

LEANDRO RIBEIRO SIMÕES

**FITOQUÍMICA, ATIVIDADE ANTIVIRAL E ANTIOXIDANTE DE**  
***Distictella elongata* (VAHL) URB. (BIGNONIACEAE)**

Dissertação, como requisito parcial, para obter o grau de mestre em Ciências Farmacêuticas, submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Alaíde Braga de Oliveira – UFMG  
Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Rachel Oliveira Castilho – UFMG

BELO HORIZONTE - MG  
2010

S593f Simões, Leandro Ribeiro.  
Fitoquímica, atividade antiviral e antioxidante de *Distictella elongata* (Vahl) Urb.(Bignoniaceae) / Leandro Ribeiro Simões. – 2010.  
154 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira.  
Coorientadora: Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho.  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Farmacognosia – Teses. 2. Plantas medicinais – Teses. 3. Agentes antivirais – Teses. 4. Química vegetal – Teses. I. Oliveira, Alaíde Braga de. II. Castilho, Rachel Oliveira. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.321

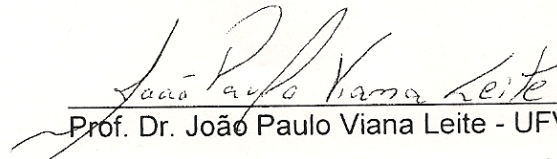
## FOLHA DE APROVAÇÃO

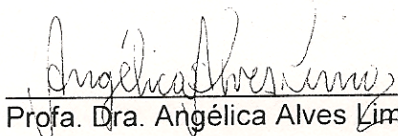
**LEANDRO RIBEIRO SIMÕES**

**FITOQUÍMICA E ATIVIDADE ANTIVIRAL E  
ANTIOXIDANTE DE DISTICTELLA  
ELONGATA (VAHL) URB**

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.

### COMISSÃO EXAMINADORA

  
Prof. Dr. João Paulo Viana Leite - UFV

  
Profa. Dra. Angélica Alves Lima - UFOP

  
Profa. Dra. Rachel Oliveira Castilho - UFMG

  
Profa. Dra. Alaíde Braga de Oliveira - UFMG

Belo Horizonte, 11 de fevereiro de 2010

“A esposa ideal vale muito mais do que pérolas. Seu marido confia nela e não deixa de encontrar vantagens. Ela traz para ele a felicidade e não a ruína, em todos os dias de sua vida.”

(Pr. 31, 10-12)

A você, que me faz tão feliz e que enfrentou comigo toda essa batalha, dedico este trabalho, minha amada Bianca.



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por TUDO.

À SS. Virgem Maria, a São José e a todos os santos aos quais recorri durante esses dois anos.

A meus pais, por serem os responsáveis por me transmitirem os maiores e mais importantes ensinamentos da vida.

À minha irmã, à minha madrinha Luci e a todos os meus familiares que se esforçaram para que eu chegasse aqui.

À minha esposa Bianca, por toda sua paciência, amor e dedicação inigualáveis.

À Professora Alaíde, pela oportunidade de repartir comigo um pouquinho de seu vasto conhecimento.

À Professora Rachel, por toda a sua disponibilidade, apoio, orientação e, principalmente, pela sua fé e seu bom humor mesmo diante das situações mais imprevisíveis ou difíceis.

Ao Geraldo Célio Brandão, pela sua enorme contribuição, desde a primeira coleta da planta até os ensaios antivirais.

Ao Glauber, pela grande parceria no trabalho.

Ao amigo Milton, bem como a todos os colegas e servidores do laboratório de Fitoquímica por toda assistência e ensino.

A todos os meus professores da graduação na UFOP que me incentivaram, auxiliaram e inspiraram a fazer esse mestrado, em especial às professoras Andrea, Angélica, Carla, Lucinha e Neila.

Aos meus colegas da graduação que também me incentivaram e que, com os quais pude viver bons momentos em Ouro Preto, especialmente, Dani, Eduardo, Lívia e Tanare.

À amiga Ana Cristina, por toda a sua colaboração, desde o material para me preparar para a prova do mestrado até a parceria no Hospital São Judas Tadeu.

Aos fraternos amigos Franco e Renata, por terem me “suportado” e pelo imenso auxílio durante todo o projeto.

À amiga Pollianna pelas correções ortográficas e gramaticais, além do auxílio com as versões em inglês.

À professora Erna G. Kroon, pelos ensaios antivirais.

Ao Professor José Dias de Sousa Filho, pelos experimentos de RMN.

Ao Professor Norberto Peporine Lopes, pelo espectro de massas.

À doutoranda Izabella Martins e aos professores João Renato Stehmann e Lúcia Lohmann, pela identificação da espécie.

A todos que, de alguma forma, colaboraram para que eu aqui estivesse hoje.

“O prazer é um impulso rápido. Já o desejo é um impulso de demoras. É feito de vagarezas. Assim como ter que andar mil quilômetros, mas certos de que há um lugar a se chegar. A dureza da viagem e o cansaço serão sempre vencidos cada vez que o desejo for lembrado. Não haverá prazer durante todo o trajeto. Por vezes, os limites serão a florados, mas o desejo de se chegar nos manterá firmes. “

Padre Fábio de Melo

## RESUMO

Alguns metabólitos de plantas têm demonstrado potenciais aplicações terapêuticas contra diversos vírus genética e funcionalmente diferentes. Seus mecanismos de ação são diversificados e, muitas vezes, múltiplos. A relevância das espécies reativas derivadas do oxigênio e do nitrogênio nas patologias virais já foi evidenciada. *Distictella elongata* (Vahl) Urb. é uma espécie vegetal pertencente à família Bignoniaceae. Extratos etanólicos de folhas e caule de *Distictella elongata* foram avaliados *in vitro* pela técnica do MTT quanto à sua atividade antiviral. Foram utilizados dois modelos de vírus de DNA: HSV-1 e VACV-WR, e um modelo de vírus de RNA: EMC. O extrato etanólico de folhas apresentou atividade anti-HSV-1 ( $CE_{50} = 142,8 \pm 5,3 \mu\text{g/mL}$ ), enquanto o extrato etanólico de caule não apresentou qualquer atividade nas concentrações testadas ( $CE_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ ). O fracionamento cromatográfico do extrato de folhas forneceu nove frações. Aquelas que foram eluídas em AcOEt e ACOEt:MeOH apresentaram atividade antiviral: anti-HSV-1 ( $CE_{50} = 164,4 \pm 5,7 \mu\text{g/mL}$ ) e anti-EMC ( $CE_{50} = 36,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ ) para a primeira e anti-HSV-1 ( $CE_{50} = 147,6 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$ ) para a segunda. O bioensaio direcionado levou ao isolamento, por técnicas cromatográficas, da flavona pectolarina da fração AcOEt:MeOH, além de misturas dos terpenoides ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido pomólico e o esteroide  $\beta$ -sistosterol presentes na fração AcOEt. A pectolarina apresentou atividade frente aos vírus HSV-1 ( $CE_{50} = 314,5 \pm 22,7 \mu\text{g/mL}$ ) e VACV-WR ( $CE_{50} = 207,1 \pm 9,6 \mu\text{g/mL}$ ). Os terpenoides ácido oleanólico e ursólico foram ativos frente ao HSV-1,  $CE_{50} = 3,8 \pm 0,6 \mu\text{g/mL}$  e  $6,2 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ , respectivamente, porém com elevadas citotoxicidades:  $CC_{50} = 4,2 \pm 0,8 \mu\text{g/mL}$  para o ácido oleanólico e  $CC_{50} = 8,1 \pm 0,9 \mu\text{g/mL}$  para o ácido ursólico. O extrato de folhas ( $CEA_{50} = 28,03 \pm 0,46 \mu\text{g/mL}$ ) e a fração AcOEt:MeOH ( $CEA_{50} = 58,00 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$ ) apresentaram atividade antioxidante frente ao DPPH, enquanto a fração AcOEt não apresentou atividade. O estudo fitoquímico do extrato de folhas de *D. elongata* demonstrou que terpenoides e fenóis, especialmente flavonoides heterosídicos como a pectolarina, são responsáveis por sua atividade antiviral. Além disso, a segunda classe de substâncias lhe confere ainda a capacidade de sequestrar radicais livres. Portanto, esses resultados sugerem uma possível utilização de metabólitos especiais de plantas como alternativas à atual farmacoterapêutica antiviral. **Palavras-chave:** *Distictella elongata*, Bignoniaceae, antiviral, antioxidante, HSV-1, VACV-WR, EMC, DPPH.

## ABSTRACT

Some plant metabolites have been found to have potential therapeutic applications against different genetically and functionally several viruses. Their mechanisms of action are diverse and, often, multiple. The relevance of reactive oxygen and nitrogen species in viral diseases has already been described. *Distictella elongata* (Vahl) Urb is a vegetal specie of Bignoniaceae family. Ethanolic extracts of leaves and stems from *Distictella elongata* were, *in vitro*, evaluated for their antiviral activity by MTT assay. Two models of DNA viruses were used: HSV-1 and VACV-WR, and one model of RNA virus: EMC. The leaves ethanolic extract presented anti-HSV-1 activity ( $EC_{50} = 142.8 \pm 5.3 \mu\text{g/mL}$ ) while the stems ethanolic extract did not present any activity in the tested concentrations ( $EC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ ). The chromatographic fractionation of the leaves extract provided nine fractions. The fractions that were eluted with EtOAc and EtOAc:MeOH presented antiviral activity: anti-HSV-1 ( $EC_{50} = 164.4 \pm 5.7 \mu\text{g/mL}$ ) and anti-EMC ( $EC_{50} = 36.6 \pm 1.2 \mu\text{g/mL}$ ) for the first and anti-HSV-1 ( $EC_{50} = 147.6 \pm 3.3 \mu\text{g/mL}$ ) for the second. The directed bioassay left to isolation by chromatographic techniques of pectolinarin of the EtOAc:MeOH fraction, in addition to mixtures of terpenoids ursolic acid, oleanolic acid and pomolic acid and the steroid  $\beta$ -sistosterol present in EtOAc fraction. The pectolinarin showed anti-HSV-1 ( $EC_{50} = 314.5 \pm 22.7 \mu\text{g/mL}$ ) and anti-VACV-WR ( $EC_{50} = 207.1 \pm 9.6 \mu\text{g/mL}$ ) activities. The terpenoids oleanolic acid and ursolic acid had activity against HSV-1,  $EC_{50} = 3.8 \pm 0.6 \mu\text{g/mL}$  and  $6.2 \pm 0.1 \mu\text{g/mL}$ , respectively, but also elevated citotoxicity:  $CC_{50} = 4.2 \pm 0.8 \mu\text{g/mL}$  for oleanolic acid and  $CC_{50} = 8.1 \pm 0.9 \mu\text{g/mL}$  for ursolic acid. The leaves extract ( $EAC_{50} = 28.03 \pm 0.46 \mu\text{g/mL}$ ) and the fraction EtOAc:MeOH ( $EAC_{50} = 58.00 \pm 0.89 \mu\text{g/mL}$ ) presented antioxidant activity by DPPH assay, but the EtOAc fraction did not present that. The phytochemical study of leaves extract of *D. elongata* demonstrated that terpenoids and phenols, especially heterosidic flavonoids such as pectolinarin, were responsible by its antiviral activity. Add to that the second class of substances confers to it the free radicals scavenging capacity. Therefore these results suggest a possible utilization of plant special metabolites such as alternatives to actual antiviral pharmacotherapeutic.

**Key words:** *Distictella elongata*, Bignoniaceae, antiviral, antioxidant, HSV-1, VACV-WR, EMC, DPPH.

## LISTA DE ESTRUTURAS QUÍMICAS

1 Digoxina.....	21
2 Quinina.....	21
3 Vincristina.....	21
4 Vimblastina.....	21
5 Taxol.....	22
6 10-desacetilbacatina III.....	22
7 Docetaxel.....	22
8 Cocaína.....	22
9 Procaína.....	22
10 Zidovudina.....	25
11 Espongouridina.....	25
12 Espongotimidina.....	25
13 Newbouldiaquinona A.....	29
14 Catalposídeo.....	29
15 Lapachol.....	32
16 Atavaquona.....	32
17 4,7-diidroxi-10-metóxi-2,2-dimetil-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromeno-5,6-diona.....	35
18 Isoquercitrina.....	38
19 Canferol.....	38
20 Quercetina.....	38
21 Hiperina.....	38
22 7-O-galoiltricetilflavana.....	39
23 7,4'-digaloiltricetilflavana.....	39
24 Torvanol A.....	39
25 Quercetina-3-ramnosídeo.....	40
26 Calicosina-7-O-β-D-glicopiranosídeo.....	40
27 Orientina.....	41
28 Vitexina.....	41
29 Baicaleína.....	41
30 Amentoflavona.....	41
31 Leachianona G.....	42



<b>32</b>	<b>6,8-diprenilaromadendrina.....</b>	<b>422</b>
<b>33</b>	<b>Caesalmino C.....</b>	<b>43</b>
<b>34</b>	<b>Disoxilino A.....</b>	<b>43</b>
<b>35</b>	<b>Androgafolídeo.....</b>	<b>43</b>
<b>36</b>	<b>Esquisanwilsoneno A.....</b>	<b>43</b>
<b>37</b>	<b>Ácido morônico.....</b>	<b>43</b>
<b>38</b>	<b>Ácido betulínico.....</b>	<b>44</b>
<b>39</b>	<b>Limonoide.....</b>	<b>44</b>
<b>40</b>	<b>Glicirrizina.....</b>	<b>44</b>
<b>41</b>	<b>Ácido oleanólico.....</b>	<b>44</b>
<b>42</b>	<b>Castanospermina.....</b>	<b>45</b>
<b>43</b>	<b>1-desoxinojirimicina.....</b>	<b>45</b>
<b>44</b>	<b>Nitidina.....</b>	<b>45</b>
<b>45</b>	<b>Rhinacanthina C.....</b>	<b>45</b>
<b>46</b>	<b>Ácido crisofânico.....</b>	<b>45</b>
<b>47</b>	<b>Calanolídeo A.....</b>	<b>45</b>
<b>48</b>	<b>Justicidina C.....</b>	<b>46</b>
<b>49</b>	<b>Ácido cafeico.....</b>	<b>46</b>
<b>50</b>	<b>Ácido clorogênico.....</b>	<b>46</b>
<b>51</b>	<b>Luteosídeo A.....</b>	<b>47</b>
<b>52</b>	<b>Verbascosídeo.....</b>	<b>87</b>
<b>53</b>	<b>Isoverbascosídeo.....</b>	<b>87</b>
<b>54</b>	<b>Osmantusídeo.....</b>	<b>87</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>1 Exemplos da diversidade estrutural dos constituintes de espécies de Bignoniaceae.....</b>	<b>28</b>
<b>2 <i>Distictella elongata</i> (Vahl.) Urb.....</b>	<b>34</b>
<b>3 Radicais livres no combate a infecções bacterianas e virais.....</b>	<b>51</b>
<b>4 <i>Distictella elongata</i> (Vahl) Urb coletada em 07 de maio de 2008.....</b>	<b>57</b>
<b>5 Rendimentos das frações obtidas no fracionamento de EEF por cromatografia em coluna de gel de sílica.....</b>	<b>60</b>
<b>6 Etapas de isolamento de AMF do extrato de folhas de <i>D. elongata</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>7 Esquema do novo fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>D. elongata</i> por cromatografia em coluna de gel de sílica.....</b>	<b>69</b>
<b>8 Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica dos extratos etanólicos de folhas (EEF) e de caule (EEC) de <i>D. elongata</i>. Revelador para taninos, fenóis, flavonoides e flavonoides heterosídeos.....</b>	<b>81</b>
<b>9 Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica dos extratos etanólicos de folhas (EEF) e de caule (EEC) de <i>D. elongata</i>. Revelador para substâncias antracênicas.....</b>	<b>82</b>
<b>10 Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica dos extratos etanólicos de folhas (EEF) e de caule (EEC) de <i>D. elongata</i>. Revelador para terpenoides e/ou esteroides.....</b>	<b>83</b>
<b>11 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR para EEF (A) e EEC (B) a <math>\lambda</math> 220 nm .....</b>	<b>84</b>
<b>12 Perfil cromatográfico de EEF a <math>\lambda</math> 220 nm com os espectros de UV obtidos <i>on line</i> para os principais picos.....</b>	<b>85</b>
<b>13 Cromatogramas do ácido cafeico (A) e do ácido ferúlico (B) com seus respectivos espectros de UV obtidos <i>on line</i> a <math>\lambda</math> 220 nm.....</b>	<b>86</b>
<b>14 Cromatograma da luteolina (1mg/mL) e espectro de UV obtido <i>on line</i> a <math>\lambda</math> 220 nm.....</b>	<b>88</b>
<b>15 Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica para as frações Hex:DCM, DCM, DCM:AcOEt e AcOEt do EEF.....</b>	<b>90</b>
<b>16 Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica para as frações AcOEt, AcOEt:MeOH e MeOH.....</b>	<b>90</b>
<b>17 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR a <math>\lambda</math> 220 nm para as frações Hex:DCM, DCM, DCM:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH obtidas do fracionamento em gel de sílica do EEF.....</b>	<b>92</b>

<b>18 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR, a <math>\lambda</math> 220 nm, para as frações MeOH, H<sub>2</sub>O e MeOH a 3% AcOH obtidas do fracionamento em gel de sílica de EEF.....</b>	<b>93</b>
<b>19 Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica para as frações AcOEt, AcOEt:MeOH , AMF, vitexina e orientina.....</b>	<b>94</b>
<b>20 Cromatogramas obtidos por CLAE-FR a <math>\lambda</math> 220 nm das frações AcOEt e AcOEt:MeOH, e da substância AMF.....</b>	<b>95</b>
<b>21 Esqueleto básico de um flavonoide e seus cromóforos.....</b>	<b>96</b>
<b>22 Espectros no UV para AMF sem e com adição de reagentes químicos específicos.....</b>	<b>97</b>
<b>23 Espectro no IV de AMF.....</b>	<b>98</b>
<b>24 Espectro de ESMS para AMF.....</b>	<b>99</b>
<b>25 Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de AMF (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>100</b>
<b>26 Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de AMF (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>101</b>
<b>27 DEPT de AMF (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>102</b>
<b>28 Experimento bidimensional HSQC de AMF (A), com expansão da região das absorções de açúcares (3,1 a 3,9 ppm) (B) (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>103</b>
<b>29 Experimento bidimensional COSY de AMF (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>105</b>
<b>30 Experimento bidimensional HMBC de AMF (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>106</b>
<b>31 Experimento bidimensional HMBC de AMF, com expansões da região das absorções de aromáticos (6,5 a 8,5 ppm) (A) e da região das absorções de açúcares (3,1 a 3,9 ppm) (B) (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>107</b>
<b>32 Experimento bidimensional HSQC-TOCSY de AMF (A), com expansão da região de açúcares (3,1 a 3,9 ppm) (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) (B).....</b>	<b>109</b>
<b>33 Cromatograma obtido para os produtos de hidrólise de AMF contidos na fase aquosa em placa de gel de sílica.....</b>	<b>111</b>
<b>34 Cromatograma obtido para o produto de hidrólise de AMF contido na fase orgânica em placa de gel de sílica.....</b>	<b>112</b>
<b>35 Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (A) e de <sup>13</sup>C (B) de HAT2 (400 MHz, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>115</b>
<b>36 Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (A) e de <sup>13</sup>C (B) de HAT3 (400 MHz, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>117</b>
<b>37 Espectros de RMN de <sup>1</sup>H (A) e de <sup>13</sup>C (B) de HAT5 (400 MHz, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).....</b>	<b>119</b>
<b>38 Cromatograma da fração HA50-21 a 35 e do padrão de <math>\beta</math> – sitosterol.....</b>	<b>121</b>

<b>39</b> Perfis cromatográficos do extrato etanólico de folhas de <i>D. elongata</i> em diferentes épocas de coleta.....	122
<b>40</b> Formação da formazana a partir do MTT.....	123
<b>41</b> Esquema do estudo fitoquímico biomonitorado pela atividade antiviral de extratos de <i>D. elongata</i> .....	125
<b>42</b> Esquema do estudo fitoquímico biomonitorado de extratos de <i>D. elongata</i> que levou ao isolamento da pectolinarina.....	128
<b>43</b> Cromatogramas das misturas de terpenoides HAT2, HAT3 e HAT5, e das frações DCM:AcOEt (DA) e AcOEt (A).....	131
<b>44</b> Resumo da análise antiviral e citotóxica do EEF de <i>D. elongata</i> .....	133
<b>45</b> Redução do DPPH pelo antioxidante BHT (di-terc-butilmetilfenol).....	134

## LISTA DE TABELAS

1 Exemplos de espécies de Bignoniaceae que apresentam atividade antimicrobiana.....	30
2 Exemplos de espécies de Bignoniaceae que apresentam atividade anti-inflamatória e/ou antioxidante.....	31
3 Exemplos de espécies de Bignoniaceae que apresentam outras atividades biológicas.....	32
4 Volumes dos solventes empregados no fracionamento de EEF por cromatografia em coluna de gel de sílica.....	59
5 Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos e frações por CLAE-FR.....	63
6 Gradiente de eluição empregado no isolamento de AMF por CLAE-FR preparativa.....	64
7 Novo fracionamento do extrato etanólico de folhas de <i>D. elongata</i> por cromatografia em coluna de gel de sílica.....	66
8 Frações resultantes de HA15.....	67
9 Frações resultantes de HA50.....	67
10 Avaliação qualitativa de classes de metabólitos secundários dos extratos etanólicos de folhas e de caule de <i>D. elongata</i> .....	80
11 Avaliação qualitativa de classes de metabólitos secundários das frações obtidas de EEF de <i>D. elongata</i> .....	89
12 Atribuição dos sinais dos espectros de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ para AMF e comparação com dados da literatura (400 MHz, 100 MHz, DMSO-d6).....	104
13 Principais interações homonucleares de spin-spin entre átomos de hidrogênio obtidas do espectro COSY de AMF (400 MHz, DMSO-d6).....	105
14 Principais interações heteronucleares de spin-spin a longa distância ( $^2J_{\text{CH}}$ , $^3J_{\text{CH}}$ e $^4J_{\text{CH}}$ ) entre átomos de carbono e hidrogênio obtidas do espectro HMBC para AMF (400 MHz, DMSO-d6).....	108
15 Principais interações heteronucleares spin-spin de átomos de carbono e hidrogênio dos açúcares de AMF obtidas do espectro HSQC-TOCSY (400 MHz, DMSO-d6).....	110
16 Dados de RMN $^{13}\text{C}$ do ácido ursólico (Castilho, 2001; Mahato e Kundu, 1994) e da fração HAT2 (100 MHz, DMSO-d6).....	116
17 Dados de RMN $^{13}\text{C}$ do ácido ursólico e ácido pomólico (Castilho, 2001; Mahato e Kundu, 1994) e da fração HAT3 (100 MHz, DMSO-d6).....	118

<b>18</b> Dados de RMN <sup>13</sup> C do ácido ursólico, ácido pomólico e ácido oleanólico (Castilho, 2001; Mahato e Kundu, 1994) e da fração HAT5 (100 MHz, DMSO - d6).....	120
<b>19</b> Parâmetros de atividade antiviral e citotóxica para a pectolinarina obtidos pela técnica do MTT.....	127
<b>20</b> CEA <sub>50</sub> obtidas pelas amostras testadas frente ao DPPH.....	135



## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcOEt	acetato de etila
AcOH	ácido acético
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BHT	di-terc-butil metil fenol
$\lambda$	comprimento de onda
$\lambda_{\text{máx.}}$	comprimento de onda máximo
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CC <sub>50</sub>	concentração citotóxica a 50%
CE <sub>50</sub>	concentração eficaz para 50% de inibição
CEA <sub>50</sub>	concentração eficaz para 50% de atividade antioxidante
CI <sub>50</sub>	concentração inibitória a 50%
<i>J</i>	constante de acoplamento
CLAE – FR	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em Fase Reversa
COSY	homonuclear correlation spectroscopy
CPE	efeito citopático
<i>d</i>	duplete
<i>dd</i>	duplo duplete
DCM	diclorometano
d.i.	diâmetro interno
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO-d <sub>6</sub>	dimetilsulfóxido delterado
DNA	deoxyribonucleic acid (ácido desoxirribonucleico)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DO <sub>492nm</sub>	densidade óptica a 492 nm
EAC <sub>50</sub>	concentração eficaz para 50% de efeito antioxidante
EEC	extrato etanólico de caule
EEF	extrato etanólico de folhas
EMC	vírus da encefalomiocardite murina
ESMS	espectrometria de massas por eletrospray
FM	fórmula molecular
Glc	glicose
Hex	hexano
HBV	vírus da hepatite B
HCMV	citomegalovírus humano
HCV	vírus da hepatite C
HIV	Human Immunodeficiency Virus (vírus da imunodeficiência humana)
HMBC	Heteronuclear Multiple-Bond Coherence
HPV	Human Papiloma Virus (vírus do papiloma humano)
HSQC	Heteronuclear Single-Quantum Coherence
HSV	Herpes Simplex Virus (vírus herpes simples)
HSV-1	Herpes Simplex Vírus tipo 1
IL-1	interleucina 1
iNOS	óxido nítrico sintetase – forma induzida
IS	Índice de Seletividade

IT	Índice Terapêutico
IV	infravermelho
MEM	Minimo Essencial Eagle (meio mínimo essencial)
MeOH	metanol ou metanólica
mM	milimolar(es)
mod.	modelo
MTT	brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólico
µg/mL	micrograma(s) por mililitro(s)
µL	microlitro(s)
µm	micrômetro(s)
nM	nanomolar
nm	nanômetro(s)
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintase
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)
ONOO <sup>-</sup>	peroxinitrito
p/v	peso por volume
pf	ponto de fusão
PV	poliovírus
%AAO	porcentagem de atividade antioxidante
Ram	ramnose
Rf	fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	ribonucleic acid (ácido ribonucleico)
RNS	espécies reativas derivadas do nitrogênio
ROS	espécies reativas derivadas do oxigênio
RSV	vírus sincicial respiratório
s	simpleto (singleto)
SFB	soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TCID <sub>50</sub>	diluição de vírus exigida para infectar 50% de um determinado grupo de células inoculadas
TNF	fator de necrose tumoral
TOCSY	Total correlation spectroscopy
TR	tempo de retenção
UI/ml	unidades internacionais por mililitro
UV	ultra-violeta
VACV-WR	Vaccinia virus Western Reserve
VERO	células derivadas de rim de macaco verde

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	27
2.1 A família Bignoniaceae.....	27
<u>2.1.1 O gênero <i>Distictella</i> e a espécie <i>Distictella elongata</i> (Vahl) Urb....</u>	33
2.2 Espécies vegetais com atividade antiviral.....	36
<u>2.2.1 Flavonoides.....</u>	38
<u>2.2.2 Terpenoides.....</u>	42
<u>2.2.3 Alcaloides.....</u>	44
<u>2.2.4 Quinonas.....</u>	45
<u>2.2.5 Outras classes de metabólitos especiais com atividade antiviral.....</u>	45
2.3 Vírus e radicais livres.....	47
3. OBJETIVOS.....	53
3.1 Objetivo geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	54
4.1 Materiais, métodos e equipamentos.....	54
4.2 Fitoquímica.....	57
<u>4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal.....</u>	57
<u>4.2.2 Preparo do material vegetal e extração.....</u>	58
<u>4.2.3 Fracionamento do extrato das folhas de <i>D. elongata</i> (Vahl) Urb....</u>	58
<u>4.2.4 Prospecção fitoquímica.....</u>	60
<u>4.2.5 Perfis cromatográficos por CLAE-FR.....</u>	63
<u>4.2.6 Isolamento de AMF.....</u>	64
<u>4.2.7 Isolamento dos terpenoides.....</u>	65
<u>4.2.8 Caracterização de AMF.....</u>	70
<u>4.2.9 Dados físico-químicos das substâncias isoladas das folhas do EEF de <i>Distictella elongata</i>.....</u>	71
4.3 Atividades Biológicas.....	75
<u>4.3.1 Ensaio antivirais e citotóxicos.....</u>	75
<u>4.3.2 Ensaio antioxidante.....</u>	79
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80

<b>5.1 Fitoquímica.....</b>	<b>80</b>
<b><u>5.1.1 Prospecção fitoquímica.....</u></b>	<b>80</b>
<b><u>5.1.2 Análise por CLAE-FR.....</u></b>	<b>84</b>
<b>5.2 Fitoquímica – frações originadas do EEF.....</b>	<b>89</b>
<b><u>5.2.1 Prospecção fitoquímica.....</u></b>	<b>89</b>
<b><u>5.2.2 Análises por CLAE-FR.....</u></b>	<b>91</b>
<b>5.3 Fitoquímica de EEF e caracterização das substâncias isoladas.....</b>	<b>94</b>
<b><u>5.3.1 AMF.....</u></b>	<b>94</b>
<b><u>5.3.2 Terpenoides.....</u></b>	<b>112</b>
<b><u>5.3.3 Variação na produção dos metabólitos secundários de <i>D. elongata</i> em diferentes épocas de coleta.....</u></b>	<b>121</b>
<b>5.4 Atividade antiviral.....</b>	<b>123</b>
<b>5.5 Atividade antioxidante.....</b>	<b>134</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>137</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>138</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A questão das enfermidades é motivo de curiosidade e preocupação desde os primórdios da humanidade. Utilizando-se do princípio da tentativa e erro, através dos meios disponíveis, muitas civilizações aprenderam bastante a respeito do combate aos males físicos e psicológicos (WENZCENOVICZ, 2002).

Os primeiros povos perceberam a existência de vegetais, ao lado daqueles que lhes serviam como alimento, dotados de maior ou menor toxicidade e que, quando empregados no combate a doenças, apresentavam um potencial de cura (CUNHA, 2005). Há relatos do uso de plantas com finalidades terapêuticas por volta de 3.000 a.C. na obra Pen Ts'ao do chinês Shen Nung (KO, 1999; TYLER, 1996).

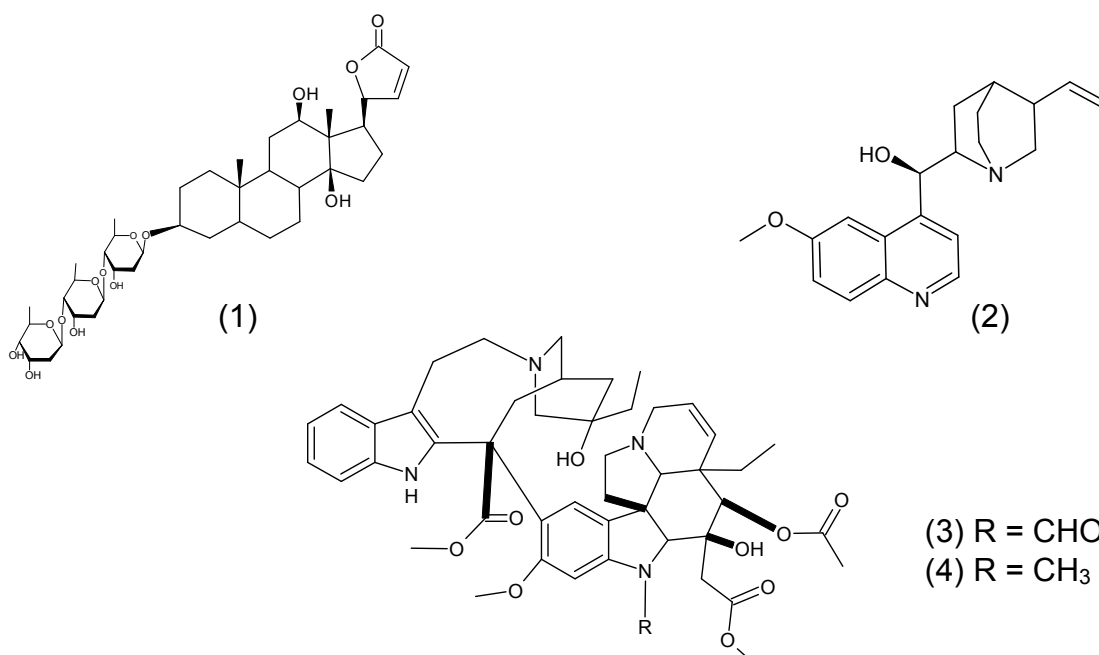
Para o correto funcionamento de sua maquinaria celular, os vegetais desenvolveram metabólitos especiais que lhes servem como mensageiros de informação e fatores de proteção perante agentes de estresse (GOTTLIEB *et al.*, 1996). O reino vegetal é, sem dúvida, o mais relevante na contribuição de metabólitos secundários com aplicações não só medicamentosas, mas também cosméticas e nutracêuticas (PINTO *et al.*, 2002).

Os metabólitos especiais de origem vegetal são muitas vezes empregados como fitofármacos que, por definição, "são substâncias ativas, isoladas de matérias primas vegetais ou, mesmo, misturas de substâncias ativas de origem vegetal" (CALIXTO, 1997). Muitas dessas substâncias são caracterizadas por possuírem estruturas químicas complexas e que dificilmente seriam obtidas através de processos sintéticos. Exemplo clássico é o da administração da digoxina (1) a pacientes que sofrem de insuficiência cardíaca. Embora tenham se passado mais de 200 anos da identificação estrutural desse heterosídeo, esse fitofármaco que ainda tem como fonte espécies do gênero *Digitalis* permanece sendo amplamente empregado como cardiotônico (BARREIRO, 1990).

Também de grande valor histórico, a quinina (2), isolada das cascas de espécies de *Cinchona*, foi por quase 300 anos o único princípio ativo eficaz contra a malária. Essa doença é reconhecida como grave problema de saúde pública, provocando a morte de mais de um milhão de pessoas no mundo a cada ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

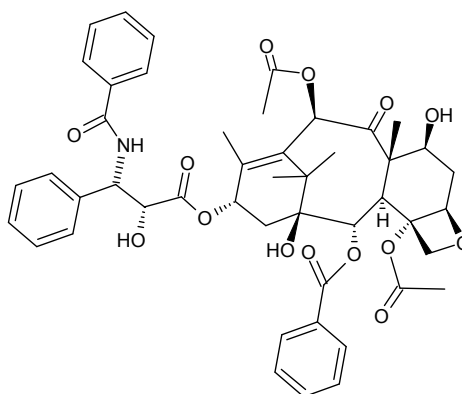
Isolados de *Catharanthus roseus* L., os alcaloides indólicos vincristina (3) e vimblastina (4) ligam-se aos microtúbulos cromossômicos inibindo a metáfase da

mitose celular. Esses fitofármacos são importantes agentes clínicos no tratamento de leucemias, linfomas e câncer testicular (BUDMAN *et al.*, 1997; NEWMAN *et al.*, 2000).

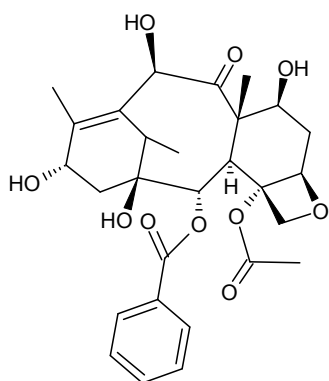


Os processos de semissíntese de fármacos cujas substâncias precursoras são metabólitos especiais de plantas também são valiosas ferramentas farmacoterapêuticas. Das cascas de *Taxus brevifolia* Nutt. se isola um complexo diterpenoide com atividade antineoplásica, o taxol, cujo medicamento é denominado de paclitaxel (5). Porém, a concentração do mesmo nas cascas é extremamente baixa, sendo essa forma de obtenção caracterizada como não ecológica e economicamente inviável. A solução desse problema se dá através da produção semissintética do taxol a partir das bacatinas como, por exemplo, a 10-desacetil-bacatina III (6). Essas são outros taxanos encontrados abundantemente nas folhas de espécies do gênero *Taxus*. Assim, não somente o taxol é sintetizado com bons rendimentos, mas também outros fármacos como o docetaxel (7), substância duas vezes mais ativa que seu análogo. (NEWMAN *et al.*, 2000; VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

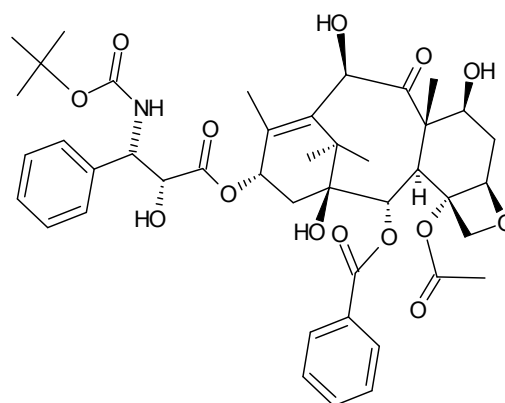




(5)

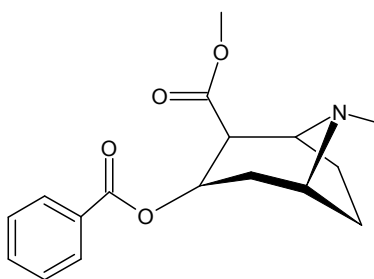


(6)

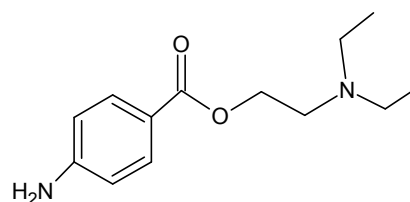


(7)

Os metabólitos secundários de plantas possuem também importante papel como protótipos ou modelos para obtenção de fármacos sintéticos que possuam atividades biológicas semelhantes aos originais. A cocaína (8), extraída das folhas de espécies de *Erythroxylum*, foi o protótipo dos anestésicos locais de síntese, como a procaína (9) (ROBBERS *et al.*, 1997).



(8)



(9)

Paralelamente aos fitofármacos, os medicamentos fitoterápicos também são importantes no tratamento de diversas patologias nos dias de hoje. A RDC n.º48 de 16 de março de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define esses

medicamentos como sendo aqueles obtidos empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais. Além disso, possuem eficácia e riscos de seu uso reconhecidos segundo critérios específicos e que garantam sua reprodutibilidade e constância de qualidade. Ressalta ainda que não é permitida a adição aos mesmos de substância ativa, de qualquer origem, nem a associação desta com extratos vegetais (ANVISA, 2004).

Geralmente os medicamentos fitoterápicos possuem mais de uma substância bioativa que podem apresentar sinergismo. Com isso, a resposta farmacológica apresentada pela associação é, muitas vezes, maior do que aquelas obtidas para cada uma das substâncias isoladas. A artemisinina, por exemplo, um sesquiterpenoide utilizado no combate ao *Plasmodium falciparum* e *P. vivax* apresenta uma concentração inibitória a 50% (CI<sub>50</sub>) de 9,0 nM. Porém, quando associada a flavonoides também presentes em *Artemisia annua* L., tem sua CI<sub>50</sub> reduzida para 2,2 nM (KAUFMAN *et. al.*, 1998).

Outra possível vantagem deste tipo de medicamento consiste na associação de mecanismos de substâncias que agem em alvos moleculares diferentes. O extrato lipofílico de *Serenoa repens* W. Bartram tem mostrado bons resultados no tratamento da hiperplasia prostática benigna. Esse apresenta fitoesteroides que inibem a enzima 5 $\alpha$ -redutase e, conseqüentemente a formação de desidrotestosterona, que se liga a receptores androgênicos presentes nas células prostráticas. Além disso, outras substâncias presentes nesse extrato possuem propriedades anti-inflamatórias, antagonistas de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos e bloqueadoras de canais de cálcio. Por isso há uma maior eficácia no alívio dos sintomas urológicos de pacientes que sofrem com essa doença (YUNES *et. al.*, 2001).

A expansão do mercado de medicamentos fitoterápicos no Brasil é notória. Entre aqueles com maior número de registros de formulações se encontram os extratos de *Ginkgo biloba* L. e de *Aesculus hippocastanum* L. (castanha-da-índia). O primeiro se trata de um agente nootrópico, eficaz no tratamento de doenças cognitivas. O segundo possui atividade antiedema, eficaz no tratamento sintomático de pacientes que sofrem de insuficiência venosa crônica. Entre os extratos de plantas nativas ou domesticadas no Brasil, destacam-se os preparados de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), que apresenta atividade expectorante; *Maytenus ilicifolia* Schrad (espinheira-santa), com atividade antiulcerogênica; *Paullinia cupana* Kunth (guaraná), estimulante do sistema nervoso central (SNC); além daquelas do gênero *Passiflora* (maracujá),

que apresentam atividade sedativa e ansiolítica (CARVALHO *et. al.*, 2008; RIBEIRO *et. al.*, 2005).

Os exemplos descritos acima ressaltam a importância das plantas como fontes farmacoterapêuticas que auxiliam no combate a diversas enfermidades que afetam o sistema cardiovascular, trato gastrointestinal, sistema endócrino, SNC; além de doenças infectoparasitárias e neoplasias.

Nos últimos anos várias doenças infecciosas humanas têm sido relatadas como até então desconhecidas ou ainda caracterizadas como reemergentes, uma vez que já haviam sido controladas em épocas anteriores. A maioria dessas é de origem viral (SCHATZMAYR *et. al.*, 2001). Exemplo bem recente é o da pandemia chamada “gripe suína”, cujo agente etiológico é o vírus H1N1 da família Orthomyxoviridae. Tal pandemia atraiu a atenção de vários agentes de saúde para os vírus Influenza, patógenos comuns que causaram graves problemas respiratórios e mortes no século XX (KHANNA *et. al.*, 2009).

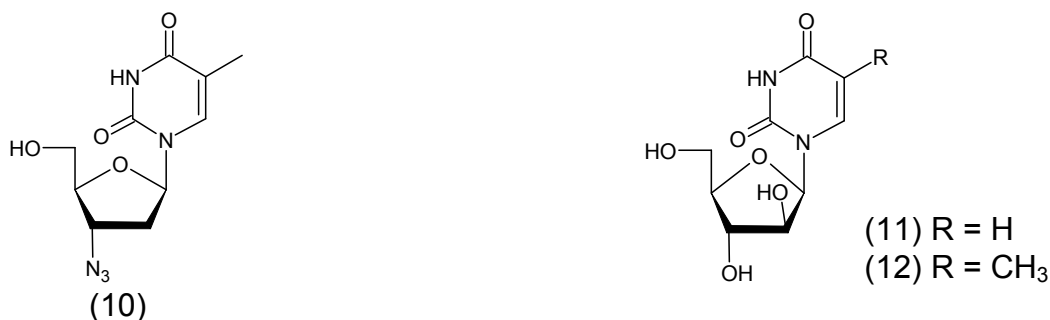
A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), considerada a doença emergente mais importante do século XX, é causada pelo vírus HIV da família Retroviridae. Sua evolução é marcada por uma considerável destruição de linfócitos TCD4+ e que, depois de instaurada, torna o organismo susceptível a infecções oportunistas e até mesmo à disseminação de tumores. No Brasil, desde a identificação do primeiro caso da doença em 1980 e até junho de 2006 já foram notificados mais de 400 mil infectados pelo vírus HIV. Em todo o mundo, esse número já ultrapassou os 39 milhões (DUTRA *et. al.* 2008; SCHATZMAYR *et. al.*, 2001).

Como exemplo de doença reemergente, a dengue constitui hoje a mais importante virose humana transmitida por mosquitos. Apenas entre o período compreendido entre os meses de janeiro e julho de 2007 foram notificados pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde 438.949 casos de dengue clássica, 926 casos de febre hemorrágica da dengue e a ocorrência de 98 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; SCHATZMAYR *et. al.*, 2001).

Os vírus são partículas proteicas contendo ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) e que só se replicam no interior de células, pois não podem gerar energia ou sintetizar proteínas. Por isso, são considerados parasitas intracelulares obrigatórios. Quando um vírus infecta uma célula, a morte desta ocorre principalmente devido a inibição de sua síntese macromolecular, com consequente efeito citopático (LEVINSON e JAWETZ, 2006).

Muitas doenças virais podem ser prevenidas pela imunização ativa, como poliomielite e sarampo. Porém, outras de grande relevância clínica e epidemiológica como hepatite C, dengue e AIDS são causadas por vírus que apresentam grande número de sorotipos, o que inviabiliza esse tipo de prevenção (LEVINSON e JAWETZ, 2006). Geralmente, as diversas medidas sanitárias adotadas no controle das viroses realmente se dão através de vacinas. Entretanto, quando o organismo já se encontra infectado, dificilmente adotam-se medidas para o seu tratamento. A maioria dos medicamentos empregados apenas alivia os sintomas causados pelas infecções virais. Poucas classes de fármacos atuam no ataque ao vírus propriamente dito e esse ataque na maioria das vezes ocorre de forma semelhante, ou seja, na inibição da replicação viral. Dessa forma, não são afetados os vírus que permanecem em estado latente, algo comum entre muitos desses agentes patológicos. Outro problema encontrado para os atuais antivirais empregados é o seu baixo Índice de Seletividade (IS) ou Índice Terapêutico (IT), justamente pelo fato de os vírus se tratarem de parasitas intracelulares obrigatórios. O potencial surgimento de vírus mutantes resistentes a esses fármacos corrobora a ineficácia da farmacoterapia atualmente empregada (SILVA, 2006; SIMONI, 2003).

A relação entre drogas antivirais e produtos naturais é estreita. Basta citar como exemplo a zidovudina (AZT) (10), análogo de nucleosídeo inibidor da transcriptase reversa; um dos fármacos mais prescritos para pacientes infectados pelo HIV. Sintetizada pela primeira vez por Hitchens e Elion, essa droga teve como protótipos duas substâncias isoladas de espécies de esponjas marinhas: esponouridina (11) e espongotimidina (12) (NEWMAN *et al.*, 2000; SILVA, 2006).



Muitos estudos já demonstraram a importância de extratos e metabólitos especiais de plantas como potentes agentes inibidores de vírus. Alguns são apontados como alternativas viáveis aos atuais antivirais empregados ou, até mesmo, como seus coadjuvantes no combate às doenças virais. Espera-se que a necessidade de novas

classes de antivirais que atuem em alvos moleculares diferentes ou ainda simultaneamente em mais de um alvo possa ser suprimida pela diversidade estrutural dos metabólitos especiais encontrados no reino vegetal. Alguns mecanismos de ação e/ou alvos moleculares atribuídos a essas substâncias já foram elucidados e incluem: a inibição da entrada do vírus na célula, a inibição da síntese de DNA ou RNA e a inibição de enzimas da reprodução viral (JASSIM e NAJI, 2003; MUKHTAR *et al.*, 2008; NAITHANI *et al.*, 2008).

Os sinais e sintomas da maioria das patologias virais são decorrentes da morte celular provocada pelo agente ou pela reação imunológica do hospedeiro (LEVINSON e JAWETZ, 2006). Alguns vírus podem ainda induzir a transformação maligna, levando ao crescimento descontrolado da célula infectada e a formação de tumores. Há evidências de que espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS) e espécies reativas derivadas do nitrogênio (RNS) estejam intimamente envolvidas nesses processos. Além disso, a esses radicais livres muitas vezes podem ser atribuídos os processos de mutação que aumentam a taxa de virulência desses agentes infecciosos (AKAIKE, 2001). Isso motiva ainda mais a investigação fitoquímica em busca de novos antivirais, uma vez que mais de 8000 substâncias flavonoídicas e/ou polifenólicas que possuem atividade antioxidante intrínseca tem como origem biossintética a maquinaria celular das plantas (NAITHANI *et al.*, 2008).

Levantamentos de dados etnofarmacológicos para a identificação de espécies vegetais aos quais os usos populares podem ser associados com patologias provocadas por vírus mostra que a família Bignoniaceae, à qual pertence a espécie *Distictella elongata* (Vahl) Urb., está entre uma das mais citadas (BEDIR *et al.*, 2009, SILVA *et al.*, 1998). Um projeto que avalia a atividade antiviral de espécies vegetais de diversas famílias botânicas, selecionadas de acordo com critério etnofarmacológico, é assunto da tese de Geraldo Célio Brandão. Resultados parciais demonstram atividade para os extratos de *D. elongata*.

A avaliação fitoquímica e de atividades antiviral e antioxidante de *D. elongata* contribui para a investigação de alternativas à atual farmacoterapêutica empregada no combate às patologias virais, além de um maior conhecimento de espécies que compõem a imensa biodiversidade brasileira.

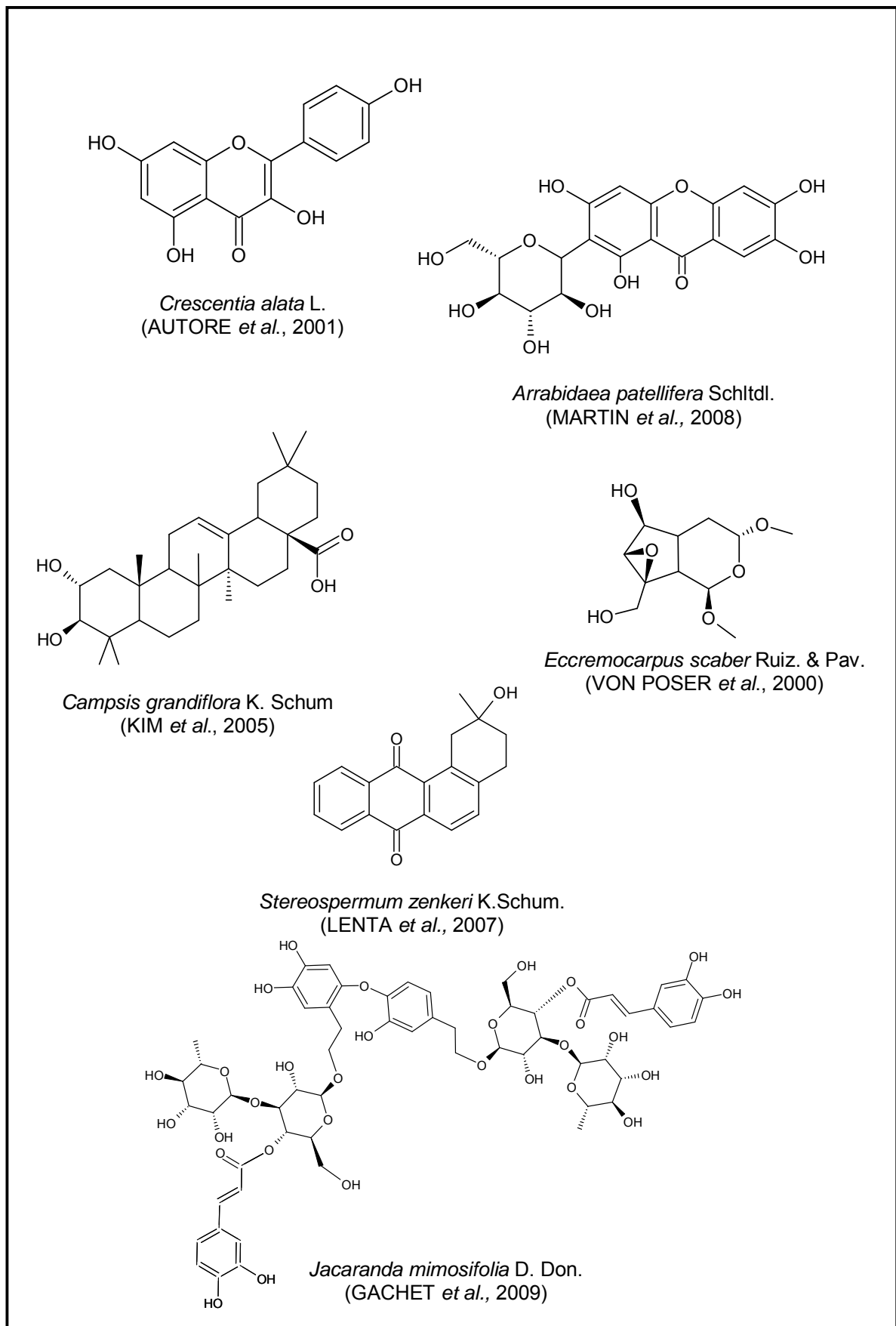
## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 A família Bignoniaceae

A família Bignoniaceae pertence à ordem Lamiales e compreende oito tribos com 104 gêneros e 860 espécies (APG II, 2003; CIPRIANI *et al.*, 2007; PAULETTI *et al.*, 2003). Sua distribuição é predominantemente tropical, destacando-se a América do Sul (MABBERLEY *et al.*, 1997). O Brasil é o maior centro de diversidade dessa família com 55 gêneros e 316 espécies, distribuídas nas tribos Crescentieae, Tecomeae e Bignoniae. A duas primeiras tribos possuem representantes com hábito arbóreo e arbustivo, enquanto a terceira apresenta espécies com hábito arbustivo com crescimento escandente (liana). No território brasileiro são encontrados 45 gêneros e 269 espécies da tribo Bignoniae, ou seja, 74% do total da mesma, que perfazem aproximadamente 85% de espécies da família encontradas no Brasil. Ocorre desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único, pois suas espécies são encontradas no Cerrado, Mata Atlântica e região Amazônica (GENTRY, 1980; PAULETTI *et al.*, 2003).

