

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE
ANTIBACTERIANOS DE PLANTAS DO
MUNICÍPIO DE LAVRAS**

ALINE CARVALHO PEREIRA

2006

ALINE CARVALHO PEREIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS DE
PLANTAS DO MUNICÍPIO DE LAVRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica e Agrobioquímica para a obtenção do título de “Mestre”.

Orientador:
Prof. Dr. Denilson Ferreira Oliveira

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca Central da UFLA**

Pereira, Aline Carvalho.

Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do Município de Lavras / Aline Carvalho Pereira. -- Lavras : UFLA, 2006.

206 p. : il.

Orientador: Denilson Ferreira Oliveira

Dissertação (Mestrado) – UFLA.

Bibliografia.

1. Plantas. 2. Antibacterianos. 3. *Copaífera langsdorffii*. 4. *Lantana lilacina*. 5. *Solanum aculeatissimum*. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD-630.24
-632.953

ALINE CARVALHO PEREIRA

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS DE
PLANTAS DO MUNICÍPIO DE LAVRAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica e Agrobioquímica para a obtenção do título de “Mestre”.

APROVADA em 23 de fevereiro de 2006

Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro UNESP

Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo UFLA

Prof. Dr. Matheus Puggina de Freitas UFLA

Prof. Dr. Denilson Ferreira Oliveira - UFLA
(Orientador)

LAVRAS
MINAS GERAIS – BRASIL

AGRADECIMENTOS

Meu Deus, obrigada por ter me iluminado neste percurso que está sendo concluído. Obrigada pelas vitórias e também pelas derrotas e dificuldades superadas que me fizeram aprender muito. Obrigada pela oportunidade de conhecer e conviver com pessoas maravilhosas.

Agradeço a todos os meus familiares, pelo apoio e compreensão, em especial aos meus pais Rui e Tereza e ao meu irmão Lucas.

Agradeço aos professores orientadores Denilson e Henrique, pela atenção, paciência, amizade e por estarem sempre prontos para ajudar. Agradeço em especial ao Denilson, pela dedicação.

Obrigada ao professor Alberto e, em especial ao Geraldo, em Araraquara, que nos ajudaram a finalizar os experimentos.

Obrigada aos demais professores e a todos os outros envolvidos, mesmo indiretamente, mas indispensáveis à realização deste trabalho.

Obrigada ao pessoal do Departamento de Medicina Veterinária, em especial à Dircéia, que muito me ajudou na realização dos testes antibacterianos.

Obrigada a todos os funcionários do Departamento de Química e a todos os colegas, pela amizade.

Minha gratidão ao pessoal do laboratório de produtos naturais, com os quais compartilhei momentos muito agradáveis ao longo deste período, muito obrigada a todos, por tudo mesmo! Agradeço em especial ao Hudson, Aline, Sandro e Greiciele, que me ajudaram diretamente nos experimentos.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
CAPÍTULO 1 Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do município de Lavras	1
1 Introdução geral	2
....	
2 Referencial teórico	6
2.1 Agentes Antibacterianos.....	6
2.2 Demanda por novos antibacterianos.....	7
3 Referências bibliográficas	10
CAPÍTULO 2 Identificação de plantas com potencial antibacteriano	11
Resumo	12
Abstract	13
1 Introdução	14
2 Referencial teórico	15
2.1 Plantas com propriedades antibacterianas.....	15
2.2 Substâncias de origem vegetal com atividades antibacterianas.....	17
3 Materiais e métodos	21
3.1 Materiais utilizados	21
3.2 Coleta de material botânico	21
3.3 Preparo de extratos brutos	21
3.4 Testes <i>in vitro</i> para identificar a atividade antibacteriana	22
4 Resultados e discussão	25
5 Conclusões	33
6 Referências bibliográficas	34
CAPÍTULO 3 Fracionamento do extrato de <i>Copaifera langsdorffii</i> direcionado por testes para detectar atividade antibacteriana	40
Resumo	41
Abstract	42
1 Introdução	43
2 Referencial teórico	44
3 Materiais e métodos	47
3.1 Materiais e equipamentos utilizados	47
3.2 Coleta de material botânico	47
3.3 Preparação do extrato bruto para ser purificado	48
3.4 Fracionamento em pequena escala	48
3.5 Testes para verificar a atividade antibacteriana.....	48
3.6 Fracionamento em grande escala	48
3.7 Cromatografia em camada delgada	49

3.8 Fração solúvel em hexano	50
3.9 Fração solúvel em acetato de etila	54
3.10 Fração solúvel em metanol	54
3.11 Destilação do extrato bruto de <i>C. langsdoffii</i>	57
4 Resultados e discussão	58
4.1 Fracionamento em pequena escala	58
4.2 Fracionamento em grande escala	59
4.3 Fração solúvel em hexano	61
4.4 Fração solúvel em acetato de etila	67
4.5 Fração solúvel em metanol	69
4.6 Destilação do extrato bruto de <i>C. langsdoffii</i>	73
5 Conclusões	78
6 Referências bibliográficas	79
CAPÍTULO 4 Purificação e identificação de substância com atividade antibacteriana de <i>Lantana lilacina</i>	81
Resumo	82
Abstract	83
1 Introdução	84
2 Referencial teórico	85
3 Materiais e métodos	90
3.1 Materiais e equipamentos utilizados	90
.....	
3.2 Coleta de material botânico	91
3.3 Preparação do extrato bruto para ser purificado	91
3.4 Fracionamento em pequena escala	91
3.5 Testes para verificar a atividade antibacteriana	91
3.6 Fracionamento em grande escala	91
3.7 Primeira cromatografia líquida em coluna de sílica-gel	92
3.8 Cromatografia em camada delgada	92
3.9 Segunda cromatografia líquida em coluna de sílica-gel	92
3.10 Cromatografia líquida de alta eficiência	93
3.11 Identificação das substâncias isoladas	95
3.12 Testes de microdiluição em caldo	96
4 Resultados e discussão	97
4.1 Fracionamento em pequena escala	97
4.2 Fracionamento em grande escala	98
4.3 Primeiro fracionamento por cromatografia em coluna de sílica-gel	99
4.4 Segundo fracionamento por cromatografia em coluna de sílica-gel	100
4.5 Análise e fracionamento em cromatografia líquida de alta eficiência	100
4.6 Identificação das substâncias isoladas	107
4.7 Testes de microdiluição em caldo	115
5 Conclusões	118

6 Referências bibliográficas	119
CAPÍTULO 5 Purificação e identificação de substâncias de <i>Solanum aculeatissimum</i> com atividade antibacteriana	123
Resumo	124
Abstract	125
1 Introdução	126
2 Referencial teórico	127
3 Materiais e métodos	131
3.1 Materiais e equipamentos utilizados.....	131
3.2 Coleta de material botânico.....	132
3.3 Preparação do extrato bruto para ser purificado.....	132
3.4 Fracionamento em pequena escala.....	132
3.5 Testes para verificar a atividade antibacteriana.....	132
3.6 Fracionamento em grande escala.....	132
3.7 Primeira cromatografia em coluna de sílica-gel.....	133
3.8 Primeira cromatografia em coluna de Amberlite xad-16.....	133
3.9 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	134
3.10 Segunda cromatografia em coluna de Amberlite xad-16.....	134
3.11 Fracionamento em CLAE.....	134
3.12 Cromatografia em coluna de sílica-C18 e análise em CLAE.....	134
3.13 Segunda etapa do fracionamento em CLAE.....	134
3.14 Identificação das substâncias isoladas.....	134
3.15 Testes de microdiluição em caldo.....	135
4 Resultados e discussão	140
4.1 Fracionamento em pequena escala.....	140
4.2 Fracionamento em grande escala.....	141
4.3 Primeira cromatografia em coluna de sílica-gel.....	142
4.4 Primeira cromatografia em coluna de Amberlite xad-16.....	143
4.5 Segunda cromatografia em coluna de Amberlite xad-16.....	144
4.6 Fracionamento por CLAE da fração metanólica proveniente da coluna de Amberlite xad-16.....	144
4.7 Fracionamento por CLAE da fração metanólica proveniente da coluna de sílica-gel.....	152
4.8 Identificação das substâncias isoladas.....	154
4.9 Teste de microdiluição em caldo.....	158
5 Conclusões	161
6 Referências bibliográficas	162
Conclusões gerais	165
Anexos	167
Anexos A.....	167
Anexos B.....	192

RESUMO

PEREIRA, Aline Carvalho. **Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do município de Lavras.** 2006. 206 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Extratos metanólicos de 30 plantas coletadas no município de Lavras (MG) foram submetidos ao teste antibacteriano contra cepas de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pela técnica de difusão em ágar. Destes, treze extratos mostraram-se ativos contra ao menos uma das bactérias empregadas e foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo visando determinar as concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM). Os valores de CIM variaram de 0,625 a 5,00 mg/mL e os valores de CBM de 1,25 a 5,00 mg/mL. Dentre as plantas que apresentaram atividade antibacteriana, *Copaifera langsdorffii*, *Lantana lilacina* e *Solanum aculeatissimum* foram selecionadas e submetidas ao processo de purificação biodirecionado por testes *in vitro* contra as supracitadas bactérias, objetivando identificar as substâncias responsáveis por tal atividade. As substâncias foram isoladas por métodos cromatográficos e identificadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. Do extrato metanólico das folhas de *L. lilacina* foi isolada uma estrutura composta por uma unidade de glicose, uma de ramnose, uma de ácido cafeico e uma de tirosol, denominada acteosídeo, que CIM e CBM de 0,125 mg/mL para *A. hydrophila*, 1,0 mg/mL para *P. aeruginosa*, 0,250 mg/mL para *S. aureus* e ambas maiores que 1,0 mg/mL para *B. subtilis*. Do extrato metanólico de *S. aculeatissimum* foram isoladas rutina e outras substâncias ainda não identificadas completamente. A CIM de rutina para *A. hydrophila* foi igual a 1,0 mg/mL e para as demais bactérias foi maior que 1,0 mg/mL; a CBM foi maior que 1,0 mg/mL para todas as bactérias avaliadas. De *C. langsdorffii* foram isoladas duas substâncias sem atividade antibacteriana, cujas estruturas ainda não foram elucidadas.

* Comitê Orientador: Denilson Ferreira Oliveira – UFLA (orientador); Henrique C. Pereira Figueiredo – UFLA.

ABSTRACT

PEREIRA, Aline Carvalho. **Purification and identification of antibacterials from Lavras city plants.** 2006. 206 p. Dissertation (Master Program in Agrochemistry and Agrobiotechnology) – Federal University of Lavras, Lavras, Minas Gerais, Brazil.*

Screening of 30 methanol extracts from plants collected in Lavras city (MG) was conducted using the agar diffusion method to identify antibacterial properties against *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. It was observed that 13 of them presented antibacterial activity. These extracts were submitted to broth microdilution assay to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). MIC values varied from 0.625 to 1.25 mg/mL, while MBC values varied from 1.25 to 5.00 mg/mL. Among the active plants, *Copaifera langsdorffii*, *Lantana lilacina* and *Solanum aculeatissimum* were selected and submitted to purification processes guided by *in vitro* assay with the bacteria cited above to identify the antibacterial compounds. Substances were isolated by chromatographic methods and their chemical structures were identified by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. From *L. lilacina* methanol extract was isolated a structure with a glucose, rhamnose, caffeoyl and hydroxytyrosol unit, that was named acteoside. MIC and MBC of such substance against *A. hydrophila*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* were 0.125 mg/mL, 1.00 mg/mL, 0.250 mg/mL and higher than 1.0 mg/mL, respectively. From the methanol extract of *S. aculeatissimum* were isolated rutin and other substances that were not identified yet. MIC and MBC of rutin were 1.0 mg/mL and higher than 1.0 mg/mL, respectively, against *A. hydrophila* and both higher than 1.0 mg/mL against *B. subtilis*, *P. aeruginosa* and *S. aureus*. From *C. langsdorffii* were isolated two substances that are under study to identify their structures.

* Guidance Committee: Denilson Ferreira Oliveira - UFLA (Advisor), Henrique C. Pereira Figueiredo – UFLA

CAPÍTULO 1

PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ANTIBACTERIANOS DE PLANTAS DO MUNICÍPIO DE LAVRAS

1 INTRODUÇÃO GERAL

O triunfo dos antibióticos sobre as bactérias patogênicas é uma das mais bem sucedidas histórias da medicina moderna. Desde a Segunda Guerra Mundial, época em que essas drogas tornaram-se amplamente usadas, inúmeras vidas foram salvas. Hoje, grande parte dos pacientes hospitalizados é tratada com um ou mais cursos de antibioticoterapia e milhões de infecções potencialmente fatais foram assim curadas (Goodman, 1996).

Há várias classes de antibióticos disponíveis para uso clínico, como penicilinas, cefalosporinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina, quinolonas e sulfonamidas; porém, muitas doenças infecciosas vêm tornando-se de difícil tratamento. Entre outras causas deste problema, o uso incorreto dos antibióticos e o surgimento de microrganismos resistentes às drogas atualmente disponíveis são relevantes.

O desenvolvimento de resistência é um fenômeno biológico natural, que se seguiu à introdução de antimicrobianos na prática clínica, sendo acentuado pelo uso desmedido e irracional desses agentes. A resistência bacteriana é preocupação mundial e, dentre as medidas que devem ser tomadas para evitá-la ou diminuí-la, está o desenvolvimento de novos medicamentos. A demanda por novos antimicrobianos também é decorrência do alto custo e dos inúmeros efeitos colaterais das drogas atualmente disponíveis (Wannmacher, 2004). Como as plantas produzem inúmeras substâncias biologicamente ativas, tem-se nos produtos de origem vegetal uma fonte importante de recursos.

As espécies vegetais estão aptas a produzir uma grande variedade de compostos oriundos de seu metabolismo secundário, como alcalóides, saponinas, flavonóides e taninos. Apesar do desenvolvimento nas áreas de síntese orgânica, microbiologia industrial e biologia molecular, parte dos

fármacos permanece sendo obtida a partir de matérias-primas vegetais, seja pela dificuldade em obter sinteticamente moléculas com a mesma estereoquímica, seja pela inviabilidade econômica. Uma lista ilustrativa de fármacos com importância terapêutica atual, obtidos exclusivamente de matérias-primas vegetais, é apresentada na Tabela 1 (Schenkel et al.,1999).

TABELA 1: Exemplos de fármacos obtidos a partir de matérias-primas vegetais.

Fármaco	Classe terapêutica	Espécie vegetal
Artemisinina	antimalárico	<i>Artemisia annua</i> L.
Atropina	anticolinérgico	<i>Atropa belladonna</i> L.
Capsaicina	anestésico tópico	<i>Capsicum</i> spp.
Colchicina	Anti-reumático	<i>Colchicum autumnale</i> L.
Digoxina, digitoxina	glicosídeos cardíacos	<i>Digitalis purpúrea</i> L., <i>D. lanata</i> Ehrhart
Escopolamina	antiparkinsoniano	<i>Datura</i> spp.
Emetina	antiamebiano	<i>Cephaelis ipecacuanha</i> (Brot) A.Rich.
pilocarpina	antiglaucomatoso	<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes
Morfina, codeína	analgésico, antitussígeno	<i>Papaver somniferum</i> L.
Quinina	antimalárico	<i>Cinchona</i> spp.
Reserpina	anti-hipertensivo	<i>Rauwolfia</i> spp.
Tubocurarina	bloqueador neuromuscular	<i>Chondodendron tomentosum</i> Ruiz e Pavon
Vimblastina, Vincristina	antitumorais	<i>Catharanthus roseus</i> G. Don

(Schenkel et al.,1999).

De acordo com Dias (1996), citado por Nodari e Guerra(1999), o Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas. Muitos trabalhos já foram realizados e pode-se dizer que o estado de Minas Gerais se destaca pela sua riqueza em recursos

vegetais, possuindo várias espécies com diversas atividades farmacológicas e portanto, grande potencial na área de produtos para usos medicinais. Especificamente na região onde se localiza o município de Lavras, sul de Minas Gerais, Rodrigues e Carvalho (2001) realizaram um levantamento etnofarmacobotânico para obterem informações das espécies nativas e colonizadoras ali utilizadas na medicina popular. Algumas destas espécies estão listadas na Tabela 2. Dentre os dados coletados, observou-se que, apesar do considerável potencial, há várias espécies que ainda não foram submetidas a qualquer estudo objetivando aproveitar suas qualidades.

TABELA 2: Plantas medicinais utilizadas no controle de enfermidades no Sul de Minas Gerais.

Usos	Plantas utilizadas
Diurético e na diabetes	Carqueja (<i>Baccharis trimera</i>) Unha-de-vaca (<i>Bauhinia holophylla</i>) Jurubeba (<i>Solanum paniculatum</i>)
Anti-hemorroidal	Melão-de-são-caetano (<i>Momordica charantia</i>) Verbasco (<i>Buddleja brasiliensis</i>)
Depurativo, anti-inflamatório e anti-sifilítico	Canela-de-perdiz (<i>Croton atisyphiliticus</i>) Japécanga (<i>Smilax campestris</i>) Cipó-prata (<i>Banisteriopsis argyrophylla</i>)
Estomáquica	Bolsa-de-pastor (<i>Zeyheria digitalis</i>) Quina-mineira (<i>Strychnos brasiliensis</i>)
Na asma, bronquite, tosse, pneumonia, expectorante	Assa-peixe, (<i>Vernonia polyanthes</i>) Cambará-vermelho (<i>Lantana camara</i>) Hortelã-do-campo (<i>Peltodon tomentosus</i>)
Vermífugo	Pequi (<i>Caryocar brasiliense</i>) Carqueja (<i>Baccharis trimera</i>) Raiz-preta (<i>Senna rugosa</i>) Hortelã-do-campo (<i>Peltodon tomentosus</i>)

(Rodrigues e Carvalho, 2001).

Em decorrência, o objetivo inicial deste trabalho foi identificar plantas do município de Lavras, Minas Gerais, que produzem substâncias com propriedades antibacterianas. A seguir, buscou-se purificar e identificar as substâncias responsáveis por tal atividade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Agentes antibacterianos

Antibacterianos são substâncias que provocam morte ou inibição do crescimento de bactérias. Podem ser de origem natural ou sintética e estão entre os fármacos mais utilizados pelos médicos. Foram identificados milhares de antibacterianos e muitos deles já atingiram o estágio em que se tornaram valiosos na terapia de doenças infecciosas. Diferem acentuadamente nas suas propriedades físicas, químicas e farmacológicas, no espectro e no modo de ação. O conhecimento dos mecanismos moleculares da replicação das bactérias facilitou enormemente o desenvolvimento racional de compostos capazes de interferir nos ciclos vitais desses microrganismos. Além disso, fez com que o mecanismo de ação se tornasse o parâmetro mais comum na classificação dos antibacterianos (Goodman, 1996):

- 1) agentes que inibem a síntese da parede celular bacteriana: penicilinas (Figura 1) e cefalosporinas;
- 2) agentes que atuam diretamente sobre a membrana celular do microrganismo, afetando sua permeabilidade e resultando no extravasamento de compostos intracelulares: incluem os detergentes como a polimixina;
- 3) agentes que causam inibição da síntese protéica: cloranfenicol (Figura 1), tetraciclinas (Figura 1), eritromicina, clindamicina e aminoglicosídeos;
- 4) agentes que afetam o metabolismo dos ácidos nucleicos, como as rifamicinas e as quinolonas;
- 5) antimetabólicos : agentes que bloqueiam etapas metabólicas

específicas, essenciais aos microrganismos, como trimetoprima e as sulfonamidas (Figura 1)

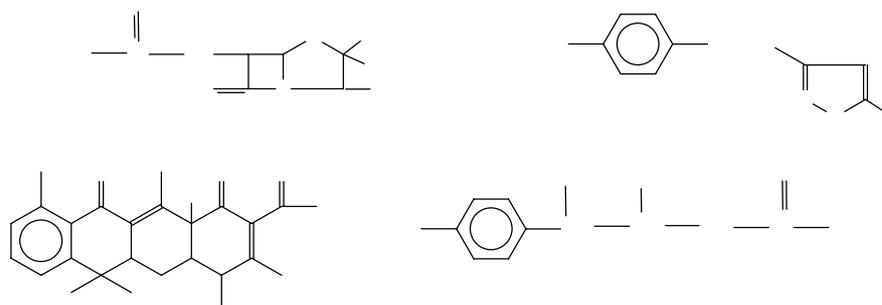


FIGURA 1: Estruturas de algumas classes de antibacterianos.

2.2 Demanda por novos antibacterianos:

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças infecciosas causam 25% das mortes em todo o mundo, chegando a 45% nos países menos desenvolvidos. Os antimicrobianos correspondem a 12% de todas as prescrições ambulatoriais. Isso gera um dispêndio de 15% dos 100 bilhões de dólares gastos anualmente com medicamentos. Nos Estados Unidos, há prescrições de 25 mil toneladas de antibióticos por ano, das quais apenas cerca de 50% se destinam a pacientes. O restante é utilizado em animais, rações, agricultura e aquicultura (Wannmacher, 2004).

Nos Estados Unidos, calcula-se que 50% do uso de antimicrobianos é inadequado, havendo automedicação e erros de prescrição. A grande disponibilidade de antibacterianos acentua o uso abusivo, trazendo como conseqüência o surgimento de efeitos colaterais e de cepas bacterianas resistentes, o que aumenta os gastos e dificulta o tratamento (Wannmacher, 2004).

O desenvolvimento de resistência refere-se à capacidade de cepas bacterianas multiplicar-se em concentrações de antibacterianos mais altas que as que provêm de doses terapêuticas dadas aos seres humanos (Wannmacher, 2004).

A resistência bacteriana ocorre devido a inúmeros mecanismos complexos e ainda não completamente entendidos. Algumas bactérias são capazes de evitar a rota metabólica inibida por sulfonamidas e trimetoprima. A inativação enzimática ocorre com quase todos os *Staphylococcus aureus*, os quais produzem beta-lactamases que degradam a penicilina. De forma similar, 90% dos isolados clínicos de *Moraxella catarrhalis*, patógeno responsável por infecções respiratórias comunitárias, produzem beta-lactamase, que degrada penicilina, amoxicilina, ampicilina e outros beta-lactâmicos. Os aminoglicosídeos e o cloranfenicol também são inativados por enzimas específicas. *Acinetobacter calcoaceticus*, *Enterococcus faecalis*, *Haemophilus influenza*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus* spp. possuem capacidade de alterar o sítio de ação dos antibióticos. Este é o mecanismo responsável pela resistência a aminoglicosídeos, macrolídeos, tetraciclina e quinolonas. As bactérias podem tornar-se resistentes à ação dos antimicrobianos devido a alterações no transporte do antibiótico através da membrana bacteriana. Esse mecanismo é mais comum em bactérias gram-negativas do que em bactérias gram-positivas, pois a principal barreira à difusão de antibióticos na célula bacteriana é a membrana externa, estrutura inexistente em organismos gram-positivos (Barros et al., 2001).

O aparecimento mundial de *Haemophilus* sp. e gonococos que produzem beta-lactamase constitui um grave problema terapêutico. As cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina encontram-se amplamente distribuídas em hospitais e estão sendo cada vez mais isoladas de infecções adquiridas na comunidade. Existem cepas de *Enterococcus* sp., *Pseudomonas*

sp. e *Enterobacter* sp. resistentes a todos os fármacos conhecidos. Nos EUA foram relatadas epidemias de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* multirresistentes (Goodman, 1996).

A resistência bacteriana é preocupação mundial e vem causando grande impacto sobre mortalidade, morbidade e custos com a saúde. Dentre as medidas que devem ser tomadas para evitá-la ou diminuí-la, estão a promoção do uso racional de antibacterianos, a implementação de medidas de controle de infecções e o desenvolvimento de novos medicamentos (Wannmacher, 2004).

Além dos problemas de resistência, os antibacterianos também podem apresentar efeitos colaterais indesejados, como vômito, diarreia, náusea, reações de hipersensibilidade (penicilinas), discrasias sanguíneas (cloranfenicol) e hepatotoxicidade (eritromicina). Rifampicina, isoniazida e etambutol são algumas das drogas com ação sobre *Mycobacterium tuberculosis*, agente causador da tuberculose, que apresentam efeitos tóxicos, dificultando a adesão ao tratamento pelo paciente e facilitando o surgimento de resistência. Nefrotoxicidade e ototoxicidade são efeitos tóxicos graves causados pelos aminoglicosídeos (neomicina, por exemplo), limitando a utilização desses agentes (Goodman, 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, E. et al **Antimicrobianos: consulta rápida**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed Editora. 2001. 428 p.

DIAS, B.F.S. A implementação da convenção sobre diversidade biológica no Brasil: desafios e oportunidades. Campinas: André Tosello, 1996. 10p. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 1999. Cap.1,.

GOODMAN, A.G. et al. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9.ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana. 1996. Cap.43.

NODARI, R.O., GUERRA, M.P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos legais e éticos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. Cap.1, p.11.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA. 2001. 180p.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 1999. Cap.15, p.306.

WANNMACHER, L. **Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida?** Brasília, 2004. v.1,n.4. (Boletim de Saúde, 4).

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO DE PLANTAS COM POTENCIAL ANTIBACTERIANO

RESUMO

PEREIRA, Aline Carvalho. Identificação de plantas da região de Lavras com atividade antibacteriana. In: **Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do município de Lavras**. 2006. Cap. 2. p. 11-39. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Extratos metanólicos de 30 plantas coletadas no município de Lavras foram submetidos ao teste antibacteriano contra cepas de *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, pela técnica de difusão em ágar. Destes, 13 extratos mostraram-se ativos contra ao menos uma das bactérias empregadas e foram submetidos ao teste de microdiluição, para determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM). Os valores de CIM variaram de 0,625 a 5,00 mg/mL e os valores de CBM foram de 1,25 a 5,00 mg/mL. Nenhum dos extratos testados apresentou atividade frente a *P. aeruginosa*.

* Comitê Orientador: Denilson Ferreira Oliveira – UFLA (orientador); Henrique C. Pereira Figueiredo - UFLA

ABSTRACT

PEREIRA, Aline Carvalho. Identification of plants on Lavras city with antibacterial activity. In: **Purification and identification of antibacterials from Lavras city plants**. 2006. Cap. 2. p. 11-39. Dissertation (Master Program in Agrochemistry and Agrobiochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

Antibacterial screening of 30 methanol extracts from plants collected in Lavras city was conducted using the agar diffusion method to identify antibacterial properties against *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. It was observed that 13 extracts presented antibacterial activity. These extracts were submitted to broth microdilution assay to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC). MIC values varied from 0.625 to 1.25 mg/mL, while MBC values varied from 1.25 to 5.00 mg/mL. None of the tested extracts was able to inhibit *P. aeruginosa* growth.

* Guidance Committee: Denilson F. Oliveira - UFLA (Advisor), Henrique C. Pereira Figueiredo - UFLA

1 INTRODUÇÃO

O grande número de agentes antibacterianos disponíveis no mercado não tem sido suficiente para suprir as exigências terapêuticas. O tratamento de muitas doenças infecciosas que até então era relativamente fácil, vem sendo dificultado, principalmente, pelo surgimento de bactérias resistentes às drogas atualmente empregadas nestes casos.

O desenvolvimento de resistência tem sido acentuado pelo uso inadequado desses agentes em prescrições médicas, na agricultura, em rações e na prática de automedicação. A resistência bacteriana é preocupação mundial, sendo alvo de muitas pesquisas nas últimas décadas.

Medidas devem ser tomadas para diminuir o problema, que se associa ainda ao alto custo e aos inúmeros efeitos colaterais destas drogas. O desenvolvimento de novos medicamentos representa uma importante estratégia para contornar estes fatores, sendo os produtos de origem vegetal fonte primordial de recursos. Inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos em todo o mundo com o intuito de identificar plantas ou substâncias com propriedades antibacterianas.

Sabendo-se do potencial que o Brasil, especificamente o estado de Minas Gerais, apresenta como fonte de matérias-primas de origem vegetal, neste trabalho buscou-se identificar plantas do município de Lavras, Sul de Minas Gerais, com potencial antibacteriano.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Plantas com propriedades antibacterianas

Desde a Antiguidade, o homem vem usando as plantas para tratar doenças infecciosas e alguns desses tratamentos tradicionais ainda são empregados em várias enfermidades. De acordo com Heinrich et al. (2004), mencionado por Rios e Reccio (2005), o uso de *Arctostaphylos uva-ursi* e *Vaccinium macrocarpon* para tratar infecções do trato urinário é citado em diferentes manuais de fitoterapia, enquanto espécies como *Melissa officinalis*, *Allium sativum* e *Melaleuca alternifolia* são descritas como agentes antimicrobianos de amplo espectro.

Os extrativos vegetais representam uma fonte promissora de substâncias com propriedades antibacterianas de grande importância clínica. Sendo assim, muitos estudos têm sido conduzidos em diferentes países para provar tal eficiência. Um estudo científico sistemático foi realizado na Jamaica, por exemplo, analisando o potencial antibacteriano de plantas comumente utilizadas na medicina tradicional. Os testes foram realizados com *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* grupo A, mostrando que 25% das plantas estudadas possuíam atividade antibacteriana (Facey et al., 1999).

Também pode ser citado o trabalho realizado na Palestina, onde 15 plantas medicinais foram submetidas a testes *in vitro* com *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. Observou-se que oito plantas apresentaram potencial atividade, destacando-se *Thymus vulgaris* (Essawi e Srour, 2000).

Palombo e Semple (2002) avaliaram cinco plantas australianas com

potencial contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, concluindo que a maioria dos extratos apresentou atividade bactericida. O melhor resultado foi obtido com o extrato das folhas de *Eremophila duttonii*.

Aqil e Ahmad (2003) estudaram várias plantas medicinais tradicionais na Índia quanto ao seu potencial antimicrobiano em sete bactérias (gram-positivas e gram-negativas) e seis fungos de isolados clínicos. Os extratos brutos que se mostraram mais promissores foram os de *Bryophyllum pinnatum* (folhas), *Caesalpinia bonducella* (sementes), *Delonix regia* (flores), *Hedychium spicatum* (frutos), *Mangifera indica* (folhas), *Murraya coenigii* (folhas) e *Syzgium cumini* (sementes).

Ainda se pode citar o trabalho de Salvat et al. (2004) que, buscando identificar plantas ativas contra *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, avaliaram 39 plantas nativas da Argentina e obtiveram bons resultados com os extratos de *Astronium balansae*, *Geoffroea decorticans*, *Peltophorum dubium*, *Geoffroea spinosa*, *Lantana balansae*, *Prosopis kuntzei*, *Prosopis ruscifolia* e *Bulnesia sarmientoi*.

Há uma série de produtos farmacêuticos à base de extratos vegetais que foram patenteados. Pode-se citar o trabalho desenvolvido por Groenewald et al. (2005), com espécies do gênero *Coleonema*. A formulação pode ter uso tópico ou oral, como imuno-estimulante, anti-HIV, anti-inflamatória e antibacteriana, sendo útil contra *Mycobacterium tuberculosis*. Outro exemplo é o de uma formulação contendo extratos de plantas das famílias Ebenaceae, Verbenaceae, Leguminosae e Juglandaceae, usada na prevenção de doenças periodontais, que foi patenteada por Lion Corp (Lyo, 1995) e possui intensa atividade contra *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Streptococcus mutans*.

No Brasil, há vários trabalhos avaliando a atividade antibacteriana de espécies vegetais. Suffredini et al. (2004) encontraram resultados promissores ao

submeterem 705 extratos orgânicos e aquosos de plantas da floresta amazônica e da floresta atlântica a testes com *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* encontrou ótimos resultados. Zaneti et al. (2003) constataram o potencial contra bactérias gram-positivas e gram-negativas das frações hexânica e clorofórmica do extrato de *Tropaeolum majus*, planta reconhecida como medicinal. Em investigação do potencial antibacteriano de dez plantas, Nascimento et al. (2000) obtiveram resultados particularmente interessantes com *Punica granatum*, *Syzygium cumini*, *Syzygium aromaticum* e *Thymus vulgaris* contra *Pseudomonas aeruginosa*. Os mesmos autores também observaram que a associação *in vitro* de antibacterianos e extratos de plantas mostrou atividade sinérgica contra bactérias resistentes aos antibacterianos.

Alves et al. (2000), Cota et al. (2002), Lima et al. (2001), Souza et al. (2001), Teletka et al. (2001) & Velozo et al. (2001) também desenvolveram estudos visando identificar plantas com propriedades antibacterianas. Mas, a abrangência de tais trabalhos ainda é pequena se for levada em consideração a grande riqueza da flora brasileira.

2.2 Substâncias de origem vegetal com atividades antibacterianas

Dentre as vantagens da utilização das substâncias ativas isoladas em substituição aos extratos vegetais, podem-se citar a reprodutibilidade dos efeitos, ou seja, a constância da composição, a ausência de qualquer outra substância ativa, maior eficácia, segurança e mesmo a qualidade dos produtos, haja vista a maior facilidade de estabelecer especificações para uma substância única, em relação aos produtos de composição complexa e não conhecida completamente. Isso pode ser exemplificado pela comparação entre o uso de quinina e de extratos de quina (*Cinchona officinalis*), cujo teor, em quinina, é variável de acordo com a região e época de coleta da droga vegetal. Além disso, no extrato de quina há cerca de 30 outros alcalóides minoritários, entre os quais a

quinidina, de ação cardíaca marcante. Estas vantagens são importantes em estudos farmacêuticos, farmacodinâmicos, toxicológicos, farmacocinéticos e clínicos, indispensáveis para se chegar a um novo medicamento (Schenckel et al., 1999).

São vários os trabalhos buscando purificar e identificar as substâncias de origem vegetal com propriedades antibacterianas, que apresentam grande diversidade estrutural, físico-química e biológica. Rauha et al. (2000) demonstraram que quercetina, substância da classe dos flavonóides (compostos fenólicos, oriundos do metabolismo secundário de vegetais) é capaz de inibir o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*, por meio do teste de difusão em ágar. Cerdeiras et al. (2000) isolaram o principal componente antibacteriano do extrato clorofórmico de *Ibicella lutea*, planta usada na medicina popular do Uruguai como antisséptico em infecções dos olhos e da pele. O composto foi identificado por meio de métodos espectroscópicos, como ácido 11-O-(6'-O-acetil-beta-D-glicopiranosil) esteárico (Figura 1).

Kawazoe et al. (2001) identificaram, da planta *Vitex rotundifolia*, a substância 2-hidroxi-1,9,10-trimetoxi-7-benzo[c]fluorenona-6-carbaldeído (Vitrofolal D) (Figura 1), com atividade antibacteriana. Van der Watt e Pretorius (2001), observando que o extrato metanólico de *Carpobrotus edulis* apresentava intensa atividade *in vitro* contra bactérias patogênicas, isolaram o ácido ferrúlico (Figura 1), dentre outras substâncias ativas.

No Brasil, Morel et al. (2002) extraíram de *Condalia buxifolia*, planta pertencente à família Rhamnaceae, o alcalóide ciclopeptídico denominado condaline-A (Figura 1), com atividade frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas. Savikin-Fodulovic et al. (2003), usando ensaios biodirecionados,

isolaram do extrato lipofílico de *Hypericum atomarium* ssp. *degenii*, uma substância denominada hyperatomarin (Figura 1), que apresenta atividade contra bactérias gram-positivas. Khera et al. (2003) obtiveram, a partir da planta *Caiophora coronata*, um triterpeno pentacíclico, denominado ácido 1 β -3 β -diidroxieursano-12-en-27-óico (Figura 1), ativo contra cepas de *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

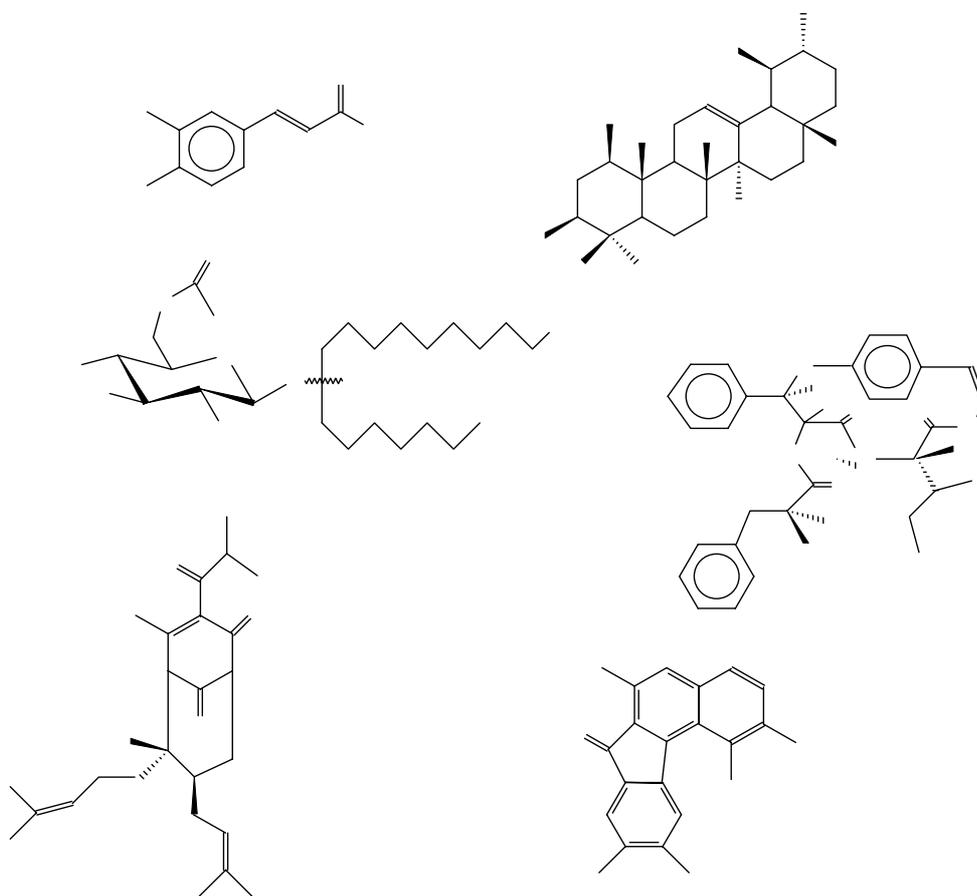


FIGURA 1: Estruturas de substâncias de origem vegetal com propriedades antibacterianas.

Fogliani et al. (2005) isolaram e identificaram, por métodos cromatográficos e espectroscópicos, sete taninos bioativos do extrato metanólico das folhas de *Cunonia macrophylla*. Dentre esses, estava a substância denominada corilagin (Figura 2), capaz de inibir o crescimento de *Corynebacterium accolans*, *Erwinia carotovora* e *S. aureus*. Dois triterpenos pentacíclicos e outras substâncias foram isoladas da casca de *Maesopsis eminii* por Fokou et al. (2004), dentre as quais destaca-se o ácido 1 α ,3 β -diidroxibauer-7-en-28-óico (Figura 2), pela sua moderada atividade contra *B. subtilis*.

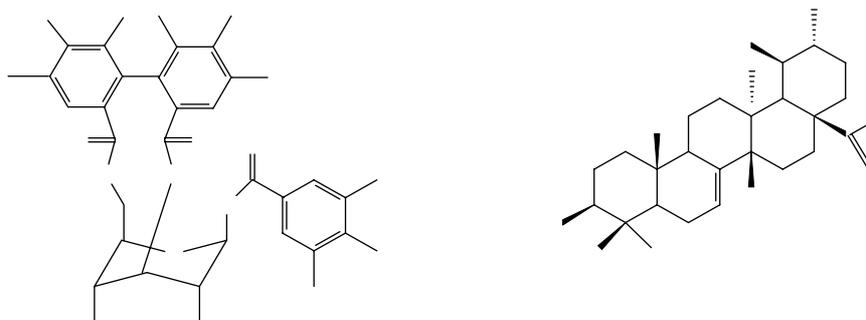


FIGURA 2: Estruturas de um tanino e de um triterpeno pentacíclico, substâncias antibacterianas de origem vegetal.

Optoquina e mefloquina são exemplos de substâncias com propriedades antibacterianas sintetizadas a partir da quinina (*Cinchona officinalis*); as três apresentam atividade frente a *Streptococcus pneumoniae* e foram avaliadas por Martin-Galiano et al. (2002) quanto à capacidade de inibição de *ATPase*. Optoquina é utilizada, atualmente, em testes de sensibilidade *in vitro*, enquanto mefloquina e quinina são usadas em esquemas terapêuticos antimaláricos. Berberina (*Hydrastis canadensis*) possui atividade contra várias bactérias (Knight,1999), mas, é tóxica ao homem.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais utilizados

Meios de cultura: TSA (do inglês *tryptic soy agar*, Acumedia, USA), ágar Mueller-Hinton (Merck, Alemanha) e caldo Mueller-Hinton (Biolife, Itália); solução salina (0,85 g de cloreto de sódio P.A./100 mL água destilada), placas de Petri (95 mm x 15 mm), etanol P.A., água destilada, água deionizada para preparar soluções de cloreto de cálcio P.A. e cloreto de magnésio P.A., cloranfenicol (Sigma, USA) e membrana esterilizante (membrana GV Durapore em PVDF, diâmetro do poro = 0,22 µm, Milipore).

3.2 Coleta de material botânico

O material botânico foi coletado no município de Lavras, Minas Gerais e levado ao Laboratório de Produtos Naturais, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), onde teve início o processamento para a identificação dos princípios ativos.

Uma amostra foi encaminhada ao Departamento de Biologia (UFLA) para identificação botânica por meio de comparações com exsiccatas no Herbário ESAL e consultas a especialistas e obras clássicas.

3.3 Preparo de extratos brutos

O material vegetal fresco foi picado e imerso em metanol durante 48 horas. Essa mistura foi filtrada em algodão, dando origem ao resíduo e ao filtrado. O resíduo foi imerso em mais metanol durante 48 horas, dando origem a um novo resíduo e a um novo filtrado. Este, adicionado ao filtrado anterior,

originou uma solução, que foi concentrada em evaporador rotatório e, em seguida, liofilizada. O resíduo seco resultante de tal liofilização foi empregado nos testes.

3.4 Testes *in vitro* para identificar a atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana foi avaliada em quatro cepas bacterianas, sendo duas gram-positivas (*Bacillus subtilis* ATCC 6633 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) e duas gram-negativas (*Aeromonas hydrophila* ATCC 7966 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), adquiridas no *American Type of Culture Collection* (ATCC, USA). Os testes foram realizados no Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos, no Departamento de Medicina Veterinária.

3.4.1 Teste de difusão em ágar (*screening*)

Os testes, efetuados em duplicata interplacas, basearam-se na técnica de difusão em ágar (NCCLS, 2003b). As bactérias foram cultivadas em meio de cultura TSA por 24 horas a 37°C. Partindo-se desta cultura, preparou-se uma suspensão bacteriana em solução salina comparando-se a turbidez com a escala 0,5 de MacFarland (exceção para *B. subtilis*, para a qual foi usada a escala 1,0). Utilizando-se um *swab*, as bactérias foram semeadas em confluência em placas de Petri, contendo o meio de cultura ágar Müller-Hinton. No meio foram feitos sete furos de 6 mm de diâmetro, nos quais foram colocados 40 µL de solução de extrato em etanol:água (7:3) na concentração de 10 mg/mL. Dessa forma, em cada furo, foram depositados 400 µg de extrato.

Após 24 horas de incubação a 37°C, os testes foram analisados quanto à formação ou não de uma zona clara de inibição ao redor do furo (denominada halo inibitório). Havendo formação de halo, seu diâmetro foi medido com uma régua milimetrada.

3.4.2 Teste de microdiluição em caldo

Aqueles extratos apresentando propriedades antibacterianas no teste de difusão foram submetidos ao teste de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração bactericida mínima (CBM), visando quantificar e avaliar melhor o potencial antibacteriano dos mesmos.

A CIM foi realizada em duplicata pela técnica de microdiluição em caldo (NCCLS, 2003a). O teste foi realizado em placas de microtitulação, adicionando-se, a cada cavidade, cem microlitros de caldo Müeller-Hinton, suplementado segundo Alderman e Smith (2001), com cátions cálcio (0,01%) e magnésio (0,005%).

Cem microlitros de solução do extrato vegetal dissolvido em Tween 80 a 1% (g/mL) na concentração de 10 mg/mL e filtrado em membrana esterilizante, foram adicionados à primeira cavidade. A seguir, realizaram-se 10 diluições sucessivas de base 2 (5,00 a 0,01 mg/mL). Então, a cada cavidade, foram adicionados 5 µL do inóculo, preparado diluindo-se 100 µL de suspensão bacteriana (solução salina - escala 0,5 de MacFarland) para 1 mL com solução salina. Após homogeneização, as placas foram incubadas em câmara úmida a 37°C, por 24 horas.

Os testes foram avaliados quanto à presença ou não de turbidez em comparação com os controles positivo e negativo, observando-se contra um fundo escuro. Como referência, foi utilizado o antibiótico cloranfenicol, preparado na concentração de 0,4 mg/mL. CIM correspondeu à menor

concentração de extrato capaz de inibir totalmente o crescimento bacteriano a olho nu.

