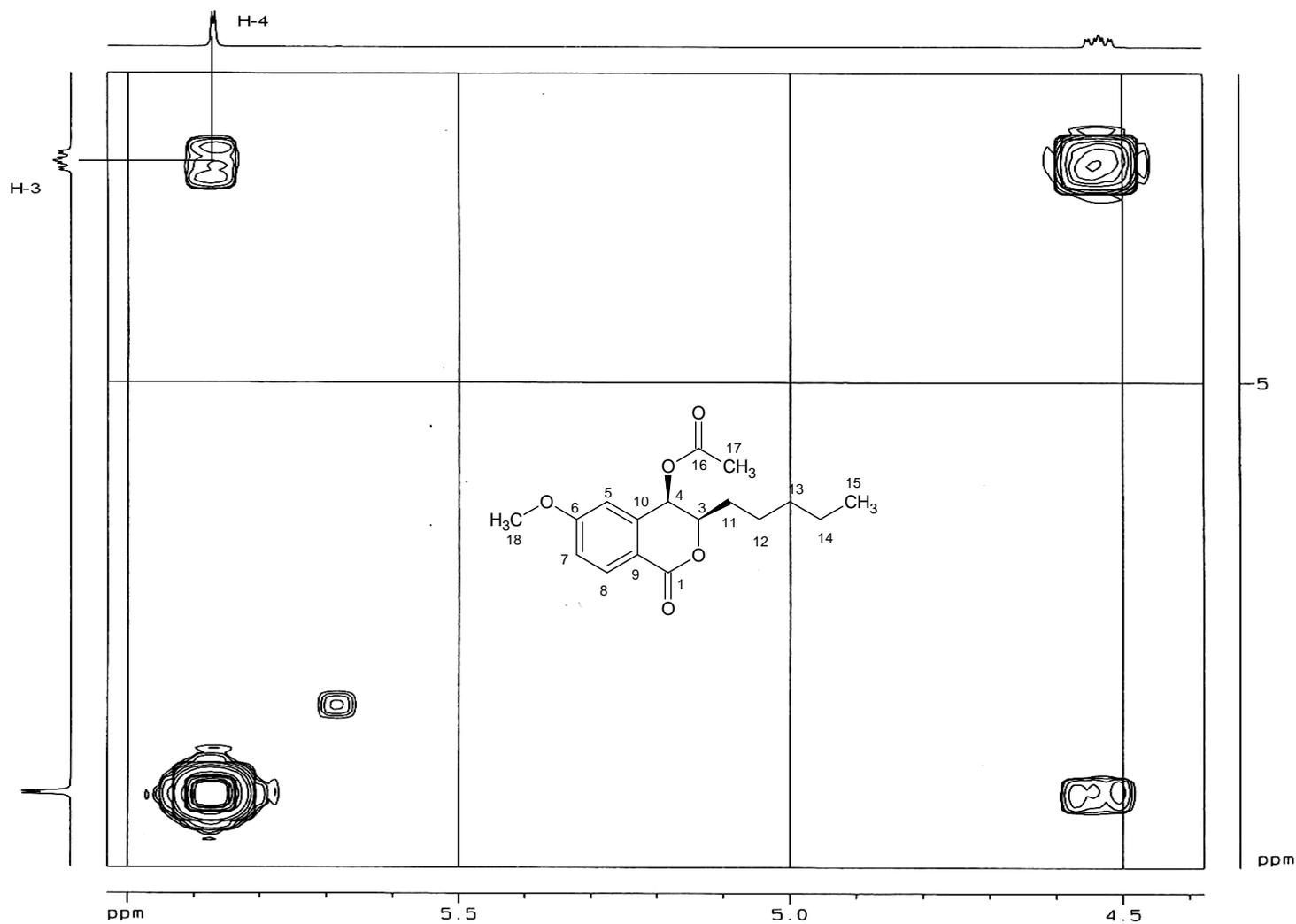


Figura 26 – Expansão do espectro de correlação homonuclear COSY obtido para 5E2C.

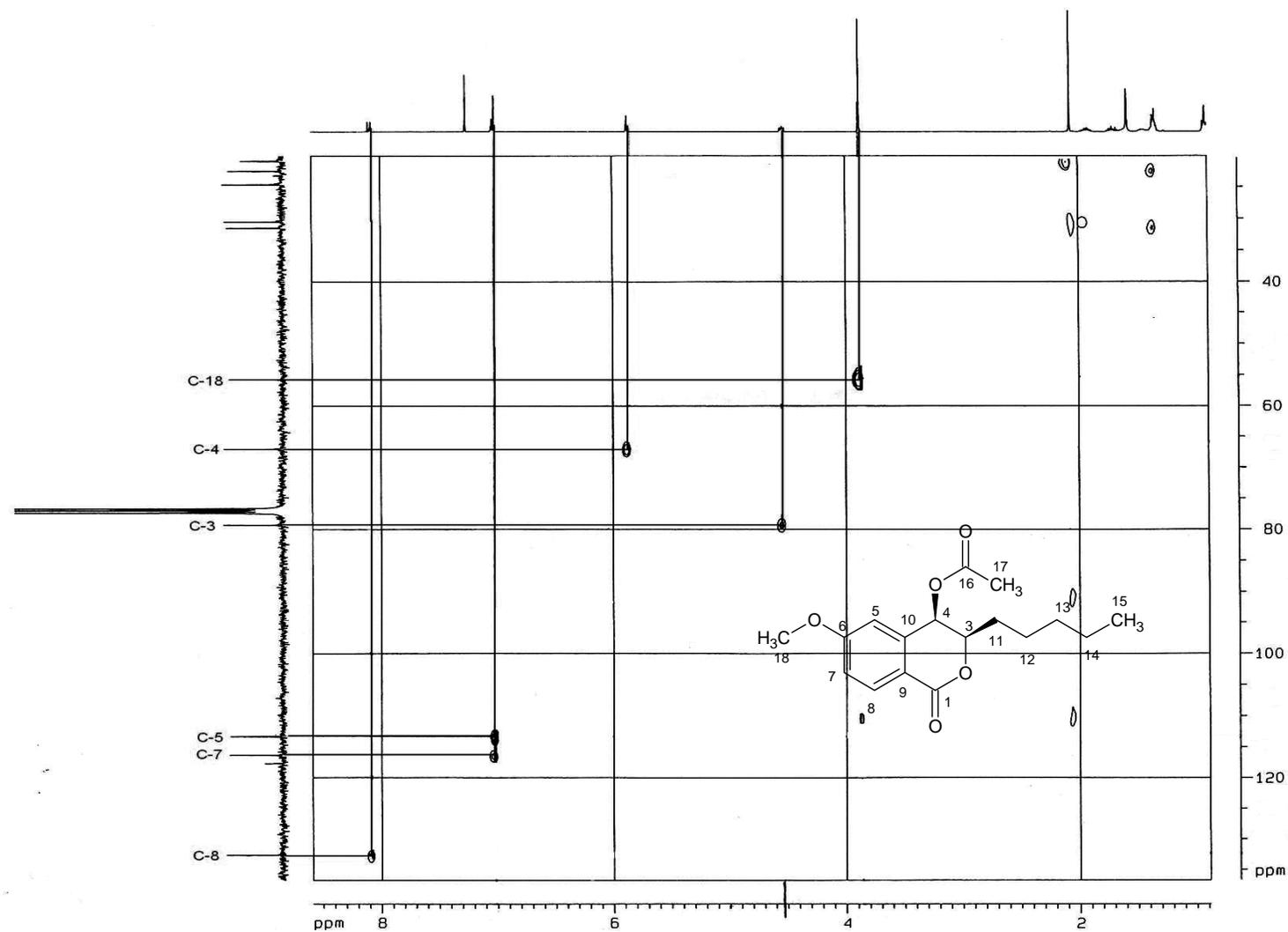


Figura 27 – Espectro de correlação heteronuclear HMQC obtido para 5E2C.

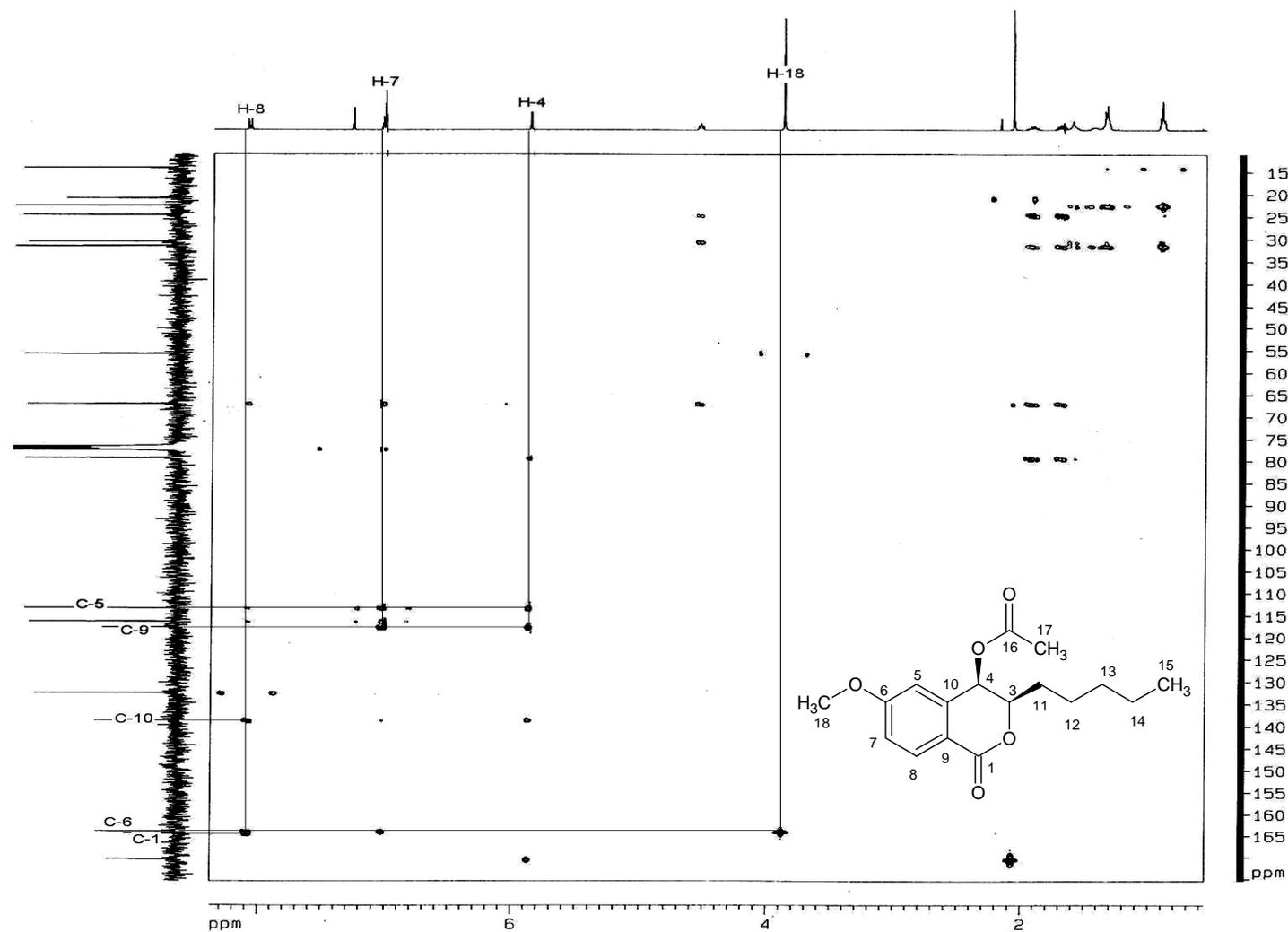


Figura 28 – Espectro de correlação heteronuclear HMBC obtido para 5E2C.