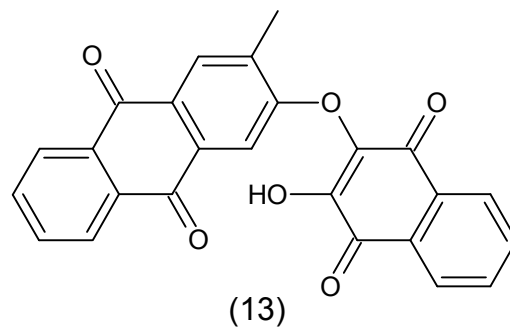
As plantas pertencentes à família Bignoniaceae costumam ser utilizadas na construção civil, carpintaria e construção de instrumentos musicais devido à natureza rígida da madeira. Também no planejamento citadino possuem utilidade como plantas ornamentais, devido à beleza de suas flores, que têm nos ipês (*Tabebuia* spp.) o exemplo mais conhecido no paisagismo urbano (PAULETTI *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, muitas espécies da família Bignoniaceae têm sido estudadas do ponto de vista fitoquímico e farmacológico. Os principais metabólitos secundários encontrados nesta família são derivados fenólicos como xantonas, quinonas, flavonoides e glicosídeos de ariletanoides ou arilpropanoides; além de iridoïdes e terpenoides (CIPRIANI *et al.*, 2007; GACHET *et al.*, 2009) (**Figura 1**, pág. 28). É considerável o número de publicações sobre atividades biológicas nas quais foram avaliados extratos e/ou constituintes químicos isolados, bem como substâncias sintetizadas com base nos metabólitos isolados (CAMPANA *et al.*, 2009; CORRAL *et al.*, 2002; GOULART *et al.*, 1997).

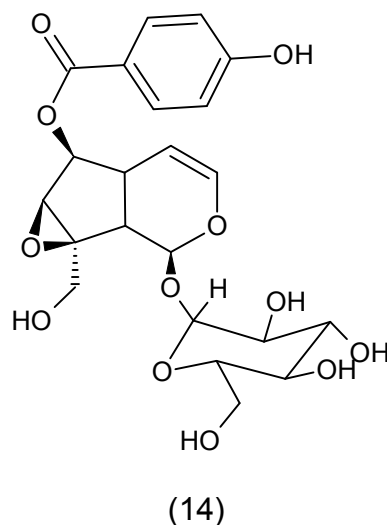


**Figura 1 - Exemplos da diversidade estrutural dos constituintes de espécies de Bignoniaceae.**

A atividade antimicrobiana de extratos e substâncias isoladas de espécies de Bignoniaceae já foi demonstrada em muitos estudos (**Tabela 1**, pág. 30). Isolada das raízes de *Newboldia laevis* Seem., a nafto-antraquinona newbouldiaquinona A (13) demonstrou atividade *in vitro* contra bactérias e leveduras. Para *Enterobacter aerogenes* e *Candida glabrata*, as concentrações inibitórias mínimas encontradas para essa substância foram, respectivamente, 24 e 13 vezes maiores que as dos antimicrobianos de referência (gentamicina e nistatina) no combate a esses microrganismos (EYONG *et al.*, 2006).



O catalposídeo (14) é um iridoide presente nas cascas de *Catalpa ovata* G. Don. que apresenta algumas atividades biológicas. Entre essas se encontram a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos ativados por lipopolissacarídeo (AN *et al.*, 2002) e a proteção de células neuronais do estresse oxidativo (MOON *et al.*, 2003). Outras espécies de Bignoniaceae também demonstram atividade anti-inflamatória e/ou antioxidante (**Tabela 2**, pág. 31).





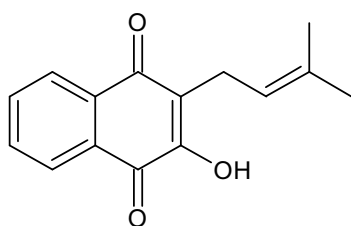
**Tabela 1 - Exemplos de espécies de Bignoniaceae que apresentam atividade antimicrobiana**

<b>Espécie(s)</b>	<b>Microrganismo(s) inibido(s)</b>	<b>Substância(s) e/ou extrato(s) ativo(s)</b>	<b>Referências</b>
<i>Mansoa hirsuta</i> DC. e <i>Clytostoma ramentaceum</i> Bur & K. Schum. (folhas)	<i>Fusarium niger</i> e <i>Aspergillus oxysporum</i>	alcanóis, alcanodióis e ácido ursólico	ROCHA <i>et al.</i> , 2004
<i>Markhamia lutea</i> (Seem.) K. Schum. (folhas e raízes)	Herpes simplex tipo 1 e cocksackie B2 virus	extratos etanólicos	VLIETINCK <i>et al.</i> , 1995
<i>Newbouldia laevis</i> (raízes)	<i>Cladosporium cucumerinum</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Escherichia coli</i>	naftoquinonas	GAFNER <i>et al.</i> , 1996
<i>Stereospermum zenkeri</i> K.Schum. (cascas do caule)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	antraquinonas	LENTA <i>et al.</i> , 2007
<i>Tabebuia impetiginosa</i> Martius (cascas do caule)	<i>Helicobacter pylori</i>	naftoquinonas	PARK <i>et al.</i> , 2006
<i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb	Cepas de <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes a metilina	lapachol e derivados	PEREIRA <i>et al.</i> , 2006
<i>Zeyheria tuberculosa</i> (Vell.) Bur. (caule)	<i>Staphylococcus aureus</i>	extrato etanólico e metoxiflavonas	BASTOS <i>et al.</i> , 2009

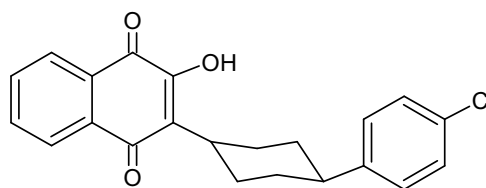
O lapachol (15), uma naftoquinona comum a algumas espécies de Bignoniaceae, apresenta um largo espectro de bioatividades: antibacteriana, tripanossomicida, antiplasmódica, antitumoral e antioxidante. Não é de se estranhar o interesse na obtenção de substâncias bioativas derivadas do mesmo. É o caso da atovaquona (16), um fármaco aprovado para o tratamento de pneumonia provocada por *Pneumocystis* ssp., malária e toxoplasmose (EYONG *et al.*, 2008). Muitas substâncias e/ou extratos advindos de espécies de Bignoniaceae possuem essas e outras atividades promissoras (**Tabela 3**, pág. 32).

**Tabela 2 - Exemplos de espécies de Bignoniaceae que apresentam atividade anti-inflamatória e/ou antioxidante**

<b>Espécie(s)</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Substância(s) e/ou extrato(s) ativo(s)</b>	<b>Referências</b>
<i>Arrabidaea patellifera</i> Schlttdl. (folhas)	Antioxidante	C-glicosilxantonas	MARTIN <i>et al.</i> , 2008
<i>Catalpa bignonioides</i> Walt. (folhas, flores e frutos)	Antioxidante	extratos metanólicos	DVORSKÁ <i>et al.</i> , 2007
<i>Catalpa ovata</i> G. Don. (caule)	Inibição da síntese de óxido nítrico e de TNF $\alpha$	extrato metanólico	PAE <i>et al.</i> , 2003
<i>Crescentia alata</i> L. (folhas)	Inibição da síntese de óxido nítrico	extrato metanólico, flavonoides	AUTORE <i>et al.</i> , 2001
<i>Dolichandrone falcata</i> Seem (caule)	Antioxidante	arilpropanoides glicosilados	APARNA <i>et al.</i> , 2009
<i>Pachyptera hymenaea</i> (folhas)	Antinociceptiva	extrato aquoso	VERMA <i>et al.</i> , 2007
<i>Pithecoctenium crucigerum</i> (L.) A.H. Gentry (caule)	Antioxidante	ariletanoides glicosilados	MARTIN <i>et al.</i> , 2007
<i>Tabebuia avellanedae</i> Lorentz ex Griseb (cascas do caule)	Inibição da síntese de óxido nítrico	iridoides, ariletanoides glicosilados	AWALE <i>et al.</i> , 2005
<i>Tabebuia impetiginosa</i> Martius (cascas do caule)	Inibição da agregação plaquetária	fração clorofórmica do extrato metanólico	SON <i>et al.</i> , 2006
<i>Zeyheria montana</i> Mart. (folhas)	Analgésica e anti-inflamatória	extrato etanólico	GUENKA <i>et al.</i> , 2008



(15)



(16)

**Tabela 3 - Exemplos de espécies de Bignoniaceae que apresentam outras atividades biológicas**

<b>Espécie</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Substância(s) isolada(s) e/ou extratos ativo(s)</b>	<b>Referência</b>
<i>Arrabidaea triplinervia</i> H. Baill. (folhas)	Tripanossomicida	terpenoides	LEITE <i>et al.</i> , 2006
<i>Campsis grandiflora</i> K. Schum. (flores)	Hipocolesterolemiantes	terpenoides	KIM <i>et al.</i> , 2005
<i>Cybistax antisiphilitica</i> Martius (caule)	Inibição de larvas do <i>Aedes aegypti</i>	lapachol	RODRIGUES <i>et al.</i> , 2005
<i>Jacaranda puberula</i> Cham. (folhas)	Anti-leishmania	extrato metanólico	PASSERO <i>et al.</i> , 2007
<i>Mansoa hirsuta</i> D.C. (folhas)	Vasorrelaxamento	extrato etanólico	CAMPANA <i>et al.</i> , 2009
<i>Melloa quadrivalvis</i> (Jacq.) A.H.Gentry (cascas do caule)	Citotoxicidade	piranoftoquinonas	LIMA <i>et al.</i> , 2005
<i>Stereospermum kunthianum</i> Cham. (caule)	Antimalárica	naftoquinonas e antraquinona	ONEGI <i>et al.</i> , 2002
<i>Tecomella undulata</i> Seem. (cascas do caule)	Hepatoproteção	extrato etanólico	KHATRI <i>et al.</i> , 2009
<i>Tecoma stans</i> (L.) Juss. ex Kunth (folhas)	Antidiabética	extrato aquoso	AGUILAR-SANTAMARÍA <i>et al.</i> , 2009

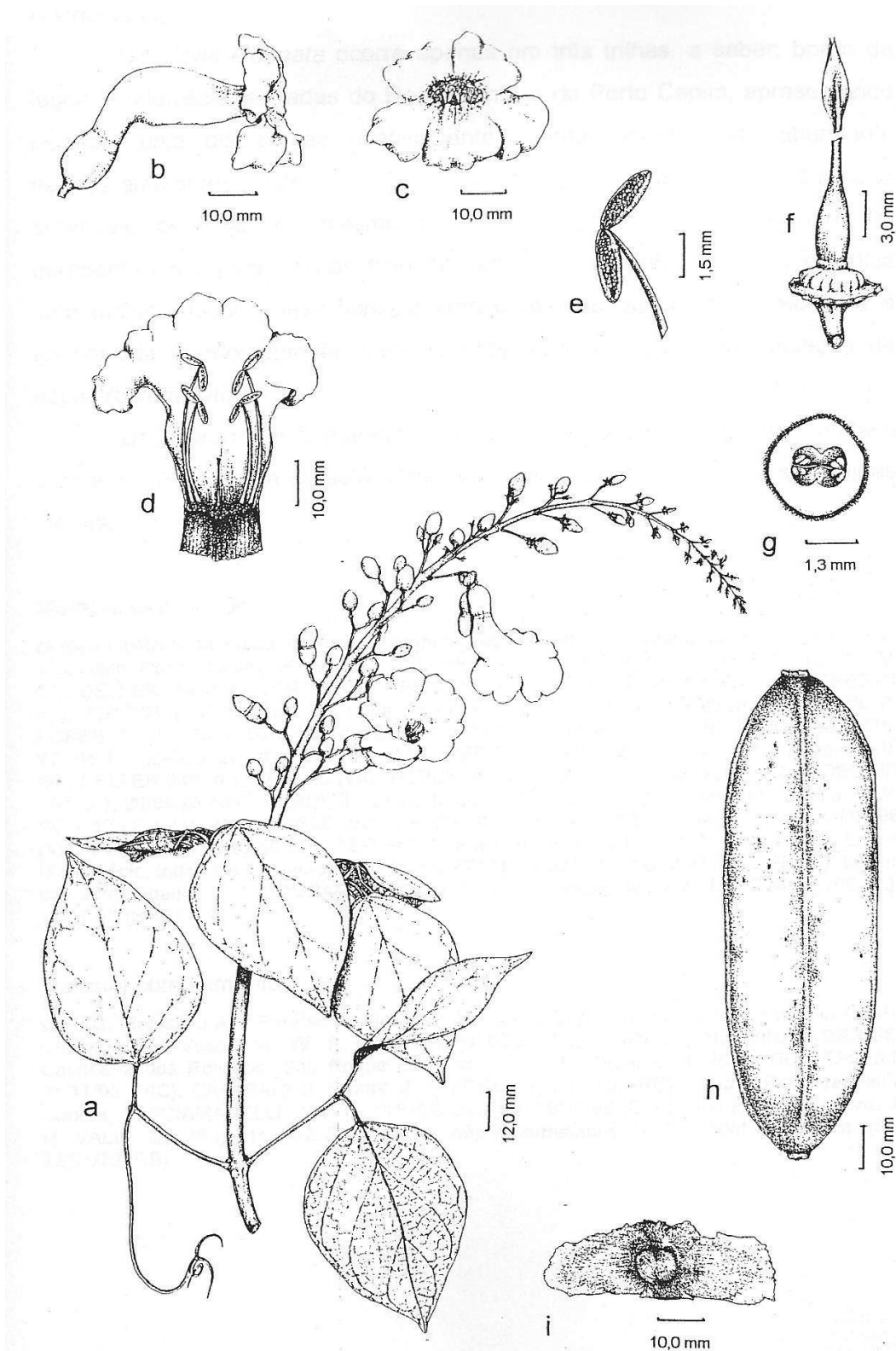
### **2.1.1 O gênero *Distictella* e a espécie *Distictella elongata* (Vahl.) Urb.**

De acordo com Gentry (1973), o gênero *Distictella* apresenta aproximadamente dez espécies na América Tropical, que ocorrem desde a Costa Rica até o Brasil. É caracterizado por possuir fruto em cápsula septígrafa, oblongo, tomentoso e achatado, com duas valvas lenhosas, curvadas, o replum fixando o septo, o último com numerosas fileiras de cicatrizes lineares das sementes ao longo de cada bordo e semente pubescente (SCUDELLER, 1997).

*Distictella elongata* (Vahl) Urb. (**Figura 2**, pág. 34) caracteriza-se por apresentar a lâmina foliolar obovada a elíptica, com dimensões 7,2-10,7 × 3,9-6,1 cm, base arredondada, ápice obtuso, margem inteira, levemente assimétrica, pilosa em ambas as faces, nervuras secundárias em número de seis a oito, inicialmente acompanhando a primária e com ângulo de divergência levemente agudo; gavinha trífida; inflorescência alongada e floribunda, com cálice verde amarelado, 0,6-0,8 × 0,7-0,9 cm, campanulado, lepidoto, 5-mucronado; corola rosa, estreito campanulada, tubo 4,2-4,5 × 1,5-2 cm, lobo 1,5-1,6 × 1-1,1 cm; inserção dos estames vilosa; ovário 0,2 × 0,1 cm, linear, lepidoto; disco nectarífero inconspícuo; fruto cápsula septígrafa, oblongo, superfície vilosa, nervura dorsal saliente, de coloração marrom-avermelhada. No campo, essa espécie é facilmente reconhecida pelas flores esbranquiçadas a creme claro e fauce amarelada, com forte odor adocicado e pelos campos de glândulas na porção apical do cálice, geralmente muito visitados por formigas (SCUDELLER, 1997).

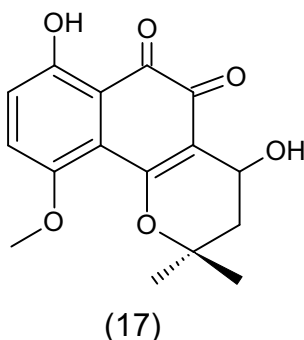
Apresenta os seguintes sinônimos: *Bignonia elongata* Vahl (basiônimo); *Amphilophium elongatum* (Vahl) L.G. Lohmann; *Distictis elongata* (Vahl) Bureau ex Benth; *Doxantha elongata* (Vahl) Miers e *Pithecoctenium elongatum* (Vahl) Klotzsch (sinônimos homotípicos); e *Pithecoctenium obovatum* Mart. ex DC. (sinônimo heterotípico) (FLORA BRASILIENSIS, 2009). Não foram encontrados nomes populares para a referida espécie na literatura.

Ocorre nos seguintes países sul-americanos: Bolívia, Colômbia, Guiana, Guiana Francesa, Peru, Venezuela e Brasil. E, neste último, nos seguintes estados: Amapá, Amazonas, Bahia, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraná, Rondônia, Roraima e São Paulo (LOHMANN, 2007).



**Figura 2 - *Distictella elongata* (Vahl.) Urb. – ramo fértil (a), vista lateral da flor (b), vista frontal da flor (c), corola aberta (d), detalhe da antera (e), gineceu e disco nectarífero (f), seção transversal do ovário (g), fruto (h) e semente (i) (Reproduzido de SCUDELLER, 1997).**

Há dois registros de estudos de potencial bioatividade de espécies pertencentes a esse gênero. O primeiro se refere à atividade citotóxica do extrato orgânico de partes aéreas de *Distictella magnoliifolia* (HBK) Sandwith. Esse apresentou um índice de letalidade de 81% para células de uma linhagem leucêmica em ensaio *in vitro* (SUFFREDINI *et al.*, 2007). Bedir e colaboradores (2009) foram os primeiros a relatar uma atividade biológica apresentada por *Distictella elongata* (Vahl) Urb. O extrato clorofórmico de suas raízes apresentou atividade citotóxica significativa frente a linhagens de células tumorais humanas do tipo SK-MEL (melanoma) e SK-OV-3 (carcinoma de ovário), com valores de  $CI_{50}$  de 40  $\mu\text{g/mL}$  e 56  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Através de técnicas cromatográficas clássicas, isolaram deste extrato uma naftoquinona até então inédita: 4,7-diidroxi-10-metóxi-2,2-dimetil-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromeno-5,6-diona (17), que não apresentou a referida atividade.



## 2.2 Espécies vegetais com atividade antiviral

O uso de plantas medicinais no tratamento de pacientes acometidos por infecções virais ainda hoje é acentuado. Diversas culturas usam tradicionalmente chás, infusos, tinturas, elixires e cápsulas de extratos vegetais com o propósito de cura ou alívio dos sintomas dessas doenças. Países como China, Índia, Japão, Paquistão, Tailândia e do continente africano estão entre aqueles que mais se destacam neste tipo de intervenção terapêutica antiviral. Entre as patologias virais mais combatidas dessa forma destacam-se o resfriado comum, a gripe, o herpes, as hepatites e a AIDS. Essa última é responsável por um grande fomento na investigação fitoquímica e farmacológica na busca de novos fármacos antirretrovirais (JASSIM e NAJI, 2003; MUKHTAR *et al.*, 2008).

O primeiro interesse, que se tem registro, no desenvolvimento de novos agentes antivirais a partir de plantas surgiu após a segunda guerra mundial. Em 1952 a companhia farmacêutica Boots (Nottingham, Inglaterra) realizou uma triagem de 288 plantas à procura de alguma que apresentasse atividade anti-influenza. Essa atividade foi encontrada para doze espécies. Desde então, muitos são os grupos de pesquisa que realizam programas com esse tipo de seleção, avaliação da atividade antiviral *in vitro* ou *in vivo* de extratos vegetais (JASSIM e NAJI, 2003; MUKHTAR *et al.*, 2008).

Nos anos 70, pesquisadores canadenses demonstraram que os sucos de algumas frutas como uva, maçã e morango inibiam vírus importantes como herpes simplex (HSV), poliovírus tipo 1 (PV-1), coxsackievírus B5 (Cox-B5) e echovírus 7 (JASSIM e NAJI, 2003).

McCutcheon e colaboradores (1995) publicaram os resultados dos testes de extratos metanólicos de 100 espécies vegetais britânicas frente a sete vírus. Doze deles apresentaram promissoras atividades em concentrações não citotóxicas. *Rosa nutkana* Presl var. *nutkana* e *Amelanchier alnifolia* Nutt. var. *humptulipensis* (Jones) Hitchc., ambas da família Rosaceae, foram ativas contra um coronavírus entérico. Outro membro dessa família, *Potentilla arguta* Pursh inibiu completamente o vírus sincicial respiratório (RSV). *Ipomopsis aggregata* (Pursh) Grant var. *aggregata* (Polemoniaceae) exibiu boa atividade contra o vírus parainfluenza tipo 3. *Lomatium dissectum* (Nutt.) Math. et Const. var. *multifidum* (Nutt.) Math. et Const. (Umbelliferae) inibiu o efeito citopático do rotavírus. E os extratos preparados com as seguintes espécies foram ativos contra o vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1): *Conocephalum*

*conicum* (L.) Dum. (Conocephalaceae), *Lysichiton umericunum* Hulten et St. John (Aracaceae), *Polypodium glycyrrhizu* D.C. Eaton (Polypodiaceae) e *Verbascum thapsus* L. (Scrophulariaceae).

Baseado no uso tradicional de plantas em Ruanda, um estudo testou dezenas de extratos vegetais etanólicos frente a alguns vírus. Alguns exibiram proeminentes atividades. Podem ser citados como exemplos aqueles derivados de *Crassocephalum multicorymbosum* (Klatt.) S. More (Asteraceae) e *Laggera brivepes* Olive et. Hiern (Asteraceae) que reduziram, respectivamente, os títulos dos vírus polio (PV) e coxackie (Cox) na ordem de  $10^3$  (VLIETINCK *et al.*, 1995).

Taylor e colaboradores (1996) testaram os extratos metanólicos de 22 plantas nepalesas, cujos empregos populares eram associados a prováveis patologias virais. Entre elas destacou-se a espécie *Hypericum uralum* Buch.-Ham. ex D. Don (Hypericaceae), ativa contra os três vírus testados: HSV-1, poliovírus tipo 1 (PV-1) e Sindbis.

Semple e colaboradores (1998) testaram 40 extratos obtidos de plantas australianas com emprego popular. Os extratos de partes aéreas de *Pterocaulon sphacelatum* (Labill.) F. Muell. (Asteraceae) e de raízes de *Dianella longifolia* R. Br. var. *grandis* (Liliaceae), foram os mais ativos contra PV-1. Já para a inibição do citomegalovírus humano (HCMV), os melhores resultados foram obtidos para os extratos de *Euphorbia australis* Boiss. (Euphorbiaceae) e *Scaevola spinescens* R. Br. (Goodeniaceae).

Seis plantas medicinais da mata atlântica brasileira foram avaliadas quanto as suas atividades inibitórias frente aos vírus HSV-1 e poliovírus tipo 2: *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) MacBride (Lythraceae), *Lippia alba* (Miller) N.E. Brown (Verbenaceae), *Tillandsia usneoides* (L.) L. (Bromeliaceae), *Bromelia antiacantha* Bert. (Bromeliaceae), *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze (Araucariaceae) e *Wilbrandia ebracteata* Cogn. (Cucurbitaceae). Dos extratos testados, aqueles preparados com acetato de etila das partes aéreas de *Cuphea carthagenensis* e de *Tillandsia usneoides* foram os que melhor apresentaram atividade frente ao HSV-1: IS (Índice de Seletividade) de 90 e 65, respectivamente. Extratos etanólicos e butanólicos de *L. alba* (folhas), *T. usneoides* (partes aéreas) e *W. ebracteata* (partes subterrâneas) demonstraram atividade contra uma linhagem de HSV resistente a aciclovir (ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2005).

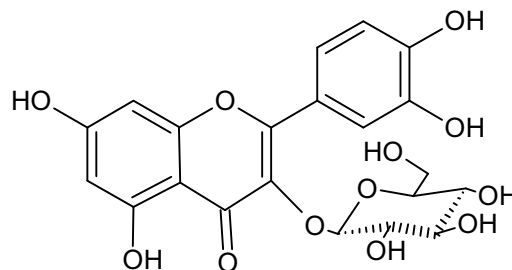


A partir do momento em que são demonstrados bons parâmetros de atividade inibitória viral (baixa  $CE_{50}$  e alto IS) para extratos vegetais, cresce o interesse no isolamento de substâncias que estejam neles presentes (JASSIM e NAJI, 2003; MUKHTAR *et al.*, 2008). Os próximos itens descrevem alguns metabólitos, dentre tantos isolados de plantas, que apresentam promissoras atividades antivirais. Dentre os mesmos se encontram aqueles que são apontados como bons candidatos a se tornarem novos fármacos antivirais e/ou seus protótipos.

### **2.2.1 Flavonoides**

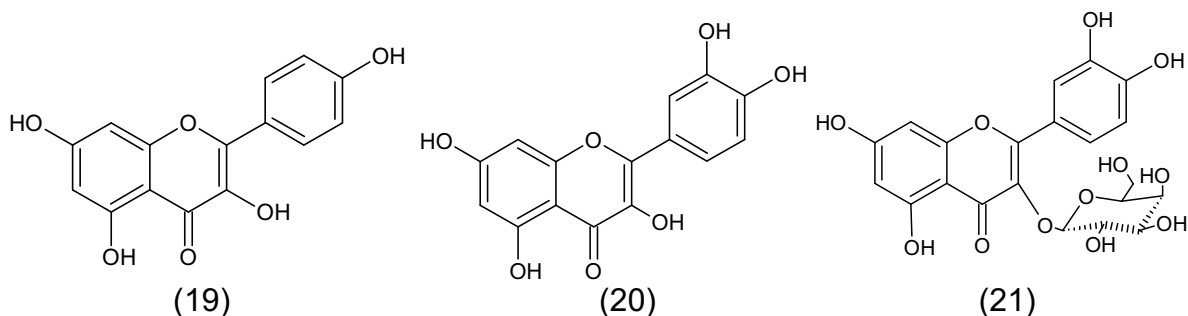
Os flavonoides constituem a maior classe de metabólitos secundários de plantas com representantes que já demonstraram alguma atividade antiviral (NAITHANI *et al.*, 2008).

Através de bioensaio guiado, Abou-Karam e Shier (1992) isolaram a isoquercitrina (18) das folhas de *Waldsteinia fragarioid* Tratt. (Rosaceae), que inibiu completamente, na concentração de 15,7  $\mu\text{g/mL}$ , o HSV-1, com  $CC_{50}$  de 250  $\mu\text{g/mL}$ .



(18)

Os flavonóis canferol (19), quercetina (20) e hiperina (21), presentes no extrato etanólico de partes aéreas de *Geranium carolinianum* L. (Geraniaceae) inibiram a secreção dos antígenos HBsAg e HBeAg de uma linhagem de células humanas infectadas pelo vírus da hepatite B (HBV). Esses resultados são um indício de que tais substâncias interferem no ciclo de vida viral (LI *et al.*, 2008).

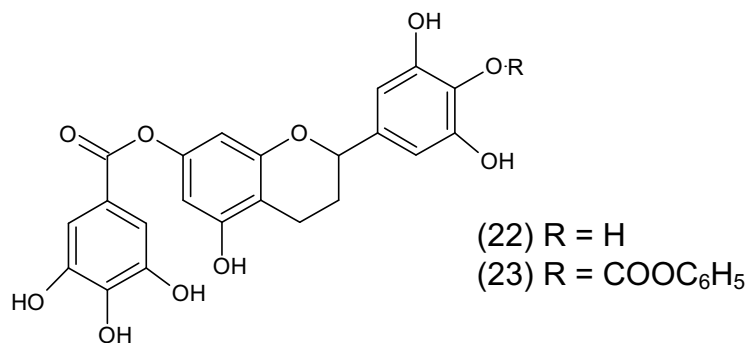


(19)

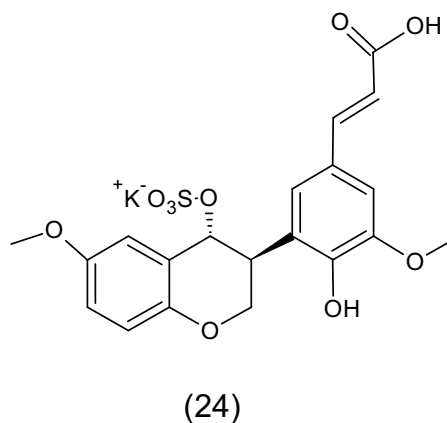
(20)

(21)

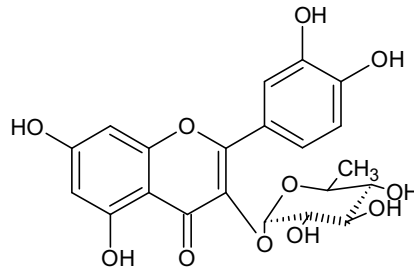
Duas novas flavanas, 7-O-galoiltricetiflavana (22) e 7,4'-digaloiltricetiflavana (23), isoladas das folhas de *Pithecellobium clypearia* (Jack) Benth. (Mimosaceae) apresentaram valores de  $CE_{50}$  iguais a 5,0 e 10,0  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, frente ao RSV; 15,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$  frente ao  $H_1N_1$ ; 12,5 e 25,0  $\mu\text{g/mL}$  contra o Cox-B3 e 20,0 e 30,0  $\mu\text{g/mL}$  frente ao HSV-1. Para todos os testes foram encontrados IS com valores  $\geq 2,0$ . Os resultados foram obtidos através do ensaio da observação de redução do efeito citopático (CPE) (LI *et al.*, 2006).



Isolado do extrato metanólico dos frutos de *Solanum torvum* Swartz (Solanaceae), o isoflavonoide sulfatado torvanol A (24) apresentou uma  $CE_{50}$  igual a 9,6  $\mu\text{g/mL}$  no teste frente ao HSV-1 (ARTHAN *et al.*, 2002).

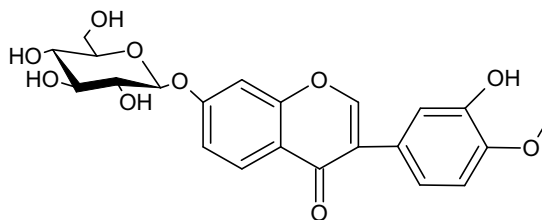


A quercetina-3-ramnosídeo (25) se mostrou mais ativa que o fármaco oseltamivir ao inibir o efeito citopático do vírus influenza AWS/33. Enquanto o flavonoide inibiu 86% do efeito citopático numa concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ , o fármaco apresentou tal efeito na ordem de 58%, quando avaliado na mesma concentração. Não foi observada citotoxicidade nessa concentração (CHOI *et al.*, 2009).



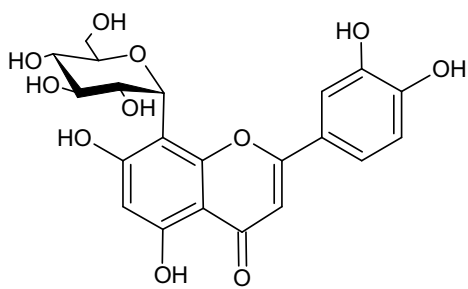
(25)

O isoflavonoide calicosina-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo (26) foi isolado de *Astragalus membranaceus* var. *Mongholicu* (BGE.) HSIAO (Fabaceae), uma erva medicinal chinesa tradicionalmente utilizada no tratamento de miocardite viral. Ensaios antivirais *in vitro* frente ao vírus Cox-B3, agente etiológico da doença, demonstraram boa atividade inibitória,  $CE_{50}$  de 25  $\mu\text{g/mL}$  e baixa citotoxicidade. Em um modelo de miocardite murina, tratamento com 24 mg/kg da mesma substância por 14 dias aumentou significativamente a taxa de sobrevivência dos camundongos infectados com o Cox-B3, além de aliviar os danos patológicos provocados pelo vírus, reduzir os títulos virais no coração e aumentar a função ventricular esquerda (ZHU *et al.*, 2009).

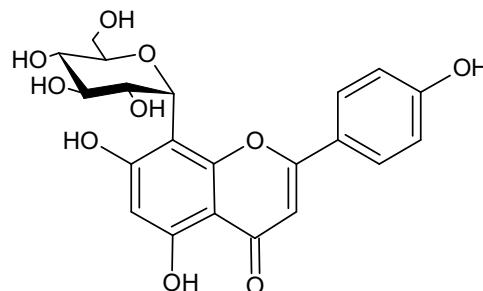


(26)

Dois C-glicosilflavonas, orientina (27) e vitexina (28) apresentaram  $CE_{50}$  de 11,7 e 20,8  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, frente ao vírus parainfluenza tipo 3. Tais flavonas foram isoladas das flores de *Trollius chinensis* Bunge (Ranunculaceae), planta medicinal chinesa tradicionalmente utilizada no tratamento de infecções do trato respiratório. Além de boas  $CE_{50}$ , apresentaram também altos valores de IS (32,1 e 16,0, respectivamente) (LI *et al.*, 2002).

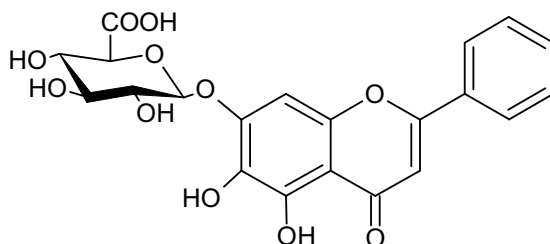


(27)



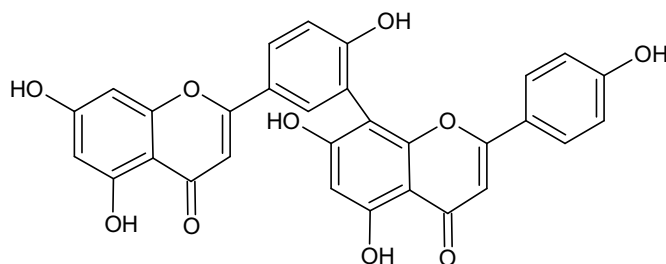
(28)

A baicaleína (29), isolada da espécie *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae), é uma flavona que inibe a replicação do HIV-1 numa relação dose-dependente e que já demonstrou exercer mais de um mecanismo de ação contra o mesmo. Além de inibir a transcriptase reversa, essa flavona interfere na interação das proteínas do envelope viral com as células CD4+, bloqueando sua infecção (ASRES *et al.*, 2005).



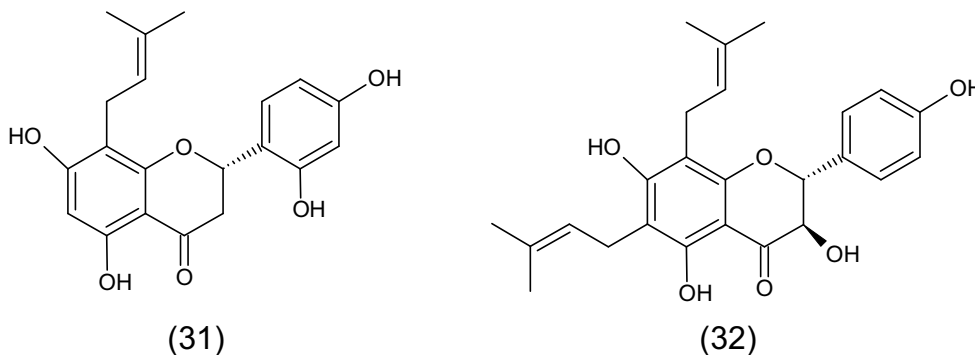
(29)

A amentoflavona (30) está entre os biflavonoides presentes em *Rhus succedanea* L. (Anacardiaceae) que apresentam a propriedade de inibição da enzima transcriptase reversa do HIV, com CE<sub>50</sub> de 119 µM (LIN *et al.*, 1997).



(30)

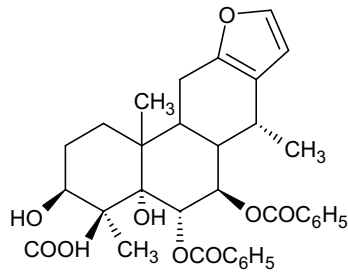
Derivados prenilados de flavonoides são apontados como substâncias com proeminentes atividades antivirais. Esse é o caso da leachianona G (31), isolada das raízes de *Morus alba* L. (Moraceae) e que inibiu a ação do HSV-1 *in vitro* ( $CE_{50} = 1,6$  com  $CC_{50} = 15,5 \mu\text{g/mL}$ ) (DU *et al.*, 2003). Em se tratando de inibição do HIV, a presença de grupos prenila no esqueleto flavonônico parece contribuir significativamente para a atividade dessas substâncias. Isso pode ser exemplificado pelo flavonoide 6,8-diprenilaromadendrina (32), com valor de  $CE_{50}$  igual a  $2,1 \mu\text{g/mL}$ , isolado das folhas de *Monotes africanus* Welw. & Kirk ex A. DC. (Dipterocarpaceae) (MERAGELMAN *et al.*, 2001).



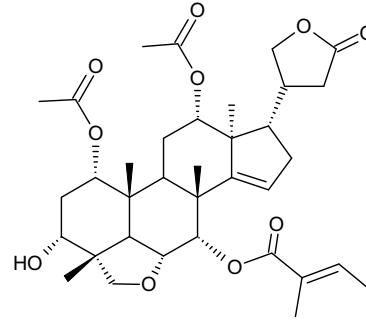
### **2.2.2 Terpenoides**

Uma ampla e diversa classe de metabólitos formados pela condensação de unidades de isopreno também já tiveram muitos de seus representantes investigados quanto à presença de atividade antiviral (NAITHANI *et al.*, 2008).

O caesalmino C (33) é um dos seis furanoditerpenos tipo cassano que foram isolados das sementes de *Caesalpinia minax* Hance (Fabaceae) por Jiang e colaboradores (2001). O mesmo exibiu atividade antiparainfluenza tipo 3, com  $CE_{50} = 8,2 \mu\text{g/mL}$  e  $IS = 23,9$ . Os outros cinco diterpenos também apresentaram boa atividade indicando que substâncias com esse tipo de estrutura podem ser bons candidatos a fármacos antivirais. O mesmo pode ser dito para os tetranortriterpenoides, como, o disoxilino A (34). Juntamente com outros análogos estruturais, tal triterpenoide demonstrou atividade anti-RSV ( $CE_{50} = 2,0 \mu\text{g/mL}$  e  $CC_{50} = 150 \mu\text{g/mL}$ ) (CHEN *et al.*, 2007).

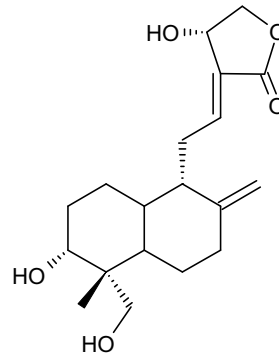


(33)



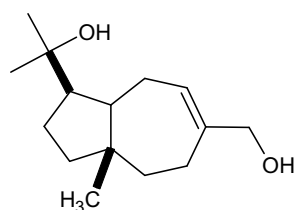
(34)

O andrografóldeo (35) é um diterpeno presente na espécie *Andrographis paniculata* Nees (Acanthaceae) que já foi testado em alguns ensaios antivirais. Lin e colaboradores (2008) demonstraram que apenas 5,0 µg/mL do mesmo são capazes de inibir, *in vitro*, a expressão de proteínas líticas do vírus Epstein-Barr (EBV).

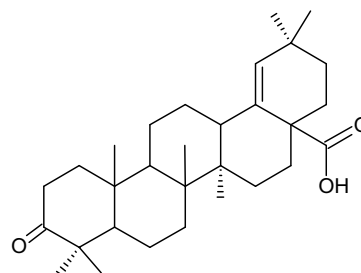


(35)

O sesquiterpeno do tipo carotano, esquisanwilsoneno A (36) inibiu de forma eficaz a secreção dos antígenos HBsAg e HBeAg de uma linhagem de células humanas infectadas pelo HBV. O mesmo foi isolado dos frutos de *Schisandra wilsoniana* A. C. Smith (Schisandraceae) (MA *et al.*, 2009). Já o ácido morônico (37) é um triterpeno que foi isolado de *Rhus javanica* L. (Anacardiaceae) e apresentou atividade anti-HSV *in vitro* e *in vivo* (KUROKAWA *et al.*, 1999).

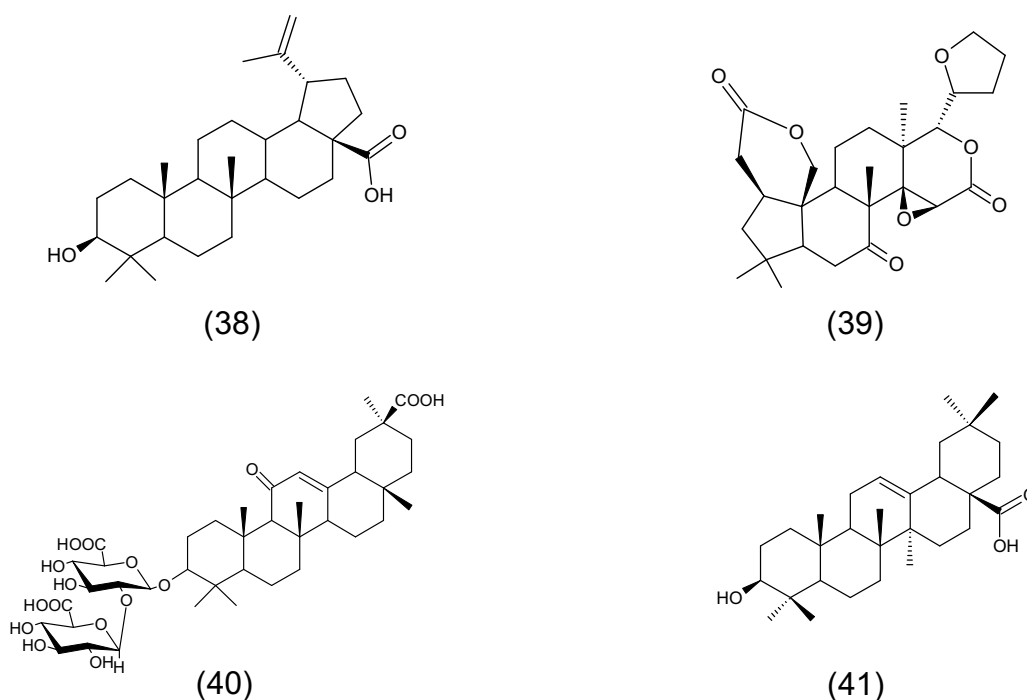


(36)



(37)

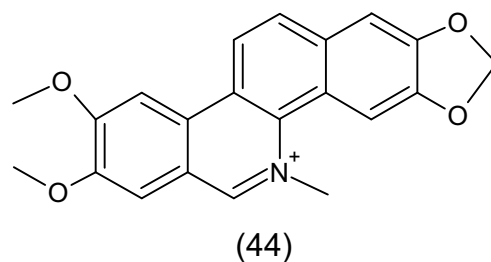
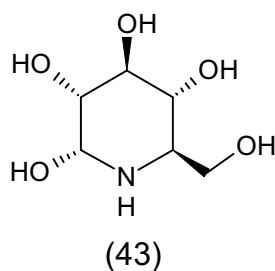
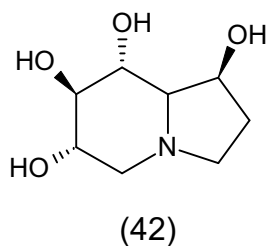
Muitos triterpenoides, comuns a várias espécies vegetais, demonstraram potenciais atividades anti-HIV. São exemplos o ácido betulínico (38) e alguns de seus derivados naturais e/ou sintéticos, que inibem a entrada do vírus nas células; já o ácido oleanólico (41), inibe a replicação do HIV *in vitro*. O limonoide (39) inibe a protease viral; enquanto a saponina glicirrizina (40), isolada das raízes de *Glycyrrhiza glabra* L. (Fabaceae), que já foi testada até mesmo em pacientes infectados, inibe a replicação do HIV *in vitro* (ASRES *et al.*, 2005).



### **2.2.3 Alcaloides**

Os alcaloides são substâncias nitrogenadas comuns a 15-20% das plantas vasculares, possuem em sua estrutura um ou mais átomos de nitrogênio (NAITHANI *et al.*, 2008).

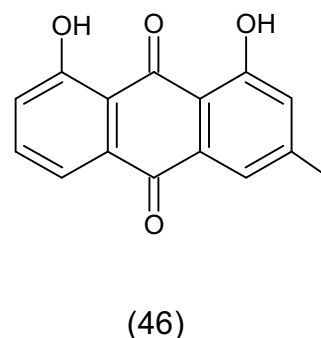
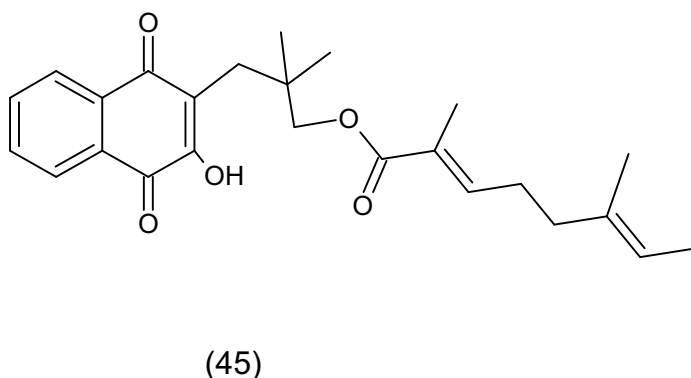
A inibição da  $\alpha$ -glicosidase, importante na formação de partículas virais de HIV infectantes é característica para alguns alcaloides. Esses incluem os indolizidínicos, como a castanospermina (42), isolada das sementes de *Castanospermum australe* A. Cunn. (Papilionaceae) e os piperidínicos como a 1-desoxinojirimicina (43), extraída da folhas de espécies do gênero *Morus* (ASRES *et al.*, 2005). Outro mecanismo de ação de alcaloides anti-HIV é a inibição da transcriptase reversa, observado para a nitidina (44), isolada das raízes de *Toddalia asiatica* L. Lam. (Rutaceae) (YANG *et al.*, 2001).



### **2.2.4 Quinonas**

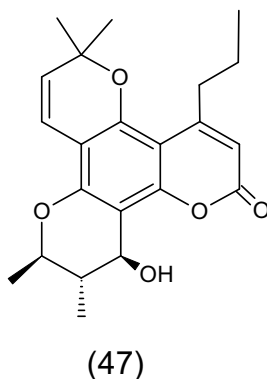
Para a rhinacanthina C (45), uma das naftoquinonas isoladas da espécie *Rhinacanthus nasutus* L. KURZ (Acanthaceae) observou-se uma  $CE_{50}$  de 1,1  $\mu\text{g/mL}$  (IS = 7,3) frente ao HCMV (SENDL *et al.*, 1996).

O ácido crisofânico (46), uma antraquinona isolada das raízes de uma planta medicinal australiana, *Dianella longifolia* R. Br. var. *grandis* (Liliaceae), inibiu a replicação de poliovírus 2 e poliovírus 3 *in vitro* (SEMPLE *et al.*, 2001).



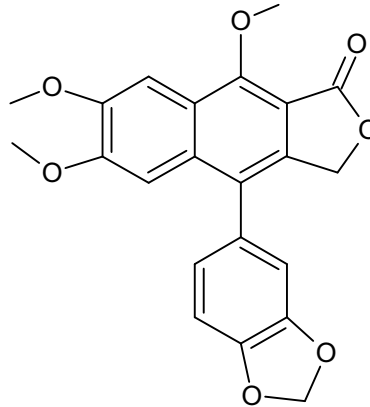
### **2.2.5 Outras classes de metabólitos especiais com atividade antiviral**

O calanolídeo A (47), uma cumarina isolada das folhas de *Calophyllum lanigerum* Miq. (Guttiferae), demonstrou atividade inibidora da transcriptase reversa e já teve sua farmacocinética avaliada em humanos sadios (CREAGH *et al.*, 2001).



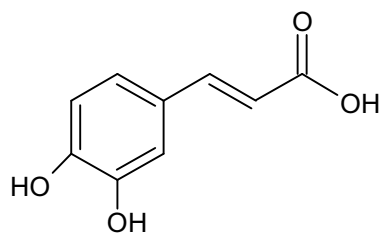


As lignanas também possuem representantes com atividade antiviral. Para a justicidina C (48), isolada das partes aéreas de *Justicia procumbens* L. (Acanthaceae), foi observada uma concentração inibitória mínima de 16 µg/mL para o vírus da estomatite vesicular (ASANO *et al.*, 1996).