A concentração bactericida mínima (CBM) foi determinada a partir do teste de CIM. Dez microlitros da cavidade correspondente a CIM e das cavidades com concentrações superiores foram semeadas em duplicata com auxílio de alça de Drigalski, em placas de Petri contendo meio TSA. Após 24 horas a 37°C, as placas foram observadas quanto à presença de colônias de bactérias. A menor concentração de extrato vegetal capaz de impedir totalmente o desenvolvimento de colônias de bactérias nas placas foi considerada a CBM.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização de material vegetal fresco pode ser indispensável para a detecção de alguns componentes específicos. Seu emprego traz a vantagem de evitar a presença de substâncias oriundas do metabolismo de fenecimento do vegetal (Falkenberg et al, 1999). O aumento da área de contato entre o material sólido e o líquido extrator torna mais eficiente a extração (Falkenberg et al., 1999), justificando o uso do material vegetal picado. A utilização de metanol na extração foi devido à sua eficiência, apresentando polaridade intermediária e à facilidade de sua eliminação da solução extrativa.

No teste antibacteriano foram utilizadas cepas bacterianas padronizadas, adquiridas de banco internacional (*American Type Culture Collection*, ATCC), o que é muito importante pois assegura a reprodutibilidade dos resultados, quando realizados por meio de técnicas padronizadas.

Dentre as 30 espécies vegetais estudadas, observou-se que 13 apresentavam atividade contra, no mínimo, uma das bactérias testadas. Foram utilizadas folhas na preparação dos extratos brutos, com exceção para *Smilax* sp. e *Solanum cernuum*, nos quais empregaram-se folhas e caule. O nome científico das plantas utilizadas, a família a que pertencem e os resultados do teste antibacteriano de difusão em ágar, expresso através da medida do diâmetro do halo de inibição, encontram-se na Tabela 1.

TABELA 1: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados por extratos metanólicos de plantas do município de Lavras.

Nome científico	Família	Atividade antibacteriana contra			
		A. h	B. s	P. a	S. a
<i>Arctium lappa</i> L.	Asteraceae	-	-	-	-
<i>Aristolochia</i> sp.	Aristolochiaceae	-	10,0	-	9,0
<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC.	Asteraceae	-	-	-	7,5
<i>Banisteriopsis</i> sp.	Malpighiaceae	-	-	-	-
<i>Bidens pilosa</i> L.	Asteraceae	-	-	-	-
<i>Buddleja brasiliensis</i> Jacq	Loganiaceae	7,5	-	-	-
<i>Calendula officinalis</i> L.	Asteraceae	-	-	-	-
<i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.	Fabaceae	9,0	8,0	-	10,0
<i>Gleichenia pectinata</i> (Willd.) Pr.	Gleicheniaceae	-	-	-	-
<i>Hypericum perforatum</i> L.	Clusiaceae	12,5	9,5	-	9,5
<i>Imperata brasiliensis</i> Trin.	Poaceae	-	-	-	-
<i>Kalanchoe</i> sp.	Crassulaceae	-	-	-	-
<i>Lantana camara</i> L.	Verbenaceae	12,0	8,0	-	12,0
<i>Lantana lilacina</i> Desf.	Verbenaceae	12,5	10,0	-	7,5
<i>Maytenus ilicifolia</i> Reissek	Celastraceae	-	-	-	-
<i>Mikania glomerata</i> Spreng.	Asteraceae	-	-	-	-
<i>Mikania hirsutissima</i> DC.	Asteraceae	8,0	-	-	10,0
<i>Moringa</i> sp. Lam.	Moringaceae	-	-	-	-
<i>Oxalis hirsutissima</i> Mart. E Zucc.	Oxalidaceae	-	-	-	-
<i>Phyllanthus tenellus</i> L.	Euphorbiaceae	9,0	-	-	10,0
<i>Plantago tomentosa</i> Lam.	Plantaginaceae	-	-	-	-
<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Lamiaceae	-	-	-	-
<i>Sambucus nigra</i> L.	Caprifoliaceae	-	-	-	-
<i>Schinus molle</i> L.	Anacardiaceae	-	7,5	-	-
<i>Silybum marianum</i> (L.) Gaertn	Asteraceae	-	-	-	-
<i>Smilax</i> sp.	Smilacaceae	-	-	-	-
<i>Solanum aculeatissimum</i> Jacq.	Solanaceae	12,5	9,5	-	9,5

...continua...

TABELA 01, cont.

<i>Solanum cernum</i> Vell.	Solanaceae	-	-	-	-
<i>Struthantus flexicaulis</i> Mart.	Loranthaceae	7,0	-	-	-
<i>Talinum patens</i> (L.) Willd.	Portulacaceae	8,0	-	-	-

Valores expressos em mm; *Aeromonas hydrophila* ATCC 7966(A.h.), *Bacillus subtilis* ATCC 6633(B.s.), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853(P.A.) e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923(S.a.); (-): ausência de atividade antibacteriana

Nenhuma das plantas avaliadas apresentou potencial antibacteriano frente a *P. aeruginosa*, uma bactéria naturalmente resistente aos agentes antibacterianos (Barros et al., 2001).

Banisteriopsis sp., *G. pectinata*, *I. brasiliensis*, *O. hirsutissima*, *P. tomentosa*, *P. amboinicus*, *S. nigra*, *S. marianum* e *S. cernum* não apresentaram atividade neste estudo (Tabela 1), o que parece razoável, já que não foram encontrados dados na literatura sobre essas plantas, relacionados à atividade antibacteriana.

Segundo estudo realizado por Holetz et al. (2002), *A. lappa* e *M. glomerata* não possuem atividade contra *Escherichia coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* e nem contra *P. aeruginosa*. Possuem, entretanto, atividade antifúngica frente a *Candida albicans*. Os resultados aqui obtidos estão de acordo com esse trabalho, pois ambas as espécies vegetais se mostraram inativas frente às quatro bactérias empregadas (Tabela 1).

Geissberger e Sequin (1991) avaliaram o potencial antibacteriano de *B. pilosa* frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, observando que o extrato metanólico e o extrato clorofórmico das folhas de *B. pilosa* eram inativos, enquanto os extratos obtidos com éter de petróleo e metanol/água apresentavam discreta atividade quando comparados ao cloranfenicol. Khan et al. (2001) verificaram que o extrato etanólico de toda a planta possuía amplo espectro antibacteriano. A seletividade do solvente frente às substâncias a serem

extraídas depende da polaridade, sendo clorofórmio e éter de petróleo menos polares que etanol e metanol. Sendo assim, o resultado negativo (Tabela 1) no teste antibacteriano deste estudo, com base nos dados citados acima, justifica-se pelo emprego de extrato metanólico das folhas de *B. pilosa*.

Asiedu-Gyekye et al. (2002) verificaram efeito antibacteriano contra *S. aureus* e *E. coli* na espécie *Kalanchoe pinnata*. Entretanto, a espécie deste gênero que foi submetida ao teste antibacteriano neste estudo, mostrou-se inativa frente às quatro bactérias empregadas (Tabela 1).

Iauk et al. (2003), analisando o potencial do extrato metanólico das flores de *C. officinalis* contra as bactérias periodontais *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella spp.* e *Fusobacterium nucleatum*, verificaram baixa atividade antibacteriana, com concentração inibitória mínima superior a 2,048 mg/mL; Silva (1999), analisando preparações para higiene bucal contendo extratos de *C. officinalis*, observou que o extrato metanólico das folhas desta planta não apresentou atividade antibacteriana, o que está de acordo com o resultado obtido neste trabalho (Tabela 1).

Lima et al. (1971) verificaram a presença de uma substância com atividade antibacteriana nas raízes de *M. ilicifolia*, que foi denominada maytenina. Não foram encontrados estudos referentes a atividade antibacteriana nas folhas desta espécie, o que é coerente com o resultado obtido neste estudo (Tabela 1).

Segundo Gundidza (1993), o óleo essencial de *S. molle* exibiu intensa atividade no teste de difusão em ágar contra *Klebsiella pneumoniae*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Leuconostoc cremoris*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus vulgaris*, *Clostridium sporogenes*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Escherichia coli*, *Beneckea natriegens*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Bacillus subtilis* e *Brochothrix thermosphacata*, sendo eficaz também contra os fungos *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus parasiticus*,

Fusarium culmorum e *Alternaria alternata*. Neste trabalho, o extrato metanólico das folhas de tal planta apresentou discreto halo inibitório frente a *B. subtilis*.

Para o gênero *Smilax*, foram encontrados trabalhos sobre a atividade antibacteriana de algumas espécies. *S. lundellii* foi ativa frente a cepas de bactérias enteropatogênicas (Caceres et al., 1990), *S. china* apresentou atividade antibacteriana no estudo desenvolvido por Lee et al., (2001) e *S. spinosa* mostrou atividade antibacteriana frente a *Salmonella typhi*. (Navarro et al., 2003). Porém, a espécie avaliada nesse trabalho não apresentou atividade frente às bactérias testadas.

As concentrações inibitórias e bactericidas mínimas (CIM e CBM) foram determinadas, visando melhor avaliar a atividade antibacteriana dos extratos vegetais brutos (Tabela 2).

TABELA 2: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de plantas e do cloranfenicol frente a bactérias.

Plantas	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>Aristolochia</i> sp.	-	-	2,50	5,00	5,00	> 5,00
<i>B. dracunculifolia</i>	-	-	-	-	2,50	2,50
<i>B. brasiliensis</i>	1,25	1,25	-	-	-	-
<i>C. langsdorffii</i>	-	-	5,00	>5,00	5,00	>5,00
<i>H. perforatum</i>	2,50	2,50	5,00	5,00	1,25	5,00
<i>L. camara</i>	1,25	2,50	-	-	1,25	2,50
<i>L. lilacina</i>	1,25	1,25	1,25	1,25	0,625	2,50
<i>M. hirsutissima</i>	2,50	5,00	-	-	2,50	2,50
<i>Moringa</i> sp.	-	-	5,00	5,00	-	-
<i>P. tenellus</i>	0,625	1,25	-	-	0,625	2,50
<i>S. aculeatissimum</i>	1,25	1,25	5,00	>5,00	2,50	5,00
<i>S. flexicaulis</i>	5,00	5,00	-	-	-	-
<i>T. patens</i>	1,25	1,25	-	-	-	-
Cloranfenicol	0,025	0,50	0,05	0,10	0,10	> 0,20

Valores expressos em mg/mL

O extrato metanólico do rizoma ou das folhas de *Aristolochia paucinervis* foi submetido à avaliação de atividade antibacteriana frente a 14 cepas bacterianas no trabalho desenvolvido por Gadhi et al. (2001). Os autores observaram que as frações clorofórmicas de tais extratos apresentavam atividade antibacteriana, sendo aquela proveniente dos rizomas ativa em concentrações menores que a proveniente das folhas (0,008 mg/mL e 0,064 mg/mL contra *Clostridium perfringens*, 0,032 mg/mL e > 0,1 mg/mL contra *Bacillus subtilis*, respectivamente). A espécie de *Aristolochia* cujo potencial antibacteriano foi explorado neste estudo, mostrou atividade contra *B. subtilis* e *S. aureus* (Tabela 1).

Bankova et al. (1999) verificaram que as folhas de *B. dracunculifolia* possuem propriedades antibacterianas. Neste trabalho, esta espécie vegetal apresentou atividade contra a bactéria *S. aureus*.

B. brasiliensis apresentou atividade frente a *A. hydrophila*, apesar de não terem sido encontrados, na literatura, dados referentes à propriedade antibacteriana desta planta.

O extrato de acetato de etila das partes aéreas de *H. perforatum* apresentou amplo espectro de atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas no estudo realizado com diferentes extratos desta planta (Avato et al., 2004). Keles et al. (2001) também obtiveram resultados semelhantes com o extrato etanólico desta planta. Do extrato obtido com éter de petróleo das folhas de *H. perforatum* foi isolada a substância hyperforin, com CIM de 0,001 mg/mL para *S. aureus* resistente a meticilina. O extrato aquoso desta planta apresentou CIM de 1,3 a 2,5 mg/ mL frente à mesma bactéria. O extrato butanólico revelou atividade contra *Helicobacter pylori*, com CIM entre 0,015 e 0,031 mg/mL (Reichling et al., 2001). Os resultados obtidos aqui (Tabela 2), em que o extrato

metanólico das folhas de *H. perforatum* apresentou atividade frente *A. hydrophila*, *B. subtilis* e *S. aureus*, estão coerentes com dados da literatura.

L. camara possui vasto estudo fitoquímico confirmando seu potencial antibacteriano (Barre et al., 1997). A substância denominada ácido lântico, isolada desta planta no trabalho desenvolvido por Saleh et al. (1999), apresentou intensa atividade antibacteriana, com CIM de 0,08 e 0,1 mg/mL para *E. coli* e *B. cereus*, respectivamente. Na concentração de 0,0016 mg/mL, o óleo essencial de *L. camara* inibiu o crescimento de *Bacillus megatarim* e *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella* sp e o fungo *Aspergillus niger* também foram inibidos. Neste trabalho, o extrato metanólico das folhas de *L. camara* apresentou potencial inibitório frente a *A. hydrophila* e *S. aureus* (Tabela 2).

Limberger (1998) observou que o óleo essencial de *M. hirsutissima* era ativo contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Neste trabalho, foi obtido resultado análogo (Tabela 02), já que o extrato metanólico dessa planta apresentou CBM de 5,0 e 2,5 mg/mL frente a *A. hydrophila* e *S. aureus*, respectivamente.

Moringa oleifera demonstrou atividade bactericida capaz de descontaminar água e matar cepas de *Staphylococcus*, *Streptococcus* e *Legionella* resistentes a antibióticos (Suarez et al., 2003). O extrato aquoso das sementes de *M. oleifera*, em estudo realizado por Caceres et al. (1991), foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, no teste de difusão em ágar. *Moringa* sp., utilizada nesta avaliação, não apresentou efeitos semelhantes, inibindo apenas *B. subtilis*, com CIM e CBM iguais a 5,0 mg/mL (Tabela 02).

Garcia (2000) verificou que *P. tenellus* possuía ação inibitória frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, por meio do teste de difusão em ágar. Amaral et al. (2001) verificaram que o extrato das folhas desta planta era ativo contra bactérias de origem hospitalar. Os resultados obtidos neste trabalho

confirmam os dados encontrados na literatura, pois, o extrato de tal planta apresentou os menores valores de CIM e de CBM observados (Tabela 2).

S. flexicaulis e *T. patens* apresentaram atividade frente a *A. hydrophila* (Tabela 03), apesar de não terem sido encontrados dados, na literatura consultada, referindo-se a este potencial.

A concentração de princípios ativos na planta depende do controle genético e de estímulos proporcionados pelo meio ambiente. Esses estímulos podem ser causados por excesso ou deficiência de algum fator de produção para a planta. Assim, a concentração de substâncias ativas pode ser alterada por fatores climáticos, edáficos, poluentes ou pela ação de microrganismos, insetos e animais herbívoros (Rodrigues e Carvalho, 2001). Desse modo, a diferença entre alguns dos resultados obtidos com dados da literatura pode ser devido a estes fatores.

C. langsdorffii, *L. lilacina* e *S. aculeatissimum* apresentaram atividade antibacteriana e, segundo revisão bibliográfica, não possuíam estudos quanto à purificação de substâncias antibacterianas a partir do extrato das folhas. Em decorrência, foram selecionadas para as etapas de purificação e identificação das substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana observada.

5 CONCLUSÕES

Os extratos de 13 plantas coletadas no município de Lavras são ativos segundo teste antibacteriano por meio da técnica de difusão em agar. Quando submetidos ao teste de microdiluição em caldo, observa-se que as concentrações inibitórias mínimas (CIM) vão de 0,625 a 5,00 mg/mL e as concentrações bactericidas mínimas (CBM) variam de 1,25 a 5,00 mg/mL, sendo os menores valores obtidos com os extratos de *L. lilacina* e *P. tenellus*. Esses resultados comprovam o potencial de extratos vegetais como fonte de compostos antibacterianos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALDERMAN, D.J.; SMITH, P. Development of draft protocols of standard reference methods for antimicrobial agent susceptibility testing of bacteria associated with fish diseases. **Aquaculture**, v.196, p.211-243, 2001.
- ALVES, T.M.A. et al. Biological screening of brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p.367-373, 2000.
- AMARAL, A.C.F. et al. Antimicrobial evaluation of *Phyllanthus tenellus* leaves against hospital bacteria. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.13, n.1, p.107, 2001. Supl.
- AQIL, F.; AHMAD, I. Broad-spectrum antibacterial and antifungal properties of certain traditionally used Indian medicinal plants. **World Journal of Microbiology e Biotechnology**, v.19, p.653–657, 2003.
- ASIEDU-GYEKYE, I.J.; ANTWI, D.A.; DONKOR. T. Some effects of the medicinal plant *Kalanchoe pinnata*. **Discovery and Innovation**, v.14, n.1-2, p.102-106, June 2002
- AVATO, P. et al. Extracts from St John's Wort and their antimicrobial activity. **Phytotherapy Research**, v.18, n.3, p.230-232, Mar. 2004
- BANKOVA, V. et al. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo state. **Z Naturforsch [C]** v.54,n.5-6, p.401-405, May/June 1999.
- BARRE, J.T. et al. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. **Phytochemistry**, v.45, n.2, p.321-324, 1997.
- BARROS, E. et al. **Antimicrobianos: consulta rápida**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2001. 428p.
- CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of gastrointestinal disorders. 1. Screening of 84 plants against enterobacteria. **Journal of Ethnopharmacol**, v.30, n.1, p.55-73, Aug. 1990

- CACERES, A. et al. Pharmacological properties of *Moringa oleifera*. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, n.3, p.213-216, July 1991.
- CERDEIRAS, M.P. et al. A new antibacterial compound from *Ibicella lútea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.3, p.521-525, Dec. 2000.
- COTA, B.B. et al. Antimicrobial activity of plant species from a Brazilian hotspot for conservation priority. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.7, p.542-547, Oct. 2002.
- ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, n.3, p.343-349, June 2000.
- FACEY, P.C. et al. Investigation of plants used in Jamaican folk medicine for anti-bacterial activity. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.51, n.12, p.1455-1460, Dec. 1999.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. Cap.10.
- FOGLIANI, B. et al. Bioactive ellagitannins from *Cunonia macrophylla*, an endemic Cunoniaceae from New Caledonia. **Phytochemistry**, v.66, p.241-247, 2005.
- FOKOU, P.A. et al. Triterpenes from *Maesopsis eminii*. **Journal of Natural Products**, v.67, p.2124-2126; 2004.
- GADHI, C. A. et al. Bactericidal properties of the chloroform fraction from rhizomes of *Aristolochia paucineris* Pomel. **Journal of Ethnopharmacology**, v.75, p. 207-212, 2001.
- GARCIA, C.M. **Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica do *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb. (Euphorbiaceae)**. 2000. 161p. Dissertação (Ciências e Tecnologias Farmacêuticas)-Unversidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS.
- GEISSBERGER, P.; SEQUIN, U. Constituents of *Bidens pilosa* L.: do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine?

Acta Tropical, v. 48, n.4, p.251-261, Feb. 1991

GROENEWALD, J. G. et al. Use of plant material or an extract of a plant of the Coleonema as an immune stimulant, antibacterial agent, antifungal agent, antiviral agent for the treatment of e.g. arthritis and HIV infection. Patent Publ. n. WO2005105124-A1 10 Nov 2005. **Patente n. 2005-786158 [80]**.

GUNDIDZA, M. Antimicrobial activity of essential oil from *Schinus molle* Linn. **Central Africa Journal Med.**, v.39, n.11, 231-214, Nov. 1993.

HEINRICH, A. M. et al. **Fundamentals of pharmacognosy and phytotherapy**. Edinbrugh: Churchill Livingstone, 2004. p.245-252.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.7, p.1027-1031, Oct. 2002.

IAUK, L. et al. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. **Phytotherapy Research.**, v.17, n.6, p.599-604, June 2003.

KAWAZOE, K. et al. Phenylanthralene Compounds from the Subterranean Part of *Vitex rotundifolia* and their antibacterial activity against Meticilin-Resistente *Staphylococcus aureus*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.588-591, 2001.

KELES, O. et al. Screening of some Turkish plants for antibacterial activity. **Turkish Journal of Veterinary e Animal Sciences**, v.25, n.4, p.559-565, 2001.

KHAN, M.R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A.D. Anti-microbial activity of *Bidens pilosa*, *Bischofia javanica*, *Elmerillia papuana* and *Sigesbekia orientalis*. **Fitoterapia**, v.72, n.6, p.662-665, Aug. 2001.

KHERA, S. et al. Novel Antibacterial Iridoid and Triterpene from *Caiophora coronata*. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1628-1631, 2003.

KNIGHT, E.S. Goldenseal (*Hydrastis canadensis*) versus penicillin: a comparison of effects on *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, and *Pseudomonas aeruginosa*. **Bios**, v.70, n.1, p.3-10, 1999.

LEE, S.E.; JU, .E.M.; KIM, J.H. Free radical scavenging and antioxidant enzyme fortifying activities of extracts from Smilax china root. **Experimental and Molecular Medicine**, v.33, n.4, p.263-268, Dec. 2001 .

LIMA, M.R.F.; XIMENES, E.C.P.A.; SANT´ANA, A.E.G. Avaliação da atividade antibiótica de algumas plantas medicinais brasileiras. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 24, 2001, Poços de Caldas; **Livro de Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2001.

LIMA, O.G. et al. Antimicrobial substances from higher plants. XXXVI. On the presence of maytenin and pristimerine in the cortical part of the roots of *Maytenus ilicifolia* from the South of Brazil. **Revista do Instituto de Antibióticos**, Recife, v.11, n.1, p.35-38, June 1971.

LIMBERGER, R.P. **Estudo de óleos voláteis de espécies do gênero Mikania (Asteraceae) e da subtribo Myrtinae (Myrtaceae) de ocorrência no Rio Grande do Sul**. 1998. 121p. Mestrado (Dissertação em Ciências e Tecnologias Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LION CORP (LIOY). Buccal compsn. used to prevent tooth decay - contains solvent extract from wood parts of Ebenaceae, Verbenaceae, Legminosae and Juglandaceae plants. Patent Publ. n. JP7069853-A 14 Mar. 1995. **Patente n. 1995-144677 [78]**.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial Activity of Plants Extracts and Phytochemicals on Antibiotic-Resistant Bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, p.247-256, 2000.

NAVARRO, M.C. et al. Antibacterial, antiprotozoal and antioxidant activity of five plants used in Izabal for infectious diseases. **Phytotherapy Research**, v.17, n.4, p.325-329, Apr. 2003.

NCCLS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**; approved standard. 6.ed. Wayne, Pennsylvania, 2003a. v. 23, n.2. (Document M7-A6).

NCCLS. **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard**. 8.ed. Wayne, Pennsylvania, 2003b. v.23, n.1. (Document M2-A8).

- MARTIN-GALIANO, A. et al. Mefloquine and new related compounds target the F₀ complex of the F₀F₁ H⁺-ATPase of *Streptococcus pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, n.6, p.1680-1687, 2002.
- MOREL, A.F. et al. Antibacterial cyclopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. **Phytochemistry**, v.61, p.561-566, 2002.
- PALOMBO, E.A.; SEMPLE, S.J. Antibacterial activity of Australian plant extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin-resistant enterococci (VRE) **Journal of Basic Microbiology**, v.42, n.6, p.444-448, 2002.
- RAUHA, J.P. Antimicrobial effects of finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. **International Journal of Food Microbiology**, v.56, n.1, p.3-12, Maio 2000.
- REICHLING, J.; WESELER, A.; SALLER, R.A. current review of the antimicrobial activity of *Hypericum perforatum* L. **Pharmacopsychiatry**, v.34, n.S116-S118, July 2001. Suppl. 1.
- RIOS, J. L.; RECCIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.80-84, 2005.
- RODRIGUES, V.E.G., CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180p.
- SALEH, M. et al. Antibacterial triterpenoids isolated from *Lantana camara*. **Pharmaceutical Biology**, v.37, n.1, p.63-66, jan. 1999.
- SALVAT, A. et al. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytomedicine**, v.11, n.2-3, p.230-234, Feb. 2004 .
- SAVIKIN-FODULOVIC, K. et al. Hyperatomarin, an antibacterial prenylated phloroglucinol from *Hypericum atomarium* ssp *degenii*. **Journal of Natural Products**, v.66, n.9, p.1236-1238, Sept. 2003.
- SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O. et al.

(Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 1999. Cap.15, p.306.

SILVA, G. **Atividade antimicrobiana de anti-sépticos orais e dentifrícios para bebês**: um estudo sobre células sésseis e planctômicas. Rio de Janeiro 1999. 136p. Tese (Doutorado em Microbiologia)-Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

SOUZA, E.R.V. et al. Atividade antibiótica de plantas da restinga da Barra da Tijuca. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 24., 2001, Poços de Caldas. **Livro de Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2001.

SUAREZ, M. Expression of a plant-derived peptide harboring water-cleaning and antimicrobial activities. **Biotechnology and Bioengineering**, v.81, n.1, p.13-20, Jan. 2003.

SUFFREDINI, I.B. et al. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p.379-384, 2004.

TELETKA, A.D. et al. Testes de atividade antibacteriana em 21 plantas coletadas na Floresta Nacional de Ipanema. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 24., 2001, Poços de Caldas. **Livro de Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2001.

VAN DER WATT, E.; PRETORIUS, J.C. Purification and Isolation of Active Antibacterial Components in *Carpobrotus edulis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, n.1, p.87-91, June 2001.

VELOZO, L.S.M. et al. Atividade antibacteriana de *Peperomia blanda*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 24., 2001, Poços de Caldas. **Livro de Resumos**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2001.

ZANETTI, G.D. et al. Toxicidade aguda e atividade antibacteriana dos extratos de *Tropaeolum majus* L. **Acta Farm. Bonaerense**, v.22, n.2, p.159-162, 2003.

CAPÍTULO 3

FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE *Copaifera langsdorffii* DIRECIONADO POR TESTES PARA DETECTAR ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

RESUMO

PEREIRA, Aline Carvalho. Fracionamento do extrato de *Copaifera langsdorffii* direcionado por testes para detectar atividade antibacteriana. In: **Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do município de Lavras**. 2006. Cap. 3. p. 40-80. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Sabendo-se das propriedades antibacterianas do extrato metanólico das folhas de *C. langsdorffii* coletadas no município de Lavras, o mesmo foi submetido a fracionamento por meio de lavagens sucessivas com hexano, acetato de etila e metanol. As três frações obtidas apresentaram atividade antibacteriana no teste de difusão em ágar, o que indicava a presença de mais de uma substância ativa. Quando analisada por cromatografia em camada fina, a fração acetato de etila apresentou perfil semelhante ao da fração hexano. Logo, apenas uma das duas foi submetida a alguns dos processos de fracionamento. A fração solúvel em hexano foi fracionada por cromatografia em coluna de sílica-gel, o que resultou na obtenção de várias frações com propriedade antibacteriana. Aparentemente, os componentes de tais frações eram instáveis, o que tornava o a purificação extremamente complexa. Com vistas a minimizar o problema, buscou-se submeter a fração hexano a lavagens com ácido e base, tratamento com carvão ativo, reação de hidrogenação com H₂ catalisada por Pd/C e redução com boroidreto de sódio. Porém, nenhum destes procedimentos mostrou-se eficiente. A fração metanólica foi submetida a análises e fracionamentos em sílica-C18 em cromatografia líquida de alta eficiência e em bancada. Observou-se que a fração com propriedade antibacteriana era altamente complexa na sua composição, o que inviabilizou a purificação da substância ativa. No entanto, observou-se que em tal fração havia duas substâncias aparentemente em grande quantidade, que foram purificadas e deverão ser posteriormente identificadas.

* Comitê Orientador: Denilson Ferreira Oliveira (orientador) – UFLA; Henrique C. Pereira Figueiredo - UFLA

ABSTRACT

Pereira, Aline Carvalho. Purification of the *Copaifera langsdorffii* methanolic extract guided by antibacterial assays. In: **Purification and identification of antibacterials from Lavras city plants**. 2006. Cap. 3. p. 40-80. Dissertation (Master in Agrochemical and Agrobiochemical) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

As the methanolic extract of *C. langsdorffii* leaves collected in Lavras city presented antibacterial properties, it was submitted to purification by successive extractions with hexane, ethyl acetate and methanol. All fractions presented antibacterial activity in the Agar diffusion assay, indicating that there was more than one active substance in the crude extract. When analyzed by thin layer chromatography, hexane and ethyl acetate fractions were identical. Consequently, only one of them was submitted to some of the purification steps. After elution of the hexane fraction through a silica gel column, several fractions with antibacterial properties were obtained. Apparently, the components of such fractions were unstable, turning the purification step very complex. In order to solve that problem, the hexane fraction was submitted to extraction with acids and bases, treatment with charcoal, hydrogenation with H₂ catalyzed by Pd/C and reduction with sodium borohydride. Unfortunately, none of those procedures were efficient. The methanol fraction was submitted to analysis and purification by high performance liquid chromatography with a silica gel-C18 column. As the active fraction was very complex, the process was stopped. Nevertheless, two inactive substances that seemed to be present in great amounts in such fraction were isolated for further identification.

* Guidance Committee: Denilson F. Oliveira - UFLA (Advisor), Henrique C. Pereira Figueiredo – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Como se pode observar no capítulo anterior, cerca de 45% dos extratos vegetais testados apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas e ou gram-negativas. Dentre estes, encontra-se aquele proveniente de *C. langsdorffii*. Como não havia qualquer relato na literatura sobre trabalhos fitoquímicos com vistas a identificar substâncias com propriedade antibacteriana do extrato metanólico das folhas dessa planta, buscou-se fracioná-lo, para purificar a substância responsável pela atividade antibacteriana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Copaifera langsdorffii Desf., conhecida vulgarmente como bálsamo, copaíba, copaíba vermelha, óleo-de-copaíba e pau-de-óleo, pertence à família Fabaceae. As sinónimas para esta espécie vegetal são: *Copaiba langsdorffii* (Desf.) Kuntze, *Copaifera nitida* Mart. ex Hayne e *Copaifera sellowii* Hayne (Corrêa, 1926).

Trata-se de uma planta arbórea, com altura de 10 a 40 metros, com folhagem densa e constituída de folhas compostas pinadas, alternadas, com folíolos coriáceos de 3 a 6 cm de comprimento (Corrêa, 1926). No Brasil, *C. langsdorffii* é a espécie mais comum dentre aquelas que produzem o óleo de copaíba, bálsamo acumulado em cavidades do tronco da árvore de onde, pelo processo artesanal, é extraído uma vez ao ano. Tem uma parte volátil formada por compostos sesquiterpênicos, principalmente beta-cariofileno (50-52%) e uma fração fixa que é a resina, onde predominam alguns ácidos diterpênicos, especialmente o copálico (Lorenzi e Matos, 2002).

Os trabalhos realizados sobre o género *Copaifera* estão em sua maioria relacionados ao óleo de copaíba, que é um líquido transparente cuja coloração varia do amarelo ao marrom e somente na espécie *C. langsdorffii*, apresenta-se vermelho. Desde os primeiros anos do descobrimento do Brasil, esse óleo vem sendo indicado para diversos fins. É amplamente comercializado pelos laboratórios farmacêuticos, podendo ser encontrado em farmácias de todo o país em diversas apresentações. A exportação para a Europa foi registrada desde o final do século XVIII, estando, nas últimas três décadas, dividida entre a França, Alemanha, Inglaterra e Estados Unidos (Veiga Junior e Pinto, 2002).

Na indústria de perfumes, cosméticos, na indústria de vernizes, na pintura com porcelana e na indústria de fotografia, o óleo de copaíba possui

aplicações importantes. Por ser uma fonte rica e renovável de hidrocarbonetos, o seu uso como combustível ecologicamente limpo, tem sido extensamente avaliado. Na medicina tradicional dos índios brasileiros, desde o período pré-colombiano o óleo tem sido usado externamente, no tratamento de doenças da pele e como proteção contra picadas de insetos. Depois de sua introdução nas farmacopéias como medicamento antiblenorrágico, seu uso generalizou-se na medicina popular como cicatrizante e antiinflamatório local e, internamente, como diurético, expectorante e antimicrobiano das afecções urinárias e da garganta (Veiga Junior e Pinto, 2002).

Apesar da extensa literatura sobre os óleos de copaíba, poucos são os estudos que conseguem identificar e isolar os princípios ativos, sugerindo apenas que compostos fortemente ativos estão presentes. Dentre os constituintes ativos identificados e testados isoladamente podem-se citar os sesquiterpenos β -bisabolol e β -cariofileno (antiinflamatório e protetor da mucosa gástrica, segundo Veiga Junior e Pinto, 2002) e o diterpeno ácido caurenóico (relaxante uterino em contrações induzidas, segundo Cunha e Rao, 2001; antiinflamatório, relatado por Paiva et al., 2003) Figura 1 (Veiga Junior et al., 2005).

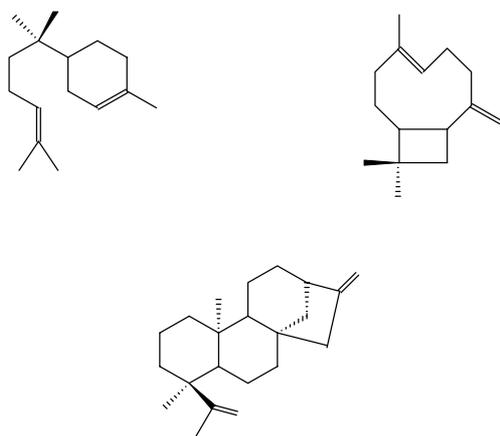


FIGURA 1: Estruturas de compostos isolados do óleo de copaíba.

Tem-se observado que a eficiência do óleo integral é maior do que as de seus constituintes isoladamente. Dentre as propriedades medicinais dos óleos de copaíba podem-se citar, ainda, ação analgésica, tripanossomicida, protetora contra a penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni* e cercaricida (Lorenzi e Matos, 2002 & Veiga Júnior e Pinto, 2002), atividade inseticida útil no controle do vetor da dengue e febre amarela (Mendonça et al., 2005).

Dentre as patentes contendo produtos oriundos de espécies do gênero *Copaifera*, podem-se citar os produtos à base de extratos vegetais para uso bucal com potencial antibacteriano contra *Streptococcus mutans*, *Porphyromonas gingivalis* e *Fusobacterium nucleatum* (Lion corp, 1995), inseto-repelentes contendo óleo de copaíba e ou cariofileno como ingrediente ativo (Rifure, 2002) e *trans*-(α)-bergamoteno, germacreno-D, germacreno-B e óxido de cariofileno (Ichihara et al., 2005).

Krauchenco et al. (2004) isolaram das sementes de *C. langsdorffii* uma proteína capaz de inibir a atividade de tripsina. Alguns agentes deste tipo possuem propriedades anticarcinogênicas. Estudos realizados com óleos de sementes de *C. langsdorffii* mostraram a presença da cumarina umbeliferona e de oligossacarídeos xiloglucânicos. A casca da copaíba encontra aplicações na tintura caseira, de onde se retira um corante amarelo (Veiga Júnior e Pinto, 2002).

Gramosa e Silveira (2005), estudando o óleo essencial das folhas de *C. langsdorffii*, obtiveram 0,04% de rendimento e a análise revelou a presença de vários compostos, principalmente beta-cariofileno (16,6%) e gama-muuroloeno (25,5%). Aminoácidos não-protéicos foram encontrados como cerca de 2% a 3% do peso seco das folhas de *C. langsdorffii* (Veiga Júnior e Pinto, 2002).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos utilizados:

Hexano P.A., acetato de etila P.A., metanol P.A., etanol P.A., água destilada, placas de alumínio recobertas com sílica-gel com indicador de fluorescência UV 254 (Alugram) e placas de alumínio recobertas com sílica-C18 (Merck), sílica-gel 60 (230-400 mesh, Merck); ácido clorídrico P.A.; bicarbonato de sódio P.A.; carvão ativo P.A. em pó (Vetec); paládio sobre carvão (10%) ativado (Aldrich); boroidreto de sódio P.A.; resina de poliestireno Amberlite XAD-16 (Sigma); metanol espectroscópico. Reveladores: luz UV, iodo ressublimado e solução de sulfato cérico amoniacal (SCA) ou solução de ácido fosfomolibdico a 5% em etanol (AF). Cromatógrafos líquidos de alta eficiência utilizados: Varian com detector de UV modelo 9050, bomba ternária modelo 9012, injetor automático modelo 9300; Hewlett Packard 1100 equipado com detector de UV do tipo DAD; Varian ProStar equipado com detector de UV do tipo DAD; colunas analíticas utilizadas: Phenomenex Gemini Sílica-C18 (5 μ , 250 x 4,6 mm) e phenyl-hexyl Luna (5 μ , 250 x 4,6 mm); coluna semipreparativa Phenomenex Gemini Sílica-C18 (5 μ , 250 x 10 mm); aparelho para destilação (Z147966-1EA, catálogo Aldrich 2005-2006).

3.2 Coleta de material botânico

Foram coletados 1.077,38 g de folhas da espécie *Copaifera langsdorffii* Desf., procedendo-se conforme descrito no item 3.1, capítulo 2.

3.3 Preparação do extrato bruto para ser purificado

Procedimento realizado conforme descrito no ítem 3.2, capítulo 2, sendo o resíduo final (101,974 g, pó verde escuro) empregado no processo de purificação.

3.4 Fracionamento em pequena escala

O extrato bruto (20 mg) foi sucessivamente lavado com hexano (1 mL), acetato de etila (1 mL) e metanol (1 mL). Em cada lavagem, após agitação do extrato com solvente por cinco minutos, o material foi centrifugado e o sobrenadante foi concentrado até *secura* em evaporador rotatório. Ao final, obteve-se a fração solúvel em hexano, fração solúvel em acetato de etila, fração solúvel em metanol e um resíduo insolúvel nestes solventes (Figura 2). Estes, dissolvidos em 0,5 mL de etanol/água (7:3), foram submetidos ao teste antibacteriano.

3.5 Testes para verificar a atividade antibacteriana

O fracionamento foi direcionado por testes antibacterianos *in vitro*, realizados como descrito no ítem 3.4.1 do capítulo 2. Em todos os casos foram colocados 40µL da solução a ser testada por furo na placa de Petri contendo o meio de cultura ágar Müller-Hinton.

3.6 Fracionamento em grande escala.

O extrato bruto (20 g) foi extraído sucessivamente com hexano, acetato de etila e metanol. Para tanto, foram feitas 10 lavagens com 200 mL de cada solvente. Após cada adição de solvente, o material foi agitado por cerca de 5 minutos e decantado por, aproximadamente, o mesmo período, sendo posteriormente filtrado, concentrado e liofilizado. As quatro frações obtidas (fração solúvel em hexano, em acetato de etila, em metanol e fração insolúvel

em todos esses solventes) foram submetidas ao teste de difusão em ágar. Uma alíquota equivalente a 0,1% de cada fração foi dissolvida em 0,5 mL de solução etanol/água (7:3), sendo empregados 40 µL desta solução por furo (teste) na placa de Petri com ágar Müller-Hinton.

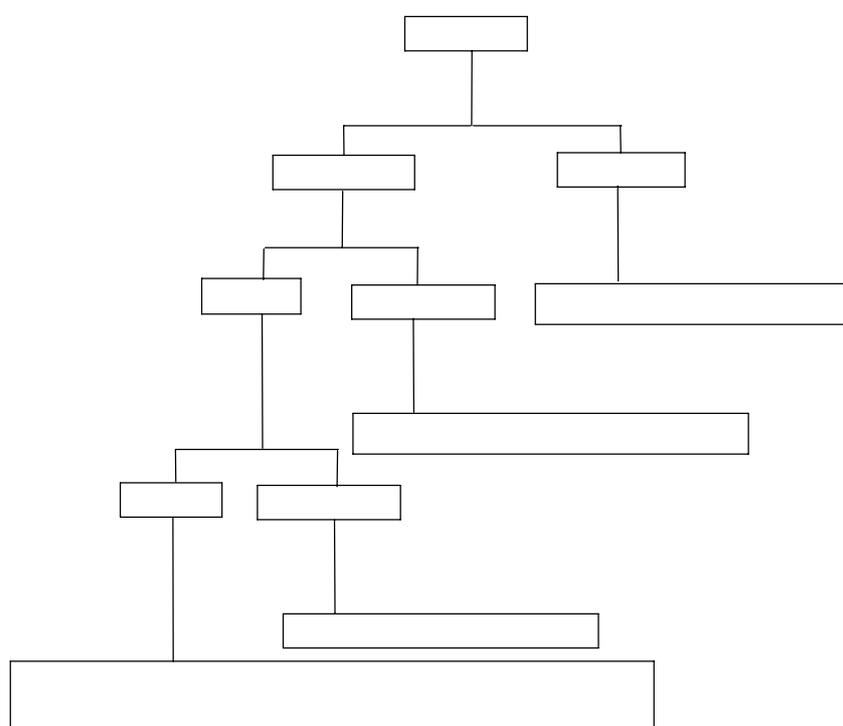


FIGURA 2: Fracionamento em pequena escala do extrato de *C. langsdorffii*:

3.7 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram utilizados vários eluentes para as análises em sílica-gel: hexano/acetato de etila para a fração hexânica, hexano/acetato de etila e acetato de etila/metanol para a fração solúvel em acetato de etila e acetato de etila/metanol para a fração metanólica. As placas foram reveladas com luz Uv,

iodo, SCA ou AF. A fração metanólica ainda foi analisada em sílica-C18, utilizando-se metanol/água como eluente e revelando-se com luz UV, iodo e SCA.

3.8 Fração solúvel em hexano

3.8.1 Cromatografia em coluna de sílica-gel

Parte da fração solúvel em hexano (400 mg) foi dissolvida em acetato de etila e adicionaram-se, aproximadamente, 900 mg de sílica gel à solução obtida. Este material foi concentrado até a secura em evaporador rotatório e, sob a forma de pó, foi adicionado ao topo de uma coluna 3 x 17 cm de sílica-gel empacotada com hexano. Pela coluna, na velocidade aproximada de 2 polegadas/minutos, eluíram-se hexano:acetato de etila (9:1, 100 mL; 8:2, 100 mL, 7:3, 100 mL, 1:1, 100 mL), 100 mL de acetato de etila, 100 mL de acetato de etila:metanol (9:1) e 200 mL de metanol. Foram coletadas 40 frações de 20 mL que, após serem analisadas em CCD, em placas de alumínio recobertas com sílica-gel conforme descrito no item 3.7, foram combinadas, concentradas e liofilizadas, resultando em 19 frações. Para o teste antibacteriano, as frações foram dissolvidas em 4 mL de etanol P.A. O restante foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizado.

A sétima fração (fração 7) proveniente do fracionamento em coluna de sílica gel anterior (toda a massa) foi dissolvida em acetato de etila e adicionaram-se cerca de 100 g de sílica gel à solução. A mistura resultante foi concentrada até secura em evaporador rotatório e, sob forma de pó, acrescentada ao topo de uma coluna de 1 x 15 cm sílica-gel. Na velocidade aproximada de 2 polegadas/minuto, foram eluídos hexano/acetato de etila (9:1, 50 mL; 8,5:1,5, 50 mL; 8:2, 50 mL; 7,5:2,5, 50 mL; 7:3, 50 mL ; 4:6, 50 mL), 50 mL de acetato de etila, 50 mL de acetato de etila/metanol (9:1) e 50 ml de metanol. Foram coletadas frações de 5 mL que, após serem analisadas em CCD, concentradas e

lioofilizadas, foram submetidas ao teste de difusão em ágar. Para tanto, as frações foram dissolvidas em 2 mL de etanol P.A.

3.8.2 Purificação com ácido e base

A fração solúvel em hexano (20 mg) foi dissolvida em 1 mL de diclorometano. À solução obtida adicionou-se 1 mL de HCl 0,1M. Após agitação por 5 minutos em agitador automático e repouso, as fases foram separadas. À fase orgânica, adicionou-se 1 mL de solução saturada de bicarbonato de sódio. Após agitação e repouso, as fases foram separadas e à fase orgânica, adicionou-se sulfato de sódio sólido. Agitou-se e filtrou-se em algodão, originando o filtrado 1. À fase aquosa/ácida obtida anteriormente, foi adicionado 1 mL de diclorometano e bicarbonato de sódio até não haver liberação de bolhas. Após agitação e separação de fases, à nova fase orgânica foi adicionado sulfato de sódio sólido. Após filtração em algodão, obteve-se o filtrado 2. A fase aquosa/básica obtida na segunda etapa foi tratada com 1 ml de diclorometano e HCL 0,1M até não haver liberação de bolhas. Após agitação e separação de fases, a fase orgânica foi tratada com sulfato de sódio sólido e filtrada em algodão, dando origem ao filtrado 3. Os filtrados 1, 2 e 3 foram concentrados em evaporador rotatório e liofilizados, originando os resíduos 1, 2 e 3, respectivamente. Estes resíduos foram dissolvidos em 0,5 mL de etanol para serem testados. Como a atividade antibacteriana não foi afetada, o resíduo 1 foi analisado em CCD, comparando-se com o material não submetido ao tratamento.

3.8.3 Purificação com carvão ativo

A fração solúvel em hexano (20 mg) foi dissolvida em 2 mL de acetato de etila. A esta solução adicionaram-se 40 mg de carvão ativo P.A. em pó (1:2). A

suspensão foi agitada por 10 minutos e filtrada em algodão. O procedimento anterior foi repetido usando-se 102,3 mg de carvão ativo (1:5). Ambos os filtrados, após serem concentrados e liofilizados, foram dissolvidos em 0,5 mL de etanol para serem testadas. Como a atividade antibacteriana não foi afetada, o processo foi repetido partindo-se de 100 mg da fração solúvel em hexano e 200 mg de carvão ativo, visando obtenção de maior quantidade do material. Após análises por CCD, comparando-se com o material não submetido ao tratamento, o material tratado com carvão ativo (65,3 mg) foi submetido à cromatografia em coluna de 2 x 16 cm de sílica-gel, eluindo-se com hexano/acetato de etila (10:0,5, 100 mL; 9:1, 100 mL; 8:2, 100 mL; 7:3, 100 mL; 6:4, 100 mL; 1:1, 100 mL), 100 mL de acetato de etila e 100 mL de metanol. Coletaram-se 105 frações de 5 mL, que foram analisadas por CCD (sílica-gel), conforme descrito no item 3.7. Aquelas semelhantes foram agrupadas, o que resultou em 10 frações. Estas foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas para serem testadas. Para isso, cada fração foi dissolvida em 0,5 mL de etanol.