+TOF MS: 0.267 min from Sample 2 (fcb1) of jul280511.wiff
 a=3.56433672989811090e-004, t0=-1.54310274846466200e+001 R; subtracted (0.017 to 0.067 ...

Max. 919.51

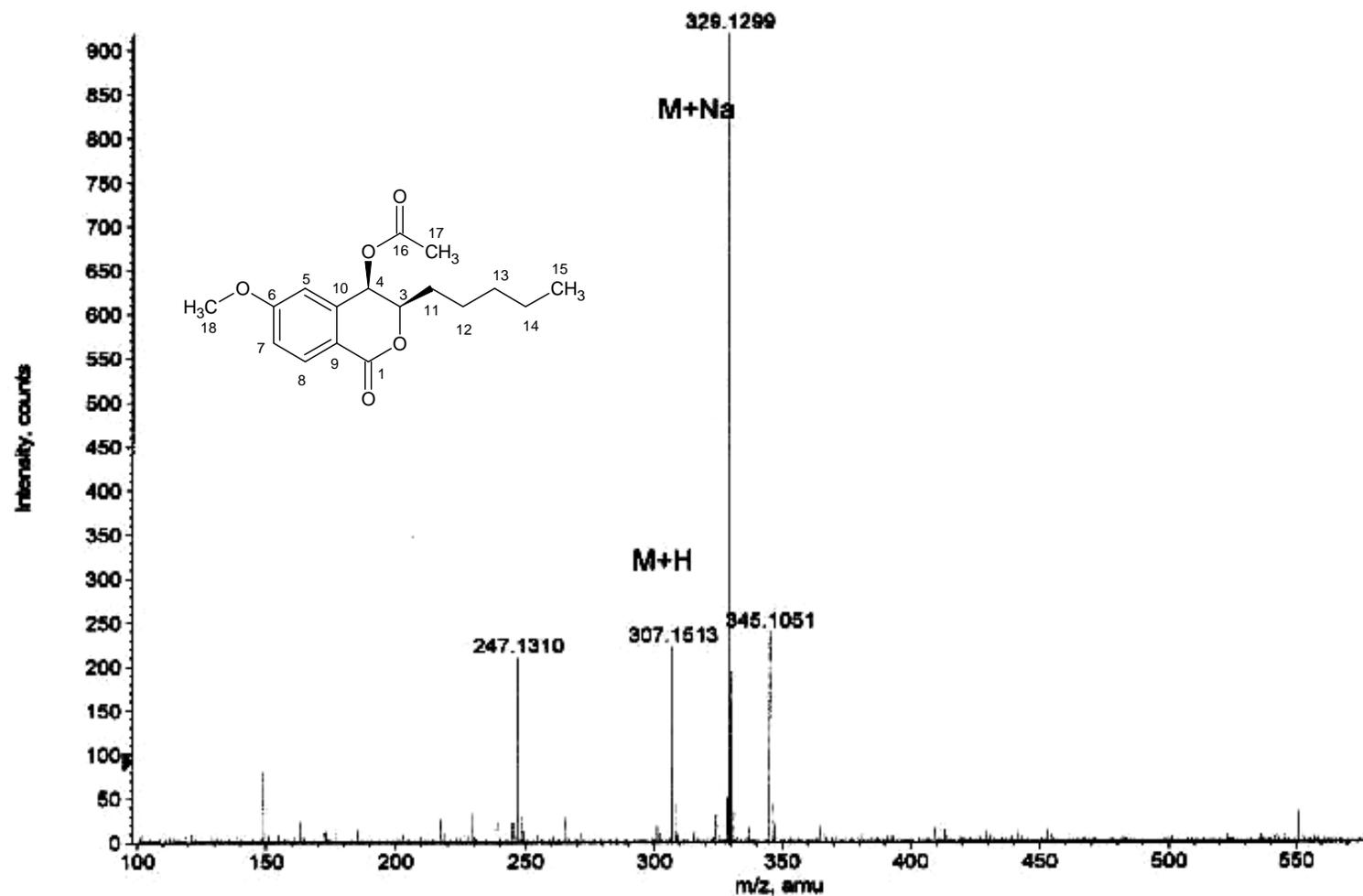


Figura 31 – Espectro de massas obtido para a substância 5E2C (FAB, TOF MS).

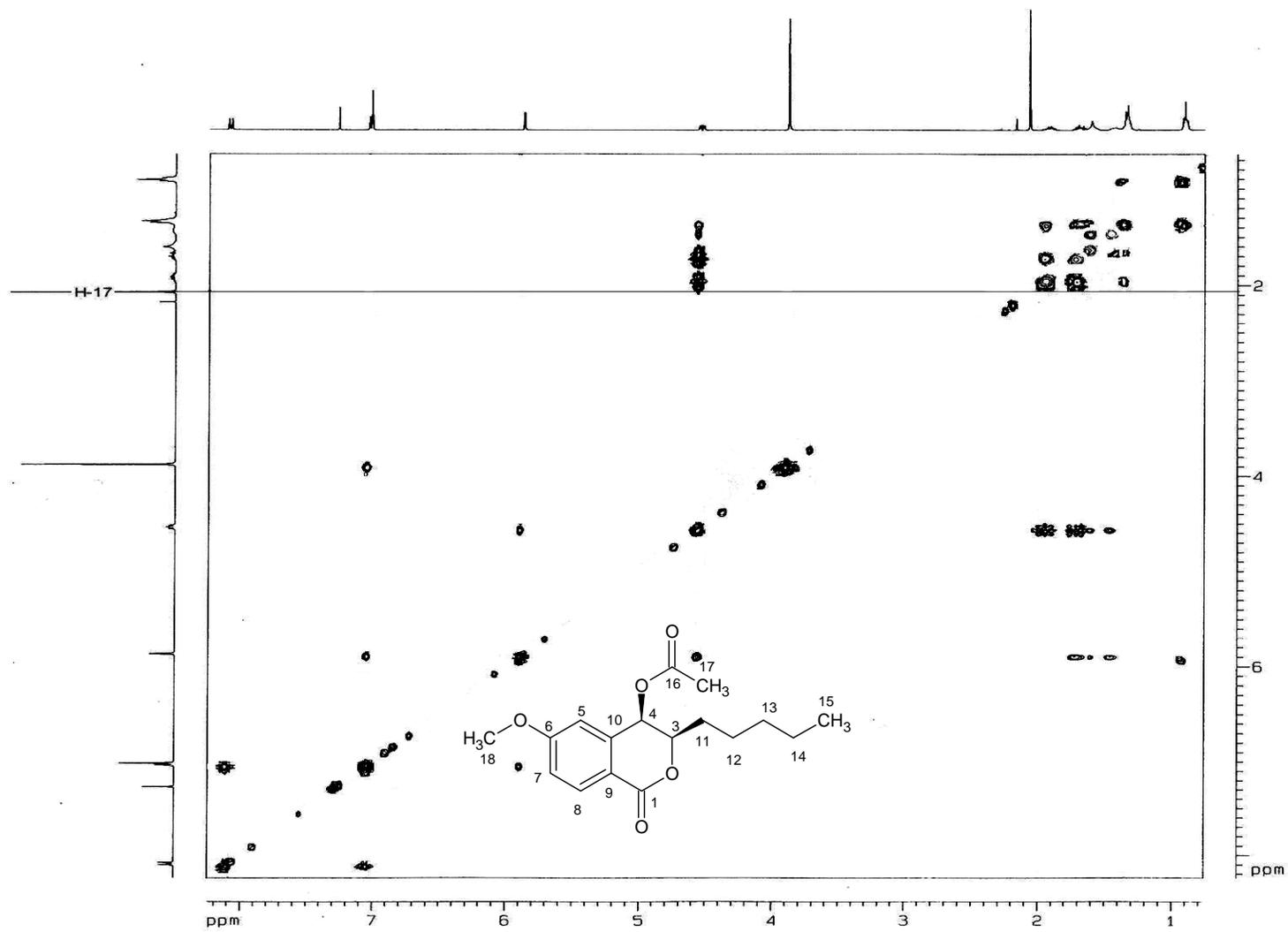


Figura 32 – Mapa de correlação espacial homonuclear NOESY obtido para 5E2C.

4.2.3 Substância B2

A substância B2, obtida da “fração polar” do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* (item 3.8.1), foi isolada como um sólido amarelo com PF de 313,1 – 315,7 °C.

O espectro de RMN de ^{13}C obtido para B2 (Fig. 37) apresentou sinais referentes a 15 carbonos, cuja natureza foi identificada pelo sub-espectro DEPT-135 (Fig. 37) como sendo 5 CH e 10 C não hidrogenados. Esse dado sugere que B2 seja uma aglicona de flavonóide, devido ao número de átomos de carbono (C6-C3-C6, totalizando 15 átomos de carbono no esqueleto da estrutura).

O espectro de RMN de ^1H obtido para C2 (Fig. 38 e 39) apresenta sinais com integrais relativas a 10 átomos de hidrogênio, sendo 5 deles na região de aromáticos (δ entre 6 e 8 ppm) e os demais em campo mais alto (δ entre 9,2 e 12,5 ppm), com valores de deslocamentos químicos característicos de H de hidroxilas.

O sinal em δ 175,70 ppm indica a presença de uma carbonila. O fato de todos os sinais de carbono estarem em campo alto, acima de δ 93,17 ppm, sugere que a estrutura possua mais de um anel aromático.

Com base na polaridade da fração da qual foi isolado o sólido, no seu aspecto físico e pelo fato de cloreto de alumínio ter se mostrado um bom revelador para o composto em CCD, com intensificação da cor amarela e da fluorescência sob luz UV₂₆₅, havia a suspeita de que B2 seria um flavonóide. Essa suspeita foi confirmada pelo espectro no UV registrado no detector de DAD (Fig. 40), que apresenta λ_{max} em 254,4 nm, característico de banda benzoíla, e 368,4 nm, característico de banda cinamoíla.