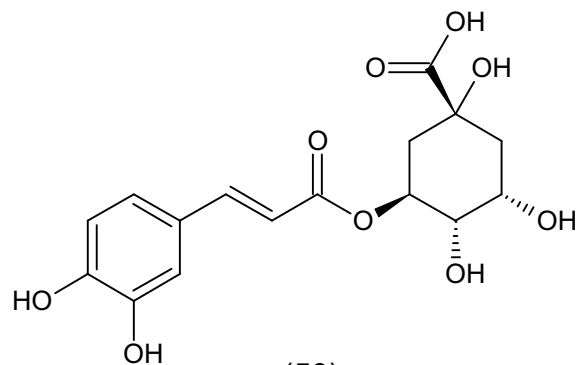


(48)

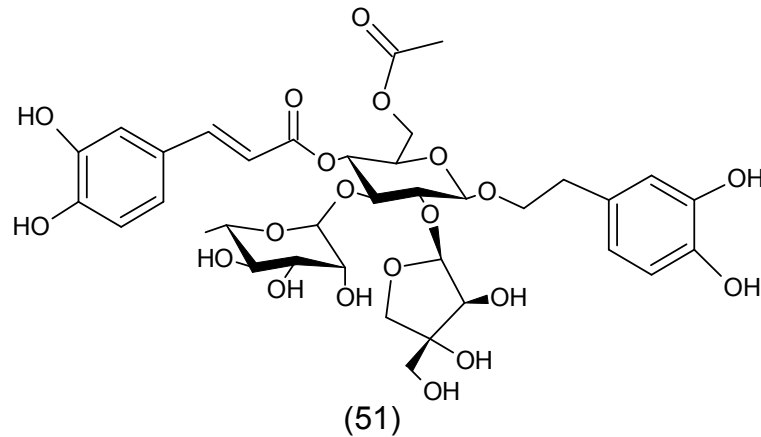
Algumas substâncias fenólicas comumente presentes nas células vegetais como o ácido cafeico (49) e o ácido clorogênico (50), também já tiveram atividades antivirais avaliadas. Num estudo realizado por Chiang e colaboradores (2002), suas  $CE_{50}$  para o HSV-1 foram de 15,3 e 47,6 µg/mL, respectivamente; enquanto que para o HSV-2 foram, respectivamente, 87,3 e 86,5 µg/mL. Outras não tanto comuns como o arilpropanoide glicosilado luteosídeo A (51), isolado das raízes de *Markhamia lutea* (Benth.) K.Schum. (Bignoniaceae) apresentou uma  $CE_{50}$  de 0,87 µg/mL e IS de 89,0 frente ao RSV (KERNAN *et al.*, 1998).



(49)



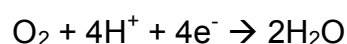
(50)



Outros metabólitos secundários tais como: saponinas, iridoides, organossulfurados e taninos, também já passaram por ensaios de atividade antiviral e apresentaram atividades inibitórias a diversos vírus (NAITHANI *et al.*, 2008).

### 2.3 Vírus e radicais livres

Um radical livre pode ser definido como um átomo ou molécula que contém um ou mais elétrons não pareados. Os radicais livres mais comumente descritos são aqueles originados a partir do oxigênio. O oxigênio (O<sub>2</sub>), essencial no processo respiratório aeróbico de plantas e animais é reduzido à água (H<sub>2</sub>O) via ações do complexo mitocondrial citocromo C oxidase. Esse requer a adição de quatro elétrons a cada molécula de oxigênio:



Durante esse processo de redução, são formadas espécies intermediárias como o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e o radical hidroxila (HO<sup>•</sup>). Essas espécies químicas são denominadas espécies reativas derivadas do oxigênio (ROS). Elas apresentam tempos de meia-vida bem curtos, porém, como o próprio nome enfatiza, possuem alta reatividade, requerendo pouca energia para iniciar reações. Ao se combinar com outros átomos ou até mesmo macromoléculas, são formados novos radicais, como os alquila (RHO<sup>•</sup>) ou peróxido (ROO<sup>•</sup>), que dão continuidade a uma série de reações em cadeia (BERGENDI *et al.*, 1999).

As ROS são formadas principalmente no interior de células fagocitárias (macrófagos e neutrófilos) do sistema imune, num processo chamado explosão

respiratória. Através de estímulos, como macromoléculas oriundas de microrganismos e/ou citocinas, ocorre a ativação do sistema enzimático NADPH oxidase presente nesses leucócitos. Dessa forma, ocorre primeiramente a formação do ânion superóxido, que por si só já possui ação microbicida e que pode gerar outras ROS ainda mais potentes. O peróxido de hidrogênio, por sua vez, é formado pela dismutação do superóxido. E o radical hidroxila, o mais reativo dentre esses radicais, é formado pela redução do peróxido de hidrogênio na presença de íons metálicos como  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Cu}^+$ . Outras ROS também são comumente formadas durante esse processo e do mesmo modo exercem sua atividade combatendo microrganismos infectantes (AKAIKE, 2001; BERGENDI *et al.*, 1999).

Uma vez que os radicais livres não possuem ação específica sobre as biomoléculas dos microrganismos infectantes, sua interação com as células do hospedeiro podem provocar sérios danos teciduais. A peroxidação de fosfolipídios leva a disfunção da membrana plasmática com perda de sua seletividade, a reação dos radicais com proteínas leva a sua desnaturação e com os ácidos nucleicos, a processos de mutação ou, até mesmo, a apoptose. Para que tais processos não ocorram ou, ao menos sejam minimizados, as células possuem sistemas de defesa conhecidos como antioxidantes. Um antioxidante é uma substância que, em baixa concentração, impede a reação radicalar que levaria a um dano tecidual. Esse pode ser uma enzima que impede a formação dos radicais ou os elimina, como no caso da superóxido dismutase, da glutathione peroxidase e da catalase. Pode ser também uma molécula, como por exemplo, a glutathione e a vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol), que reage mol a mol com um radical prevenindo a reação desse com uma macromolécula constitutiva do tecido e que forma uma espécie mais estável (BERGENDI *et al.*, 1999).

Quando há um desequilíbrio, com a superprodução de radicais livres em relação à quantidade de agentes antioxidantes disponíveis nas células, ocorre o chamado estresse oxidativo. Muitas patologias humanas que envolvem processos inflamatórios costumam ser atribuídas aos radicais livres. Podem ser exemplificadas: artrite reumatoide, aterosclerose, síndrome da angústia respiratória do adulto, catarata, diabetes, câncer, psoríase, doenças hepáticas, desordens imunológicas, entre outras (BERGENDI *et al.*, 1999).

Recentemente tem sido dada atenção ao óxido nítrico (NO) e a outras espécies radicalares derivadas do nitrogênio (RNS). Essas possuem alta reatividade e longos tempos de meia vida. O NO é produzido através da enzima NO sintase (NOS).

Existem pelo menos seis diferentes isoformas dessa enzima. A isoforma presente em células do sistema imune na forma induzida produz o NO em grande quantidade quando estimulada por fatores semelhantes àqueles que levam à produção das ROS. Esse exercerá ações antimicrobianas, antitumorais e citotóxicas (BERGENDI *et al.*, 1999).

Uma vez que em infecções provocadas por bactérias e fungos há estímulos que favorecem a produção de espécies radicalares que combatam esses agentes infecciosos, nas infecções virais também não haveria de ser diferente. Porém, algumas características tornam a produção de radicais livres durante uma infecção viral bem peculiar porque, muitas vezes, a mesma se torna extremamente prejudicial ao hospedeiro e nem tanto ao vírus, como alguns estudos já demonstraram (AKAIKE, 2001).

Jareño e colaboradores (1998) apontaram o aumento da concentração de malondialdeído sérico e outros produtos derivados da lipoperoxidação em crianças infectadas pelo HIV. Também foi demonstrada a significativa diminuição da concentração sérica de antioxidantes em crianças soropositivas quando comparadas com crianças soronegativas. Esses resultados estão entre outros que indicam o envolvimento do estresse oxidativo nos danos fisiológicos acarretados por infecções virais.

As células infectadas por vírus ativam indiretamente células fagocitárias a produzirem citocinas pro-oxidantes, tais como fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1). O TNF interrompe a cadeia respiratória mitocondrial em seu estágio II, levando a produção do ânion superóxido. Como já exposto, o superóxido dá origem a outras ROS como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e HO<sup>•</sup>. A IL-1 estimula a liberação de lactoferrina dos lisossomas de neutrófilos. Essa proteína se liga a íons ferrosos, cujo acúmulo acelera a produção do radical hidroxila através da reação de Fenton. A encubação de hepatócitos na presença de sobrenadante de macrófagos ativado por vírus influenza B leva à depressão respiratória nessas células por danos oxidativos observados na membrana mitocondrial, além de acelerar o seu processo apoptótico. Porém quando esse mesmo ensaio é repetido na presença de vitamina E (antioxidante) ou anticorpos monoclonais anti-TNF, esses efeitos lesivos não mais são observados (SCHWARZ, 1996).

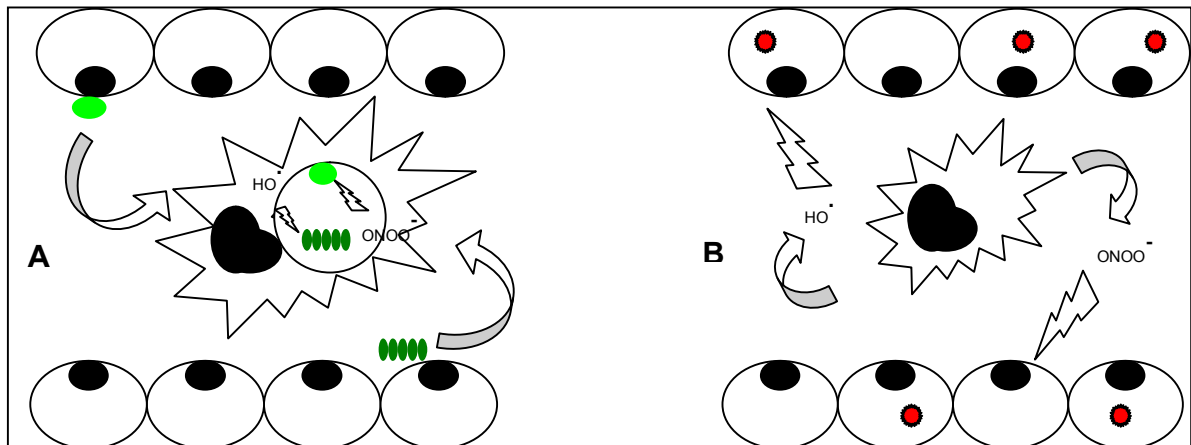
Os vírus estimulam a expressão da enzima iNOS de duas formas:

- direta, como no caso do HIV, cuja glicoproteína gp41 presente em seu envelope viral ativa a referida enzima;

- indireta, através de citocinas pró-inflamatórias como o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) produzido por linfócitos T auxiliares ativados (AKAIKE e MAEDA, 2000).

Entre todas as espécies de radicais livres envolvidos nas patologias virais, o peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) tem sido apontado como a principal, apresentando elevada reatividade e citotoxicidade. Esse radical é produzido através da reação entre o óxido nítrico e o ânion superóxido, sendo, portanto, comum às vias de produção das RNS e das ROS. O peroxinitrito promove alterações nas funções de proteínas, lipídios e ácidos nucleicos através do processo de nitrosilação. A presença sérica de nitrotirosina, um dos produtos mais comuns da nitrosilação, é marcante em muitos pacientes acometidos por viroses (AKAIKE e MAEDA, 2000).

Os danos teciduais promovidos pelos radicais livres em infecções virais costumam ser mais evidentes que aqueles observados em infecções por bactérias, fungos ou protozoários. Isso se deve a uma distinção característica entre o primeiro e os últimos tipos de infecção. Esses se tratam de parasitas extracelulares, enquanto que aqueles são parasitas intracelulares obrigatórios. Bactérias, fungos e protozoários são fagocitados pelas células do sistema imune do hospedeiro, as mesmas que produzem as ROS e RNS. Com isso, esses patógenos são confinados num sítio específico para o ataque dessas espécies radicalares. No entanto, o estímulo de células fagocitárias promovido por vírus acarreta em uma maior dificuldade em promover toxicidade apenas sobre esses agentes infecciosos. Essas espécies geradas no interior de neutrófilos e macrófagos se deslocam por poucos fentômetros ( $10^{-15}$  m), mas seus produtos, incluindo aqueles derivados da peroxidação lipídica, atravessam as membranas dessas células, atingem a circulação sanguínea e indiscriminadamente atacam células que se encontram infectadas ou não (**Figura 3**, pág. 51) (AKAIKE, 2001).



**Figura 3** – Radicais livres no combate a infecções bacterianas e virais. As bactérias são fagocitadas pelo leucócito, que produz espécies radicalares para combatê-las (A). Os vírus não podem ser fagocitados por serem parasitas intracelulares. Não há formação de foco para o ataque dos radicais produzidos, que acabam lesionando células infectadas ou não (B).

Dolganova e Sharanov (1997) mostraram que camundongos infectados por um vírus influenza A que receberam a administração de superóxido dismutase na dose de 100 U/dia entre os dias 4 e 8 após a infecção tiveram um aumento na taxa de sobrevivência de 75% em relação àqueles que não a receberam. Isso denota o papel importante do radical superóxido no processo patológico da pneumonia induzida por vírus tipo influenza, uma vez que tal enzima catalisa a eliminação desse radical.

Em outro estudo, realizado por Akaike e colaboradores (1996), foi observada que a administração de L-N<sup>G</sup>-monometil-arginina (L-NMMA), um inibidor da enzima NOS promove incremento na taxa de sobrevivência de camundongos infectados pelo vírus H<sub>2</sub>N<sub>2</sub> em relação àqueles não tratados com o fármaco. Em biópsia realizada nos tecidos pulmonares dos camundongos não tratados foi observada uma grande concentração de nitrotirosina, o que implica que o peroxinitrito possui estreita correlação com os danos patológicos acarretados pela virose.

A inibição de pneumonia também pôde ser observada pela administração de L-NMMA a camundongos infectados pelo HSV-1 no estudo realizado por Adler e colaboradores (2003). Análises imuno-histoquímicas demonstraram indução de iNOS e presença de nitrotirosina apenas nos camundongos infectados, mas não tratados. Os camundongos tratados tiveram complacência pulmonar semelhante àquela observada para os não infectados. O título viral encontrado para os camundongos infectados que receberam a administração de L-NMMA foi bem superior àquele obtido para os camundongos infectados, mas não tratados. Tal indício leva a concluir que os

radicais livres gerados durante o processo infeccioso viral possuem efeito antiviral, porém seus efeitos pró-inflamatórios parecem exercer papel bem mais significativo.

Durante uma infecção viral os radicais livres além de gerarem lesão tecidual, induzem a transcrição de genes virais, pelo fator de transcrição nuclear NF- $\kappa$ -B. O uso de antioxidantes pode inibir esse fator (SCHWARZ, 1996). Camundongos normalmente resistentes a miocardite murina provocada por Cox-B3 se tornaram susceptíveis a mesma quando receberam dieta deficiente em dois agentes antioxidantes (selênio e vitamina E). Esse resultado não foi observado para aqueles que receberam dieta normal e/ou deficiente em apenas um dos antioxidantes. Além disso, a deficiência desses dois nutrientes na dieta de camundongos infectados por uma linhagem de Cox-B3 que não provoca miocardite murina levou à mutação da mesma de tal forma que seu genótipo se tornou mais similar ao de uma linhagem virulenta, capaz de provocar a patologia. Portanto, a mutação de linhagens de vírus tornando-os mais virulentos também parece ter o envolvimento de radicais livres (BECK *et al.*, 2003).

A associação entre infecções virais e neoplasias tem sido evidenciada. Estudos recentes mostram que essa associação pode estar interligada através da formação de radicais livres. A oxidação de bases que compõem o DNA está envolvida no processo de hepatocarcinogênese observado em pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV) (FARINATI *et al.*, 2007). Já a 8-nitroguanina, uma lesão mutagênica do DNA produzida pelo ONOO<sup>-</sup>, está presente de forma marcante em pacientes com neoplasia cervical infectadas por subtipos de alto risco do vírus do papiloma humano (HPV) (HIRAKU *et al.*, 2007).

O emprego de substâncias antioxidantes como coadjuvantes na terapia antiviral é relevante, uma vez que os radicais livres desempenham papéis importantes nos processos patológicos virais. As plantas produzem muitos metabólitos fenólicos que possuem a propriedade de eliminar as ROS originadas não só pela cadeia respiratória, como também pela fotossintética. Esses podem ser uma poderosa ferramenta na prevenção dos danos provocados pelos vírus aos seus hospedeiros (NAITHANI *et al.*, 2008; SCHWARZ, 1996).

### 3. Objetivos

#### 3.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi o estudo biomonitorado de extratos e frações de *Distictella elongata* (Vahl) Urb., uma espécie da família Bignoniaceae, por ensaios *in vitro* de atividade antiviral e antioxidante.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Obtenção de extratos vegetais do caule e das folhas de *Distictella elongata* (Vahl) Urb.;
- Avaliação da potencial atividade antiviral (HSV-1, EMC e VAC-WR) desses extratos;
- Fracionamento do extrato e frações ativas por técnicas cromatográficas para o isolamento de substâncias ativas;
- Avaliação da potencial atividade antiviral (HSV-1, EMC e VAC-WR) das substâncias isoladas;
- Avaliação da potencial atividade antioxidante dos extratos, frações e substâncias isoladas que apresentaram atividade antiviral.



#### 4.1 Materiais, métodos e equipamentos

O material vegetal seco em estufa ventilada Fanem mod. 501A foi pulverizado em moinho de facas Marconi mod. MA-680.

As balanças utilizadas neste trabalho foram a analítica Mettler Toledo mod. AB204 e a semi-analítica Núcleo.

Para separações cromatográficas em coluna, utilizou-se gel de sílica 60 com tamanho de partículas variando de 0,063-0,200, 70-230 mesh (Merck). Para cromatografia em coluna rápida (sob pressão) utilizou-se gel de sílica 60 com tamanho de partículas variando de 0,063-0,200, 230-400 mesh (Merck) acoplada a bomba de vácuo Fabbe mod. 131. As cromatografias em coluna foram monitoradas por cromatografia em camada delgada.

Para cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia preparativa (CCP), com espessura de 2,5 e 5,0 mm, respectivamente, foram utilizadas gel de sílica 60G (Merck) e cromatofolhas (Al) de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck). A visualização das substâncias em camada fina foi feita, quando possível, sob luz ultravioleta (UV) a  $\lambda$  254 e 365 nm e, com os seguintes reveladores, assim preparados (WAGNER *et al.*, 1984):

a. Anisaldeído sulfúrico – dissolveram-se 0,5 mL de anisaldeído em 10 mL de ácido acético glacial. Em seguida, adicionaram-se 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado;

b. Liebermann-Burchard - Misturaram-se 10 mL de anidrido acético a duas gotas de ácido sulfúrico concentrado;

c. Reagente de Produtos Naturais + polietilenoglicol 4000 (NP/PEG) – separadamente foram diluídos 1 g do ácido difenilbórico em 10 mL de metanol e 5g de polietilenoglicol 4000 em 100 mL de metanol. Para revelação das placas primeiramente era borrifada a solução do ácido e, em seguida, a do polietilenoglicol.

d. Solução de hidróxido de potássio a 5% - dissolveram-se 5 g de KOH em 100 mL de etanol;

e. Solução de cloreto de alumínio a 2% - dissolveram-se 2 g de AlCl<sub>3</sub> em 100 mL de etanol;

f. Solução de cloreto férrico a 2% - dissolveram-se 2 g de FeCl<sub>3</sub> em 100 mL de etanol;

g. Reagente de Kedde – dissolveram-se 3 g de ácido 3,5-dinitrobenzoico em 100 mL de metanol (solução A) e 5,7 g de KOH a 100 mL de água (solução B). Misturaram-se as soluções A e B;

h. Reagente de Dragendorff - Solução A: dissolveram-se 1,7 g de nitrato de bismuto (III) e 20 g de ácido tartárico em 80 mL de água. Solução B: dissolveram-se 16 g de iodeto de potássio em 40 mL de água. Misturaram-se partes iguais de A e de B.

Os solventes utilizados foram das marcas Merck, Aldrich, Quimex e Grupo Química, de grau P.A. Os solventes de grau cromatográfico utilizados foram da marca Tedia Brasil.

A água ultrapura utilizada foi obtida através de sistema de filtração de água Milli-Q Milli-Q Plus.

A concentração das soluções foi feita destilando-se o solvente, sob pressão reduzida, em evaporador rotatório Büchi, mod. B480.

A lavadora ultrassônica utilizada era da marca Unique, mod. USC 1400.

Os critérios de pureza adotados foram as análises de cromatogramas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE); observação de mancha única em CCD, variando-se a fase móvel; o ponto de fusão e/ou comparação com amostras de referência e com dados da literatura.

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho de ponto de fusão MQAPF-301, Microquímica, e não foram corrigidos.

Para CLAE analítica utilizou-se cromatógrafo Waters, composto de injetor automático, modelo 2695, com sistema operacional computadorizado com software Empower e detector de arranjos de diodos (DAD), modelo 2996, bomba modelo L-6200<sup>a</sup>, integrador modelo C-R4A.

Para CLAE preparativa utilizou-se cromatógrafo Shimadzu, equipado com sistema de controle de bomba, mod. SCL-8A; detector UV-VIS, mod. SPD-6AV; bombas mod. LC-8A; integrador mod. C-R4A.

A rotação óptica  $[\alpha]_D$  foi mensurada em polarímetro Bellingham + Stanley Ltda, modelo ADP 220 (Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR, UFMG).

A determinação estrutural das substâncias isoladas foi realizada através dos métodos instrumentais de espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H, COSY H,H) e carbono (RMN <sup>13</sup>C, DEPT, HETCOR, HSQC,

HMBC e HSQC-TOCSY), espectrometria de massas por eletrospray (ESMS), espectrometria na região do infravermelho (IV) e espectroscopia na região do UV.

Os espectros de RMN foram registrados no aparelho Bruker Avance DRX-400 (Departamento de Química, ICEX, UFMG). O solvente utilizado para solubilização das amostras foi o dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- $d_6$ ) da marca Tedia Brasil. Como referência interna, foi utilizado o sinal relativo ao tetrametilsilano (TMS).

Os espectros de massa foram obtidos utilizando-se o espectrômetro de massas Bruker Daltonics, mod. ultrOTOFG, operando a uma voltagem de aceleração nominal de 70 eV, no modo de detecção positivo (Departamento de Química, Universidade de São Paulo). Utilizou-se para solubilizar as amostras uma mistura de H<sub>2</sub>O:MeOH (20:80).

Os espectros no IV foram registrados no espectrofotômetro de infravermelho Perkin-Elmer, modelo Spectrum One, com valores expressos em  $cm^{-1}$  (Laboratório de Química Farmacêutica, FAFAR, UFMG).

Os espectros e as absorvâncias das soluções utilizadas nos ensaios antioxidantes no UV foram registrados no espectrofotômetro Hitachi, modelo UV-2900. Para obtenção dos espectros realizou-se uma varredura na faixa de  $\lambda$  200 a 500 nm, enquanto que para obtenção das absorvâncias do teste antioxidante utilizou-se  $\lambda$  516 nm. As amostras foram solubilizadas em metanol.

As células empregadas no ensaio antiviral foram incubadas em estufa para cultura bacteriológica Fanem, mod. 502A/4 e a manipulação das mesmas durante as etapas de infecção e tratamento com amostras se deu em capela de fluxo laminar Veco, mod. VLFS-12. A agitação das placas foi feita em Shaker New Brunswick Scientific, mod. C24. As absorvâncias das soluções dos poços nessas contidos após a adição do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ila)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) foram obtidas em leitor de ELISA Star Fax, mod. 2100, no  $\lambda$  492 nm. (Laboratório de Virologia, ICB, UFMG).

As substâncias de referência utilizadas são indicadas em cada caso e eram das marcas Sigma-Aldrich ou Merck.

Os reagentes empregados eram das marcas Vetec, Quimex, Merck, Synth, Sigma e Reagen.

## 4.2 Fitoquímica

### 4.2.1 Coleta e identificação do material vegetal

A coleta de *Distictella elongata* (Vahl) Urb. foi realizada na manhã do dia 07 de maio de 2008 no *Campus* da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais. A identificação da espécie coletada foi realizada pelo Prof. Dr. João Renato Stehmann, do Departamento de Botânica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Uma exsicata da mesma foi depositada no Herbarium do ICB sob o registro BHCB 21862. Não foram observados quaisquer sinais de insetos na mesma. Foram coletados caule e folhas que, posteriormente, foram separados (**Figura 4**). As etapas fitoquímica e de ensaios de atividades biológicas descritas nesse trabalho foram todas realizadas com base nesse material.

Apenas com a finalidade de se averiguar possíveis alterações sazonais do perfil cromatográfico por CLAE do extrato de folhas de *Distictella elongata*, mais duas coletas foram realizadas no mesmo local, mas em momentos diferentes:

- A primeira no dia 18 de março de 2009;
- A segunda no dia 01 de setembro de 2009.

O material decorrente dessas últimas coletas fora identificado como pertencentes à espécie *D. elongata* pela Prof.<sup>a</sup> Dra. Lúcia Lohmann, do Departamento de Botânica da Universidade de São Paulo.



**Figura 4 - *Distictella elongata* (Vahl) Urb. coletada em 07 de maio de 2008.**

#### **4.2.2 Preparo do material vegetal e extração**

Os fragmentos de caule e as folhas de *D. elongata* foram secos em estufa ventilada ( $T \leq 40$  °C). Os primeiros permaneceram na estufa por 08 dias, enquanto as folhas ficaram apenas por 05 dias, quando então se tornaram quebradiças ao toque.

Esses materiais foram separadamente pulverizados em moinho de facas, sendo obtidos 1200 g de pó de caule e 481 g de pó de folhas. Separaram-se 10 g de cada para maceração com 150 mL de etanol comercial (96°GL – 92,8°INPM) durante 48h. Os extratos de caule (0,5 g – 5% de rendimento) e de folhas (1,4 g – 14% de rendimento) assim obtidos foram utilizados para realização de ensaios antivirais.

O restante do pó das folhas (aproximadamente 481 g), cujo extrato obtido por maceração de sua alíquota apresentou atividade antiviral relevante, passou por processo de percolação, que também utilizou etanol comercial como solvente. O extrato resultante foi concentrado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 40 °C; transferido para frasco previamente pesado e mantido em dessecador, sob vácuo, para eliminação total do solvente. Após a secagem total, esse extrato (EEF) permaneceu armazenado em frasco de vidro fechado e acondicionado em geladeira. A massa total do mesmo foi de 130,55 g (27,14 % de rendimento).

#### **4.2.3 Fracionamento do extrato das folhas de *D. elongata* (Vahl) Urb.**

Parte do extrato etanólico obtido por percolação das folhas (EEF) de *D. elongata* (7,40 g) foi fracionado em coluna de gel de sílica 60 (740 g), utilizando-se como eluentes misturas de solventes com polaridades crescentes. De acordo com os solventes empregados, foram obtidas nove frações que foram denominadas com os nomes referentes aos mesmos:

- Hexano (Hex);
- Hexano : Diclorometano (1:1) (Hex:DCM);
- Diclorometano (DCM);
- Diclorometano : Acetato de etila (1:1) (DCM:AcOEt);
- Acetato de etila (AcOEt);
- Acetato de etila : Metanol (1:1) (AcOEt:MeOH);
- Metanol (MeOH);
- Água (H<sub>2</sub>O);
- Metanol a 3% de ácido acético (MeOH 3% AcOH).

Os volumes dos solventes empregados se encontram listados na **Tabela 4**.

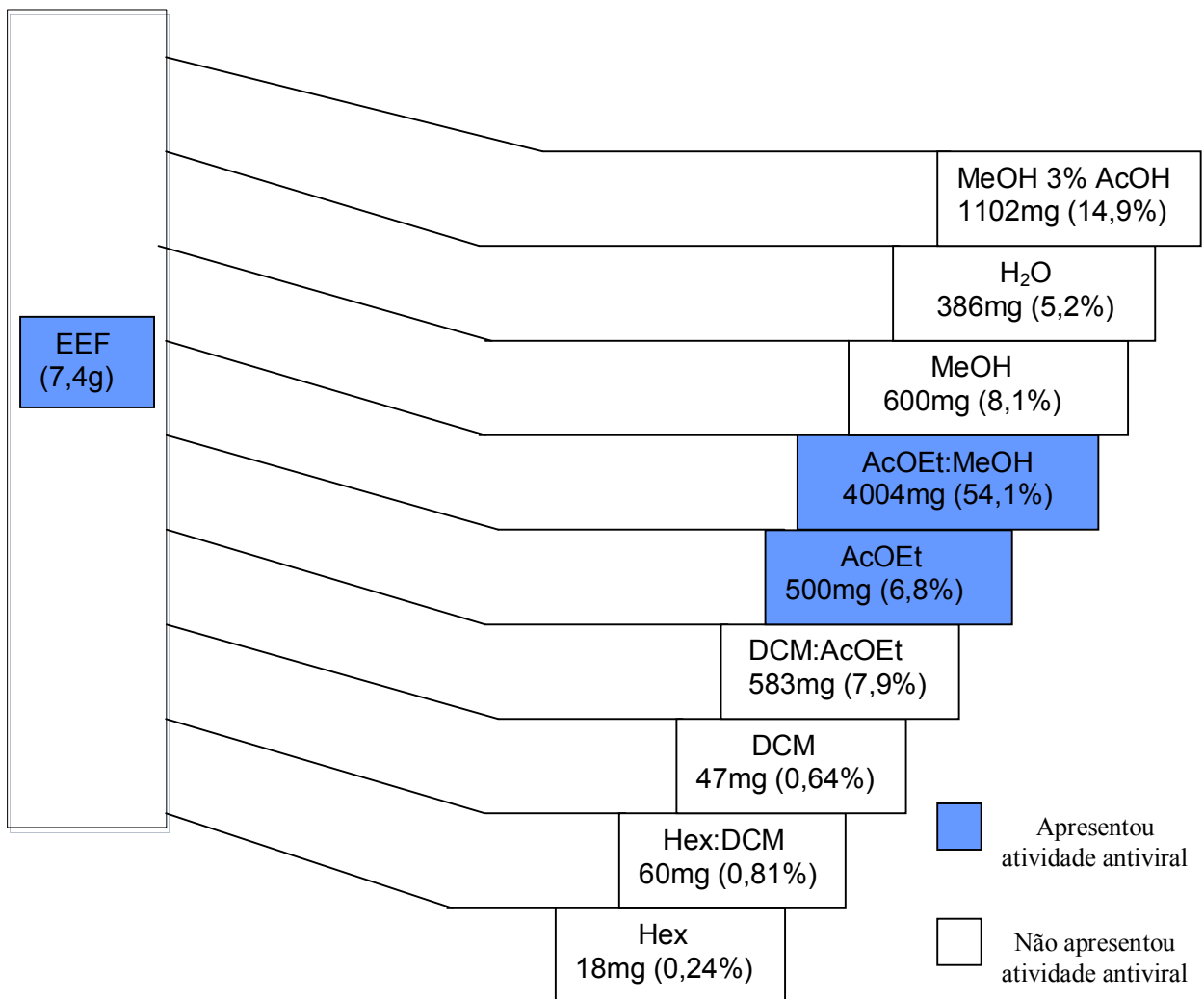
As frações foram concentradas em evaporador rotatório, sob pressão reduzida a 40 °C; transferidas para frascos previamente pesados e mantidas em dessecador, sob vácuo, para eliminação total dos solventes.

Os rendimentos das frações obtidos se encontram na **Figura 5** (pág. 60).

O fracionamento do extrato de EEF teve por objetivo uma separação preliminar das substâncias nele presentes. As frações assim obtidas passaram por ensaios de atividade antiviral que direcionaram os fracionamentos subsequentes (**Figura 5**, pág. 60).

**Tabela 4 - Volumes dos solventes empregados no fracionamento de EEF por cromatografia em coluna de gel de sílica**

<b>Solvente</b>	<b>Volume (L)</b>
hexano	3,95
hexano : diclorometano	11,75
diclorometano	8,12
diclorometano : acetato de etila	5,80
acetato de etila	8,30
acetato de etila : metanol	11,00
metanol	9,80
água	2,40
metanol a 3% de ácido acético	5,50



**Figura 5 - Rendimentos das frações obtidas no fracionamento de EEF (7,4 g) por cromatografia em coluna de gel de sílica.**

#### **4.2.4 Prospecção fitoquímica**

Realizou-se a prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada dos extratos etanólicos de folhas (EEF) e do caule (EEC), bem como das frações resultantes do fracionamento cromatográfico de EEF. As amostras e substâncias de referência empregadas foram previamente solubilizadas em metanol, acetato de etila ou diclorometano; de acordo com suas afinidades químicas. Dessa forma foram obtidos os perfis cromatográficos em CCD para avaliação de taninos, heterosídeos flavônicos, agliconas flavônicas, antraquinonas, triterpenoides, cumarinas, alcaloides, saponinas e heterosídeos cardiotônicos. Diferentes sistemas de eluentes e reveladores seletivos para cada classe de produto natural foram utilizados nas análises (MARINI-BETTOLO *et al.*, 1981; Wagner *et al.*, 1984)

a. Caracterização de fenóis

- Fase móvel: acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético – água (100:11:11:27);
- Revelador: cloreto férrico a 2%;
- Padrões de referência: catequina, rutina (Sigma-Aldrich);
- Identificação: substâncias fenólicas se apresentam como manchas negro-azuladas ou negro-esverdeadas no visível.

b. Caracterização de flavonoides heterosídicos

- Fase móvel: acetato de etila - ácido fórmico - ácido acético – água (100:11:11:27);
- Revelador:  $\text{AlCl}_3$  a 2% ou NP/PEG seguido de aquecimento a 100 °C por 5 min;
- Padrões de referência: rutina, vitexina e orientina (Sigma-Aldrich);
- Identificação: flavonoides aparecem como manchas de cor amarela ou laranja no visível e fluorescências amarelo-esverdeadas no ultravioleta ( $\lambda$  365 e 254 nm).

c. Caracterização de geninas flavônicas

- Fase móvel: clorofórmio - acetato de etila (60:40);
- Revelador:  $\text{AlCl}_3$  a 2% ou NP/PEG com aquecimento a 100°C por 5 min;
- Padrões de referência: quercetina, canferol, luteonina (Sigma-Aldrich);
- Identificação: flavonoides aparecem como manchas de cor amarela ou laranja no visível e fluorescências amarelo-esverdeadas no ultravioleta ( $\lambda$  365 e 254 nm).

d. Caracterização de taninos

- Fase móvel: clorofórmio – acetona – ácido fórmico (65:27:8);
- Revelador: cloreto férrico a 2%;
- Padrão de referência: catequina (Sigma-Aldrich);
- Identificação: taninos aparecem como manchas negro-azuladas ou negro-esverdeadas no visível.

e. Caracterização de compostos antracênicos

- Fase móvel: tolueno - acetona - clorofórmio (45:25:35);
- Revelador: hidróxido de potássio a 5% + aquecimento a 100°C por 5 minutos;
- Padrões de referência: lapachol, aloína (purificados em laboratório);



- Identificação: compostos antracênicos aparecem como manchas de coloração amarela a vermelha no visível e fluorescências laranja a vermelha no ultravioleta ( $\lambda$  365 e 254 nm).

f. Caracterização de cumarinas

- Fase móvel: acetato de etila;  
- Revelador: hidróxido de potássio a 5% + aquecimento a 100°C por 5 minutos;  
- Padrão de referência: cumarina (purificada em laboratório);  
- Identificação: cumarinas aparecem como manchas com fluorescência verde-azulada ou amarelo-esverdeada no ultravioleta ( $\lambda$  365 e 254 nm).

g. Caracterização de saponinas

- Fase móvel: clorofórmio – metanol - água (64:50:10);  
- Revelador: anisaldeído sulfúrico após aquecimento a 100°C por 5 minutos;  
- Padrão de referência: “Saponina Purificada” – VETEC 1364;  
- Identificação: saponinas aparecem como manchas de coloração azul-violácea e zonas amarelas no visível.

h. Caracterização de heterosídeos cardiotônicos

- Fase móvel: acetato de etila – metanol – água (100:13,5:10);  
- Revelador: reagente de Kedde;  
- Padrão de referência: digoxina (purificada em laboratório);  
- Identificação: heterosídeos cardiotônicos se apresentam como manchas de coloração rosa ou azul-violácea no visível.

i. Caracterização de alcaloides

- Fase móvel: clorofórmio - metanol - água (85:15:15);  
- Revelador: reagente de Dragendorff;  
- Padrão de referência: atropina (purificada em laboratório);  
- Identificação: alcaloides se apresentam como manchas de cor marrom ou laranja no visível.

## j. Caracterização de triterpenoides e esteroides

- Fase móvel: diclorometano – acetato de etila (1:1);
- Revelador: reagente de Liebermann-Burchard + aquecimento a 100°C por 10 minutos;
- Padrões de referência: lupeol,  $\beta$ -sitosterol (purificados em laboratório);
- Identificação: triterpenoides e esteroides se apresentam como manchas de cor marrom ou cinza no visível e fluorescências laranja a vermelho no ultravioleta ( $\lambda$  365 e 254 nm).

**4.2.5 Perfis cromatográficos por CLAE-FR**

Para a realização de CLAE-FR foram preparadas soluções das amostras, a 10 mg/mL, em metanol grau CLAE. A dissolução se deu com auxílio de ultrassonicação durante 20 minutos. Posteriormente, essas soluções foram filtradas em seringas acopladas ao millex LCR com membrana PTFE modificada para filtração de solventes orgânicos e aquosos 0,45  $\mu$ m, 13 mm de diâmetro. Os filtrados foram acondicionados em vials para posterior análise em cromatógrafo.

Utilizou-se coluna LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (partículas de 5  $\mu$ m, 125 x 4mm d.i., Merck), e pré-coluna LiChrospher<sup>®</sup> 100 RP-18 (5  $\mu$ m) e fluxo de 1mL/min. O forno da coluna foi mantido a 40 °C. O volume de cada solução de amostra injetado foi de 20  $\mu$ L. Os cromatogramas foram obtidos em  $\lambda_{220}$ , sendo registrados numa faixa espectral de  $\lambda$  220 a 400 nm.

Como fase móvel foram empregados os solventes metanol grau CLAE e água destilada filtrada em sistema Milli-Q. Aplicou-se um gradiente linear de MeOH:H<sub>2</sub>O (5-95% de MeOH em 60 min.), seguido de curto período de eluição isocrática (95% de MeOH por 5 min.), para se retornar às condições iniciais do gradiente (**Tabela 5**).

**Tabela 5 - Gradiente de eluição empregado nas análises dos extratos e frações por CLAE-FR**

Tempo (min)	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)
0	95	5
60	5	95
65	5	95
70	95	5

#### **4.2.6 Isolamento de AMF**

A fração AcOEt:MeOH foi fracionada por meio de CLAE-FR preparativa com coluna Agilent® RP-18 (partículas de 10 µm 21,2 x 250mm d.i.), pré coluna SIL 3227 Shimadzu® e detecção UV<sub>220nm</sub>, fluxo 4 mL/min e temperatura ambiente.

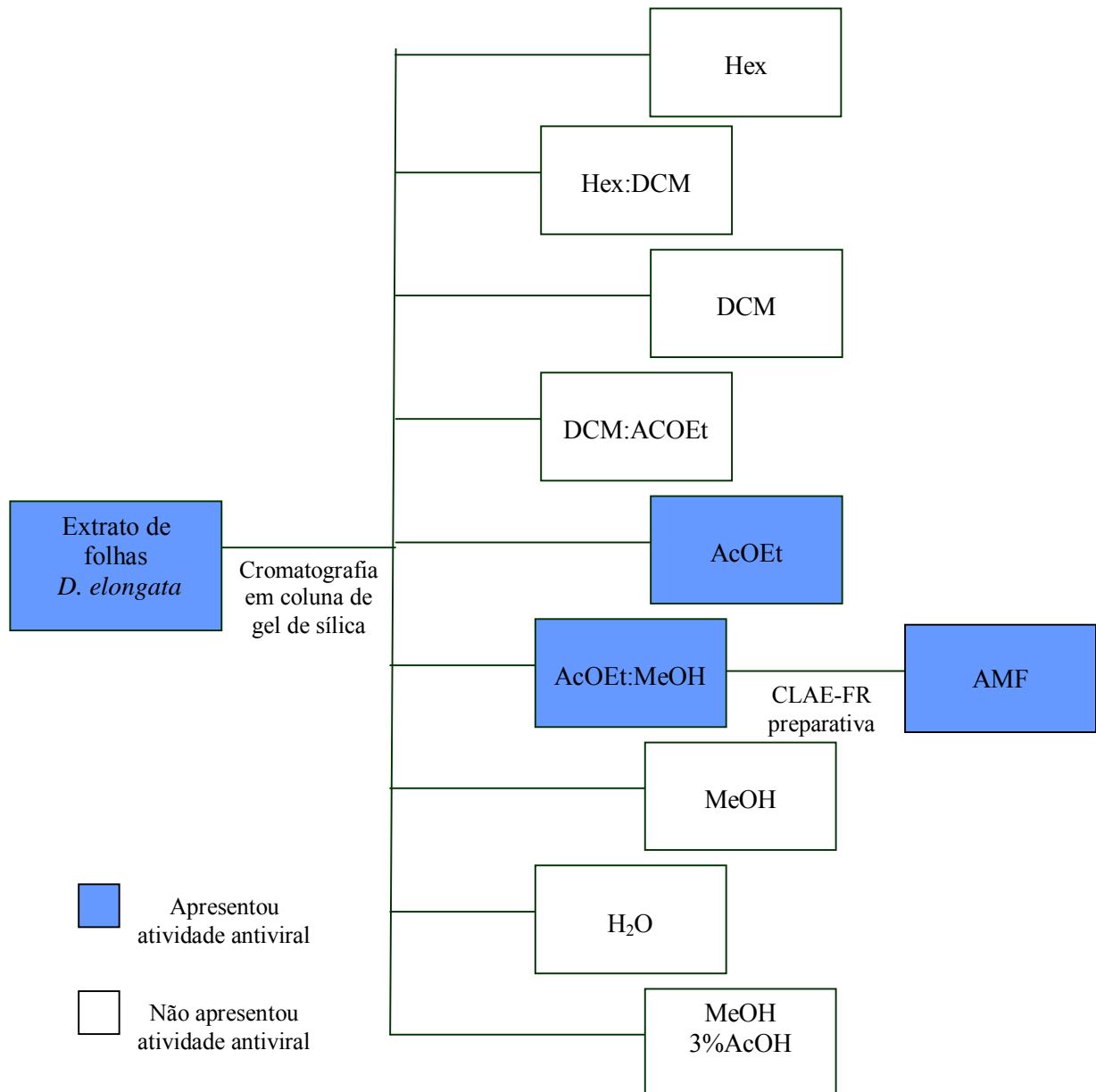
A fase móvel foi composta de metanol grau CLAE e água destilada filtrada em sistema Milli-Q. O gradiente utilizado foi segmentado de modo a permitir a limpeza da coluna antes de uma nova injeção de amostra (**Tabela 6**).

**Tabela 6 - Gradiente de eluição empregado no isolamento de AMF por CLAE-FR preparativa**

Tempo (min.)	H <sub>2</sub> O (%)	MeOH (%)
0	95	5
2	40	60
40	0	100
60	95	5

As amostras para injeção foram assim preparadas: a alíquotas de 25 mg da fração AcOEt:MeOH, em frascos Eppendorf, adicionou-se 1mL de metanol grau CLAE. A dissolução se deu com auxílio do ultrassom durante 20 minutos. Posteriormente, tais soluções foram filtradas em membranas com poros de 0,45 µm de diâmetro. Finalmente, 200 µL desse filtrado, em seringa de vidro de 1 mL, foram injetados manualmente no aparelho de cromatografia preparativa. Realizaram-se 28 injeções de 200 µL da solução de amostra (25 mg) e foram obtidos 17 mg de um pó amarelo amorfo com ponto de fusão (pf) na faixa de 248-251 °C, denominado AMF.

A **Figura 6** (pág. 65) resume as etapas experimentais que levaram ao isolamento de AMF.



**Figura 6 - Etapas de isolamento de AMF do extrato de folhas de *D. elongata*.**

#### **4.2.7 Isolamento dos terpenoides**

Para o isolamento dos terpenoides realizou-se novo fracionamento do extrato etanólico de folhas de *D. elongata* (10 g) utilizando-se cromatografia em coluna rápida. Empregou-se como fase estacionária gel de sílica 60 (100 g). O sistema de eluição utilizado foi: Hex:AcOEt (100:0; 95:5; 90:10; 85:15; 80:20; 70:30; 50:50; 20:80; 0:100), seguido da eluição de AcOEt:MeOH e, posteriormente, de MeOH. As frações obtidas, bem como os volumes de misturas de solventes empregados se encontram discriminados na **Tabela 7** (pág. 66).

**Tabela 7 - Novo fracionamento do extrato etanólico de folhas de *D. elongata* por cromatografia em coluna de gel de sílica**

<b>Fração</b>	<b>Massa mg (rendimento %)</b>	<b>Solvente</b>	<b>Volume</b>
H	33 (0,33)	hexano	200 mL
HA5	1 (0,01)	hexano - acetato de etila (95:5)	200 mL
HA10	154 (1,54)	hexano - acetato de etila (90:10)	400 mL
HA15	140 (1,40)	hexano - acetato de etila (80:15)	400 mL
HA20	108 (1,08)	hexano - acetato de etila (80:20)	400 mL
HA30	328 (3,28)	hexano - acetato de etila (70:30)	400 mL
HA50	500 (5,00)	hexano - acetato de etila (50:50)	500 mL
HA80	385 (3,85)	hexano - acetato de etila	500 mL
A	265 (2,65)	acetato de etila	500 mL
AM	1418 (14,18)	acetato de etila – metanol (50:50)	500 mL
M	997 (9,97)	metanol	500 mL
<b>Total</b>	<b>4329 (43,29)</b>		

**Refracionamento de HA15**

A fração HA15 (140 mg) mostrou-se como sendo uma das menos complexas através de seu perfil em CCD. Toda a sua massa foi novamente submetida à cromatografia em coluna rápida, empregando-se gel de sílica 60 (4,2 g) e eluição com um gradiente suave de Hex:AcOEt (0:100 a 50:50, seguido de 0:100). Foram obtidas 24 frações que foram reunidas segundo seus perfis cromatográficos em CCD (**Tabela 8**, pág. 67). A reunião das frações HA15 - 16 a 18, eluídas em Hex:AcOEt (80:20), resultou num pó incolor, com massa de 3 mg que foi denominado HAT1. CCD

demonstrou que a mesma se encontrava pura e se tratava de um terpenoide ou esteroide, pois apresentou reação positiva frente ao reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER *et al.*, 1984). Devido o seu baixo rendimento, não foi analisada por RMN.

**Tabela 8 - Frações resultantes de HA15**

<b>Frações</b>	<b>Massa mg (rendimento %)</b>
HA15 – 1	2 (1,43)
HA15 – 2 a 5	24 (17,14)
HA15 – 6 a 15	32 (22,86)
HA15 – 16 a 18	3 (2,14)
HA15 – 19 a 24	1 (0,71)
<b>Total</b>	<b>62 (44,28)</b>

#### **Refracionamento de HA50**

A fração HA50 (500 mg) foi a que apresentou perfil em CCD com maior número de manchas típicas de terpenoides/esteroides segundo revelação com o reagente Liebermann-Burchard. Essa foi então recromatografada em coluna rápida de gel de sílica (15 g), utilizando-se como eluente misturas de hexano, acetato de etila e metanol em gradiente de polaridades crescentes, obtendo-se 105 frações que foram reunidas segundo seus perfis em CCD (**Tabela 9**).

**Tabela 9 - Frações resultantes de HA50**

<b>Frações</b>	<b>Massa mg (rendimento %)</b>
HA50 – 1a 5	4 (0,80)
HA50 – 5 a 8	2 (0,40)
HA50 – 9 a 20	8 (1,60)
HA50 – 21 a 35	26 (5,20)
HA50 – 36 a 50	34 (6,80)
HA50 – 51 a 73	99 (19,80)
HA50 – 74 a 89	38 (7,60)
HA50 – 90 a 105	37 (7,40)
<b>Total</b>	<b>248 (49,60)</b>

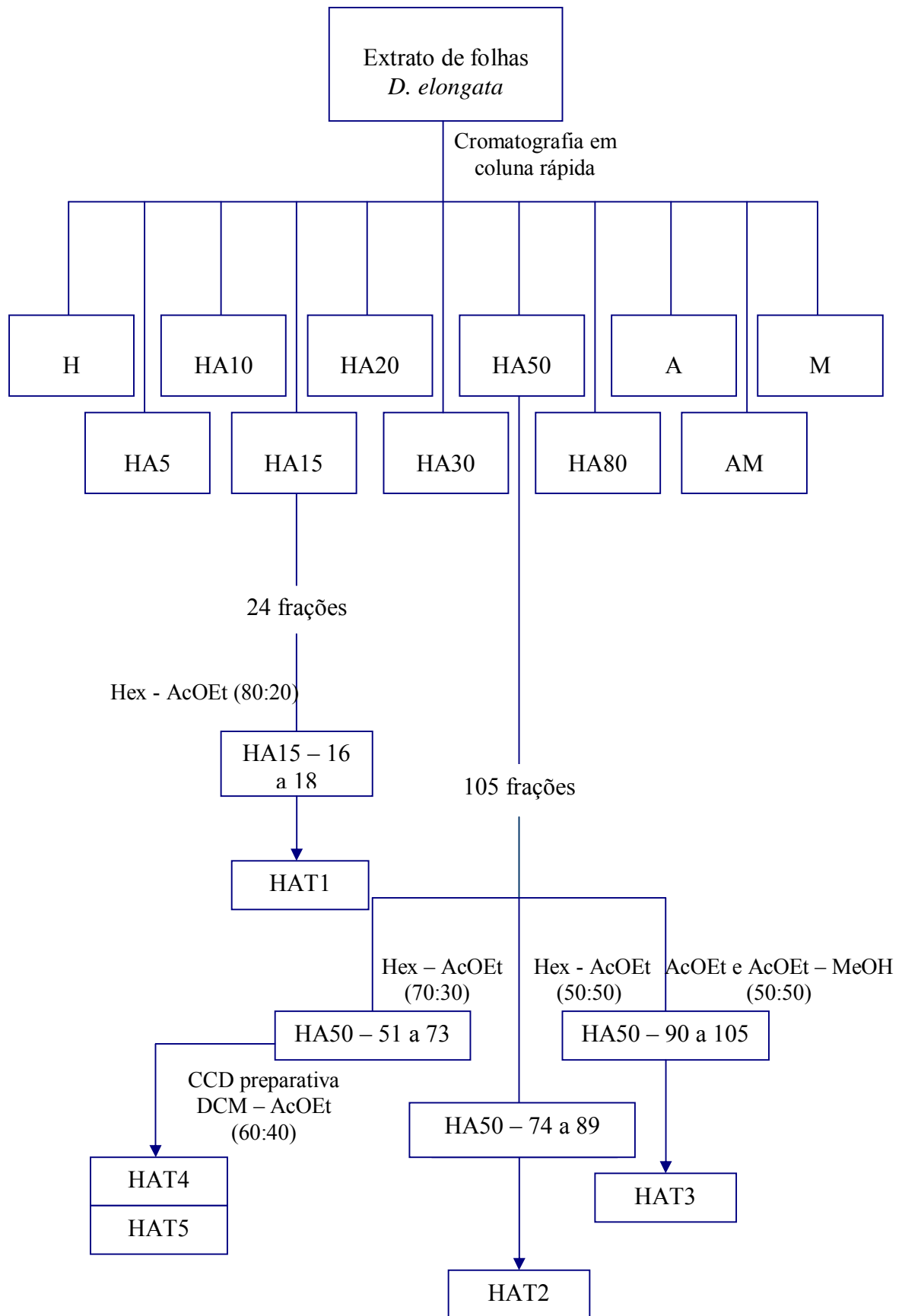
As frações HA50 – 21 a 35 (26 mg), eluídas com Hex:AcOEt (70:30) mostraram o mesmo perfil cromatográfico por CCD, sendo assim reunidas. Entre as substâncias presentes se encontrava o  $\beta$ -sitosterol, identificado por comparação com padrão de referência dessa substância em CCD.