3.8.4 Reação de hidrogenação

Em balão de 25 mL, a fração solúvel em hexano (100 mg) foi dissolvida em 5 mL de etanol, agitando-se em agitador magnético. Após dissolução, foram adicionados 20 mg de paládio sobre carvão. O balão foi tampado com um septo de borracha, que foi espetado com agulha acoplada a balão de borracha contendo H₂. O sistema permaneceu sob leve agitação por 36 horas. A seguir, o material foi filtrado em algodão e eluído em coluna de 1 x 7 cm de sílica-gel com 20 mL de acetato de etila. O solvente foi removido em evaporador rotatório e, após liofilização, o material foi submetido ao teste de difusão em ágar. Para tanto, foram dissolvidos 4,7% do material liofilizado em 0,5 mL de etanol.

Posteriormente, este material hidrogenado (34 mg) foi eluído através de coluna com 2 x 15 cm de sílica-gel, usando como eluente hexano/acetato de etila (9:1, 50 mL, 8:2, 50 mL, 7:3, 50 mL, 1:1, 50 mL), 50 mL de acetato de etila, 50 mL de acetato de etila/metanol (1:1) e 50 mL de metanol. As frações obtidas foram analisadas em CCD (sílica-gel), como descrito no item 3.7. Agruparam-se aquelas que eram semelhantes e concentraram-se as frações resultantes em evaporador rotatório e liofilizadora. Os materiais obtidos foram dissolvidos em 5 mL de etanol para serem submetidos ao teste antibacteriano.

3.8.5 Reação com boroidreto de sódio

O material hidrogenado anteriormente (item 3.7.6) e a fração solúvel em hexano (35 mg de cada) foram separadamente dissolvidos em 2 mL de etanol, em balões de 10 mL. Sob agitação magnética, em banho de gelo, adicionaram-se 100 mg de boroidreto de sódio (em pitadas). Tamparam-se os balões com septos de borracha, nos quais uma agulha foi espetada para evitar pressão excessiva. O sistema permaneceu sob leve agitação por 14 horas. Então, o balão foi refrigerado em banho de gelo e adicionou-se HCl 2M até pH aproximadamente igual a 2. Após 20 minutos, foi adicionado bicarbonato de sódio sólido até pH maior que 7. O material foi filtrado em algodão, sendo lavado posteriormente, assim como toda a vidraria utilizada, com diclorometano para evitar perdas. A fase orgânica recolhida foi concentrada em evaporador rotatório e liofilizada para ser testada. O material hidrogenado obtido foi dissolvido em 4,4 mL de etanol para ser submetido ao teste antibacteriano.

Cerca de 18 mg do material reduzido com boroidreto foram eluídos em coluna com 1 x 16 cm de sílica-gel, usando como eluente hexano/acetato de etila (9:1, 50 mL, 8:2, 50 mL, 7:3, 50 mL, 1:1, 50 mL), 50 mL de acetato de etila, 50 mL de acetato de etila/metanol (1:1) e 50 mL de metanol. As frações obtidas foram analisadas em CCD em placas de sílica gel. Agruparam-se as frações

semelhantes e as soluções obtidas foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas. Para o teste de difusão em ágar, os resíduos da liofilização foram dissolvidos em 4,4 mL de etanol.

3.9 Fração solúvel em acetato de etila

3.9.1 Cromatografia em coluna de sílica-gel

Parte da porção do extrato de *C. langsdorffii* solúvel em acetato de etila (400 mg) foi dissolvida em acetato de etila e metanol (1:1). À solução obtida foi adicionado 1 g de sílica-gel e a mistura resultante foi concentrada até secura em evaporador rotatório. O pó obtido foi acrescentado ao topo de uma coluna de 2 x 16 cm de sílica-gel. Como eluentes foram usados 150 mL de acetato de etila, seguidos de 150 mL de metanol e 100 mL de água. Foram coletadas 3 frações, provenientes da eluição com acetato de etila, com metanol e com água respectivamente. As frações foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas. Para a realização do teste de difusão em ágar, 0,6 % da massa de cada fração foi dissolvido em 0,5 mL de etanol/água (7:3).

3.9.2 Reação de hidrogenação

Uma alíquota da porção do extrato metanólico de *C. langsdorffii* solúvel em acetato de etila (100 mg) foi submetida à hidrogenação, conforme procedimento descrito em 3.7.4. O material hidrogenado e foi submetido a análises em CCD (sílica-gel) e ao teste antibacteriano.

3.10 Fração solúvel em metanol

3.10.1 Primeira cromatografia líquida em coluna de sílica-gel

Parte da fração metanólica (3,5 g) foi pulverizada com 7 g de sílica gel e adicionada à cabeça de uma coluna com 4 x 15 cm de sílica-gel. Para eluição das substâncias, empregaram-se 300 mL de metanol, seguidos de 300 mL de água e

300 mL de HCl 0,1M. Obtiveram-se três frações que, após concentração em evaporador rotatório e liofilizadora, foram submetidas ao teste de difusão em ágar. Para isso, parte das frações (0,4%) a ser testada foi dissolvida em 0,5 mL de solução etanol:água (7:3).

3.10.2 Cromatografia líquida em coluna de Amberlite

Parte (106 mg) da fração metanólica obtida na primeira cromatografia em coluna (AL-M, fração metanólica obtida no item 3.10.1), foi fracionada em uma coluna de 2 x 20 cm de amberlite. Para isso, o material foi dissolvido em metanol/água (1:1), adicionado à coluna e eluído sucessivamente com 200 mL de água e 200 mL de metanol. Foram coletadas duas frações que, após concentração em evaporador rotatório e liofilizadora, foram testadas. Foram utilizados 2,38% da massa de cada fração a ser testada, dissolvidos em 0,5 mL de etanol/água (7:3) para serem empregadas no teste antibacteriano.

3.10.3 Análise e fracionamento em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Inicialmente, a fração metanólica obtida em amberlite (item 3.10.2) foi analisada em CLAE (Varian com detector modelo 9050), trabalhando com onda de 215 nm e coluna analítica sílica C-18, descritos no item 3.1. Mantendo fluxo de 1 mL/min., foram empregadas misturas de metanol/água, como fases móveis, em várias proporções. Após determinar as condições ideais para análise, utilizando a coluna semi-preparativa sílica-C18, foram fracionados cerca de 40 mg. Obtiveram-se cinco frações que, após concentração em evaporador rotatório e liofilizadora, foram dissolvidas em 3 mL de solução etanol/água (7:3) para a realização do teste antibacteriano. O restante foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizado.

A fração ativa foi analisada em CLAE, visando obter as condições ideais para purificá-la. Estas análises foram realizadas em aparelho Hewlett Packard e coluna analítica sílica C-18, descritos no item 3.1, com fluxo de 0,7 mL/min e, como eluente, metanol/água (35:65) por 20 min.

3.10.4 Cromatografia líquida em coluna de sílica-C18 e análise em CLAE

Parte (2,2 g) da fração metanólica obtida em coluna de sílica-gel (AL-M, item 3.10.1) foi filtrada em coluna de 2 x 5 cm de sílica-C18 usando metanol como eluente. A fração eluída com metanol foi concentrada em evaporador rotatório, acrescentada de sílica-C18 (cerca de 4 g). A mistura foi concentrada até secar e o pó resultante foi adicionado ao topo de uma coluna de 13 x 4,5 cm sílica-C18 empacotada com água/metanol (9:1). Na eluição, foram usados água/metanol (9:1, 100 mL; 8:2, 100 mL; 7:3, 100 mL; 6:4, 100 mL; 1:1, 100 mL; 4:6, 100 mL; 2,5:7,5, 100 mL; 1:9, 100 mL) e 300 mL de metanol. As nove frações coletadas foram concentradas sob baixa pressão até eliminação completa do solvente.

Estas frações foram analisadas por CLAE, em aparelho Varian ProStar e coluna Phenyl-Hexyl. O fluxo foi mantido em 1 mL/min e o eluente empregado foi metanol/água, contendo 0,165% de trietanolamina e 0,165% de ácido fosfórico (9:1). A fração 11 foi purificada.

3.10.5 Purificação da fração 11

A fim de purificar substâncias da fração 11, obtida em procedimento descrito no item 3.10.4, cerca de 200 mg desta amostra foram dissolvidos em 4 mL de solução metanol/água (3:7) e, após serem estabelecidas as condições ideais para análise, a amostra foi fracionada em cromatógrafo do tipo Varian com detector de UV 9050, coluna semi-preparativa sílica-C18, usando eluição

isocrática com metanol/água com 0,1% de ácido acético (1:1) por 20 minutos. As frações coletadas foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas.

3.11 Destilação do extrato bruto de *C. langsdorffii*

Utilizando um aparelho para destilação (Aldrich, 2005-2006), 3 g do extrato bruto de *C. langsdorffii* foram destilados sob vácuo máximo de 2 mTorr. O aparelho foi mergulhado em banho de óleo, que foi lentamente aquecido até 180°C. Após 3,2 horas, o processo foi finalizado. O destilado e o resíduo foram recolhidos, dissolvendo-os em diclorometano e metanol, respectivamente. Após remoção do solvente em evaporador rotatório e liofilização, ambos os materiais obtidos foram submetidos ao teste de difusão em ágar. Para tanto, alíquotas de 1 mg de cada material foram dissolvidas em 1 mL de solução etanol:água (7:3).

Parte do destilado (58 mg) foi submetido a uma cromatografia em coluna de 1 x 15 cm de sílica-gel. Na eluição, foram usados hexano/acetato de etila (9:1, 100 mL, 8:2, 100 mL, 7:3, 100 mL, 1:1, 100 mL), 100 mL de acetato de etila e 100 mL de metanol. Coletaram-se 90 frações de 5 mL, que foram analisadas por CCD (sílica-gel), conforme descrito no item 3.7, usando-se hexano/acetato de etila como eluentes. As frações semelhantes foram agrupadas, resultando em 10 novas frações, que foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadora. Cada fração foi dissolvida em 10 mL de etanol e submetida ao teste antibacteriano. O restante das frações foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizadora.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resumo dos procedimentos utilizados na purificação do extrato de *C. langsdorffii* encontra-se na Figura 3.

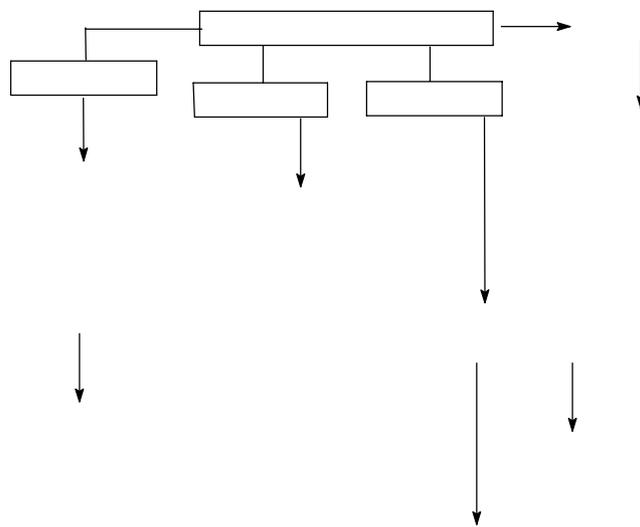


FIGURA 3: Resumo dos procedimentos utilizados na purificação do extrato metanólico bruto das folhas de *C. langsdorffii*.

4.1 Fracionamento em pequena escala

Os resultados obtidos no teste antibacteriano empregando-se as amostras obtidas no fracionamento em pequena escala são apresentados na Tabela 1.

TABELA 1: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados por frações do extrato de *C. langsdorffii*.

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Extrato bruto	11,5	13,0	12,0	12,5
Fração hexano	-	10,0	-	10,0
Fração AcOEt	-	10,0	-	8,0
Fração MeOH	20,0	14,0	13,0	19,0
Resíduo	-	-	-	-

Valores expressos em mm; (-): ausência de atividade antibacteriana

Pôde-se observar que as frações hexano, acetato de etila e metanol possuíam propriedades antibacterianas, o que sugeria a existência de mais de uma substância com propriedade antibacteriana no extrato metanólico das folhas de *C. langsdorffii*. Dentre estas, a fração metanólica mostrou-se ativa frente a todas as bactérias avaliadas.

4.2 Fracionamento em grande escala

Como todas as frações provenientes do fracionamento em pequena escala apresentaram atividade, buscou-se reproduzir o procedimento com 20 g de extrato bruto. Dentre as frações obtidas (Tabela 2), observou-se que a de metanol era a de maior massa, correspondendo a cerca de 66% do extrato bruto.

TABELA 2: Frações provenientes da lavagem do extrato bruto de *C. langsdorffii* com vários solventes.

Fração	Massa	Porcentagem do extrato bruto	Coloração / Aspecto
Hexano	4,016 g	20	Marrom esverdeado /pastoso
AcOEt	2,414 g	12,07	Verde escuro /pastoso
MeOH	13,190 g	65,95	Marrom / pó

O teste de difusão em ágar para determinar a atividade antibacteriana está sujeito a erros que podem resultar em falso-positivo ou falso-negativo. O efeito antibacteriano pode ser inibido ou aumentado por fatores como o tipo de ágar, a concentração de sais, a constituição do material, a temperatura de incubação e o tamanho molecular do componente ativo, a espessura da camada de ágar na placa e concentração de bactérias na placa (Eloff, 1998). Embora a técnica seja padronizada (NCCLS, 2003b), podem ocorrer variações nestes parâmetros, o que tende a ocasionar diferenças como as observadas quando se comparam as Tabelas 2 e 3.

TABELA 3: Halos de inibição do crescimento de diferentes bactérias, causados por frações de *C. langsdorffii* provenientes do fracionamento em grande escala.

Fração	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Hexano	-	11	-	11
Acetato de etila	10	10	-	11
Metanol	16	11	11	21

Valores expressos em mm; (-): ausência de atividade antibacteriana

Confirmado o potencial antibacteriano das frações provenientes do

extrato metanólico de *C. langsdorffii*, elas foram submetidas a processos de purificação.

4.3 Fração Hexano

4.3.1 Cromatografia em coluna de sílica-gel

A distribuição de massas das frações obtidas foi razoavelmente uniforme (Tabela 4).

TABELA 4: Frações obtidas na cromatografia em coluna de sílica-gel com a fração hexano.

Fração	Massa	Coloração
1	0,0110	incolor
2	0,0186	amarelada
3	0,0090	amarelada
4	0,0312	amarelada
5	0,0081	amarelada
6	0,0119	amarelada
7	0,0498	amarelada
8	0,0271	amarelada
9	0,0185	verde
10	0,0322	marrom
11	0,0120	marrom
12	0,0240	marrom
13	0,0288	marrom
14	0,0256	marrom
15	0,0069	esverdeada
16	0,0305	amarelo-esverdeada
17	0,0147	esverdeado
18	0,0545	marrom
19	0,0523	amarelo- esverdeada

Os resultados obtidos no teste antibacteriano mostraram que as substâncias ativas começaram a eluir a partir da sétima fração, aproximadamente

com hexano/acetato de etila (7:3), mas, não houve boa separação deste ponto em diante, já que quase todas as demais frações apresentaram atividade.

Dentre as frações ativas, a fração 7 parecia a de menor complexidade segundo análise inicial por CCD e, em decorrência, foi submetida a novo processo de fracionamento cromatográfico que resultou na obtenção de 14 frações. Dentre estas, 10 apresentaram atividade antibacteriana (da fração 4 a 14). Novas análises por cromatografia em camada delgada dessas frações e daquelas obtidas durante o primeiro fracionamento revelaram complexidade relativamente elevada, o que sugeria que eram compostas por substâncias que estavam degradando-se durante os fracionamentos. Em decorrência, foram tentados vários procedimentos com vistas a minimizar o problema.

4.3.2 Purificação com ácido e base

Inicialmente, a fração solúvel em hexano do extrato de *C.langsdorffii* foi submetida a extrações com soluções aquosas ácidas e básicas, com vistas a dividi-la em frações ácida, básica e neutra (Shriner et al., 1979), separando, principalmente, as substâncias com características alcalinas. Apenas o resíduo 1, em princípio composto por substâncias neutras, de polaridade média a baixa, apresentou atividade antibacteriana (Tabela 5).

TABELA 5: Aspecto de frações provenientes da lavagem com soluções ácidas e básicas e halos de inibição do crescimento bacteriano por elas causados.

Resíduo	Aspecto	A. hydrophila ATCC 7966	B. subtilis ATCC 6633	P. aeruginosa ATCC 27853	S. aureus ATCC 25923
1	Pastoso, marrom- esverdeado	-	18	-	12
2	Incolor	-	-	-	-
3	Amarelado	-	-	-	-

valores em mm. (-) ausência de atividade.

Apesar do resultado aparentemente promissor, o resíduo 1 se mostrou bastante parecido com a fração hexano, quando submetido a análises por CCD. Ou seja, os resultados indicavam que o processo não tinha sido eficiente.

4.3.3 Purificação com carvão ativo

Sabendo-se do fato de carvão ativo ter afinidade por substâncias orgânicas e ser utilizado na purificação de várias estruturas (Kaipper et al., 2001), a fração hexano foi submetida a tratamento com tal produto, visando eliminar pigmentos interferentes, como a clorofila. O material obtido usando extrato/carvão ativo na proporção de 1:2 apresentou coloração esverdeada, enquanto o material obtido na proporção de 1:5, aparentemente em menor quantidade, apresentou coloração esverdeada clara. Ambos os materiais apresentaram atividade antibacteriana (Tabela 6). Ao serem analisados por CCD, verificou-se que não havia diferença significativa entre os perfis cromatográficos obtidos e aquele observado para o material não submetido ao tratamento.

TABELA 6: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados por materiais provenientes da fração hexano de *C. langsdorffii* tratados com carvão ativo.

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
1:2	8	15	-	13
1:5	8	14	-	12

Halos inibitórios em mm; (-): ausência de atividade

Mesmo assim, o material tratado com carvão ativo ainda foi submetido a fracionamento em coluna de sílica, o que resultou em diversas frações ativas (Tabela 7). Análises por CCD também permitiram observar que os perfis cromatográficos das frações eram semelhantes aos das frações provenientes do fracionamento da fração hexano sem qualquer tratamento. Em outras palavras, o emprego de carvão ativo não trouxe benefícios para o processo de purificação.

TABELA 7: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados por frações provenientes do material de *C. langsdorffii* tratado com carvão ativo.

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
1	-	9	-	8
2	-	-	-	-
3	-	-	-	8
4	25	13	-	12
5	10	11	7	10
6	10	12	7	8

...continua...

TABELA 7, cont.

7	15	12	8	8
8	30	16	14	14
9	15	10	8	8
10	10	8	7	10

Halos inibitórios em mm; (-): ausência de atividade

4.3.4 Reação de hidrogenação com H₂

É amplamente conhecido que o hidrogênio pode ser facilmente adicionado a ligações duplas e triplas carbono-carbono, na presença de paládio (Hendrickson, et al., 1970). Logo, acreditava-se que seria possível reduzir o grau de insaturação da fração hexano e, com isso, diminuir possíveis processos de decomposição durante o fracionamento. Partindo-se de 100 mg da fração hexano, foram obtidos 79 mg (79%) de um pó verde-escuro, como produto da reação de hidrogenação. Este produto apresentou atividade antibacteriana (Tabela 8), porém, o perfil cromatográfico não se diferenciou do material não hidrogenado, indicando que a reação de hidrogenação também não tinha sido um processo eficiente.

TABELA 8: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelo material proveniente da fração hexano de *C. langsdorffii* antes e após a etapa de hidrogenação com H₂.

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Antes da hidrogenação	8	12	-	12
Após a hidrogenação	-	12	-	10

Valores expressos em mm, (-): ausência de atividade inibitória.

Com o objetivo de melhor avaliar a eficiência da hidrogenação, o material foi submetido à cromatografia em coluna de sílica-gel. Entretanto, o resultado do teste antibacteriano e de análises cromatográficas foram análogos aos anteriores, o que confirmou a ineficiência da hidrogenação com H₂ para simplificação do perfil cromatográfico das diversas frações.

4.3.5 Reação com boroidreto de sódio

Sabe-se que boroidreto de sódio em metanol ou etanol reduz com facilidade carbonilas cetônicas e aldeídicas aos álcoois correspondentes (Hendrickson, et al., 1970). Como há vários aldeídos que podem ser oxidados facilmente pelo oxigênio do ar (Brown e Foote, 1995), propôs-se que esse poderia ser um dos motivos para os problemas encontrados durante a purificação da fração hexano. Em decorrência, tal fração, antes e após a etapa de reação com H₂ catalisada por Pd, foi submetida a reação com boroidreto de sódio. Em ambos os casos a massa do produto foi de 20 mg, o que representa 57,1% da massa da que foi empregada na reação.

Apesar de manterem a atividade antibacteriana (Tabela 9), ambos os materiais tinham comportamento cromatográfico semelhante à fração hexano. O material submetido apenas à reação com boroidreto de sódio foi fracionado por cromatografia em coluna de sílica-gel, o que resultou em várias frações com atividade antibacteriana. Além disso, análises cromatográficas de tais frações permitiram observar que ainda eram bastante complexas. Ou seja, o processo de redução com boroidreto de sódio não facilitou a separação das substâncias.

TABELA 9: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelos materiais tratados com boroidreto de sódio.

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Antes da reação com H ₂	8	13	8	15
Após a reação com H ₂	8	10	8	12

Valores expressos em mm; (-) ausência de atividade

4.4 Fração acetato de etila

Na separação por cromatografia em coluna de sílica-gel utilizando a fração solúvel em acetato de etila (item 3.9.1), foram obtidas três frações, dentre as quais a de maior massa foi a que eluiu com acetato de etila (Tabela 10).

TABELA 10: Frações obtidas na cromatografia em coluna a partir da fração do extrato de *C. langsdorffii* solúvel em acetato de etila

Fração	Massa	Coloração, aspecto
AcOEt	0,3052g	Verde-escura, pastoso
MeOH	0,0887g	Verde-escura, pastoso
Água	0,0034g	Marrom, pó

Observou-se que a fração com maior espectro antibacteriano era aquela que eluia com acetato de etila (Tabela 11). No entanto, observou-se também que o perfil cromatográfico de tal fração era bastante semelhante ao da fração

hexano (item 4.4), o que sugeria que os problemas se repetiriam nas etapas de purificação subseqüentes.

TABELA 11: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas frações provenientes da fração do extrato de *C. langsdorffii* solúvel em acetato de etila

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
AcOEt	10	10	10	10
MeOH	9	-	-	-
Água	-	-	-	-

Valores expressos em mm (-): ausência de atividade antibacteriana

A fração acetato de etila, proveniente de cromatografia em coluna de sílica-gel (3.9.1), também foi submetida à hidrogenação e manteve-se ativa (Tabela 12). Entretanto, o perfil cromatográfico era semelhante ao da fração solúvel em acetato de etila, o que indicava ineficiência do processo. Em decorrência, esta fração foi abandonada.

TABELA 12: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pela fração acetato de etila *C. langsdorffii* antes e após hidrogenação.

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Tratada com H ₂	7	11	-	12
Não tratada	10	10	-	12

Valores expressos em mm, (-): ausência de atividade antibacteriana

4.5 Fração solúvel em metanol:

A fração metanólica, ao ser submetida a fracionamento por cromatografia em coluna de sílica gel, resultou na obtenção de três frações (Tabela 13), que foram submetidas ao teste antibacteriano (Tabela 14).

TABELA 13: Frações obtidas após eluição em coluna de sílica-gel da fração solúvel em metanol proveniente do extrato bruto de *C. langsdorffii*.

Fração	Massa	Aspecto
MeOH	3,3586 g	Marrom-escuro, pó
Água	0,1799 g	Marrom, pó
HCl	0,2264 g	Esverdeado, pó

TABELA 14: Halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos com as frações da coluna de sílica-gel através da qual a fração solúvel em metanol do extrato de *C. langsdorffii* foi eluída.

Fração	<i>A. hydrophila</i> ATCC7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
MeOH	12	12	10	17
Água	-	-	-	-
HCl	-	-	-	-

Valores expressos em mm; (-) ausência de atividade

Em análise da fração eluída com metanol por CCD, obtiveram-se melhores resultados em placas de sílica-C18, com metanol/água. Sendo assim, a próxima etapa foi a purificação em coluna cromatográfica com

Amberlite xad-16 (Mateo e Jimenez, 2000), quando obtiveram-se duas frações, uma aquosa (3%) e outra metanólica (54%), sendo esta última denominada AL-M2. Estas, foram submetidas ao teste antibacteriano (Tabela 15):

TABELA 15: Halos de inibição do crescimento bacteriano obtidos com as frações provenientes da cromatografia em coluna com Amberlite

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Aquosa	-	-	-	-
AL-M2	14	7	-	8

Halos inibitórios em mm.; (-): ausência de atividade

O resultado foi satisfatório, já que apenas a fração que eluía com metanol se mostrou ativa no teste de difusão em ágar (Tabela 15). Em decorrência, repetiu-se o processo em maior escala para que o fracionamento pudesse ter prosseguimento.

Em seguida, foram ajustadas as condições para purificação por CLAE (Figura 4), em coluna de sílica C-18 semi-preparativa. Obtiveram-se cinco frações (Tabela 16).

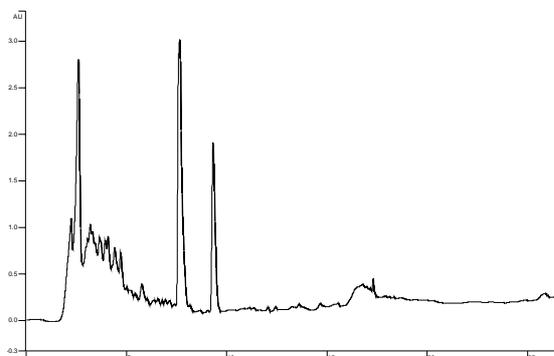


FIGURA 4: Cromatograma obtido durante o fracionamento da fração AL-M2; eluentes: metanol/água (50:50 até 77:23 em 13,5 min.; 77:23 até 100:0 em 0,5 min.; 100% metanol durante 10 min.); 4,5 mL/min. e cerca de 2,25 mg de material por injeção.

TABELA 16: Frações obtidas durante fracionamento de AL-M2 por CLAE em coluna de sílica-C18.

Fração	Massas (mg)	Tempo (min.)	Aspecto/ Coloração
01	2,0	0 - 7	Pó bege
02	2,2	7 - 8	Pó amarelo (higroscópico)
03	0,8	8 - 9	Resíduo amarelo
04	2,3	9 - 10	Resíduo amarelo
05	14,5	10 - 23,5	Pó bege

No teste antibacteriano, apenas a fração 1 apresentou atividade. No entanto, em análise por CLAE observou-se que se tratava de uma fração de grande complexidade, já que havia um grande número de substâncias que, aparentemente, se encontravam em pequenas quantidades na fração (Figura 5)

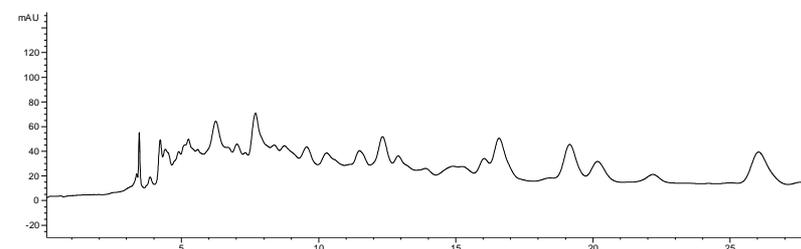


FIGURA 5: Cromatograma obtido em análise por CLAE (sílica-C18) da fração 1 de *C. langsdorffii* (Tabela 16); fluxo de 0,7 mL/min. e como eluente, metanol/água (35/65) por 20 min.

Tentando resolver este problema ou ao menos isolar as substâncias inativas (Fração 2 e 4 anteriores) em maior quantidade, foi feito o fracionamento em bancada com coluna de sílica-C18, partindo-se da fração metanólica obtida em cromatografia em coluna de sílica-gel (AL-M) (item 3.10.4). Foram obtidas nove frações, conforme a Tabela 17.

TABELA 17: Frações obtidas em coluna de sílica-C18 da fração AL-M.

Fração	Massa (mg)	Aspecto / Coloração
06	757,1	Resíduo cinza
07	258	Resíduo cinza-escuro
08	280	Resíduo cinza-escuro
09	308,8	Resíduo verde-amarronzado
10	345	Resíduo-marrom
11	200	Resíduo-marrom
12	58	Resíduo-marrom
13	49,7	Resíduo-marrom
14	61,5	Resíduo verde-escuro

Nas Figuras 6 e 7 estão os cromatogramas das frações de 7 a 13 e da fração metanólica AL-M , obtidos nas mesmas condições.

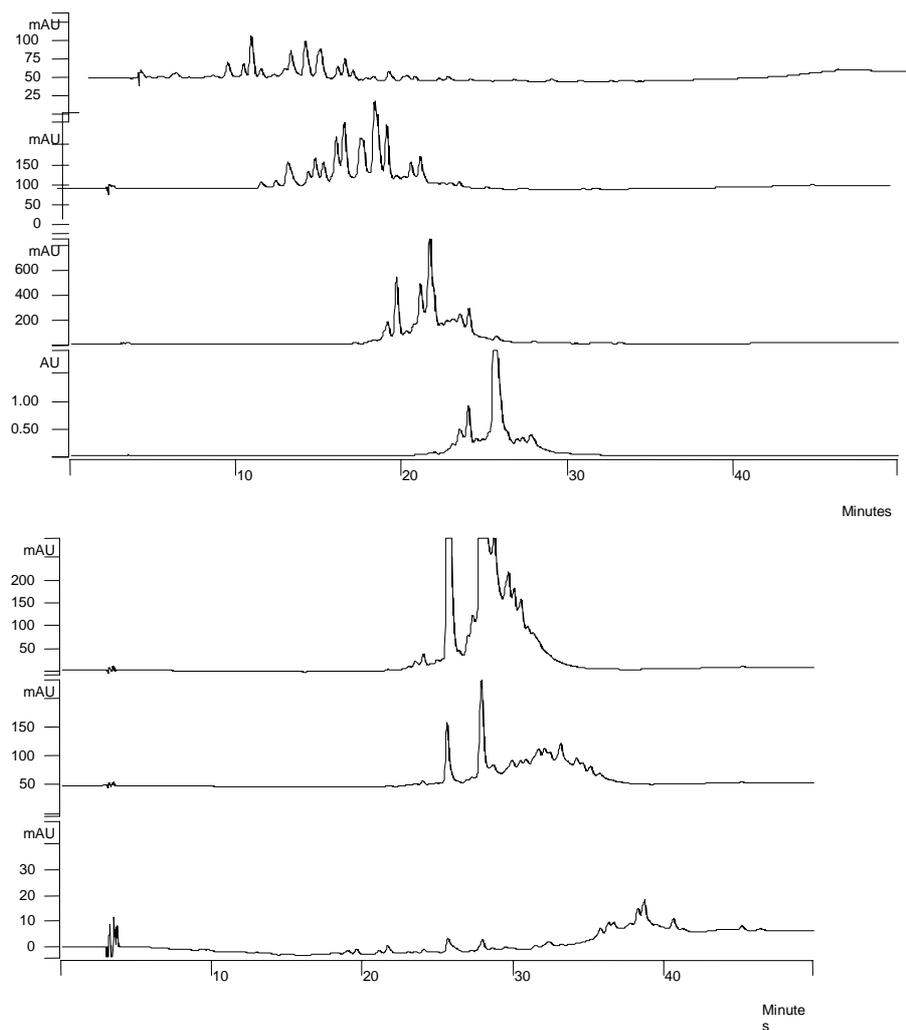


FIGURA 6: Cromatogramas das frações de 7 a 13 (de cima para baixo) obtidas em sílica-C18: fluxo de 1 mL/min., eluição com metanol/água, contendo 0,165% de trietanolamina e 0,165% de ácido fosfórico (9:1)

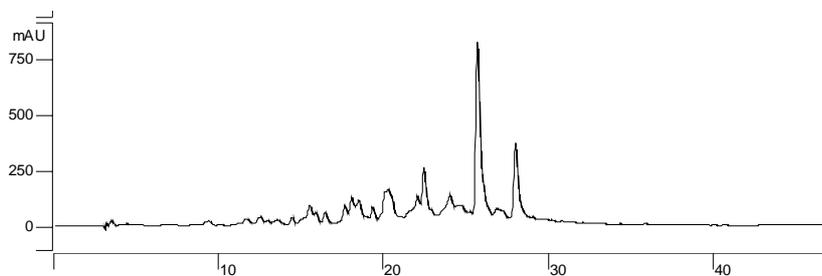


FIGURA 7: Cromatograma de AL-M, obtido com fluxo de 1 mL/min., eluição com metanol/água, contendo 0,165% de trietanolamina e 0,165% de ácido fosfórico (9:1)

Mais uma vez, observou-se a que região do cromatograma contendo as substâncias com propriedades antibacterianas se mostrava bastante complexa. Entretanto, observou-se que parecia relativamente fácil purificar as substâncias com tempo de eluição de 25,5 e 28,5 minutos, (Figuras 6 e 7). Observou-se também que os espectros de ultravioleta de tais picos (Figuras 8 e 9) eram bem semelhantes aos espectros dos principais picos na fração metanólica AL-M.

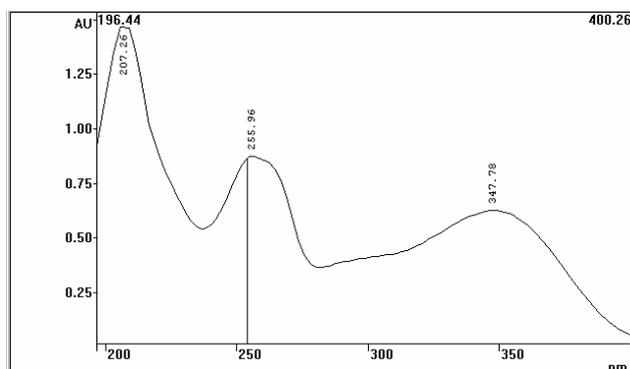


FIGURA 8: Espectro de UV da fração 11, com tempo de eluição de 25,5 min.

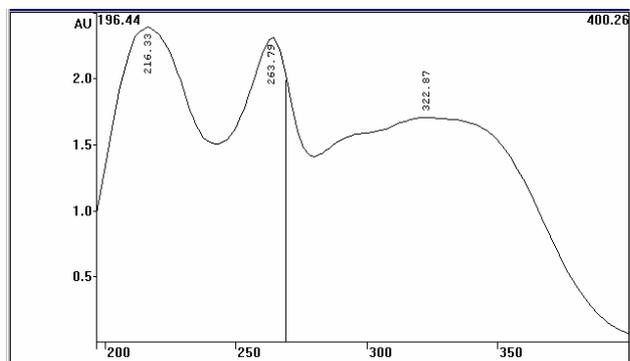


FIGURA 9: Espectro de UV da fração 11, com tempo de eluição de 28,5 min.

A fração 11 foi submetida a fracionamento em CLAE (item 3.10.5), resultando em cinco frações, das quais duas eram de maior interesse, AL-H1 e AL-H2 (Tabela 18 e Figura 10).

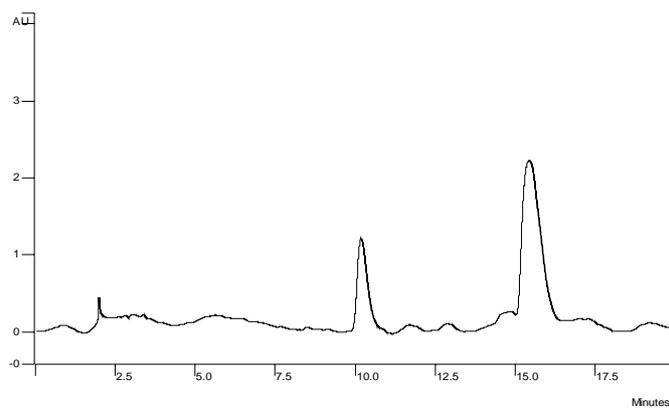


FIGURA 10: Cromatograma da purificação da fração 11. Eluente: MeOH /H₂O com 0,1% de ácido acético (50:50).

TABELA 18. Tempo de retenção, massa e aspecto das principais frações obtidas.

Fração	Tempo de saída (min)	Massa (mg)	Aspecto
AL-H 1	10,1-10,8	9,1 mg	Pó amarelo
AL-H 2	14,8-16,3	15,8 mg	Pó amarelo

Oportunamente, tais substâncias (AL-H1 e AL-H2) serão submetidas a análises por métodos espectrométricos para elucidação das suas estruturas.

4.6 – Destilação do extrato bruto de *C. langsdorffii*

O objetivo, neste caso, era tentar obter um destilado com propriedades antibacterianas, isento dos problemas observados durante os fracionamentos da fração hexano. De fato, o destilado, assim como o resíduo, mostrou-se ativo contra três das bactérias utilizadas nesse estudo (Tabela 19).

TABELA 19: Massa obtida, coloração e halos inibitórios do crescimento bacteriano para o resíduo e destilado obtidos do extrato bruto de *C. langsdorffii*.

Amostra	Massa	Coloração	A. h	B. s	P. a	S. a
resíduo	2,7466 g	verde-escuro	8	7	-	8
destilado	60,3 mg	marrom	7	10	-	9

A.h: *A. hydrophila* ATCC 7966; *B.s:* *B. subtilis* ATCC 6633; *P.a:* *P. aeruginosa* ATCC 27853; *S.a:* *S. aureus* ATCC 25923; halos inibitórios em mm; (-): ausência de halo inibitório

Das dez frações obtidas durante o processo cromatográfico do destilado, apenas as duas primeiras, com 34,0 e 8,9 mg, respectivamente, se mostram ativas. Análises cromatográficas dessas frações permitiram observar que a separação havia melhorado, mas, parecia haver sinais de decomposição como

alteração de cor e múltiplas manchas. Ou seja, a destilação não foi tão eficiente quanto o desejado.

Apesar do extrato bruto de *C. langsdorffii* não ter apresentado atividade frente a *P. aeruginosa*, esta bactéria foi empregada nos testes devido ao fato do método de difusão estar sujeito a variações. Além disso, acreditava-se que o processo de purificação poderia alterar a composição do material, eliminando substâncias interferentes.

5 CONCLUSÕES

As frações obtidas por meio de lavagens sucessivas do extrato metanólico das folhas de *C. langsdorffii* com hexano, acetato de etila e metanol, apresentam atividade antibacteriana. Portanto, em tal extrato deve haver mais de uma substância ativa contra bactérias. A utilização de cromatografia em coluna de sílica-gel sozinha ou em associação com tratamentos empregando-se carvão ativo, lavagens com soluções ácidas e básicas, hidrogenação com H₂ (Pd/C) e ou redução com boridreto de sódio não é suficiente para purificar as substâncias antibacterianas presentes na fração solúvel em hexano, proveniente do extrato das folhas de *C. langsdorffii*. A fração solúvel em acetato de etila se assemelha muito à fração solúvel em hexano, segundo análises em cromatografia de camada delgada. Ao ser submetida a fracionamento em sílica-C18, a fração metanólica dá origem a uma única fração ativa de alta complexidade, segundo análise por CLAE em sílica-C18. Entretanto, é possível isolar desta fração, com relativa facilidade, duas substâncias inativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDRICH. **Aldrich quick: distillation and sample collection tube**. Z147966 – 1EA., 2005-2006, p. E156 (catalog).

BROWN, W.H.; FOOTE, C.S. **Organic chemistry**. 2.ed. USA: Saunders College, 1995.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1926.

CUNHA, K.M.A. **Estudo dos efeitos relaxantes uterinos do ácido kaurenóico, um diterpeno isolado da *Copaifera langsdorffii* Desf.** 2001. 96p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)-Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bactéria. **Planta Medica**, v.64, p.711-713, 1998.

GRAMOSA, N.V.; SILVEIRA, E.R. Volatile Constituents of *Copaifera langsdorffii* from the Brazilian Northeast. **Journal Essent. Oil Res.**, v.17, p.130-132, Mar./Apr. 2005.

HENDRICKSON, J.B.; CRAM, D.J.; HAMMOND, G.S. **Organic chemistry**. 3.ed. McGraw-Hill, 1970. p.768-775.

ICHIHARA K. et al. Natural essential-oil insect-pest repellent, contains fractions of copaiba oil obtained by silica gel column chromatography using hexane, chloroform and/or ethyl acetate as elution solvents for development, as active ingredients. Derwent primary accession n. 2005-410635 [42]. **Patente n. JP2005145865-A**.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.O. Gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v.25, n.2, 273-286, 2002.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

KAIPPER, B. I. A.; MADUREIRA, L.A.S.; CORSEUIL, H.X. Use of activated charcoal in a solid-phase extraction technique for analysis of pesticide residues in tomatoes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v.12, n.4, jul./ago. 2001.

KRAUCHENCO, S. et al. Three-dimensional structure of an unusual Kunitz (STI) type trypsin inhibitor from *Copaifera langsdorffii*. **Biochimie**, v.86, p.167–172, 2004.

LION CORP (LIOY). Buccal compsn. used to prevent tooth decay - contains solvent extract from wood parts of Ebenaceae, Verbenaceae, Legminosae and Juglandaceae plants. Derwent primary accession. **Patente n. 1995-144677 [78]. JP7069853-A.**

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. p.279.

MATEO, J. J.; JIMENEZ, M. Monoterpenes in grape juice and wines. **Journal of Chromatography A**, n.881, p.557–567, 2000.

MENDONÇA, F.A. et al. Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti*. **Fitoterapia**, v.76, n.7-8, p.629-636, Dec. 2005.

SHRINER, R.L. et al. **The systematic identification of organic compounds – a laboratory manual**. 6.ed. Canada: J. Wiley e Sons. 1979.

PAIVA, L.A.F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from *Copaifera langsdorffii* on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascular Pharmacology**, v.39, p.303-307, 2003.

RIFURE KK. Sanitary insect-pest repellent, for use in floor waxes, comprises copaiba oil and/or caryophyllene, as active ingredient. Derwent Primary Accession Number: 2002-286700 [41]. **Patent Number: JP2001348304-A ; JP3662816-B2**

CAPÍTULO 4

PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIA COM PROPRIEDADE ANTIBACTERIANA DE *Lantana lilacina*

RESUMO

PEREIRA, Aline Carvalho. Purificação e identificação de substância com propriedade antibacteriana de *Lantana lilacina*. In: **Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do município de Lavras**. 2006. Cap. 4. p. 81-122. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Conhecendo-se as propriedades antibacterianas do extrato metanólico das folhas de *L. lilacina*, coletadas no município de Lavras, o mesmo foi submetido a fracionamento por meio de lavagens sucessivas com hexano, acetato de etila e metanol. Segundo testes de difusão de ágar, a substância antibacteriana estava presente na fração metanólica. Logo, esta foi submetida a fracionamentos direcionados por testes antibacterianos *in vitro*. Após o emprego de cromatografia em coluna de sílica-gel, Amberlite xad-16 e em coluna de sílica-C18 e cromatografia líquida de alta eficiência com coluna de sílica-C18, foi obtida uma substância, cuja estrutura foi elucidada por espectrometria de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas. Tratava-se do [β -3,4-diidroxifenil]-etil)-(3'-O- α -L-ramnopiranosil)-(4'-O-cafeoil)- β -D-glicopiranosídeo, conhecido como acteosídeo. A substância foi submetida ao teste de microdiluição em caldo, o que permitiu observar que as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínimas (CBM) para *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, eram ambas de 0,12; 1,0; 1,0 e 0,25 mg/mL, respectivamente.

* Comitê Orientador: Denilson Ferreira Oliveira – UFLA (orientador); Henrique C. Pereira Figueiredo – UFLA

ABSTRACT

PEREIRA, Aline Carvalho. Purification and identification of antibacterial substance from *Lantana lilacina*. In: **Purification and identification of antibacterials from Lavras city plants**. 2006. Cap. 4. p.81-122. Dissertation (Master Program in Agrochemistry and Agrobiochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

As the methanol extract of *L. lilacina* leaves collected in Lavras city had already presented antibacterial properties, it was purified by extraction with hexane, ethyl acetate and methanol. According to Agar diffusion assays, the antibacterial substance was present in the methanol fraction. Thus, such fraction was submitted to purification steps guided by tests to detect antibacterial properties *in vitro*. After column chromatography on silica gel, Amberlite xad-16 and silica gel-C18, and high performance liquid chromatography on silica gel-C18, one substance was isolated and its structure was elucidated by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry. That substance was the [β -3,4-dihydroxyphenyl)-ethyl]-(3'-O- α -L-rhamnopyranosyl)-(4'-O-cafeoyl)- β -D-glycopyranoside, known as acteoside. During the liquid microdilution assay it was observed that its minimal inhibition concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) against *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, were both 0.12; 1.0; 1.0 and 0.25 mg/mL, respectively.