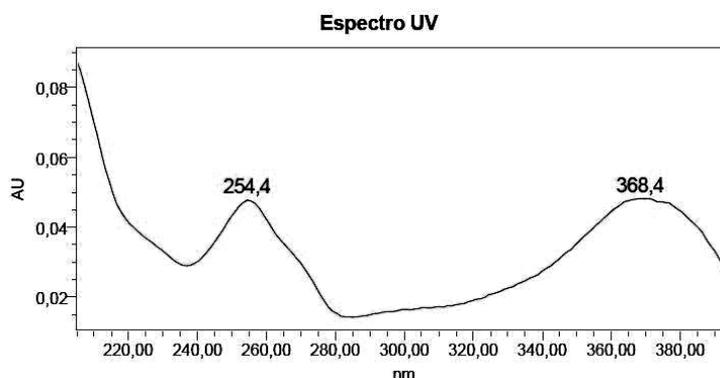


Figura 40 – Espectro de varredura no UV obtido para a substância B2.

O mapa de correlação homonuclear COSY (Fig. 41) mostra a correlação entre o duplete em δ 6,38 ppm e o duplete em δ 6,17 ppm ($J = 2,0$ Hz) indicando localização *meta* entre eles e mostrando que esse anel segue um padrão 1,2,3,5 de substituição (OH em 5 e 7). O espectro de correlação heteronuclear HMQC (Fig. 42) mostra a correlação entre esses hidrogênios em δ 6,38 e 6,17 ppm com os sinais em δ 93,17 (C-8) e 98,05 (C-6) ppm, respectivamente.

O COSY mostra ainda a correlação entre o duplete em δ 6,87 ppm e o duplete duplo em δ 7,54 ppm ($J = 8,4$ Hz), sugerindo localização *orto* entre eles. Há, ainda, uma correlação entre este duplete duplo e o duplete em δ 7,69 ppm ($J = 2,4$ Hz), indicando localização *para* entre eles. Essas correlações e suas respectivas constantes de acoplamento mostram que o segundo anel aromático da molécula segue um padrão 1,3,4 de substituição (OH em 3' e 4'). De acordo com o HMQC, esses hidrogênios (δ 6,87, 7,54 e 7,69 ppm) estão correlacionados com os sinais em δ 119,8 (C-6'), 115,42 (C-5') e 114,97 (C-2') ppm, respectivamente.

A presença de 5 hidroxilas na molécula e os padrões de substituição dos anéis A e C não deixam dúvidas de que a genina em questão seja a quercetina. As demais atribuições dos sinais de carbono foram feitas por comparação com dados existentes na literatura e estão descritas na Tabela 24. A Tabela 25 mostra as atribuições dos sinais de hidrogênio.

Tabela 24 - Atribuição dos sinais de RMN de ^{13}C para B2

Carbono	1 Valor de C (δ , ppm)	DEPT-135	2 Valor descrito na literatura(δ , ppm)
C-2	146,6	C	146,9
C-3	135,6	C	135,8
C-4	175,7	C	175,9
C-5	156,0	C	156,2
C-6	98,1	CH	98,3
C-7	163,8	C	164,0
C-8	93,2	CH	93,5
C-9	160,7	C	160,8
C-10	102,9	C	103,1
C-1'	121,9	C	122,1
C-2'	115,0	CH	115,2
C-3'	144,9	C	145,1
C-4'	147,5	C	147,7
C-5'	115,4	CH	115,7
C-6'	119,8	CH	120,1

1 - Dados obtidos em DMSO, 100 MHz.

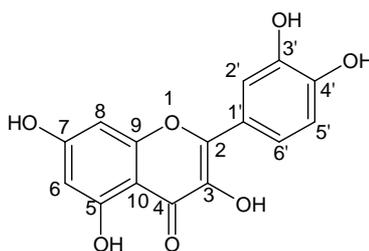
2 - BREITMAIER & VOELTER, 1987.

Tabela 25 - Atribuição dos sinais de RMN de ^1H para B2

Hidrogênio	Atribuição (δ , ppm)
H-6	6,17 <i>d</i> (2,0 Hz)
H-8	6,38 <i>d</i> (2,0 Hz)
H-2'	7,69 <i>d</i> (2,4 Hz)
H-5'	7,54 <i>dd</i> (2,4 e 8,4 Hz)
H-6'	6,87 <i>d</i> (8,4 Hz)

Dados obtidos em DMSO, 400 MHz.

Os dados espectrais analisados possibilitaram propor a estrutura representada abaixo (**32**).



32

Até o presente momento, não há relato da ocorrência de quercetina (**32**) em espécies de *Xyris*. Porém, o flavonóide ramnocitrina-3-O-glicosídeo (**16**), cuja aglicona é a quercetina, foi isolado de *X. longiscapa*. Outros flavonóides isolados de espécies de *Xyris* são crisoeriol (**15**), de *X. itatiayensis*, e luteolina-7- β -D-glicopiranosídeo (**17**) de *X. itatiayensis*, *X. longiscapa* e *X. obtusiuscula* (VARANDA *et al.*, 2001).

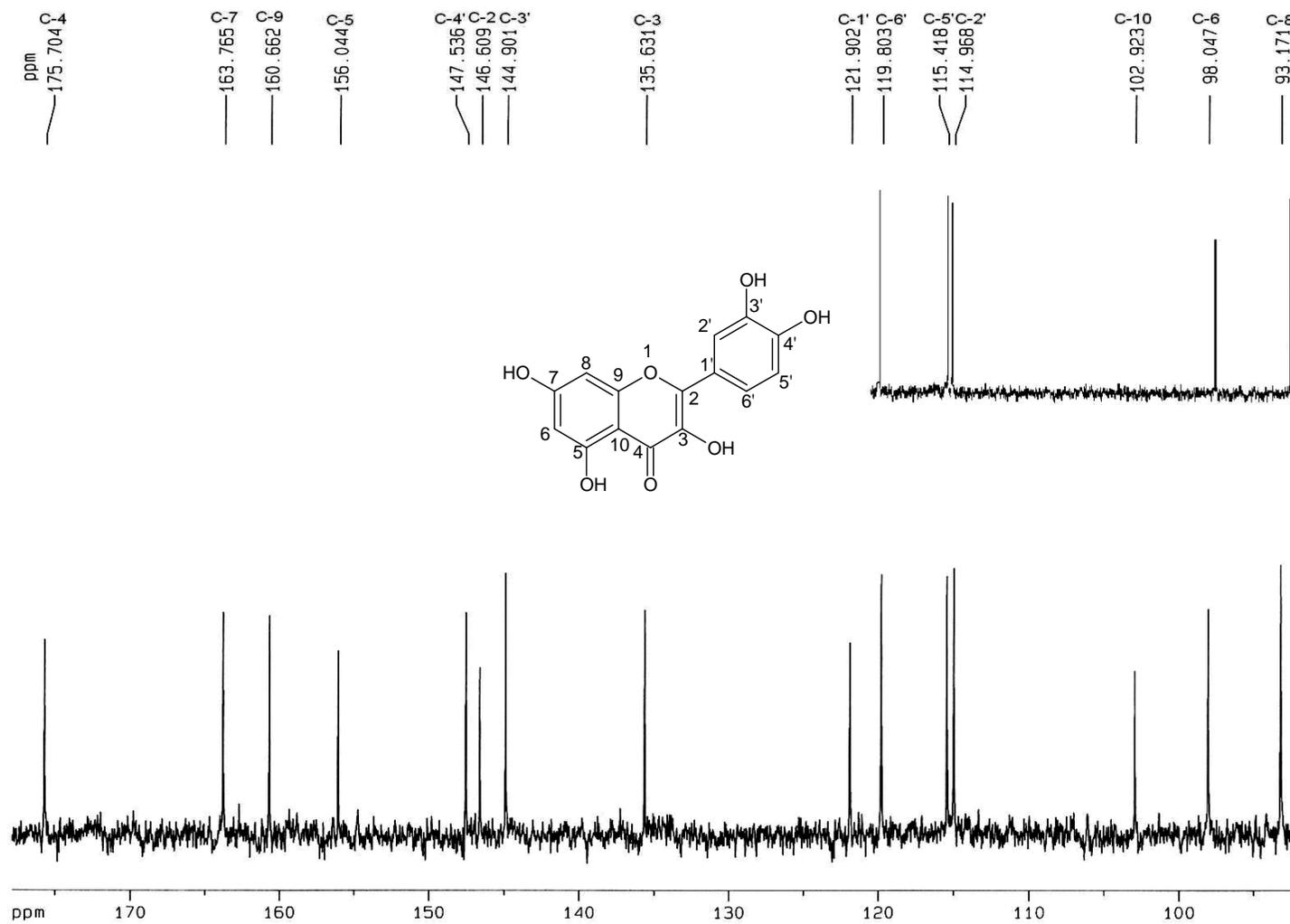


Figura 37 – Espectro de RMN de ¹³C obtido para a substância B2 (DMSO, 100 MHz).