A fração obtida da reunião de HA50 – 51 a 73 (99 mg), eluídas com Hex:AcOEt (70:30), foi submetida a cromatografia de camada delgada preparativa, utilizando-se gel de sílica como fase estacionária e como eluente DCM:AcOEt (60:40). A partir do seu perfil cromatográfico em CCD, duas misturas de terpenoides foram separadas: a primeira, com massa de 5 mg, denominada de HAT4; e a segunda, com massa de 17 mg, chamada HAT5. Após análise por CCD, a amostra HAT5 foi enviada para análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . HAT4 não foi submetida a esse tipo de análise devido o seu baixo rendimento.

A reunião das frações HA50 – 74 a 89, eluídas em Hex:AcOEt (1:1) resultou num pó branco amorfo, com massa de 38 mg, que foi denominado de HAT2. CCD mostrou tratar-se de uma mistura de terpenoides; a análise RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  foi realizada.

A reunião das frações HA50 – 90 a 105, eluídas em AcOEt e AcOEt:MeOH (1:1) resultou num pó amarelo, com massa de 37 mg. Essa fração foi denominada de HAT3 e se mostrou como uma mistura de terpenoides no cromatograma obtido por CCD e na análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  realizada.

A **Figura 7** (pág. 69) esquematiza as etapas realizadas na tentativa de se isolarem terpenoides e/ou esteroides presentes em EEF de *D. elongata*.



**Figura 7 - Esquema do novo fracionamento do extrato etanólico de folhas de *D. elongata* por cromatografia em coluna de gel de sílica.**



#### **4.2.8 Caracterização de AMF**

##### a. Ultravioleta

Os espectros no UV do flavonoide isolado neste estudo foram obtidos em metanol e utilizaram-se os aditivos químicos descritos a seguir.

A marcha de leituras no UV realizada foi a seguinte:

- Solução estoque do flavonoide (0,3 mg/10mL);
- Solução estoque do flavonoide acrescida de 3 gotas de solução metanólica de MeONa 2,5% (preparado a partir de MeONa P.A., Grupo Química);
- Solução do item anterior acrescida de 3 gotas de solução aquosa de HCl 50% p/v (preparado a partir de HCl P.A., Merck);
- Nova solução estoque de flavonoide acrescida de 6 gotas de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  5% (preparado a partir de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  P.A., Riedel);
- Solução do item anterior acrescida de 3 gotas de solução aquosa de HCl 50% p/v (preparado a partir de HCl P.A., Merck);
- Nova solução estoque de flavonoide acrescida de AcONa P.A. não hidratado (Merck) até formação de solução supersaturada. A leitura foi realizada após 3 minutos para garantir uma completa reação;
- Solução do item anterior acrescida de 5 gotas de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  P.A. (Reagen).

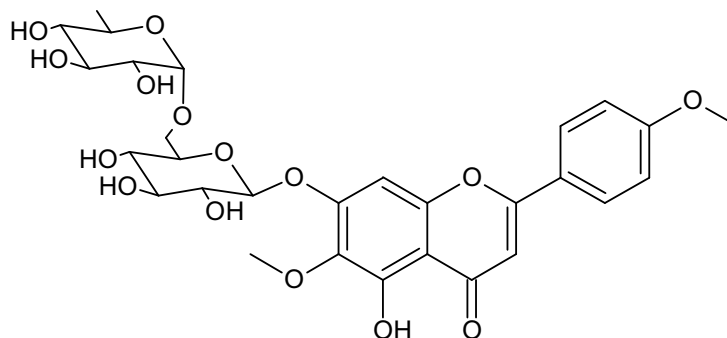
##### b. Hidrólise

A hidrólise da flavona isolada foi realizada a partir da adaptação da metodologia de hidrólise ácida total descrita por Hertog e colaboradores (1992).

A 2,0 mg da substância isolada, em metanol (1,0 mL), adicionaram-se 2 mL de solução aquosa de HCl 2 M, que permaneceu em banho-maria a 80 °C por 4 h. Posteriormente, essa solução foi particionada com DCM em funil de separação. A fase aquosa resultante foi submetida à análise por CCD, comparando-se com amostras de diferentes de açúcares (D-glicose, L-ramnose, D-galactose e L-arabinose – Sigma-Aldrich). Esta foi eluída com  $\text{CHCl}_3$ :MeOH:H<sub>2</sub>O (70:30:4) e revelada com solução de anisaldeído sulfúrico seguido de aquecimento a 100 °C por 5 min. Para facilitar a visualização das manchas obtidas na placa, a mesma foi visualizada sob luz UV<sub>365</sub>.

#### 4.2.9 Dados físico-químicos das substâncias isoladas das folhas do EEF de *Distictella elongata*

→ AMF: 4H-1-Benzopirano-4-ona,7-[[6-O-(6-desoxi- $\alpha$ -L-ramnopiranosil)- $\beta$ -D-glicopiranosil]oxi]-5-hidroxi-6-metoxi-2-(4-metoxifenil); (pectolarina)



FM: C<sub>29</sub>H<sub>34</sub>O<sub>15</sub>

Aspecto: pó amarelo amorfo;

pf: 248-251 °C (250-253 °C, YOO *et al.*, 2008);

[ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>22,4</sup>: (MeOH, c 0,5g/mL): - 0,06;

IV  $\nu_{\max}$  (cm<sup>-1</sup>): 3353 (OH), 1656 (C=O), 1608, 1583 (aromático C=C), 1068 (C-O);

UV  $\lambda_{\max}$  nm (MeOH): 273,5; 328,5;  $\lambda_{\max}$  nm (MeOH + MeONa): 295; 370,5;  $\lambda_{\max}$  nm (MeOH + AcONa): 273,5; 328,5;  $\lambda_{\max}$  nm (MeOH + AlCl<sub>3</sub>): 349; 298; 281,5; (MeOH + AlCl<sub>3</sub> + HCl): 348; 298; 281,5;

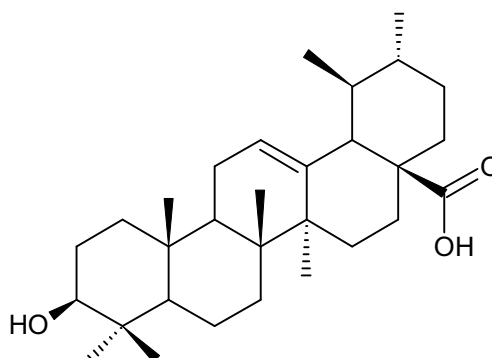
ESMS  $m/z$ : 623 [M + H]<sup>+</sup>, 645 [M + Na]<sup>+</sup>, 661 [M + K]<sup>+</sup>;

RMN de <sup>1</sup>H ppm (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1,06 (3H, *d*, *J* = 4,0 Hz, H-6, Ram), 3,89 (1H, *dd*, Ha-6, Glc), 3,87 (3H, *s*, 6-OCH<sub>3</sub>), 3,78 (3H, *s*, 4'-OCH<sub>3</sub>), 3,48 (1H, *dd*, Hb-6, Glc), 5,12 (1H, *d*, *J* = 4,0 Hz, H-1, Glc), 4,57 (1H, *d*, *J* = 1,1 Hz, H-1, Ram), 6,94 (1H, *s*, H-8), 6,93 (1H, *s*, H-3), 7,17 (2H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-3' e H-5'), 8,04 (2H, *d*, *J* = 8,0 Hz, H-2' e H-6'), 12,96 (1H, *s*, 5-OH);

RMN de <sup>13</sup>C ppm (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  55,6 (4'-OCH<sub>3</sub>), 60,3 (6-OCH<sub>3</sub>), 164,3 (C-2), 103,5 (C-3), 182,9 (C-4), 152,7 (C-5), 133,2 (C-6), 157,3 (C-7), 94,3 (C-8), 152,1 (C-9), 105,4 (C-10), 122,8 (C-1'), 128,4 (C-2' e C-6'), 114,8 (C-3' e C-5'), 162,8 (C-4'), 100,4 (C-1, Glc), 73,2 (C-2, Glc), 76,5 (C-3, Glc), 69,5 (C-4, Glc), 75,8 (C-5, Glc), 66,0 (C-6, Glc), 100,4 (C-1, Ram), 70,8 (C-2, Ram), 70,4 (C-3, Ram), 72,0 (C-4, Ram), 68,3 (C-5, Ram), 17,8 (C-6, Ram);

Produtos da hidrólise ácida: pectolarigenina, glicose e ramnose.

→ HAT2: ácido ursólico

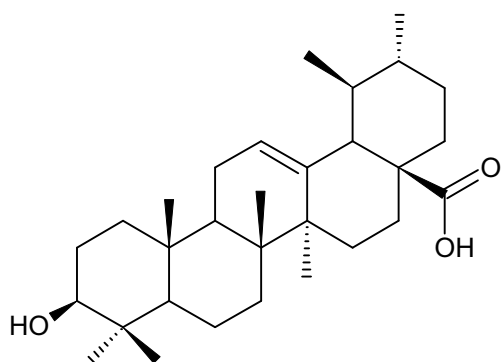


Aspecto: pó branco amorfo

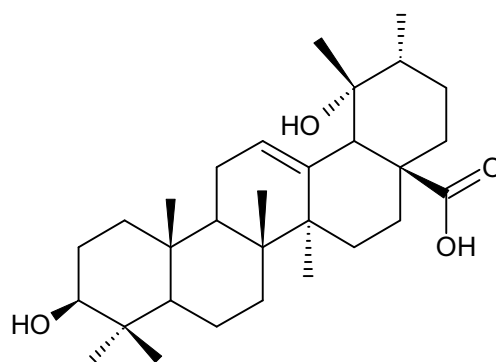
RMN de  $^1\text{H}$  ppm (400 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  0,66 – 2,00 (sinais de grupos metílicos e metilênicos:  $\text{H}_{23}$ ,  $\text{H}_{24}$ ,  $\text{H}_{25}$ ,  $\text{H}_{26}$ ,  $\text{H}_{27}$ ,  $\text{H}_{29}$  e  $\text{H}_{30}$  em 0,69, 0,71, 0,87, 0,91, 1,08, 1,29; 3,01 (m, hidrogênio carbinólico); 5,16 (sl, hidrogênio olefínico do C-12).

RMN de  $^{13}\text{C}$  ppm (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  38,36 (C-1), 26,96 (C-2), 76,82 (C-3), 38,36 (C-4), 54,79 (C-5), 18,09 (C-6), 32,71 (C-7), 39,51 (C-8), 46,82 (C-9), 36,52 (C-10), 23,25 (C-11), 124,51 (C-12), 138,29 (C-13), 41,58 (C-14), 28,24 (C-15), 24,60 (C-16), 47,02 (C-17), 52,40 (C-18), 39,11 (C-19), 38,36 (C-20), 31,27 (C-21), 36,52 (C-22), 28,24 (C-23), 16,00 (C-24), 16,05 (C-25), 16,62 (C-26), 23,81 (C-27), 178,43 (C-28), 17,02 (C-29), 21,06 (C-30).

→ HAT3: mistura de ácido ursólico e ácido pomólico



**Ácido ursólico**



**Ácido pomólico**

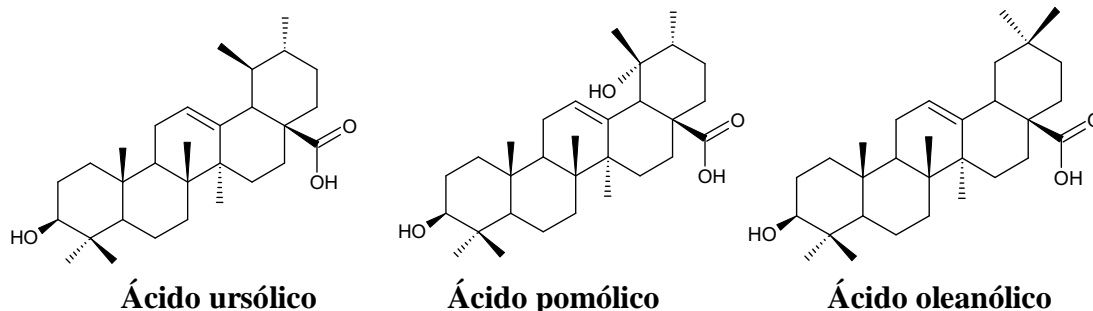
Aspecto: pó amarelo amorfo

RMN de  $^1\text{H}$  ppm (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 0,66-2,00 (sinais de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^3$  dos esqueletos triterpenoídicos), 3,00 (m, hidrogênios carbinólicos dos dois triterpenos), 5,13 (sl, hidrogênio ligado ao C-12 de ambos os terpenos).

Ácido ursólico - RMN de  $^{13}\text{C}$ -NMR ppm (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  38,45 (C-1), 27,54 (C-2), 76,90 (C-3), 38,50 (C-4), 54,87 (C-5), 17,99 (C-6), 32,71 (C-7), 39,60 (C-8), 46,89 (C-9), 36,52 (C-10), 23,25 (C-11), 124,50 (C-12), 138,21 (C-13), 41,40 (C-14), 28,24 (C-15), 23,91 (C-16), 47,02 (C-17), 52,39 (C-18), 39,10 (C-19), 38,36 (C-20), 30,20 (C-21), 36,56 (C-22), 28,24 (C-23), 16,00 (C-24), 16,00 (C-25), 16,91 (C-26), 23,82 (C-27), 178,30 (C-28), 17,00 (C-29), 21,06 (C-30).

Ácido pomólico - RMN de  $^{13}\text{C}$ -NMR ppm (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  38,24 (C-1), 28,24 (C-2), 76,82 (C-3), 41,08 (C-4), 54,79 (C-5), 18,12 (C-6), 32,71 (C-7), 41,08 (C-8), 46,82 (C-9), 36,32 (C-10), 23,13 (C-11), 126,80 (C-12), 138,60 (C-13), 41,40 (C-14), 28,24 (C-15), 26,40 (C-16), 46,82 (C-17), 53,19 (C-18), 71,63 (C-19), 41,63 (C-20), 29,96 (C-21), 36,56 (C-22), 28,24 (C-23), 16,27 (C-24), 15,09 (C-25), 16,59 (C-26), 26,96 (C-27), 178,95 (C-28), 26,96 (C-29), 16,05 (C-30).

→ HAT5: mistura de ácido ursólico, ácido pomólico e ácido oleanólico



Aspecto: pó marrom amorfo

RMN de  $^1\text{H}$  ppm (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 0,60-2,00 (sinais de hidrogênios ligados a carbonos  $\text{sp}^3$  dos esqueletos triterpenoídicos), 3,00 (m, hidrogênios carbinólicos dos três triterpenos), 5,13 (sl, hidrogênio ligado ao C-12 de ambos os terpenos).

RMN de  $^{13}\text{C}$ -NMR ppm (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):

Ácido ursólico:  $\delta$  38,42 (C-1), 27,54 (C-2), 76,83 (C-3), 38,49 (C-4), 54,94 (C-5), 18,00 (C-6), 32,69 (C-7), 39,60 (C-8), 46,88 (C-9), 36,51 (C-10), 23,14 (C-11), 124,57 (C-12), 138,17 (C-13), 41,30 (C-14), 28,24 (C-15), 23,91 (C-16), 47,01 (C-17), 52,37 (C-18), 39,10 (C-19), 38,34 (C-20), 30,37 (C-21), 36,30 (C-22), 28,11 (C-23), 16,06 (C-24), 16,06 (C-25), 16,90 (C-26), 23,80 (C-27), 178,23 (C-28), 16,90 (C-29), 21,06 (C-30).

Ácido pomólico:  $\delta$  38,34 (C-1), 28,11 (C-2), 76,83 (C-3), 41,08 (C-4), 54,77 (C-5), 18,00 (C-6), 32,69 (C-7), 41,08 (C-8), 46,81 (C-9), 36,30 (C-10), 23,14 (C-11), 126,85 (C-12), 138,57 (C-13), 41,63 (C-14), 28,11 (C-15), 26,40 (C-16), 46,81 (C-17), 53,18 (C-18), 71,62 (C-19), 41,63 (C-20), 29,98 (C-21), 36,55 (C-22), 28,11 (C-23), 16,27 (C-24), 15,09 (C-25), 16,81 (C-26), 26,98 (C-27), 178,90 (C-28), 26,98 (C-29), 16,06 (C-30).

Ácido oleanólico:  $\delta$  38,49 (C-1), 26,98 (C-2), 80,14 (C-3), 38,42 (C-4), 54,94 (C-5), 18,00 (C-6), 32,69 (C-7), 39,20 (C-8), 47,28 (C-9), 36,72 (C-10), 22,60 (C-11), 122,26 (C-12), 143,44 (C-13), 41,14 (C-14), 27,54 (C-15), 23,14 (C-16), 46,88 (C-17), 44,73 (C-18), 45,43 (C-19), 30,37 (C-20), 26,40 (C-21), 32,34 (C-22), 27,93 (C-23), 15,21 (C-24), 15,24 (C-25), 16,90 (C-26), 25,96 (C-27), 179,15 (C-28), 32,81 (C-29), 23,43 (C-30).

### **4.3 Atividades Biológicas**

#### **4.3.1 Ensaios antivirais e citotóxicos**

##### Células empregadas

Foram utilizadas células VERO de linhagem contínua (YASUMURA *et al.*, 1963). Estas são derivadas do rim do macaco verde e foram obtidas da "American Type Culture Collection", Maryland - U.S.A., sub-cultivadas no Laboratório de Virologia, ICB/UFMG. Foram cultivadas em meio MEM, acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB) para a sua manutenção. As linhagens celulares permaneceram encubadas a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Adicionaram-se ao meio de cultura os antimicrobianos fungizona (5 µg/mL), penicilina (100 UI/mL) e gentamicina (50 µg/mL) a fim de se evitar o crescimento de bactérias e fungos no mesmo.

##### Vírus testados

As amostras foram testadas frente aos vírus herpes simplex tipo 1 (HSV-1), Vaccinia virus Western Reserve (VACV-WR) e vírus da encefalomiocardite murina (EMC).

HSV-1 é um vírus de dupla-fita de DNA pertencente à família Herpesviridae que se encontra largamente espalhado pelo mundo. É agente etiológico de várias afecções humanas como gengivoestomatites, ceratoconjuntivites, doenças genitais e encefalites (LOIZZO *et al.*, 2008). Nos ensaios foi utilizada a amostra EK, um isolado clínico de HSV-1, proveniente de herpes labial de adulto saudável, que foi isolada em células de rim de macaco verde africano (VERO).

VACV-WR é um vírus de dupla-fita de DNA pertencente à família Poxviridae. O protótipo desta família é o vírus vaccínia, amplamente empregado na imunização contra a varíola (LEFKOWITZ *et al.*, 2006). A amostra de VACV-WR empregada neste trabalho foi gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth (Universidade de Wüsburg, Alemanha).

EMC é um vírus de fita simples de RNA pertencente à família Picornaviridae que infecta alguns mamíferos, como porcos e macacos, podendo lhes causar sérias complicações como encefalomielite e miocardite (KNOWLES *et al.*, 1998). A amostra do vírus EMC foi cedida pelo Dr. I. Kerr, Londres, Reino Unido. Os estoques de vírus foram obtidos em cultivos de fibroblastos de camundongos (L-929).

##### Titulação por TCID

A diluição de vírus exigida para infectar 50% de um determinado grupo de células inoculadas é conhecida por TCID<sub>50</sub>. O cálculo não prediz a quantidade de

unidades infectantes presentes na suspensão original de vírus, mas em que diluição de vírus o efeito citopático (CPE) em células inoculadas é de 50% (REED e MUENCH, 1938).

Diluições seriadas das suspensões de vírus em meio DMEM 1% SFB foram testadas frente a monocamadas celulares de  $1,0 \times 10^4$  células por cavidade incubadas em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. O CPE foi registrado a cada período de 24 h, por uma semana, observando-se o controle de células (células sem a presença de suspensão viral).

O CPE é classificado de 0-4, sendo, zero, a sua não ocorrência; um, quando o mesmo ocorre em menos de 50% das células; dois, cerca de 50% das células com CPE; três, cerca de 75% das mesmas com CPE; e quatro, quando ocorre total destruição da monocamada de células.

As suspensões de vírus testadas neste estudo causaram o efeito de 100% de destruição celular nas seguintes diluições: HSV-1 ( $2,5 \times 10^5$  TCID<sub>100</sub> em 48 h), VACV-WR ( $1,0 \times 10^6$  TCID<sub>100</sub> em 72 h) e EMC ( $1,0 \times 10^6$  TCID<sub>100</sub> em 48 h).

### Preparo das amostras empregadas

Os extratos, frações e substâncias de *D. elongata* avaliados foram previamente pesados e solubilizados em DMSO, com auxílio de ultrasson por 20 min., constituindo amostras na concentração de 20 mg/mL.

### Técnica de microscopia

Suspensões celulares em MEM 5% SFB foram distribuídas em microplacas com 96 cavidades e incubadas por 24 h em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Desta forma, formaram-se monocamadas de células em cada poço das placas com aproximadamente  $1,0 \times 10^4$  células por cavidade.

Decorrido esse tempo, descartou-se o meio de cultura dos poços das placas e acrescentaram-se em cada poço onde seria avaliada a atividade antiviral de uma determinada amostra: 288 µL de meio DMEM 1% SFB, 12µL da diluição da amostra a ser avaliada (20 mg/mL) e 300 µL da solução de vírus. Diluições seriadas foram realizadas objetivando-se o teste das amostras em concentrações inferiores, compreendendo uma faixa de 500 – 0,125 µg/mL. Posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 48 ou 72 h.

Terminado o período de incubação, as placas foram avaliadas qualitativamente com auxílio de microscópio óptico.

Para garantir a qualidade do método, os seguintes controles foram feitos:

- a. Controle de células: poços contendo apenas células acrescidas do meio de cultura DMEM 1% SFB;
- b. Controle de vírus (controle negativo): poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM 1% SFB e de suspensão de vírus;
- c. Controle de vírus com DMSO: poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM 1% SFB, suspensão de vírus e DMSO;
- d. Controle de células com DMSO: poços contendo células acrescidas de meio de cultura DMEM 1% SFB e DMSO.

O primeiro controle (“a”) tinha por objetivo avaliar o comportamento das células sem que as mesmas tivessem contato com qualquer interferente durante o período de incubação. Com isso, os poços reservados para esse controle serviram de padrão para comparação com aqueles em que fosse observada atividade citotóxica ou citopática, por exemplo.

O controle “b” serviu de referência para análise da atividade citopática provocada pelo vírus testado durante o período de incubação das placas.

O controle “c” serviu para verificar se o solvente empregado na diluição das amostras exercia qualquer efeito antiviral ao inibir a atividade citopática do vírus testado.

O controle “d” foi utilizado para avaliar se havia influência benéfica ou maléfica do solvente utilizado para diluição das amostras nas células VERO.

Poços contendo células acrescidas apenas de meio de cultura DMEM 1% SFB e de amostra a ser testada foram preparados a fim de se avaliar possível efeito de toxicidade celular provocado pelas amostras.

Os testes antivirais pela técnica de microscopia foram realizados em quadruplicata para todas as amostras analisadas.

### **Técnica do MTT**

Suspensões celulares em MEM 5% SFB foram distribuídas em microplacas com 96 cavidades que foram incubadas por 24 h em atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Desta forma, formaram-se monocamadas de células em cada poço das placas com aproximadamente 1,0 x 10<sup>4</sup> células por cavidade.



Decorrido esse tempo, descartou-se o meio de cultura dos poços das placas e acrescentaram-se em cada poço onde seria avaliada a atividade viral de uma determinada amostra: 288  $\mu\text{L}$  de meio DMEM 1% SFB, 12  $\mu\text{L}$  da diluição da amostra a ser avaliada (20 mg/mL) e 300  $\mu\text{L}$  da suspensão de vírus. Diluições seriadas foram realizadas objetivando-se o teste das amostras em concentrações inferiores às suas  $\text{CC}_{50}$  compreendendo uma faixa de 500 – 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . Posteriormente, as placas foram incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de  $\text{CO}_2$  por 48 ou 72 h. Terminado o período de incubação, foram acrescentados em cada poço da placa 28  $\mu\text{L}$  do reagente MTT (solução a 2,0 mg/mL em PBS). Finalmente, decorridos 90 minutos do acréscimo de MTT e, após 15 minutos de agitação das placas, realizou-se a leitura das mesmas em leitor de microplacas, a  $\lambda$  492 nm.

As porcentagens do efeito protetor conferidas às células para cada concentração de amostra testada foram calculadas da seguinte forma:

$[(A - B)/(C - B)] \times 100$ , onde:

- A: densidade óptica dos poços com células tratados e infectados;
- B: densidade óptica dos poços com células não-tratados e infectados;
- C: densidade óptica dos poços com células não-tratados e não-infectados.

De posse dessas porcentagens e através de regressão linear simples, obtiveram-se então as concentrações das frações, substâncias e/ou extratos ativos que apresentaram 50% de efeito antiviral:  $\text{CE}_{50}$  (TWENTYMAN *et al.*, 1987).

A concentração citotóxica a 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) para cada extrato, fração e substância também foi obtida de forma semelhante, com a porcentagem de efeito citotóxico calculado da seguinte forma:

$[(A-B)/A] \times 100$ , onde:

- A e B são a  $\text{DO}_{492}$  (densidade óptica) das cavidades onde estão presentes células não tratadas (A) e tratadas (B), respectivamente.

De posse dos valores de  $\text{CE}_{50}$  e  $\text{CC}_{50}$ , calculou-se o índice de seletividade (IS) para cada extrato, fração e substância ativa (RODRIGUEZ *et al.*, 1990):

$$\text{IS} = \text{CC}_{50} / \text{CE}_{50}$$

Os testes antivirais pela técnica do MTT foram realizados em quadruplicata para todas as amostras analisadas.

### **4.3.2 Ensaio antioxidante**

Os extratos e as frações do EEF de *D. elongata* que apresentaram atividade antiviral foram avaliados quanto a sua atividade antioxidante, utilizando um teste de atividade sequestradora de radicais livres.

#### **Sequestrador de radicais livres (DPPH)**

Foram preparadas solução de DPPH a 0,3 mM em etanol e soluções etanólicas das amostras em diversas concentrações:

- Extrato etanólico de folhas de *D. elongata* (EEF): 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 50,0 µg/mL;
- Fração AcOEt:MeOH do EEF: 12,5; 25,0; 50,0; 75,0 e 100,0 µg/mL;
- Fração AcOEt do EEF: 131,0; 252,0; 504,0; 756,0 e 1008,0 µg/mL.

O teste foi realizado em triplicata e o controle utilizado foi a rotina. Para a realização da leitura adicionou-se uma alíquota de 1,0 mL da solução de DPPH a 2,5 mL da solução da amostra. A absorbância foi lida a  $\lambda$  516 nm e a capacidade de eliminar o radical DPPH (% de atividade antioxidante) foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$\text{Atividade Antioxidante (\%)} = \left( \frac{A_{\text{Controle}} - A_{\text{Amostra}}}{A_{\text{Controle}}} \right) \times 100, \text{ onde:}$$

$A_{\text{Controle}}$  é a absorbância da solução de DPPH sem a amostra;

$A_{\text{Amostra}}$  é a absorbância da amostra com o DPPH.

Os percentuais da atividade antioxidante (%AAO) das amostras foram calculadas e o gráfico da %AAO versus concentração foi construído, obtendo-se a concentração efetiva em 50% de atividade ( $CE_{50}$ ) por meio da regressão linear (YAMASAKI *et al.*, 1994).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Fitoquímica

#### 5.1.1 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica dos extratos de *D. elongata* teve como objetivo investigar as principais classes de metabólitos especiais presentes nos mesmos.

Foram obtidos perfis cromatográficos em CCD de gel de sílica para os extratos etanólicos de folhas e de caule de *D. elongata*, utilizando-se reveladores seletivos para as principais classes de metabólitos secundários. Foi avaliada a presença de fenóis, taninos, flavonoides, antracênicos, alcaloides, cumarinas, heterosídeos cardiotônicos, saponinas e terpenoides e/ou esteroides

Os resultados da prospecção fitoquímica obtida por CCD se encontram resumidos na **Tabela 10**.

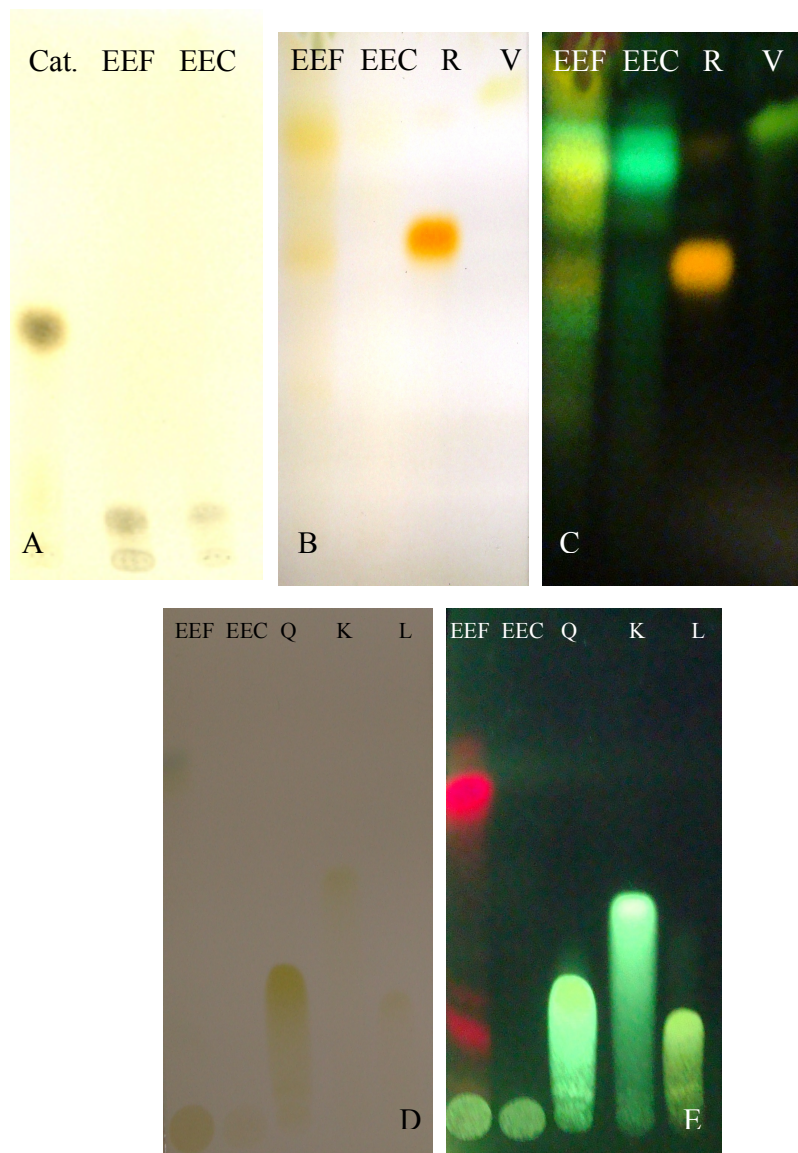
**Tabela 10 - Avaliação qualitativa de classes de metabólitos secundários dos extratos etanólicos de folhas e de caule de *D. elongata***

Extratos	Classes de metabólitos secundários									
	FE	FH	FG	TA	AN	AL	HC	CM	SA	TE
Caule	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
Folhas	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

FE – fenóis, FH – flavonoides heterosídicos, FG – geninas flavônicas, TA – taninos, AN – antracênicos, AL – alcaloides, HC – heterosídeos cardiotônicos, CM – cumarinas, SA – saponinas, TE – terpenoides e/ou esteroides; + presentes; - ausentes; Condições cromatográficas: vide item 4.2.4 (pág. 60).

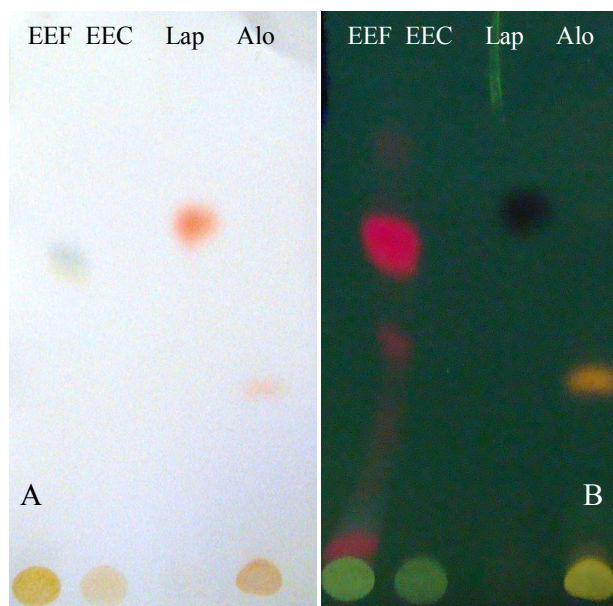
A análise dos resultados mostrou a presença de substâncias fenólicas, em ambos os extratos, pela observação de manchas acinzentadas como resultado da reação com cloreto férrico, similar ao padrão catequina. Porém, não houve indicativo da presença de taninos, uma vez que as bandas vistas nos cromatogramas de EEF e EEC apresentaram Rfs bem inferiores ao padrão catequina num sistema de eluente próprio para a classe de taninos (**Figura 8 A**, pág. 81). Entre os fenóis observados, se encontravam flavonoides heterosídicos, pela presença de manchas amarelas ou alaranjadas frente ao reagente NP/PEG, com Rfs próximos àquelas observadas pelas substâncias de referência dessa classe: rutina e vitexina (**Figura 8 B**, pág. 81). Essas se confirmaram pela sua fluorescência verde ou amarela sob luz UV<sub>365</sub> (**Figura 8 C**, pág. 81). Não foram vistas geninas de flavonoides nos extratos de *D. elongata*, uma vez que, num sistema de eluente próprio para esse tipo de substâncias, as manchas

amareladas resultantes da reação entre flavonoides e  $\text{AlCl}_3$  dos seus cromatogramas quase não se deslocaram, ao contrário das geninas utilizadas como referência; quercetina, canferol e luteonina (**Figura 8 D**). Esse dado foi confirmado pela observação da placa sob  $\text{UV}_{365}$  (**Figura 8 E**) (Wagner *et al.*, 1984). Esses resultados estão de acordo com a literatura científica, que aponta a presença de fenóis e flavonoides para várias espécies da família Bignoniaceae (GACHET *et al.*, 2009; MARTIN *et al.*, 2007; PAULETTI *et al.*, 2003).



**Figura 8** - Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica dos extratos etanólicos de folhas (EEF) e de caule (EEC) de *D. elongata*. Revelador para taninos, fenóis, flavonoides e flavonoides heterosídeos. A) Revelação com cloreto férrico (Cat = catequina). B) Revelação com NP/PEG (R = rutina e V = vitexina) C) Revelação com NP/PEG e luz  $\text{UV}_{365}$ . D) Revelação com  $\text{AlCl}_3$  (Q = quercetina, K = canferol e L = luteonina). E) Revelação com  $\text{AlCl}_3$  e luz  $\text{UV}_{365}$ . (WAGNER *et al.*, 1984). Condições cromatográficas: vide item 4.2.4 (pág. 61).

Substâncias antracênicas e naftoquinônicas são comumente encontradas em espécies pertencentes a essa família (EYONG *et al.*, 2006; LENTA *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2008; PEREIRA *et al.*, 2006), incluindo as raízes da espécie de *D. elongata*, das quais foi isolada a naftoquinona 4,7-diidróxi-10-metóxi-2,2-dimetil-3,4-diidro-2H-benzo[h]cromeno-5,6-diona (BEDIR *et al.*, 2009). Porém, no presente estudo, observou-se que substâncias antracênicas e naftoquinônicas não se mostraram presentes nas folhas e no caule dessa espécie (**Figura 9**).

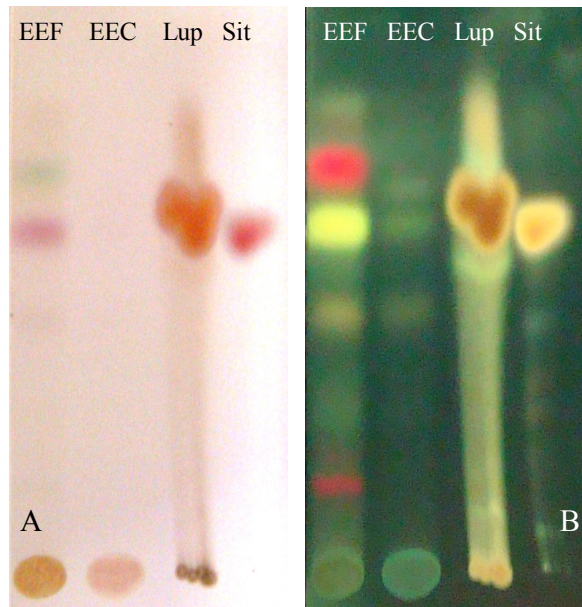


**Figura 9** - Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica dos extratos etanólicos de folhas (EEF) e de caule (EEC) de *D. elongata*. Revelador para substâncias antracênicas. A) Hidróxido de potássio a 5% no visível. B) Revelação com hidróxido de potássio a 5% e luz UV<sub>365</sub>. (Lap = lapachol, Alo = aloína) (WAGNER *et al.*, 1984). Condições cromatográficas: vide item 4.2.4 (pág. 61).

A prospecção fitoquímica revelou ainda uma diferença fitoquímica entre EEF e EEC. EEC apresentou menor diversidade de manchas referentes a terpenoides e/ou esteroides, em relação a EEF (**Figura 10**, pág. 83). Terpenoides e esteroides são substâncias amplamente difundidas no reino vegetal, incluindo espécies de Bignoniaceae (KIM *et al.*, 2005; NAITHANI *et al.*, 2008).

Não foi evidenciada a presença de cumarinas e saponinas, apontadas na literatura como presentes no perfil fitoquímico de algumas espécies de Bignoniaceae (CARVALHO *et al.*, 2009; GACHET *et al.*, 2009). Outras classes de metabólitos secundários não visualizados nos extratos de *D. elongata* costumam ser encontrados

de forma mais restrita em alguns membros de Bignoniaceae. É o caso, por exemplo, de alcaloides em espécies do gênero *Incarvillea* (FU *et al.*, 2009) e de heterosídeos cardiotônicos em *Tynnanthus fasciculatus* Miers (CARVALHO *et al.*, 2009).

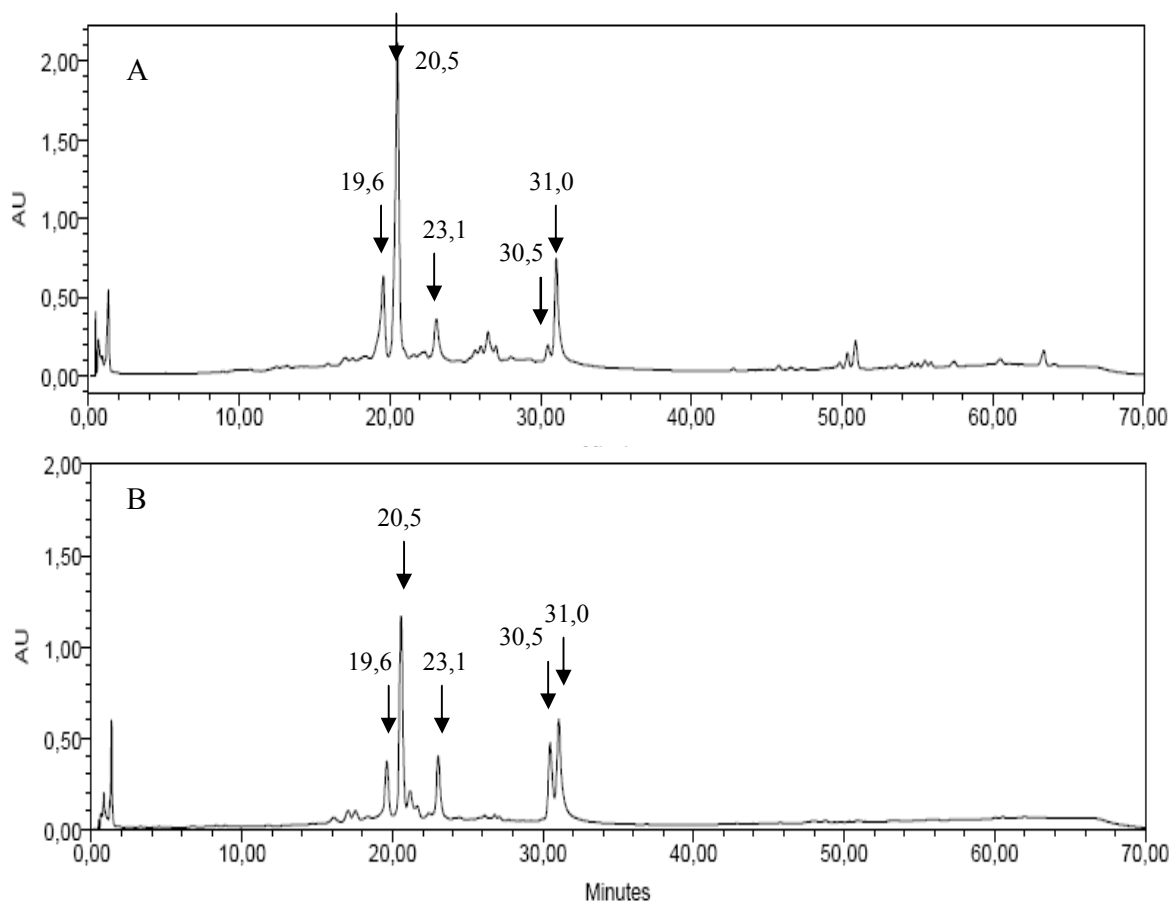


**Figura 10** - Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica dos extratos etanólicos de folhas (EEF) e de caule (EEC) de *D. elongata*. Revelador para terpenoides e/ou esteroides. A) Revelação com reagente de Liebermann-Burchard. B) Revelação com reagente de Liebermann-Burchard e luz UV<sub>365</sub>. (Lup = lupeol e Sit =  $\beta$ -sitosterol) (WAGNER *et al.*, 1984). Condições cromatográficas: vide item 4.2.4 (pág. 63).

### 5.1.2 Análise por CLAE-FR

Análises por CLAE-FR permitiram avaliar qualitativamente a composição química de EEF e de EEC e, portanto, compará-las, além de direcionar a etapa do fracionamento cromatográfico realizado posteriormente.

A **Figura 11** mostra as “impressões digitais” (perfis cromatográficos) de EEF e de EEC:

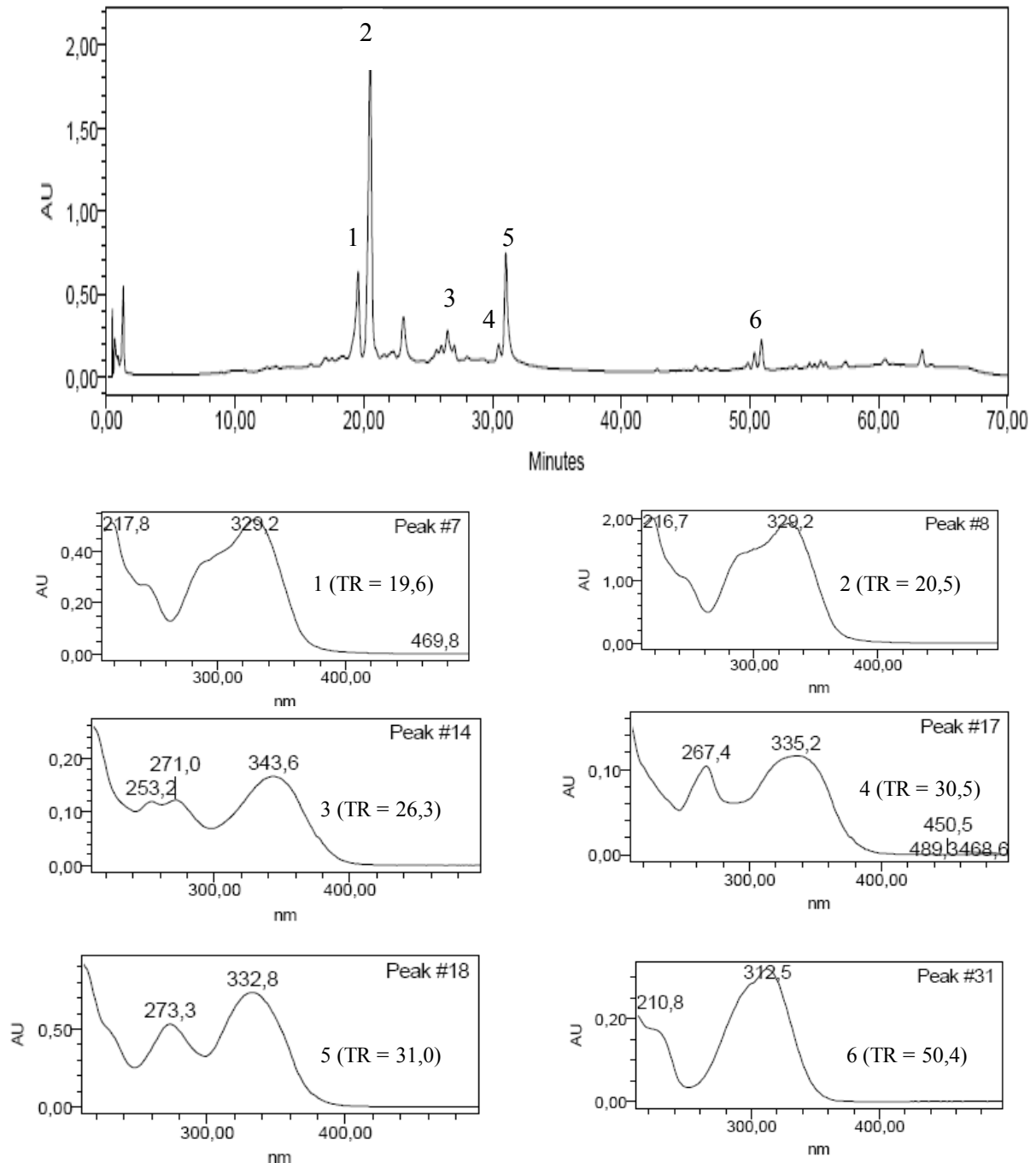


**Figura 11** - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR para EEF (A) e EEC (B) a  $\lambda$  220 nm. Os principais picos em comum entre os dois cromatogramas estão indicados por setas e pelos seus TR (min). Condições cromatográficas: vide 4.2.5 (pág 63).

Nos perfis cromatográficos de EEF e EEC, observa-se o predomínio de picos no intervalo de 20 a 30 min., correspondendo a substâncias de média polaridade. No cromatograma de EEF observam-se ainda picos com TR maiores que 50 min. A análise dos perfis cromatográficos dos dois extratos mostrou picos comuns aos mesmos.

A análise dos espectros de UV obtidos *on line* mostrou que os comprimentos de onda máximos referentes às substâncias responsáveis pelos picos com TR comuns nos cromatogramas dos dois extratos (A) e (B) de *D. elongata* são iguais (**Figura 11** e

**Figura 12).** O cromatograma de EEF apresentou maior complexidade quando comparado com EEC, por isso seus espectros de UV obtidos *on line* são mostrados na **Figura 12**.

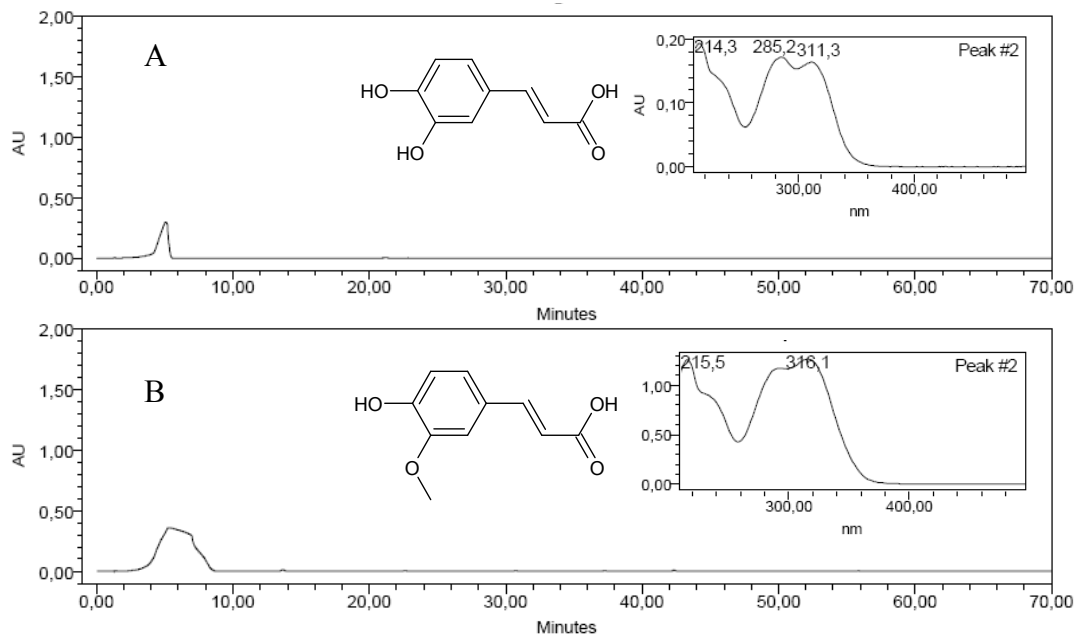


**Figura 12 - Perfil cromatográfico de EEF a  $\lambda$  220 nm com os espectros de UV obtidos *on line* para os principais picos. Condições cromatográficas: vide 4.2.5, pág 63.**

Os picos compreendidos entre os TR 19,6 e 23,1 min. se referem a substâncias que possuem o mesmo grupo cromóforo, como pode ser observado para os picos 1 e 2 (**Figura 12**). Esses espectros de UV apresentam  $\lambda_{\text{máx}}$  com quatro bandas de



absorção: II (216-218 nm), IIa (244-246 nm), I (290-292 nm) e Ia (329-333 nm). O padrão de absorção no UV dessas substâncias sugere que sejam arilpropanoides e/ou seus derivados (GADZA, 2004). No intuito de se comprovar essa possibilidade, foram analisados por CLAE-FR, utilizando-se as mesmas condições cromatográficas, dois arilpropanoides: ácido ferúlico e cafeico (**Figura 13**).