* Guidance Committee: Denilson F. Oliveira - UFLA (Advisor), Henrique C. Pereira Figueiredo – UFLA

1 INTRODUÇÃO

Como pode ser observado no Capítulo 2 desta dissertação, cerca de 45% dos extratos vegetais estudados apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas e ou gram-negativas. Dentre esses, encontra-se o proveniente das folhas de *Lantana lilacina*, sobre a qual não foi encontrado qualquer relato na literatura relacionado ao seu potencial antibacteriano. Em decorrência, o extrato das folhas de *L. lilacina* foi analisado e fracionado com vistas a identificar a substância ativa e quantificar a mencionada atividade da mesma.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Lantana lilacina Desf., cujos sinônimos são *L. fucata* Lindl., *L. czermakii* Briq. e *L. salvisefolia* Jacq. (Lorenzi, 2002); *L. inconspicua* Tausch., *L. recta* Cham. e *L. salviaefolia* (Corrêa, 1926), pertence à família Verbenaceae, é conhecida popularmente como cambará, cambará-roxo, cambará-róseo e erva-de-grilo.

É uma planta perene, subarborescente, ereta ou decumbente, muito ramificada, bastante variável no porte e em todas as suas características morfológicas, medindo, geralmente, 50 a 120 cm de altura, nativa do Brasil. Possui flores de coloração lilás ou rósea. É medianamente comum nas regiões sul e sudeste do Brasil, onde infesta, principalmente, pastagens, cercas e terrenos baldios. É mais freqüente em regiões de altitude. Geralmente, forma enormes plantas com numerosíssimos caules e ramos, podendo ocorrer também em reboleiras densas. É muito empregada na medicina caseira e ocasionalmente cultivada como ornamental (Lorenzi, 2000). Segundo Balbach (1986), é uma planta aromática usada na preparação de infusões e xaropes peitorais, contra bronquite e resfriado.

Há poucos dados na literatura referentes a *L. lilacina*. Takeda et al. (1998), mencionado por Dembitsky (2004), citam que ésteres do tipo glicosídeos monoterpênicos (Figura 1) foram isolados das folhas da planta medicinal *L. lilacina*, útil no tratamento de bronquite.

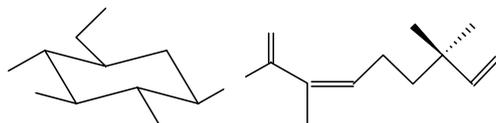


FIGURA 1: Glicosídeo monoterpêno isolado de *L. lilacina*.

Vários compostos já foram isolados do gênero *Lantana*, incluindo triterpenóides, alcalóides, glicosídeos e flavonóides. Okunade e Lewis (2004) isolaram compostos triterpenóides do extrato etanólico das folhas e caule de *L. cujabensis*, denominados ácido 3 β ,25-epoxi-3 α -hidroxi-22 β -isobutanoiloxiolean-12-en-28-oico(1), ácido lantanílico(2) e ácido camárico(3) (Figura 2).

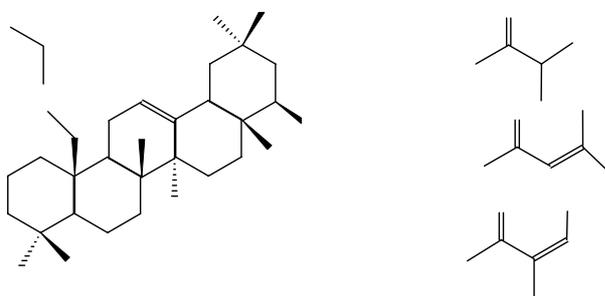


FIGURA 2: Triterpenóides isolados de *L. cujabensis*: ácido 3 β ,25-Epoxi-3 α -hidroxi-22 β -isobutanoiloxiolean-12-en-28-óico (1), ácido lantanílico(2) e ácido camárico(3).

O óleo essencial de *L. xenica* foi avaliado quanto à composição química e à atividade antimicrobiana. O principal componente encontrado foi (E)-cariofileno (35,2%), ativo contra *Bacillus cereus* e *Proteus mirabilis*. O óleo essencial mostrou pequena inibição frente a *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*. *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Micrococcus luteus* e a levedura *Candida albicans* apresentaram-se insensíveis, tanto ao óleo essencial quanto ao (E)-cariofileno (Juliani Jr. et al., 2002).

Visando à obtenção de substâncias ativas contra *Mycobacterium tuberculosis*, um screening utilizando extratos vegetais foi realizado no México. *L. hispida* apresentou resultados interessantes (Jimenez-Arellanes et al., 2003).

Outras espécies de *Lantana* já foram avaliadas quanto ao potencial bioativo, tendo *L. balansae* (Salvat et al., 2004), *L.inermis* (Ahmad e Beg, 2001), *L. camara* e *L. achyranthifolia* (Hernandez et al., 2003 & Hernandez et al. 2005) apresentado atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

No gênero *Lantana*, a espécie *L. camara* é a mais estudada. Segundo Mello et al. (2005), *L. camara* é usada popularmente, como antipirético, antimicrobiano e antitumogênico, sendo tóxica ao gado. Avaliando o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *L. camara* na fertilidade e no desenvolvimento reprodutivo geral no rato, estes autores observaram a ocorrência de anomalias fetais, sem apresentar toxicidade materna.

Kasali et al. (2004), em estudo do óleo essencial das folhas de *L. camara* L. var. *aculeata*, identificaram 39 constituintes, sendo sabineno, 1,8-cineol, cariofileno e humuleno os principais. Pino et al. (2004) identificaram sesquiterpenóides: (E)-nerolidol (43,4%), gama-cadineno (7,6%), α -humuleno (4,9%) e β -cariofileno (4,8%). Segundo Alitonou et al. (2004), o óleo essencial de *L. camara* Linn exibiu propriedades antimicrobianas significantes e possuía 41 componentes, sendo β -cariofileno o principal (18,5%). Deena e Thoppilu (2000) encontraram resultados semelhantes. Segundo Rana et al. (2005), o óleo essencial das folhas de *L. camara* é uma mistura complexa de substâncias, sendo seus principais componentes cariofileno (23,3%), α -humuleno (11,5%), e germacreno D (10,9%).

Visando à obtenção de agentes antibacterianos, Dharmagadda et al. (2005) avaliaram o óleo essencial de *L. camara*, obtendo resultados promissores na inibição do crescimento das bactérias *Bacillus megaterium*, *Klebsiella* sp. e *Staphylococcus aureus*, e do fungo *Aspergillus niger*.

Singh e Upadhyay (1993), verificaram que o óleo essencial de *L. camara* possui atividade pesticida. No Paquistão, Begun et al. (2000) isolaram,

do extrato metanólico das folhas de *L. camara*, substâncias com atividade nematocida, dentre estas, lantanosídeo (Figura 3), que causou 90% de mortalidade em *Meloidogyne incognita*.

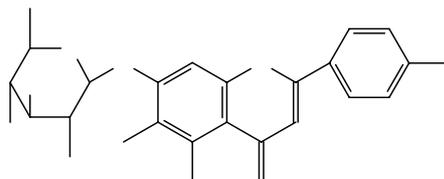


FIGURA 3: Estrutura química da substância nematocida isolada de *L. camara*.

De acordo com Siddiqui et al. (1995), investigações anteriores do extrato das folhas de *L. camara* permitiram observar propriedades farmacológicas e isolar substâncias ativas, como lancamarone (esteróide das folhas) e lantamine (alcalóide do caule e raiz). Analisando o extrato metanólico das folhas desta espécie, purificaram-no por extração com solvente e métodos cromatográficos, elucidando a estrutura de dois novos compostos por estudos de ressonância magnética nuclear. As substâncias isoladas eram triterpenos pentacíclicos, sendo um do tipo ursano e outro do tipo oleaneno.

Barre et al. (1997) isolaram compostos triterpênicos do extrato clorofórmico das folhas de *L. camara*, dentre estes o ácido 22-beta-acetil lantóico (Figura 4), com atividade antimutagênica e antibacteriana frente a *S. aureus* e *Salmonella typhi*. Saleh et al. (1999) & Rajakaruna et al. (2002) também verificaram atividade antimicrobiana de *Lantana camara*.

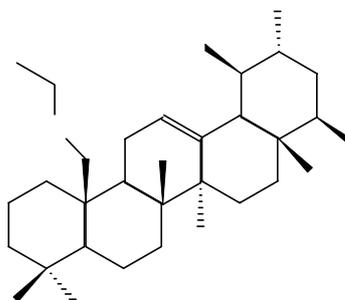


FIGURA 4: Substância antimutagênica e antibacteriana isolada de *L. camara*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos utilizados

Materiais: hexano P.A., acetato de etila P.A., metanol P.A., etanol P.A., dimetilssulfóxido (DMSO) P.A., água destilada, placas de alumínio recobertas com sílica-gel com indicador de fluorescência UV 254 (Alugram) e placas de alumínio recobertas com sílica-C18 (Merck), sílica-gel 60 (230-400 mesh, Merck), ácido clorídrico P.A., resina de poliestireno amberlite xad-16 (Sigma); metanol e acetonitrila espectroscópicos, água destilada. Reveladores: luz UV, iodo ressublimado e solução de sulfato cérico amoniacal ou solução de ácido fosfomolibdico a 5% em etanol. Cromatógrafos líquidos de alta eficiência: Varian com detector de UV modelo 9050, bomba ternária modelo 9012, injetor automático modelo 9300, Hewlett Packard 1100 equipado com detector de UV do tipo DAD, Varian ProStar equipado com detector de UV do tipo DAD, Shimadzu LC-10Ai equipado com detector de UV modelo SPD-10Ai, AGILENT 1100 com detector de UV, Varian Star SD1 com detector de UV. Colunas analíticas Phenomenex Gemini Sílica-C18 (5 μ , 250 x 4,6 mm) e Luna sílica-C18 (5 μ , 250 x 4,6 mm); coluna semipreparativa Phenomenex Gemini Sílica-C18 (5 μ , 250 x 10 mm), coluna preparativa Luna sílica-C18 (10 micrômetros, 250 x 21,2 mm); espectrômetro de massas Agilent 1100 LC/MS Trap equipado com interface do tipo electrospray; espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker de 500 MHz (IQ-UNESP). Para as análises por RMN as amostras foram dissolvidas em dimetilssulfóxido hexadeuterado (DMSO-d₆) ou em metanol tetradeuterado (CD₃OD) e empregaram-se os picos dos solventes como referência.

3.2 Coleta de material botânico

Foram coletadas 851,73g folhas da espécie *Lantana lilacina* Desf., procedendo-se conforme descrito no item 3.2, capítulo 2.

3.3 Preparação do extrato bruto para ser purificado

Procedimento realizado conforme descrito no item 3.3, capítulo 2, sendo o resíduo final (32,986 g, pó verde-escuro) empregado no processo de purificação.

3.4 Fracionamento em pequena escala

O fracionamento em pequena escala foi realizado conforme descrito no item 3.4 do capítulo 3.

3.5 Testes para verificar a atividade antibacteriana

O fracionamento foi direcionado por testes antibacterianos *in vitro*, realizados como descrito no item 3.4.1 do capítulo 2.

3.6 Fracionamento em grande escala

Parte do extrato bruto (16 g) foi extraída com acetato de etila (8 x 200 mL). Após cada adição de solvente, a mistura foi agitada por cerca de 5 minutos e decantada por, aproximadamente, o mesmo período. Então, o material extraído foi filtrado em algodão, concentrado e liofilizado. O mesmo procedimento foi realizado com metanol. Também foi obtido um resíduo insolúvel em metanol. As três frações obtidas foram submetidas ao teste de difusão em ágar. Para tanto, dissolveram-se 0,07% da massa de cada uma delas em 0,5 mL de etanol/água (7:3).

3.7 Primeira cromatografia líquida em coluna de sílica gel

Parte da fração solúvel em metanol (3,5 g), obtida no fracionamento em grande escala (item 3.6), foi pulverizada em almofariz juntamente com cerca de 7 g de sílica gel e acrescentada ao topo de uma coluna de 4 x 15 cm de sílica-gel. As substâncias foram sucessivamente eluídas com 300 mL de metanol, 300 mL de água e 300 mL de HCl 0,1M, obtendo-se 3 frações, que após serem concentradas e liofilizadas, foram submetidas ao teste de difusão em ágar. Dissolveram-se 0,3% da massa de cada uma delas em 0,5 mL de etanol/água (7:3). Desta solução, retiraram-se alíquotas de 40 µL para cada teste.

3.8 Cromatografia em camada delgada (CCD)

A fração ativa foi analisada por CCD com placas recobertas com sílica – gel. Como fase móvel, empregou-se acetato de etila/metanol em diferentes proporções. Foram obtidos vários perfis cromatográficos, direcionando a próxima etapa do fracionamento.

3.9 Segunda cromatografia líquida em coluna de sílica-gel

Partindo-se de 400 mg da fração eluída com metanol na primeira cromatografia em coluna (item 3.7), foi realizado um novo fracionamento em coluna de 2 x 20 cm de sílica-gel. Como eluentes empregaram-se acetato de etila/metanol (9:1, 100 mL; 8:2, 100 mL; 7:3, 100 mL; 6:4, 100 mL; 1:1, 100 mL; 0:1, 100 mL) e 100 mL de água. Coletaram-se frações de 20 mL, que foram analisadas por CCD e agrupadas conforme a semelhança, sendo, então, concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas. Cerca de 2,5% de cada fração foram dissolvidos em 0,5 mL de etanol/água (7:3) e alíquotas de 40 µL foram utilizadas no teste de difusão em ágar. Posteriormente, este processo foi repetido para a obtenção de maior quantidade de material.

3.10 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.10.1 Fração ativa (fração 2) obtida na segunda cromatografia em coluna

Conforme análises prévias por CCD utilizando sílica-gel e sílica-C18, a fração 2 (item 3.9) foi analisada em cromatógrafo Shimadzu, com detector que monitorava em 215 e 254 nm e coluna analítica Gemini (sílica-C18). Como eluentes empregaram-se proporções de metanol/água que variavam de 1:1 até 100% de metanol, determinando as melhores condições de análise.

Posteriormente, 125 mg da fração 2, foram fracionados em cromatógrafo Agilent 1100, equipado com coluna semi-preparativa de sílica-C18 e detector que monitorava a 215 nm. Mantendo fluxo de 3 mL/min de metanol/água (1:1), foram injetados 62,5 mg por fracionamento. Coletaram-se 22 frações, que foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas. Para a realização do teste de difusão em ágar, as frações foram dissolvidas em 13,7 mL de etanol/água (7:3). Após retirar alíquota destinada ao teste (40µL), o restante de cada fração foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizado.

3.10.2 Fração ativa (fração 3) obtida no item 3.10.1

Parte (20 mg) da fração 03, foi fracionada em cromatógrafo Varian equipado com detector de UV 9050, a 215 nm e coluna semi-preparativa Gemini (sílica-C18). A fração foi diluída em 5 mL de acetonitrila/água (25:75) e eluída com a mesma mistura de solventes por 7 min., com fluxo de 4,5 mL/min. Foram injetados 400 µg da fração por cada purificação. Obtiveram-se cinco frações que, após concentração em evaporador rotatório e liofilizadora, foram submetidas ao teste de difusão em ágar. Nesse caso, as frações foram dissolvidas em 7,2 mL de etanol/água (7:3), retirando-se alíquotas de 40 µL (0,55% de cada fração) para cada teste. O restante das frações foi concentrado em evaporador rotatório e liofilizado.

3.10.3 Fração ativa (fração 4) obtida no item 3.10.2

A fração 4 foi submetida à análise em CLAE Varian ProStar e coluna Luna sílica-C18. Mantendo fluxo de 1mL/min., a fração foi eluída com metanol/água com 0,1% de ácido acético (5:95 a 100:0 em 30 min.). Isso permitiu observar que tal fração se tratava de uma substância principal com algumas poucas impurezas. A fração que eluiu com metanol na primeira cromatografia em coluna (item 3.7) também foi analisada nestas condições, para ser utilizada posteriormente.

Visando obter maior quantidade da fração 4, a fração metanólica (1,8 g), analisada no item anterior, foi eluída através de coluna de 10 x 50 mm de sílica-C18 com 30 mL de metanol. A fase líquida obtida foi concentrada em evaporador rotatório, resultando em cerca de 1 g de material, que foi dissolvido em metanol/água (1:2) e eluído através de coluna de 1m x 2cm sílica-C18. Para tanto, foi utilizado cromatógrafo Varian Star SD1 equipado com detector de UV a 254 nm, metanol/água com 0,1% de ácido acético como eluentes, sendo 5% de metanol até 5 min., 5% a 100% de metanol até 65 minutos e 100% de metanol até 86 minutos. O fluxo foi mantido em 30 mL/min., obtendo-se 30 frações (AL-01 até AL-30), que foram concentradas sob baixa pressão. Algumas destas frações foram analisadas sob estas mesmas condições, empregando-se o aparelho Varian ProStar. A metodologia empregada foi a mesma anterior, empregando-se aqui uma coluna analítica do tipo Luna sílica-C18.

3.10.4 Purificação de AL-11 obtida em 3.10.3

A fração AL-11 foi dissolvida em 2,5 mL de MeOH/água (3:7), a uma concentração aproximada de 67 mg/mL e submetida ao fracionamento empregando-se CLAE em aparelho preparativo Varian Star SD1 equipado com coluna preparativa Luna (sílica-C18) e detecção a 320 nm. As substâncias foram eluídas com metanol/água com 0,1% de ácido acético (38:62), durante 16

minutos. O fluxo foi mantido em 20mL/min. e o detector em 320 nm. As frações foram concentradas sob baixa pressão.

Posteriormente, as frações AL-10 e AL-12 (obtidas em 3.10.3) foram reunidas e submetidas ao processo de fracionamento nas mesmas condições, obtendo-se as frações AL-E2 e AL-F2.

AL-E e AL-E2, AL-F e AL-F2 foram analisadas em cromatógrafo Varian ProStar, empregando-se uma coluna analítica do tipo Luna sílica-C18, usando na eluição metanol/água (38:62), com fluxo de 1 mL/min. Verificou-se que as frações AL-E e AL-E2 não estavam puras, ao contrário de AL-F e AL-F2.

3.10.5 Purificação de AL-E

AL-E reunida a AL-E2, foi purificada em coluna semi-preparativa Gemini já descrita anteriormente; aparelho Varian equipado com detector de UV 9050, a 254 nm; coluna preparativa Gemini (sílica C-18), eluição com 38% MeOH/ 62% água com 0,1% AcOH por 12 min., injeção de 1 mg; fluxo de 4,5 mL/min. Foram obtidas 5 frações, que foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas.

A fração obtida neste fracionamento equivalente à AL-F, foi denominada AL-F3. Solução de AL-F e AL-F3 foi misturada em proporções iguais (1 mg/mL de metanol / água (1:1)) e submetidas à análise em CLAE nas condições descritas acima, em coluna analítica Gemini. Foram injetados 30 microlitros, visando confirmar a identidade das amostras.

3.11 Identificação das substâncias isoladas

3.11.1 Espectrometria de massas

As análises foram realizadas em aparelho Agilent 1100, no modo positivo e no modo negativo, do tipo MS¹, MS² e MS³. As fragmentações foram induzidas por colisões contra He. Cerca de 1 mg da substância foi dissolvida em

1 mL de metanol espectroscópico, injetando-se 20 µL diretamente na interface com um fluxo de 5 µL/min.

3.11.2 Espectrometria de ressonância magnética nuclear

Foram feitas análises unidimensionais e bidimensionais, empregando-se um aparelho Bruker 500 MHz e como solvente DMSO-d₆ e ou CD₃OD.

3.12 Testes de microdiluição em caldo

A substância pura foi submetida ao teste de microdiluição em caldo visando obter a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Dois miligramas da amostra pura foram dissolvidos em 100 µL de DMSO, deixando-se em solução por 30 minutos. A seguir, completou-se o volume até 1 mL com caldo Mueller-Hinton. Após homogenização, 100 µL da solução foram adicionados ao primeiro poço da série de diluições. O preparo do inóculo e demais procedimentos estão de acordo com o descrito no item 3.4.2, capítulo 2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O fluxograma da Figura 5 resume os procedimentos realizados na purificação do extrato metanólico bruto das folhas de *L. lilacina*.

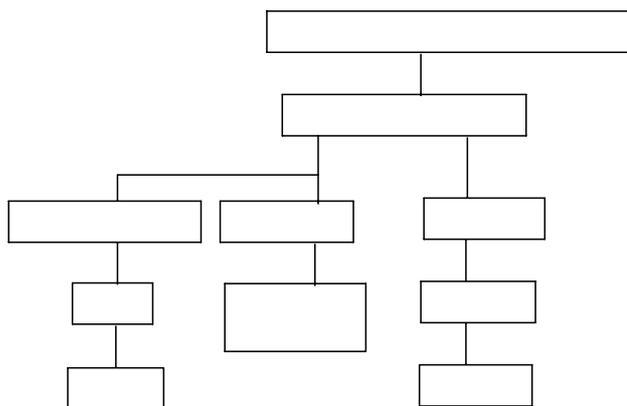


FIGURA 5: Resumo dos procedimentos realizados na purificação do extrato bruto de *L. lilacina*.

4.1 Fracionamento em pequena escala:

Os resultados do teste antibacteriano realizado com as frações provenientes da lavagem do extrato bruto em pequena escala encontram-se na Tabela 1. Como pode ser observado, as substâncias ativas se encontravam na porção do extrato solúvel em metanol.

TABELA 1: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas frações obtidas no fracionamento em pequena escala do extrato bruto de *L. lilacina*.

<i>Tratamentos</i>	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Extrato bruto	18,0	12,0	11,0	18,0
Fração hexano	-	-	-	12,0
Fração acetato	-	-	-	7,5
Fração metanol	19,0	10,0	12,0	22,0
Resíduo insolúvel	-	-	-	-

Medida do halo inibitório em mm. (-):ausência de atividade antibacteriana

4.2 Fracionamento em grande escala

Como a porção do extrato bruto do fracionamento em pequena escala que apresentou maior atividade antibacteriana foi aquela que se solubilizou em metanol, buscou-se obtê-la em maior quantidade. Observou-se que a fração metanólica correspondia a 54,6% do extrato bruto (Tabelas 2 e 3).

TABELA 2: Frações de *L. lilacina* obtidas em grande escala.

Fração	Massa	Aspecto
AcOEt	6,2698 g	Verde-escuro, pastoso
MeOH	8,74 g	marrom, pó
Resíduo	0,1508 g	marrom, pó

TABELA 3: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas frações do extrato de *L. lilacina* obtidas em grande escala.

<i>Amostra</i>	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
AcOEt	17,0	12,0	-	20,0
MeOH	25,0	14,0	11,5	20,0
Resíduo	7,5	-	-	-

halos inibitórios em mm; (-): ausência de atividade

A fração acetato de etila proveniente do fracionamento em grande escala, ao contrário daquela obtida em pequena escala, apresentou atividade contra *A. hydrophila* e *B. subtilise*. Talvez a substância ativa tivesse solubilidade intermediária, sendo parcialmente extraída durante as lavagens sucessivas com acetato de etila.

Como a fração metanólica correspondia à maior parte do extrato bruto, foi submetida a processos de purificação.

4.3 Primeiro fracionamento por cromatografia em coluna de sílica-gel

Foram obtidas três frações, cujas massas e aspectos estão descritos na Tabela 4. A fração obtida da eluição com metanol correspondia a 91% da massa total submetida ao fracionamento.

TABELA 4: Massas e aspectos das frações obtidas na primeira cromatografia em coluna de sílica-gel.

Fração	Massa (g)	Aspecto
MeOH	3,182	Marrom-esverdeado-escuro
Aquosa	0,36	Marrom
HCl	0,2294	Amarelada

O resultado do teste antibacteriano realizado com as frações obtidas nesta primeira cromatografia em coluna encontra-se na Tabela 5. A porção ativa concentrou-se na fração eluída com metanol.

TABELA 5: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas frações de *L. lilacina* obtidas na primeira cromatografia em coluna.

Frações	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
MeOH	19,0	13,0	8,0	14,0
Aquosa	8,0	-	-	-
HCL	-	-	-	-

halos inibitórios em mm; (-): ausência de atividade

4.4 Segundo fracionamento por cromatografia em coluna de sílica-gel

As frações obtidas durante a eluição foram analisadas por CCD, aquelas semelhantes foram agrupadas resultando em 12 frações. Destas, apenas uma (fração 2), obtida em acetato de etila/metanol (9:1), apresentou atividade antibacteriana, com halos de 14,0, 10,0 e 18,0 frente a *A. hydrophila*, *B. subtilis* e *S. aureus*, respectivamente.

4.5 Análise e fracionamento em cromatografia líquida de alta eficiência

A fração ativa (fração 2) obtida anteriormente em coluna de sílica-gel, foi analisada por CCD em sílica-gel e sílica C-18. Como o perfil cromatográfico obtido em sílica-C18 foi o melhor, iniciou-se o estudo utilizando fase reversa, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – sílica C-18. Na análise prévia, conforme descrito no item 3.10.1, foram estabelecidas as condições para iniciar o fracionamento e, como os cromatogramas obtidos eram semelhantes, as duas frações ativas foram reunidas.

No primeiro fracionamento, descrito no item 3.10.1, dentre as 22 frações coletadas, apenas uma (fração 3), obtida entre 5,6-8,4 minutos, com 23 mg e aspecto de um pó bege, apresentava atividade antibacteriana, com halos de inibição iguais a 10 mm para *A. hydrophila*, 9 mm para *B. subtilis*, 7 mm para *P.aeruginosa* e 12 mm para *S.aureus*. Todas as demais frações foram inativas.

Na próxima etapa (item 3.10.2), obtiveram-se cinco frações a partir da fração 03. Dentre essas, apenas a de número 4, que eluiu em AcCN/água (25:75), entre 4,5 e 5 minutos, com 4,5 mg e aspecto de pó bege, apresentado atividade antibacteriana. O cromatograma obtido durante o segundo fracionamento de *L. lilacina*, encontra-se na Figura 6.

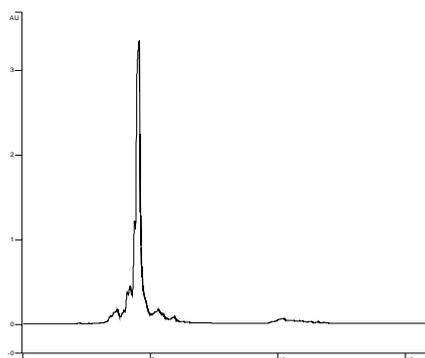


FIGURA 6: Cromatograma obtido durante o fracionamento da fração 03 de *L. lilacina*, conforme descrito no item 3.10.2.

A fração 4 apresentou os seguintes halos inibitórios: 10,0 mm para *A. hydrophila*, 10,0 mm para *B. subtilis*, 7,0 mm para *P. aeruginosa* e 12,0 mm para *S. aureus*.

A fração 4 foi analisada em CLAE conforme descrito no item 3.10.3. obtendo-se um cromatograma com pico principal entre 11 e 12 minutos, sendo o mesmo observado na análise da fração metanólica, sob as mesmas condições (Figura 7).

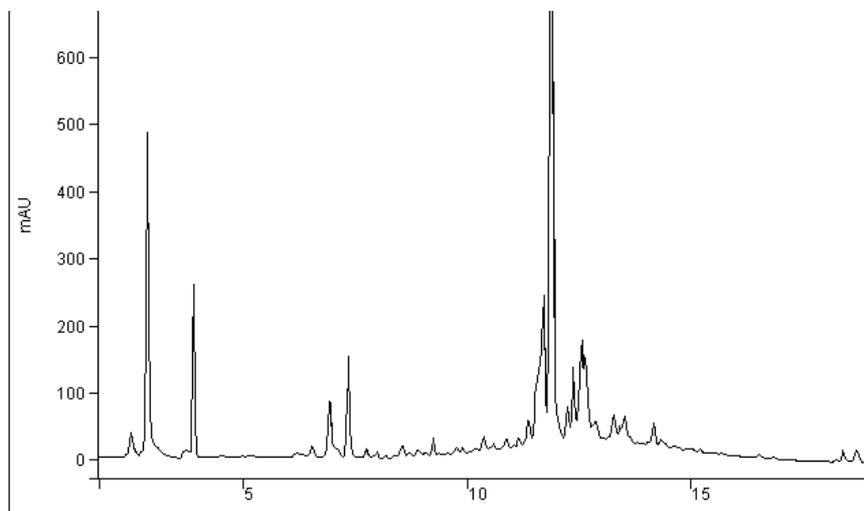


FIGURA 7: Cromatograma da fração metanólica, nas condições descritas em 3.10.3.

Visando obter material puro em maior quantidade, iniciou-se novo fracionamento a partir da fração metanólica obtida na primeira cromatografia em coluna de sílica-gel, denominada fração metanólica 1. Neste fracionamento foram obtidas 30 frações, sendo as de número 10, 11 e 12 as que possuíam maior massa (Tabela 6) e apresentavam maior pureza na região de interesse (Figura 8), conforme análise da fração 4. A fração 11 (AL-11), possuindo a maior massa, foi selecionada para ser purificada. Espectros de ultravioleta desta fração apresentaram curvas características de flavonóides, sendo a região de absorção máxima do pico de interesse em 320 nm. Por este motivo, este foi o comprimento de onda selecionado para dar continuidade à purificação.

TABELA 6: Frações de maior interesse obtidas no fracionamento da fração metanólica 1.

Código	Tempo de coleta	Massa obtida (g)
Al-10	35-37 min.	63,1
Al-11	37-39 min.	169,0
Al-12	39-41 min.	90,2

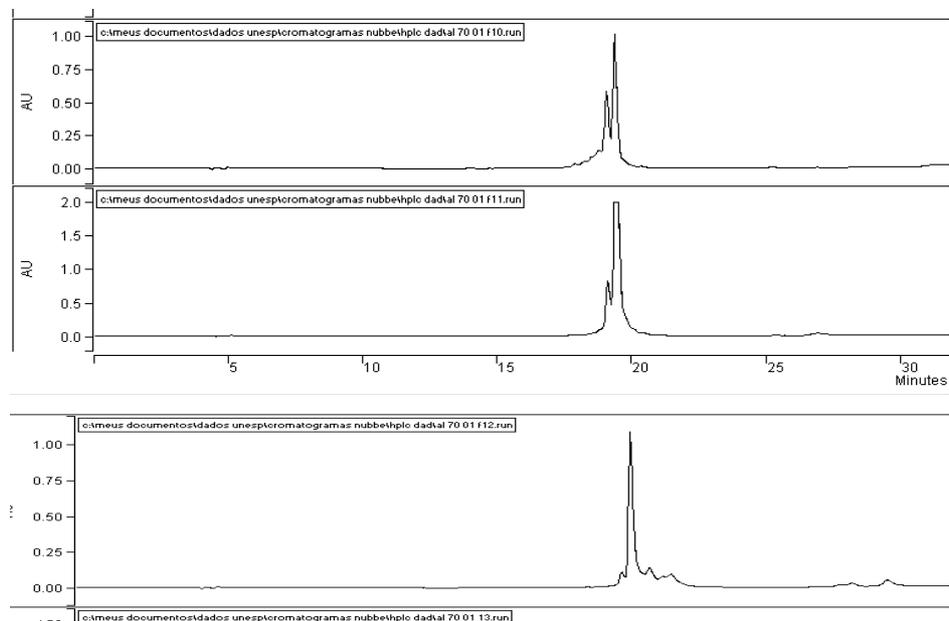


FIGURA 8: Cromatogramas das frações AL-10, AL-11 e AL-12, respectivamente, nas condições descritas no item 3.10.3.

AL-11, possuindo maior massa, foi selecionada para ser purificada, conforme descrito no item 3.10.4. Na Figura 9 encontra-se o cromatograma obtido neste fracionamento e na Tabela 7 há informações sobre as duas principais frações obtidas. Na Figura 8, o pico equivalente à fração AL-F está com o cume duplicado devido a uma falha no detector usado durante a purificação.

Foram obtidos cerca de 15 mg de AL-F, um material pastoso que escurecia com facilidade.

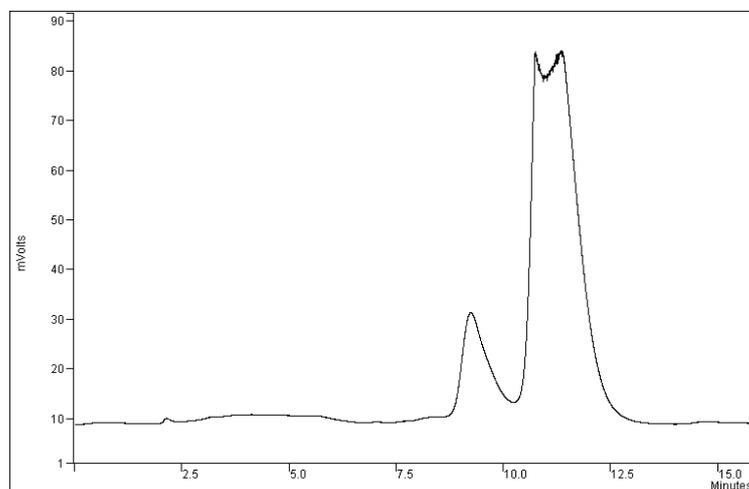


FIGURA 9: Cromatograma obtido durante a purificação de AL-11, conforme descrito no item 3.10.4.

TABELA 7: Informações sobre as principais frações obtidas a partir de AL-11.

Amostra	Tempo de coleta	Massa obtida
Al-E	8,5-10,2 min	8 mg
Al-F	10,2-12,5 min	15 mg

Após a purificação de AL-11, as frações AL-10 e AL-12 foram reunidas e fracionadas empregando-se a mesma metodologia, visando obter maior quantidade das substâncias de interesse (Figura 10), agora denominadas AL-E2 (3,2 mg) e AL-F2 (11mg).

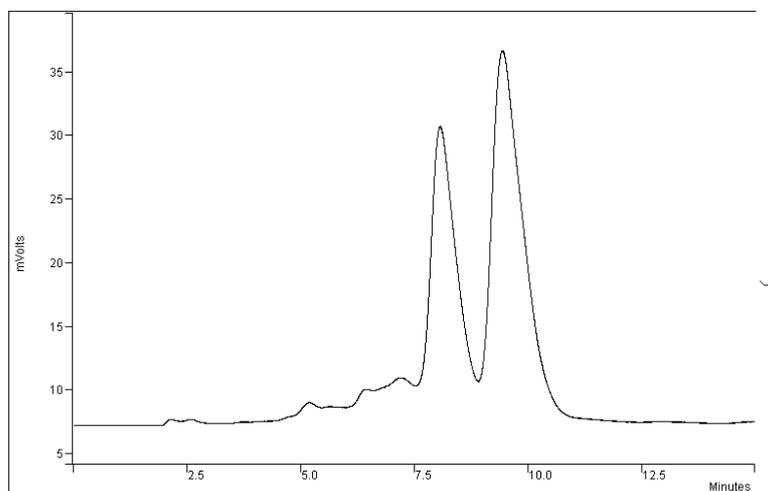


FIGURA 10: Cromatograma obtido durante purificação das frações 10 e 12, nas condições citadas em 3.10.4.

As amostras AL-F, AL-F2, AL-E e AL-E2 foram submetidas a análise por CLAE, nas mesmas condições em que foram obtidas, com o objetivo de compará-las. Observou-se que AL-F e AL-F2 eram iguais, assim como AL-E e AL-E2.

As amostras AL-E e AL-E2 estavam contaminadas com AL-F e AL-F2, respectivamente, e foram purificadas como descrito no item 3.10.5, o que resultou nas frações AL-E3 e AL-F3. Em análise comparativa foi confirmado que AL-F3 = ALF. O cromatograma obtido durante o fracionamento de ALE encontra-se na Figura 11 e algumas informações sobre as frações de interesse encontram-se na Tabela 8.

TABELA 8: Informações sobre as frações de interesse obtidas no fracionamento de AL-E

Frações	Tempo (min)	Massa final	Aspecto / Coloração
AL-E3	7,9-9	3,8 mg	Pó higroscópico, marrom
AL-F3	9,5-10,5	5,3 mg	Pó higroscópico, marrom

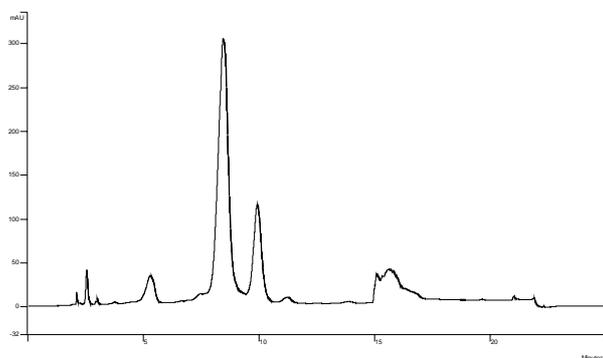


FIGURA 11: Cromatograma obtido durante o fracionamento de AL-E (3.10.5).

O cromatograma obtido através de co-injeção de AL-F e AL-F3 encontra-se na figura 12, verificando-se realmente ser a mesma substância, eluindo a 11,5 min., aproximadamente.

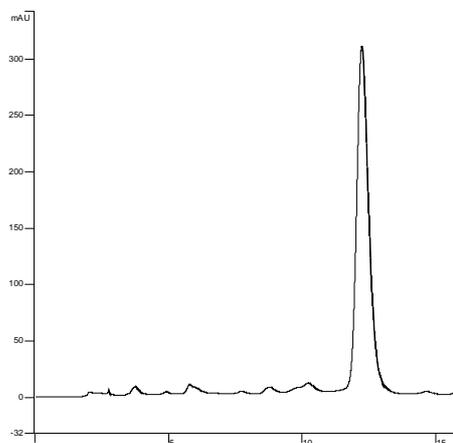


FIGURA 12: Cromatograma obtido durante co-injeção de AL-F com AL-F3 (3.10.5).

4.6 Identificação das substâncias isoladas:

A amostra AL-E3 foi submetida à análise por RMN, mas, a quantidade de material obtida não foi suficiente para um bom espectro, não sendo possível obter maiores informações desta substância.

Nas análises de AL-F, o espectro de RMN ^1H mostrava, nitidamente, que a maior parte dos sinais era decorrente de grupos ligados a heteroátomos (2,6 a 5,1 ppm) ou com carbono sp^2 (6 a 7,8 ppm). Este resultado sugeria que a estrutura da molécula poderia ser composta por anéis aromáticos (talvez flavonóides) ligados a unidades glicosídicas. Tal possibilidade foi corroborada pelo espectro de RMN ^{13}C , já que a maior parte dos sinais se encontrava na região de carbono sp^3 ligado a heteroátomo e de carbono sp^2 . Aqui vale mencionar que os sinais entre 140 e 150 ppm sugeriam que os átomos de carbono estavam ligados a heteroátomos, talvez hidroxilas. Ademais, observava-se também um sinal nítido em 165 ppm, o que indicava a presença de um grupo carbonila derivado de ácido carboxílico na molécula, sendo, provavelmente, um éster. (Silverstein, 1991).

Os resultados obtidos em análises por correlações heteronucleares do tipo HMQC e HMBC e homonucleares do tipo TOCSY 1D (Figuras 1A a 21A do anexo A) confirmaram essas propostas iniciais e permitiram a construção da estrutura apresentada na Figura 13. Os dados de RMN deixavam evidente a presença do grupo cafeoil com a estereoquímica *trans*, que ficou nítida pela constante de acoplamento (16 Hz) entre os hidrogênios olefinicos.

Os dados estão de acordo com os obtidos por Owen et al. (2003), em metanol, não restando dúvidas quanto à estrutura da substância. O resíduo de α -L-ramnose com R1-OR e R2-OH, na posição axial é confirmado pelos deslocamentos químicos de ^{13}C e os baixos valores de acoplamento entre os hidrogênios 1-2 ($J=1,5$ Hz, equatorial-equatorial) e entre os hidrogênios 2-3 (equatorial-axial). O resíduo de β -D-glicose com substituinte em 1-O, ligação glicosídica em G3 e acilação em G4 é confirmada por: deslocamento químico de ^{13}C a 101,8 ppm para G1 e elevada constante de acoplamento trans-axial para todos os prótons do anel (7,5 – 9,0 Hz), deslocamento químico em baixo campo para G3 (80,44) e para o hidrogênio de G4 (4,90 ppm).

As posições das hidroxilas no anel aromático também puderam ser estabelecidas de forma inequívoca sem qualquer problema. Quanto ao grupo derivado do hidroxitirosol, a atribuição também ocorreu com facilidade, estando de acordo com os dados obtidos para substâncias com características similares à estrutura proposta para AL-F, isoladas de plantas do gênero *Lantana*. Observou-se que *Lantana camara* produzia uma substância muito similar (Mahato et al., 1994) à apresentada na Figura 13. A única diferença aparente estava na estereoquímica da dupla ligação que, nesse caso, era *cis*. Os sinais observados no espectro de RMN ^1H e ^{13}C eram bastante similares aos obtidos para AL-F. Uma das diferenças observadas residia no valor da constante de acoplamento entre os hidrogênios olefinicos, que era menor.

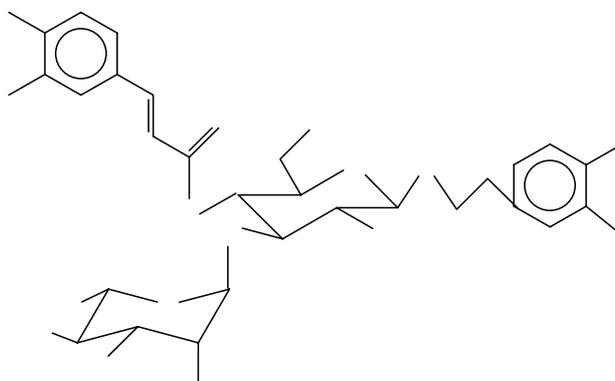


FIGURA 13: Estrutura proposta para AL-F.

Outras buscas na literatura conduziram ao trabalho realizado com a planta *Strobilanthes cusia*, da qual foi isolada uma substância, denominada acteosídeo (Tanaka et al., 2004), cuja estrutura era idêntica à proposta para AL-F. Como pode ser observado na Tabela 9, os dados de RMN ^{13}C e ^1H de AL-F e do acteosídeo, obtidos em DMSO- d_6 , eram perfeitamente coincidentes, o que confirmava a proposta inicial.

TABELA 9: Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H em DMSO- d_6 para AL-F e acteosídeo.

Posição	^{13}C		^1H	
	Acteosídeo*	AL-F	Acteosídeo*	AL-F
H1	129	129,6	-	-
H2	116,2	116,28	6,77(d; J=7,9; 1H)	6,68(s; 1H)
H3	144,9	144,96		
H4	143,4	143,5		
H5	115,7	115,5	6,62(sl; 1H)	6,69(d; J=5,0; 1H)
H6	119,4	119,5	6,50(d; J=7,9; 1H)	6,55(dd; J1=8,0; J2=1,5; 1H)

...continua...

TABELA 9, cont.

H7	34,9	34,97	2,71 (m; 2H)	2,78(ddd; J1=13,0; J2=7,0; J3=7.0; 1H) 2,73(dd; J=13; J=7; 1H)
H8	70,2	70,2		3,94(ddd; J1=7; J2=J3=9; 1H) 3,66(ddd; J1=6,8; J2=J3=9,3; 1H)
C1	125,8	125,8		
C2	114,6	114,68	7,05 (sl; 1H)	7,08(s;1H)
C3	145,5	145,52		
C4	148,4	148,44		
C5	115,4	113,9	6,63 (d; J=7,9; 1H)	6,82(d; J=8,5; 1H)
C6	121,3	121,36	6,99 (d; J=7,9; 1H)	7,03(dd; J1=8; J2=1,5; 1H)
C7	145,5	145,54	6,21 (d; J=15,9; 1H)	7,51(d; J=16; 1H)
C8	113,5	113,57	7,47 (d; J=15,9; 1H)	6,25(d; d; J=13; 1H)
C9	165,6	165,5		
G1	102,2	102,27	4,35 (d; J=7,3; 1H)	4,41(d; 8; 1H)
G2	74,4	74,48	3,22(dd; J1=7,3; J2=9,8)	3,27(dd; J=8; 1H)
G3	79,5	79,6	3,67(dd; J1=9,2; J2=9,8)	3,76(dd; J1=J2=9; 1H)
G4	69	69,14	4,68(dd; J1=J2=9,8)	4,77(dd; J1=J2=9,5; 1H)
G5	74,4	74,48	3,43(d; J=9,2; 1H)	3,53(m) 4,77(dd)
G6	60,6	61	3,47 3,43	3,47(m) 3,36(m)
R1	101,1	101,1	N	5,09(sl)
R2	70,6	70,37	N	3,74(s)
R3	70,3	70,49	N	3,3-3,58(m)
R4	71,6	72	N	3,16(dd; J=9; J2=9,5)
R5	68,6	68,8	N	3,32(m)

...continua...

TABELA 9, cont.

R6	18,0	18,1	0,96 (d, J=6,0; 3H)	1,01(d; J=6,5)
----	------	------	------------------------	----------------

Acteosídeo*: Tanaka et al.(2004); N: Não mencionado pelo autor; J=Hz

Os dados espectroscópicos obtidos para AL-F em CD₃OD, também foram coincidentes com os observados na literatura (Wu et al.,2004; Owen et al., 2003), tendo, neste solvente, o espectro de ¹H apresentado uma resolução melhor que aquela obtida em DMSO-d₆ (Tabela 10).

TABELA 10: Deslocamentos químicos para ¹³C e ¹H obtidos em CD₃OD para AL-F e acteosídeo.