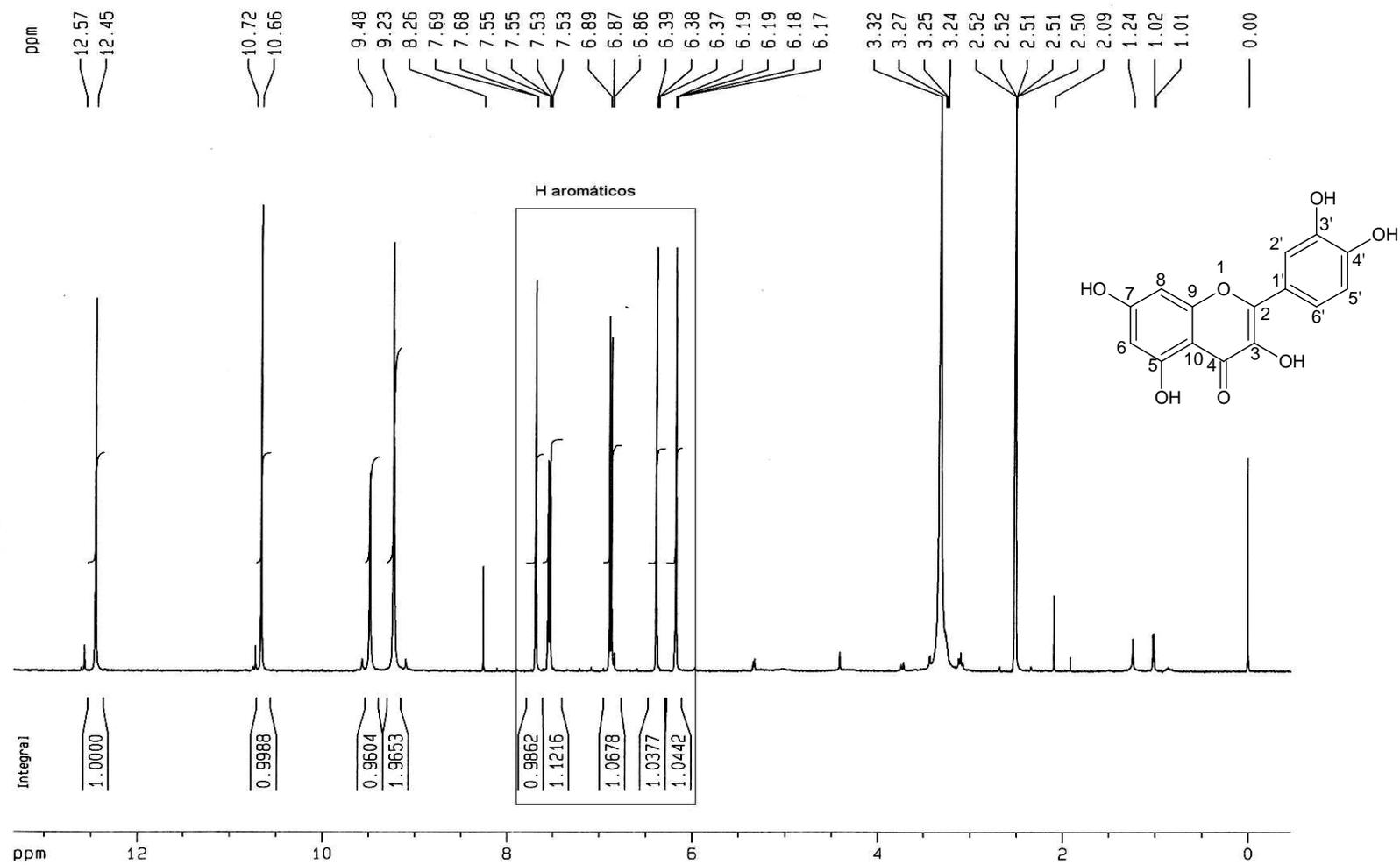


Figura 38 – Espectro de RMN de ¹H obtido para B2 (DMSO, 400 MHz).

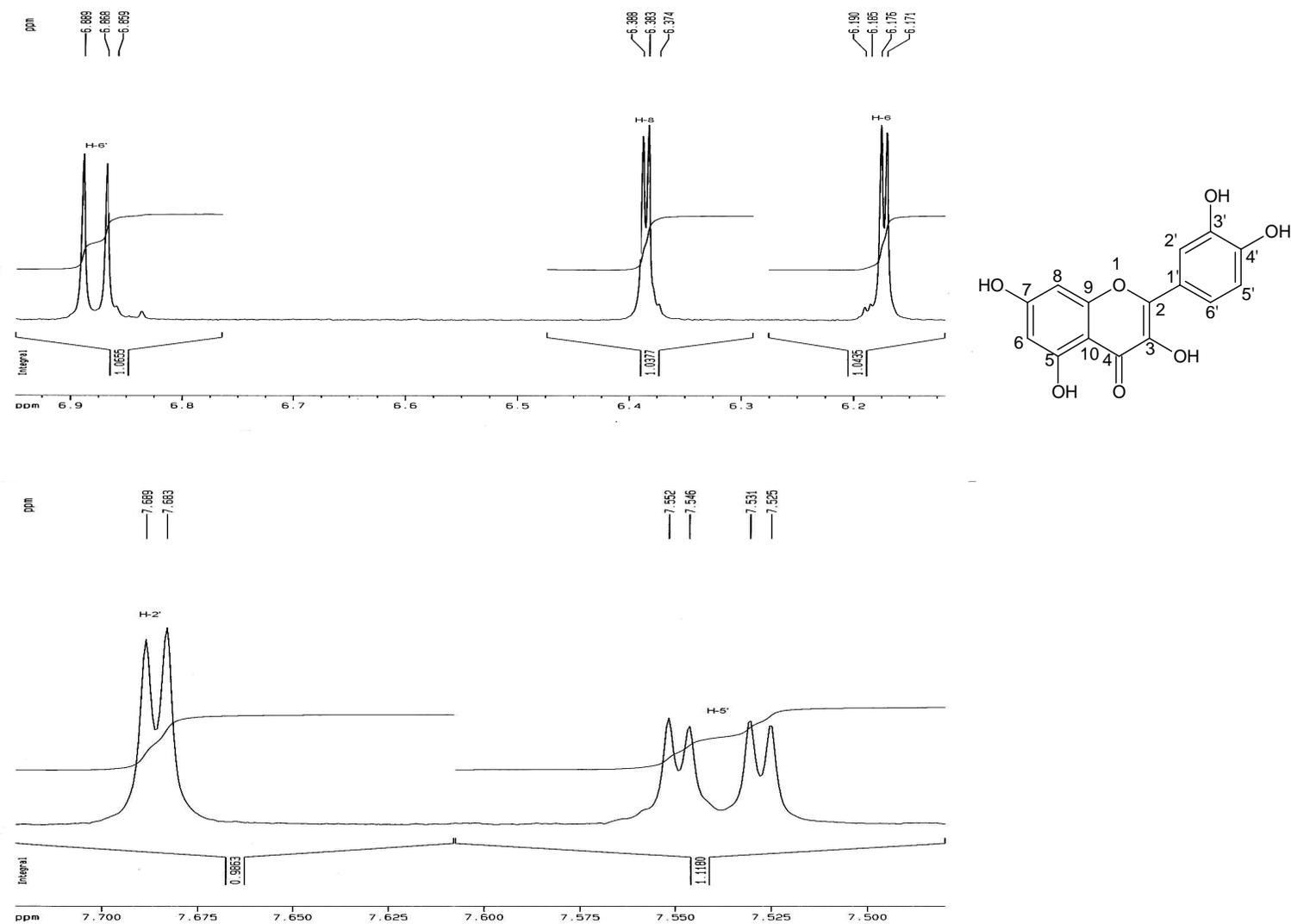


Figura 39 – Expansões do espectro de RMN de ¹H obtido para B2 (DMSO, 400 MHz).

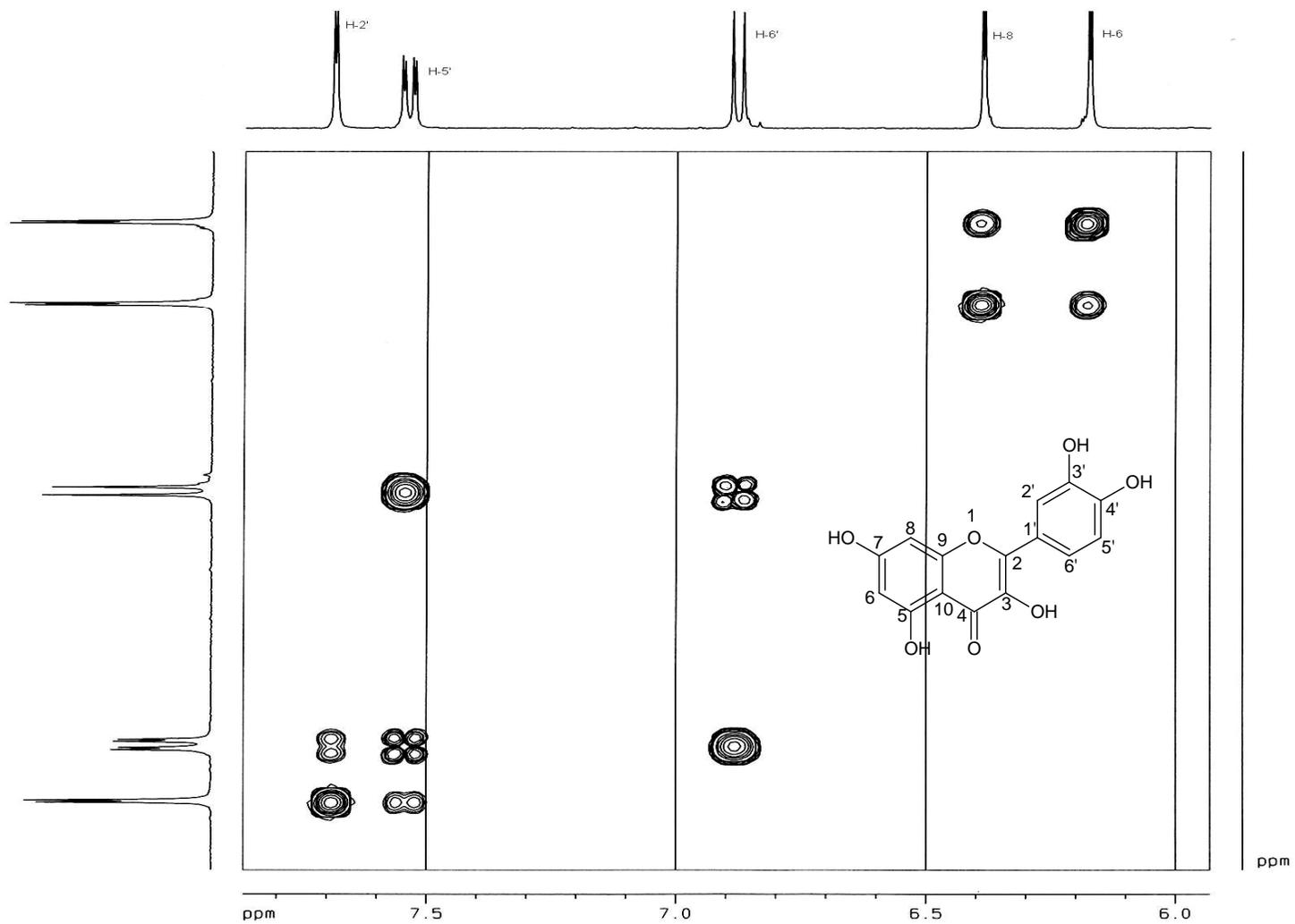


Figura 41 – Espectro de correlação homonuclear COSY obtido para B2 (DMSO, 400 MHz).