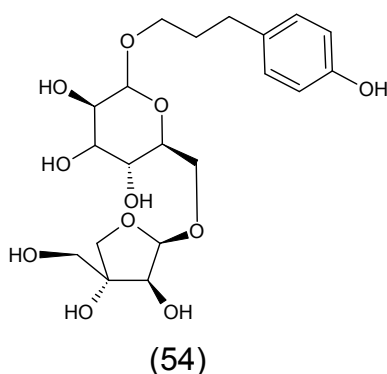
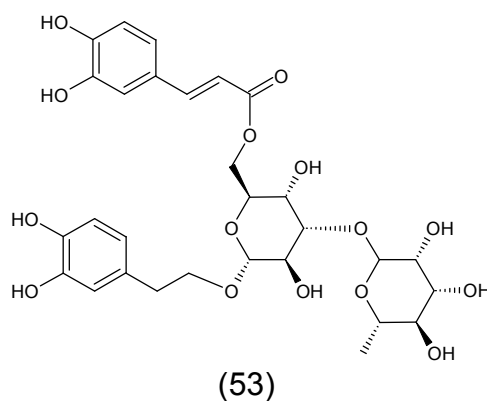
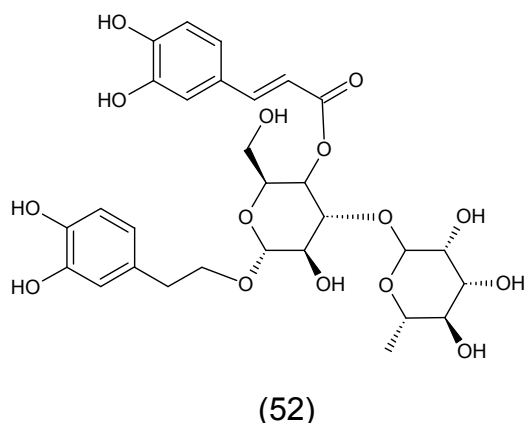


**Figura 13** - Cromatogramas do ácido cafeico (A) e do ácido ferúlico (B) com seus respectivos espectros de UV obtidos *on line* a  $\lambda$  220 nm. Condições cromatográficas: vide 4.2.5, pág 63.

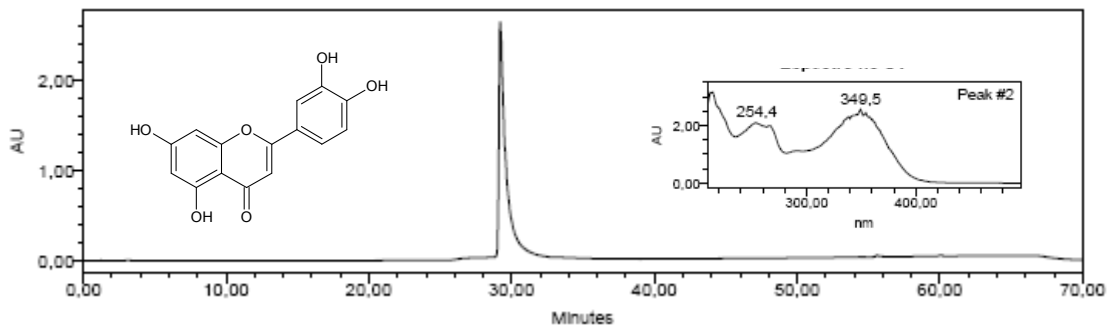
Como pode ser observado, os arilpropanoides apresentaram o mesmo padrão de absorção no UV que as substâncias de EEF, porém com tempos de retenção menores (5,1 min. para o ácido cafeico e 5,3 min. para o ácido ferúlico). Uma vez que o sistema cromatográfico utilizado se dá em fase reversa com elevação da concentração do modificador orgânico, observou-se que as substâncias responsáveis pelos picos compreendidos entre TR 19,6 e 23,1 min devem ser derivados de maior peso molecular ou menos polares dos ácido ferúlico e cafeico, possivelmente ésteres, tais como ariletanoides e/ou arilpropanoides (SNYDER *et al.*, 1997).

Levantamento bibliográfico de substâncias com tais características presentes na família Bignoniaceae apontaram que essas se tratam provavelmente de ariletanoides e/ou arilpropanoides glicosilados, comuns a essa família. A espécie *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry, por exemplo, apresenta nas cascas de seu caule, os

isômeros verbascosídeo (52) e isoverbascosídeo (53) (LIMA *et al.*, 2003). Já a espécie *Tabebuia impetiginosa* Stanley possui vários ariletanoides glicosilados nas cascas de seu caule, como o osmantusídeo (54) (WARASHINA *et al.*, 2006). Espécies de *Jacaranda* e outras Bignoniaceae também possuem esses tipos de metabólitos (GACHET *et al.*, 2009).



Os picos com TR compreendidos entre 25,0 e 28,0 min, apresentaram também espectros de absorção no UV com  $\lambda_{\text{máx}}$  como aquele visualizado em 3 (Figura 12, pág. 85). Esse tipo de espectro no UV é típico de flavonoides di-hidroxilados nas posições 3' e 4' (anel B), uma vez que apresentam duas bandas de absorção (bandas I e II), com a banda II se dividindo em duas (IIa e IIb) (MABRY *et al.*, 1970). Análise da luteonina nas mesmas condições cromatográficas que foram realizadas para EEF mostram que o padrão de absorção no UV é similar (Figura 14, pág. 88).



**Figura 14 - Cromatograma da luteolina (1mg/mL) e espectro de UV obtido *on line* a  $\lambda$  220 nm. Condições cromatográficas: vide 4.2.5, pág 63.**

Os picos com TR em 30,5 e 31,0 (**Figura 12**, pág. 85) apresentam espectros no UV típicos de flavonas: banda I compreendida entre  $\lambda$  310 e 350 nm e banda II compreendida entre  $\lambda$  250 e 280 nm (MABRY *et al.*, 1970).

Os picos com TR maiores que 50,0 min apresentaram padrões de absorção variados. É de se esperar que os terpenoides contidos em EEF tenham sido eluídos nesse tempo, uma vez que se trata de substâncias menos polares e, que, raramente, apresentam algum grupo cromóforo para detecção em UV (DEWICK, 1997; VOLPATO, 2005).

Analisando a **Figura 11** (pág. 84) algumas diferenças entre EEF e EEC puderam ser apontadas: As áreas dos picos gerados pelas substâncias estão diretamente relacionadas às concentrações das mesmas. Portanto, pode-se sugerir que EEF provavelmente possui uma maior concentração das substâncias que também estão presentes em EEC, com exceção daquelas com TR 23,1 e 30,5 min. Isso pode ser dito por que as amostras injetadas foram preparadas na mesma concentração e mesmas condições (seção 4.2.5, pág. 63) (SNYDER *et al.*, 1997). EEC apresenta uma quantidade ínfima ou até mesmo não apresenta as substâncias referentes aos picos que aparecem nas regiões compreendidas entre TR 25,0 e 28,0 min. (flavonoides 3',4'-OH) e acima de 50,0 min (terpenoides) do cromatograma de EEF. Portanto, a concentração de fenóis em EEC provavelmente é inferior a de EEF. Assim também pode ser sugerido para a concentração de terpenoides, já predita na prospecção fitoquímica por CCD.

## 5.2 Fitoquímica – frações originadas do EEF

O fracionamento, bem como o isolamento dos principais constituintes de EEF foram guiados pelos bioensaios antivirais, como descrito na seção 5.4 (pág. 123).

O fracionamento do EEF de *D. elongata* foi realizado em coluna cromatográfica utilizando como fase estacionária gel de sílica e solventes com polaridade crescente. Obtiveram-se 9 frações: Hex, Hex:DCM, DCM, DCM:AcOEt, AcOEt, AcOEt:MeOH, MeOH, H<sub>2</sub>O e MeOH a 3% AcOH.

### 5.2.1 Prospecção fitoquímica

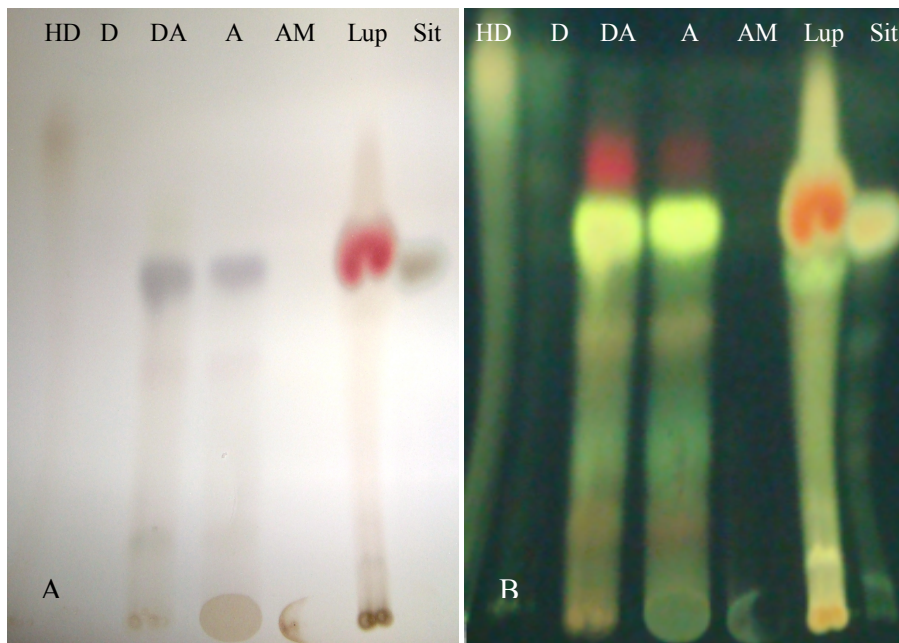
Os resultados da prospecção fitoquímica obtida por CCD para as frações obtidas a partir do primeiro fracionamento do EEF de *D. elongata* se encontram resumidos na **Tabela 11**.

**Tabela 11 - Avaliação qualitativa de classes de metabólitos secundários das frações obtidas de EEF de *D. elongata***

Frações	Classes de metabólitos secundários									
	FE	FH	FG	TA	AN	AL	HC	CM	SA	TE
Hex	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Hex:DCM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
DCM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
DCM: AcOEt	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
AcOEt	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
AcOEt:MeOH	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MeOH a 3% AcOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

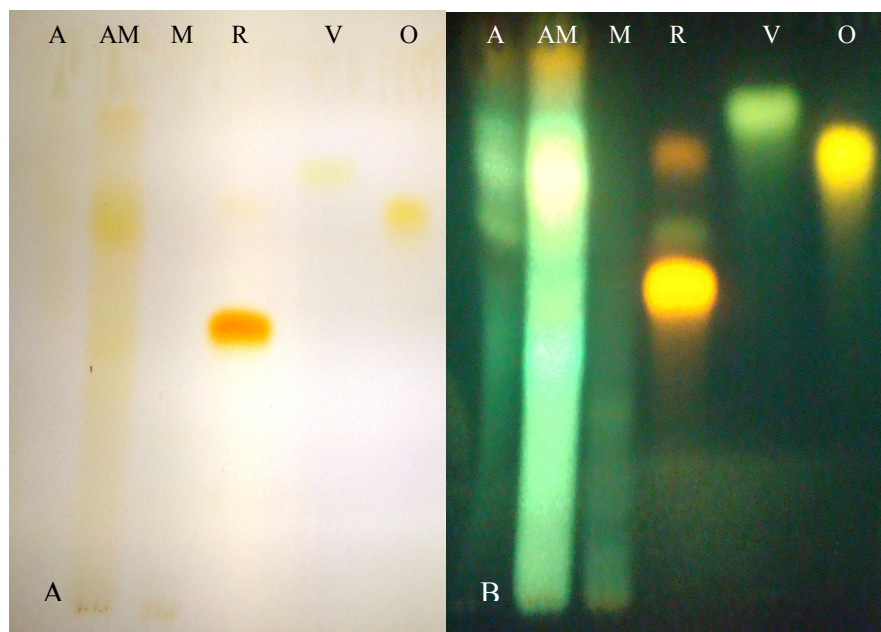
FE – fenóis, FH – flavonoides heterosídicos, FG – geninas flavônicas, TA – taninos, AN – antracênicos, AL – alcaloides, HC – heterosídeos cardiotônicos, CM – cumarinas, SA – saponinas, TE – terpenoides e/ou esteroides; + presentes; - ausentes; Condições cromatográficas: vide item 4.2.4 (pág. 60).

Como era de se esperar, os terpenoides e/ou esteroides presentes no EEF se concentraram nas frações eluídas com os solventes menos polares (VOLPATO, 2005), com destaque para as frações DCM:AcOEt e AcOEt. Os mesmos já não foram encontrados em AcOEt:MeOH (**Figura 15**, pág. 90).



**Figura 15** - Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica para as frações Hex:DCM, DCM, DCM:AcOEt e AcOEt do EEF. Revelador para terpenos e/ou esteroides. HD = Hex:DCM, D = DCM, DA = DCM:AcOEt, A = AcOEt, AM = AcOEt:MeOH, Lup = lupeol, Sit =  $\beta$ -sitosterol. Condições cromatográficas: vide item 4.2.4 (pág. 63), A – visível, B – UV<sub>365</sub> (WAGNER *et al.*, 1984).

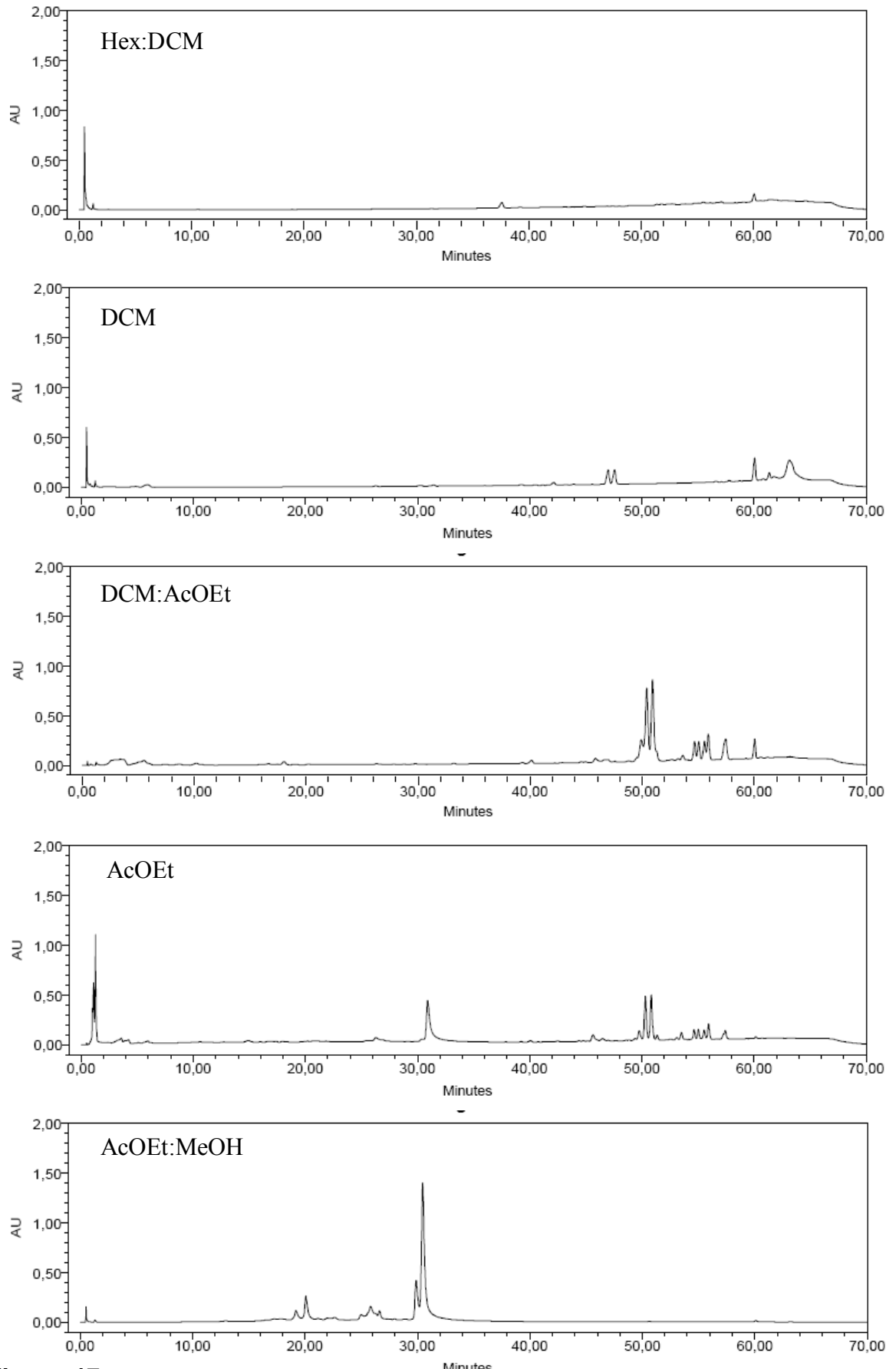
Os flavonoides se concentraram principalmente nas frações AcOEt e AcOEt:MeOH. Essa última se mostrou a mais rica em substâncias fenólicas. A fração MeOH apresentou resquícios de substâncias fenólicas (**Figura 16**).



**Figura 16** - Cromatogramas obtidos por CCD de gel de sílica para as frações AcOEt (A), AcOEt:MeOH (AM) e MeOH (M). Revelador para flavonoides. R = rutina, V = vitexina, O = orientina. Condições cromatográficas: vide item 4.2.4 (pág. 61), A – visível, B – UV<sub>365</sub> (WAGNER *et al.*, 1984).

### **5.2.2 Análises por CLAE-FR**

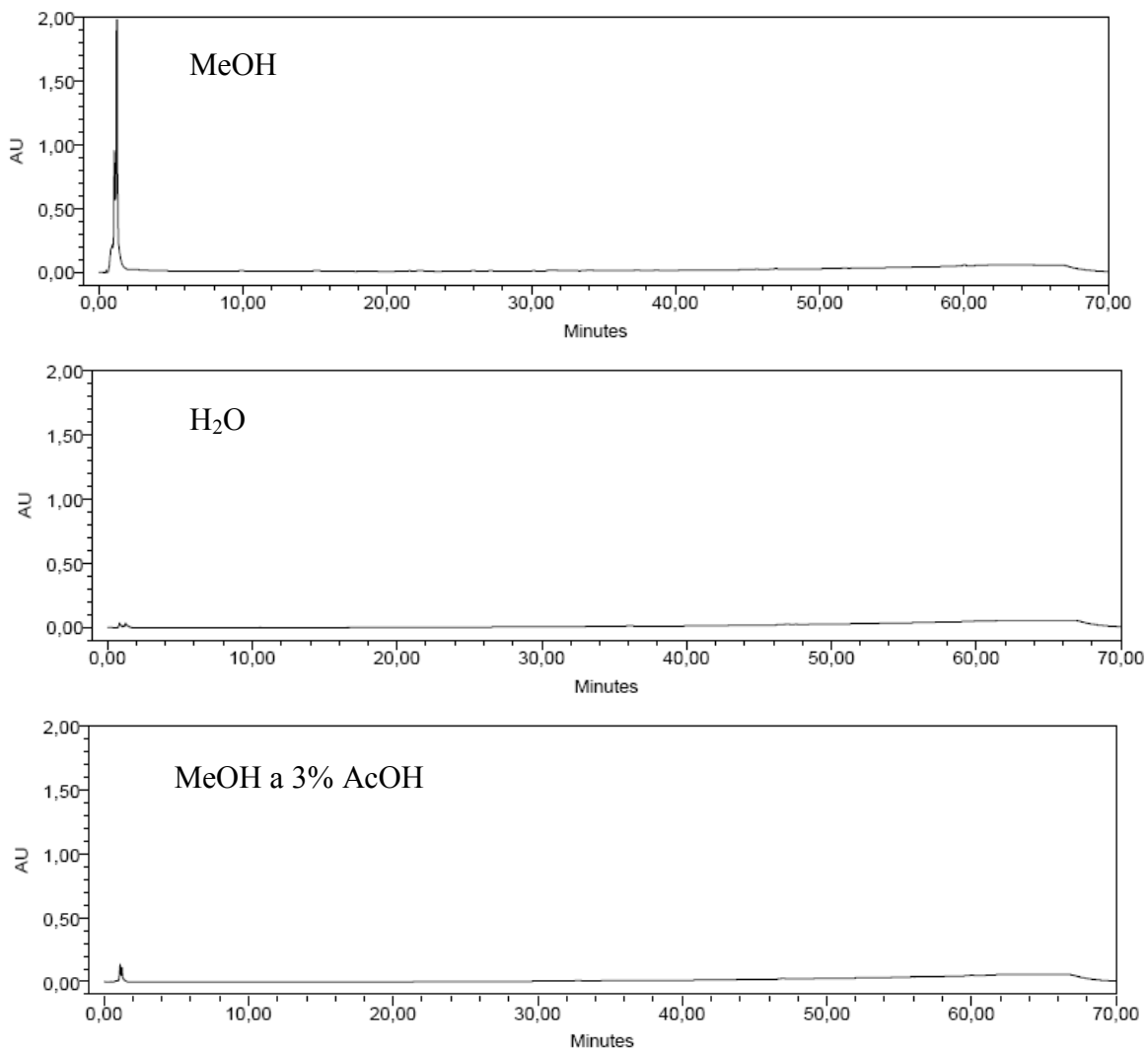
As análises das frações obtidas de EEF por CLAE-FR confirmam as observações já realizadas por CCD. As frações menos polares são as mais ricas em terpenoides e/ou esteroides (metabólitos menos polares). As substâncias de menor polaridade, ou seja, com maiores TR observadas em EEF (**Figura 12**, pág. 85) se concentraram nas frações Hex:DCM, DCM, DCM:AcOEt e AcOEt, principalmente nessas duas últimas. Também há a confirmação do aparecimento de substâncias fenólicas na fração AcOEt (flavonoide com TR 30,5 min.). A fração AcOEt:MeOH tem como substância majoritária o mesmo flavonoide detectado para a fração AcOEt (**Figura 17**, pág. 92). Os derivados de ariletanoides discutidos na seção 5.1.2 (pág. 84), que apresentavam picos com TR entre 19,6 e 23,1 min. no cromatograma de EEF aparecem na fração AcOEt:MeOH, mas com áreas dos picos reduzidas. Isso pode ter ocorrido pela alta interação desses metabólitos com os grupos silanóis presentes no gel de sílica empregado como fase estacionária durante a fase de fracionamento cromatográfico de EEF. Parte da concentração total dessas substâncias presentes em EEF provavelmente não foi eluída com nenhum dos solventes utilizados durante o seu fracionamento. Logo, essas se encontraram com concentrações reduzidas na fração AcOEt:MeOH. (**Figura 17**, pág. 92) (SNYDER *et al.*, 1997).



**Figura 17** - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR a  $\lambda$  220 nm para as frações Hex:DCM, DCM, DCM:AcOEt, AcOEt e AcOEt:MeOH obtidas do fracionamento em gel de sílica do EEF. Condições cromatográficas: vide 4.2.5, pág. 63.

As três frações mais polares (MeOH, H<sub>2</sub>O e MeOH a 3% AcOH) (**Figura 18**) não apresentaram quaisquer substâncias analisadas no cromatograma de EEF e/ou concentrações detectáveis dessas.

Para a fração MeOH observa-se um pico intenso em torno de 1 min. (**Figura 18**). Logo, as substâncias mais polares presentes em EEF se concentraram nessa fração.



**Figura 18** - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR, a  $\lambda$  220 nm, para as frações MeOH, H<sub>2</sub>O e MeOH a 3% AcOH obtidas do fracionamento em gel de sílica de EEF. Condições cromatográficas: vide seção 4.2.5, pág. 63.

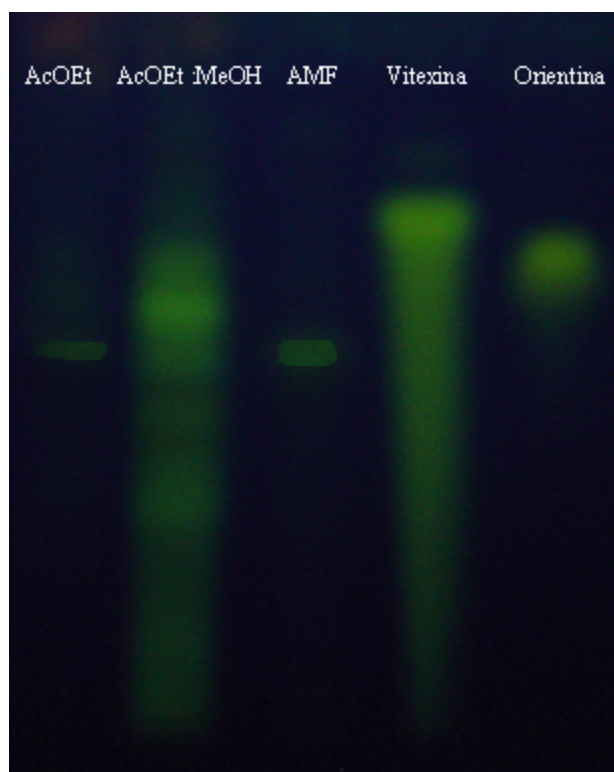


### 5.3 Fitoquímica de EEF e caracterização das substâncias isoladas

#### 5.3.1 AMF

A substância denominada AMF foi isolada da fração AcOEt:MeOH por CLAE-FR preparativa. AMF se apresentou como um pó amarelo amorfo, com ponto de fusão na faixa 248-251 °C.

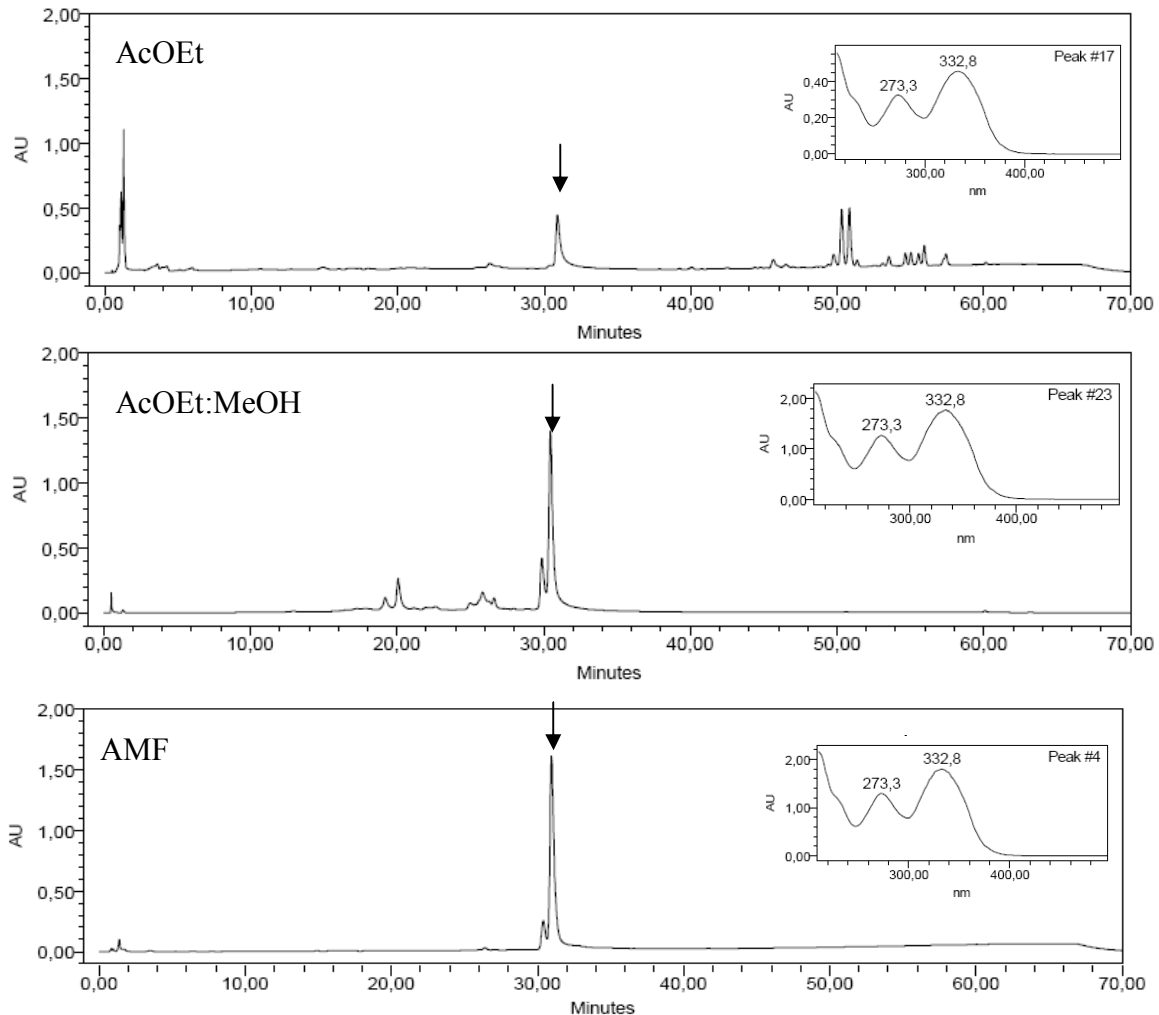
A análise por CCD de AMF mostrou que a mesma se encontrava presente tanto na fração AcOEt, quanto na fração AcOEt:MeOH (**Figura 19**). A fluorescência esverdeada sob luz UV<sub>365</sub>, após revelação com AlCl<sub>3</sub>, sugeriu que essa se tratava de um flavonoide. A mancha no UV apresentava o mesmo padrão de fluorescência dos dois flavonoides utilizados como referência: vitexina e orientina (WAGNER *et al.*, 1984).



**Figura 19** - Cromatograma obtido por CCD de gel de sílica para as frações AcOEt, AcOEt:MeOH, AMF, vitexina e orientina. Revelador: AlCl<sub>3</sub> e UV<sub>365</sub>. Condições cromatográficas: vide seção 4.2.4, pág. 61. (WAGNER *et al.*, 1984).

Análises por CLAE-FR de AMF e das frações AcOEt e AcOEt:MeOH indicaram a presença de AMF nas duas frações: pico com tempo de retenção aproximado de 30,5 min. e mesmo espectro de UV (**Figura 20**, pág. 95).

No cromatograma da substância isolada, considerando-se a proporção da área do pico de AMF em relação ao total da área gerada por todos os picos, essa corresponde a 86,3% do total (**Figura 20**).



**Figura 20** – Cromatogramas obtidos por CLAE-FR a  $\lambda$  220 nm das frações AcOEt e AcOEt:MeOH, e da substância AMF. Condições, vide 4.2.5 pág. 63; AMF: 4,0 mg/mL, frações: 10 mg/mL.

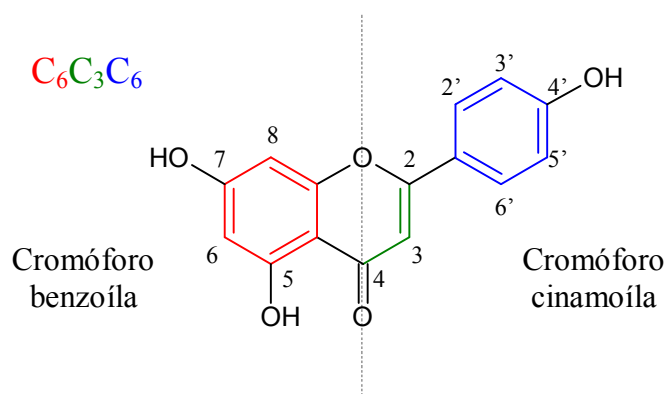
A caracterização estrutural de AMF se deu através de experimentos espectrométricos, como descrito a seguir.

A espectroscopia de absorção na região de UV é uma das técnicas mais simples disponível para a análise estrutural de flavonoides, sendo utilizada para obter informações a respeito de seu esqueleto básico e para definir padrão de oxigenação da molécula.

Os flavonoides são sintetizados nas células vegetais a partir de duas rotas biossintéticas, a do chiquimato e a do acetato-malonato. A primeira utiliza aminoácidos aromáticos (fenilalanina e tirosina) para formar o ácido cumárico, que fornecerá o anel

aromático B e três átomos de carbono do anel C do esqueleto básico de flavonoides. A segunda, por sua vez, fornecerá o anel aromático A pela condensação de três unidades de acetato (malonato). O esqueleto básico dos flavonoides, portanto, é quimicamente caracterizado como  $C_6C_3C_6$ . O padrão de hidroxilação básico dos anéis aromáticos de um flavonoide, devido a sua rota biossintética é C-7, C-5 e C-4' (**Figura 21**) (DEWICK, 1997).

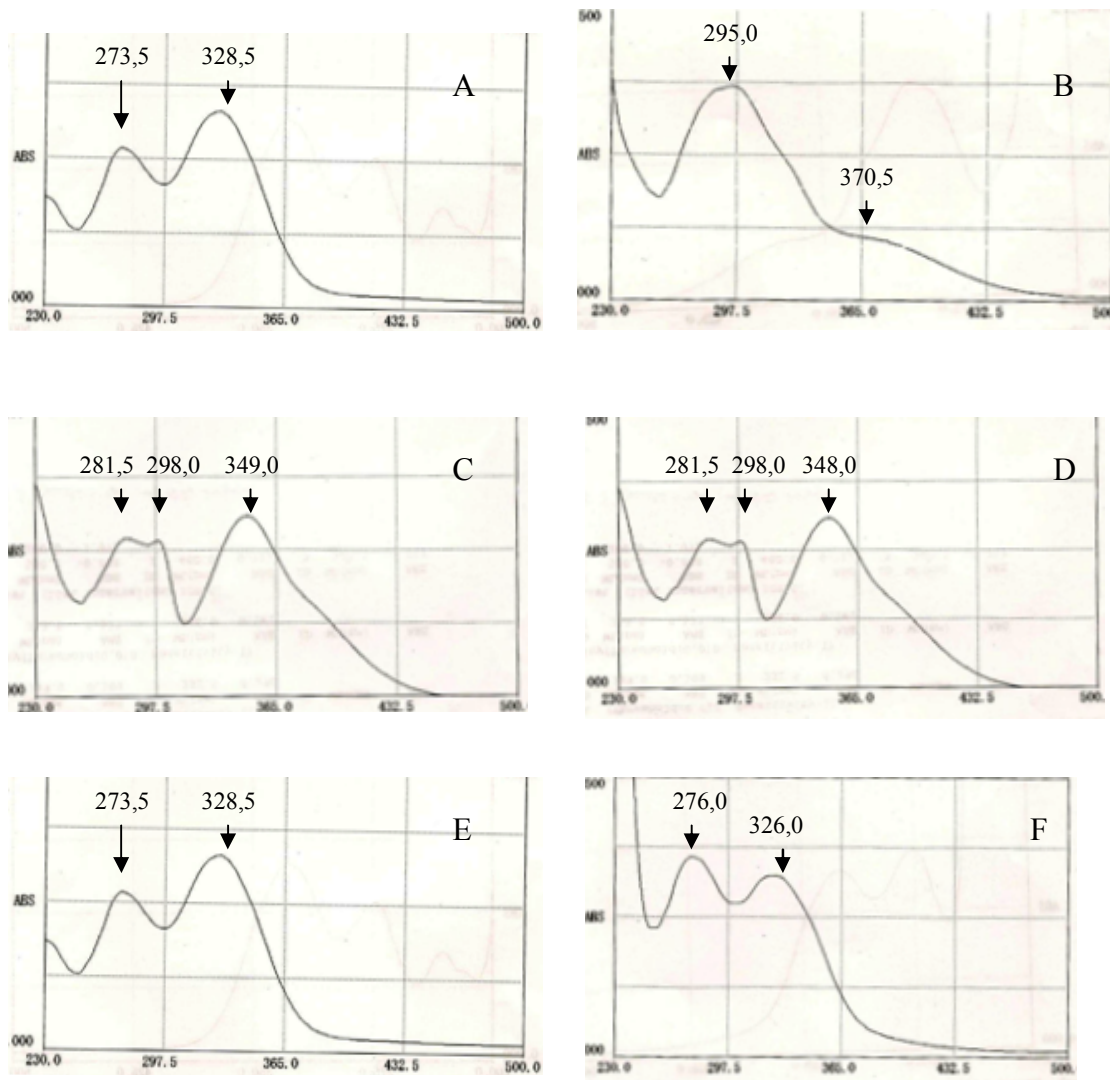
O espectro no UV de flavonoides apresenta duas bandas de absorção, devido a presença de dois cromóforos principais. O cromóforo benzoíla é responsável pela banda II ( $\lambda$  240-285 nm) e o cromóforo cinamoíla é responsável pela banda I ( $\lambda$  310-370 nm) (**Figura 21**) (MABRY *et al.*, 1970).



**Figura 21** - Esqueleto básico de um flavonoide e seus cromóforos.

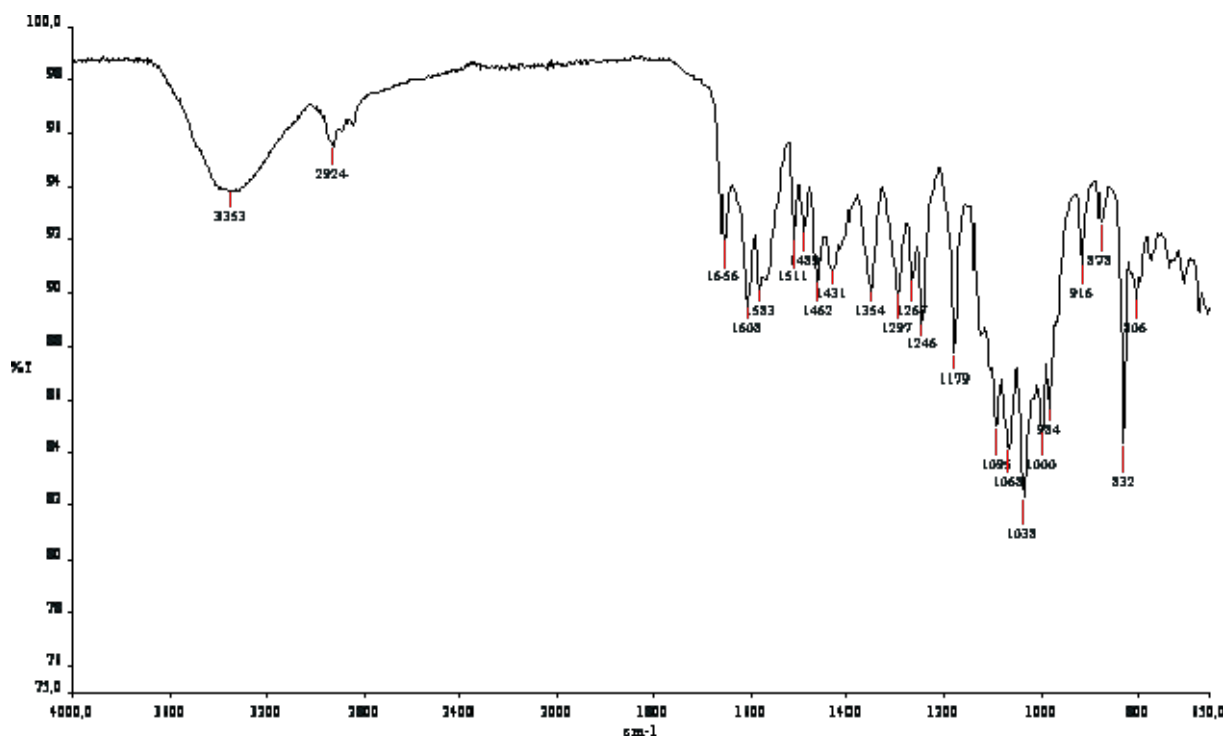
Análise de AMF por espectroscopia na região do UV mostrou bandas intensas com máximos de absorção em  $\lambda$  273,5 e 328,5 nm, sendo compatível com a estrutura de uma flavona (250-280, 310-350 nm) (**Figura 22 A**, pág. 96). Com a adição de MeONa, houve deslocamento batocrômico de ambas as bandas,  $\lambda$  295, 370,5 nm, evidenciando a natureza fenólica de AMF. No entanto, o efeito hipocrômico observado para a banda I é típico da presença de substituinte oxigenado em C-4' (4'-OH não livre: O-CH<sub>3</sub> ou O-açúcar, por exemplo) (**Figura 22 B**, pág. 96). Após 5 min. do acréscimo de MeONa, não houve alteração do espectro em relação àquele obtido logo após o acréscimo. O espectro modificado em meio básico voltou a apresentar o padrão obtido pela solução estoque após o acréscimo de HCl. Adição de AlCl<sub>3</sub> levou a um efeito batocrômico da banda I,  $\lambda$  349 nm, e à divisão da banda II em outras duas, IIa –  $\lambda$  298 nm, IIb –  $\lambda$  281,5 nm (**Figura 22 C**, pág. 96). Esse resultado indica a presença de hidroxila nas posições 3 ou 5. Após a adição de HCl à solução anterior, não foi observada qualquer alteração no espectro, levando a concluir que há hidroxila

livre em C-5 (**Figura 22 D**). A adição de AcONa à solução estoque não provocou qualquer alteração em seu espectro, indicando ausência de OH livre em C-7 ou C-4' (**Figura 22 E**). A essa última acrescentaram-se gotas de  $H_3BO_3$ . Porém, não houve deslocamentos significantes das bandas em relação ao espectro da solução estoque, o que indica ausência de sistema di-hidroxi na estrutura de AMF (**Figura 22 F**) (MABRY *et al.*, 1970).



**Figura 22** - Espectros no UV para AMF sem e com adição de reagentes químicos específicos: A. solução estoque de AMF sem adição de qualquer reagente. B. Solução estoque + NaOMe. C. Solução estoque +  $AlCl_3$ . D. Solução de "C" + HCl. E. Solução estoque + NaOAc. F. Solução de "E" +  $H_3BO_3$ . Para maiores detalhes, vide seção 4.2.8, pág. 70.

O espectro no IV de AMF (**Figura 23**) mostrou a natureza aromática da substância pelas absorções em  $1608$  e  $1583\text{ cm}^{-1}$ , devidas a estiramentos C=C de anel aromático. A banda larga em  $3353\text{ cm}^{-1}$ , relativa a vibrações de deformação axial de O-H, indicou a presença de hidroxila(s). Já a banda em  $1656\text{ cm}^{-1}$  é típica de estiramento de C=O conjugada com uma ligação C=C ( $\alpha$ ,  $\beta$  - insaturada). A baixa intensidade de absorção da mesma indica uma ligação de hidrogênio intramolecular, confirmando a presença de OH em C-5, sugerida pelo espectro de UV. Em  $2924\text{ cm}^{-1}$  há uma banda de absorção indicando deformação axial assimétrica de C-H de  $\text{CH}_2$ . A presença de bandas na região compreendida entre  $1260$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$  indicam presença de ligação C-O (deformação axial) (SILVERSTEIN *et al.*, 2005).



**Figura 23** – Espectro no IV de AMF.

O ESMS forneceu os picos referentes aos íons aductos de próton  $623\text{ [M + H]}^+$ , de sódio  $645\text{ [M + Na]}^+$  e de potássio  $661\text{ [M + K]}^+$ , caracterizando a massa molecular de AMF como  $622\text{ u.m.a.}$ , compatível com a fórmula molecular  $\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_{15}$  (**Figura 24**, pág. 99) (SILVERSTEIN *et al.*, 2005; YIM *et al.*, 2003).

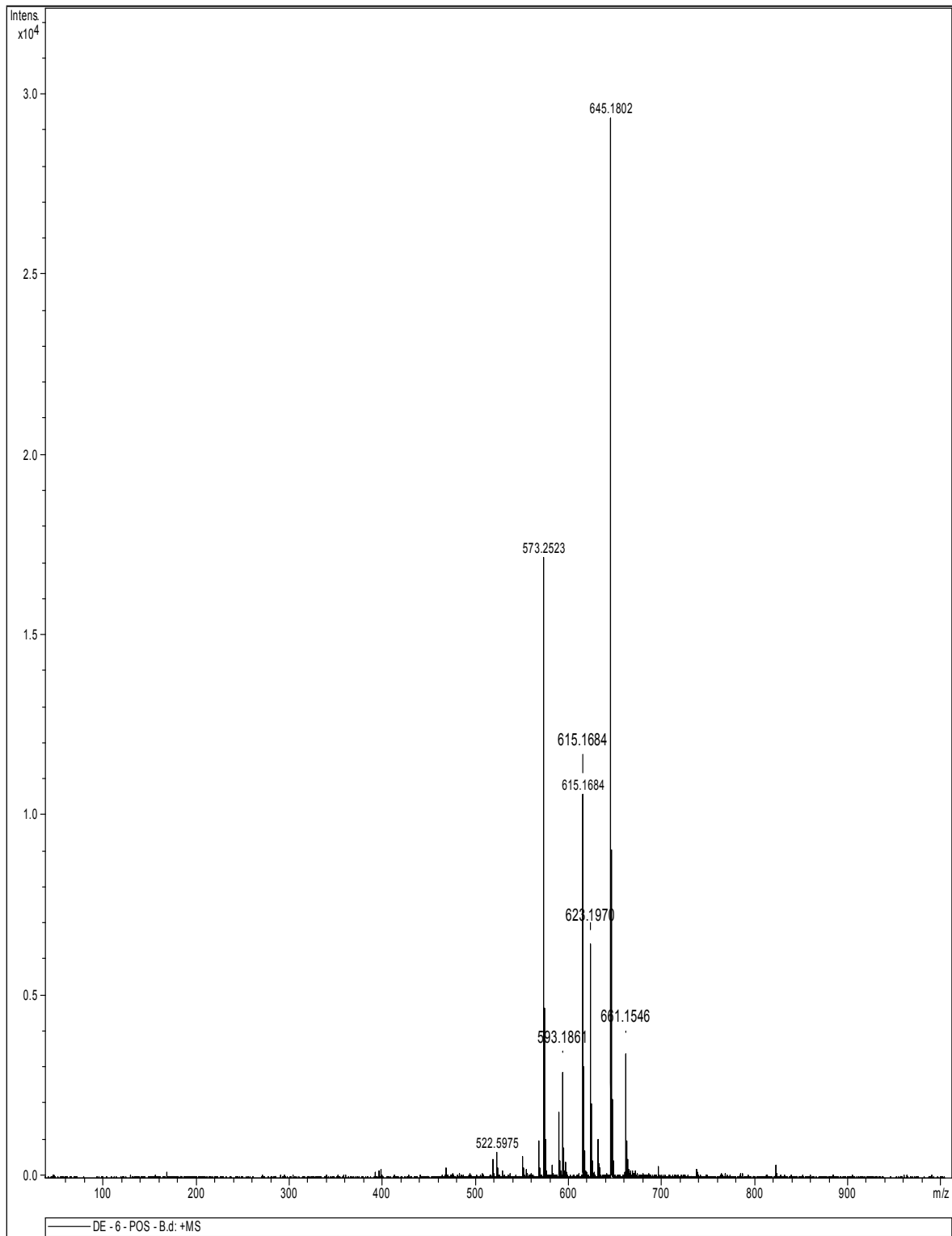
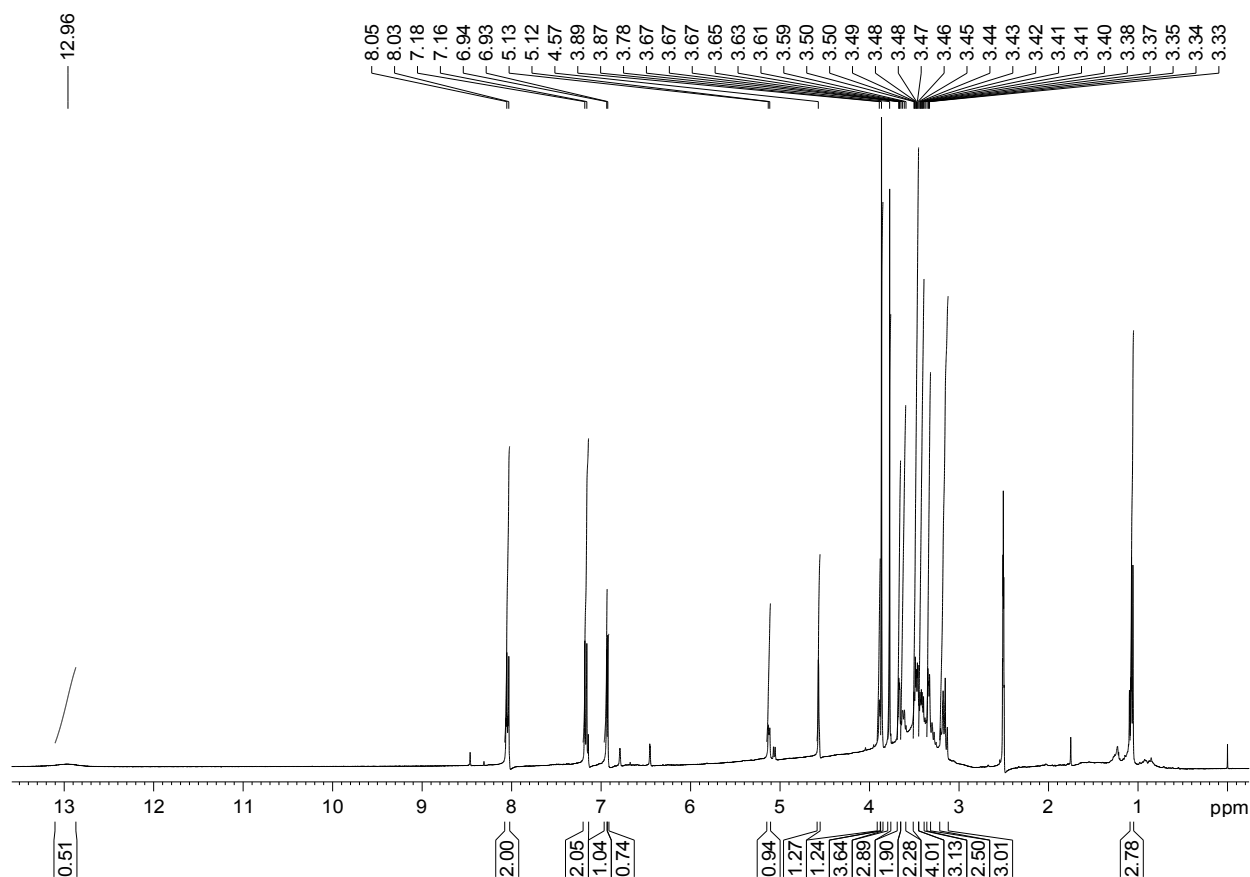


Figura 24 - Espectro de ESMS para AMF.