Posição	¹³ C		¹ H	
	Actosídeo*	AL-F	Acteosídeo*	AL-F
C1	127,69	126,52		
C2	115,29	114,10	7,06 (d; J=1,8; 1H)	7,05 (d; J=2; 1H)
C3	146,83	146,81		
C4	149,78	149,21		
C5	116,55	115,95	6,78 (d; 8,2; 1H)	6,77 (d; J=2,0; 1H))
C6	123,23	122,00	6,96(dd; J1=8,2; J2=1,8; 1H)	6,95 (dd; J1=2,0; J2=8,2; 1H)
C7	114,75	115,15	7,59 (d; J=16; 1H)	7,58 (d; J=16; 1H)
C8	148,02	148,57	6,27 (d; J=16; 1H)	6,26 (d; J=16; 1H)
C9	168,31	167,11		
H1	131,52	130,34		
H2	116,35	115,35	6,71(d;J=2,0;1H)	6,69 (d; J=2; 1H))
H3	146,07	145,98		
H4	144,59	145,65		
H5	146,07	115,35	6,68(d;J=8,0;1H)	6,67 (d; J=7; 1H)
H6	117,08	120,08	6,57(dd;J=8,0;1 H)	6,56 (dd; J1=2; J2=9,7)

...continua...

TABELA 10, cont.

H7	36,56	35,38	2,76(m;2H)	2,79 (m; 2H)
H8	71,32	72,35	4,05(dd, J1=17,0; J2=8,0; 1H)	4,03(dd; J1=7,5; J2=15,0; 1H) 3,72(dd; J1=9,5; J2=11,0; 1H)
G1	104,21	101,83	4,38(d; J=8,0;1H)	4,37 (d; J=8,0)
G2	76,22	75,04	3,40(dd; J1=8,0; J2=9,0; 1H)	3,38 (t; J1=8,0; J2=7,5; 1H)
G3	81,66	80,44	3,81(t; J=9,2;1H)	3,81 (t; J1=8,0; J2=9,5; 1H)
G4	70,62	70,91	4,91(t; J=9,6;1H)	4,90 (t; J=6; J=9)
G5	76,03	74,88	3,53	3,53 (m; 1H)
G6	62,39	61,21	3,52 3,62	3,62 (dd; 1H) 3,519 (dd; 1H)
R1	103,02	103,05	5,20 (d; J=1,4;1H)	5,18 (dd) J=1,5 Hz
R2	72,35	71,18	3,93 (sl; 1H)	3,91 (m; 1H)
R3	72,25	71,05	3,58	3,55 (m; 1H)
R4	73,99	72,63	3,30 (t; J=9,5;1H)	3,27(m; 1H)
R5	70,08	69,23	3,55	3,54 (m; 1H)
R6	17,91	17,24	1,08 (d, J=6,0; 3H)	1,08 (d; J=6; 3H)

J=Hz; Acteosídeo*: Wu et al.(2004)

As representadas as correlações heteronucleares $^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$ a ^2J e ^3J (HMBC), obtidas para AL-F, estão representadas na Figura 14.

A estrutura proposta para AL-F, nomeada [β -3,4-dihidroxifenil)-etil]- $(3'-\text{O}-\alpha\text{-L-ramnopiranosil})-(4'-\text{O-caffeoil})-\beta\text{-D-glicopiranosídeo}$, foi confirmada pelos dados de RMN, tem fórmula molecular $\text{C}_{29}\text{H}_{36}\text{O}_{15}$ e massa molecular igual

a 624, o que estava totalmente de acordo com os resultados das análises por espectrometria de massas (Figuras 22A a 26A do anexo A). Observou-se que, no modo negativo, AL-F apresentava picos com massa/carga iguais a 623 e 659, que correspondiam a M-1 e M+Cl. Experimentos que permitiam induzir tais íons à fragmentação também estavam totalmente de acordo com a estrutura proposta. O íon com massa/carga igual a 623 gerava um sinal com massa/carga igual a 461 (M-1-162), que correspondia à perda do grupo cafeoil. Observou-se também que, a partir do íon correspondente ao pico em m/z 461, era possível gerar picos com massa/carga iguais a 315 (M-1-162-146), referente à perda de ramnose. No modo positivo, os dados estavam coerentes com os obtidos por Plaza et al. (2005), sendo observado um pico com massa/carga igual a 647 (M+Na⁺), que sofria fragmentação para gerar o pico com massa/carga igual a 501 (M+Na⁺-146), referente à perda de ramnose.

Glicosídeos do tipo fenilpropanoides são amplamente distribuídos em diferentes famílias de plantas. Possuem propriedades diversas, como antibacteriana, antiviral, analgésica, antiespasmódica, neuroprotetora, citostática, antiinflamatória e potente ação antioxidante (Diaz et al., 2004).

Acteosídeo, também denominado verbascosídeo, pertencente a esta classe, foi isolado no gênero *Lantana* (Herbert et al., 1991), do extrato metanólico das folhas de *L. camara*. Neste estudo, afirmaram que a substância é um potente inibidor de proteína quinase C, o que explicaria, em parte, a atividade antitumoral desta planta.

Zhang et al. (2002) estudaram a função regulatória de acteosídeo na atividade da telomerase de adenocarcinoma humano, sugerindo uma ação inibitória desta substância frente à telomerase. O potencial antitumoral desta substância também foi avaliado por Ohno et al. (2002), verificando que ela suprimia metástases e prolongava o tempo de vida em ratos.

Ono et al. (2005) verificaram que acteosídeo, proveniente de *Lippia dulcis*, apresenta atividade antioxidante mais potente que α -tocoferol. Owen et al. (2003) e Aligiannia et al. (2003) também avaliaram o potencial antioxidante desta substância. A mesma substância foi isolada de *Scrophularia scorodonia*, sendo classificada como potente antiinflamatório (Diaz et al., 2004) e das flores de *Buddleja officinalis*, apresentando atividades antibacteriana e anticâncer (Li et al., 1997).

4.7 Testes de microdiluição em caldo

A substância pura foi submetida ao teste de microdiluição em caldo, visando melhor avaliar o potencial antibacteriano e comparar com um antibiótico conhecido (cloranfenicol). O teste foi realizado conforme descrito no item 3.11. Na Tabela 11 encontram-se os resultados obtidos no teste de microdiluição em caldo.

Debrauwer et al. (1989) isolaram acteosídeo isolado das partes aéreas de *Plantago cynops* L. verificando o efeito antibacteriano desta substância. Acteosídeo foi obtido de *Ballota nigra* (Didry et al., 1999), sendo capaz de inibir o crescimento de cepas de *Proteus mirabilis* e *S. aureus* resistente à meticilina, na concentração de 0,128 mg/mL. *Phlomis samia* (Kyriakopoulou et al., 2002) e *Arrabidaea harleyi* (Lima et al., 2003) também são fontes de acteosídeo, substância capaz de inibir o crescimento de *S. aureus*, *Micrococcus luteus*, *B. subtilis*, *B. mycoides*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens* e *Candida albicans*.

TABELA 11: Resultados de CIM e CBM para a substância isolada de *L.lilacina*.

<i>Amostra</i>	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>
Al-F	0,125	0,125	>1,000	-	1,000	1,000	0,250	0,250
Cloranfenicol	0,025	0,050	0,100	0,100	>0,200	-	0,200	>0,200

Valores expressos em mg/mL: (-): teste não realizado

Avila et al. (1999) avaliaram o modo de ação de acteosídeo obtido de *Buddleja cordata* frente a *Staphylococcus aureus*, observando um efeito letal devido à inibição da incorporação de leucina e da síntese de proteínas. Segundo Pardo et al. (1993), a concentração mínima inibitória desta substância frente a *S. aureus* foi de 0,4 mg/ml, enquanto a concentração bactericida mínima foi de 0,8 mg/ml.

Neste trabalho, acteosídeo exibiu ação inibitória no crescimento de *A. hydrophila*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* (Tabela 11). A bactéria que se mostrou mais susceptível nas condições do experimento foi *A. hydrophila*, com CIM e CBM de 0,125 mg/mL de acteosídeo.

Frente ao potencial antibacteriano, antitumoral e antioxidante, bem como ao fato de ser encontrada em várias espécies vegetais, é preciso melhor avaliar a substância acteosídeo, realizando ensaios químicos e farmacológicos que viabilizem seu uso, seja humano, veterinário ou como protótipo na síntese de novas drogas.

5 CONCLUSÕES

Por meio de extrações com solventes e métodos cromatográficos é possível isolar a substância com fórmula molecular $C_{29}H_{36}O_{15}$, nomeada [β -3,4-dihidroxifenil)-etil)-(3'-O- α -L-ramnopiranosil)-(4'-O-cafeoil)- β -D-glicopiranosídeo, conhecida como acteosídeo, do extrato metanólico das folhas de *L. lilacina*. No teste de microdiluição em caldo, com *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, essa substância apresenta concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) de 0,12 mg/mL, > 1,0 mg/mL, 1,0 mg/mL e 0,25 mg/mL, respectivamente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, A.; BEG, A.Z. Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, n.2, p.113-213, 2001.
- ALIGIANNIA, N. et al. Methanolic extract of *Verbascum macrurum* as a source of natural preservatives against oxidative rancidity. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.7308-7312, 2003.
- ALITONOU, G. et al. Chemical composition and biological activities of essential oil from *Lantana camara* Linn. **Comptes Rendus Chimie**, v.7, n.10-11, p.1101-1105, 2004.
- AVILA, J.G. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.66, p.75-78, 1999.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. Itaquaquecetuba, SP: Edel, 1986. p. 110.
- BARRE, J.T. et al. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. **Phytochemistry**, v.45, n.2, p.321-324, 1997.
- BEGUM, S. et al. Nematicidal Constituents of the Aerial Parts of *Lantana camara*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.765-767, 2000.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1926.
- DEBRAUWER, L. et al. Study in the chemical constituents of plantago cynops L. and antibacterial evaluation of verbascoside. **Pharmaceutical Acta Helv.** v.64, n.7, p.183-187, 1989.
- DEENA, M.J.; THOPPILU, J.E. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. **Fitoterapia**, v.71, p.453-455, 2000.
- DEMBITSKY, V.M. Chemistry and Biodiversity of the biologically active natural glycosides. **Chemistry e Biodiversity**, v.1, p.673, 2004.

DHARMAGADDA, V.S.S.; TANDONB, M.; VASUDEVAN, P. Biocidal activity of the essential oils of *Lantana camara*, *Ocimum sanctum* and *Tagetes patula*. **Journal of Scientific e Industrial Research**, v.64, n.1, p.53-56, 2005.

DIAZ, A. M. et al. Phenylpropanoid glycosides from *Scrophularia scorodonia*: in vitro anti-inflammatory activity. **Life Sciences**, v.74, p.2515-2526, 2004.

DIDRY, N. et al. Isolation and antibacterial activity of phenylpropanoid derivatives from *Ballota nigra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.67, p.197–202, 1999.

HERBERT, J. M. et al. Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. **Journal of Natural Products**, v.54, n.6, p.1595-1600, 1991

HERNANDEZ, T. et al. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlan de las Salinas, Puebla (Mexico). **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, n.2-3, p.181-188, Oct. 2003

HERNANDEZ, T. et al. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.551–554, 2005.

JIMENEZ-ARELLANES, A. et al. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. **Phytotherapy Research**, n.17, n.8, p.903-908, 2003.

JULIANI, H.R. et al. Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica*. **Planta Medica**, v.68, n.8, p.762-764, 2002.

KASALI, A.A. et al. Essential oil of *Lantana camara* L. var. *aculeata* from Nigeria. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p.582-584, 2004.

KYRIAKOPOULOU, et al. Samioside, a new phenylethanoid glycoside with free-radical scavenging and antimicrobial activities from *Phlomis samia*. **Journal of Natural products**, v.64, p.1095-1097, 2002.

LI, J. et al. Phenylethanoid glucosides from flos *Buddlejae*. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**, v.22, n.10, p.613-615, 640, Oct. 1997.

LIMA, C.S.A. et al. Antimicrobial activity of a mixture of two isomeric phenylpropanoid glycosides from *Arrabidaea Harleyi* A.H. Gentry

(Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.39, n.1, p.77-81, 2003.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas. 3.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2000.

MAHATO, S.B. et al. Potential antitumor agents from *Lantana camara*: Structures of flavonoid and phenylpropanoid glycosides. **Tetrahedron**, v.50, n.31, p.9439-9446, 1994.

MELLO, F.B. et al. Effects of *Lantana camara* (Verbenaceae) on general reproductive performance and teratology in rats. **Toxicol**, v.45, p.459-466, 2005.

OHNO, T. et al. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v.25, n.5, p.666-668, 2002.

OKUNADE, A.L.; LEWIS, W.H. Oleanene constituents of *Lantana cujabensis*. **Fitoterapia**, v.75, p.327-331, 2004.

ONO, M. et al. New bisabolane-type sesquiterpenes from the aerial parts of *Lippia dulcis*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v.53, n.9, p.1175-1177, 2005

OWEN, R.W. et al. Isolation structure elucidation and antioxidant potencial of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.703-717, 2003.

PARDO, F. et al. Isolation of verbascoside, an antimicrobial constituent of *Buddleja globosa* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.39, n.3, p.221-222, 1993.

PINO, J.A. et al. Chemical composition of the essential oil of *Lantana camara* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, n.3, p.216-218, 2004.

PLAZA, A. et al. Phenylpropanoid glycosides from *Tynanthus panurensis*: characterization and LC-MS quantitative análisis. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v.53, p.2853-2858, 2005.

RAJAKARUNA, N.; HARRIS, C.S.; TOWERS, G.H.N. Antimicrobial activity of plants collected from serpentine outcrops in Sri Lanka. **Pharmaceutical Biology**, v.40, n.3, p.235-244, 2002.

RANA, V.S.; PRASAD, D.; BLAZQUEZ, M.A. Chemical composition of the leaf oil of *Lantana camara*. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, p.198-200, 2005.

SALEH, M.; KAMEL, A.; LI, X.Y.; SWARAY, J. Antibacterial triterpenoids isolated from *Lantana camara*. **Pharmaceutical Biology**, v.37, n.1, p.63-66, Jan. 1999 .

SALVAT, A. et al. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. **Phytochemistry**, v.11, n.2-3, p.230-234, 2004.

SIDDIQUI, B.S.; RAZA, S.M.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, S.; FIRDOUS, S. Pentacyclic triterpenoids from *Lantana camara*. **Phytochemistry**, v.38, n.3, p. 681-685, 1995.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5.ed. New York: J. Wiley, 1991. 419p.

SINGH, G.; UPADHYAY, R.K. Essential oils - a potent source of natural pesticides. **Journal of Scientific e Industrial Research**, 52, n.10, p.676-683, Oct. 1993 .

TAKEDA, Y. et al. An acyclic monoterpene glucosyl ester from *Lantana lilacia*. **Planta Medica**, v.64, p.78, 1998.

TANAKA, T., IKEDA, T., KAKU, M., ZHU, X.H., OKAWA, M., YOKOMIZO, K., UYEDA, M., NOHARA, T. A new lignan glycoside and phenylethanoid glycosides from *Strobilanthes cusia* Bremek. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, 52(10) 1242-1245, 2005.

WU, J. et al. Epectral assignments and reference data – Complete assggnments of H-1 and C-13 NMR data for 10 phenylethanoid glycosides. **Magnetic resonance in Chemistry**, v.42, n.7, p.659-662, July 2004.

ZHANG, F. et al. Inhibition of verbascoside on the telomerase activity of human gastric adenocarcinoma cell MKN 45. **Shiejie Huaren Xiaohua Zazhi**, v.10, n.3, p.366-367, 2002.

CAPÍTULO 5

PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS DE *Solanum aculeatissimum* COM ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

RESUMO

PEREIRA, Aline Carvalho. Purificação e identificação de substâncias de *Solanum aculeatissimum* com atividade antibacteriana. In: **Purificação e caracterização de antibacterianos de plantas do município de Lavras**. 2006. Cap.5. p.123-164. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.*

Sabendo-se das propriedades antibacterianas do extrato metanólico das folhas de *S. aculeatissimum* coletadas no município de Lavras, o mesmo foi submetido a fracionamento por meio de lavagens sucessivas com hexano, acetato de etila e metanol, visando purificar o extrato e obter as substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana. Como as substâncias antibacterianas estavam presentes na fração metanólica, esta foi obtida em maior quantidade e submetida a fracionamentos direcionados por testes antibacterianos *in vitro*. Foram utilizados métodos cromatográficos do tipo CLAE, em coluna de sílica-C18 usando metanol/água como eluentes. Após cromatografia em coluna de sílica-gel, Amberlite xad-16, sílica-C18 e cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de sílica-C18, foram isoladas cinco substâncias, dentre elas o flavonóide rutina, identificado por métodos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear e de espectrometria de massas. No teste de microdiluição em caldo, foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e bactericidas mínimas (CBM), para *Aeromonas hydrophila*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. A CIM de rutina para *A. hydrophila* foi de 1,0 mg/mL, sendo as demais CIM e as CBM maiores que 1,0 para todas as bactérias citadas.

* Comitê Orientador: Denilson Ferreira Oliveira – UFLA (orientador), Henrique C. Pereira Figueiredo – UFLA

ABSTRACT

Pereira, Aline Carvalho. Purification and identification of antibacterial compounds from *Solanum aculeatissimum*. In: **Purification and identification of antibacterials from Lavras city plants**. 2006. Cap.5. p.123-164. Dissertation (Master Program in Agrochemistry and Agrobiochemistry) – Federal University of Lavras, Lavras, MG.*

As the methanol extract of *S. aculeatissimum* leaves collected in Lavras city had already presented antibacterial properties, it was purified by extraction with hexane, ethyl acetate and methanol. According to agar diffusion assays, the antibacterial substance was present in the methanol fraction. Thus, such fraction was submitted to purification steps guided by tests to detect antibacterial properties *in vitro*. After column chromatography on silica gel, Amberlite XAD-16 and silica gel-C18, and high performance liquid chromatography on silica gel-C18, five substances were isolated and one of them was identified by nuclear magnetic resonance and mass spectrometry, it was the flavonoid rutin. During the liquid microdilution assay it was observed that rutin minimal inhibition concentration (MIC) against *Aeromonas hydrophila* was 1.0 mg/mL and the minimal inhibition concentration (MBC) was above 1.0 mg/mL. Against *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* MIC and MBC were both higher than 1.0 mg/mL.

* Guidance Committee: Denilson F. Oliveira - UFLA (Advisor), Henrique C. Pereira Figueiredo - UFLA

1 INTRODUÇÃO

Como pode ser observado no Capítulo 2 desta dissertação, cerca de 45% dos extratos vegetais estudados apresentaram atividade contra bactérias gram-positivas e ou gram-negativas. Dentre esses, encontra-se o proveniente das folhas de *Solanum aculeatissimum*, sobre a qual não foi encontrado qualquer relato na literatura relacionado ao seu potencial antibacteriano. Em decorrência, o extrato das folhas de *Solanum aculeatissimum* foi analisado e fracionado com vistas a identificar a substância ativa e quantificar a mencionada atividade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Solanum aculeatissimum Jacq., também denominada como *S. arrebenta* Vell. e *S. cilliatum* Lam., é pertencente à família Solanaceae. Popularmente é conhecida por arrebenta-cavalos ou juá-bravo (Corrêa, 1926).

Trata-se de uma erva espinhosa, cujos ramos se elevam até uns 50 cm, com haste e folhas cheias de espinhos, folhas pecioladas, relativamente grandes, flores reunidas em pequenos grupos, formando estrelas esbranquiçadas ou verde-amareladas. O fruto é esférico ou achatado na base, aderente ao cálice, pálido e marcado com traços verde-escuros; quando maduro é amarelo ou vermelho. Contém uma massa branca, prateada, semi-esponjosa, muito doce, e muitas sementes reniformes (Balbach, 1986).

Toda a planta, inclusive a raiz, é utilizada em banhos contra moléstias cutâneas, edemacia dos membros inferiores e tuberculose mesentérica. As folhas têm reputação de serem tóxicas principalmente para o gado. Ocorre em campos e margens de estradas, em São Paulo, Mato Grosso, Minas Gerais e Bahia (Corrêa, 1926).

Saijo et al. (1983) isolaram dois glicosídeos esteroidais denominados aculeatisídeo A (Figura 1) e aculeatisídeo B, das raízes de *S. aculeatissimum*, sendo suas estruturas determinadas como sendo 26-*O*- β -glucopyranosyl nuatigenin 3-*O*- β -chacotriósido e 26-*O*- β -glucopyranosyl nuatigenin 3-*O*- β -solatriósido, respectivamente.

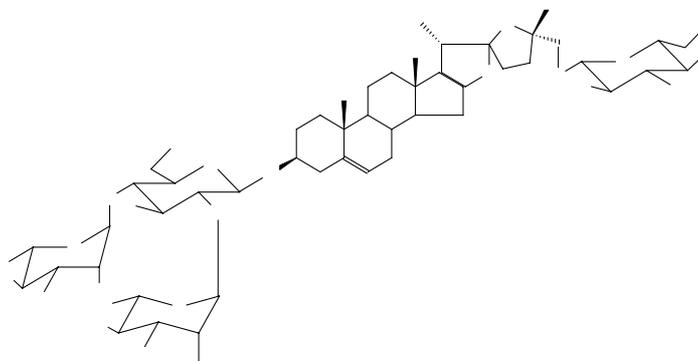


FIGURA 1 : Aculeatisídeo-A, isolado de *S. aculeatissimum*.

As saponinas esteroidais estão amplamente distribuídas em muitas espécies de plantas, possuindo grande diversidade de estruturas e várias aplicações, inclusive na produção de medicamentos. Kohara et al. (2005), analisando enzimas envolvidas na biossíntese destas substâncias, clonaram três glicosiltransferases de *Solanum aculeatissimum*, sendo uma delas importante em mecanismos de defesa da planta.

O uso de saponinas esteroidais extraídas de plantas do gênero *Solanum*, especialmente *S. aculeatissimum*, como intermediárias na síntese do hormônio esteroidal 16-dehidroprenenona, foi patenteada por Tomimatsu e Murakami (1983).

Em estudo realizado por Kanada e Silva (1997), sobre o extrato etanólico das folhas de *Solanum sordidum*, que apresenta atividade anticancerígena moderada, foram isolados o flavonóide rutina, estigmasterol, uma mistura de estigmasterol e sitosterol glicosilado, uma mistura contendo pelo menos duas solaminas acetiladas, cujo composto majoritário foi proposto como sendo N,N-bis-[4-(dimetilamino)butil]-octadeca-2,9-dien-12-inamida. As solaminas acetiladas pertencem a uma classe de alcalóides pouco isolados de espécies vegetais.

Alcalóides, taninos e esteróides estão presentes nos extratos metanólicos de folhas de *Solanum macrocarpum* e *Solanum torvum*. Em estudo fitoquímico realizado por Ajaiyeoba (1999), ambos os extratos apresentaram atividade antibacteriana dependente da concentração destes compostos, sendo maior em *S. torvum*. O extrato metanólico das folhas de *Solanum torvum* exibiu amplo espectro antibacteriano em screening na Malásia, sendo ativo contra *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *S. aureus* (Wiart et al. 2004).

Isla et al. (2002) isolaram uma proteína de *Solanum tuberosum* exibindo atividade antibacteriana *in vitro* frente a cepas fitopatogênicas de *Xanthomonas campestris*, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas syringae* e *Erwinia carotovora*.

Kimura e Yokota (2004) avaliaram a atividade antibacteriana de ácidos graxos hidroxilados derivados do metabolismo de plantas do gênero *Solanum* contra a bactéria fitopatogênica *Erwinia carotovora* T-29, mostrando que o crescimento desta bactéria era inibido com maior intensidade por ácidos monoidroxilados. A atividade antibacteriana de *Solanum tuberosum*, segundo Guevara et al. (2004), deve-se à ação proteolítica de enzimas que são induzidas, como mecanismo de defesa, em infecções bacterianas.

As propriedades antibacterianas de *Solanum nigrum* foram avaliadas por Mendonça Filho (2002) e por Rani e Khullar (2004), sendo, neste último trabalho, ativa contra *Salmonella typhi* multirresistente. A espécie *Solanum nigrescens*, usada no tratamento de doenças respiratórias, possui potencial para inibir o crescimento de *S. aureus*, *Streptococcus pneumonia* e *Streptococcus pyogenes* (Caceres et al., 1991)

Também do gênero *Solanum*, a espécie *S. trilobatum* teve seu potencial antibacteriano avaliado por Citarasu et al. (2003), sendo o extrato metanólico capaz de reduzir o crescimento bacteriano em sistemas de aquicultura. O extrato metanólico das folhas *Solanum incanum* L. foi capaz de inibir o crescimento de

Bacillus cereus, *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Enterobacter aerogenes*,
Enterobacter cloacae, *Micrococcus kristinae* e *Staphylococcus aureus* na
concentração de 0,5 mg/mL. Já o extrato aquoso foi ativo em concentração de 5
mg/mL (Kambizi e Afolayan, 2001).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e equipamentos utilizados

Hexano P.A., acetato de etila P.A., metanol P.A., etanol P.A., dimetilssulfóxido (DMSO) P.A., água destilada, placas de alumínio recobertas com sílica-gel com indicador de fluorescência UV 254 (Alugram), placas de plástico recobertas com sílica-gel com indicador de fluorescência UV 254 (Alugram), placas de plástico recobertas com celulose com indicador de fluorescência (Alugram) e placas de alumínio recobertas com sílica-C18 (Merck), sílica-gel 60 (230-400 mesh, Merck), ácido clorídrico P.A., resina de poliestireno amberlite xad-16 (Sigma), metanol e acetonitrila espectroscópicos, água destilada. Reveladores: luz UV, iodo ressublimado e solução de sulfato cérico amoniacal ou solução de ácido fosfomolibdico a 5% em etanol. Cromatógrafos líquidos de alta eficiência: Varian com detector de UV modelo 9050, bomba ternária modelo 9012, injetor automático modelo 9300; Hewlett Packard 1100 equipado com detector de UV do tipo DAD; Varian ProStar equipado com detector de UV do tipo DAD; Shimadzu LC-10Ai equipado com detector de UV modelo SPD-10Ai; Agilent 1100 com detector de UV; Varian Star SD1 com detector de UV. Colunas analíticas Phenomenex Gemini Sílica-C18 (5 μ , 250 x 4,6 mm), Luna phenyl-hexyl (5 μ , 250 x 4,6 mm). Coluna semi-preparativa Phenomenex Gemini Sílica-C18 (5 μ , 250 x 10 mm); coluna phenyl-hexyl Luna (10 μ , 250 x 21,2 mm), coluna Luna sílica C-18 (10 μ , 250 x 20 mm). Espectrômetro de massas Agilent 1100 LC/MS Trap equipado com interface do tipo electrospray; espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker de 500 MHz (IQ-UNESP). Para as análises por RMN as amostras foram dissolvidas em dimetilssulfóxido hexadeuterado (DMSO-d₆) e empregaram-se os picos dos solventes como referência

3.2 Coleta de material botânico

Foram coletadas 793,92 g de folhas da espécie *Solanum acuelatissimum* Jacq., procedendo-se conforme descrito no item 3.2, capítulo 2.

3.3 Preparação do extrato bruto para ser purificado

Procedimento realizado conforme descrito no item 3.3, capítulo 2, sendo o resíduo final (20,030 g, pó verde) empregado no processo de purificação.

3.4 Fracionamento em pequena escala

O fracionamento em pequena escala foi realizado conforme descrito no item 3.4 do capítulo 3.

3.5 Testes para verificar a atividade antibacteriana

O fracionamento foi direcionado por testes antibacterianos *in vitro*, realizados como descrito no item 3.4.1 do capítulo 2.

3.6 Fracionamento em grande escala

O extrato bruto (10 g) foi extraído com acetato de etila (5 x 200 mL). Após cada adição de solvente, o material foi agitado por cerca de 5 minutos e decantado por aproximadamente o mesmo período. Então, o material extraído foi filtrado em algodão, concentrado e liofilizado. Em seguida, o resíduo insolúvel em acetato de etila foi lavado com metanol (5 x 200 mL), empregando-se o mesmo procedimento. As três frações obtidas (fração solúvel em acetato de etila, fração solúvel em metanol e fração insolúvel em acetato de etila e metanol) foram submetidas ao teste antibacteriano. Para tal, uma alíquota equivalente a 0,19% de cada fração foi dissolvida em 0,5 mL de solução etanol/água (7:3).

3.7 Primeira cromatografia em coluna de sílica-gel

Utilizando-se uma coluna 4 x 15 cm de sílica-gel, foram eluídos 3,5 g da fração metanólica obtida no fracionamento em grande escala. O material foi solubilizado em metanol/água (1:1), sobre o qual adicionaram-se cerca de 7 g de sílica, sendo concentrado até securo em evaporador rotatório. Estando sob forma de pó, foi acrescentado ao topo da coluna. Empregaram-se 300 mL de metanol, seguidos de 300 mL de água e 300 mL de HCl 0,1M, obtendo-se três frações, que, após serem concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas, foram submetidas ao teste antibacteriano. Uma alíquota equivalente a 0,44% de cada fração foi dissolvida em 0,5 mL de solução etanol/água (7:3) para ser submetida ao teste antibacteriano. A fração ativa (metanólica) foi analisada por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando placas de sílica-gel e vários sistemas eluentes com acetato de etila/metanol. Posteriormente, foram usados outros sistemas eluentes como: diclorometano/metanol/hidróxido de amônio concentrado em placas de sílica-gel e de celulose; diclorometano/metanol, acetato de etila/metanol/ácido acético, acetato de etila/metanol/ácido fórmico, diclorometano/metanol/ácido fórmico, clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio concentrado, etanol/hidróxido de amônio em placas de sílica-gel e metanol/água em placas de sílica-C18.

3.8 Primeira cromatografia em coluna de amberlite xad-16:

Cerca de 70 mg da fração metanólica obtida na coluna de sílica-gel anteriormente, foram dissolvidos em metanol e acrescentados a coluna 2 x 25 cm de amberlite xad-16 (Sigma). A eluição foi feita com metanol/água (1:5, 150 mL; 1:4, 150 mL; 1:3, 150 mL; 1:2, 150 mL; 1:1, 150 mL) e 300 mL de metanol, coletando-se frações de aproximadamente 15 mL. Após estudo por CCD em sílica-C18, as frações semelhantes foram agrupadas resultando em seis frações, que foram concentradas em evaporador rotatório, liofilizadas e testadas. Para o

teste, as frações foram dissolvidas em solução etanol/água (7:3), na concentração aproximada de 10 mg /mL.

3.9 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As frações ativas obtidas na cromatografia em Amberlite XAD-16 foram analisadas por CCD em sílica-C18, obtendo-se boa separação. Posteriormente, foram analisadas em CLAE. Na análise em CLAE foi utilizado um aparelho para CLAE do tipo Shimadzu, detecção a 215 e 254 nm, coluna analítica Gemini sílica C18, fluxo de 1 mL/min; injeção de 80 µg de material dissolvido em metanol/água (1:1), sendo os melhores resultados em metanol/água (50:50) até 30 min., aumentando para (75:25) até 45 min. e 100% de metanol até 60 min.

3.10 Segunda cromatografia em coluna de amberlite xad-16

Empregou-se uma coluna 2 x 20, de amberlite xad-16. O fracionamento foi realizado em três etapas, partindo-se de 180 mg de material eluído com 150 mL de água e 200 mL de metanol a cada vez. As três frações aquosas e as três frações metanólicas obtidas foram reunidas, concentradas, liofilizadas e submetidas ao teste antibacteriano. Uma alíquota equivalente a 2% de cada fração foi dissolvida em 0,5 mL de solução etanol/água (7:3) e submetida ao teste antibacteriano.

3.11 Fracionamento em CLAE

3.11.1 Fração metanólica obtida em amberlite xad-16

Parte deste material foi fracionada em aparelho Agilent 1100, coluna semi-preparativa Gemini de sílica-C18, metanol/água (50:50) por 30 minutos; detector de UV 215 nm; fluxo de 4,5 mL/min. O material foi dissolvido em metanol/água (1:1) a 62,5 mg/mL, sendo injetados cerca de 156 mg (30

mg/injeção). Foram obtidas 11 frações que, após serem concentradas em evaporador rotatório, foram liofilizadas e submetidas ao teste antibacteriano, dissolvendo-as em 6,8 mL de solução etanol/água (7:3). Após retirar alíquota de 40µL empregada no teste, o restante foi concentrado e liofilizado como anteriormente. A fração amostra ativa (AL-138-02) foi fracionada.

3.11.2 Fração AL-138-02

Após determinar as melhores condições para análise de AL-138-02, o fracionamento foi realizado em aparelho Varian com detector de UV modelo 9050, coluna semi-preparativa Gemini (sílica-C18). O material foi dissolvido em metanol/água (4:6) na concentração de 20 mg/mL, sendo feitas nove injeções de 1,5 mg cada. Como eluentes foram usados metanol/água em gradiente de (20:80) a (68:32) em 16 min. e 100% de metanol por 10 min., fluxo de 4,5 mL/min. e detecção a 215 nm. Nesta etapa foram obtidas sete frações, que foram concentradas em evaporador rotatório, liofilizadas e dissolvidas em 1 mL de etanol/água para serem testadas. As frações ativas (fração 6 e 7) foram purificadas.

3.11.3 Frações AL-139-06 e AL-139-07

As frações ativas resultantes do fracionamento anterior, AL-139-06 e AL-139-07 (fração 6 e 7 do item 3.11.2) foram analisadas em aparelho do tipo Hewlett Packard 1100, equipado com coluna analítica Gemini (sílica-C18) e detector de UV a 215nm. Para eluir as substâncias empregou-se metanol/água, com fluxo de 0,7 mL/min. As condições para análise de cada uma das frações foram: AL-139-06 (1mg/mL de metanol/água 4:6) - metanol/água (55:45) durante 8 min. até metanol/água (100:0) em 0,5 min., metanol puro durante 10

min.; AL-139-07 (3mg/mL de metanol/água 4:6) - 100% de metanol durante cerca de 30 minutos.

3.11.4 Segunda purificação da fração metanólica obtida em amberlite xad-16

Cerca de 106 mg da fração metanólica obtida em coluna com amberlite xad-16 (item 3.8) foram fracionados em aparelho de CLAE Varian descrito acima, em coluna semi-preparativa Gemini, utilizando como eluentes metanol/água (55:45) por 6 min., 55-100% MeOH em 0,5 min. e 100% MeOH por 7 min. Para estabilizar a coluna entre as injeções empregou-se 100-55% MeOH em 0,5 min., 55% MeOH por 9 min. O material foi preparado na concentração de 50 mg/mL de metanol/água (4:6), sendo cerca de 3 mg/injeção. Fluxo de 4,5 mL/min. e detecção a 215 nm. As quatro frações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório e liofilizadas, sendo as duas de interesse, AL-141-02 e AL-141-04, analisadas posteriormente.

3.11.5 Frações AL-141-02 e AL-141-04

Ambas as frações AL-141-02 e AL-141-04 (item 3.11.4) foram fracionadas em aparelho para CLAE do tipo Varian já descrito e coluna semi-preparativa Gemini, fluxo de 4,5 mL e detector de UV a 254 nm.

Para o fracionamento de AL-141-02, partiu-se de 20 mg dissolvidos em 3 mL de solução MeOH/água com 0,1% de ácido acético (4:6), injetando-se 450 µg por vez. Na eluição, utilizou-se metanol/água com 0,1% de ácido acético (50:50) por 8 min., 50-100% MeOH em 0,5 min., 100% MeOH por 7,5 min. Para estabilizar a coluna entre as injeções utilizou-se 100-50% de metanol em

0,5 min. e 50% de metanol por 8,5 min. As seis frações coletadas foram concentradas em evaporador rotatório, liofilizadas e dissolvidas em 9 mL de água para serem submetidas ao teste antibacteriano.

No fracionamento de AL-141-04 partiu-se de 20 mg, na concentração de 5 mg/mL de metanol/água com 0,1% de ácido acético (4:6), injetando-se até 450 µg por vez. A eluição foi feita com MeOH/água contendo 0,1% AcOH (45:55) por 10 min, 45% a 100% MeOH em 0,5 min. e 100% MeOH por 10 min. As seis frações coletadas foram dissolvidas em 3 mL de água para serem testadas. Após a montagem do teste, foram liofilizadas.

3.11.6 Frações AL-142-11 e AL-142-04

As frações ativas obtidas no fracionamento de AL-141-02 e AL-141-04, AL-142-11 e AL-142-04 respectivamente, foram analisadas por CLAE em aparelho Varian ProStar equipado com coluna analítica Luna Phenyl-hexyl. Como eluentes empregou-se mistura de metanol/Trietanolamina 0,165%; ácido fosfórico 0,165% e ácido acético 0,1% em água, sendo 5 a 100% de metanol em 40 min. e 100% de metanol por 10 min., 20 min. para estabilização entre uma análise e outra, fluxo de 1 mL/min. A fração metanólica obtida em coluna de sílica-gel (item 3.7) também foi analisada nestas condições e, baseando-se neste cromatograma, foi fracionada.

3.12 Cromatografia em coluna de sílica-C18 e análise em CLAE

Partindo-se de 1,4 g, a fração metanólica anteriormente citada, foi filtrada em coluna 2 x 5 cm de sílica-C18, usando metanol como eluente e concentrada em evaporador rotatório até a secura. Para adicionar o material à coluna, foi necessário dissolvê-lo em cerca de 20 mL de metanol, acrescentar

cerca de 4 g de sílica-C18 e evaporar até estar sob a forma de pó, quando pôde, então, ser adicionado ao topo da coluna 13 x 4,5 cm empacotada com sílica-C18. Em seguida, adicionou-se um pedaço de algodão para facilitar a adição de solvente e não ficar revolvendo o topo da coluna. Na eluição, foram usados água com 0,2% de ácido acético/metanol (85:15, 300mL; 70:30, 300mL; 60:40, 300mL; 55:45, 300mL; 50:50, 300mL; 30:70, 300mL) e metanol (400mL). Foram obtidas sete frações, que, após serem concentradas até secura sob baixa pressão, foram analisadas por CLAE em aparelho Varian ProStar, sob as mesmas condições descritas anteriormente (3.11.6). As frações obtidas com 45% e 50% de metanol, AL-143-04 e AL-143-05, respectivamente, foram posteriormente fracionadas.

3.13 Segunda etapa do fracionamento em CLAE

3.13.1 Fracionamento de AL-143-05

Após estabelecer as melhores condições para o fracionamento em CLAE da amostra AL-143-05, foram injetados cerca de 80 mg de material dissolvidos em 2 mL de metanol/água (1:1), sendo 0,25 mL/injeção. A eluição foi isocrática com 42% de metanol/58% água com 0,2% de ácido acético durante 50 min., em aparelho para CLAE Varian com detector de UV a 254 nm, coluna preparativa Luna Phenyl-hexyl e fluxo de 15 ml/min. Coletaram-se dez frações, que foram concentradas em evaporador rotatório até a secura.

3.13.2 Fracionamento de AL-143-04

Após estabelecer as melhores condições para o fracionamento em CLAE da amostra AL-143-04, foram injetados 104 mg de material dissolvidos em 1,5 mL de acetonitrila/água (2:8), sendo 0,3 mL/injeção. A eluição foi isocrática com 25% de acetonitrila e 75% de água com 0,2% de ácido acético, em aparelho para CLAE Varian com detector de UV a 254 nm, coluna preparativa Luna sílica-

C18, 15 mL/min. Coletaram-se dez frações, que foram concentradas em evaporador rotatório até a secura.

3.14 Identificação das substâncias isoladas

A elucidação da estrutura das substâncias isoladas foi feita por meio de espectrometria de massas (EM) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^{13}C e ^1H .

3.14.1 Espectrometria de massas

Foram feitas análises no modo positivo e no modo negativo, do tipo MS^1 , MS^2 e MS^3 . As fragmentações foram induzidas por colisões contra He. Cerca de 1 mg das substâncias foi dissolvida em 1 mL de metanol/água (1:1), injetando-se 20 μL diretamente na interface, com um fluxo de 5 $\mu\text{L}/\text{min}$.

3.14.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

A análise por RMN de ^{13}C e ^1H foi realizada em aparelhos do tipo Bruker 200 e 500 MHz. A amostra foi dissolvida em DMSO- d_6 . Foram realizados experimentos unidimensionais e bidimensionais.

3.15 Testes de microdiluição em caldo

As substâncias puras foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo, visando obter a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). Dois miligramas da amostra pura foram dissolvidos em 100 μL de DMSO, deixando-o em solução por 30 minutos. A seguir, completou-se o volume até 1 mL, com caldo Mueller-Hinton. Após homogenização, 100 μL da solução foram adicionados ao primeiro poço da série de diluições. Cloranfenicol foi usado como referência. O preparo do inóculo e demais procedimentos estão de acordo com o descrito no item 3.4.2 – capítulo 2.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 2, estão resumidos os procedimentos realizados durante a purificação do extrato bruto das folhas de *S. aculeatissimum*.

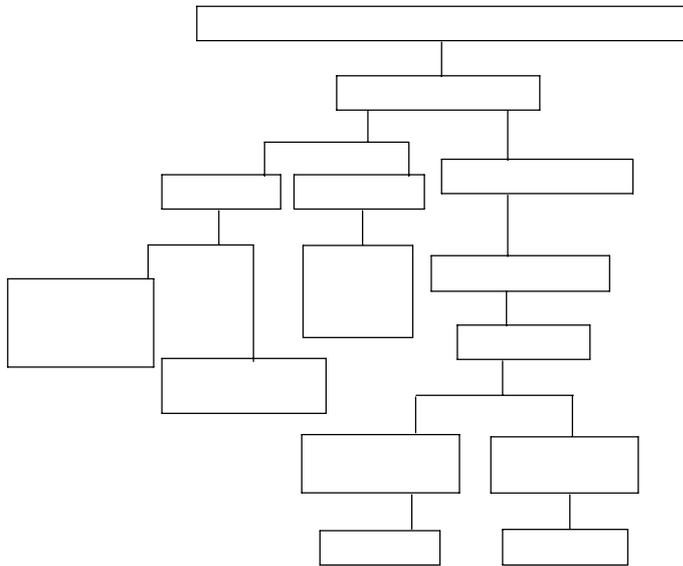


FIGURA 2: Fluxograma dos procedimentos realizados na purificação do extrato bruto de *S. aculeatissimum*.

4.1 Fracionamento em pequena escala

O resultado do teste antibacteriano realizado com as frações obtidas no fracionamento em pequena escala encontra-se na Tabela 1. A porção do extrato solúvel em metanol concentrava as substâncias responsáveis pela atividade antibacteriana.

TABELA 1: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas amostras provenientes do fracionamento em pequena escala do extrato bruto de *S. aculeatissimum*.

Amostras	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Extrato bruto	16,5	11,0	8,0	15,0
Fração hexano	-	-	-	-
Fração acetato de etila	-	-	-	-
Fração metanol	20,0	15,0	10,0	22,5
Resíduo	-	-	-	-

Valores expressos em mm. (-): ausência de atividade antibacteriana

4.2 Fracionamento em grande escala

Visto que a porção do extrato onde se concentravam as substâncias ativas era a fração metanólica, foi realizado um fracionamento em grande escala com a finalidade de conseguir material suficiente para iniciar o processo de purificação (Tabela 2). O resultado do teste antibacteriano empregando essas frações encontra-se na Tabela 3.

TABELA 2: Frações obtidas no fracionamento inicial em grande escala do extrato metanólico de *S. aculeatissimum*.

Fração	Massa final	Porcentagem	Aspecto/Coloração
Acetato de etila	1,2471 g	12,47%	Pastoso/Verde escuro
Metanol	7,8142 g	78,14%	Pó/Marrom escuro
Resíduo	0,935 g	9,35%	Pó/Marrom

TABELA 3: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas amostras do fracionamento inicial em grande escala do extrato metanólico de *S. aculeatissimum*.

Fração	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Acetato de etila	-	-	-	-
Metanol	19	9	10	22
Resíduo	8	-	-	7

Halos inibitórios em mm; (-): ausência de atividade

4.3 Primeira cromatografia em coluna de sílica-gel

O fracionamento da amostra solúvel em metanol, proveniente do extrato bruto (Tabela 3), deu origem a três frações: metanólica, aquosa e ácida (Tabela 4).

TABELA 4: Frações obtidas no primeiro fracionamento em coluna de sílica-gel da fração solúvel em metanol do extrato bruto.

Fração	Massa	Coloração/aspecto
Metanólica	3,1404 g	marrom, pó
Aquosa	0,2426 g	marrom, pó
Ácida	0,3899 g	amarelo, pó

Observou-se que apenas a fração metanólica (Tabela 4) apresentava atividade antibacteriana (Tabela 5).

TABELA 5: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas frações da primeira coluna de sílica-gel.

Fração	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Metanólica	25	13	7	20
Aquosa	-	-	-	-
Ácida	-	-	-	-

Valores expressos em mm. (-): ausência de atividade antibacteriana.

Em análise por CCD observou-se que a fração metanólica (Tabela 5) apresentava manchas com melhores definições quando se empregava sílica-C18 como fase estacionária. Logo, submeteu-se tal fração à purificação em coluna de Amberlite xad-16, utilizando metanol/água como eluentes.

4.4 Primeira cromatografia em coluna de Amberlite xad-16.

Quando submetidas ao teste, observou-se que várias das frações (Tabela 6) apresentaram atividade antibacteriana (Tabela 7).

TABELA 6: Frações obtidas no fracionamento em coluna de Amberlite xad-16.