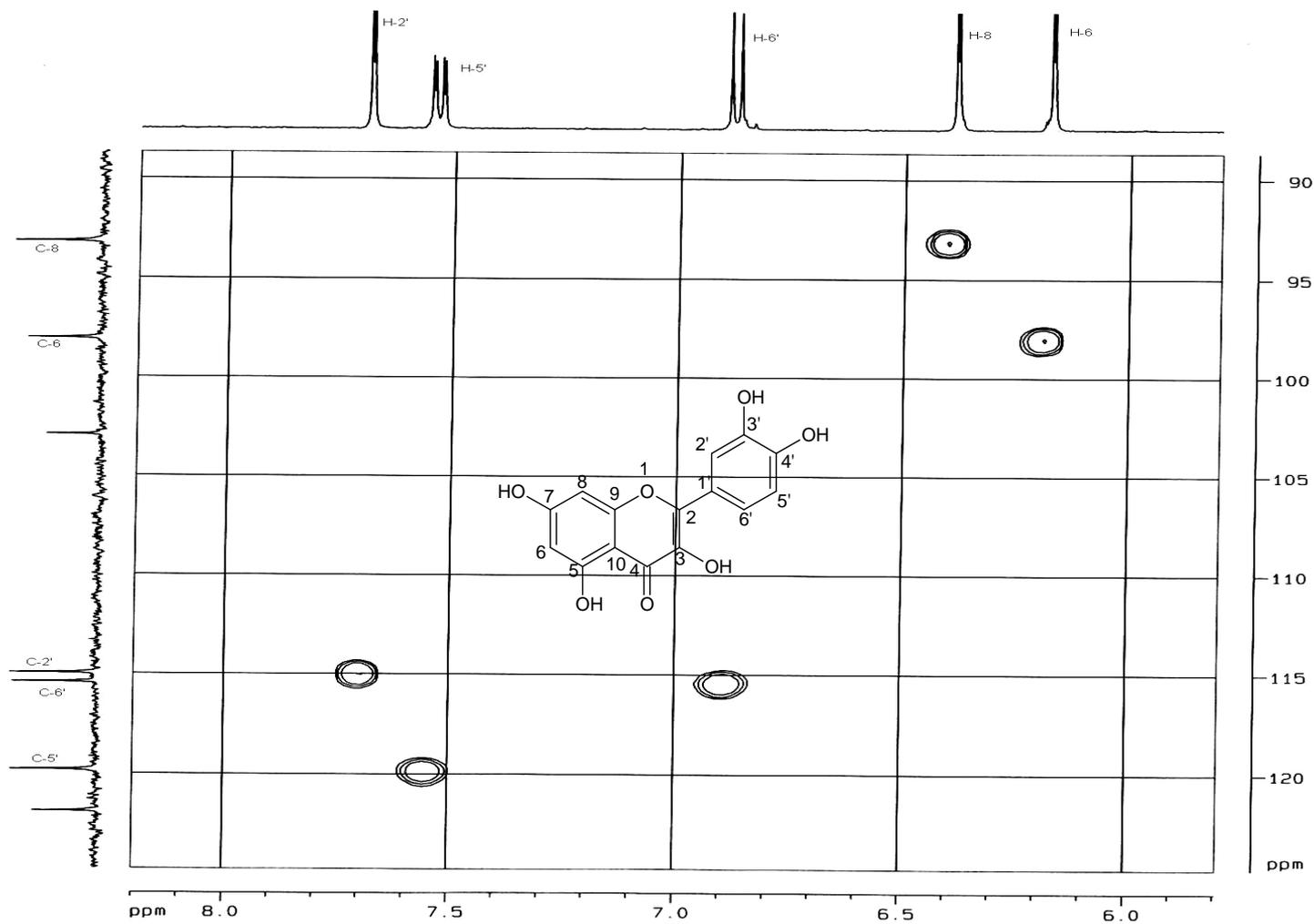


Figura 42 – Espectro de correlação heteronuclear HMBC obtido para B2.

5.1 Atividade antimicrobiana *in vitro* dos extratos e frações

5.1.1 Ensaio de difusão em ágar

Os extratos etanólicos das 8 espécies em estudo, as frações em *n*-hexano, acetato de etila e água, resultantes da partição do extrato etanólico de *X. pterygoblephara* entre solventes imiscíveis, bem como a substância 5E2C foram avaliadas contra *Bacillus subtilis*. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 26.

Tabela 26 – Diâmetros dos halos de inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* determinados pelo método de difusão em ágar

Espécie	Amostra	Halo de inibição (mm, média ± desvio padrão; n = 6).
<i>T. laniflora</i>	EE folhas	9,7 ± 1,0
	EE caule	-
<i>X. cipoensis</i>	EE	-
<i>X. longiscapa</i>	EE	11,5 ± 1,6
<i>X. peregrina</i>	EE	-
<i>X. pilosa</i>	EE	10,7 ± 2,2
<i>X. platystachia</i>	EE	-
<i>X. tortula</i>	EE	11,5 ± 1,0
	EE	-
	Fr <i>n</i> -hexano	-
	Fr acetato de etila	-
<i>X. pterygoblephara</i>	Fr aquosa	-
	Substância 5E2C	-
	Cloranfenicol	11,6 ± 1,5

Nota: (-), ausência de atividade na concentração avaliada. EE, extrato etanólico (2 mg/disco); Fr, fração (1 mg/disco); cloranfenicol (3 µg/disco).

Nas condições do ensaio, apenas os extratos etanólicos de *T. laniflora* (folhas), *X. longiscapa*, *X. pilosa* e *X. tortula* foram ativos contra *B. subtilis*. A atividade antimicrobiana dessas espécies é descrita pela primeira vez no presente trabalho.

A proposta inicial do presente trabalho era avaliar a atividade antimicrobiana de todos os extratos e frações pelo método de difusão em ágar, frente aos microrganismos selecionados para estudo. O primeiro microrganismo ensaiado foi *B. subtilis*. No entanto, apesar de diversos relatos na literatura de avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais e de substâncias de baixa polaridade pelo método de difusão em ágar, alguns autores não recomendam esse método, sugerindo as técnicas de diluição como alternativa (RÍOS & RECIO, 2005).

Assim, os ensaios contra os demais microrganismos foram realizados pelo método de microdiluição (item 2.7.2).

5.1.2 Ensaios de microdiluição

A técnica de microdiluição foi utilizada para avaliação dos extratos, visando sanar as deficiências apresentadas pelo método de difusão em ágar. Por outro lado, na microdiluição existe a possibilidade de ocorrer precipitação de constituintes dos extratos e interferência da cor na leitura no UV (ELOFF, 1998). Visando minimizar esta interferência potencial, no presente trabalho foram empregados brancos, em triplicata, para cada concentração das amostras ensaiadas. Quando da execução do ensaio, os valores de absorbância das amostras foram descontados dos valores médios das leituras dos brancos.

Para os ensaios de microdiluição foram selecionadas cinco linhagens de microrganismos: duas de bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *B. subtilis*), uma de bactéria Gram-negativa (*P.aeruginosa*), uma de levedura (*C. albicans*) e uma de fungo filamentoso (*A. niger*). Os resultados obtidos nos ensaios de microdiluição estão dispostos na Tabela 27.

Nos Gráficos 1 a 5 são apresentadas curvas de concentração-atividade antimicrobiana (determinada como % de inibição) para a amostra mais ativa frente a cada microrganismo ensaiado.

Tabela 27 - Atividade antimicrobiana de extratos brutos das espécies em estudo e da substância 5E2C frente aos microrganismos ensaiados

Espécies vegetais	CI ₅₀ (µg/ml) ± desvio padrão				
	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>
<i>T. laniflora</i> (caule)	168,9 ± 8,0	319,6 ± 27,2	644,6 ± 19,0	-	-
<i>T. laniflora</i> (folhas)	209,1 ± 24,9	259,4 ± 16,4	422,9 ± 20,9	487,6 ± 38,1	772,3 ± 47,7
<i>X. cipoensis</i>	522,2 ± 46,5	608,9 ± 28,3	774,0 ± 19,5	> 1000	> 1000
<i>X. longiscapa</i>	-	241,9 ± 29,0	266,4 ± 18,5	967,3 ± 29,7	-
<i>X. peregrina</i>	190,2 ± 25,9	157,9 ± 12,3	357,0 ± 18,8	487,4 ± 25,4	710,4 ± 53,1
<i>X. pilosa</i>	319,3 ± 17,6	346,5 ± 20,6	369,5 ± 18,8	556,0 ± 46,2	> 1000
<i>X. platystachia</i>	767,2 ± 95,9	441,1 ± 56,8	856,9 ± 47,6	> 1000	-
<i>X. tortula</i>	252,0 ± 34,1	418,9 ± 17,7	743,8 ± 89,2	909,5 ± 41,5	> 1000
<i>X. pterygoblephara</i> :					
Extrato bruto	> 1000	747,6 ± 45,9	> 1000	> 1000	972,4 ± 21,3
Fr. água	924,3 ± 82,2	> 1000	878,5 ± 21,2	-	965,1 ± 18,6
Fr. acetato	622,8 ± 49,8	> 1000	851,6 ± 56,7	805,5 ± 53,6	> 1000
Fr. dicloro	> 1000	-	> 1000	-	-
Fr. hexano	276,5 ± 29,6	383,0 ± 39,2	920,4 ± 29,1	-	> 1000
5E2C	> 500	> 500	-	-	-

Nota: - não apresentou atividade nas concentrações ensaiadas.

Controles positivos: (a) gentamicina 4 µg/ml (100% inibição frente a *P. aeruginosa*), (b) cloranfenicol 4 µg/ml (100% inibição frente a *S. aureus* e *B. subtilis*), (c) fluconazol 4 µg/ml (100% inibição frente a *C. albicans*) e 64 µg/ml (100% inibição frente a *A. niger*).

Atividade de *T. laniflora* (caule)
contra *P. aeruginosa*

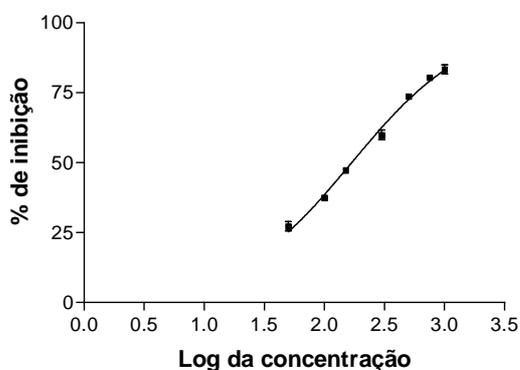


Gráfico 1 – Curva de log da concentração (µg/ml) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de *T. laniflora* frente a *P. aeruginosa*, determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI₅₀ do extrato.

Atividade de *X. peregrina*
contra *S. aureus*

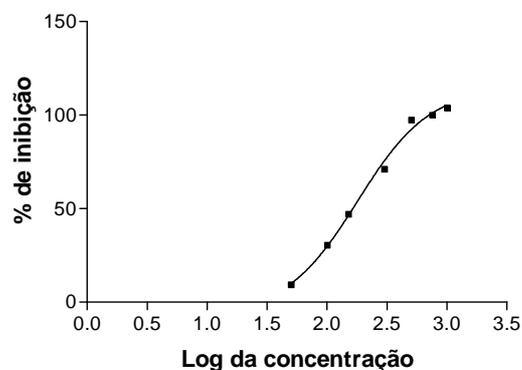


Gráfico 2 – Curva de log da concentração (µg/ml) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de *X. peregrina* frente a *S. aureus*, determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI₅₀ do extrato.

**Atividade de *X. longiscapa*
contra *B. subtilis***

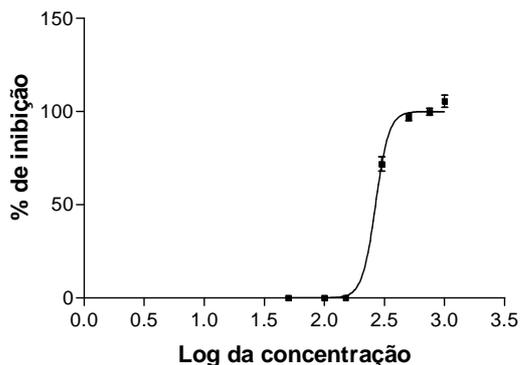


Gráfico 3 – Curva de log da concentração ($\mu\text{g/ml}$) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de *X. longiscapa* frente a *B. subtilis*, determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI_{50} do extrato.