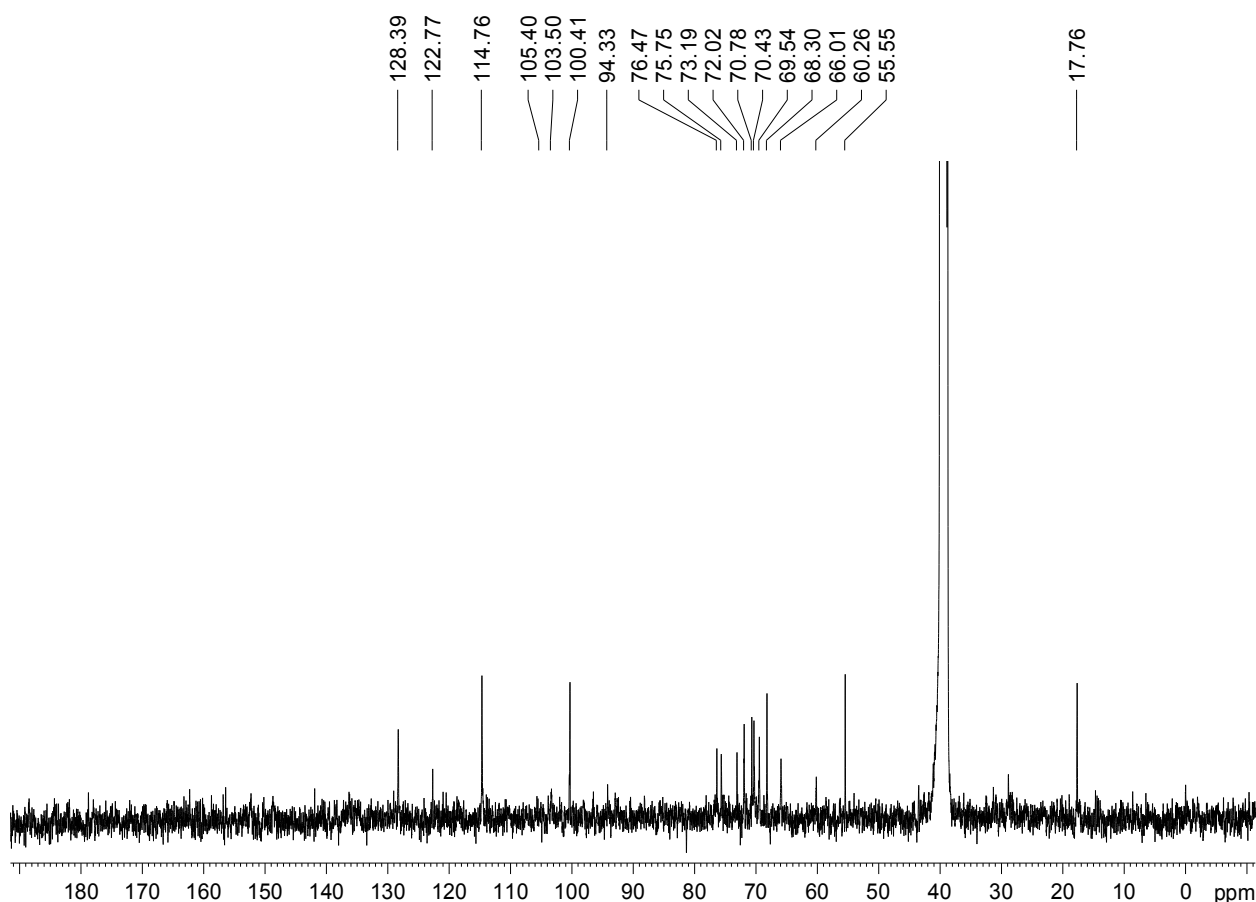
A natureza da genina e o número de unidades de açúcares de AMF foram definidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

Os singletos em  $\delta$  6,94 e 6,93 ppm foram atribuídos a H-8 e H-3, respectivamente. O duplete em  $\delta$  4,57, com  $J = 1,1$  Hz e o duplete em  $\delta$  5,12 ppm, com  $J = 4,00$  Hz, foram atribuídos a dois hidrogênios dos carbonos anoméricos. De acordo com as constantes de acoplamento para os sinais dos hidrogênios dos carbonos anoméricos dos açúcares, a configuração de D-glicose e L-ramnose foram determinadas como  $\beta$  e  $\alpha$ , respectivamente (YIM *et al.*, 2003). O duplete em 1,06 (3H,  $J = 4,0$  Hz) indicou a presença de grupo metila de ramnose. Dois singletos, com integração de 3H cada, referentes a hidrogênios de grupos metoxila em  $\delta$  3,78 e 3,87 ppm foram observados e atribuídos a 4'-OCH<sub>3</sub> e 6-OCH<sub>3</sub>, respectivamente. O sinal em  $\delta$  12,96 confirmou a presença de OH em C-5 (**Figura 25**). O espectro de  $^1\text{H}$  também mostrou um sistema AA'XX' formado por 2 dupletos: um a  $\delta$  8,04 e outro a 7,17 ppm, cada um referente a 2H, com  $J = 8,0$  Hz, que indicou que C-4' se encontrava O-substituído (anel B) (MARKHAM, 1982).



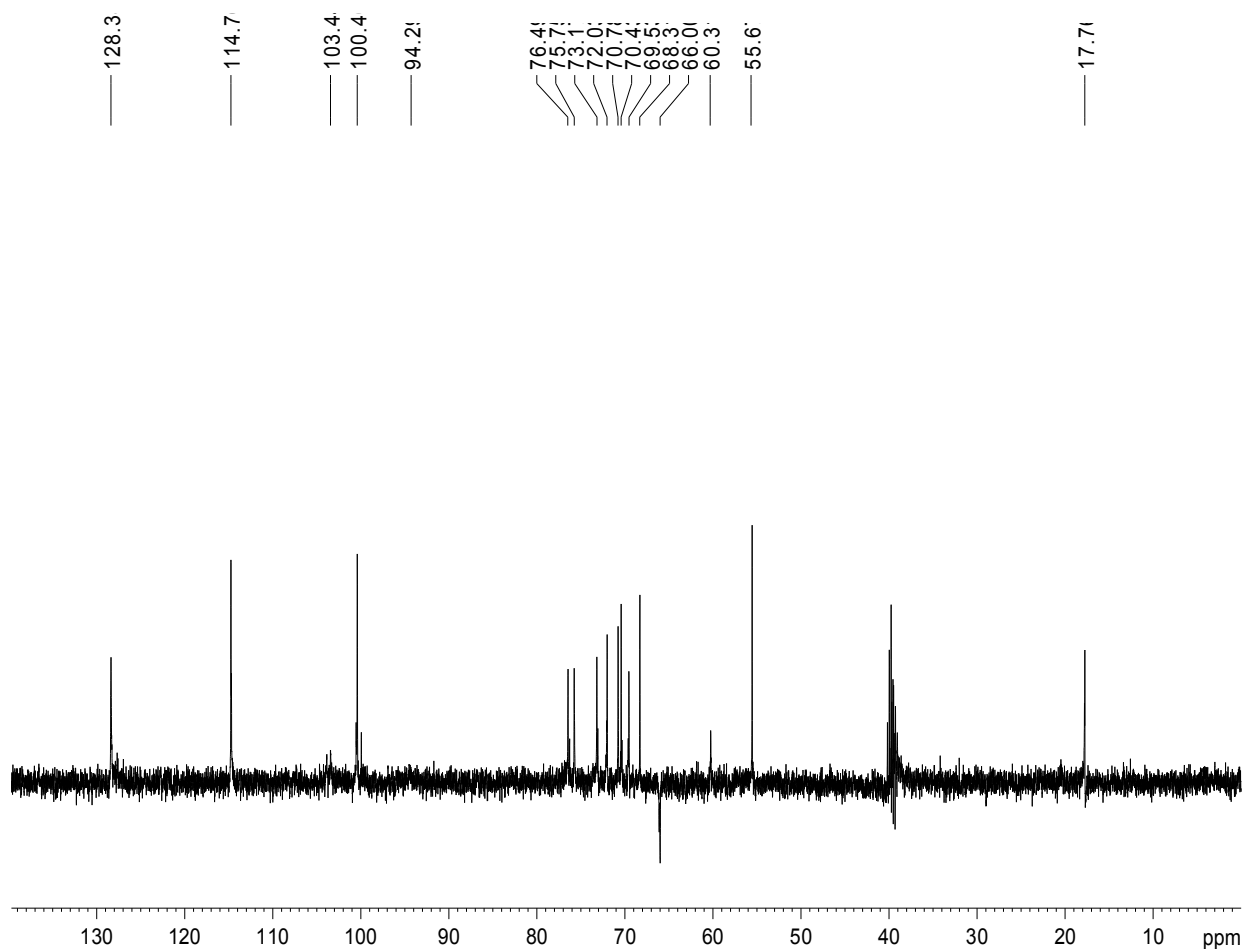
**Figura 25** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de AMF (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

O espectro de  $^{13}\text{C}$  também revelou a presença de dois sinais que indicavam a presença de grupos metoxila em  $\delta$  55,6 (4'-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta$  60,3 ppm (6-OCH<sub>3</sub>). Nove sinais apareceram na região entre  $\delta$  66,0-76,5 ppm, indicando a presença de dois açúcares: D-glicose e L-ramnose, confirmados pelos experimentos bidimensionais HMBC (**Figura 30**, pág. 106; **Figura 31**, pág. 107; e **Tabela 14**, pág. 108) e HSQC-TOCSY (**Figura 32**, pág. 109 e **Tabela 15**, pág. 110). A presença de um sinal em  $\delta$  17,8 ppm referente a carbono de grupo metila da ramnose também foi observado (**Figura 26**). O sinal em  $\delta$  66,0 ppm foi atribuído ao C-6 da glicose, o que indicou a ligação de outro açúcar, pois quando não há açúcar ligado a esse carbono, o mesmo apresenta sinal em torno de 60,0 ppm (MOCCELINI *et al.*, 2009). O DEPT confirmou que o sinal em  $\delta$  66,0 ppm era relativo a um grupo metileno (**Figura 27**, pág. 102). Portanto, o dissacarídeo se tratava do rutenosídeo:  $\beta$ -D-glicopiranosídeo (6 $\rightarrow$ 1)  $\alpha$ -L-ramnopiranosídeo. As atribuições dos carbonos quaternários, que não apareceram no espectro de  $^{13}\text{C}$ , foram feitas de acordo com o experimento HMBC (**Figura 31**, pág. 107).



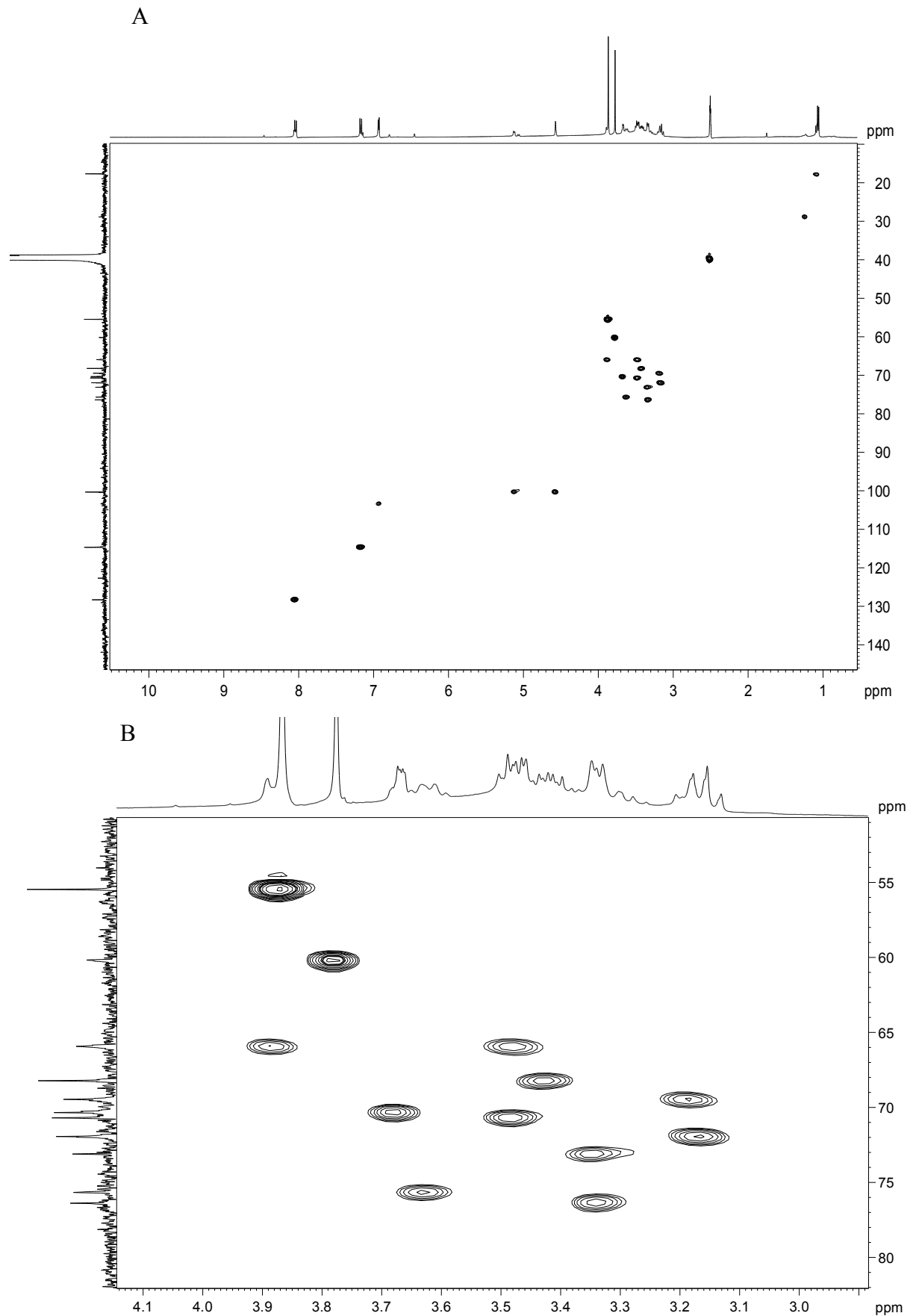
**Figura 26** – Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de AMF (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).





**Figura 27** – DEPT de AMF (100 MHz, DMSO-d6).

Através do experimento bidimensional HSQC pôde-se observar quais hidrogênios se encontravam ligados a cada carbono, estimando-se até mesmo os valores próximos dos deslocamentos químicos dos hidrogênios dos açúcares (**Figura 28**, pág. 103 e **Tabela 12**, pág. 104). O espectro COSY também auxiliou na elucidação estrutural de AMF ao apontar quais hidrogênios da molécula se encontravam diretamente acoplados (**Figura 29** e **Tabela 13**, pág. 105).



**Figura 28** – Experimento bidimensional HSQC de AMF (A), com expansão da região das absorções de açúcares (B) (3,1 a 3,9 ppm) (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).

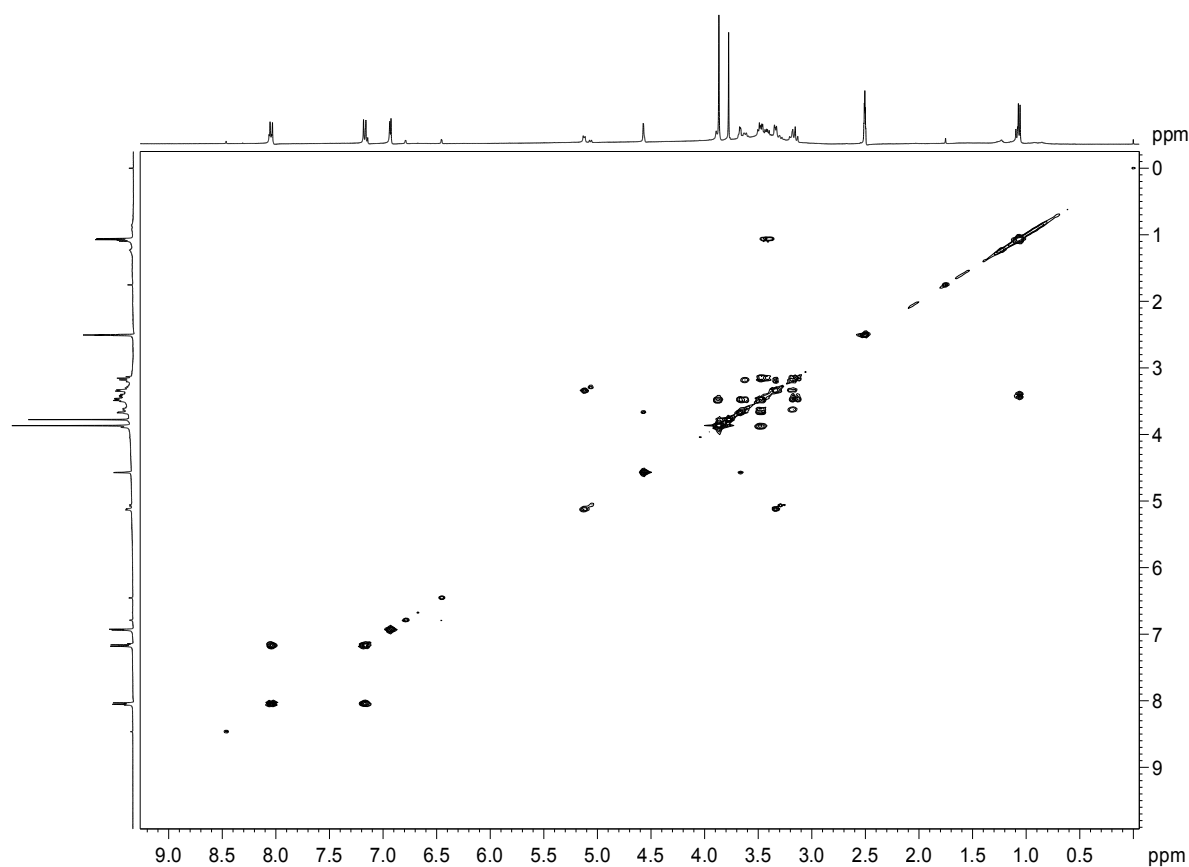
**Tabela 12** - Atribuição dos sinais dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para AMF e comparação com dados da literatura (400 MHz, 100 MHz, DMSO-d6).

Posição	Tipo C	AMF $\delta_{\text{C}}$ , ppm	AMF $\delta_{\text{H}}$ , ppm	Pectolarina $\delta_{\text{C}}$ , ppm (YIM <i>et al.</i> , 2003)
2	C	164,3	-	164,0
3	CH	103,5	6,93 (s)	103,3
4	C	182,9	-	182,3
5	C	152,7	-	152,4
6	C	133,2	-	132,6
7	C	157,3	-	156,4
8	CH	94,3	6,94 (s)	94,3
9	C	152,1	-	152,1
10	C	105,4	-	105,8
-	-	-	12,96 (s, 5-OH)	-
1'	C	122,8	-	122,6
2'	CH	128,4	8,04 (d, $J = 8,0$ Hz)	128,4
3'	CH	114,8	7,17 (d, $J = 8,0$ Hz)	114,7
4'	C	162,8	-	162,3
5'	CH	114,8	7,17 (d, $J = 8,0$ Hz)	114,7
6'	CH	128,4	8,04 (d, $J = 8,0$ Hz)	128,4
6-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	60,3	3,87 (s)	60,2
4'-OCH <sub>3</sub>	CH <sub>3</sub>	55,6	3,78 (s)	55,5
1''	CH	100,4	5,12 (d, $J = 4,0$ Hz)	100,3
2''	CH	73,2	3,33 <sup>1</sup>	73,1
3''	CH	76,5	3,35 <sup>1</sup>	76,4
4''	CH	69,5	3,18 <sup>1</sup>	69,4
5''	CH	75,8	3,63 <sup>1</sup>	75,7
6''	CH <sub>2</sub>	66,0	3,89; 3,48 (dd)	65,9
1'''	CH	100,4	4,57 (d, $J = 1,1$ Hz)	100,3
2'''	CH	70,8	3,46 <sup>1</sup>	70,7
3'''	CH	70,4	3,67 <sup>1</sup>	70,4
4'''	CH	72,0	3,16 <sup>1</sup>	71,9
5'''	CH	68,3	3,41 <sup>1</sup>	68,2
6'''	CH <sub>3</sub>	17,8	1,06 (d, $J = 4,0$ Hz)	17,7

<sup>1</sup> Deslocamentos aproximados obtidos pelo experimento HSQC.

**Tabela 13** - Principais interações homonucleares de spin-spin entre átomos de hidrogênio obtidos do espectro COSY de AMF (400 MHz, DMSO-d6).

H ( $\delta_H$ ppm)	H ( $\delta_H$ ppm)
2H-2', 6' (8,04)	H-3', 5' (7,17)
H-1'' (5,12)	H-2'' (3,33)
H-3'' (3,35)	H-4'' (3,18)
H-4'' (3,18)	H-5'' (3,63)
H-6'' (3,48)	H-6'' (3,89)
H-1''' (4,57)	H-2''' (3,46)
H-2''' (3,46)	H-3''' (3,67)
H-5''' (3,41)	H-6''' (1,06)



**Figura 29** – Experimento bidimensional COSY de AMF (400 MHz, DMSO-d6).

A posição do dissacarídeo em C-7 foi confirmada pela correlação entre o sinal de H-1 da glicose ( $\delta$  5,12 ppm) e o sinal de C-7 ( $\delta$  157,3 ppm) pelo HMBC (MABRY *et al.*, 1970 e MARKHAM, 1982).

A **Tabela 14** (pág. 108) mostra as correlações entre H e C com constantes de acoplamento  $^2J$ ,  $^3J$  e  $^4J$ . H-3 ( $\delta$  6,93 ppm) se acopla com uma constante de  $^2J$  com os carbonos 2 e 4 ( $\delta$  164,3 e 182,9 ppm); e com constante de  $^3J$  com os carbonos 10 e 1' ( $\delta$  105,4 e 122,8 ppm). H-8 ( $\delta$  6,94 ppm) teve sua atribuição confirmada pelo seu acoplamento  $^2J$  com os carbonos 7, 9 ( $\delta$  157,3, 152,9 ppm) e  $^3J$  com o carbono 6 ( $\delta$  133,2 ppm), tendo ainda  $^4J$  com C-5 ( $\delta$  152,7 ppm). H-6' e H-2' ( $\delta$  8,04 ppm) tem  $^3J$  com C-2 e C-4' ( $\delta$  164,3 e 162,8 ppm). H-3' e H-5' ( $\delta$  7, 17) mostram  $^2J$  com C-4' ( $\delta$  162,8 ppm) e  $^3J$  com C-1' ( $\delta$  122,8 ppm). A correlação entre os hidrogênios de  $-\text{OCH}_3$  ( $\delta$  3,78 ppm) com C-4 em  $\delta$  162,8 ppm e dos H de  $-\text{OCH}_3$  ( $\delta$  3,87 ppm) com C-6 em campo mais baixo,  $\delta$  133,2 ppm, definiram as localizações das metoxilas. (SILVERSTEIN *et al.*, 2007, YIM *et al.*, 2003).

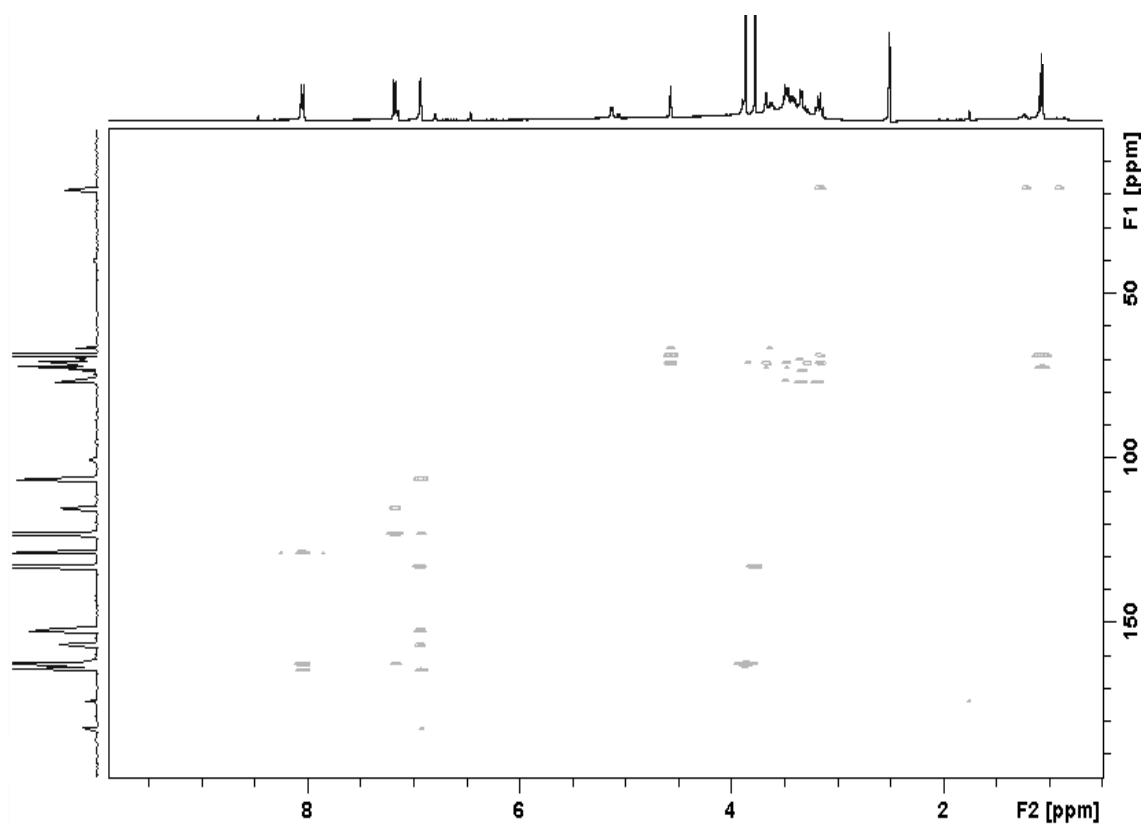
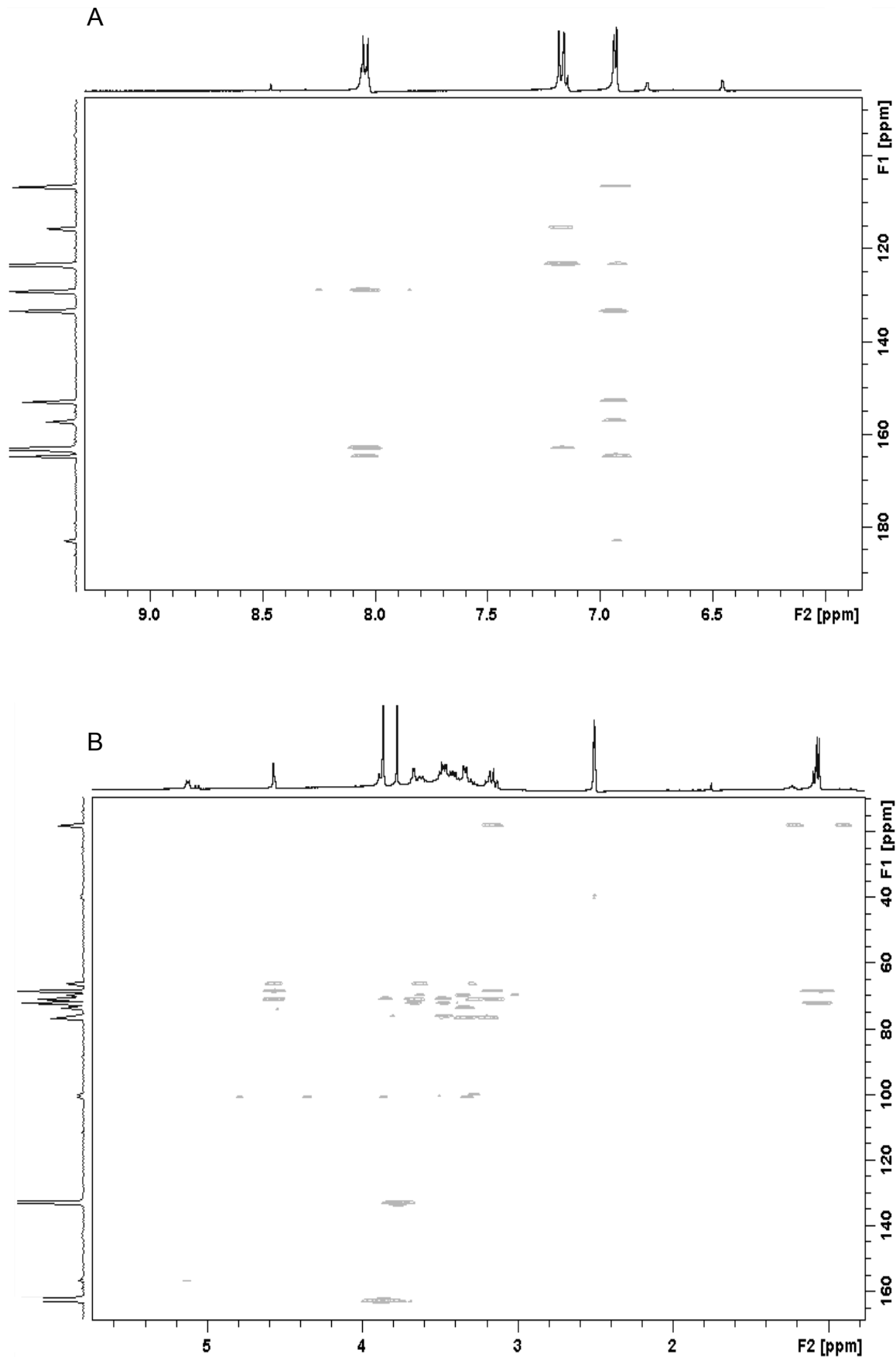


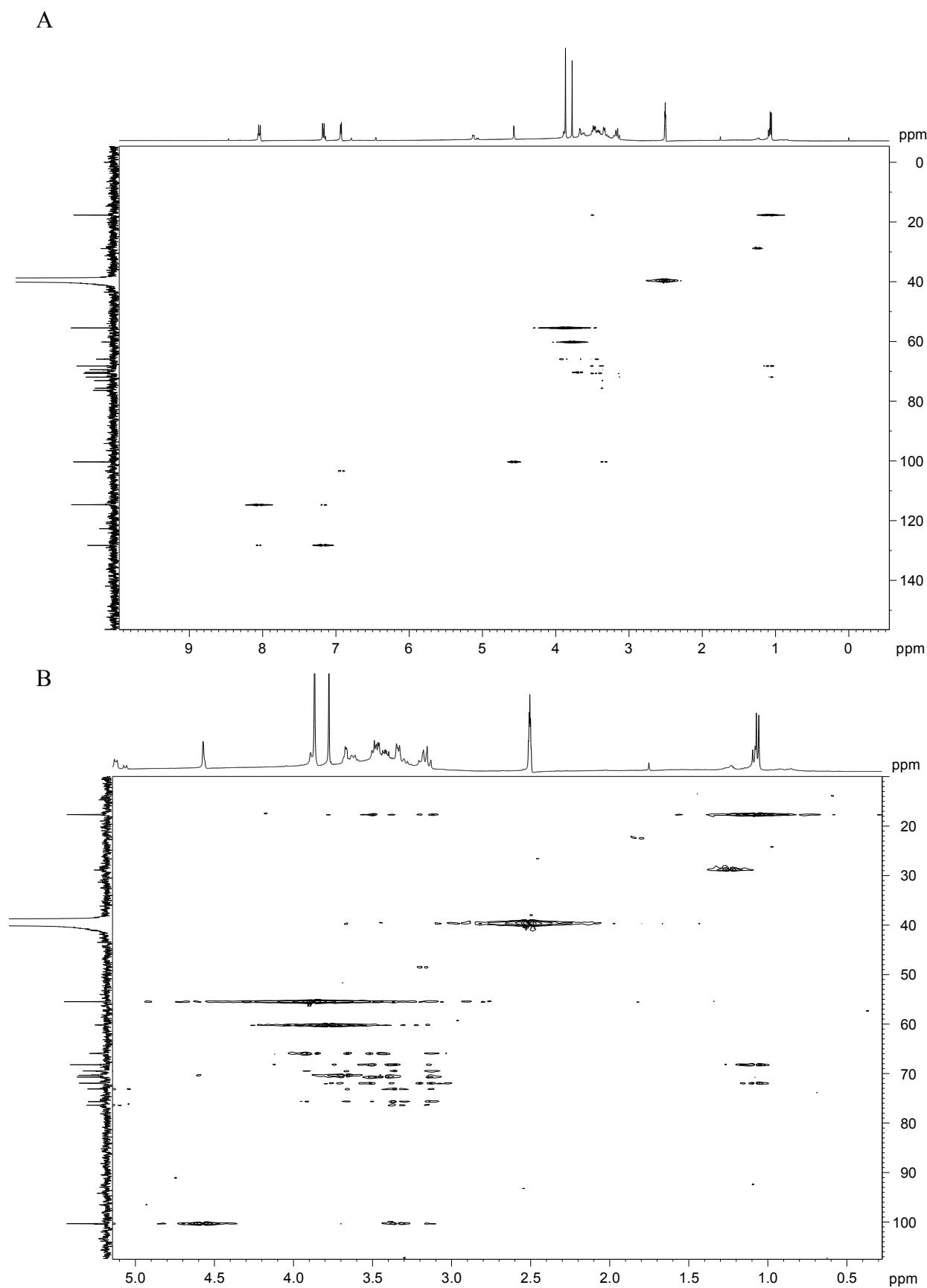
Figura 30 – Experimento bidimensional HMBC de AMF (400 MHz, DMSO-d6).



**Figura 31** – Experimento bidimensional HMBC de AMF, com expansões da região das absorções de aromáticos (6,5 a 8,5 ppm) (A) e da região das absorções de açúcares (3,1 a 3,9 ppm) (B) (400 MHz, DMSO- $d_6$ ).

**Tabela 14** - Principais interações heteronucleares de spin-spin a longa distância ( $^2J_{CH}$ ,  $^3J_{CH}$  e  $^4J_{CH}$ ) entre átomos de carbono e hidrogênio obtidas do espectro HMBC para AMF (400 MHz, DMSO-d6)

C	$\delta_c$ ppm	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$	$^4J_{CH}$
2	164,3	H-3	2H-2',6'	-
3	103,5	-	-	-
4	182,9	H-3	-	-
5	152,7	-	-	H-8
6	133,2	-	6-OCH <sub>3</sub> , H-8	-
7	157,3	H-8	1''-H	-
8	94,3	-	-	-
9	152,1	H-8	-	-
10	105,4	-	H-3	-
1'	122,8	-	H-3, 2H-3',5'	-
2'	128,4	-	-	-
3'	114,8	-	-	-
4'	162,8	2H-3',5'	4'-OCH <sub>3</sub> , 2H-2',6'	-
5'	114,8	-	-	-
6'	128,4	-	-	-
6-OCH <sub>3</sub>	60,3	-	-	-
4'-OCH <sub>3</sub>	55,6	-	-	-
1''	100,4	H-2''	-	H-6''
2''	73,2	-	-	-
3''	76,5	H-2'', H-4''	-	-
4''	69,5	H-5'', H-3''	-	-
5''	75,8	H-6''	-	H-2''
6''	66,0	H-5''	H-4'', H-1'''	-
1'''	100,4	-	2H-6''	-
2'''	70,8	H-1''', H-3'''	H-4'''	H-6''
3'''	70,4	H-2'''	-	-
4'''	72,0	H-3'''	H-2'', 3H-6''	H-1'''
5'''	68,3	H-4''', 3H-6'''	H-1''''	-
6'''	17,8	-	H-4''''	-



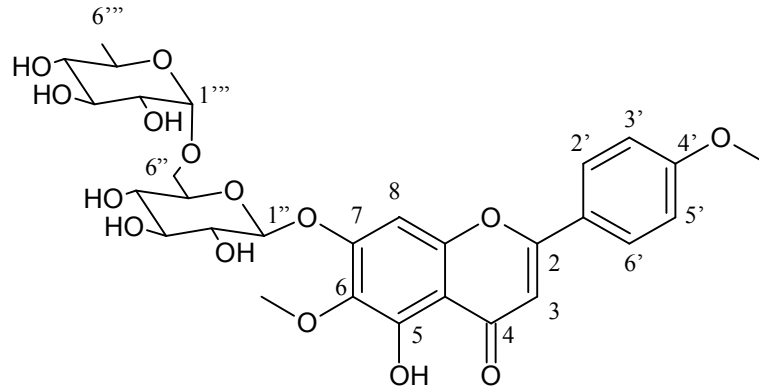
**Figura 32** – Experimento bidimensional HSQC-TOCSY de AMF (A), com expansão da região de açúcares (3,1 a 3,9 ppm) (B) (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).



**Tabela 15 - Principais interações heteronucleares spin-spin de átomos de carbono e hidrogênio dos açúcares de AMF obtidas do espectro HSQC-TOCSY (400 MHz, DMSO-d6).**

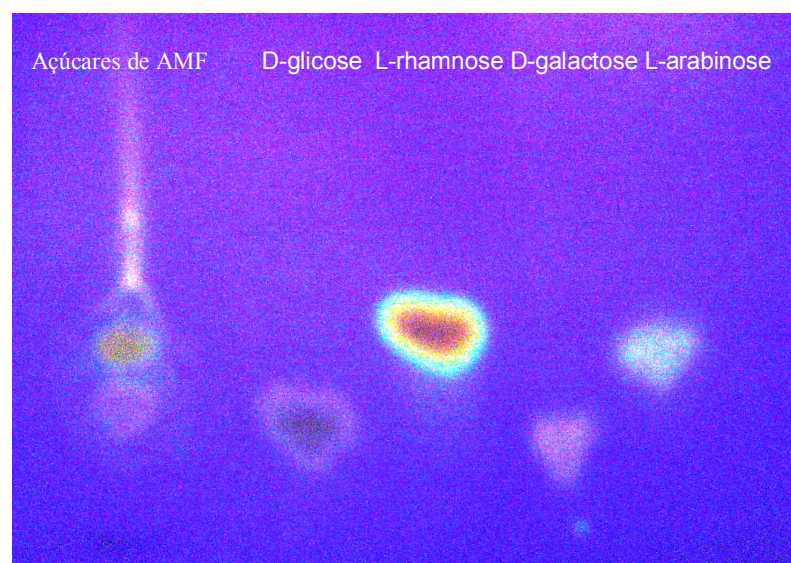
H	$\delta_H$ ppm	C ( $\delta_C$ ppm)
		C-1'' (100,4), C-2'' (73,2),
H-1''	5,12 (d, $J = 4,0$ Hz)	C-3''(76,5), C-4''(69,5)
		C-1'' (100,4), C-2'' (73,2),
H-2''	3,33	C-3''(76,5), C-4''(69,5),
H-3''	3,35	C-5''(75,8)
		C-2'' (73,2), C-3''(76,5),
H-4''	3,18	C-4''(69,5), C-5''(75,8),
		C-6'' (66,0)
		C-2'' (73,2), C-5''(75,8),
H-5''	3,63	C-6'' (66,0)
		C-4''(69,5), C-5''(75,8),
H-6''	3,89 (dd)	C-6'' (66,0)
H-6''	3,48 (dd)	C-5''(75,8), C-6'' (66,0)
H-1'''	4,57 (sl)	C-1''' (100,4), C-3''' (70,3)
H-2'''	3,46	C-2''' (70,8), C-5'''(68,3)
H-3'''	3,67	C-3''' (70,3), C-4'''(72,0)
		C-2''' (70,8), C-4'''(72,0),
H-4'''	3,16	C-5'''(68,3)
H-5'''	3,41	C-2''' (70,8), C-5'''(68,3)
3H-6'''	1,06 (d, $J = 4,0$ Hz)	C-6'''(17,8), C-4'''(72,0),
		C-5'''(68,3)

Com base em todas as informações obtidas das técnicas espectrométricas empregadas, caracterizou-se AMF como pectolinarina (YIM *et al.*, 2003). Esta é a primeira vez que se descreve a presença desta flavona numa espécie da família Bignoniaceae.



A fim de confirmar a identidade dos açúcares constituintes, realizou-se a hidrólise ácida de AMF (seção 4.2.8, pág. 70).

O cromatograma obtido para a fração aquosa da partição do hidrolisado de AMF (pectolinarina) confirmou mais uma vez a presença dos açúcares D-glicose e L-ramnose (**Figura 33**). E a genina (pectolinarigenina) liberada pela hidrólise de AMF apresentou mancha com características de uma aglicona flavonoídica, num sistema de eluente próprio para geninas de flavonoides (**Figura 34**, pág. 112).



**Figura 33** - Cromatograma obtido para os produtos de hidrólise de AMF contidos na fase aquosa em placa de gel de sílica. Condições: vide seção 4.2.8, pág. 70.



**Figura 34** - Cromatograma obtido para o produto de hidrólise de AMF contido na fase orgânica em placa de gel de sílica. Condições: vide seção 4.2.8, pág. 70.

### **5.3.2 Terpenoides**

Para o isolamento dos terpenoides presentes na fração AcOEt realizou-se novo fracionamento do extrato etanólico de folhas de *D. elongata* utilizando-se cromatografia em coluna de gel de sílica. A fração HA15 e HA50 foram recromatografadas em coluna de gel de sílica e obtiveram-se as substâncias denominadas de HAT1, HAT2, HAT3, HAT4 e HAT5 (seção 4.2.7, pág. 65).

A análise por CCD de HAT1, HAT2, HAT3, HAT4 e HAT5 revelou que as mesmas se tratavam de misturas de substâncias terpenoídicas e/ou esteroidais, apresentando manchas semelhantes às do lupeol e do  $\beta$ -sitosterol frente ao revelador Liebermann-Burchard (WAGNER *et al.*, 1984).

HAT1 e HAT4 foram obtidas em pequenas quantidades não sendo possível a realização de RMN. Para caracterização dos terpenoides presentes em HAT2, HAT3 e HAT5, foram obtidos seus espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e posterior comparação com dados da literatura.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HAT2 apresentou sinais na região de  $\delta$  0,66-1,50 ppm correspondendo a hidrogênios metílicos e metilênicos. O sinal em  $\delta$  2,37 (s) ppm

indicou a presença de hidrogênio ligado ao carbono 18, que sugere um esqueleto do tipo ursano. O sinal relativo ao hidrogênio carbinólico de C-3 apareceu em  $\delta$  3,01 (m). Pode-se observar também um sinal em  $\delta$  5,16 (sl) referente ao hidrogênio olefínico H-12. (**Figura 35**, pág. 115). Esses sinais estão de acordo com a estrutura proposta (CASTILHO *et al.*, 2001).

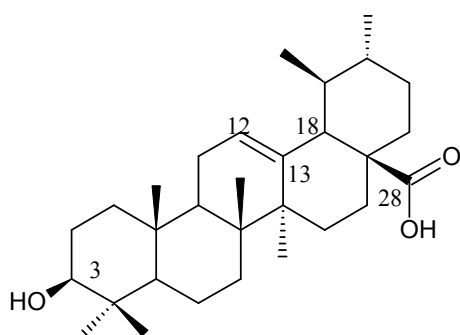
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HAT2 apresentou os deslocamentos químicos de  $\delta$  124,5 e 138,3 ppm atribuídos aos carbonos da ligação dupla em C-12 e C-13, característica de triterpenoide com esqueleto do tipo ursano e/ou oleanano. Foi observado sinal de carbono de carbonila carboxílica referente a C-28 em  $\delta$  178,4 ppm e um sinal em  $\delta$  76,8 ppm de carbono carbinólico de C-3. Diante disso, os outros sinais do espectro de HAT2 foram comparados com os da literatura, observando-se correspondência com o ácido ursólico (CASTILHO *et al.*, 2001) (**Figura 35**, pág. 115 e **Tabela 16**, pág. 116). Como outros sinais além daqueles que identificaram o ácido ursólico estavam presentes, mas em menor proporção, sugeriu-se que HAT2 se tratava de uma mistura de triterpenoides com predominância do ácido ursólico.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HAT3 apresentou os mesmos sinais descritos para o espectro de  $^1\text{H}$  de HAT2. Porém, alguns desses sinais de HAT3 se apresentaram duplicados e/ou com integração de números de hidrogênios dobrados em relação aos de HAT2 (**Figura 36**, pág. 117). Esses dados estão de acordo com a presença de dois triterpenos com esqueleto do tipo ursano em HAT3.

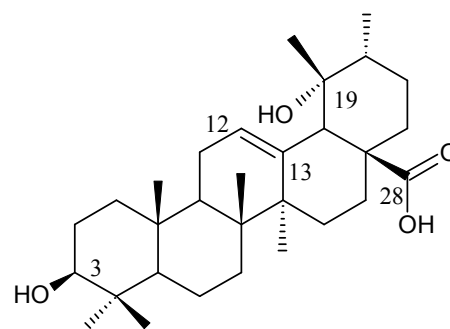
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HAT3 (**Figura 36**, pág. 117) também apresentou os deslocamentos assinalados para HAT2, porém com acréscimo de outros característicos de esqueleto do tipo ursano e/ou oleanano em proporções iguais. O que levou a concluir que o mesmo se referia a uma mistura de ácido ursólico com outro triterpenoide. Para esse foram atribuídos os sinais em  $\delta$  126,8 e 138,6 ppm referentes aos carbonos olefínicos C-12 e C-13,  $\delta$  178,95 a C-28 e mais dois referentes a carbonos carbinólicos: um em  $\delta$  76,82 ppm (C-3) e outro em  $\delta$  71,63 (C-19). Os outros sinais presentes no espectro, além daqueles do ácido ursólico, identificaram o ácido pomólico (**Tabela 17**, pág. 118) (CASTILHO *et al.*, 2001).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de HAT5 apresentou os mesmos sinais relatados para o espectro de  $^1\text{H}$  de HAT3. Porém, esse espectro se apresentou com maior número de sinais em relação a HAT3, sugerindo que essa fração se tratava de uma mistura mais complexa, com a presença de mais de dois triterpenos com esqueleto do tipo ursano (**Figura 37**, pág. 119) (CASTILHO *et al.*, 2001).

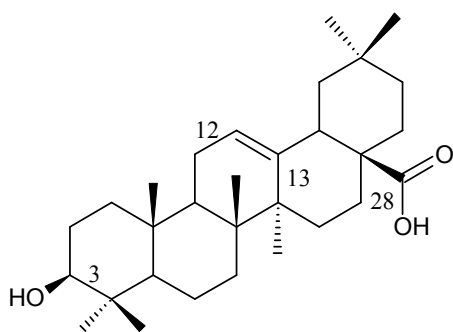
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de HAT5 (**Figura 37**, pág. 119) também apresentou os deslocamentos assinalados para HAT3, porém com acréscimo de outros com características de esqueleto do tipo ursano e/ou oleanano em proporções iguais. Isso levou a concluir que o mesmo se referia a uma mistura de ácido ursólico, com ácido pomólico, acrescidos de outro triterpenoide. Para esse foram atribuídos os sinais em  $\delta$  122,6 e 143,4 ppm para os carbonos olefínicos C-12 e C-13,  $\delta$  179,15 ppm para o carbono da carbonila carboxílica referente a C-28 e um carbono carbinólico em  $\delta$  80,14 ppm referente a C-3. Os outros sinais presentes no espectro, além daqueles do ácido ursólico e do ácido pomólico, identificaram o ácido oleanólico (**Figura 37**, pág. 119 e **Tabela 18**, pág. 120).