Frações	Massa / coloração / aspecto
AL-89-01	1,5 mg, incolor, pastoso
AL-89-02	2 mg, esverdeado, pastoso
AL-89-03	5,0 mg, amarelo esverdeado, pó
AL-89-04	10,1 mg, amarelo, pó
AL-89-05	11,0 mg, marrom-esverdeado, pastoso
AL-89-06	11,0 mg, marrom-esverdeado, pastoso

TABELA 7: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas frações da coluna de Amberlite xad-16.

Fração	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
AL-89-01	-	-	-	-
AL-89-02	8	-	-	9
AL-89-03	17	12	10	18
AL-89-04	12	12	7	15
AL-89-05	12	12	7	15
AL-89-06	12	12	7	14

Valores expressos em mm. (-): ausência de atividade antibacteriana.

A análise, em CLAE, das frações AL-89-03, AL-89-04 AL-89-05 e AL-89-06 (Tabelas 6 e 7), resultou em perfis cromatográficos muito semelhantes, indicando que a separação em amberlite xad-16 não havia sido eficiente.

4.5 Segunda cromatografia em coluna de Amberlite xad-16

Como o fracionamento anterior em Amberlite xad-16 não tinha sido bem sucedido, nesta etapa foram obtidas apenas duas frações (metanólica e aquosa), com o objetivo de conseguir material em quantidade suficiente para fracionamento em CLAE. A fração aquosa, com cerca de 30 mg, apresentou aspecto pastoso e coloração amarelada, enquanto a fração metanólica com 270,5 mg apresentou aspecto de pó e coloração marrom. O resultado do teste antibacteriano empregando-se essas frações, encontra-se na Tabela 8.

TABELA 8: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas frações provenientes do segundo fracionamento em coluna de Amberlite xad-16.

Amostra	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
Aquosa	-	-	-	-
Metanólica	19	8	10	24

Valores expressos em mm. (-): ausência de atividade antibacteriana.

Como a atividade antibacteriana só foi observada na fração metanólica (Tabela 8), esta foi submetida a processos de purificação em CLAE.

4.6 Fracionamento por CLAE da fração metanólica proveniente da coluna de Amberlite xad-16.

Dentre as frações obtidas no primeiro fracionamento da fração metanólica obtida em Amberlite xad-16 (3.11.1), apenas a segunda fração era

ativa (AL-138-02) com massa de 91,6 mg, aspecto de pó marrom, eluindo entre 3,4-12,6 min em metanol/água (1:1).

No segundo fracionamento (3.11.2), obteve-se o cromatograma da Figura 3, eluindo com metanol/água (20:80 até 68:32 em 16 min.); metanol/água (68:32 até 100:0 em 0,5 min.) e 100% de metanol por 10 min. Na tabela 9 estão informações sobre tempo de retenção, massa e aspecto das frações obtidas.

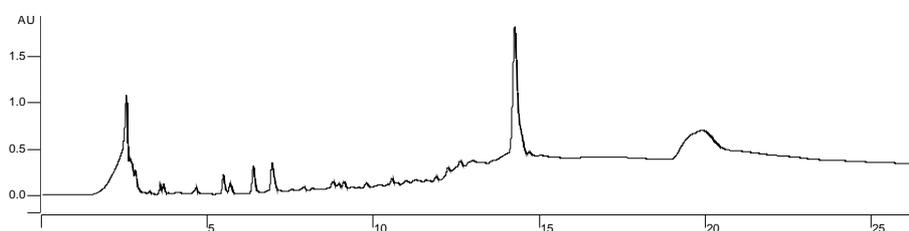


FIGURA 3: Cromatograma obtido durante o fracionamento de AL-138-02, fração ativa proveniente da purificação da fração metanólica obtida em Amberlite xad-16, de *S. aculeatissimum*.

TABELA 9: Frações obtidas durante o fracionamento de AL-138-02 em CLAE.

Fração	Tempo (min)	Massa (mg)	Aspecto
AL-139-01	0 – 5,5	0,5	Resíduo verde
AL-139-02	5,5 – 6	0,1	Resíduo marrom escuro
AL-139-03	6 – 6,5	0,1	Resíduo marrom
AL-139-04	6,5 – 7	0,2	Resíduo marrom
AL-139-05	7 – 14,5	1,1	Resíduo marrom esverdeado
AL-139-06	14,5 – 15	1,5	Resíduo esverdeado
AL-138-07	15 - 26	4,7	Pó bege

No teste antibacteriano (Tabela 10), apenas as duas últimas frações apresentaram atividade antibacteriana.

TABELA 10: Halos de inibição do crescimento bacteriano causados pelas frações de AL-138-02.

Fração	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966	<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S.aureus</i> ATCC 25923
AL-139-06	12	-	-	-
AL-139-07	23	10	10	15

Quando analisado por CLAE (item 3.11.3), observou-se que a fração AL-139-06 só apresentava um pico (Figura 4), cujo espectro de UV correspondente sugeria a presença de flavonóides (Figura 5).

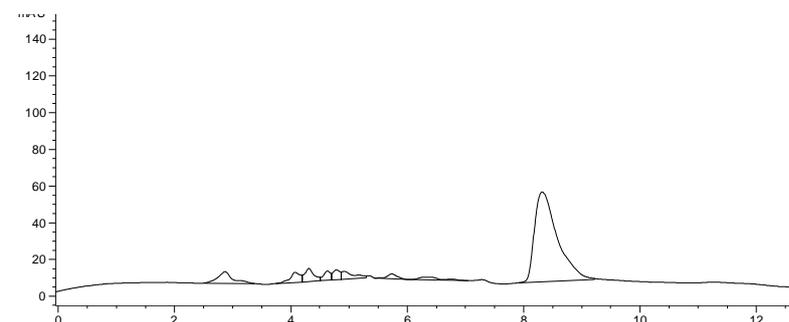


FIGURA 4: Cromatograma obtido com AL-139-06, uma das frações ativas provenientes da purificação da fração metanólica de *S. aculeatissimum*.

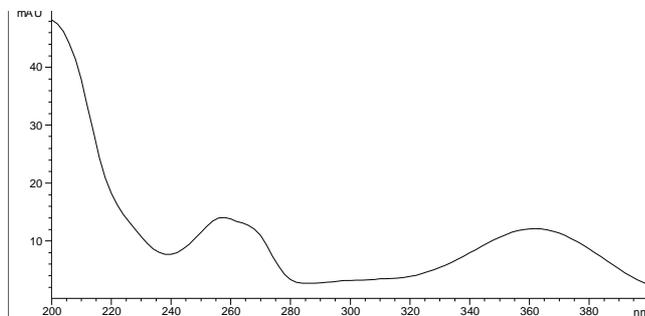


FIGURA 5: Espectro de UV do material eluído aos 8,8 min., conforme cromatograma de AL-139-06, Figura 4.

Já a fração AL-139-07, não tinha picos com boa definição (Figura 6), mas também parecia ser composta por flavonóides (Figuras 7 e 8).

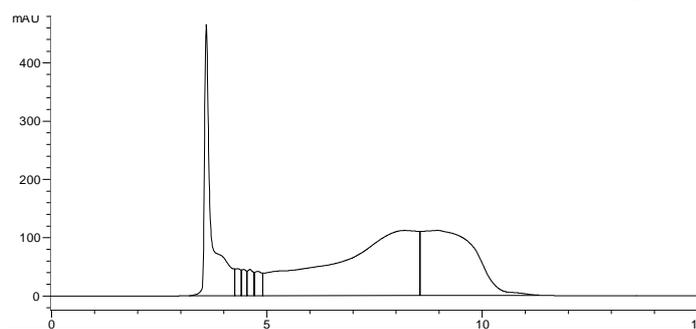


FIGURA 6: Cromatograma obtido com AL-139-07

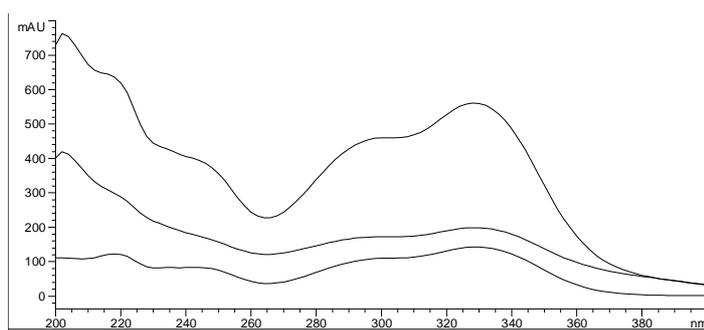


FIGURA 7: Espectro de UV do material eluído de 3,5 a 3,7 min, conforme cromatograma da Figura 6.

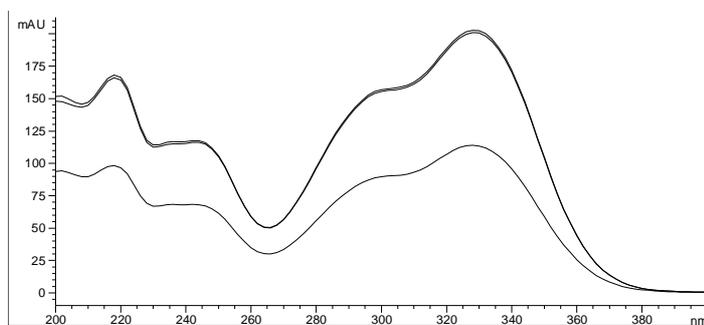


FIGURA 8: Espectro de UV do material eluído de 8,5 a 9,9 min, conforme cromatograma da Figura 6.

Como era necessário obter maior quantidade de material ativo (AL-139-06 e AL-139-07), a fração metanólica obtida em Amberlite xad-16 foi fracionada nas condições descritas no item 3.11.4, resultando no cromatograma da Figura 9. Foram obtidas quatro frações (Tabela 11).

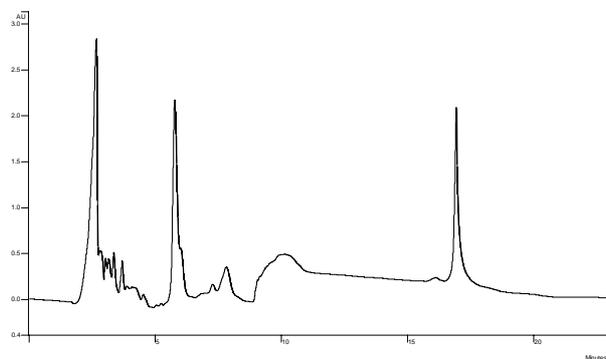


FIGURA 9: Cromatograma obtido durante o segundo fracionamento da fração metanólica de Amberlite xad-16 por CLAE.

TABELA 11: Características das frações obtidas no fracionamento da fração metanólica de Amberlite xad-16 por CLAE.

Frações	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)	Aspecto
Descarte	0-2	-	-
AL-141-01	2-5,5	25,6	Resíduo esverdeado
AL-141-02	5,5 – 6	9,5 mg	Pó amarelo
AL-141-03	6 – 9	13,1	Pó amarelo
AL-141-04	9 – 18	28,2	Pó bege
Descarte	18- 23	-	-

As frações de interesse eram a AL-141-02 (equivalente a AL-139-06) e AL-141-04 (equivalente a AL-139-07), que foram analisadas por CLAE. Observou-se que a resolução em tais análises melhorava consideravelmente quando se adicionava um pouco de ácido acético ao eluente. No caso de AL-141-02 (ou AL-139-06) ficou nítida a presença de outras substâncias (Figura 10). Um novo fracionamento dessa amostra resultou em seis frações (Tabela 12), sendo ativa apenas a fração AL-142-11.

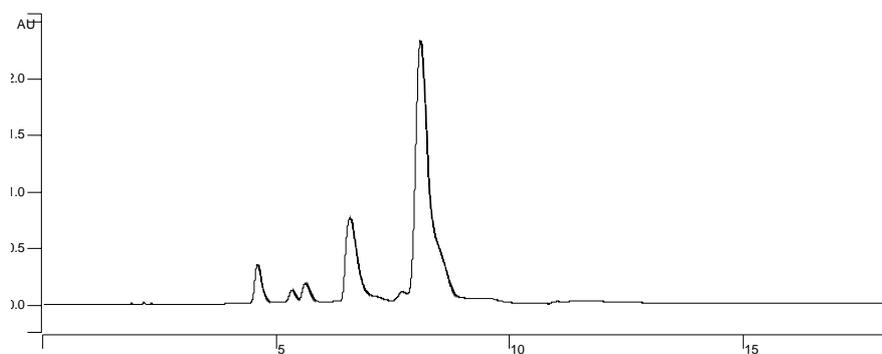


FIGURA 10: Cromatograma obtido durante o fracionamento de AL-141-02, obtido durante a purificação da fração metanólica de *S. aculeatissimum*.

TABELA 12: Características das frações obtida durante o fracionamento de AL-141-02

Frações	Tempo de retenção (min.)	Massa (mg)	Aspecto
Descarte	0-2,2	-	-
AL-142-07	2,2-4,5	2,1	Resíduo bege
AL-142-08	4,5-5,2	3,3	Pó branco
AL-142-09	5,2-6,6	4,6	Resíduo cinza
AL-142-10	6,6-8	4,6	Pó bege
AL-142-11	8-9,2	7,4	Pó amarelo
AL-142-12	9,2-14,5	0,8	Resíduo bege
Descarte	14,5-25	-	-

A adição de ácido acético ao eluente a ser empregado na purificação de AL-141-04 (ou AL-139-07) também melhorou bastante o perfil cromatográfico (Figura 11). Com isso, obtiveram-se seis novas frações de tal amostra (Tabela 13), sendo ativa apenas a fração AL-142-04 .

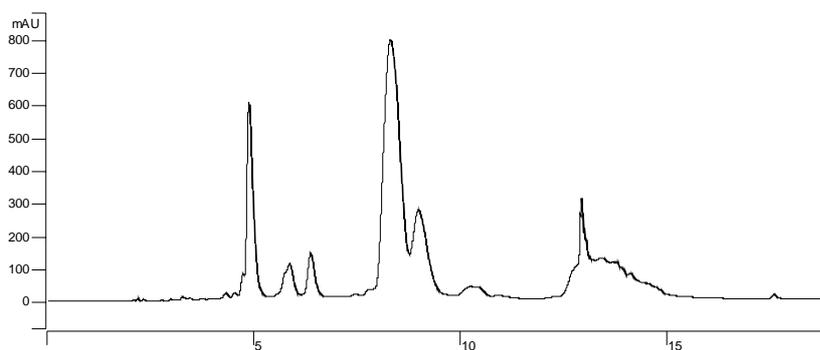


FIGURA 11: Cromatograma obtido durante o fracionamento de AL-141-04

TABELA 13: Características das frações obtidas no fracionamento de AL-141-04

Frações	Tempo de retenção (min.)	Massa (mg)	Aspecto
Descarte	0-2	-	-
AL-142-01	2-5	1,2	Resíduo cinza
AL-142-02	5-5,5	5	Resíduo marrom
AL-142-03	5,5-7,7	3,6	Resíduo escuro
AL-142-04	7,7-8,5	5	Pó branco
AL-142-05	8,5-9,8	3,2	Resíduo cinza
AL-142-06	9,8-18	6,4	Resíduo cinza
Descarte	18-28	-	-

As frações ativas, AL-142-11 e AL-142-04, obtidas em pequena quantidade, foram analisadas por CLAE. Como seria necessário obter material puro em maior quantidade, a fração metanólica de *S. aculeatissimum* oriunda da primeira cromatografia em coluna de sílica-gel também foi analisada nestas condições visando um novo fracionamento. Na Figura 12 observam-se estes cromatogramas, obtidos em coluna preparativa Luna Phenyl-Hexyl.

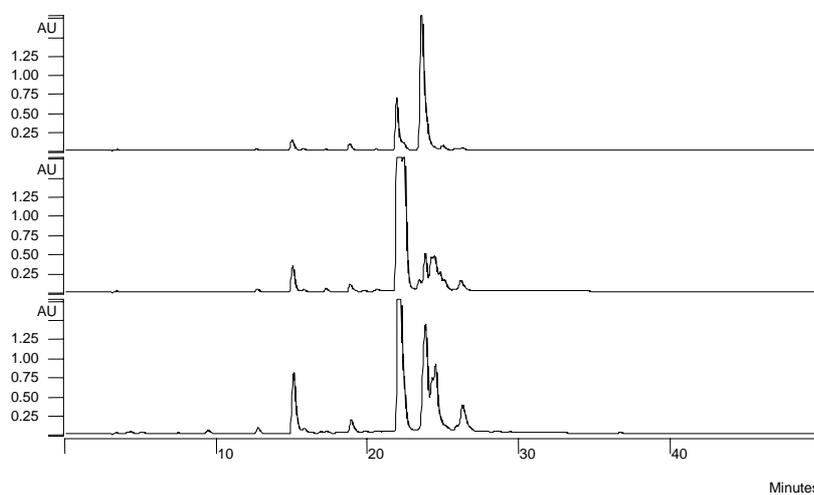


FIGURA 12: Cromatogramas de AL-142-11, AL-142-04 e fração metanólica de coluna de sílica-gel.

4.7 Fracionamento em coluna de sílica-C18 da fração metanólica proveniente da coluna de sílica-gel

Como era necessário maior quantidade de material, o fracionamento em coluna de sílica-C18 da fração metanólica obtida em coluna de sílica-gel (item 3.12), resultou em sete frações (Tabela 13).

TABELA 13: Massa e aspecto das frações obtidas em coluna de sílica-C18.

Amostra	Massa (mg)	Aspecto
AL-143-01	500,5	Pó marrom
AL-143-02	130	Pó marrom-claro
AL-143-03	70	Pó marrom-claro
AL-143-04	468	Pó marrom
AL-143-05	106	Resíduo marrom-escuro
AL-143-06	30	Resíduo marrom-escuro
AL-143-07	24,3	Resíduo verde-escuro

As frações foram analisadas por CLAE e seus cromatogramas foram comparados aos das frações AL-142-11 e AL-142-04 (Figura 12), que continham as substâncias com propriedades antibacterianas. Com isso, observou-se que as frações de interesse eram AL-143-04 e AL-143-05, que foram submetidas a novo fracionamento.

Havia vários picos no cromatograma da amostra AL-143-05 (Figura 13), o que acarretou a obtenção de várias frações (Tabela 14).

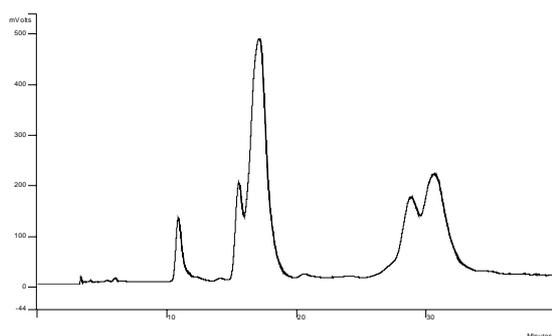


FIGURA 13: Cromatograma obtido durante o fracionamento de AL-143-05 (item 3.13.1).

TABELA 14: Características das frações obtidas no fracionamento de AL-143-05.

Amostra	Tempo de retenção (min)	Massa (mg)	Coloração
AL-143-08	0 – 10	5,8	Marrom
AL-143-09	10 - 10,5	4,4	Amarelo
AL-143-10	10,5 – 15	4,2	Amarelo
AL-143-11	15 – 15,8	4,6	Amarelo-esverdeado
AL-143-12	15,8 – 18	6,4	Amarelo-esverdeado
AL-143-13	18 – 18,6	1,7	Amarelo-esverdeado
AL-143-14	18,6 – 28	2,5	Marrom
AL-143-15	28 – 30	7,8	Amarelo
AL-143-16	30 – 31	6,0	Amarelo-claro
AL-143-17	31 - 35	3,0	Marrom-claro

De forma relativamente análoga, a amostra Al-143-04 também era composta por várias substâncias (Figura 14), o que resultou na obtenção de dez frações (Tabela 15).

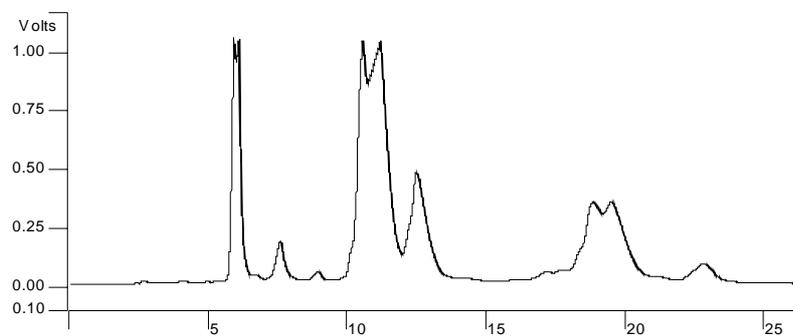


FIGURA 20: Cromatograma obtido no fracionamento de AL-143-04 (os picos maiores encontram-se bifurcados, devido a uma falha do detector).

TABELA 15: Características das frações obtidas no fracionamento de AL-143-04.

Fração	Tempo de retenção (min.)	Massa (mg)	Aspecto
Descarte	0 – 5,6	-	-
AL-144-01	5,6 – 6	7,3	Resíduo bege
AL-144-02	6 – 7,5	3,1	Resíduo marrom-amarelado
AL-144-03	7,5 – 10,3	1,4	Resíduo bege
AL-144-04	10,3 – 11,6	30,7	Resíduo bege
AL-144-05	11,6 – 12,3	2,1	Resíduo bege
AL-144-06	12,3 – 13	3,0	Resíduo bege
AL-144-07	13 – 18	1,2	Resíduo bege
AL-144-08	18 – 19	5,1	Resíduo bege
AL-144-09	19 – 20,2	6,6	Resíduo bege
AL-144-10	20,2 – 25	2,2	Resíduo bege
Descarte	25 - 30	-	-

4.8 Identificação das substâncias isoladas

As frações AL-143-09, AL-143-11, AL-143-12, AL-143-15 e AL-143-16, AL-144-01 e AL-144-04 foram analisadas por espectroscopia de RMN, sendo que os melhores espectros foram obtidos para AL-143-11, AL-143-12, AL-143-15 e AL-144-04. Estas ainda foram analisadas por espectrometria de massas e serão posteriormente identificadas. AL-144-01 foi identificada.

4.8.1 Amostra AL-144-01

A maioria dos sinais no espectro de RMN ^1H estava entre 3 e 4 ppm, o que indicava a presença de vários átomos de carbono ligados a heteroátomos e entre 6 e 7,5 ppm, que pareciam decorrentes de átomos de ^1H ligados a carbonos sp^2 . Estes dados sugeriram a presença de anéis aromáticos e unidades glicosídicas, possibilidade confirmada pela análise do espectro de RMN ^{13}C . A maior parte dos sinais de ^{13}C se encontrava na região de carbono sp^3 ligado a

heteroátomo e de carbono sp^2 . Havia um sinal característico de carbonila a 177 ppm (Silverstein, 1991)

Os resultados obtidos em vários experimentos de RMN unidimensionais e bidimensionais (Figuras 1B a 12B do anexo B), bem como comparação com dados da literatura, permitiram elucidar a estrutura de AL-144-01 (Figura 14), o que confirmou as propostas iniciais. Lee et al. (2004) isolaram a mesma substância da planta *Diodia teres* e Niassy et al.(2004), da planta *Tephrosia deflexa*. Trata-se do flavonóide rutina, quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil (1-6) glicopirranose.

Como pode ser observado na Tabela 16, os dados encontrados na literatura são perfeitamente coincidentes (Lee et al., 2004; Niassy, et al., 2004). Com base nos dados relatados por Niassy et al. (2004), verifica-se para AL-144-01 (Tabela 16) que os prótons a 6,36 ppm (d; 1,5Hz; 1H) e 6,17ppm (d; 1,5Hz; 1H) são característicos do ciclo A dos flavonóides. No ciclo B, o sinal em 7,53 ppm (dd; J=8,0Hz; 2,0Hz) revela um acoplamento em orto com 6,83 ppm (d; J=8,5Hz) e em meta com 7,55 ppm (d; J=2,0Hz). O valor elevado da constante de acoplamento do próton anomérico de um dos açúcares a 5,34 ppm (d;J=7,1Hz), sugere que este açúcar está na forma de β -D-glicopirranose; o outro próton anomérico a 4,41 ppm (d; J=1,1 Hz) e a metila a 1,00 indicam que este açúcar está na forma α -L-ramnopirranose. O deslocamento químico de G6 a 66,9 ppm indica que a ramnose está ligada na posição 6 da glicose.

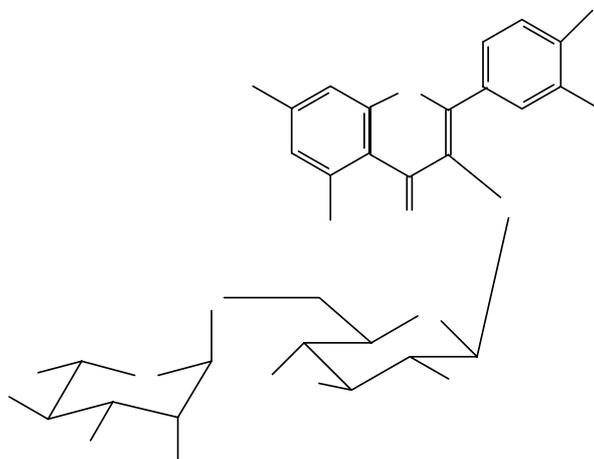


FIGURA 14: Estrutura da substância AL-144-01: rutina.

TABELA 16: Deslocamentos químicos de ^{13}C e ^1H obtidos para AL-144-01 e encontrados na literatura.

Posição do C	^{13}C		^1H		
	Rutina(1)	AL-144-01	Rutina(1)	Rutina(2)	AL-144-01
1'	121,3	121,1			
2'	115,4	116,2	7,54(dd, J1=8,5; J2=2,0; 2H)	7,52(d, J=2,2)	7,55(d; J=2; 1H)
3'	144,8	144,8			
4'	148,5	148,5			
5'	116,4	115,2	6,85(d, J=8,8; 1H)	6,83 (d, J=9,0)	6,83(d; J=8,5; 1H)
6'	121,6	121,6	7,54(dd, J1=8,5; J2=2,0; 2H)	7,53 (dd, J1=9, J2=2,2)	7,53(dd; J1=8,0;J2=2,0 1H)
2	156,7	156,4			
3	133,4	133,3			
4	177,4	177,3			
5	161,3	161,2			

...continua...

TABELA 16, Cont.

6	98,6	98,7	6,18(d, J=1,8)	6,19(d, J=1,9)	6,17(d; J=1,5; 1H)
7	164,3	164,5			
8	93,7	93,6	6,41(d, J=1,8; 1H)	6,38(1H,d, J=1,9)	6,36(d; J=1,5; 1H)
9	156,5	156,5			
10	104,0	103,8			
G-1	101,3	101,3	5,30(d, J=7,0; 1H)	5,34 (d, J=7,1)	5,34(d; J=7,1; 1H)
G-2	74,3	74,0		3,21 (s)	3,27(s; 1H)
G-3	76,5	76,4		3,30 (s)	3,30(s; 1H)
G-4	70,1	69,9		3,31 (s)	3,33(s; 1H)
G-5	76,0	75,9		3,31 (s)	3,17(s; 1H)
G-6	67,1	66,9		3,70(d, J=9,8) 3,28	3,71(d; J=10,6; 1H) 3,26
R-1	100,8	100,7	4,40(sl; 1H)	4,38 (d, J=1,1)	4,41(d; 1H)
R-2	70,5	70,3		3,28 (d)	3,40 (d;1H)
R-3	70,7	70,5		3,28 (s)	3,49 (d;J=5,3;1H)
R-4	71,9	71,8		3,08 (s)	3,08(dd, J1=J2=9,4; 1H)
R-5	68,3	68,2		3,25 (s)	3,23 (m)
R-6	17,9	17,7	1,00(d, J=6; 3H)	0,98 (d)	1,00(d; J=6,5; 3H)

Valores de deslocamentos expressos em ppm; constante de acoplamento (J) em Hz., DMSO-d6. Rutina(1): Lee et al., (2004); Rutina(2): Niassy et al. (2004).

As correlações HMBC, indispensáveis na elucidação estrutural, estão representadas na Figura 15, plenamente coerentes com a distribuição feita.

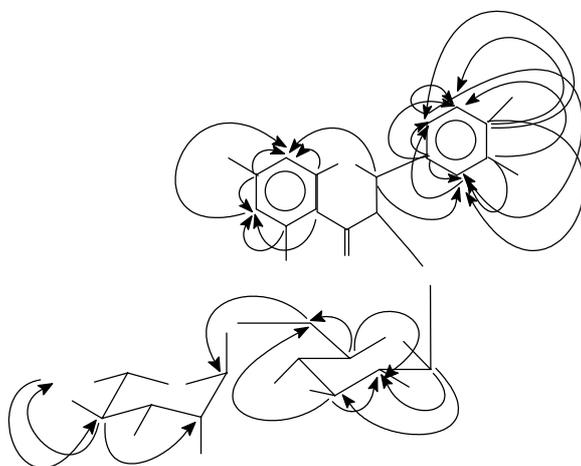


FIGURA 15: Correlações heteronucleares a longa distância (2J e 3J) obtidas para AL-144-01 (rutina).

A estrutura proposta para AL-144-01 e confirmada pelos dados de RMN tem fórmula molecular $C_{27}H_{30}O_{16}$, massa molecular igual a 610, estando de acordo com os resultados das análises por espectrometria de massas (Figuras 13B a 15B do anexo B) e com dados da literatura (Dubber et al., 2005). Observou-se que no modo negativo, AL-144-01 apresentava o pico com massa/carga igual a 609,2 ($M-1$). Experimentos induzindo tal íon à fragmentação geravam o sinal com massa/carga igual a 300,7 ($M-1-309$) produzido pela perda de rutinose. No modo positivo, foi observado um pico com massa/carga 633,2 ($M+Na^+$).

4.9 Teste de microdiluição em caldo

AL-144-01 (rutina) e AL-144-04 foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo, para determinar CIM e CBM e melhor avaliar o seu potencial antibacteriano (Tabela 17).

TABELA 17: Resultados de CIM e CBM para as substâncias puras.

<i>Amostra</i>	<i>A. hydrophila</i> ATCC 7966		<i>B. subtilis</i> ATCC 6633		<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853		<i>S. aureus</i> ATCC 25923	
	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>	<i>MIC</i>	<i>MBC</i>
AL-144-01	1,00	>1,00	>1,00	-	>1,00	-	>1,00	-
AL-144-04	0,25	0,25	1,00	>1,00	>1,00	-	1,00	1,00
Cloranfenicol	0,02	0,05	0,1	0,1	>0,2	-	0,2	>0,2

Valores em mg/mL. (-) teste não realizado.

As preparações que contêm flavonóides como principal constituinte ativo são usadas há séculos no tratamento de doenças infecciosas, possuindo atividade antifúngica, antiviral e antibacteriana comprovadas. Estudos referentes à atividade antibacteriana desses compostos têm aumentado significativamente, entretanto, há muitas discrepâncias entre os dados (Cushnie e Lamb, 2005).

A atividade antibacteriana dos flavonóides deve-se a diversos mecanismos. Segundo estudos de Bernard et al. (1997), citados por Cushnie e Lamb (2005), a ação de rutina contra *E. coli* deve-se à inibição da síntese de ácidos nucléicos. No gênero *Solanum*, rutina já foi isolada de *Solanum sordidum* (Kanada e Silva, 1997).

Van der Watt e Pretorius (2001) identificaram a presença de rutina no extrato metanólico das folhas de *Carpobrotus edulis*. No teste antibacteriano de difusão em ágar, a substância apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* e *Moraxella catarrhalis*, mas foi inativa frente a *P. aeruginosa* e *E. coli*.

Ogundipe et al. (2001) isolaram rutina do extrato metanólico das folhas de *Alchornea laxiflora*. No teste de difusão em ágar, a substância não apresentou atividade antibacteriana frente a *E. coli*, *P. aeruginosa* ou *S. aureus*. Os autores

argumentam que, segundo Havsteen (1983), a atividade antimicrobiana dos flavonóides depende da permeabilidade através da membrana, sendo necessária certa lipofilicidade, o que explicaria a ausência de atividade antimicrobiana, no caso da rutina.

Rutina também foi isolada das flores de *Sophora japonica* L., sendo relatada fraca atividade antibacteriana (Ng et al., 1996) do extrato metanólico de toda a planta *Diodia teres* (Lee et al., 2004) e do extrato etanólico das folhas de folhas de *Tephrosia deflexa* e de *Tephrosia albifoliolis* (Niassy et al., 2004).

Como pôde-se observar, os resultados de testes antibacterianos empregando rutina, encontrados na literatura, são contraditórios. No teste de microdiluição em caldo realizado neste trabalho, rutina apresentou potencial inibitório em concentrações mais altas que as demais substâncias avaliadas, sendo *A. hydrophila* a bactéria mais susceptível (Tabela 17).

5 CONCLUSÕES

O extrato metanólico das folhas de *Solanum aculeatissimum* possui potencial como fonte de substâncias com propriedades antibacterianas. Da porção do extrato bruto proveniente de lavagens sucessivas com metanol, podem ser isoladas cinco substâncias, dentre elas o flavonóide rutina. Ao serem submetidas a teste de microdiluição em caldo, rutina apresenta concentração inibitória mínima (CIM) para *A. hydrophila* de 1,0 mg/mL, enquanto para *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* a CIM é maior que 1,0 mg/mL e a concentração bactericida mínima (CBM) é maior que 1,0 mg/mL para todas as bactérias citadas. No caso de AL-144-04 a CIM e CBM, para *A. hydrophila*, são de 0,25 mg/mL, para *S. aureus* são de 1,0 mg/mL e, para as demais bactérias, são maiores que 1,0 mg/mL. As demais substâncias isoladas são inativas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJAIYEGBA, E.O. Comparative phytochemical and antimicrobial studies of *Solanum macrocarpum* and *S. torvum* leaves. **Fitoterapia**, v.70, p.184-186, 1999.
- BALBACH, A. **As plantas curam**. Itaquaquecetuba, SP: Edel, 1986. p.110.
- CACERES, A. et al. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory-diseases.1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.31, n.2, p.193-208, Feb. 1991.
- CITARASU, T. et al. Influence of the antibacterial herbs, *Solanum trilobatum*, *Andrographis paniculata* and *Psoralea corylifolia* on the survival, growth and bacterial load of *Penaeus monodon* post larvae. **Aquaculture International**, v.11, n.6, p.583-595, 2003.
- CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional. 1926.
- CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, p.343-356, 2005.
- DUBBER, M.J. et al. The simultaneous determination of selected flavonol glycosides and aglycones in *Ginkgo biloba* oral dosage forms by high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.723–731, 2005.
- GUEVARA, M.G. et al. Potato aspartic proteases: Induction, antimicrobial activity and substrate specificity. **Journal of Plant Pathology**, v.86, n.3, p.233-238, Nov. 2004.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical pharmacology**, v.32, n.7, 1141–1148, 1983.
- ISLA, M.I. et al. Inhibition of hydrolytic enzyme activities and plant pathogen growth by invertase inhibitors. **Journal Enzyme Inhib Med Chem.**, v. 17, n.1, p.37-43, Feb. 2002.
- KAMBIZI, L.; AFOLAYAN, A. J. An ethnobotanical study of plants used for

the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Guruve District, Zimbabwe. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, n.1, p.5-9, Sept. 2001.

KANADA, R.M., SILVA, C.C. **Estudo químico e avaliação de atividade antibacteriana e anticancerígena da espécie vegetal *Solanum sordidum* sendt (*Solanaceae*)**. 1997. 100p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada)- Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

KIMURA, H., YOKOTA, K. Characterization of metabolic pathway of linoleic acid 9-hydroperoxide in cytosolic fraction of potato tubers and identification of reaction products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.118, n.1-3, p.115-132, July/Sept. 2004.

KOHARA, A. et al. A novel glucosyltransferase involved in steroid saponin biosynthesis in *Solanum aculeatissimum*. **Plant Molecular Biology**, v.57, n.2, p.225-239, Jan. 2005.

LEE, J. H. et al. Phytochemical constituents from *Diodia teres*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n.1, p. 40-43, 2004.

MENDONÇA FILHO, R.R. **Avaliação in vitro da bioatividade de plantas comestíveis**. 2002. 116p. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos)- Universidade Federal do Rio de Janeiro, Janeiro de Janeiro..

NG,T.B. et al. Examination of Coumarins, Flavonoids and Polysaccharopeptide for Antibacterial Activity. **Gen. Pharmac.**, v.27, n.7, p.1237-1240, 1996. (ELSEVIER)

NIASSY, B. et al. Flavonoïdes de *Tephrosia deflexa* et *Tephrosia albifoliolis*. **Comptes R. Chimie**, v.7, p.993-996, 2004.

OGUNDIPE, O.O. Bioactive chemical constituents from *Alchornea laxiflora* (benth) pax and hoffman. **Journal of Ethnopharmacology**, v.74, p.275-280, 2001.

RANI, P., KHULLAR, N. Antimicrobial evaluation of some medicinal plants for their anti-enteric potential against multi-drug resistant *Salmonella typhi*. **Phytotherapy Research**, v.18, n.8, p.670-673, Aug. 2004.

SAIJO, R. et al. Two steroidal glycosides, aculeatiside A and B from *Solanum aculeatissimum*. **Phytochemistry**, v.22, p.733-736, 1983.

SILVERSTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRILL, T.C. **Spectrometric identification of organic compounds**. 5.ed. New York: J. Wiley, 1991. 419p.
TOMIMATSU T.; MURAKAMI K. Steroid saponin(s) - employable directly for pptn. of 16 hydro pregnenolone are extracted from plants of genus **Solanum**. Patente n. WO8301065-A; JP58055500-A; EP89377-A. Derwent primary accession n. 1983-34516K [14] B01.

VAN DER WATT, E.; PRETORIUS, J.C. Purification and identification of active antibacterial components in *Carpobrotus edulis* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v.76, p.87-91, 2001.

WIART, C. et al. Antimicrobial screening of plants used for traditional medicine in the state of Perak, Peninsular Malaysia. **Fitoterapia**, v.75, n.1, p.68-73, Jan. 2004.

CONCLUSÕES GERAIS

O fracionamento biodirecionado por testes antibacterianos do extrato bruto de *C. langsdorffii* resulta em frações ativas de grande complexidade. Durante os procedimentos é possível isolar duas substâncias inativas.

No caso de *L. lilacina*, o fracionamento é bem sucedido, resultando na purificação e identificação da substância denominada acteosídeo (Figura 1), ativa contra *A. hydrophila*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

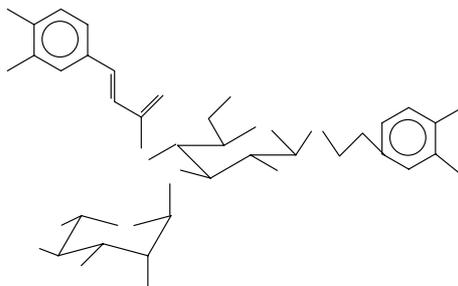


FIGURA 1: Estrutura do acteosídeo, isolado de *L. lilacina*.

O fracionamento do extrato metanólico das folhas de *S. aculeatissimum*, leva a duas substâncias com propriedades antibacterianas: rutina (Figura 2) e AL-144-04 (em fase de identificação). Rutina apresenta capacidade de inibir o crescimento de *A. hydrophila*, enquanto AL-144-04 é capaz de inibir o crescimento de *A. hydrophila*, *B. subtilis* e *S. aureus*.

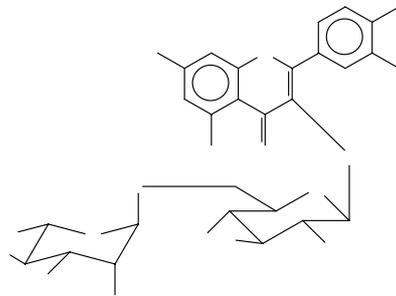


FIGURA 2: Estrutura da rutina, isolada de *S. aculeatissimum*.