**Atividade de *X. peregrina*
contra *C. albicans***

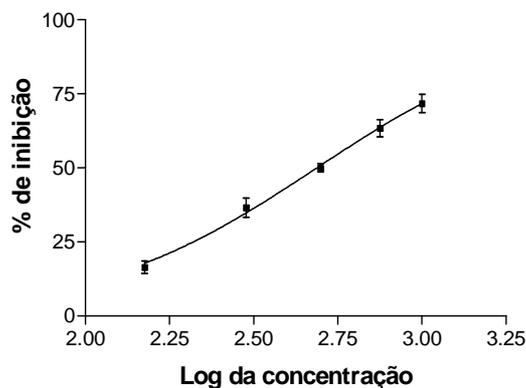


Gráfico 4 – Curva de log da concentração ($\mu\text{g/ml}$) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de *X. peregrina* frente a *C. albicans*, determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI_{50} do extrato.

**Atividade de *X. peregrina*
contra *A. niger***

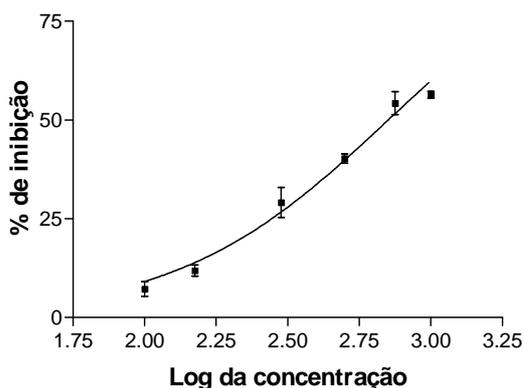


Gráfico 5 – Curva de log da concentração ($\mu\text{g/ml}$) versus percentual de inibição obtida para o extrato de caules de *X. peregrina* frente a *A. niger*, determinada pelo método de microdiluição, utilizada para cálculo da CI_{50} do extrato.

Os ensaios de microdiluição não só informam se há atividade relacionada a um extrato, fração ou substância isolada, como também permitem quantificar esta atividade.

A análise dos dados obtidos indica que os extratos etanólicos de *T. laniflora* (caule), *X. cipoensis*, *X. peregrina*, *X. pilosa*, *X. tortula* e *X. pterygoblephara*, assim como a fração em acetato de etila de *X. pterygoblephara* foram, em algum grau, ativos contra todos os microrganismos testados.

Os resultados indicam que o extrato bruto de *X. peregrina* apresentou o menor valor de CI_{50} para três dos cinco microrganismos ensaiados, a saber, *S.*

aureus, *C. albicans* e *A. niger*. O extrato bruto de caules de *T. laniflora* apresentou o menor valor de CI_{50} contra *P. aeruginosa*, enquanto *X. longiscapa* apresentou menor valor de CI_{50} frente a *B. subtilis*.

No caso de *X. pterygoblephara*, a CI_{50} frente a *S. aureus* para a fração em *n*-hexano foi menor que aquelas das demais frações e do extrato, sugerindo uma maior atividade antimicrobiana dessa fração. O extrato bruto apresentou um maior valor de CI_{50} em relação à fração em *n*-hexano. Esse dado sugere a maior concentração da(s) substância(s) ativa(s) na fração em *n*-hexano, ou a presença de antagonismo no extrato bruto. Um comportamento semelhante foi observado na atividade frente a *C. albicans*, onde a fração em acetato de etila apresentou menor valor de CI_{50} que o extrato bruto e as demais frações, e frente a *A. niger*, cuja fração aquosa apresentou menor valor de CI_{50} . Situação similar foi evidenciada para os ensaios com *B. subtilis* e *P. aeruginosa*, nos quais as frações em *n*-hexano, acetato de etila e água apresentaram valores de CI_{50} inferiores ao do extrato bruto.

Apesar do ácido morônico não ter sido ensaiado no presente trabalho, diversas atividades biológicas já foram descritas para triterpenos pentacíclicos.

No caso específico do ácido morônico (**28**), isolado inicialmente do extrato aquoso de *Rhus javanica*, a atividade antiviral é a mais pronunciada. Esse composto apresenta atividade antiviral *in vitro* contra cepas selvagens de herpes simplex tipo 1 (HSV-1) e tipo 2 (HSV-2), com CI_{50} de 3,9 e 5,8 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. Além da atividade *in vitro*, o ácido morônico também apresenta atividade anti-HSV-1 *in vivo*, reduzindo a carga viral em lesões de pele de camundongos infectados nas doses de 0,2, 1,0, 5,0 e 10,0 mg/kg. O ácido morônico também reduz a carga viral cerebral de camundongos infectados com HSV-1. Essa atividade é mais pronunciada na dose de 10,0 mg/kg, seis dias após a infecção (KUROKAWA *et al.*, 1999).

Além da atividade frente ao herpes simplex vírus, também há relatos de atividade do ácido morônico contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV). Neste caso, o ácido morônico isolado de amostra de própolis brasileiro ensaiado *in vitro* apresentou CI_{50} de 18,6 $\mu\text{g/ml}$, valor considerado significativo (ITO *et al.*, 2001).

Há, ainda, relato de atividade citotóxica *in vitro* para o ácido morônico, que apresentou CI_{50} igual a 13,1 $\mu\text{g/ml}$ frente a células tumorais de ovário humano do tipo A2780 (CAO *et al.*, 2004).

O possível uso terapêutico do ácido morônico tem estimulado a síntese de diversos derivados na busca de novos agentes anti-HIV, com mecanismo diferente dos antivirais já conhecidos (ITO *et al.*, 2001; YU *et al.*, 2006).

Até o momento, não há relatos de atividade antibacteriana e antifúngica para o ácido morônico.

Devido à pequena quantidade isolada, a quercetina também não foi utilizada nos ensaios biológicos realizados no presente trabalho. No entanto, extratos de plantas ricos em flavonóides, como espécies de *Hypericum*, *Capsella* e *Chromolaena* vêm sendo descritos por sua atividade antibacteriana (CUSHNIE & LAMB, 2005).

A quercetina (**32**) apresenta atividade antibacteriana, avaliada por difusão em ágar na concentração de 500 µg/disco, frente a *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* e *E. coli* (RUAHUA *et al.*, 2000).

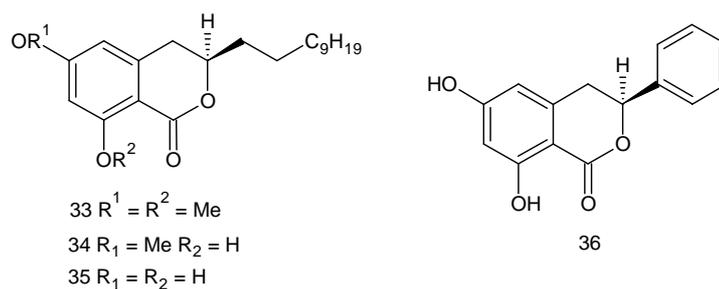
Diante das atividades relatadas para o ácido morônico e a quercetina, é possível supor que eles tenham alguma contribuição na atividade antibacteriana e antifúngica do extrato etanólico de *X. pterygoblephara*, e de algumas de suas frações.

5.1.3 Avaliação da substância 5E2C frente a fungos dermatófitos

Algumas diidroisocumarinas conhecidas, além de apresentarem atividade diurética, anti-reumática e antibacteriana, também são potentes agentes antifúngicos (SAEED, 2003).

1H-[2]benzopiran-1-ona (**33**), 8-hidróxi-1H-[2]benzopiran-1-ona (**34**) e 6,8-diidróxi-1H-[2]benzopiran-1-ona (**35**), três diidroisocumarinas sintéticas, são ativas, pelo método de diluição em ágar, contra os fungos dermatófitos *Trichophyton schoenleinii* (19,4, 25,0 e 26,3% de inibição, respectivamente, na concentração de 400 µg/ml), e *Microsporum canis* (56,0, 60,0 e 64,0%, respectivamente) (SAEED, 2003).

A monotroumarina (**36**), outra diidroisocumarina sintética, também inibe o crescimento de *Trichophyton schoenleinii* (26,0%, nas mesmas condições descritas acima) e *Microsporum canis* (60,0%) (SAEED, 2003).



Com base nesses dados da literatura e, também, à disponibilidade da amostra, optou-se por testar a substância 5E2C contra os fungos dermatófitos *Epidermophyton floccosum*, *Mycrosporium canis*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Tricophyton rubrum*.

A princípio, os ensaios foram realizados pelo método de microdiluição (item 2.7.2). Porém, ao se realizar os ensaios contra os fungos dermatófitos, algumas dificuldades foram observadas.

Em primeiro lugar, a anfotericina B, utilizada como controle positivo, é insolúvel em água, dificultando seu uso no ensaio. Na tentativa de solucionar este problema foi feita uma dispersão da anfotericina B, previamente solubilizada em DMSO. Porém, verificou-se que a anfotericina B reage com MTT, reagente colorimétrico utilizado para detecção no método da microdiluição, formando um produto de cor roxa que mascara os resultados do ensaio.

A segunda alternativa foi, então, a troca do controle positivo por fluconazol que, além de ser solúvel em água, é relatado na literatura como sendo ativo contra *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (NORRIS *et al*, 1999). No entanto, como os fungos dermatófitos utilizados nos ensaios foram isolados de ambiente hospitalar, todos se mostraram resistentes ao fluconazol. Como não havia disponibilidade de outro agente antifúngico para ser utilizado como controle positivo no ensaio, decidiu-se empregar o método de difusão em ágar (item 2.7.1).

Apesar da baixa solubilidade da substância 5E2C em água e, conseqüentemente, no ágar, esta se mostrou ativa contra três dos quatro fungos dermatófitos avaliados (Tabela 28). As placas obtidas com alguns dos resultados positivos estão representadas nas Figuras 43 a 45.

Tabela 28 – Diâmetros dos halos de inibição de crescimento de fungos dermatófitos, determinados pelo método de difusão em ágar para a substância 5E2C

Microrganismo	Halo de inibição (mm, média \pm desvio padrão; $n = 6$).	
	5E2C	Anfotericina B
<i>E. floccosum</i>	4,5 \pm 0,8	5,0 \pm 0,2
<i>M. canis</i>	-	12,7 \pm 1,2
<i>T. mentagrophytes</i>	4,8 \pm 0,4	5,0 \pm 0,6
<i>T. rubrum</i>	10,2 \pm 0,8	8,8 \pm 1,2

Nota: (-), não apresentou atividade na concentração avaliada.
5E2C (100 μ g/disco); Anfotericina B (32 μ g/disco).