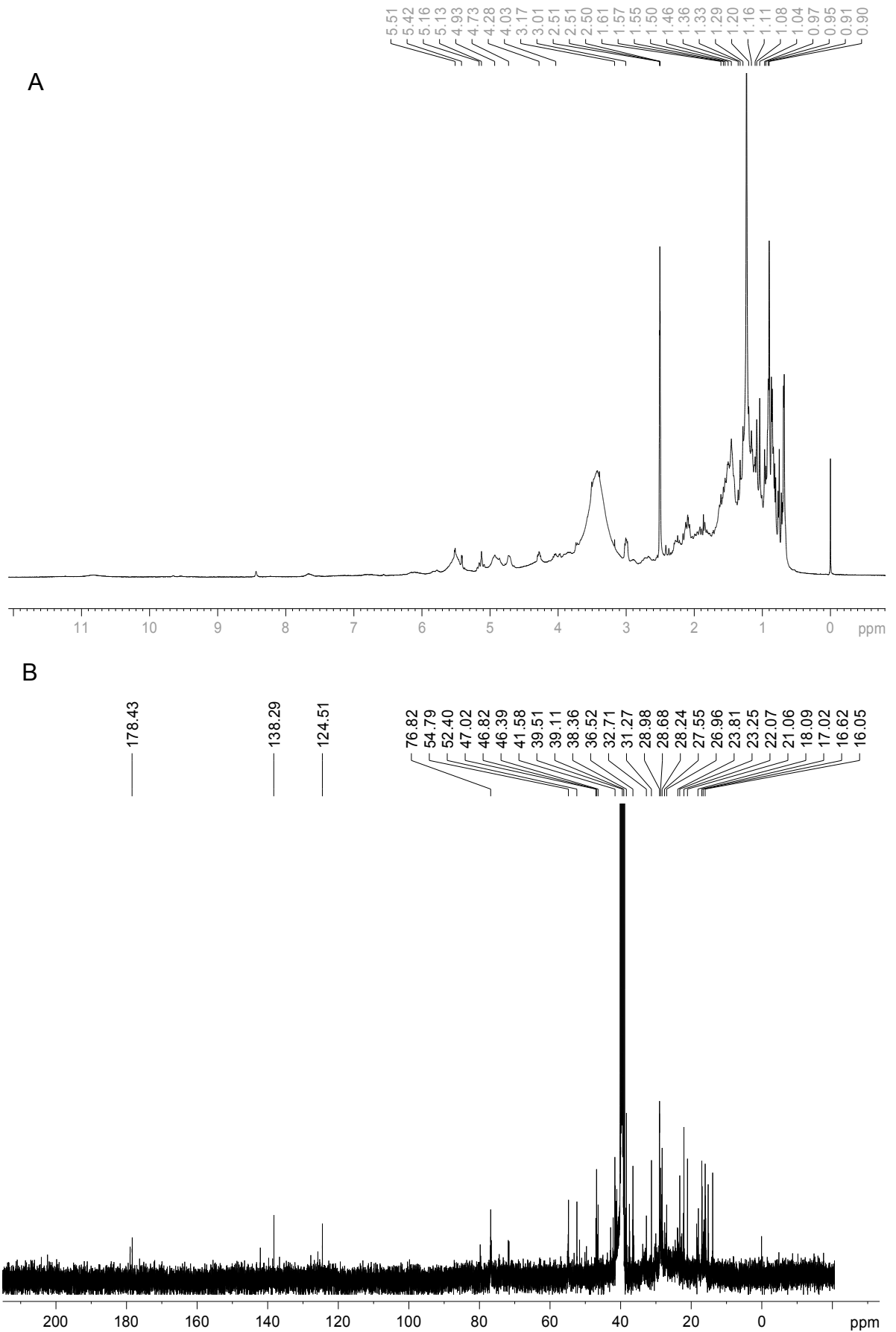
Ácido ursólico



Ácido pomólico



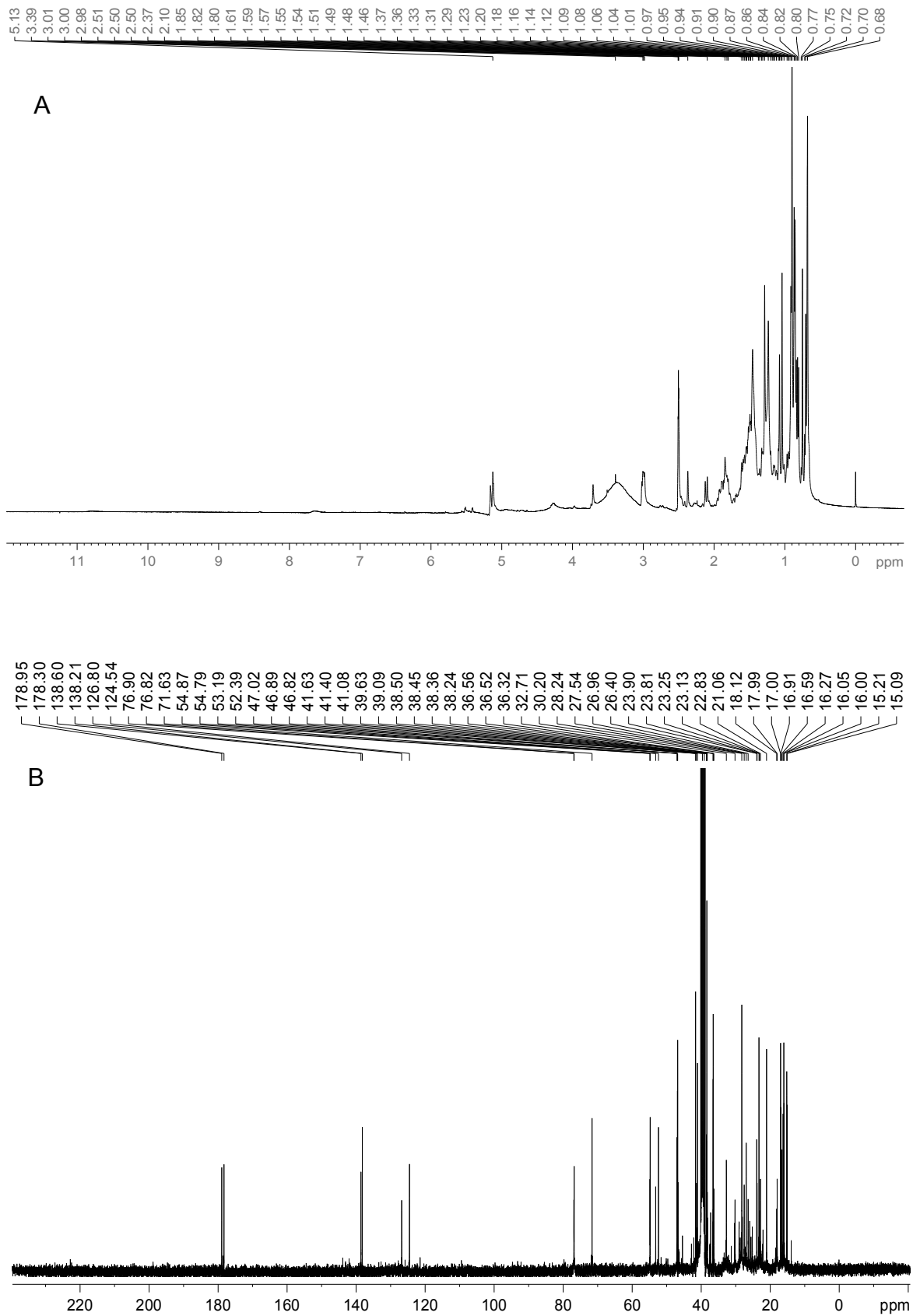
Ácido oleanólico



**Figura 35 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (A) e de  $^{13}\text{C}$  (B) de HAT2 (400 MHz, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).**

**Tabela 16** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido ursólico (Castilho, 2001; Mahato e Kundu, 1994) e da fração HAT2 (100 MHz, DMSO-d6)

C		Ácido ursólico	HAT2
		Literatura ( $\delta_{\text{C}}$ , ppm)	( $\delta_{\text{C}}$ , ppm)
1	CH <sub>2</sub>	38,8	38,4
2	CH <sub>2</sub>	27,3	27,0
3	CH	77,2	76,8
4	C	38,8	38,4
5	CH	55,2	54,8
6	CH <sub>2</sub>	18,4	18,1
7	CH <sub>2</sub>	33,3	32,7
8	C	39,6	39,5
9	CH	46,6	46,8
10	C	36,7	36,5
11	CH <sub>2</sub>	23,3	23,2
12	CH	124,6	124,5
13	C	138,1	138,3
14	C	41,3	41,6
15	CH <sub>2</sub>	28,2	28,2
16	CH <sub>2</sub>	24,3	24,6
17	C	48,1	47,0
18	CH	52,3	52,4
19	CH	39,1	39,1
20	CH	38,7	38,4
21	CH <sub>2</sub>	30,7	31,3
22	CH <sub>2</sub>	36,7	36,5
23	CH <sub>3</sub>	28,2	28,2
24	CH <sub>3</sub>	15,8	16,0
25	CH <sub>3</sub>	15,9	16,0
26	CH <sub>3</sub>	16,6	16,6
27	CH <sub>3</sub>	23,6	23,8
28	C	177,7	178,4
29	CH <sub>3</sub>	17,0	17,0
30	CH <sub>3</sub>	21,0	21,1

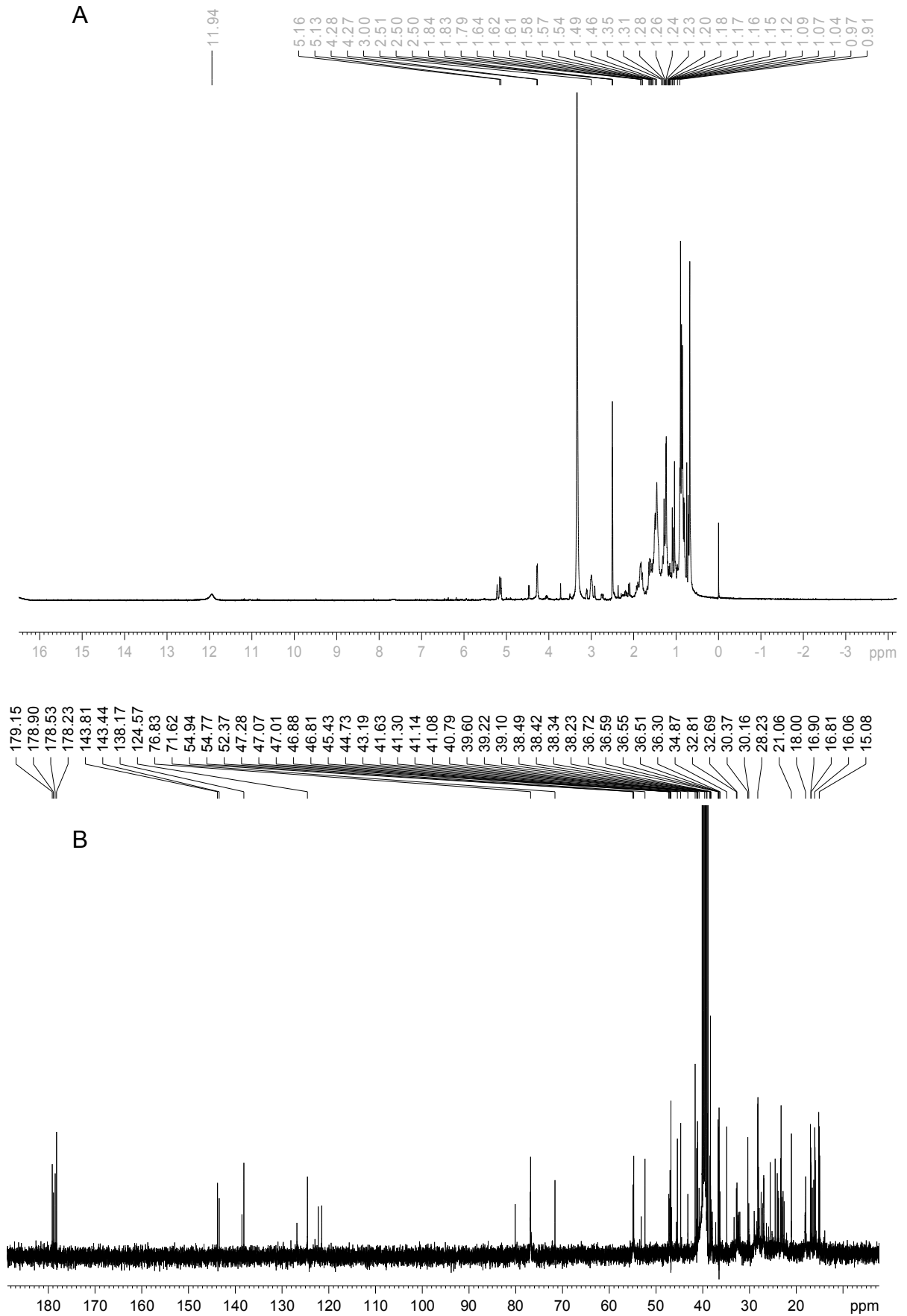


**Figura 36 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (A) e de  $^{13}\text{C}$  (B) de HAT3 (400 MHz, 100 MHz, DMSO- $d_6$ ).**



**Tabela 17 - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido ursólico e ácido pomólico (Castilho, 2001; Mahato e Kundu, 1994) e da fração HAT3 (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)**

C		Literatura ( $\delta_c$ , ppm)		HAT3 ( $\delta_c$ , ppm)	
		Ácido ursólico	Ácido pomólico	Ácido ursólico	Ácido pomólico
1	CH <sub>2</sub>	38,8	38,2	38,4	38,2
2	CH <sub>2</sub>	27,3	28,1	27,5	28,2
3	CH	77,2	76,8	76,9	76,8
4	C	38,8	40,7	38,5	41,1
5	CH	55,2	54,8	54,9	54,8
6	CH <sub>2</sub>	18,4	18,0	18,0	18,1
7	CH <sub>2</sub>	33,3	32,6	32,7	32,7
8	C	39,6	40,7	39,6	41,1
9	CH	46,6	46,8	46,9	46,8
10	C	36,7	36,5	36,5	36,3
11	CH <sub>2</sub>	23,3	23,0	23,2	23,1
12	CH	124,6	126,7	124,5	126,8
13	C	138,1	138,5	138,2	138,6
14	C	41,3	41,3	41,4	41,4
15	CH <sub>2</sub>	28,2	28,1	28,2	28,2
16	CH <sub>2</sub>	24,3	25,8	23,9	26,4
17	C	48,1	46,8	47,0	46,8
18	CH	52,3	53,1	52,4	53,2
19	CH	39,1		39,1	
	C		71,6		71,6
20	CH	38,7	41,5	38,4	41,6
21	CH <sub>2</sub>	30,7	26,3	30,2	30,0
22	CH <sub>2</sub>	36,7	37,1	36,6	36,6
23	CH <sub>3</sub>	28,2	28,1	28,2	28,2
24	CH <sub>3</sub>	15,8	16,1	16,0	16,3
25	CH <sub>3</sub>	15,9	15,0	16,0	15,1
26	CH <sub>3</sub>	16,6	16,5	16,9	16,6
27	CH <sub>3</sub>	23,6	26,9	23,8	27,0
28	C	177,7	178,7	178,3	179,0
29	CH <sub>3</sub>	17,0	26,9	17,0	27,0
30	CH <sub>3</sub>	21,0	15,9	21,1	16,1



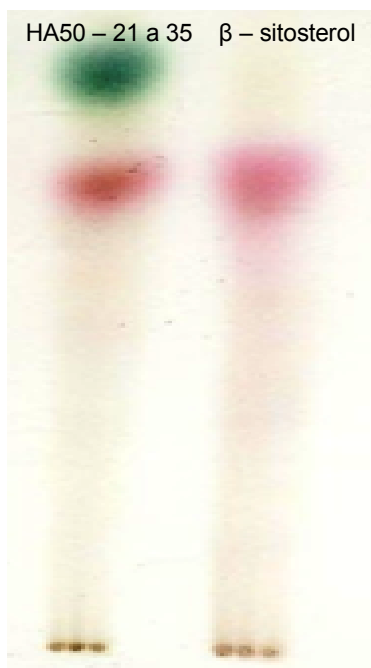
**Figura 37 – Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  (A) e de  $^{13}\text{C}$  (B) de HAT5 (400 MHz, 100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>).**

**Tabela 18** - Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  do ácido ursólico, ácido pomólico e ácido oleanólico (Castilho, 2001; Mahato e Kundu, 1994) e da fração HAT5 (100 MHz, DMSO-d6)

C		Literatura ( $\delta_c$ , ppm)			HAT5 ( $\delta_H$ , ppm)		
		Ácido ursólico	Ácido pomólico	Ácido oleanólico	Ácido ursólico	Ácido pomólico	Ácido oleanólico
1	CH <sub>2</sub>	38,8	38,2	38,5	38,4	38,3	38,5
2	CH <sub>2</sub>	27,3	28,1	27,4	27,5	28,1	27,0
3	CH	77,2	76,8	78,9	76,8	76,8	80,1
4	C	38,8	40,7	38,6	38,5	41,1	38,4
5	CH	55,2	54,8	55,1	54,9	54,8	54,9
6	CH <sub>2</sub>	18,4	18,0	18,2	18,0	18,0	18,0
7	CH <sub>2</sub>	33,3	32,6	32,5	32,7	32,7	32,7
8	C	39,6	40,7	39,2	39,6	41,1	39,2
9	CH	46,6	46,8	47,5	46,9	48,8	47,3
10	C	36,7	36,5	36,9	36,5	36,3	36,7
11	CH <sub>2</sub>	23,3	23,0	22,8	23,1	23,1	22,6
12	CH	124,6	126,7	122,4	124,6	126,8	122,3
13	C	138,1	138,5	143,4	138,2	138,6	143,4
14	C	41,3	41,3	41,5	41,3	41,6	41,1
15	CH <sub>2</sub>	28,2	28,1	27,6	28,2	28,1	27,5
16	CH <sub>2</sub>	24,3	25,8	23,3	23,9	26,4	23,1
17	C	48,1	46,8	46,6	47,0	46,8	46,9
18	CH	52,3	53,1	44,9	52,4	53,2	44,7
19	CH	39,1			39,1		
	C		71,6			71,6	
	CH <sub>2</sub>			45,8			45,4
20	CH	38,7	41,5		38,6	41,6	
	C			30,5			30,4
21	CH <sub>2</sub>	30,7	26,3	33,7	30,4	26,40	33,7
22	CH <sub>2</sub>	36,7	37,1	32,3	36,3	36,6	32,3
23	CH <sub>3</sub>	28,2	28,1	27,9	28,1	28,1	27,9
24	CH <sub>3</sub>	15,8	16,1	15,4	16,1	16,3	15,2
25	CH <sub>3</sub>	15,9	15,0	15,2	16,0	15,1	15,2
26	CH <sub>3</sub>	16,6	16,5	16,9	16,9	16,8	16,9
27	CH <sub>3</sub>	23,6	26,9	25,8	23,8	27,0	26,0
28	C	177,7	178,7	183,0	178,2	178,9	179,2
29	CH <sub>3</sub>	17,0	26,9	32,9	16,9	27,0	32,8
30	CH <sub>3</sub>	21,0	15,9	23,4	21,1	16,0	23,4

### Identificação do $\beta$ – sitosterol

A análise por CCD da fração HA50 – 21 a 35, eluída com Hex:AcOEt (70:30), revelou a presença do esteroide  $\beta$ -sitosterol. Isso pôde ser observado pela mancha caracteristicamente similar àquela do padrão frente ao revelador Liebermann-Burchard, além de Rf idêntico ao da substância de referência quando ambos foram eluídos nas mesmas condições cromatográficas (**Figura 38**) (WAGNER *et al.*, 1984).



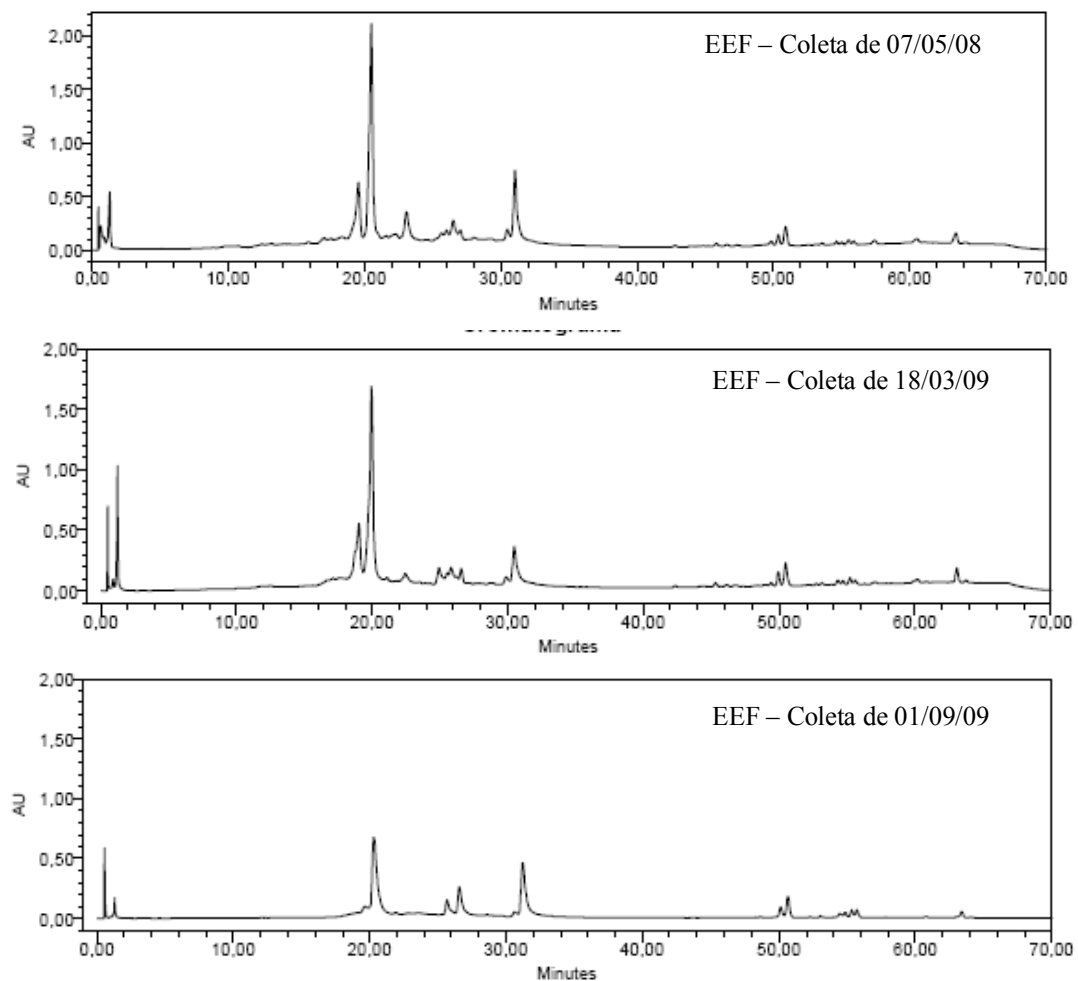
**Figura 38** - Cromatograma da fração HA50-21 a 35 e do padrão de  $\beta$ -sitosterol. Condições: vide seção 4.2.4 – j, pág. 63.

### 5.3.3 Variação na produção dos metabólitos secundários de *D. elongata* em diferentes épocas de coleta

A **Figura 39** (pág. 122) mostra os perfis cromatográficos por CLAE-FR dos extratos etanólicos das folhas de *D. elongata* coletadas em diferentes épocas. Os TRs e os espectros de UV obtidos *on line* para os picos com maiores áreas nos cromatogramas das duas primeiras coletas não apresentam diferenças significativas, e, portanto, os metabólitos secundários responsáveis pelos mesmos estão presentes em ambas as amostras. Quando se analisam as áreas relativas desses picos, observa-se que essas são menores no cromatograma da segunda coleta.

Já o extrato obtido do material vegetal da terceira coleta apresentou maiores variações em relação àqueles das duas primeiras coletas. A área do pico com TR 30,5 min. no EEF da 3ª coleta foi inferior à da primeira e superior à da segunda. As áreas

dos picos com TR compreendidos entre 19,6 e 23,1 min. da 3ª coleta foram as mais baixas obtidas, sendo que algumas das substâncias desse grupo antes detectadas nas duas primeiras coletas, não foram detectadas para essa. Em contrapartida, alguns dos flavonoides 3',4'-di-hidroxilados (TR 25,7 e 26,6 min) apresentaram picos com maiores áreas no cromatograma do material dessa última coleta. Os metabólitos com maiores TR (acima de 50,0 min) foram os que se apresentaram mais homogêneos entre os EEF das três coletas.



**Figura 39** - Perfis cromatográficos do extrato etanólico de folhas *D. elongata* em diferentes épocas de coleta. Condições cromatográficas vide item 4.2.5, pág. 63.

#### 5.4 Atividade antiviral

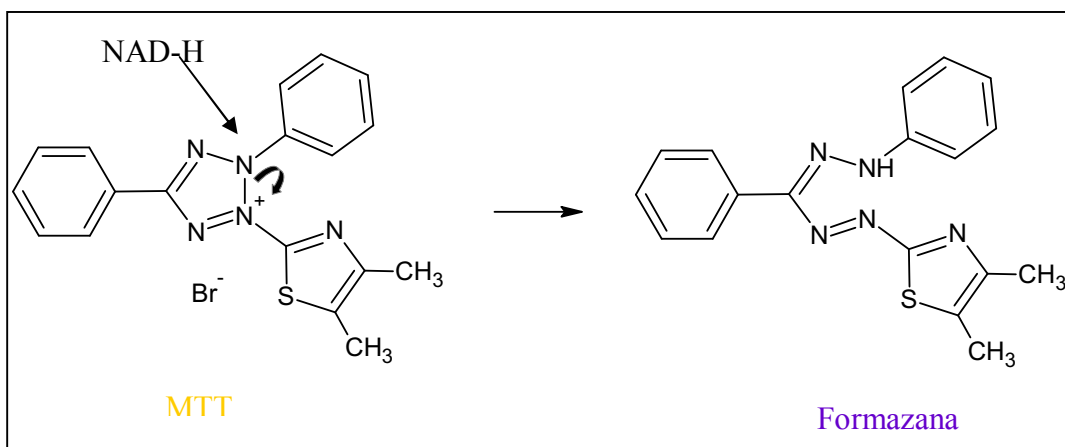
Os ensaios de atividade antiviral foram realizados pelo doutorando Geraldo Célio Brandão, no laboratório de Virologia do ICB – UFMG, sob orientação da Professora Erna G. Kroon.

Estes ensaios direcionaram a parte fitoquímica do trabalho, nas tentativas de se isolarem substâncias presentes no(s) extrato(s) e/ou frações ativos.

Os primeiros extratos obtidos por maceração, para o caule e para as folhas de *D.elongata*, tiveram suas atividades antiviral frente aos vírus HSV-1, VACV-WR e EMC e citotóxica, avaliadas pelas técnicas de microscopia e do MTT.

Para os testes contra HSV-1, a análise microscópica das cavidades da microplaca tratadas com suspensão desse vírus e de macerado de folhas nas concentrações maiores ou iguais a 200 µg/mL revelou a presença de um tapete de células contínuo; comparável às cavidades do controle de células (cavidades sem acréscimo de vírus ou amostras). As cavidades infectadas com HSV-1 e tratadas com suspensão de macerado de folhas a concentrações iguais ou inferiores a 150 µg/mL não apresentou o mesmo aspecto, pois já não havia mais quantidade expressiva de células.

O MTT possui cor amarela, mas quando o mesmo é reduzido, há a formação de formazana, de cor roxa, que sofre absorção a  $\lambda$  492 nm (**Figura 40**). As células que permanecem viáveis mantêm a atividade de suas desidrogenases e tendem a provocar a redução do MTT à formazana (TWENTYMAN *et al.*, 1987). Portanto, quanto maior a absorbância nos poços de células a  $\lambda$  492 nm, maior a concentração de formazana nos mesmos e, maior a probabilidade de as células neles contidas não terem sofrido efeito citopático.



**Figura 40 - Formação da formazana a partir do MTT.**

As  $DO_{492}$  observadas para o controle de vírus e para o controle de vírus + DMSO foram similares, indicando que o solvente não exerceu qualquer efeito sobre a atividade viral. Esse também não exerceu influência sobre as células e/ou sobre a atividade redutora de suas enzimas, como observado pela comparação das  $DO_{492}$  do controle de células e do controle de células + DMSO.

Por meio de regressão linear chegou-se a  $CE_{50}$  para o extrato etanólico de folhas de *D. elongata*:  $142,8 \pm 5,3 \mu\text{g/mL}$ .

A atividade citotóxica foi analisada comparando-se as  $DO_{492}$  médias das células tratadas apenas com EEF com aquelas do controle de células (sem qualquer tratamento). Dessa forma, a  $CC_{50}$  para EEF, obtida por regressão linear, foi de  $310,0 \pm 8,1 \mu\text{g/mL}$ . O índice de seletividade ( $CC_{50}/CE_{50}$ ) para EEF foi igual a 2,2.

Segundo Vlietinck e colaboradores (1995) extratos vegetais que protegem as células do efeito citopático de uma suspensão viral com título  $TCID_{50} > 10^3$  são relevantes na busca de antivirais. Esse foi o caso do EEF de *D. elongata*, que apresentou efeito protetor contra uma suspensão do vírus HSV-1 com título  $2,5 \times 10^5$   $TCID_{100}$ .

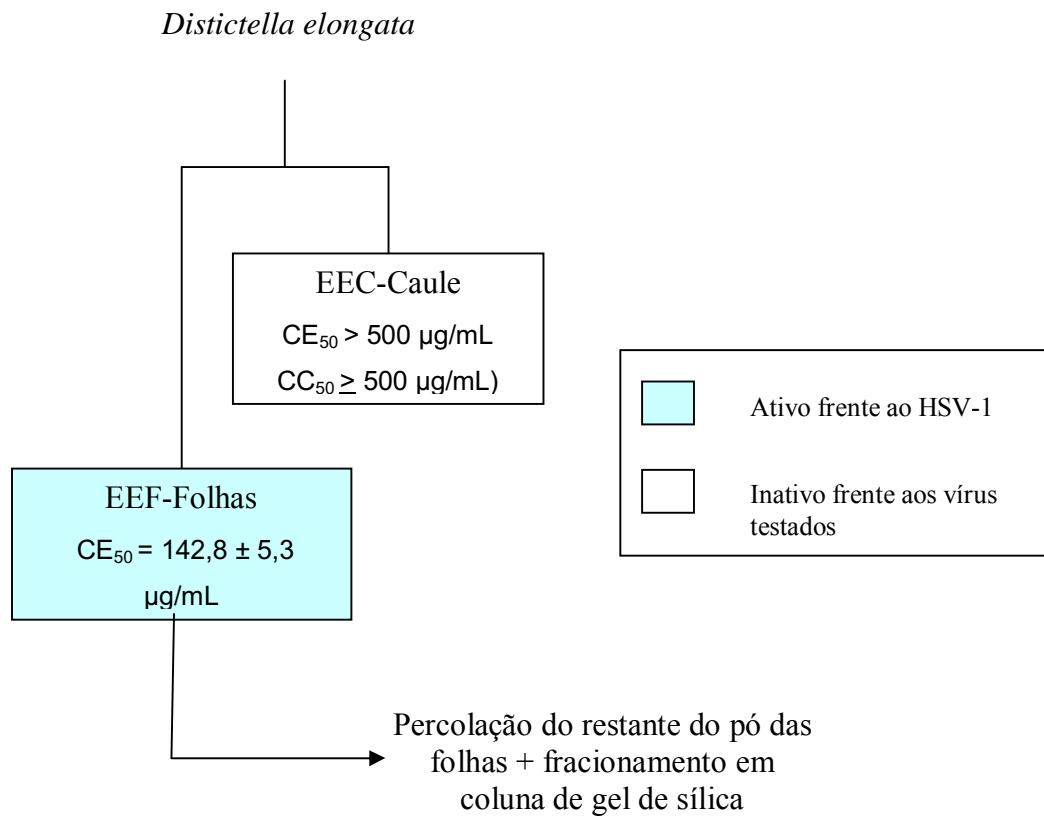
De acordo com Cos e colaboradores (2006), uma atividade antiviral é relevante quando a amostra testada apresenta  $CE_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$  ou  $IS \geq 2$ . Logo, EEF de *D. elongata* apresentou atividade antiviral moderada frente ao HSV-1.

Todas as cavidades tratadas com a suspensão de HSV-1 e com macerado de caule (EEC), independentemente da concentração, apresentaram apenas alguns grupos de células, células isoladas e muitos espaços vazios, comparáveis às cavidades do controle negativo (controle de vírus). Pela técnica do MTT, observou-se que todas as cavidades tratadas com EEC apresentaram  $DO_{492}$  semelhantes ao do controle negativo. Logo, EEC não apresentou atividade protetora de células frente ao HSV-1.

A  $CC_{50}$  para o EEC, obtida pela técnica do MTT, também não foi relevante, visto que foi superior a concentração máxima dessa amostra empregada no teste ( $500 \mu\text{g/mL}$ ).

Frente aos vírus EMC e VACV-WR, não foi observado qualquer efeito antiviral, tanto para tratamento com macerado de folhas quanto para tratamento com macerado de caule, mesmo em suas concentrações máximas avaliadas ( $500 \mu\text{g/mL}$ ).

Uma vez que só foi observada atividade antiviral relevante para o macerado de folhas, decidiu-se realizar o estudo fitoquímico biomonitorado com as folhas de *D. elongata* (**Figura 41**).



**Figura 41** – Esquema do estudo fitoquímico biomonitorado pela atividade antiviral de extratos de *D. elongata*.

O EEF, obtido por percolação, foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica de gel de sílica (item 4.2.3; pág. 58), com o objetivo de se fazer uma separação preliminar das substâncias presentes. Foram obtidas nove frações que foram avaliadas nos ensaios antivirais. Com isso, buscou-se o direcionamento de quais substâncias presentes no EEF seriam responsáveis pela atividade antiviral do mesmo.

Das nove frações obtidas, apenas duas apresentaram atividade antiviral pelas técnicas de microscopia e do MTT, avaliadas como descrito para EEF e EEC. A fração AcOEt:MeOH foi ativa frente ao vírus HSV-1, apresentando CE<sub>50</sub> igual a 147,6 ± 3,3 µg/mL e CC<sub>50</sub> ≥ 500 µg/mL. Logo, seu IS foi superior a 3,4. A fração AcOEt também



foi ativa frente a esse vírus, com  $CE_{50}$  igual a  $164,4 \pm 5,7 \mu\text{g/mL}$  e  $CC_{50} \geq 500 \mu\text{g/mL}$ . Seu IS foi superior a 3,0.

Essas frações apresentaram  $CE_{50}$  ligeiramente mais altas que aquela apresentada pelo EEF. Isso poderia ser explicado por algumas argumentações: diluição de substâncias ativas entre essas frações, separação de substâncias que agiriam de forma sinérgica na inibição do vírus ou aumento da concentração de substâncias nessas frações que inibem a atividade antiviral daquelas que são ativas (CUNHA *et al.*, 2006; KAUFMAN *et al.*, 1998, VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

A prospecção fitoquímica da fração AcOEt revelou que essa era composta de flavonoides e terpenoides/esteroides. Já a fração AcOEt:MeOH possuía como componentes flavonoides e outros fenóis (seção 5.2.1, pág. 89). A análise por CLAE-FR mostrou que essas duas frações apresentavam em comum o flavonoide com TR de aproximadamente 31,0 min. (seção 5.2.2, pág. 91). Esse resultado sugeriu que esse flavonoide poderia ser o responsável ou, uma das substâncias responsáveis pela atividade anti-HSV-1 de EEF. Diante disso, e aliado ao fato de que há muitos registros na literatura sobre a atividade antiviral de flavonoides, direcionou-se o trabalho para o isolamento dessa substância (CHOI *et al.*, 2009; LI *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2008).

A fração AcOEt apresentou ainda uma  $CE_{50}$  igual a  $36,6 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ , com IS > 13,7, frente ao vírus EMC. O EEF não apresentou atividade contra esse vírus, indicando que através de seu fracionamento houve aumento da concentração de substância(s) ativa(s) na fração AcOEt ou a separação dessa(s) de outra(s) que, antes do fracionamento inibiam sua ação frente ao EMC. A fração AcOEt:MeOH não foi ativa contra esse vírus. Isso indicou que terpenoide(s)/esteroide(s) presentes na fração AcOEt poderiam ser os responsáveis ou co-responsáveis pela ação anti-EMC da fração AcOEt. Isso pôde ser afirmado por serem essas substâncias a principal diferença fitoquímica entre as frações AcOEt e AcOEt:MeOH obtida pela prospecção fitoquímica em CCD de gel de sílica e CLAE-FR de ambas (seções 5.2.1, pág. 89 e 5.2.2, pág. 91).

A fração DCM:AcOEt foi a única que apresentou  $CC_{50}$  inferior a  $500 \mu\text{g/mL}$ , sendo essa igual a  $17,06 \pm 1,2 \mu\text{g/mL}$ . A análise fitoquímica dessa fração demonstrou que a mesma era rica em substâncias terpenoídicas/esteroidais. Uma vez que o EEF também apresentou atividade citotóxica e que a  $CC_{50}$  encontrada para DCM:AcOEt ter sido bem inferior àquela do EEF, deduziu-se que nessa fração foram concentradas as substâncias responsáveis pela  $CC_{50}$  do EEF. Os vários relatos na literatura de

substâncias terpenoídicas com essa propriedade reforçaram ainda mais essa hipótese (FERNANDES *et al.*, 2005; VECHIA *et al.*, 2009).

A provável participação de terpenoides e/ou esteroides na atividade antiviral e/ou citotóxica das frações do EEF de *D. elongata* fomentou o interesse no isolamento e/ou caracterização dos mesmos através de um segundo fracionamento de EEF (seção 4.2.7, pág. 65).

Nenhuma das frações apresentou atividade contra o vírus VACV-WR.

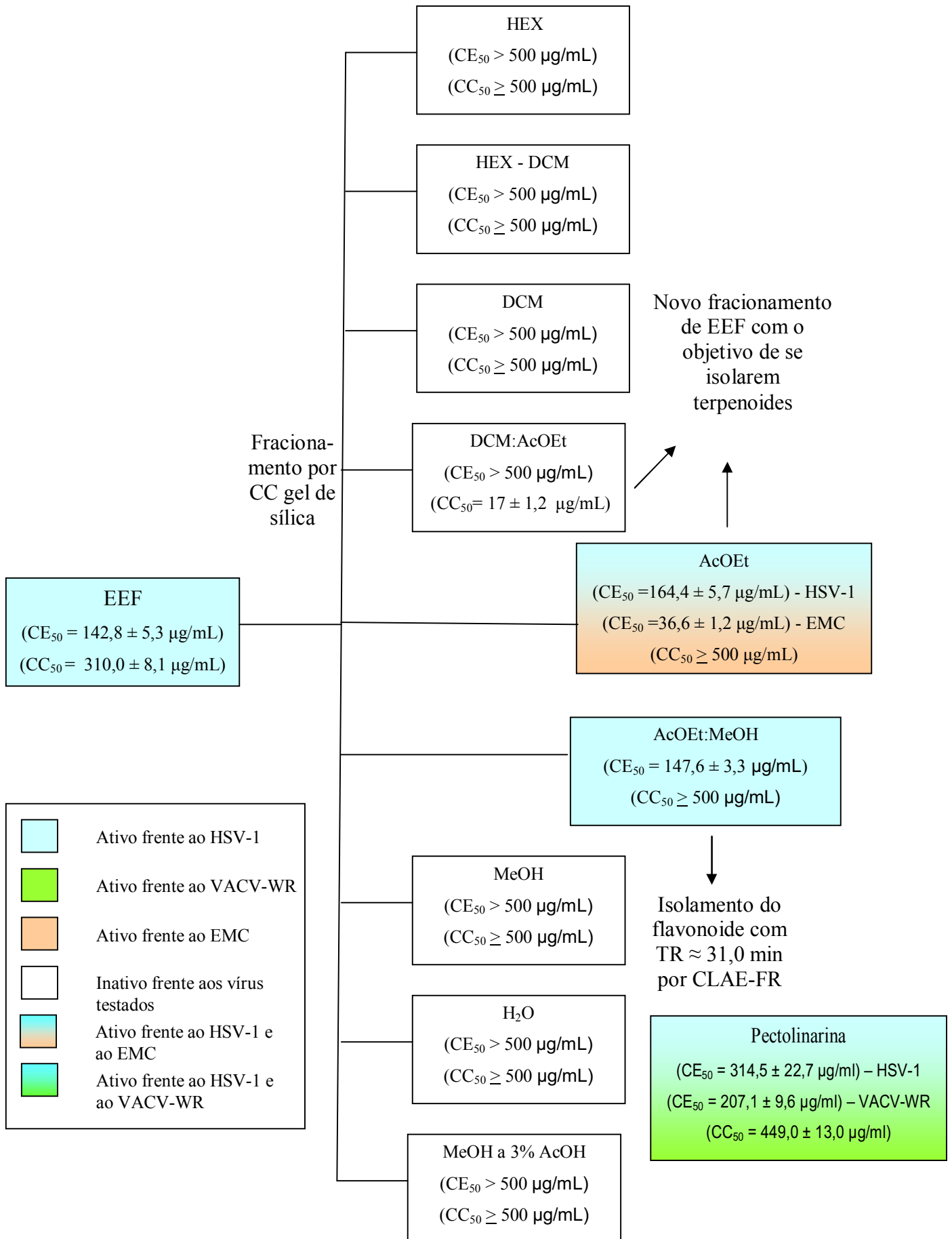
A **Figura 42** (pág. 128) resume os resultados obtidos pelos ensaios antivirais para as frações do EEF e o direcionamento do estudo fitoquímico.

O flavonoide comum às frações com atividade anti-HSV-1 foi isolado conforme descrito na seção 4.2.6 (pág. 64). Esse foi caracterizado estruturalmente como sendo a flavona pectolarina (seção 5.3.1, pág. 94) e avaliado frente aos três vírus utilizados neste trabalho. Os resultados se encontram apontados na **Tabela 19**.

**Tabela 19 – Parâmetros de atividade antiviral e citotóxica para a pectolarina obtidos pela técnica do MTT**

Parâmetros	Células VERO	HSV-1	VACV-WR	EMC
CE <sub>50</sub>	-	314,5 ± 22,7 µg/mL	207,1 ± 9,6 µg/mL	NA
CC <sub>50</sub>	449,0 ± 13,0 µg/mL	-	-	-
IS	-	1,4	2,2	-

NA – Não apresentou



**Figura 42 – Esquema do estudo fitoquímico biomonitorado de extratos de *D. elongata* que levou ao isolamento da pectolarina.**

O flavonoide pectolinarina apresentou atividade frente ao HSV-1 menor que as frações que o continham. Isso sugere que esse apenas contribua para a atividade anti-HSV do extrato e das frações, não sendo o único responsável pela mesma. Outras substâncias presentes no extrato e frações de folhas devem agir de forma sinérgica com essa flavona inibindo a atividade de HSV-1 (AMOROS *et al.*, 1992).

Pelo que foi observado na atividade anti-HSV-1 e na prospecção fitoquímica da fração AcOEt, terpenoides/esteroides presentes na mesma devem exercer alguma atividade contra o HSV-1. Já para a fração AcOEt:MeOH, outras substâncias fenólicas presentes devem agir de forma sinérgica à pectolinarina contra esse vírus.

O extrato de caule (EEC) não demonstrou atividade anti-HSV. Uma das diferenças fitoquímicas entre esse extrato e o extrato de folhas ativo está na ausência ou na concentração reduzida de flavonoides com tempos de retenção compreendidos entre 25,0 e 28,0 min. no perfil cromatográfico de EEF (seção 5.1.2, pág. 84). Logo, esses flavonoides devem exercer alguma atividade anti-HSV, o que também explicaria a atividade da fração AcOEt:MeOH.

A pectolinarina, após purificação, demonstrou atividade relevante anti-VACV-WR. Provavelmente em meio ao extrato e frações essa não exerceu essa atividade por se encontrar mais diluída e/ou pela presença de outras substâncias nos mesmos que inibiam essa sua atividade (CUNHA *et al.*, 2006; VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

De acordo com Cos e colaboradores (2006), a atividade antiviral frente ao VACV-WR da pectolinarina pode ser classificada como relevante, pois apresenta  $IS \geq 2$ . Essa é a primeira vez em que se descreve alguma atividade antiviral para essa flavona.

A ausência de atividade da flavona frente ao vírus EMC levou à dedução de que a atividade anti-EMC vista para a fração AcOEt provavelmente se deve apenas aos seus terpenoides/esteroides.

A pectolinarina, isolada das folhas de *D. elongata*, bem como outros flavonoides presentes podem exercer mecanismos de ação diferentes, ou até mesmo de forma múltipla, conforme já foi apontado em alguns estudos:

- Interação do flavonoide com as glicoproteínas e/ou outras macromoléculas presentes no envelope ou capsídeo viral. As proteínas presentes na superfície de um vírus são essenciais para o processo de adsorção e, conseqüentemente, posterior penetração dos mesmos às células do hospedeiro. Ao se ligarem irreversivelmente a essas, os flavonoides podem acarretar a sua desnaturação, levando a um efeito

virucida. Mahmood e colaboradores (1993) demonstraram que a atividade inibitória dos vírus HIV-1 e/ou HIV-2 apresentada por alguns representantes dessa classe se deve à sua ligação a gp120 do envelope viral. Esse tipo de mecanismo também foi demonstrado por flavonoides presentes nos frutos de *Sambucus nigra* L. (Caprifoliaceae) que inibiram a infecção de células *in vitro* pelo vírus H<sub>1</sub>N<sub>1</sub> (ROSCHEK JR. *et al.*, 2009).

- Inibição de enzimas necessárias à digestão do envelope viral após a entrada do vírus nas células ou à liberação de novas partículas virais após sua produção. A hesperidina, presente em algumas frutas cítricas, inibiu a enzima sialidase, necessária para esse estágio da replicação, diminuindo a taxa de infecção de células *in vitro* por vírus Influenza A (SAHA *et al.*, 2009);

- Inibição de enzimas necessárias à replicação do material genético viral e/ou proteínas necessárias na constituição de novas partículas virais produzidas. Esses efeitos foram demonstrados para o vírus CMV em fibroblastos cultivados *in vitro* e tratados com genisteína e baicaleína (EVERS *et al.*, 2005);

- Inibição de enzimas que exercem papel nas vias transdutoras de sinais necessárias à reprodução viral. Esse efeito já foi visto em vários estudos com isoflavonas e outros flavonoides e se dá principalmente pela inibição da enzima tirosina quinase, culminando na perda de infectividade de vários vírus (ANDRES *et al.*, 2009);

- A interferência na modulação de citocinas importantes nas patologias virais ou de seus receptores. A baicaleína, por exemplo, exerce esse efeito (LI *et al.*, 2000).

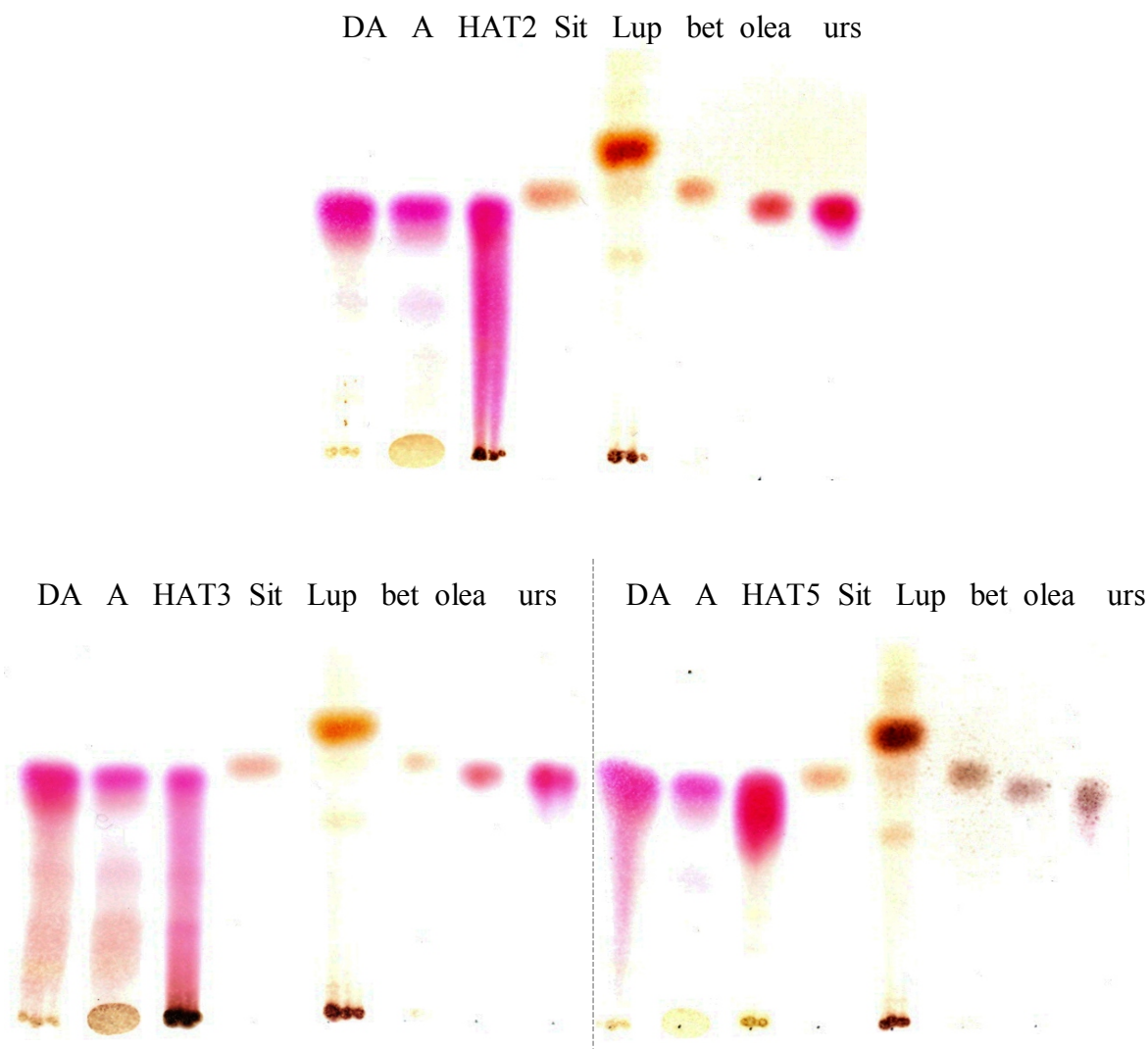
As misturas de terpenoides HAT2, HAT3 e HAT5, provenientes do segundo fracionamento de EEF, demonstraram, através de CCD em gel de sílica, estar presentes nas frações AcOEt e DCM:AcOEt (**Figura 43**, pág. 131). Essas misturas não foram avaliadas frente aos ensaios antivirais. Porém, a análise de padrões de ácido ursólico e oleanólico, presentes nas misturas, foi realizada. Ambos os triterpenoides foram ativos frente ao HSV-1 com os seguintes parâmetros:

- Ácido oleanólico: CE<sub>50</sub> = 3,8 ± 0,6 µg/mL, CC<sub>50</sub> = 4,2 ± 0,8 µg/mL;

- Ácido ursólico: CE<sub>50</sub> = 6,2 ± 0,1 µg/mL, CC<sub>50</sub> = 8,1 ± 0,9 µg/mL.

Ambos apresentaram ótimos valores de CE<sub>50</sub>, porém com valores de CC<sub>50</sub> muito próximos (COS *et al.*, 2006). Os valores de IS para ácido oleanólico e betulínico foram, respectivamente, iguais a 1,1 e 1,3.

A atividade observada para cada um desses triterpenoides apontou a participação dos mesmos na atividade anti-HSV apresentada pela fração AcOEt, mas não para o EMC. Isso implica que outros terpenoides ou esteroides presentes nessa fração desempenhem essa função.



**Figura 43** – Cromatogramas das misturas de terpenoides HAT2, HAT3 e HAT5, e das frações DCM:AcOEt (DA) e AcOEt (A). Lup = Lupeol, Sit =  $\beta$ -sitosterol, bet = ácido betulínico, olea = ácido oleanólico e urs = ácido ursólico. Condições: vide seção 4.2.4 - j, pág 63.

A atividade anti-HSV-1 do ácido ursólico já foi previamente relatada por Chiang e colaboradores (2005). O amplo espectro antiviral desse triterpenoide foi demonstrado, pois esse inibiu também os vírus de DNA adenovírus – 3 e HBV, além dos de RNA Cox-B1 e enterovírus 7, *in vitro*.

A ação antitumoral e anti-HPV do ácido ursólico foi relatada por Yim e colaboradores (2006), que apontam essa substância como uma possível alternativa no tratamento de neoplasias cervicais associadas ao HPV.