ANEXOS

ANEXO A	Página
FIGURA 1A: AL-F, ^1H (DMSO-d6).....	168
FIGURA 2A: AL-F, ^1H (DMSO-d6).....	169
FIGURA 3A AL-F, ^1H (DMSO-d6).....	170
FIGURA 4A : AL-F, ^{13}C (DMSO-d6).....	171
FIGURA 5A : AL-F, ^{13}C (DMSO-d6).....	172
FIGURA 6A: AL-F, ^{13}C (DMSO-d6).....	173
FIGURA 7A : AL-F; HMQC(DMSO-d6).....	174
FIGURA 8A : AL-F; HMQC (DMSO-d6).....	175
FIGURA 9A : AL-F; HMQC (DMSO-d6).....	176
FIGURA 10A : AL-F; HMQC (DMSO-d6).....	177
FIGURA 11A : AL-F; HMBC (DMSO-d6).....	178
FIGURA 12A : AL-F; HMBC (DMSO-d6).....	179
FIGURA 13A AL-F; HMBC (DMSO-d6).....	180
FIGURA 14A: AL-F; HMBC (DMSO-d6).....	181
FIGURA 15A: AL-F.; HMBC (DMSO-d6).....	182
FIGURA 16A: AL-F; TOCSY 1D (DMSO-d6).....	183
FIGURA 17A: AL-F; TOCSY 1D (DMSO-d6).....	184
FIGURA 18A: AL-F; ^1H (CD ₃ OD).....	185
FIGURA 19A: AL-F; ^1H (CD ₃ OD).....	186
FIGURA 20A: AL-F; ^1H (CD ₃ OD)	187
FIGURA 21A: AL-F; ^{13}C , (CD ₃ OD).....	188
FIGURA 22A: AL-F; MS ¹ (623=M-1).....	189
FIGURA 23A: AL-F; MS ² (461=M-1-162).....	189
FIGURA 24A: AL-F; MS ³ (315=M-1-162-146).....	190
FIGURA 25A: AL-F MS ¹ (647=M + Na ⁺).....	190
FIGURA 26A: AL-F; MS ² (501=M+ Na ⁺ -146).....	191

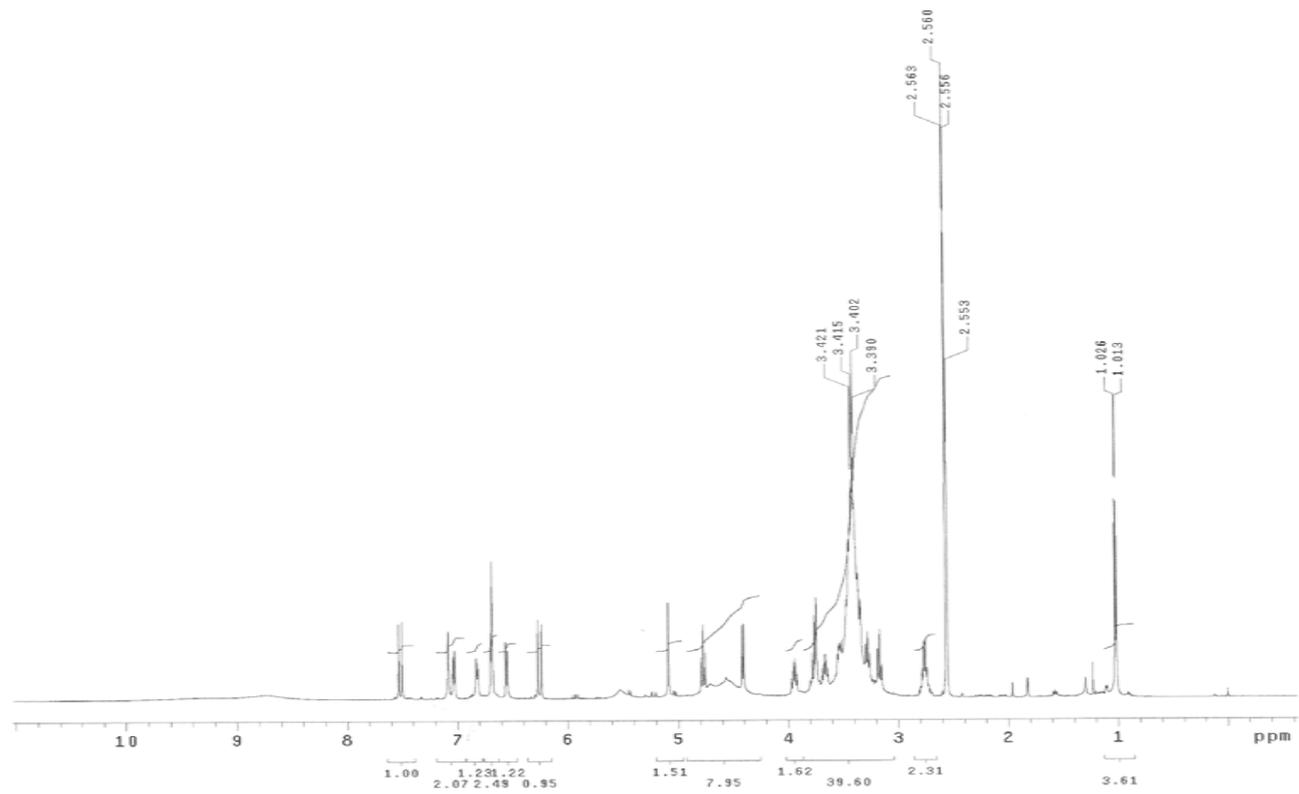


FIGURA 1A: AL-F, ¹H (DMSO-d₆)

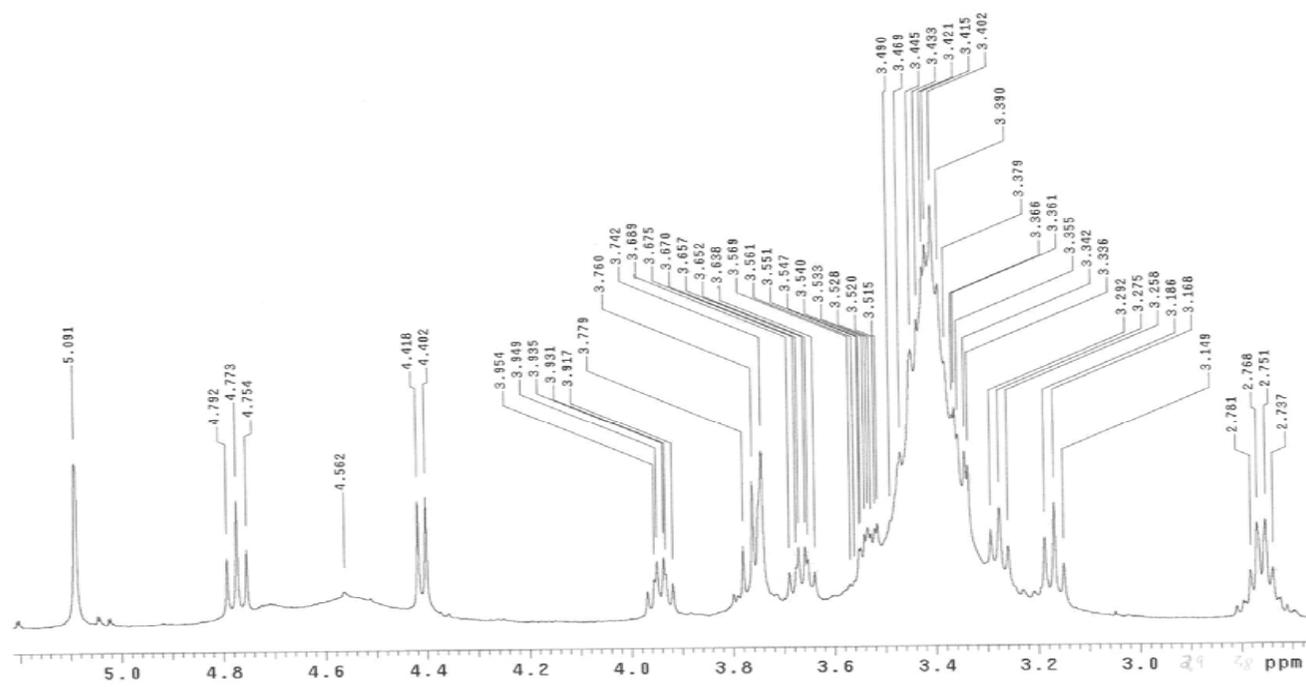


FIGURA 2A: AL-F, ^1H (DMSO- d_6)

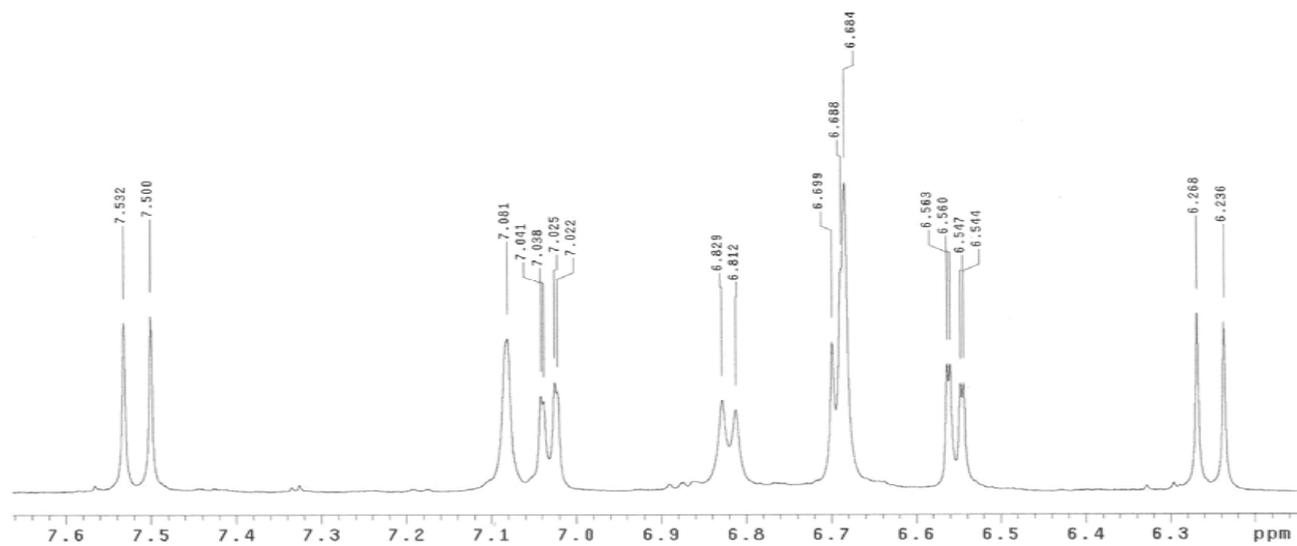


FIGURA 3A: AL-F, ¹H (DMSO-d₆)

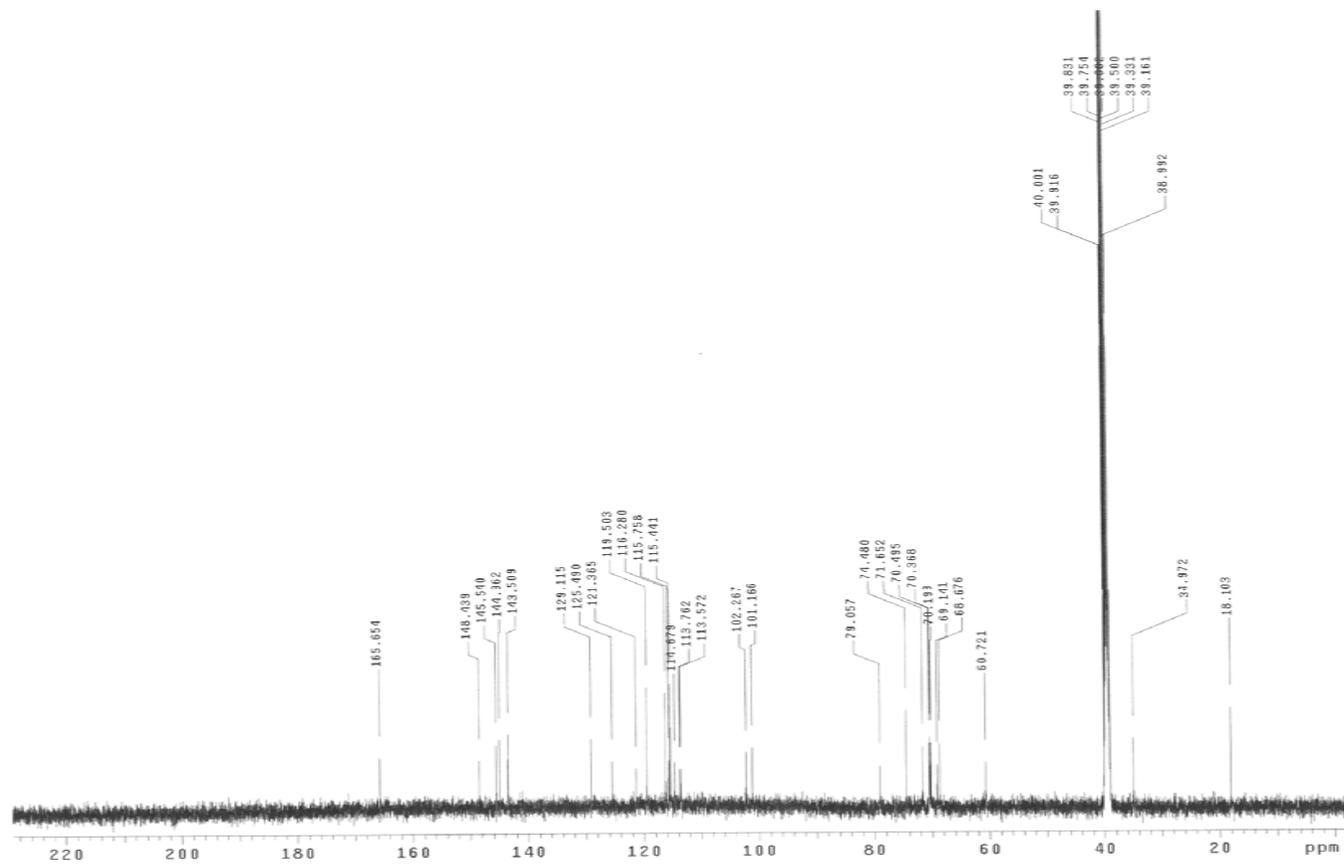


FIGURA 4A : AL-F, ¹³C (DMSO-d₆)

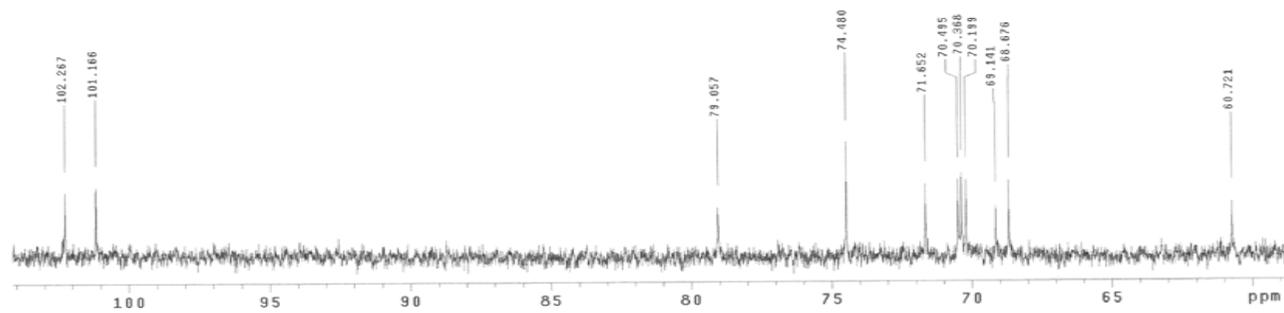


FIGURA 5A: AL-F, ¹³C (DMSO-d₆)

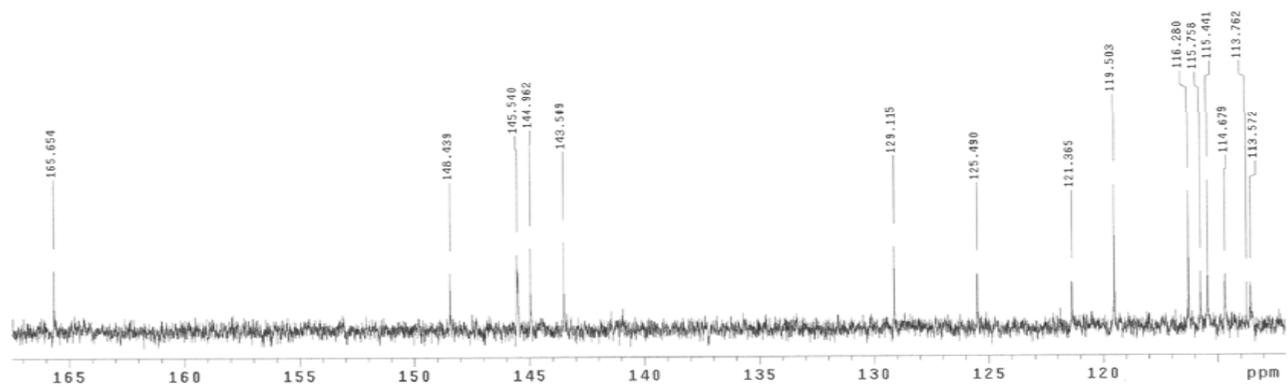


FIGURA 6A: AL-F, ^{13}C (DMSO- d_6)

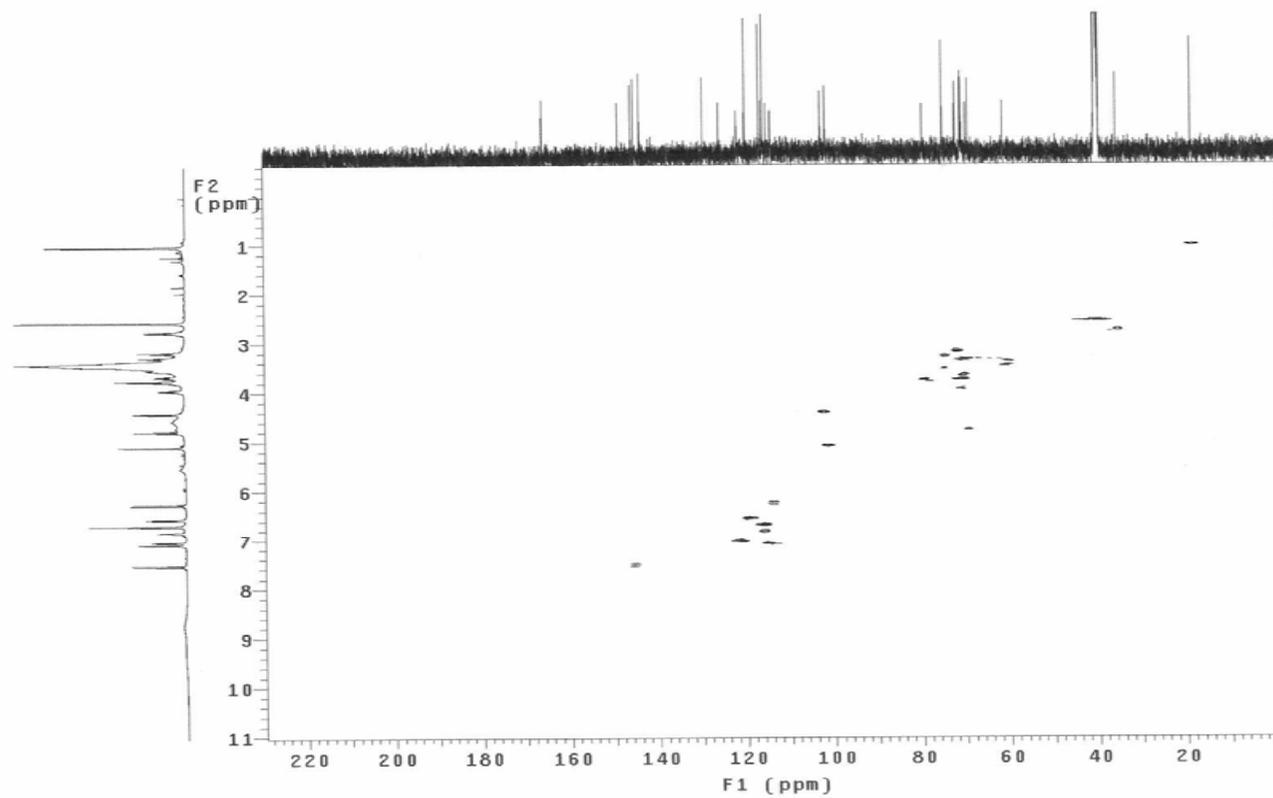


FIGURA 7A: AL-F, HMQC (DMSO-d6)

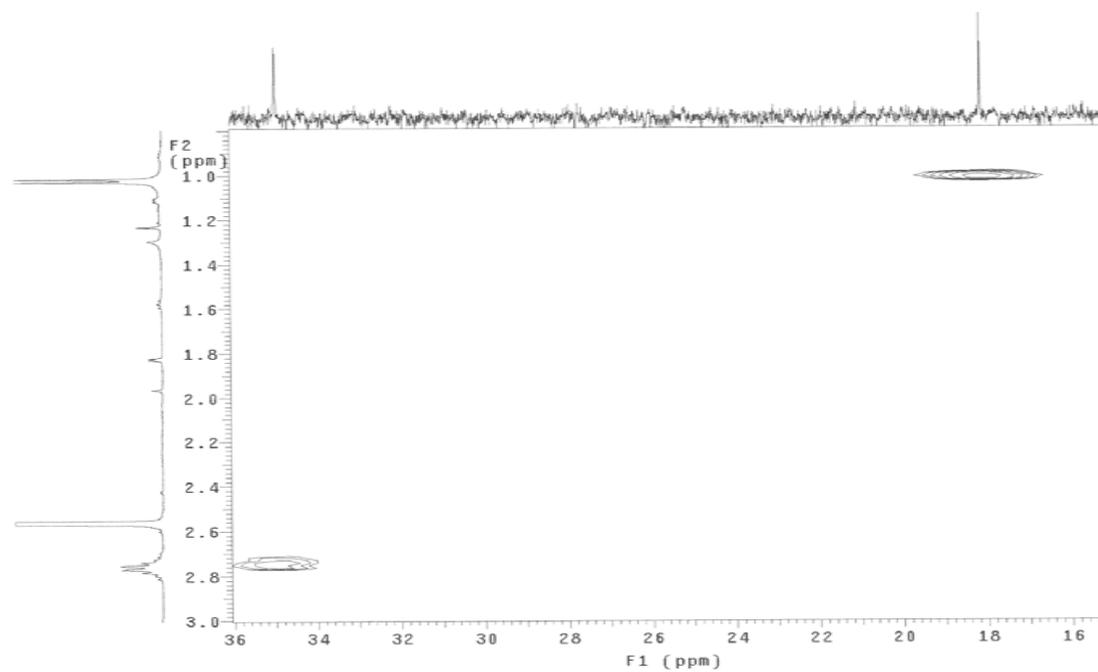


FIGURA 8A: AL-F, HMQC (DMSO-d₆)

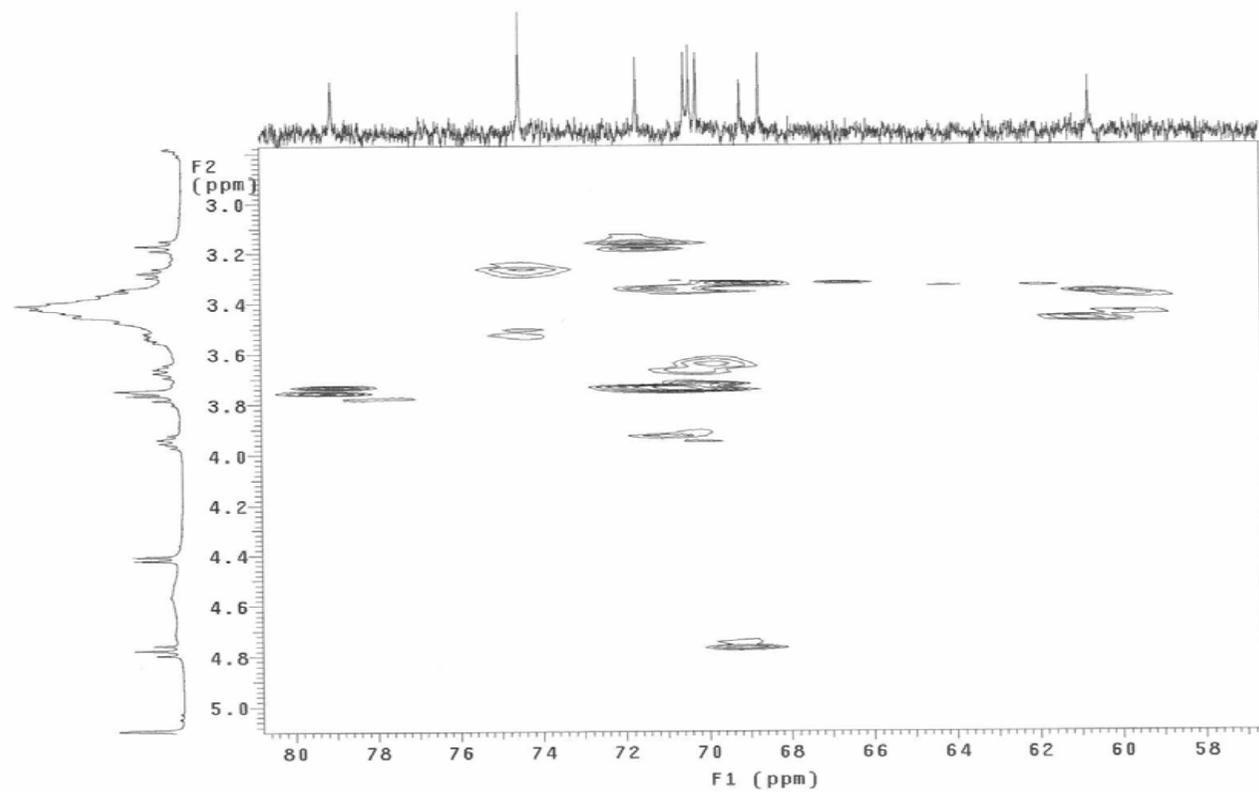


FIGURA 9A: AL-F, HMQC (DMSO-d6)

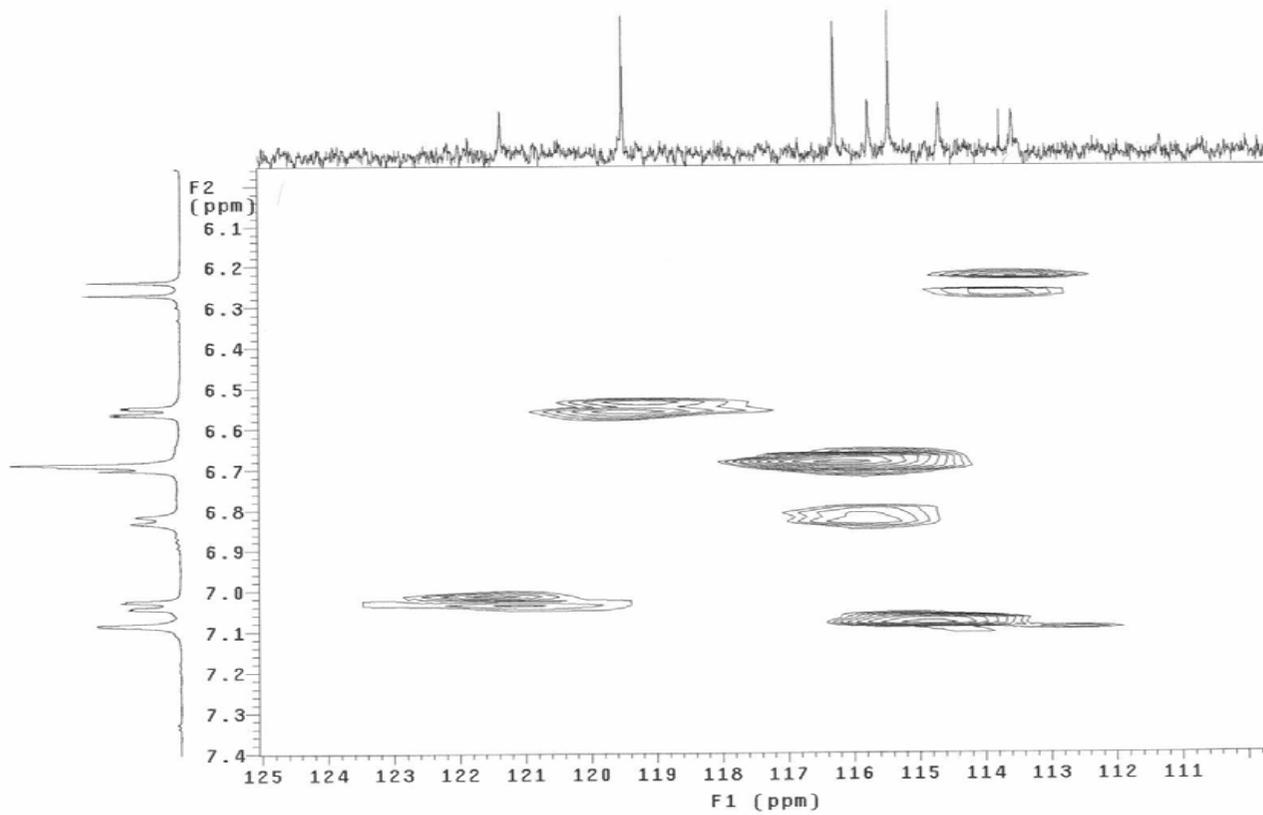


FIGURA 10A: AL-F, HMQC (DMSO-d6)

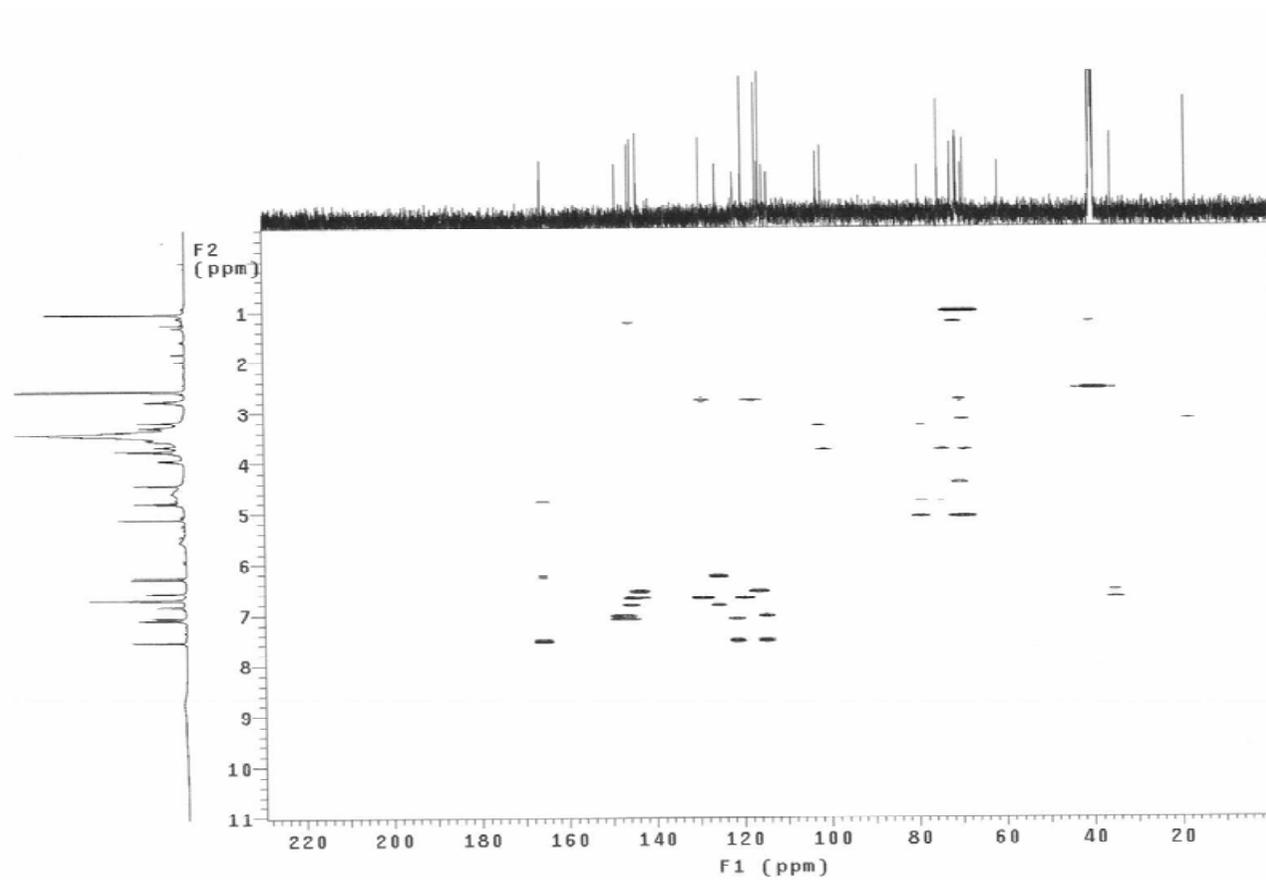


FIGURA 11A: AL-F, HMBC (DMSO-d6)

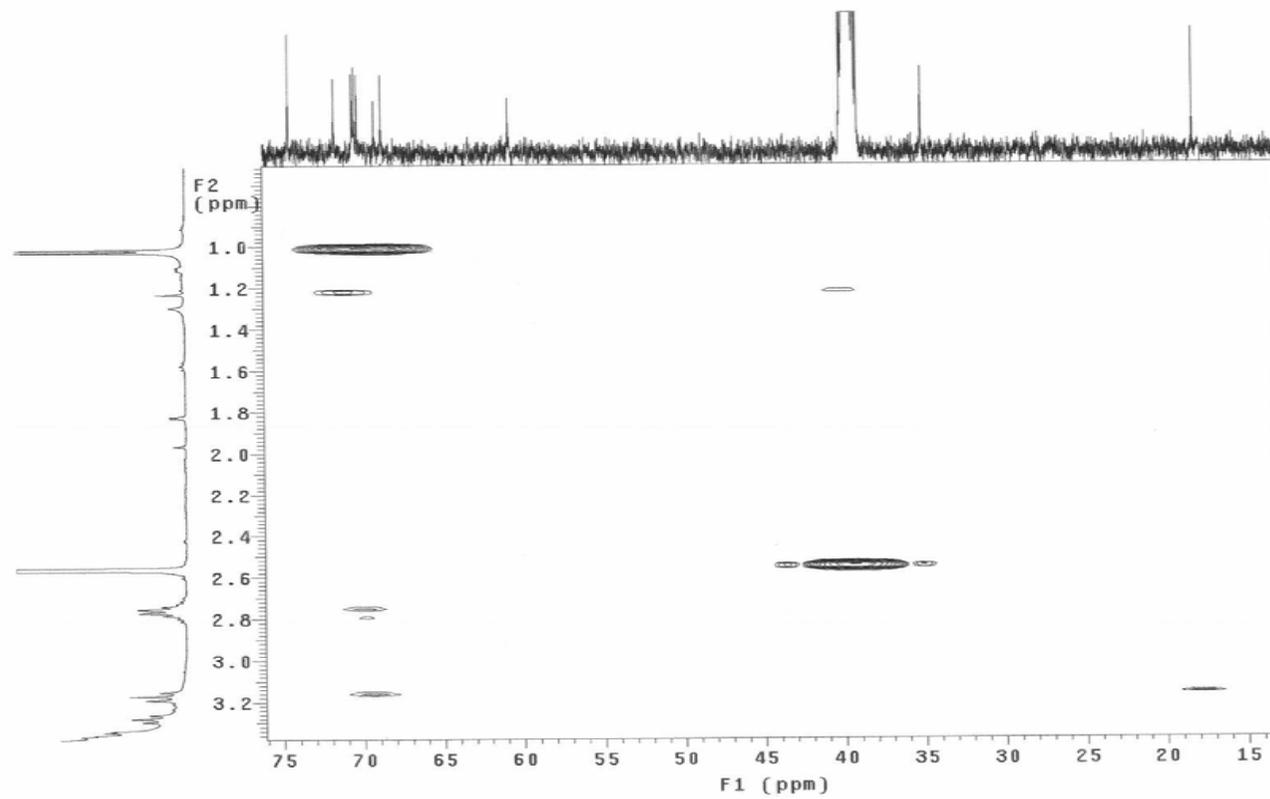


FIGURA 12A: AL-F, HMBC (DMSO-d6)

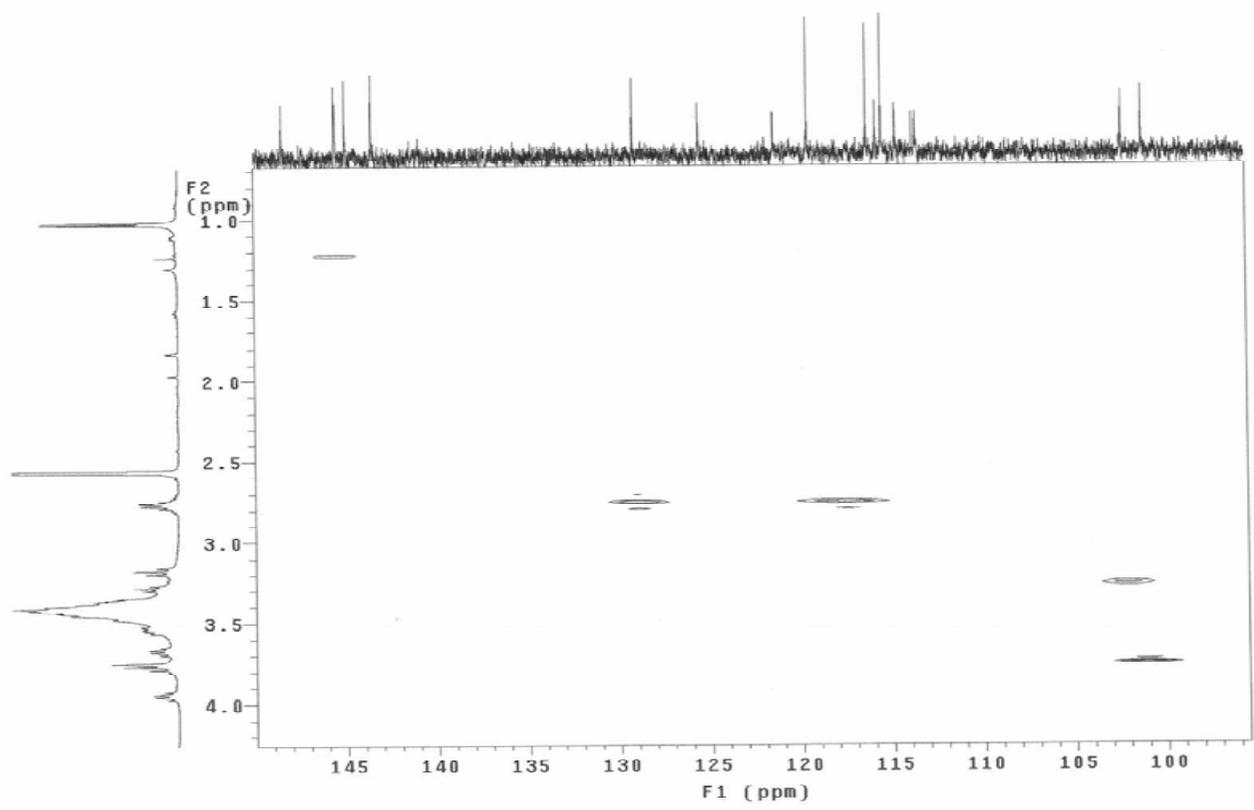


FIGURA 13A: AL-F, HMBC (DMSO-d6)

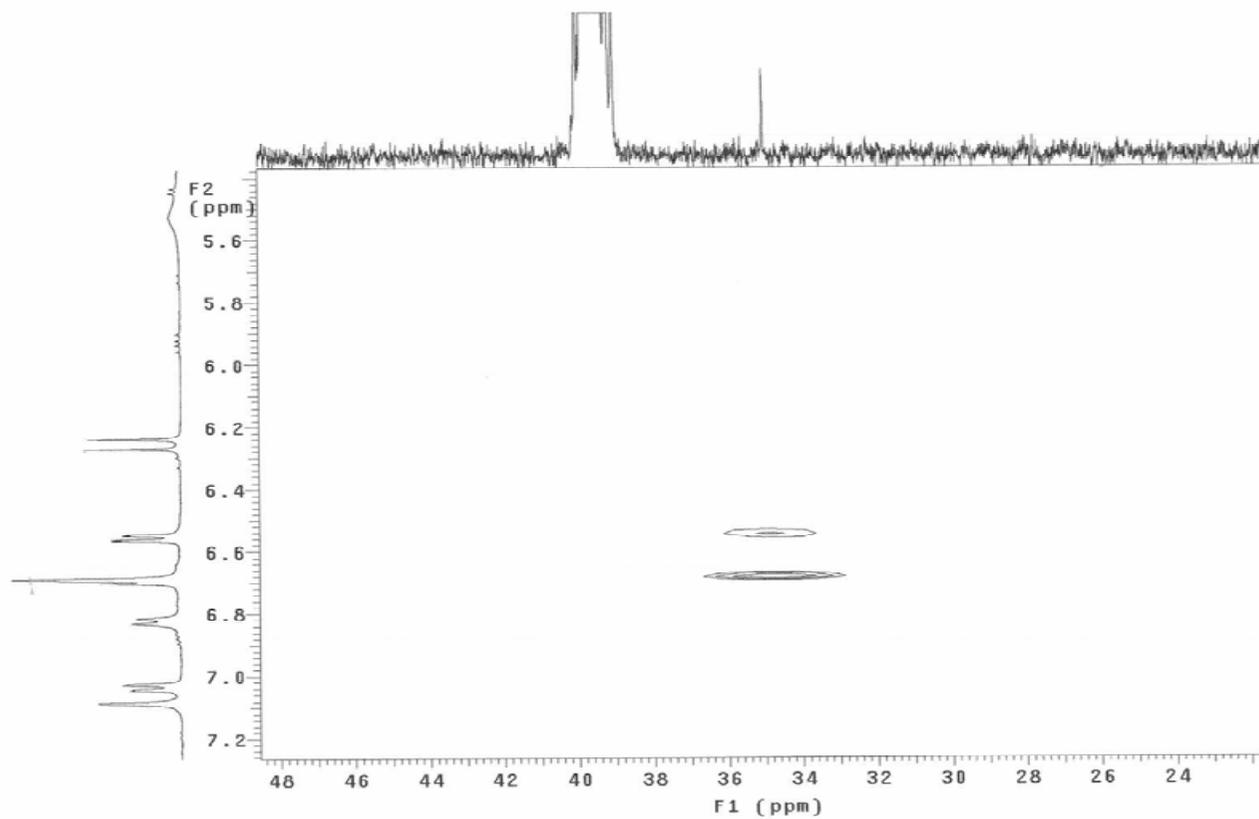


FIGURA 14A: AL-F, HMBC (DMSO-d6)

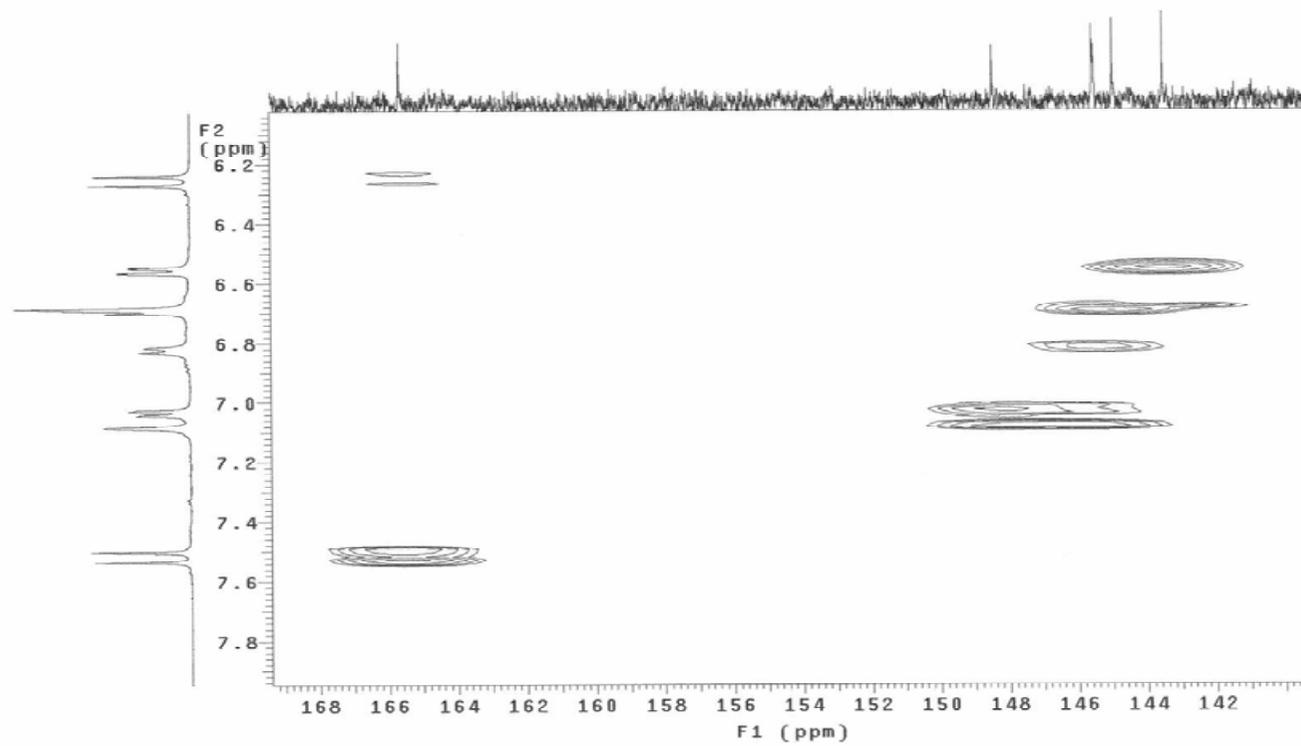


FIGURA 15A: AL-F, HMBC (DMSO-d6)

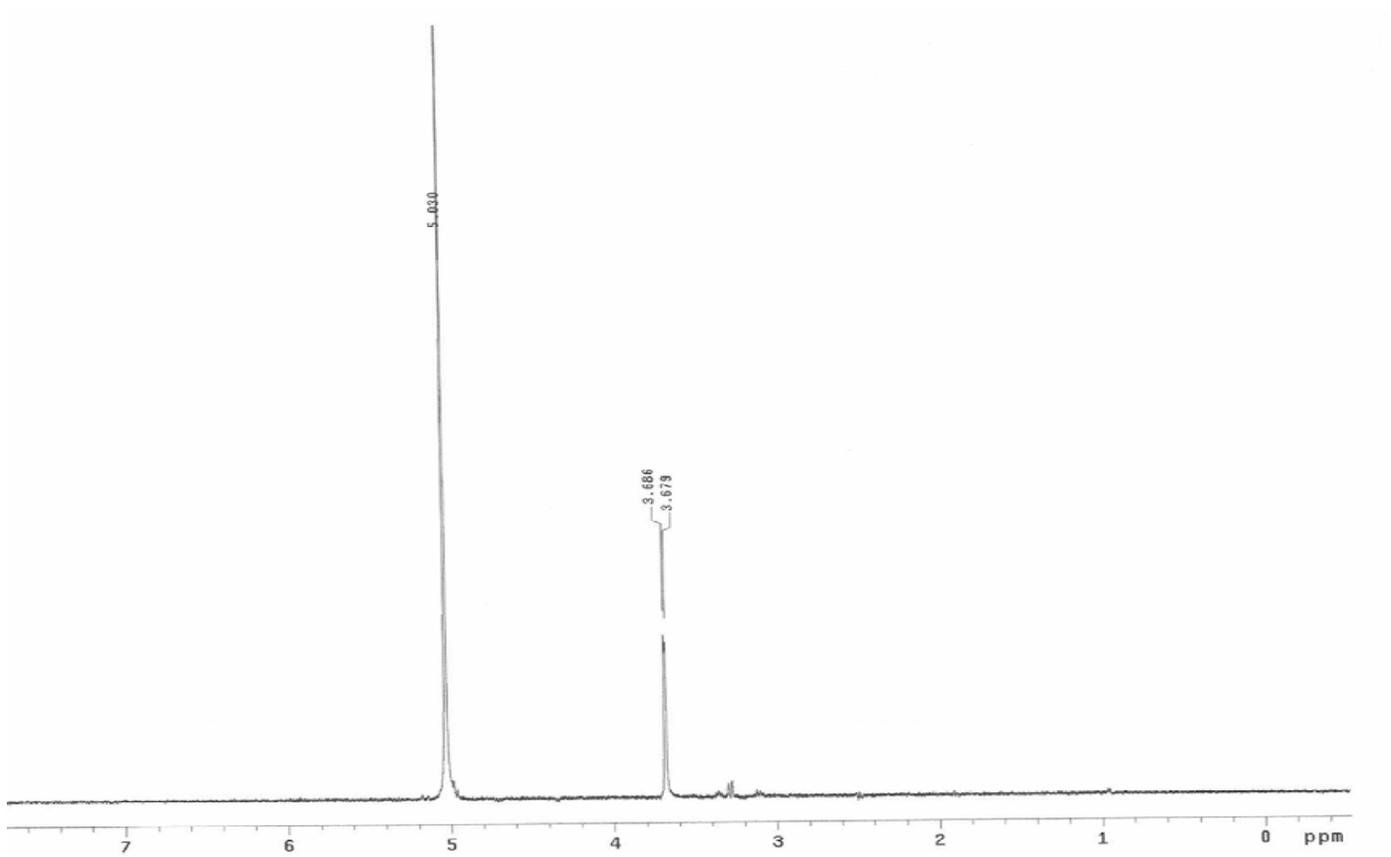


FIGURA 16A: AL-F, TOCSY 1D (DMSO-d6)

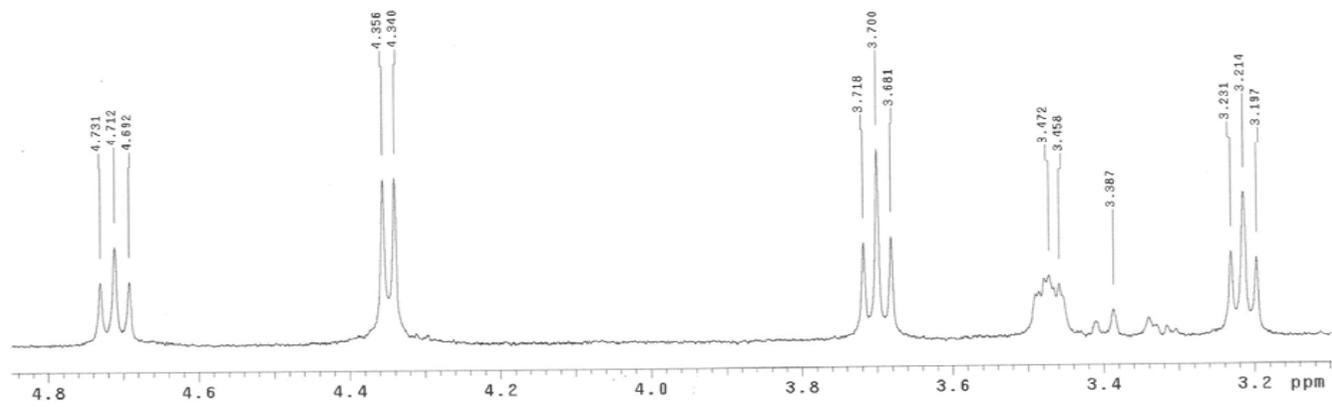


FIGURA 17A: AL-F, TOCSY 1D (DMSO-d6)