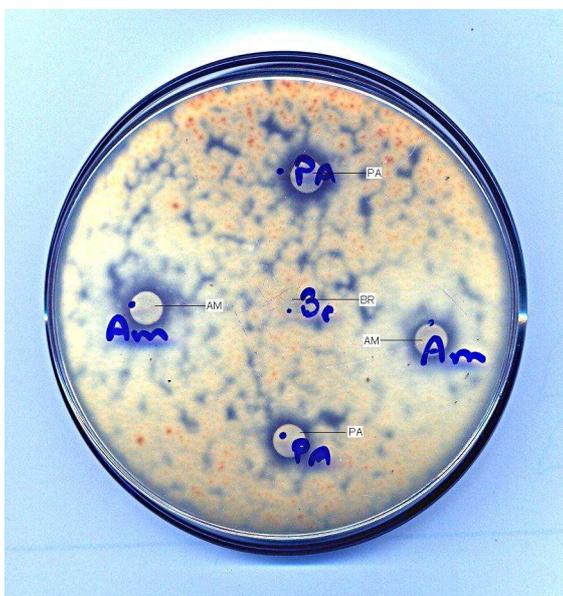


Figura 43 – Avaliação da substância 5E2C no ensaio de difusão em ágar frente a *T. mentagrophytes*. AM (amostra), 5E2C 100 μ g/disco; PA (padrão), anfotericina B, 32 μ g/disco; BR (branco), *n*-hexano.



Figura 44 – Avaliação da substância 5E2C no ensaio de difusão em ágar frente a *E. floccosum*. AM (amostra), 5E2C 100 μ g/disco; PA (padrão), anfotericina B, 32 μ g/disco; BR (branco), *n*-hexano.

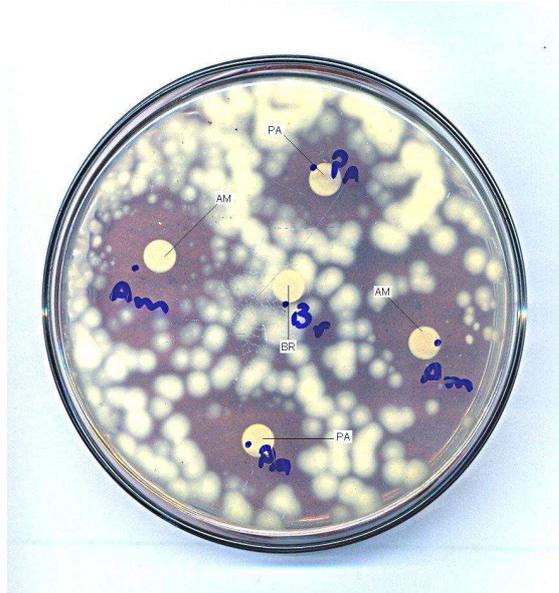


Figura 45 – Avaliação da substância 5E2C no ensaio de difusão em ágar frente a *T. rubrum*. AM (amostra), 5E2C 100 µg/disco; PA (padrão), anfotericina B, 32 µg/disco; BR (branco), *n*-hexano.

Há relatos de pelo menos duas espécies de *Xyris*, *X. laxifolia* e *X. pallida*, utilizadas popularmente para tratamento de doenças de pele, incluindo alguns tipos de micoses (PIO CORRÊA, 1969). A identificação dessas espécies baseada apenas em características morfológicas é muito difícil e, portanto, é provável que outras espécies de *Xyris* também sejam usadas popularmente com a mesma finalidade, bem como espécies de outros gêneros, igualmente denominadas de “sempre-vivas”.

Os dados obtidos no presente trabalho fornecem evidência para corroborar o uso popular de espécies de *Xyris* para tratar dermatoses.

6 Conclusões

Todas as oito espécies vegetais ocorrentes na Serra do Cipó (*Trembleya laniflora*, *Xyris cipoensis*, *X. longiscapa*, *X. peregrina*, *X. pilosa*, *X. platystachia*, *X. pterygoblephara* e *X. tortula*), avaliadas no presente trabalho, apresentaram atividade frente a pelo menos um dos microorganismos ensaiados.

Os extratos etanólicos de folhas de *T. laniflora* e de partes aéreas de *X. longiscapa*, *X. pilosa* e *X. tortula* foram ativos contra *B. subtilis* pelo método de difusão em ágar (2 mg/disco). Dentre as amostras ensaiadas pelo método de microdiluição, apenas o extrato etanólico de *X. platystachia* não foi ativo frente a *A. niger*; *X. longiscapa* não foi ativo contra *P. aeruginosa* e *A. niger*; e *T. laniflora* (caules) não inibiu o crescimento de *C. albicans* e *A. niger*. Já as frações aquosa, hexânica e diclorometânica de *X. pterygoblephara* não foram ativas frente a *C. albicans*, sendo que a última também não apresentou atividade contra *S. aureus* e *A. niger*.

O estudo fitoquímico de partes aéreas de *X. pterygoblephara* levou ao isolamento de três substâncias, a saber, P2A, isolada da fração em *n*-hexano, 5E2C, proveniente da “fração apolar”, e B2, oriunda da “fração polar”. A elucidação estrutural dos compostos isolados foi realizada por métodos espectrométricos usuais (UV, IR, espectrometria de massas e RMN de ^1H e ^{13}C) e possibilitou identificar a substância P2A como ácido morônico, B2 como quercetina e 5E2C como a diidroisocumarina (3R,4R)-(-)-6-metóxi-3,4-diidro-4-acetóxi-5-*n*-pentil-1H-2-benzopirano-1-ona, cuja configuração absoluta foi definida por espectrometria de dicroísmo circular. A substância 5E2C é uma diidroisocumarina inédita e os demais compostos isolados nunca foram anteriormente descritos em espécies de *Xyris*.

Nos ensaios de microdiluição, a substância 5E2C mostrou-se pouco ativa frente a *P. aeruginosa* e *S. aureus*. Já nos ensaios de difusão em ágar, 5E2C (100 µg/disco) apresentou atividade contra os fungos dermatófitos *E. floccosum*, *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, produzindo halos de inibição semelhantes ao controle positivo anfotericina B (32 µg/disco).

Algumas espécies de *Xyris*, denominadas vulgarmente de “sempre-vivas”, são utilizadas tradicionalmente para tratar eczemas e dermatites. Portanto, os dados obtidos para *X. pterygoblephara* fornecem evidência para corroborar o uso etnomédico de *Xyris* spp. no tratamento de dermatites.

Referências bibliográficas

AHASAN, M., J. A. ARMSTRONG, et al. (1994). "Terpenoids, alkaloids and coumarins from Boronia inornata and Boronia gracilipes." Phytochemistry **38**(5): 1275-78.

ANTUS, S., G. SNATZKE, et al. (1983). "Circular dichroism. LXXXI: Synthese und Circular dichroismus von Steroiden mit Isochromanon-chromophor." Liebigs Annalen der Chemie **12**: 2247-2261.

BAKER, D. D. and K. A. Alvi (2004). "Small-molecule natural products: new structures, new activities." Current Opinion in Biotechnology **15**(6): 576-83.

BAKER, M. (1999). "Fur rubbing: Use of medicinal plants by capuchin monkeys (Cebus capucinus)." American Journal of Primatology **38**(3): 263-270.

BALUNAS, M. J. and A. D. KINGHORN (2005). "Drug discovery from medicinal plants." Life Sciences **78**(5): 431-41.

BARREIRO, E. J. and C. A. M. FRAGA (2001.). Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos. Porto Alegre, Editora ArtMed.

BERGUE, D. A. V. and A. J. VLIETINCK (1991). "Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants." Methods in Plant Biochemistry. **6**: 47-70.

BOMFIM-PATRÍCIO, M. C., A. SALATINO, et al. (2001). "Flavonoids of Lavoisiera, Microlicia and Trembleya (Melastomataceae) and their taxonomic meaning." Biochem. Syst. Ecol. **29**: 711-726.

BREITMAIER, E. and W. VOELTER (1987). ¹³C NMR Spectra of Natural Products. Carbon-13 NMR Spectroscopy. VCH. Nova Iorque: 453.

BREMER, K., M. W. CHASE, et al. (1998). "*Angiosperm Phylogeny Group - An ordinal classification for the families of flowering plants.*" Annals of the Missouri Botanical Garden **85**: 531-553.

CALLISTO, M., P. MORENO, et al. (2001). "*Habitat diversity and benthic functional trophic groups at Serra do Cipó, southeast Brazil.*" Rev. Brasil. Biol. **61**(2): 259-266.

CAO, S., R. C. GUZA, et al. (2004). "*Cytotoxic triterpenoids from Acridocarpus vivy from the Madagascar rain forest.*" J Nat Prod **67**(6): 986-9.

CHIN, Y. W., M. J. BALUNAS, et al. (2006). "*Drug discovery from natural sources.*" Aaps Journal **8**(2): E239-53.

COLE, M. D. (1994). "*Key antifungal, antibacterial and anti-insect assays - a critical review.*" Biochemical Systematics and Ecology. **22**(8): 837-856.

COTA, B. B., A. B. DE OLIVEIRA, et al. (2002). "*Antimicrobial activity and constituents of Coccoloba acrostichoides.*" Fitoterapia **74**(7-8): 729-731.

COTA, B. B., A. B. de OLIVEIRA, et al. (2004). "*Chemistry and antifungal activity of Xyris species (Xyridaceae): a new anthraquinone from Xyris pilosa.*" Biochem. Syst. Ecol. **32**: 391-397.

CROCKETT, D. N., J. F. O'GRADY, et al. (1992). "*Candida species and Candida albicans morphotypes in erythematous candidiasis.*" Oral Surg Oral Med Oral Pathol **73**(5): 559-63.

CUSHNIE, T. P. T. and A. J. LAMB (2005). "*Antimicrobial activity of flavonoids.*" International Journal of Antimicrobial Agents **26**: 343-356.

- DUARTE, M. C., G. M. FIGUEIRA, et al. (2005). "Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants." J Ethnopharmacol **97**(2): 305-11.
- ELOFF, J. N. (1998). "A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria." Planta Med **64**(8): 711-3.
- EVANS, S. T. (2004.). Ancient Mexico and Central America. New York, Thames and Hudson.
- FOURNIER, G., C. A. L. BERCHT, et al. (1975). "3-Methoxychryszina, new antraquinone from Xyris semifuscata." Phytochemistry **14**: 2099.
- FRASER, H. S. (1996). "Reserpine: a tragic victim of myths, marketing, and fashionable prescribing." Clin. Pharmacol. Ther. **60**: 368-373.
- GAVIN, J. (1957). "Microbiological process report; analytical microbiological. II. The diffusion methods." Applied Microbiology **5**(25-33).
- GLANDER, K. E. (1994). Nonhuman primate self-medication with wild plant foods. Eating on the Wild Side: The Pharmacologic, Ecologic, and Social Implications of Using Noncultigens (Arizona Studies in Human Ecology)
N. L. Etkin, Eating on the Wild Side. Tucson, University of Arizona Press: 227-239.
- GRANGE, J. M. and R. W. DAVEY (1990). "Antibacterial properties of propolis (bee glue)." J R Soc Med **83**(3): 159-60.
- GROVE, J. F. and M. POPLE (1979). "Metabolic products of Fusarium larvarum Fuckel. The fusaretins and absolute configuration of monocerin." J Chem Soc Perkin Trans I: 2048-51.
- GURGEL, L. A., J. J. C. SIDRIM, et al. (2005). "In vitro antifungal activity of dragon's

*blood from Croton urucurana against dermatophytes." J Ethnopharmacol **97**: 409-412.*

HALBERSTEIN, R. A. (2005). "*Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns.*" Annals of Epidemiology **15**(9): 686-699

HEGAZI, A. G., F. K. ABD EL HADY, et al. (2000). "*Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis.*" Z. Naturforsch **55**: 70-75.