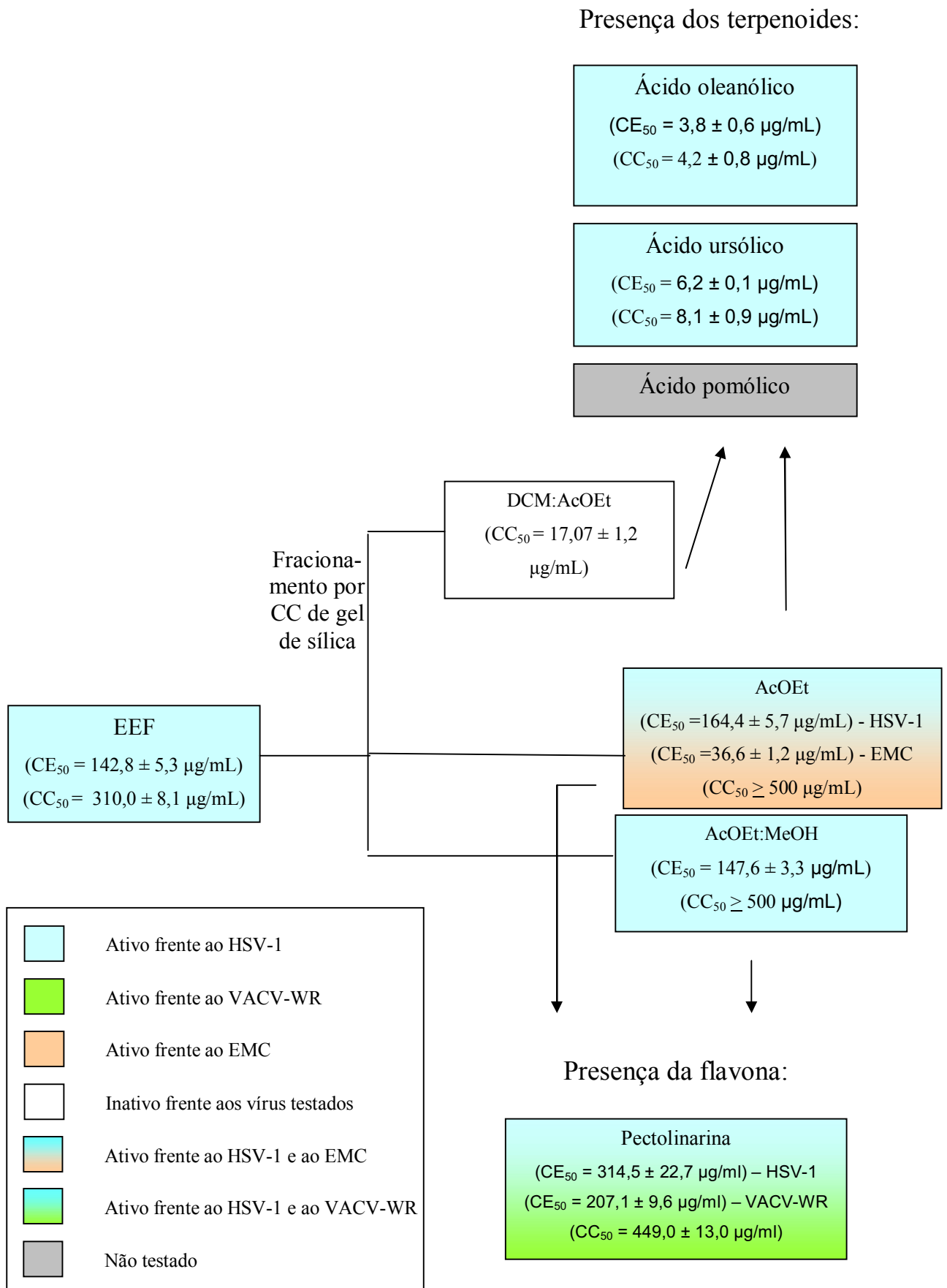
Tanto o ácido oleanólico quanto o ácido ursólico foram apontados como inibidores de enzimas necessárias ao ciclo de replicação do HIV-1. Esses triterpenoides são responsáveis pela ação anti-HIV observada para muitas espécies vegetais (ASRES *et al.*, 2005).

Como demonstrado em vários trabalhos, a elevada citotoxicidade observada para esses triterpenoides poderia contribuir para essa atividade apresentada pela fração DCM:AcOEt (VECHIA *et al.*, 2009). Porém, apesar de estarem presentes na fração AcOEt, esta não demonstrou alta citotoxicidade. Esse resultado poderia ser explicado por uma menor concentração dessas substâncias e/ou a presença de outras substâncias que inibiram a sua atividade citotóxica (CUNHA *et al.*, 2006; VIEGAS JR. *et al.*, 2006).

Os triterpenoides ácido ursólico e oleanólico, bem como muitos de seus derivados, são descritos na literatura como potentes agentes citotóxicos, inibindo várias linhagens de células tumorais. Isso justifica o interesse por essas substâncias como potenciais agentes no tratamento do câncer. Possíveis mecanismos de ação antitumoral desses terpenoides envolvem a indução da célula à apoptose, a sua atividade anti-inflamatória e, até mesmo, sua atividade antioxidante (VECHIA *et al.*, 2009).

Apesar de não ter sido testado, o ácido pomólico presente em EEC e na fração citotóxica de *D. elongata* deve ser um dos participantes nessa ação observada. Fernandes e colaboradores (2005) apontaram tal substância como potente inibidora do crescimento de uma linhagem de células leucêmicas, incluindo aquelas multirresistentes a agentes antineoplásicos.

A **Figura 44** (pág. 133) resume a análise antiviral e citotóxica do EEF de *D. elongata* realizada neste trabalho.



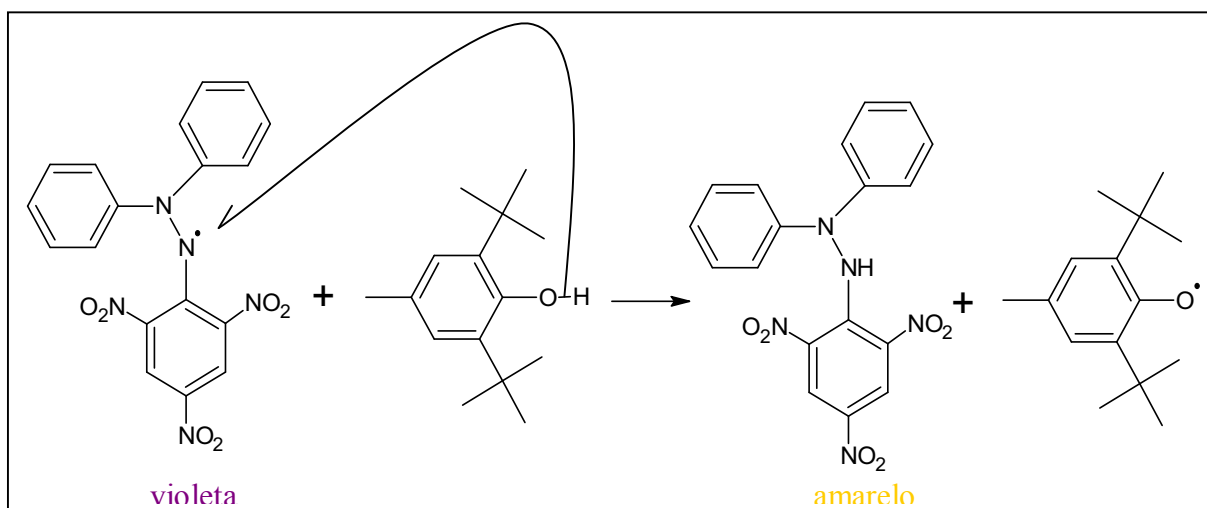
**Figura 44** – Resumo da análise antiviral e citotóxica do EEF de *D. elongata*.



### 5.5 Atividade antioxidante

Por apresentarem atividade antiviral, o extrato de folhas e as frações AcOEt e AcOEt:MeOH tiveram avaliadas suas potenciais atividades antioxidantes pela técnica do DPPH. Esses ensaios foram realizados pelo aluno de iniciação científica Glauber M. Maciel.

O radical de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) apresenta uma forte absorção no espectro visível (comprimento de onda de 515 a 517 nm) com coloração violácea intensa, devido à presença de elétrons desemparelhados. Quando o DPPH é colocado em presença de substâncias capazes de doar elétrons, a absorção é inibida. Ocorre a descoloração estequiométrica em relação ao número de radicais DPPH reduzidos por moléculas doadoras de elétrons (H<sup>•</sup>) presentes na amostra testada. Isso ocorre porque ao ser reduzido, o DPPH passa a apresentar coloração amarela, não mais sofrendo absorção no comprimento de onda analisado (**Figura 45**). Portanto, o grau de descoloração indica a capacidade sequestradora de radical livre (BLOIS, 1955; YAMAKASI *et al.*, 1994).



**Figura 45** - Redução do DPPH pelo antioxidante BHT (di-terc-butilmetilfenol).

Os resultados das concentrações eficazes para 50% de atividade antioxidante (CEA<sub>50</sub>) obtidos por meio de regressão linear se encontram na **Tabela 20** (pág. 135).

**Tabela 20 – CEA<sub>50</sub> obtidas pelas amostras testadas frente ao DPPH**

<b>Amostra</b>	<b>CEA<sub>50</sub> (µg/mL)</b>
EEF	28,03 ± 0,46
AcOEt:MeOH	58,00 ± 0,89
AcOEt	2036,12 ± 111,50
Rutina	14,13 ± 0,29

Como revelado pela análise fitoquímica dessas amostras, o EEF se apresenta rico em substâncias fenólicas. Essas são quimicamente caracterizadas como boas doadoras de elétrons (H<sup>•</sup>), possuindo atividade sequestradora de radicais livres. Ao estabilizarem o radical DPPH, doando-lhe um H<sup>•</sup>, a absorvância do mesmo em λ<sub>máx.</sub> 516 nm não mais é observada, de forma que quanto menor a concentração desse radical em solução, menor a absorvância da solução. Da mesma forma pode-se dizer que quanto maior a concentração de fenóis numa solução, maior a estabilização de radicais DPPH e, portanto, maior a atividade antioxidante da mesma (YAMASAKI *et al.*, 1994; RICE-EVANS *et al.*, 1997).

A atividade antioxidante da fração AcOEt:MeOH deve estar associada a pectolinarina e outros flavonoides presentes na mesma. O EEF apresenta uma boa atividade antioxidante, sendo composto de muitas substâncias fenólicas como flavonoides heterosídicos e, provavelmente, ariletanoides/arilpropanoides glicosilados. A fração AcOEt, por sua vez, possui apenas o flavonoide pectolinarina e em concentração inferior à da fração AcOEt:MeOH, sendo formada predominantemente por terpenoides, o que explica sua baixa atividade.

A quantidade de pectolinarina isolada de EEF não permitiu que fosse realizado esse ensaio com a mesma. Porém, JEONG e colaboradores (2008) testaram a atividade sequestradora de DPPH de quatro extratos de plantas coreanas do gênero *Cirsium* que apresentavam predominantemente e/ou até mesmo só este flavonoide. Em média, essas amostras apresentaram uma CEA<sub>50</sub> de 14,64 ± 2,37 µg/mL.

Esses resultados sugerem a participação da pectolinarina na atividade sequestradora de DPPH observada nas amostras provenientes do EEF que foram testadas. Além disso, JEONG e colaboradores (2008) também testaram a atividade sequestradora de peroxinitrito, encontrando excelentes resultados para aquelas

espécies ricas em pectolinarina (em média, essas apresentaram  $CEA_{50}$  igual a  $7,84 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$ ). Esses resultados demonstram o potencial antioxidante dessa flavona.

O  $\text{ONOO}^-$  é um dos principais responsáveis pelos danos teciduais observados em patologias provocadas por vírus, além de influenciar em processos carcinogênicos e processos de mutação que levam ao aumento da virulência desses agentes (AKAIKE e MAEDA, 2000). Portanto, a pectolinarina e/ou extratos e frações de *D. elongata* que a possuam associados a outros flavonoides podem ser extremamente úteis como alternativas terapêuticas no tratamento de doenças virais. Isso porque, além de possuírem atividade antiviral intrínseca, podem prevenir as consequências nocivas geradas pelo  $\text{ONOO}^-$  e/ou por outros radicais livres.

## 6. CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos do caule e das folhas de *Distictella elongata* (Vahl) Urb. tiveram sua atividade antiviral avaliada frente aos vírus HSV-1, EMC e VACV-WR por técnicas de microscopia e do MTT. Apenas o extrato de folhas apresentou atividade antiviral e essa se deu contra o vírus HSV-1.

O fracionamento do extrato de folhas por cromatografia em coluna de gel de sílica forneceu nove frações, que foram avaliadas frente aos mesmos vírus. Apenas as frações AcOEt e AcOEt:MeOH apresentaram atividade antiviral: a primeira frente aos vírus EMC e HSV-1, e a segunda frente ao vírus HSV-1. Através de CLAE-FR e CCD demonstrou-se que a fração AcOEt era rica em terpenoides, enquanto que a fração AcOEt:MeOH apresentou-se constituída apenas de substâncias fenólicas. Em comum, as duas apresentaram apenas uma flavona, que foi isolada da fração AcOEt:MeOH por meio de CLAE-FR preparativa. Através de técnicas espectrométricas, essa teve sua estrutura elucidada, sendo a pectolinarina, isolada pela primeira vez de uma espécie da família Bignoniaceae. Esse flavonoide apresentou atividades anti-HSV-1 e anti-VACV-WR, nunca antes relatadas na literatura.

Do EEF obtiveram-se, por técnicas cromatográficas, misturas dos terpenoides presentes na fração AcOEt: ácido ursólico, ácido pomólico e ácido oleanólico; além do esteroide  $\beta$ -sitosterol. Os ácidos ursólico e oleanólico apresentaram atividade anti-HSV-1 e citotóxica.

O extrato de folhas e a fração AcOEt:MeOH, ricos em fenóis, apresentaram atividade antioxidante através do ensaio de sequestro de radical livre (DPPH).

Os resultados encontrados apontam a necessidade da avaliação de outras substâncias presentes no EEF de *D. elongata* quanto às suas atividades antiviral e antioxidante. E também fomentam avaliações mais abrangentes de metabólitos especiais de plantas, especialmente flavonoides e outros fenóis, como potenciais alternativas à atual farmacoterapêutica antiviral, ao agirem simultaneamente por duas vias:

1. Inibição direta desses agentes patológicos através de seus mecanismos antivirais;
2. Redução dos danos provocados ao hospedeiro pelos radicais livres, habitualmente produzidos nesse tipo de infecção.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOU-KARAM, M.; SHIER, T. Isolation and characterization of an antiviral flavonoid from *Waldsteinia fragarioides*. *J. Nat. Prod.*, v.55, n.10, p.1525-1527, 1992.

ADLER, H.; BELAND, J. L.; DEL-PAN, N.C; KOBZIK, L.; BREWER, J. P.; MARTIN, T. R.; RIMM, I. J. Suppression of herpes simplex virus type 1 (HSV-1)-induced Pneumonia in Mice by Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase (iNOS, NOS2). *Free Radic. Biol. & Med.*, v. 34, n.10, p1263–1270, 2003.

AGUILAR-SANTAMARÍA, L.; RAMÍREZ, G.; NICASIO, P.; ALEGRÍA-REYES, P.; HERRERA-ARELLANO, A. Antidiabetic activities of *Tecoma stans* (L.) Juss. ex Kunth. *J. Ethnopharmacol.*, v.124, p.284–288, 2009.

AKAIKE, T. Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation. *Rev. Med.Virol.* v.11, p.87-101, 2001.

AKAIKE, T., MAEDA, H. Nitric oxide and virus infection. *Immunology*, v.101, p.300-308, 2000.

AKAIKE, T.; NOGUCHI, Y.; IJIRI, S.; SETOGUCHI, K.; SUGA, M.; ZHENG, Y. M.; DIETZSCHOLD, M. H. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: Involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v.93, p.2448-2453, 1996.

AMOROS, M.; SIMOES, C. M. O.; GIRRE, L. Synergistic effect of flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. *J. Nat. Prod.*, v.55, p.1732-1740, 1992.

AN, S. J.; PAE, H. O.; OH, G. S.; CHOI, B. M.; JEONG, S.; JANG, S. I.; OH, H.; KWON, T. O.; SONG, C. E.; CHUNG, H. T. Inhibition of TNF-alpha, IL-1beta, and IL-6 productions and NF-kappa B activation in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 macrophages by catalposide, an iridoid glycoside isolated from *Catalpa ovata* G. Don (Bignoniaceae). *Int. Immunopharmacol.*, v.2, n.8, p.1173-81, 2002.

ANDRES, A.; DONOVAN, S. M.; KUHLENSCHMIDT, M. S. Soy isoflavones and virus infections. *J. Nutri. Biochem.*, v.20, p.563–569, 2009.

ANDRIGHETTI-FROHNER C. R.; SINCERO, T. C. M.; DA SILVA A. C.; SAVI, L. A.; GAIDO, C. M.; BETTEGA, J. M. R.; MANCINI, M.; ALMEIDA, M. T. R.; BARBOSA, R. A.; FARIAS, M. R.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*, v. 76, p.374–378, 2005.

ANVISA RDC n.º48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em trinta e um de março de dois mil e oito.

APARNA, P.; TIWARI, A. K.; SRINIVAS, P. V.; ALI, A. Z.; ANURADHA, V.; RAO, J. M. Dolichandroside A, a New  $\alpha$ -glucosidase Inhibitor and DPPH Free-Radical Scavenger from *Dolichandrone falcata* Seem. *Phytother. Res.*, v.23, p.591-596, 2009.

APGII: An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II -The angiosperm phylogeny group. *Bot. J. Linnean Soc.*, v.141, p.399–436, 2003.

ARTHAN, D.; SVASTI, J.; KITTAKOOP, P.; PITTAYAKHACHONWUT, D.; TANTICHAROEN, M.; THEBTARANONTH, J. Antiviral isoflavonoid sulfate and steroidal glycosides from the fruits of *Solanum torvum* (Solanaceae). *Phytochemistry*, v.39, p.459-463, 2002.

ASANO, J.; CHIBA, K.; TADA, M.; YOSHII, T. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens* L. *Phytochemistry*, v.42, p.713–717, 1996.

ASRES, K.; SEYOUM, A.; VEERESHAM, C.; BUCAR, F.; BIBBONS, S. Naturally derived anti-HIV agents. *Phytother. Res.*, v.19, n.7 p.557-581, 2005.

AUTORE, G.; RASTRELLI, L.; LAURO, M. R.; MARZOCCO, S.; SORRENTINO, R.; SORRENTINO, U.; PINTO, A.; AQUINO, R. Inhibition of nitric oxide synthase expression by a methanolic extract of *Crescentia alata* and its derived flavonols. *Life Sci.*, v.70, n.5, p.523-34, 2001.

AWALE, S.; KAWAKAMI, T.; TEZUKA, Y.; UEDA, J. Y.; TANAKA, K.; KADOTA, S. Nitric oxide (NO) production inhibitory constituents of *Tabebuia avellanedae* from Brazil. *Chem. Pharm. Bull.*, v.53, n.6, p.710-3, 2005.

BARREIRO, E. J. Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos. *Quím. Nova*, v.13, n.01, p.29-39, 1990.

BASTOS, M. L. A.; LIMA, M. R. F.; CONSERVA, L. M.; ANDRADE, V. S.; ROCHA, E. M. M.; LEMOS, R. P. L. Studies on the antimicrobial activity and brine shrimp toxicity of *Zeyheria tuberculosa* (Vell.) Bur. (Bignoniaceae) extracts and their main constituents. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, v.8, n.16, p.1-6, 2009.

BECK, M. A.; WILLIAMS-TOONE, D.; LEVANDER, O. A. Coxsackievirus B3-resistant mice become susceptible in Se/vitamin E deficiency. *Free Radic. Biol. & Med.*, v.34, n.10, p.1263–1270, 2003.

BEDIR, E.; PEREIRA, A. M. S.; KHAN, S. I.; CHITTIBOYINA, A.; MORAES, R. M.; KHAN, I. A. A new  $\beta$ -lapachone derivative from *Distictella elongata* (Vahl) Urb. *J. Braz. Chem. Soc.*, v.20, p.383-386, 2009.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVA, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci.*, v. 65, n. 18-19, p. 1865-1874, 1999.

BLOIS, M. S. A note on free radical formation in biologically occurring quinones. *Biochim. Biophys. Acta*, v.18, n.1, p.165, 1955.

BUDMAN, D. R.; PETRONI, G. R.; JOHNSON, J. L.; COOPER, M. R.; SCHLOSSMAN, D. M.; BARCOS, M.; PETERSON, B. A. Phase II trial of Docetaxel in non-Hodgkin's lymphomas: a study of the cancer and leukemia group B. *J. Clin. Oncol.*, V.15, n.10, p.3275–3279, 1997.

CALIXTO, J. B. Fitofármacos no Brasil: agora ou nunca! *Ciência hoje*, v. 21, n.1234, p.26-30, 1997.

CAMPANA, P. R. V.; BRAGA, F. C.; CORTES, S. F. Endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta by *Mansoa hirsuta* D.C. *Phytomedicine*, v.16, p.456–461, 2009.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev. Bras. Farmacogn.*, V.18, n.2, p.314-319, 2008.

CARVALHO, C. A.; MATTA, S. L. P.; MELO, F. C. S. A.; ANDRADE, D. C. F.; CARVALHO, L. M.; NASCIMENTO, P. C.; SILVA, M. B.; ROSA, M. B. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* Miers – Bignoniaceae): estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemia salina*. *Rev. Eletr. Farm.*, v.6, n.1, p.51-57, 2009.

CASTILHO, R. O. *Química de Chrysobalanus icaco L. e Licania tomentosa Benth. (Chrysobalanaceae): plantas brasileiras com potencial terapêutico*. 2001. Tese apresentada ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 171p.

CHEN, J. L.; KERNAN, M. R.; JOLAD, S. D.; STODDART, C. A.; BOGAN, M. A.; COOPER, R. Dysoxylins A-D, tetranortriterpenoids with potent anti-RSV activity from *Dysoxylum gaudichaudianum*. *J. Nat. Prod.*, v.70, p.312-315, 2007.

CHIANG, L. C.; NG, L. T.; CHENG, P. W.; CHIANG, W.; LIN, C. C. Antiviral activities of extracts and selected pure constituents of *Ocimum basilicum*. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, v.3, n.10, p.811-6, 2005.

CHIANG, L. C.; CHIANG, W.; CHANG, M. Y.; NG, L.T.; LIN, C. C. Antiviral activity of *Plantago major* extracts and related compounds *in vitro*. *Antiviral Res.* v.55, n.1, p.53–62, 2002.

CHOI, H. J.; SONGB, J. H.; PARKC, K. S.; KWONA, D. H. Inhibitory effects of quercetin 3-rhamnoside on influenza A virus replication. *European J. of Pharm. Sc.*, v.37, p.329-333, 2009.

CHREAGH, T.; RUCKLE, J. L.; TOLBERT, D. T.; GILTNER, J.; EIZNHAMER, D. A.; DUTTA, B.; FLAVIN, M.T.; XU, Z. Safety and Pharmacokinetics of single doses of (1)-Calanolide A, a novel, naturally occurring nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor, in healthy, human immunodeficiency virus-negative human subjects. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.45, p.1379-1386, 2001.

CIPRIANI, F. A.; CIDADE, F. W.; SOARES, G. L. G.; KAPLAN; M. A. C. Similaridade Química entre as Tribos de Bignoniaceae. *Rev. Bras. de Biociências*, v. 5, n. 2, p. 612-614, 2007.

CORRAL, J. M. DEL; CASTRO, M. A.; GORDALIZA, M.; MARTIN, M. L.; OLIVEIRA, A. B.; GUALBERTO, S. A.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D.; FELICIANO, A. S. Synthesis and Biological Evaluation of Cytotoxic 6(7)-Alkyl-2-hydroxy-1,4-naphthoquinones. *Archiv. der Pharmazie*, v.335, n.9, p.427-437, 2002.



COS, P.; VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. *J. Ethnopharmacol.*, v.106, p.290–302, 2006.

CUNHA, U. S.; VENDRAMIN, J. D.; ROCHA, W. C.; VIEIRA, P. C. Frações de *Trichilia pallens* com atividade inseticida sobre *Tuta absoluta*. *Pesq. agropec. bras.*, v.41,n.11, p.1579-1585, 2006.

CUNHA, A. P. *Farmacognosia e fitoquímica*. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2005. 671p.

DEWICK, P. M. *Medicinal natural products*. Canada: John Wiley & Sons, 1997. 507p.

DOLGANOVA, A.; SHARONOV, B. P. Application of various antioxidants in the treatment of influenza. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, v.30, p.1333-1336, 1997.

DU, J.; HE, Z. D; JIANG, R. W.; YE, W. C; XU, H. X.; BUT, P. P. H. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry*, v.62, p.135-138, 2003.

DUTRA, C. D. T.; LIBOATI, R. M. F. Metabolic and nutritional approach of lipodystrophy in the use of antiretroviral therapy. *Rev. Nutr.*, V.21, n.4, p.439-446, 2008.

DVORSKÁ, M.; ZEMLICKA, M.; MUSELÍK, J.; KARAFIÁTOVÁ, J.; SUCHÝ, V. Antioxidant activity of *Catalpa bignonioides*. *Fitoterapia*, v.78, n.6, p.437-9, 2007.

EVERS, D. L.; CHAO, C. F.; WANG, X.; ZHANG, Z.; HUONG, S. M.; HUANG, E. S. Human cytomegalovirus-inhibitory flavonoids: studies on antiviral activity and mechanism of action. *Antiviral Res.*, v.68, p.124–34, 2005.

EYONG, K. O.; FOLEFOG, G. N.; KUETE, V.; BENG, V. P.; KHRON, K.; HUSSAIN, H.; NKENGFACK, A. E.; SAEFTEL, M.; SARITE, S. R.; HOERAUF, A. Newbouldiaquinone A: A naphthoquinone–anthraquinone ether coupled pigment, as a potential antimicrobial and antimalarial agent from *Newbouldia laevis*. *Phytochemistry*, v.67, p.605-605, 2006.

EYONG, K. O.; KUMAR, P. S.; KUETE, V.; FOLEFOC, G. N.; NKENGFACK, A. E.; BASKARAN, S. Semisynthesis and antitumoral activity of acetylfuranonaphthoquinone and other naphthoquinone derivatives from lapachol. *Bioorg. Medic. Chem. Lett.*, v.18, n.20, p.5387-5390, 2008.

FARINATI, F.; CARDIN, R.; BORTOLAMI, M.; BURRA, P.; RUSSO, F. P.; RUGGE, M.; GUIDO, M.; SERGIO, A.; NACCARATO, R. Hepatitis C virus: from oxygen free radicals to hepatocellular carcinoma. *J. Viral Hepat.*, v.14, p.821-829, 2007.

FERNANDES, J.; WEINLICH, R. I.; CASTILHO, R. O.; KAPLAN, M. A. C.; MENDES, G. P. A.; GATTASS, C. R. Pomolic acid triggers mitochondria-dependent apoptotic cell death in leukemia cell line. *Cancer Lett.*, v. 219, p. 49-55, 2005.

FLORA BRASILIENSIS. <http://flora.cria.org.br/taxonCard?id=FBR1064> – Acessado em dezanove de dezembro de dois mil e nove.

FU, J.; JINA, H.; SHENB, Y.; QINA, J.; WANGA, Y.; HUANGA, Y.; ZHANG, Y. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Incarvillea*. *Chem. Biodivers.*, v.6, p.818-826, 2009.

GACHET, M. S.; SCHÜLY, W. *Jacaranda* — An ethnopharmacological and phytochemical review. *J. Ethnopharmacol.*, v.121, p.14-27, 2009.

GADZA, V. E. *Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de Chiococca alba Hitchc (Rubiaceae)*. Dissertação apresentada ao Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. 164p. 2004.

GAFNER, S.; WOLFENDER, J. L.; NIANGA, M.; STOECKLI-EVANS, H.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and antibacterial naphthoquinones from *Newbouldia laevis* roots. *Phytochemistry*. v.42, n.5, p.1315-20, 1996.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae. I (Crescentieae and Tourrettieae). *Flora Neotropica Monograph*, v.25, n.1, p.1-130, 1980.

GENTRY, A. H. Bignoniaceae. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, v.60, n.3, p.781-977, 1973.

GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. *Biodiversidade: Enfoque químico-biológico*. Rio de Janeiro: Editora UFRJ, 1996.

GOULART, M. O. F.; ZANI, C. L.; TONHOLO, J.; FREITAS, L. R., ABREU, F. C. DE; OLIVEIRA, A. B.; RASLAN, D. S.; STARLING, S.; CHIARI, E. Trypanocidal activity and potential of heterocyclic- and 2-hydroxy-naphthoquinones. *Bioorg. Méd. Chem. Lett.* v. 7, n.15, p.2043-2048, 1997.

GUENKA, L. C.; GOMES, R. C.; MELO, V. L.; KITANISHI, C. R.; PEREIRA, P. S.; FRANÇA, S. C.; COUTO, L. B.; BELEBONI, R. O. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Zeyheria montana* (Bignoniaceae) ethanol extract. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 103, n.8, p.768-772, 2008.

HERTOG, M. G. L.; HOLLMAN, P. C. H.; VENEMA, D. P. Optimization of a quantitative HPLC determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in vegetables and fruits. *J. Agric. Food Chem.*, v.40, p.1591–1598, 1992.

HIRAKU, Y.; TABATA, T.; MA, N.; MURATA, M.; DING, X.; KAWANISHI, S. Nitrate and oxidative DNA damage in cervical intraepithelial neoplasia associated with human papilloma virus infection. *Cancer Sci.*, v. 98, p.964-972, 2007.

JAREÑO, E. J.; BOSCH-MORELL, F.; FERNANDEZ-DELGADO, R.; DONAT, J.; ROMERO, F. J. Serum malondialdehyde in HIV seropositive children. *Free Radic. Biol. & Med.*, v.24, n.3, p. 503-506, 1998.

JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.*, v.95, p.412-427, 2003.

JEONG, D. M.; JUNG, H. A.; HOI, J. S. Comparative antioxidant and HPLC profiles of some selected Korean thistles. *Arch. Pharm. Res.*, v.31, n.1, p.28-33, 2008.

JIANG, R.; MA, S.; BUT, P. P.; MAK, T. C. W. New antiviral cassane furanoditerpenes from *Caesalpinia minax*. *J. Nat. Prod.*, v.64, p.1266-1272, 2001.

KAUFMAN, P. B.; LSEKE, L. J.; WARBER, S.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. *Natural Products from Plants*, USA: CRC Press, 1998.

KERNAN, M. R.; AMARQUAVE, A.; CHEN, J. L.; CHAN, J.; SESIN, D. F.; PARKINSON, N.; YE, Z. J.; BARRETT, M.; BALES, C.; STODDART, C. A.; SLOAN, B.; BLANC, P.; LIMBACH, C.; MRISHO, S.; ROZHON, E. J. Antiviral phenylpropanoid glycosides from the medicinal plant *Markhamia lutea*. *J. Nat. Prod.*, v. 61, n. 5, p. 564-570, 1998.

KHANNA, M.; GUPTA, N.; GUPTA, A.; VIJAYAN, B. K. Influenza A (H1N1): a pandemic alarm. *J. Biosci*, V.34, p.481-489, 2009.

KHATRI, A.; GARK, A.; AGRAWAL, S. S. Evaluation of hepatoprotective activity of aerial parts of *Tephrosia purpurea* L. and stem bark of *Tecomella undulate*. *J. Ethnopharmacol.*, v.122, p.1-5, 2009.

KIM, D. H.; HAN, K. M.; CHUNG, I. S.; KIM, D. K.; KIM, S. H.; KWON, B. M.; JEONG, T. S.; PARK, M. H.; AHN, E. M.; BAEK, N. I. Triterpenoids from the flower of *Campsis grandiflora* K. Schum. as human acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitors. *Arch. Pharm. Res.*, v.28, n.5, p.550-6, 2005.

KNOWLES, N. J.; DICKINSON, N. D.; WILSDEN, G.; CARRA, E.; BROCCHI, E.; DE SIMONE, F. Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy. *Virus Res.*, v.57, p.53-62, 1998.

KO, R. J. Causes, epidemiology, and clinical evaluation of suspected herbal poisoning. *Clin. Toxicol.*, v.37, n.6, p.697-708, 1999.

KUMAR, U. S.; TIWARI, A. K.; REDDY, S. V.; APARNA, P.; RAO, R. J.; ALI, A. Z.; RAO, J. M. Free-radical-scavenging and xanthine oxidase inhibitory constituents from *Stereospermum personatum*. *J. Nat. Prod.*, v.68, n.11, p.1615-21, 2005.

KUROKAWA, M.; BASNET, P.; OHSUGI, M.; HOZUMI, T.; KADOTA, S.; NAMBA, T.; KAWANA, T.; SHIRAKI, K. Anti-herpes simplex virus activity of moronic acid purified from *Rhus javanica* *in vitro* and *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.289, p.72-78, 1999.

LEFKOWITZ, E. J.; WANG, C.; UPTON, C. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res.* v.117, p.105-118, 2006.

LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; LOMBARDI, J. A.; FILHO, J. D. S., CHIARI, E. Trypanocidal activity of triterpenes from *Arrabidaea triplinervia* and derivatives. *Biol. Pharm. Bull.*, v.29, n.11, p.2307-2309, 2006.

LEITE, J. P. V. *Estudo fitoquímico de folhas de Maytenus ilicifolia Mart. Ex. Reiss. e variação sazonal e intra-específica de polifenóis em populações nativas*. 2002. Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais. 299p.

LENTA, B. N.; WENIGER, B.; ANTHEAUME, C.; NOUNGOUE, D. T.; NGOUELA, S.; ASSOBA, J. C.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; FOKOU, P. A.; DEVKOTA, K. P.; TSAMO, E.; SEWALD, N. Anthraquinones from the stem bark of *Stereospermum zenkeri* with antimicrobial activity. *Phytochemistry*, v.68, n.11, p.1595-9, 2007.

LEVINSON, W.; JAWETZ E. *Microbiologia médica e Imunologia*. 5 ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2006, 632p.

LI, J.; HUANG, H.; ZHOU, W.; FENG, M.; ZHOU, P. Anti-hepatitis B virus activities of *Geranium carolinianum* L. extracts and identification of the active components. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, n.4, 743-747, 2008.

LI, Y.; LEUNG, K. T.; YAO, F. Antiviral flavans from the leaves of *Pithecellobium clypearia*. *J. Nat. Prod.*, v.69, n.5, p.833-835, 2006.

LI, Y.; MA, S.; YANG, Y.; YE, S.; BUT, P.P. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. *J. Ethnopharmacol.*, v.79, p.365-368, 2002.

LI B. Q.; FU T.; GONG W.; DUNLOP N.; KUNG H.; YAN Y.; KANG J.; WANG, J.M. The flavonoid baicalin exhibits anti-inflammatory activity by binding to chemokines. *Immunopharmacol.*, v.49, p.295-306, 2000.

LI, C. J.; ZHANG, L. J.; DEZUBE, B. J.; CRUMPACKER, C. S.; PARDEE, A. B. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.90, n.5, p.1839-42, 1993.

LI, B. Q.; FU, T.; DONGYAN, Y.; MIKOVITS, J. A.; RUSCETTI, F. W.; WANG, J. M. Flavonoid baicalin inhibits HIV-1 infection at the level of viral entry. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, v.276, p.534-538, 2000.

LIMA, C. S.; DE AMORIM, E. L.; NASCIMENTO, S. C.; DE ARAÚJO, C. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V.; VIEIRA, I. J.; BRAZ-FILHO, R. Cytotoxic pyranonaphthoquinones from *Melloa quadrivalvis* (Bignoniaceae). *Nat. Prod. Res.*, v.19, n.3, p.217-22, 2005.

LIMA, C. S.; AMORIM, E. L. B., SENA, K. X. F. R.; CHIAPPETA, A. A., NUNES, X. P.; ANGRA, M. F.; CUNHO, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea harleyi* A.H. Gentry (Bignoniaceae). *Braz. J. Pharm. Sci.*, v.39, n.1, 2003.

LIN, T.; CHEN, S.; DUH, P.; CHANG, L.; LIU, Y. Inhibition of the Epstein–Barr virus lytic cycle by Andrographolide. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, n.11, p.2018-2023, 2008.

LIN, Y. M.; ANDERSON, H.; FLAVIN, M. T.; PAI, Y. H.; MATA-GREENWOOD, E.; PENGUSUPARP, T.; PEZZUTO, J. M.; SCHINAZI, R. F.; HUGHES, S. H.; CHEN; F. C. *In vitro* anti-HIV activity of biflavonoids isolated from *Rhus succedanea* and *Garcinia multiflora*. *J. Nat. Prod* v.60, p.884–888, 1997.

LOHMANN, L. G. (2007). Homepage da Flora Brasiliensis <http://flora.cria.org.br/taxonCard?id=FBR1058> Acessado em sete de dezembro de dois mil e nove.

LOGUERCIO, C.; DI PIERRO, M.; DI MARINO, M. P.; FEDERICO, A.; DISALVO, D.; CRAFA, E.; TUCCILLO, C.; BALDI, F.; DEL VECCHIO BLANCO, C. Drinking habits of subjects with hepatitis C virus-related chronic liver disease: prevalence and effect on clinical, virological and pathological aspects. *Alcohol*. v.35, p.296–301, 2000.

LOIZZO, M. R., SAAB, A. TUNDIS, R., STATTI, G. A.. Phytochemical analysis and *in vitro* evaluation of the biological activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) of *Cedrus libani* A. Rich. *Phytochemistry*, v.15, p.79-83, 2008.

MA, W.; HUANG, H.; ZHOU, P.; CHEN, D. Schisanwilsonenes A-C, anti-HBV carotane sesquiterpenoids from the fruits of *Schisandra wilsoniana*. *J. Nat. Prod.*, v.72, p.676-678, 2009.

MABBERLEY, D. J. The plant-book: a portable dictionary of the vascular plants. 2. ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1997, 858p.

MABRY, T. J.; MARKHAM K. R.; THOMAS, M. B. *The systematic identification of flavonoids*. New York: Springer, 1970, 354p.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. <sup>13</sup>C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids – a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v.37, n.6, p.1517-1575, 1994.

MAHMOOD, N.; PIZZA, C.; AQUINO, R.; DE TOMMASI, N.; PIACENTE, S.; COLMAN, S.; BURKE, A.; HAY, A. J. Inhibition of HIV infection by flavanoids. *Antiviral Res.*, v.22, p.189-199, 1993.

MARINI-BETTOLO, G. B.; NICOLETTI, M.; PATAMIA, M. Plant screening by chemical and chromatographic procedures under field conditions. *J. Chromatogr.*, v.213, p.112-127, 1981.

MARKHAM K. R. *Techniques of flavonoids identification*. London: Academic press, 1982, 113p.

MARTIN, F.; HAY, A.; CORNO, L.; GUPTA, M. P.; HOSTTETTMANN, K. Iridoid glycosides from the stems of *Pithecoctenium crucigerum* (Bignoniaceae). *Phytochemistry*, v.68, p.1307-1311, 2007.

MARTIN, F.; HAY, A. E.; CRESSEND, D.; REIST, M.; VIVAS, L.; GUPTA, M. P.; CARRUPT, P. A.; HOSTTETTMANN, K. Antioxidant C-Glucosylxanthones from the Leaves of *Arrabidaea patellifera*. *J. Nat. Prod.*, v.71, n11, p.1887-1890, 2008.

MCCUTCHEON, A. R.; ROBERTS, T. E.; GIBBONS, E.; ELLIS, S. M.; BABIUK, L. A.; HANCOCK, R. E.; TOWERS, G. H. Antiviral screening of British Columbian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, v.49, p. 101–110, 1995.

MERAGELMAN, K. N.; MCKEE, T. C.; BOYD, M. R. Anti-HIV prenylated flavonoids from *Monotes africanus*. *J. Nat. Prod.*, v.64, p.546-548, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da malária no Brasil. 1. ed. Brasília, DF: editora MS, 2006. 10p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Situação epidemiológica da dengue – 2007. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php?name=Tnet> . Acessado em quinze de novembro de dois mil e nove.

MOCCELINI, S. K.; SILVA, V. C.; NDIAYE, E. A.; SOUSA Jr., P. T. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae) *Quím. Nova*, v.32, n.1, p.131-133, 2009.

MOON, M. K.; CHOI, B.; OH, G.; PAE, H.; KIM, J.; OH, H.; OH, C.; KIM, D.; RHO, Y.; SHIN, M.; LEE, H.; CHUNG, H. Catalposide protects Neuro 2A cells from hydrogen peroxide-induced cytotoxicity via the expression of heme oxygenase-1. *Toxicol. Lett.*, v.145, p.46-54, 2003.

MUKHTAR, M.; ARSHAD, M.; AHMAD, M.; POMERANTZ, R. J.; WIGHDAHL, B.; PARVEEN, Z. Antiviral potentials of medicinal plants. *Virus Res.* v.131, 111-120, 2008.

NAITHANI, R., HUMA, L. C., HOLLAND, L. E., SHUKLA, D., MCCORMICK, D. L., MEHTA, R. G., MORIARTY, R. M. Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini Rev. Med. Chem.* v. 8, p.1106-1133, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.* v.17, p.215-234, 2000.

ONEGI, B.; KRAFT, C.; KÖHLER, I.; FREUND, M.; JENETT-SIEMS, K.; SIEMS, K.; BEYER, G.; MELZIG, M. F.; BIENZLE, U.; EICH, E. Antiplasmodial activity of naphthoquinones and one anthraquinone from *Stereospermum kunthianum*. *Phytochemistry.*, v.60, n.1, p.39-44, 2002.

PAE, H. O.; OH, G. S.; CHOI, B. M.; SHIN, S.; CHAI, K. Y.; OH, H.; KIM, J. M.; KIM, H. J.; JANG, S. I.; CHUNG, H. T. Inhibitory effects of the stem bark of *Catalpa ovata* G. Don. (Bignoniaceae) on the productions of tumor necrosis factor-alpha and nitric oxide by the lipopolisaccharide-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J. Ethnopharmacol.*, v.88, n.2-3, p.287-91, 2003.

PARK, B. S.; LEE, H. K.; LEE, S. E.; PIAO, X. L.; TAKEOKA, G. R.; WONG, R. Y.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Antibacterial activity of *Tabebuia impetiginosa* Martius ex DC (Taheebo) against *Helicobacter pylori*. *J. Ethnopharmacol.*, v.105, n.1-2, p.255-62, 2006.

PARK, B. S.; KIM, J. R.; LEE, S. E.; KIM, K. S.; TAKEOKA, G. R.; AHN, Y. J.; KIM, J. H. Selective growth-inhibiting effects of compounds identified in *Tabebuia impetiginosa* inner bark on human intestinal bacteria. *J. Agric. Food Chem.*, v.53, n.4, p.1152-7, 2005.



PASSERO, L. F.; CASTRO, A. A.; TOMOKANE, T. Y.; KATO, M. J.; PAULINETTI, T. F.; CORBETT, C. E.; LAURENTI, M. D. Anti-leishmania activity of semi-purified fraction of *Jacaranda puberula* leaves. *Parasitol. Res.*, v.101, n.3, p.677-80, 2007.

PAULETTI, P. M.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M. Constituintes químicos de *Arrabidaea samydoides* (Bignoniaceae). *Quim. Nova*, v.26, n5, p.641-653, 2003.

PEREIRA, E. M.; MACHADO, T. D. E. B.; LEAL, I. C.; JESUS, D. M.; DAMASO, C. R.; PINTO, A. V.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; KUSTER, R. M.; SANTOS, K. R. *Tabebuia avellaneda* naphthoquinones: activity against methicillin-resistant staphylococcal strains, cytotoxic activity and *in vivo* dermal irritability analysis. *Ann. Clin. Microbiol Antimicrob.*, v. 22, n.5, 2006.

PICERNO, P.; AUTORE, G.; MARZOCCO, S.; MELONI, M.; SANOGO, R.; AQUINO, R. P. Anti-inflammatory activity of verminoside from *Kigelia africana* and evaluation of cutaneous irritation in cell cultures and reconstituted human epidermis. *J. Nat. Prod.*, v.68, n.11, p.1610-4, 2005.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quím Nova*, v.25, n.1, p.45-61, 2002.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.*, v. 27, p.493-497, 1938.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. *Rev. Bras. Farmacogn.*, V.15, n.1, p.65-70, 2005.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, v.2, p.152-159, 1997.

ROBBERS, J. E; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. *Farmacognosia e Biotecnologia* 1 Ed. São Paulo: Editora Premier, 1997. 372p.

ROCHA, A. D.; DE OLIVEIRA, A. B.; DE SOUZA FILHO, J. D.; LOMBARDI, J. Á.; BRAGA, F. C. Antifungal constituents of *Clytostoma ramentaceum* and *Mansoa hirsuta*. *Phytother. Res.*, v.18, n.6, p.463-7, 2004.

RODRIGUES, A. M.; DE PAULA, J. E.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; ESPÍNDOLA, L. S. Larvicidal activity of *Cybistax antisiphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. *Fitoterapia.*, v.76, n.7-8, p.755-7, 2005.

RODRIGUEZ, D. J.; CHULIA, J.; SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; MARIOTTE, A. M.; GIRRE, L. Search for in vitro antiviral activity of a new isoflavonic glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Med.*, v. 56, p. 59-62, 1990.

ROSCHEK JR., B.; FINK R. C.; MCMICHAEL M. D.; LI, D.; ALBERTE R. S. Elderberry flavonoids bind to and prevent H1N1 infection *in vitro*. *Phytochemistry*, v.70 p.1255-1261, 2009.

SAHA, R. K.; TAKAHASHI, T.; SUZUKI, T. Glucosyl hesperidin prevents Influenza A virus replication *in Vitro* by inhibition of viral sialidase. *Biol. Pharm. Bull.*, v.32, n.7, p.1188-1192, 2009.

SCHATZMAYR, H. G. Emerging and reemerging viral diseases. *Cad. Saúde Pública*, V.17, p.209-213, 2001.

SCHNITZLER, P.; SCHON, K.; REICHLING, J. Antiviral activity of Australian tea tree oil and eucalyptus oil against herpes simplex virus in cell culture. *Die Pharmazie* , v.56, p.343–347, 2001.

SCHWARZ, K. B. Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radic. Biol. Med.*, v.21, p.641-649, 1996.

SCUDELLER, V.V. *A tribo Bignoniaceae Spreng. (Bignoniaceae) no parque estadual do Rio Doce*. 1997. Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais. 214p.

SEMPLE, S. J.; REYNOLDS, G. D.; O'LEARY, M. C.; FLOWER, R. L. Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. *J. Ethnopharmacol.*, v.60, p.163–172, 1998.

SEMPLE, S. J.; NOBBS, S. F.; PYKE, S. M.; REYNOLDS, G. D.; FLOWER, R. L. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian aboriginal medicine. *J. Ethnopharmacol.*, v.68, p.283–288, 1999.

SEMPLE, S. J.; PYKE, S. M.; REYNOLDS, G. D.; FLOWER, R. L. P. *In vitro* antiviral activity of the anthraquinone chrysophanic acid against poliovirus. *Antiviral Res.*, v.49, n.3, p.169-178, 2001.

SENDL, A.; CHEN, J. L.; JOLAD, S. D.; STODDART, D.; ROZHON, E.; KERNAN, M. Two new naphthoquinones with antiviral activity from *Rhinacanthus nasutus*. *J. Nat. Prod.*, v.59, n.8, p.808-811, 2006.

SILVA, M. DE A.; SOUZA FILHO, J. D.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. *Estudo fitoquímico de espécies vegetais de uso em medicina popular, monitorado por testes in vitro de atividade antiviral*. Relatório Técnico para Exame de Qualificação, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, 1998.

SILVA, P. *Farmacologia*. 7 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006, 1398p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro: Ed. Livros Técnicos e Científicos, 2005, 490p.

SIMONI, I. C. *Tratamentos antivirais*. *Biológico*, V.65, n.1, p.41-44, 2003.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*, 2 ed., New York: John Wiley & Sons, Inc, 1997, 800p.

SON, D. J.; LIM, Y.; PARK, Y. H.; CHANG, S. K.; YUN, Y. P.; HONG, J. T.; TAKEOKA, G. R.; LEE, K. G.; LEE, S. E.; KIM, M. R.; KIM, J. H.; PARK, B. S. Inhibitory effects of *Tabebuia impetiginosa* inner bark extract on platelet aggregation and vascular smooth muscle cell proliferation through suppressions of arachidonic acid liberation and ERK1/2 MAPK activation. *J. Ethnopharmacol.*, v.108, n.1, p.148-51, 2006.

SUFFREDINI, I. B.; PACIÊNCIA, M. L. B.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. *In vitro* cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. *Fitoterapia*, v. 78, p.223–226, 2007.

TAYLOR, R. S. L.; MANANDHAR, N. P.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral activities of nepalese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, v.52 p.157-163, 1996.

TWENTYMAN, P. R., LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. *British J. Cancer*, v. 56, p. 279-285, 1987.

TYLER, V. E. Natural products and medicine: an overview. In: BALICK, M.J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, S.A., eds. *Medicinal resources of the tropical forest, biodiversity and its importance to human health*. New York: Columbia University Press, 1996, p.3-10.

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. *Quím. Nova*, v.32, n.5, p. 1245-1252, 2009.

VERMA, P. R.; DESHPANDE, A. S.; RANGARI, V. D. Antinociceptive activity of aqueous extract of *Pachyptera hymenaea* (DC.) in mice. *J. Ethnopharmacol.*, v.112, n.1, p.203-6, 2007.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. The natural products and the modern medicinal chemistry. *Quím. Nova*, v.29, n.2, 326-337, 2006.

VLIETINCK, A. J.; VAN HOOFF, A. L.; TOTT, J.; LASURE, A.; VANDEN BERGHE, A. D.; RWANGABO, P. C.; MVUKIYUMWAMI, J. Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *J. Ethnopharmacol.*, v.46, p. 31-47, 1995.

VOLPATO, A. M. M. *Avaliação do potencial antibacteriano de Calendula officinalis (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico*. Tese apresentada ao Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, 2005, 115p.

VON POSER, G. L.; SCHRIPSEMA, J.; HENRIQUES, A. T.; JENSEN, S. R. The distribution of iridoids in Bignoniaceae. *Biochem. Syst. Ecol.*, v.28, 351-366, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E. M. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer, 1984, 320p.

WARASHINA, T.; NAGATANI, Y.; NORO, T. Constituents from the Bark of *Tabebuia impetiginosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, v.54, n.1, p.14-20, 2006.

WENCZENOVICZ, T. J. *Montanhas que Furam as Nuvens! Imigração Polonesa em Áurea*. 2002. 151f. Dissertação (História Regional; Processos de ocupação do espaço e movimento sociais). Universidade de Passo Fundo, Passo fundo, 2002.

YAMASAKI, K.; HASHIMOTO, A.; KOKUSENYA, Y.; MIYAMOTO, T.; SATO, T. Protective effects of methanol extracts of crude drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, v.42, p.1663-1665, 1994.

YANG, S. S.; GRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; BADER, J. P. Natural product-based anti-HIV drug discovery and development facilitated by the NCI Developmental. *J. Nat. Prod.*, v.64, n.2, p.265-277, 2001.

YASUMURA, Y.; KAWAKITA, M. The search for SV40 by means of tissue culture methods. *Nippon Rinsho*, v. 21, p. 1201-1219, 1963.

YIM, E. K.; LEE, M. J.; LEE, K. H.; UM, S. J.; PARK, J. S. Antiproliferative and antiviral mechanisms of ursolic acid and dexamethasone in cervical carcinoma cell lines. *Int. J. Gynecol. Cancer*, v.16, n.6, p.2023-2031, 2006.

YIM, S.; KIM, H. J.; LEE, I. A. polyacetilene and flavonoids from *Cirsium rhinoceros*. *Arch. Pharm. Res.*, v.26, n.2, p.128-131, 2003.

YOO, Y.; NAM, J.; KIM, M.; CHOI, J.; PARK, H. Pectolinarin and pectolinarigenin of *Cirsium setidens* prevent the hepatic injury in rats caused by D-Galactosamine via an antioxidant mechanism. *Biol. Pharm. Bull.*, v.31, n.4, p.760-764, 2008.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; FILHO, V. C. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. *Quim. Nova*, V.24, n.1, p.147-152, 2001.

ZHU, H.; ZHANG, Y.; YE, G.; LI, Z.; ZHOU, P.; HUANG, C. *In vivo* and *in vitro* antiviral activities of calycosin-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside against Coxsackie Virus B3. *Biol. Pharm. Bull.*, v.32, p.68-73, 2009.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.  
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.  
This page will not be added after purchasing Win2PDF.