HUFFMAN, M. A. (1997). "*Current evidence for self-medication in primates: A multidisciplinary perspective.*" Yearbook of Physical Anthropology **40**: 171-200.

IBGE. (2005). "Mapa de Biomas Brasileiros." Retrieved 09 de setembro, 2006, from mapas.ibge.gov.br.

ITO, J., F. R. CHANG, et al. (2001). "*Anti-AIDS agents. 48.(1) Anti-HIV activity of moronic acid derivatives and the new melliferone-related triterpenoid isolated from Brazilian propolis.*" J Nat Prod **64**(10): 1278-81.

JAWETZ, E. (2000). Microbiologia médica. Rio de Janeiro, RJ, Guanabara Koogan, 21^a ed.

KINGHORN, A. D. (2001). "*Pharmacognosy in the 21st century.*" Journal of Pharmacy and Pharmacognosy **53**(2): 135-148.

KOEHN, F. E. and G. T. CARTER (2005). "*The evolving role of natural products in drug discovery.*" Nature Reviews Drug Discovery **4**(3): 206-20.

KONGSAEREE, P., S. PRABPAI, et al. (2003). "*Antimalarial dihydroisocoumarins produced by Geotrichum sp., an endophytic fungus of Crassocephalum crepidioides.*" J Nat Prod **66**(5): 709-11.

- KROHN, K., R. BAHRAMSARI, et al. (1997). "*Dihydroisocoumarins from fungi: isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity.*" Phytochemistry **45**(2): 313-20.
- KUROKAWA, M., P. BASNET, et al. (1999). "*Anti-Herpes simplex virus activity of moronic acid purified from Rhus javanica in vitro and in vivo.*" J Pharmacol Exp Ther **289**(1): 72-8.
- LEE, K. H. (2004). "*Current developments in the discovery and design of new drug candidates from plant natural product leads.*" Journal of Natural Products **67**(2): 273-83.
- LIMA, M. R., J. de SOUZA LUNA, et al. (2006). "*Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants.*" Journal of Ethnopharmacology **105**(1-2): 137-47.
- MABRY, T. J., K. R. MARKHAM, et al. (1970). The systematic identification of flavonoids. Berlim: Springer-Verlag. 354p.
- MACHADO, T. B., I. C. LEAL, et al. (2005). "*Brazilian phytopharmaceuticals - evaluation against hospital bacteria.*" Phytotherapy Research **19**(6): 519-25.
- MAGARIAN, G. J. (1991). "*Reserpine: A relic from the past or a neglected drug of the present for achieving cost containment in treating hypertension?*" J. Gen. Inter. Med. **6**: 561-572.
- MAHATO, S. B. and A. P. KUNDU (1994). "*¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features.*" Phytochemistry **37**(6): 1517-1575.
- MAJUMDER, P. L., R. N. MAITI, et al. (1979). "*Structure of Moronic Acid.*" J. Org. Chem **44**(15): 2811-12.
- MENDONÇA, M. P. and L. V. LINS (2000). Lista Vermelha das Espécies Ameaçadas de

Extinção da Flora de Minas Geras. Belo Horizonte, Biodiversitas & Fundação Zôo-Botânica de Belo Horizonte.

MONAGHAN, R. L. and J. F. BARRET (2006). "*Antibacterial drug discovery - Then, now and the genomics future.*" Biochemical Pharmacology **71**: 901-909.

MORITA, T. and R. M. V. ASSUMPÇÃO (1972). Manual de Soluções, Reagentes e Solventes. São Paulo. Editora Edgard Blücher Ltda.

MURRAY, P. R., E. J. BARON, et al. (1995). Manual of Clinical Microbiology. Washington, D.C., ASM Press.

MYERS, N., R. A. MITTERMEIER, et al. (2000). "*Biodiversity hotspots for conservation priorities.*" Nature **403**: 853-858.

NASCIMENTO, G. G. F., J. LOCATELLI, et al. (2000). "*Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria.*" Brazilian Journal of Microbiology **31**: 247-256.

NCCLS (2000). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, Pensilvânia, NCCLS document M7-A5.

NEWMAN, D. J., G. M. CRAGG, et al. (2003). "*Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002.*" Journal of Natural Products **66**(7): 1022-37.

NORRIS, H. A., B. E. ELEWSKI, et al. (1999). "*Optimal growth conditions for the determination of the antifungal susceptibility of three species of dermatophytes with the use of a microdilution method.*" J Am Acad Dermatol **40**(6 Pt 2): S9-13.

NOWAKOWSKA, Z. (2006). "*A review of anti-infective and anti-inflammatory chalcones.*" European Journal of Medicinal Chemistry (In press): 1-13.

- NUNN, J. F. (1996). Ancient Egyptian Medicine. Norman, University of Oklahoma Press.
- PATWARDHAN, B. (2005). "Ethnopharmacology and drug discovery." J Ethnopharmacol **100**(1-2): 50-2.
- PIO CORRÊA, M. and L. PENNA (1969.). Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro, Ministério da Agricultura, IBDF.
- PLOTKIN, M. J. (2000). Medicine Quest. New York, Penguin Books.
- RASOOLI, I., M. B. REZAEI, et al. (2006). "Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*." Food Control **17**: 359-364.
- RATES, S. M. K. (2001). "Plants as source of drugs." Toxicon **39**(5): 603-613.
- RAUHA, J., S. REMES, et al. (2000). "Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds." International Journal of Food Microbiology **56**: 3-12.
- RÍOS, J. L. and M. C. RECIO (2005). "Medicinal plants and antimicrobial activity." J Ethnopharmacol **100**(1-2): 80-84.
- RUANGRUNGSI, N., T. SEKINE, et al. (1995). "Isocoumarins from *Xyris indica*." Phytochemistry **38**(2): 481-483.
- SAEED, A. (2003). "Stereoselective synthesis of (3R)-3,4-dihydro-6,8-dimethoxy-3-undecyl-1H-[2]benzopyran-1-one and derivatives, metabolites from *Ononis natrix*." Helvetica Chimica Acta **86**.

- SAEED, A. (2003). "Synthesis of montroumarin." Z. Naturforsch **58c**: 691-696.
- SAJO, M. G. and P. J. RUDALL (1999). "Systematic vegetative anatomy and ensiform leaf development in *Xyris* (Xyridaceae)." Botanical Journal of the Linnean Society **130**: 171-182.
- SAJO, M. G., M. G. L. WANDERLEY, et al. (1997). "Observações anatômicas sobre a vascularização floral em *Xyris* L. (Xyridaceae)." Bol. Bot. USP **16**: 15-19.
- SCHLINGMANN, G. and D. ROLL (2005). "Absolute stereochemistry of unusual biopolymers from *Ascomycete* culture LL-W1278: Examples that derivatives of (S)-6-hydroxymellein are also natural fungal metabolites." Chirality **17**(S1): S48-S51.
- SILVERSTEIN, R. M. and F. X. WEBSTER (2000). Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC. 460p.
- SIMÕES, C. M. O., E. P. SCHENKEL, et al. (1999). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre, Editora da UFSC e Editora da UFRS.
- SINGH, S. B. and J. F. BARRETT (2006). "Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products." Biochem Pharmacol **71**(7): 1006-15.
- SIQUEIRA, E. R., J. C. FERREIRA, et al. (2006). "Ocorrência de dermatófitos em amostras de unhas, pés e mãos coletadas de estudantes universitários." Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical **39**(3): 269-271.
- SNATZKE, G. (1968). "Circular Dichroism and Optical Rotatory Dispersion - Principles and Application to the Investigation of the Stereochemistry of Natural Products." Angewandte Chemie International Edition in English **7**(1): 14-25.
- STEPP, J. R. (2004). "The role of weeds as sources of pharmaceuticals." Journal of

Ethnopharmacology **92**(2-3): 163-6.

TAYLOR, R. S. L., F. EDEL, et al. (1996). "*Antimicrobial activities of southern Nepalese medicinal plants.*" J Ethnopharmacol **50**: 97-102.

TORRAS, M. A., C. A. FAURA, et al. (2005). "*Antimicrobial activity of Pycnogenol.*" Phytother Res **19**(7): 647-8.

TREASURE, J. (2005). "*Herbal medicine and cancer: an introductory overview.*" Seminars in Oncology Nursing **21**(3): 177-83.

TSUKIYAMA, R., H. KATSURA, et al. (2002). "*Antibacterial activity of licochalcone A against spore-forming bacteria.*" Antimicrob Agents Chemother **46**(5): 1226-30.

TULP, M. and L. BOHLIN (2005). "*Rediscovery of known natural compounds: nuisance or goldmine?*" Bioorg Med Chem **13**(17): 5274-82.

TWENTYMAN, P. R. and M. LUSCOMBE (1987). "*A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity.*" Br J Cancer **56**(3): 279-85.

VARANDA, E. M., C. RONDINONI, et al. (2001). "*Flavonoids from Xyris species (Xyridaceae).*" Biochem. Syst. Ecol. **30**: 997-998.

VENTURA, C. P., J. D. S. FILHO, et al. (2007). "*A flavanone and other constituents of the Brazilian endemic species Trembleya laniflora (D. Don) Cogn. (Melastomataceae).*" Biochem. Syst. Ecol. **35**: 40-41.

VIEGAS JR, C., V. S. BOLZANI, et al. (2006). "*Os produtos naturais e a química medicinal moderna.*" Química Nova **29**(2): 326-337.

VON STADEN, H. (1989). The Art of Medicine in Early Alexandria. New York, Cambridge University Press.

WAGNER, H., S. BLADT, et al. (1984). Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. Berlim: Springer 320p.

YU, D., Y. SAKURAI, et al. (2006). "*Anti-AIDS Agents 69. Moronic Acid and Other Triterpene Derivatives as Novel Potent Anti-HIV Agents.*" J. Med. Chem. **49**: 5462-69.

ZGODA, J. R. and J. R. PORTER (2001). "*A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi.*" Pharmaceutical Biology **39**(3): 221-225.