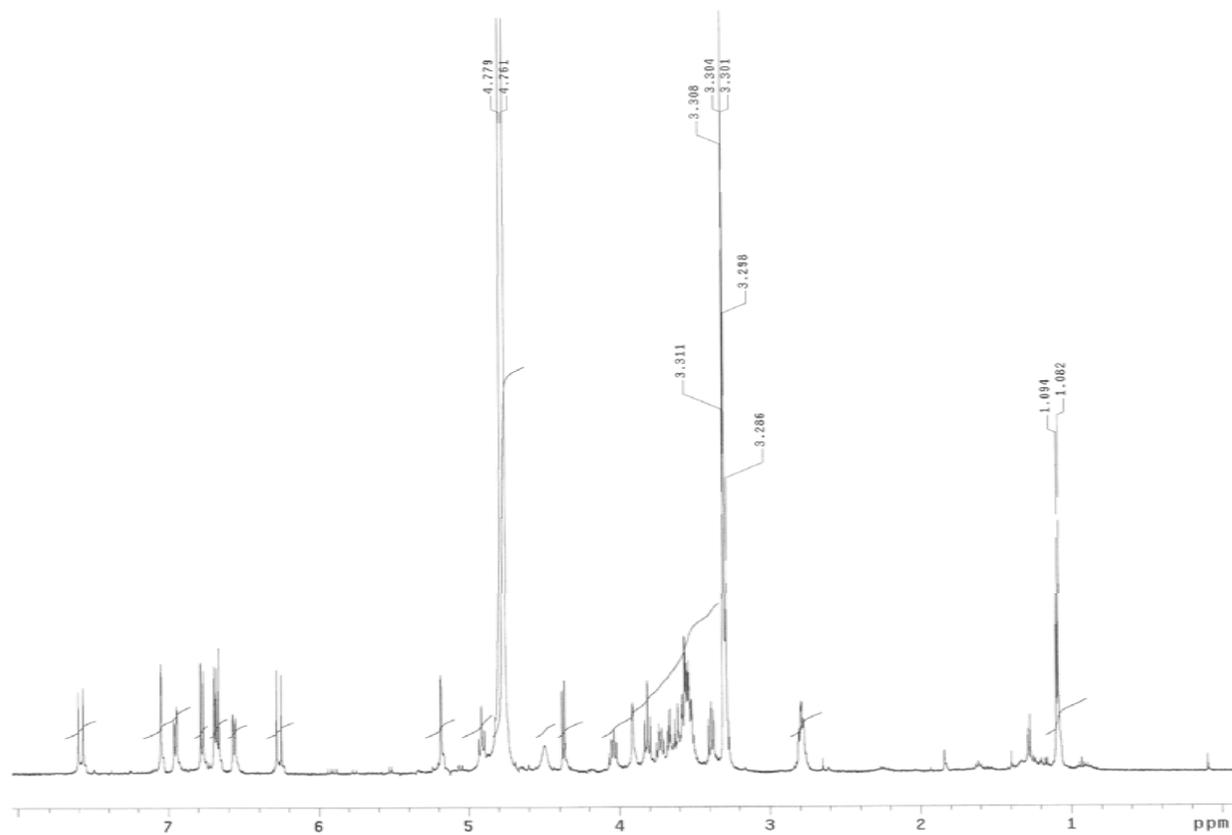


FIGURA 18A: Espectro de AL-F, ^1H (CD_3OD)

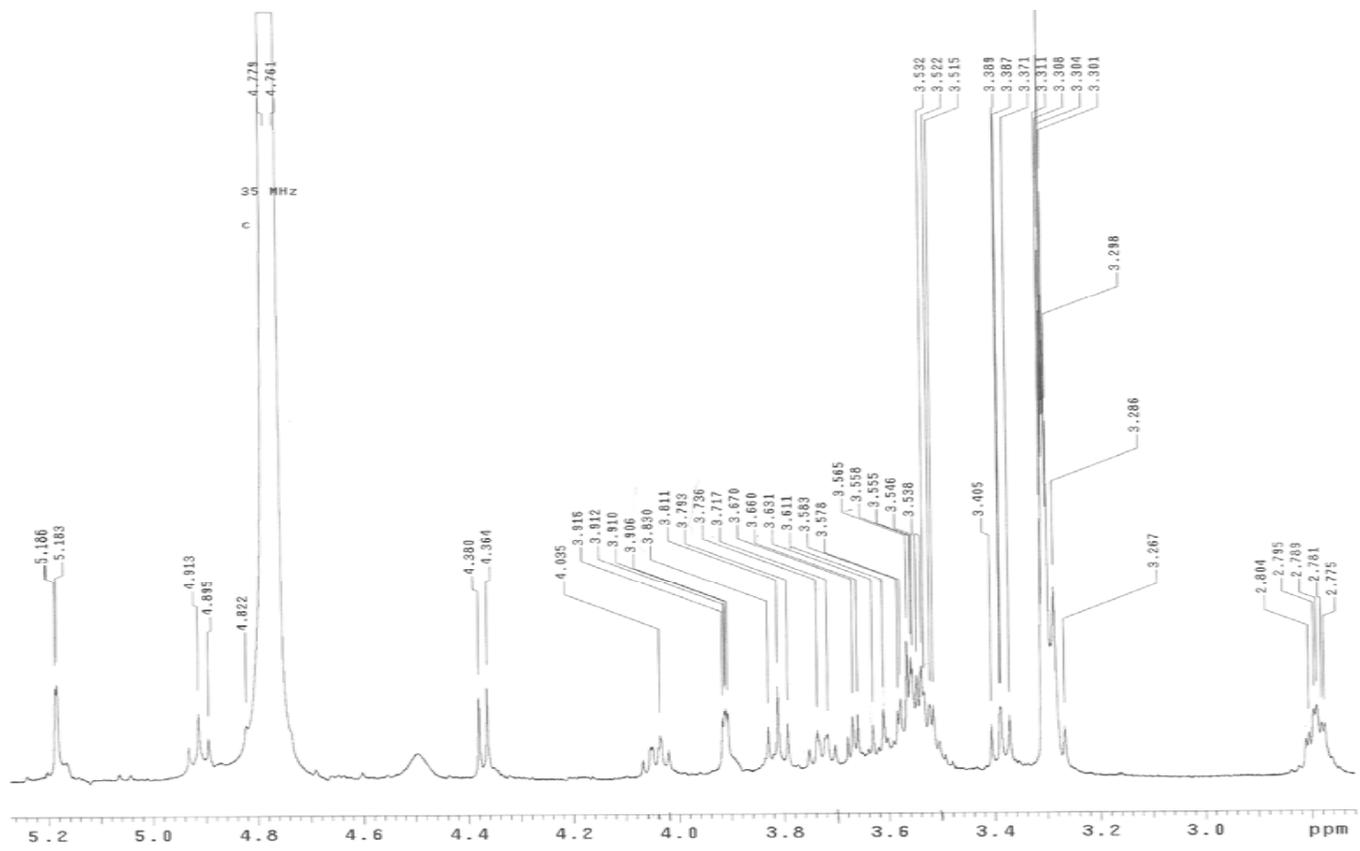


FIGURA 19A: AL-F, ^1H (CD_3OD)

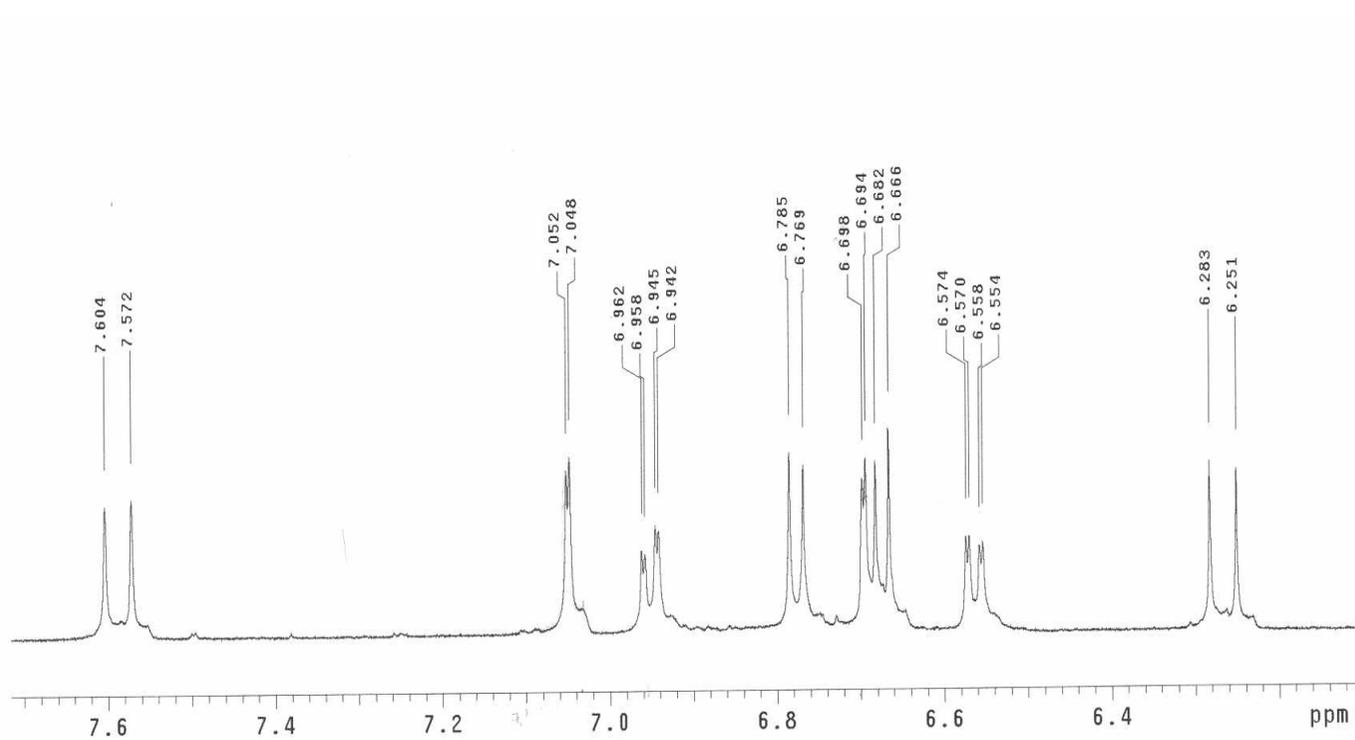


FIGURA 20A: AL-F, ¹H (CD₃OD)

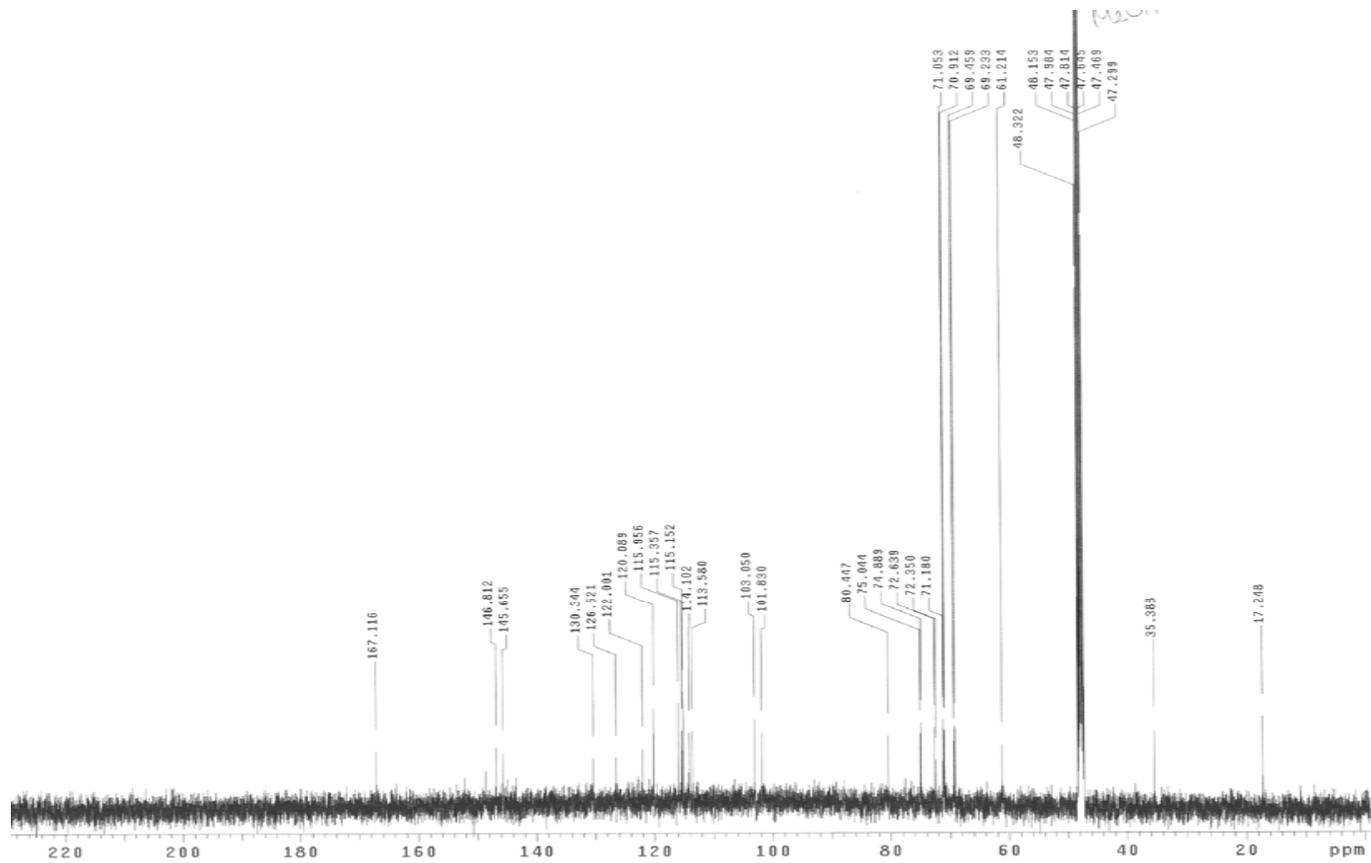


FIGURA 21A: AL-F, ^{13}C (CD_3OD)

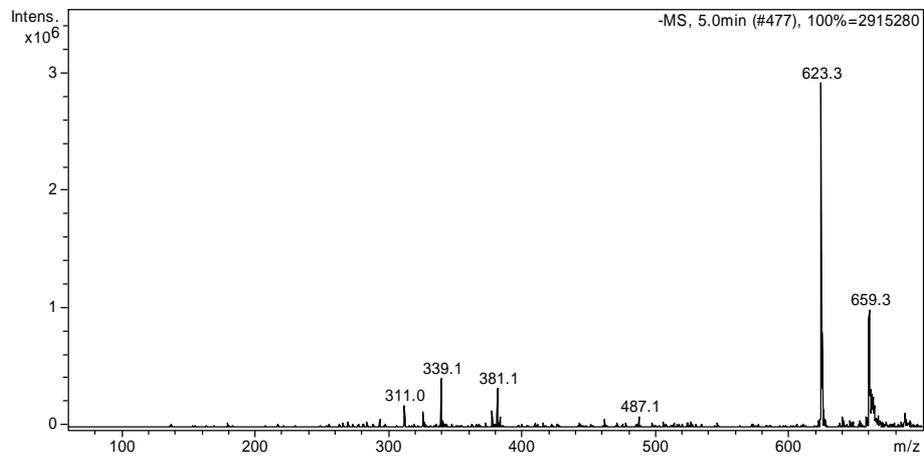


FIGURA 22A: AL-F, MS¹ (623=M-1)

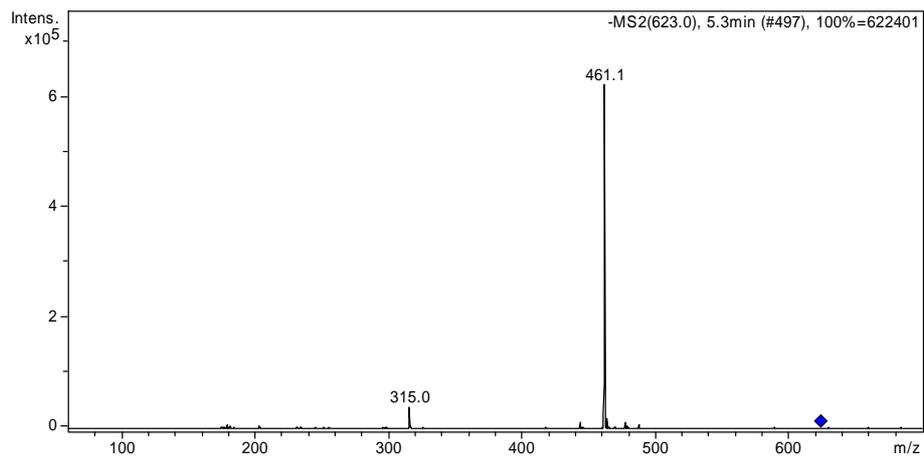


FIGURA 23A: AL-F, MS² (461=M-1-162)

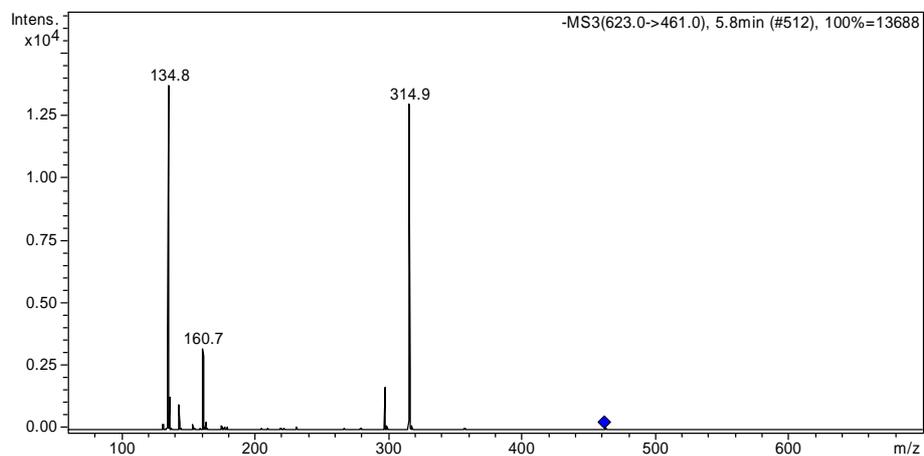


FIGURA 24A: AL-F, MS³ (315=M-1-162-146)

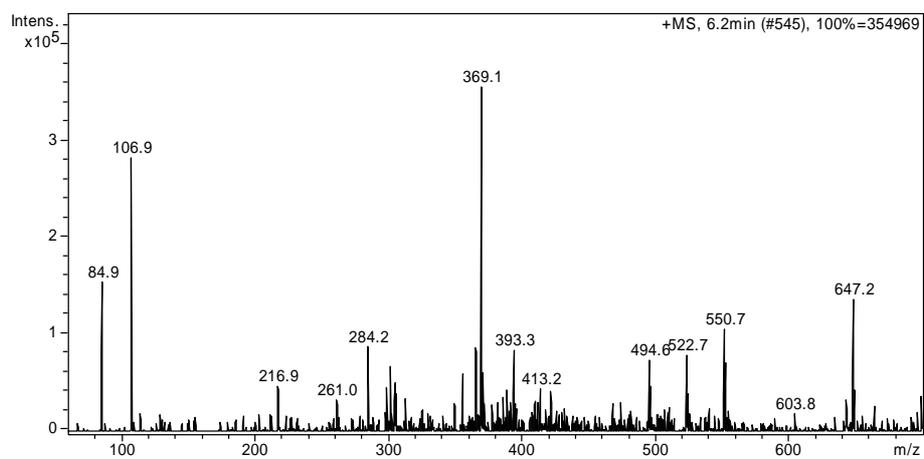


FIGURA 25A: AL-F, MS¹ (647=M+Na⁺)

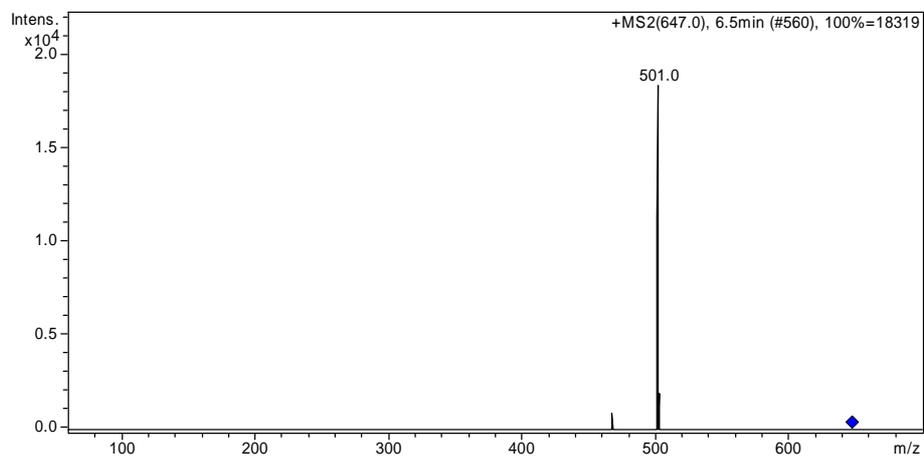


FIGURA 26A: AL-F, MS² (501=M + Na⁺-146)

ANEXOS B	Página
FIGURA 1B : AL-144-01, ¹ H (DMSO-d6).....	193
FIGURA 2B : AL-144-01, ¹ H (DMSO-d6).....	194
FIGURA 3B : AL-144-01, ¹ H (DMSO-d6).....	195
FIGURA 4B : AL-144-01, ¹³ C (DMSO-d6).....	196
FIGURA 5B : AL-144-01, HMQC (DMSO-d6).....	197
FIGURA 6B : AL-144-01, HMQC (DMSO-d6).....	198
FIGURA 7B : AL-144-01, HMQC (DMSO-d6).....	199
FIGURA 8B : AL-144-01, HMBC (DMSO-d6).....	200
FIGURA 9B : AL-144-01, HMBC (DMSO-d6).....	201
FIGURA 10B : AL-144-01, HMBC (DMSO-d6).....	202
FIGURA 11B : AL-144-01, HMBC (DMSO-d6).....	203
FIGURA 12B : AL-144-01, COSY (DMSO-d6).....	204
FIGURA 13B : AL-144-01, (M-1).....	205
FIGURA 14B : AL-144-01, (M-1-309).....	205
FIGURA 15B : AL-144-01, (M+Na ⁺).....	206

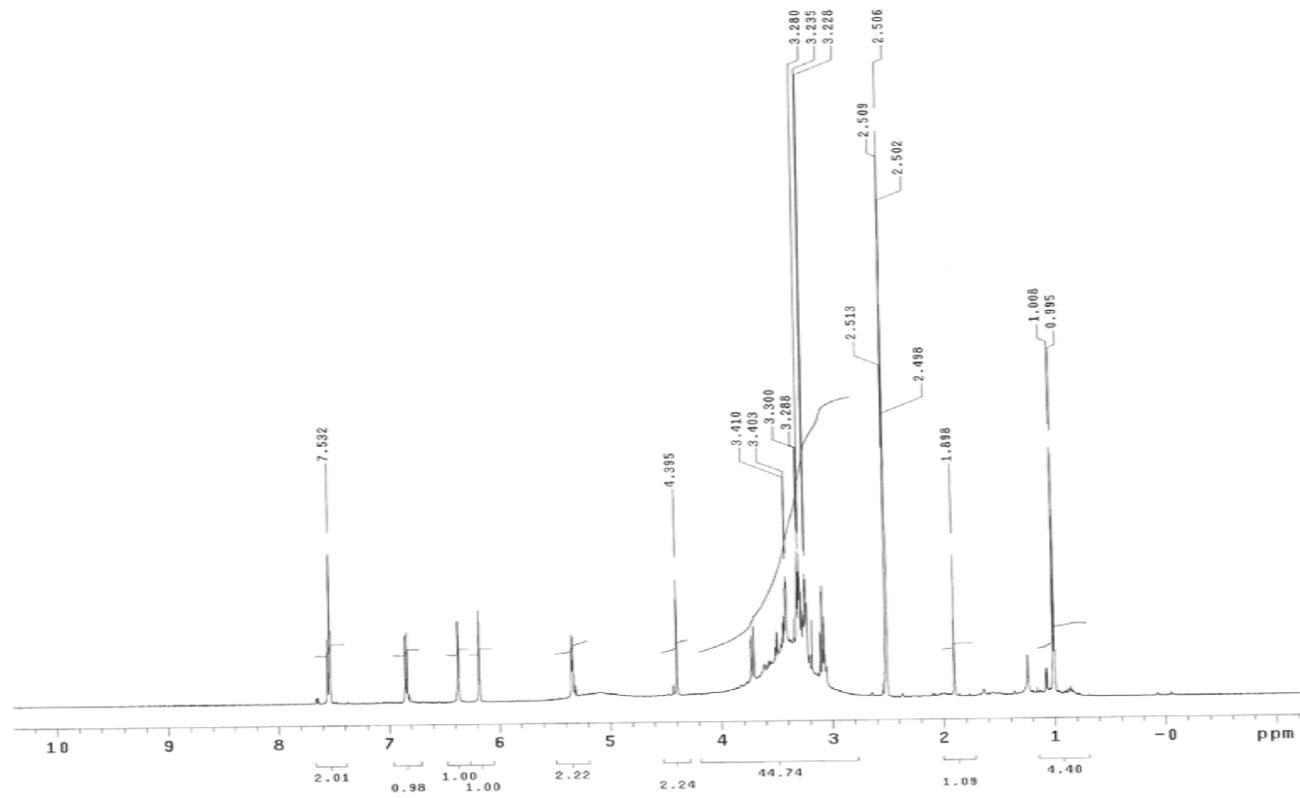


FIGURA 1B: AL-144-01, ¹H (DMSO-d6)

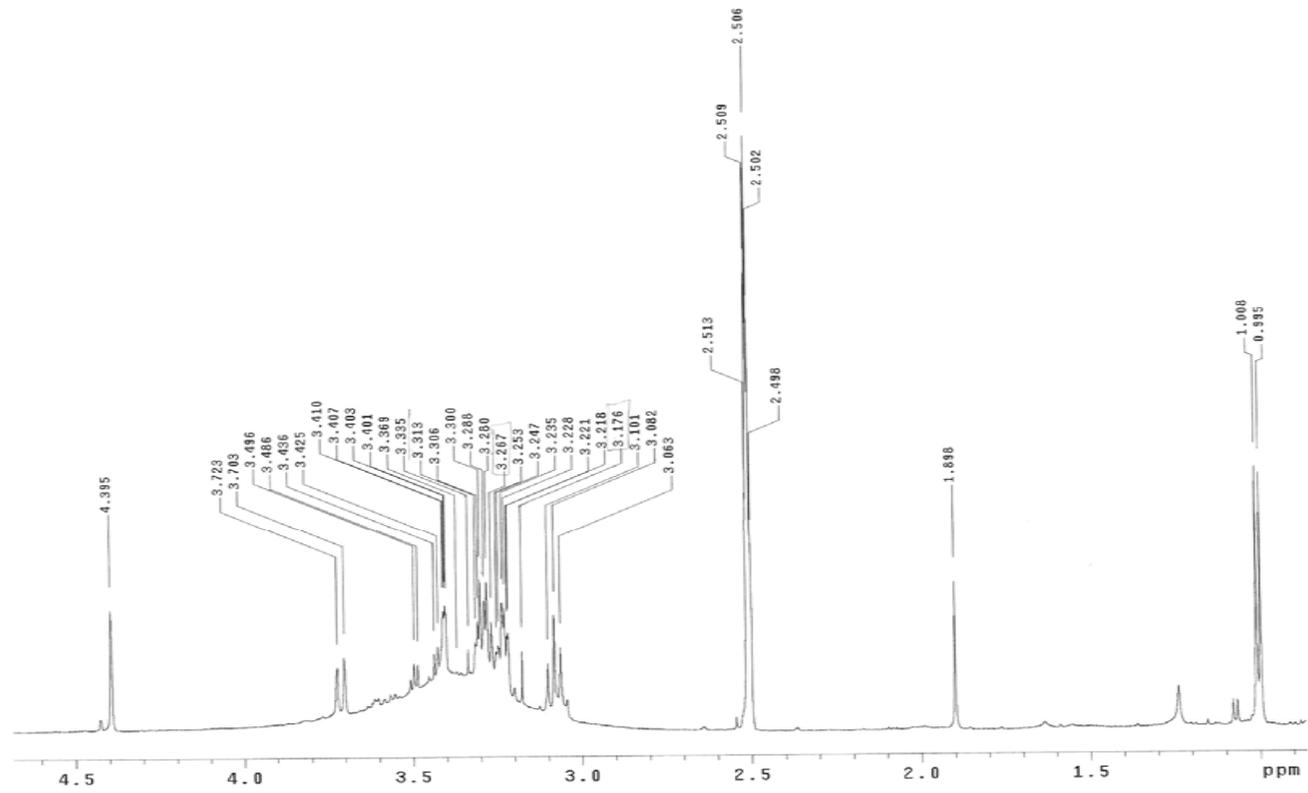


FIGURA 2B: AL-144-01, ¹H (DMSO-d₆)

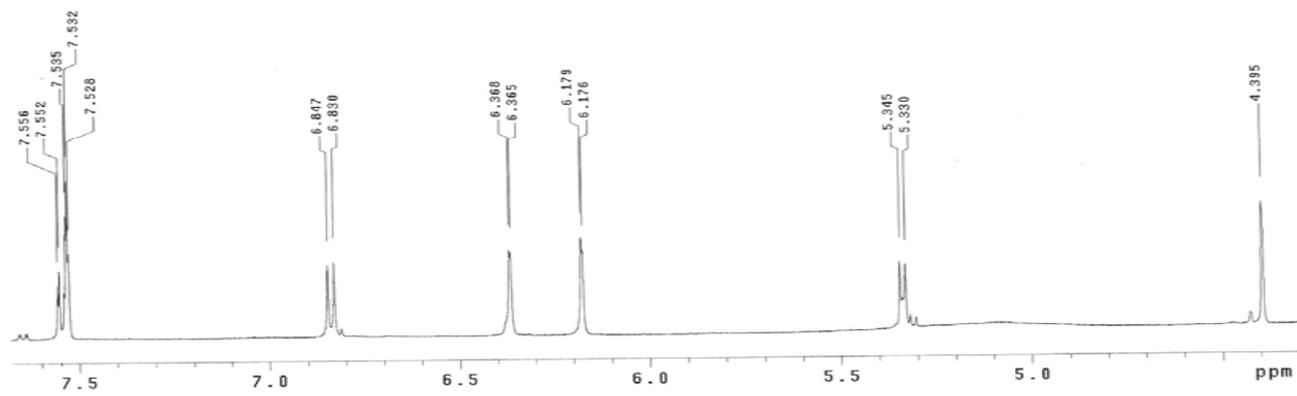


FIGURA 3B: AL-144-01, ¹H (DMSO-d₆)

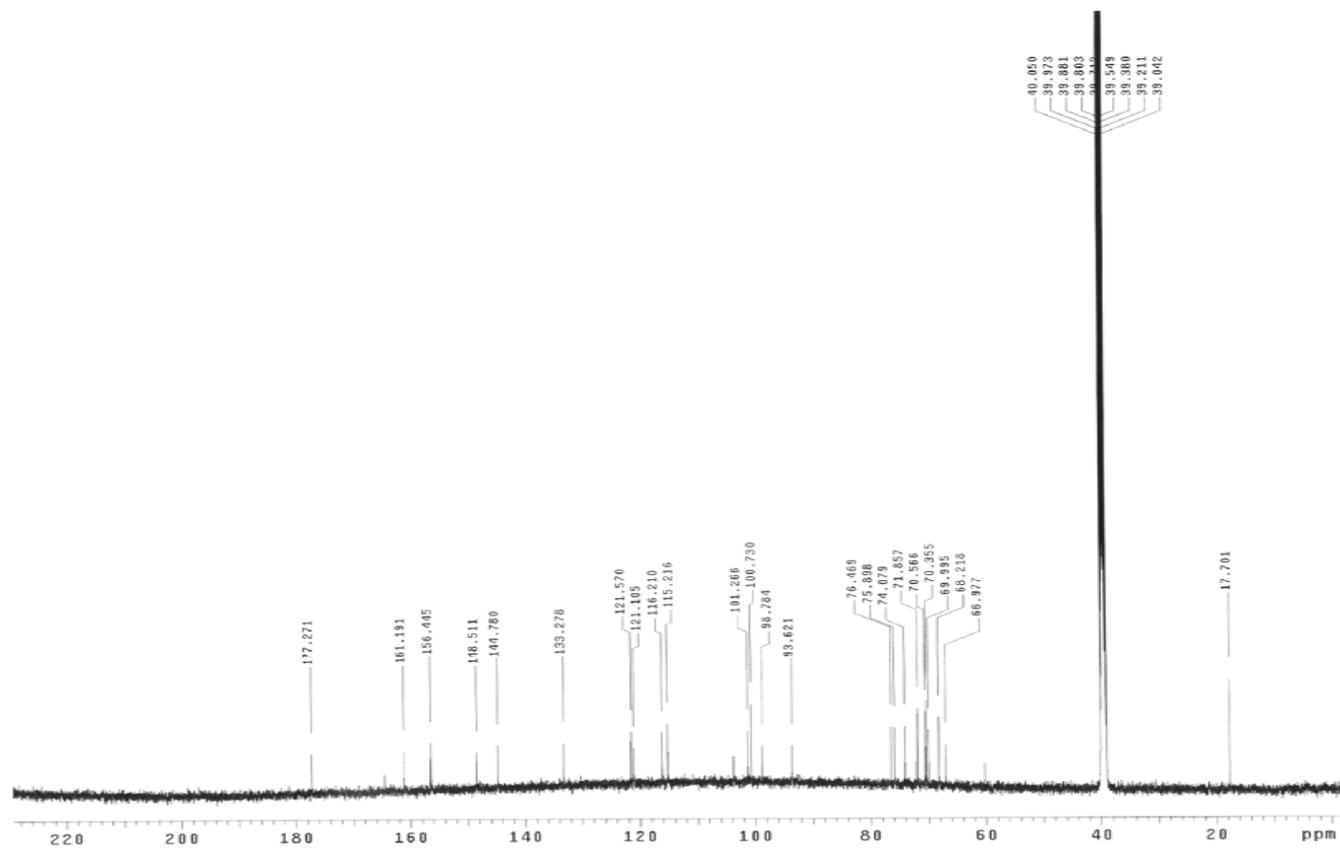


FIGURA 4B: AL-144-01, ^{13}C (DMSO- d_6)

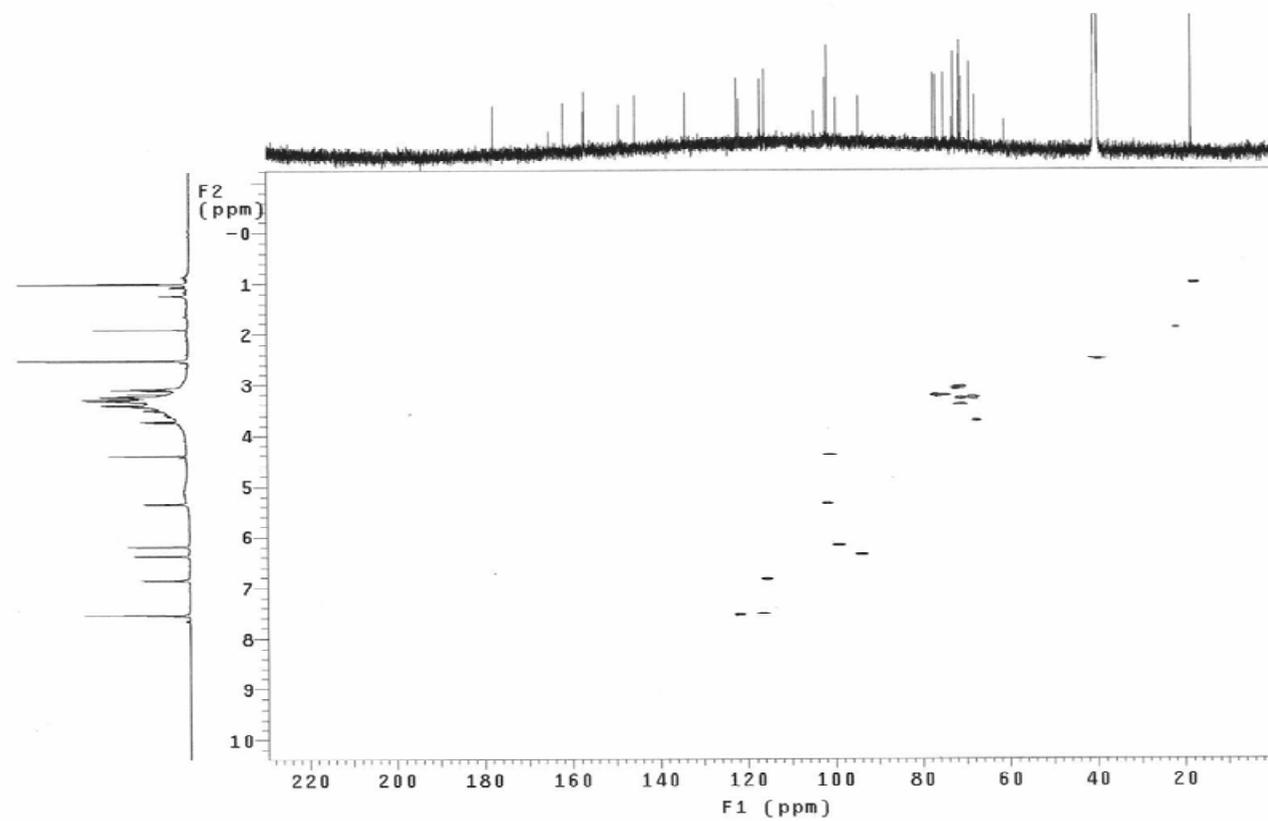


FIGURA 5B: AL-144-01, HMQC (DMSO-d₆)

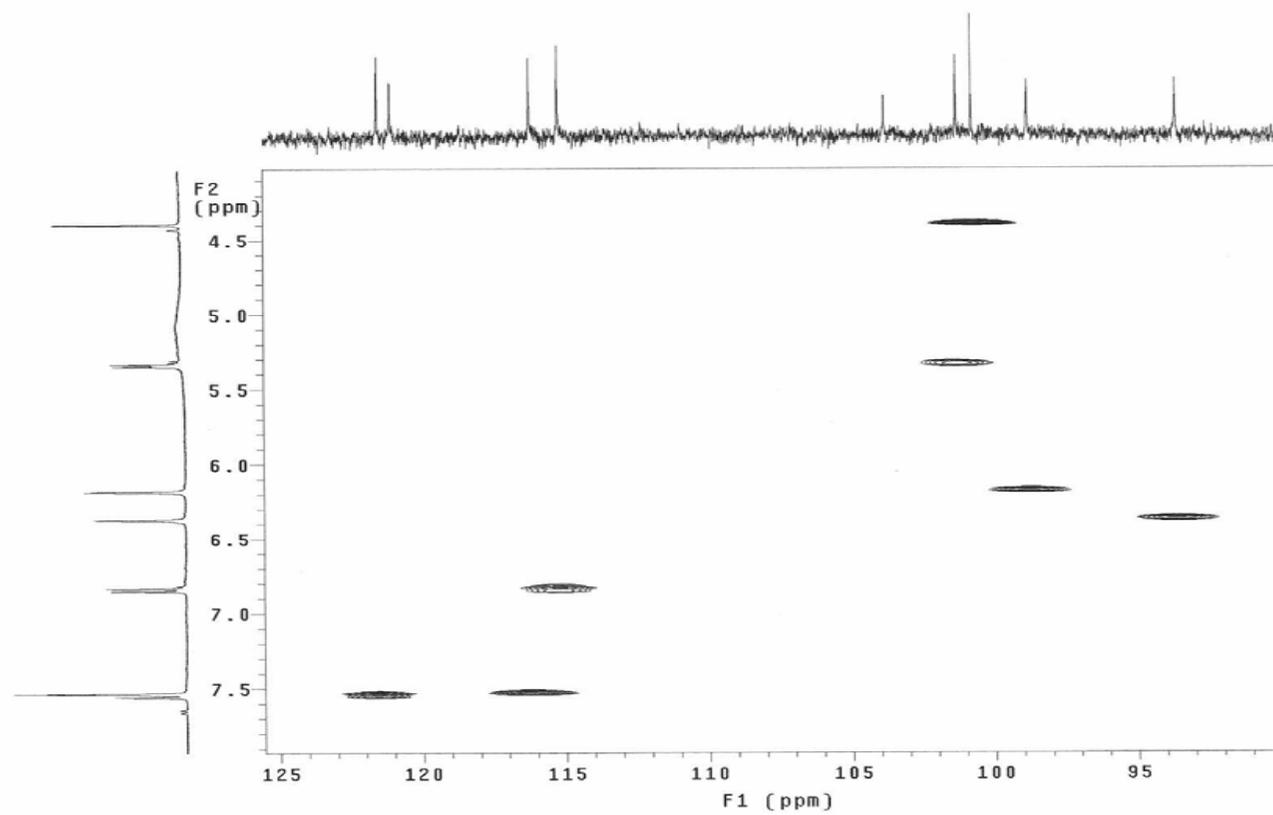


FIGURA 6B: AL-144-01, HMQC (DMSO-d6)

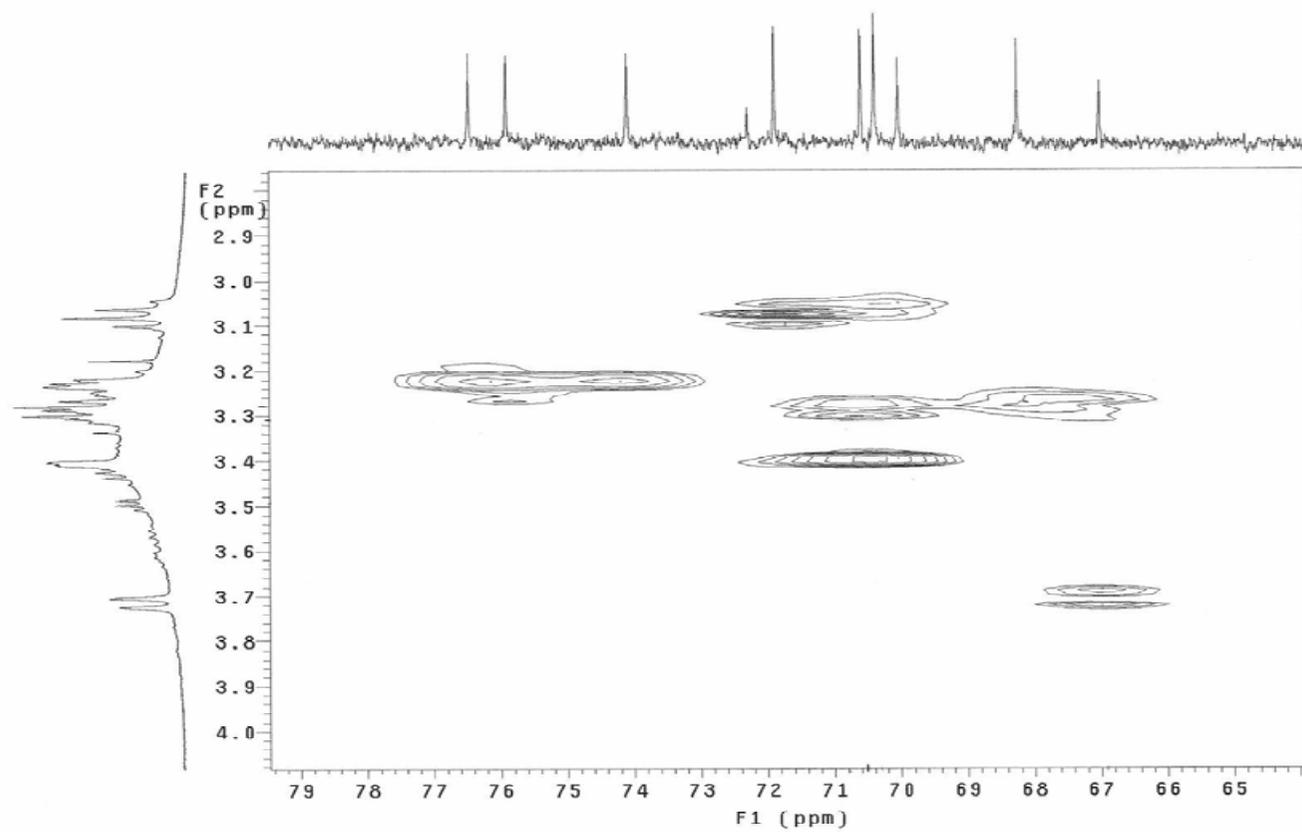


FIGURA 7B: AL-144-01, HMQC (DMSO-d6)

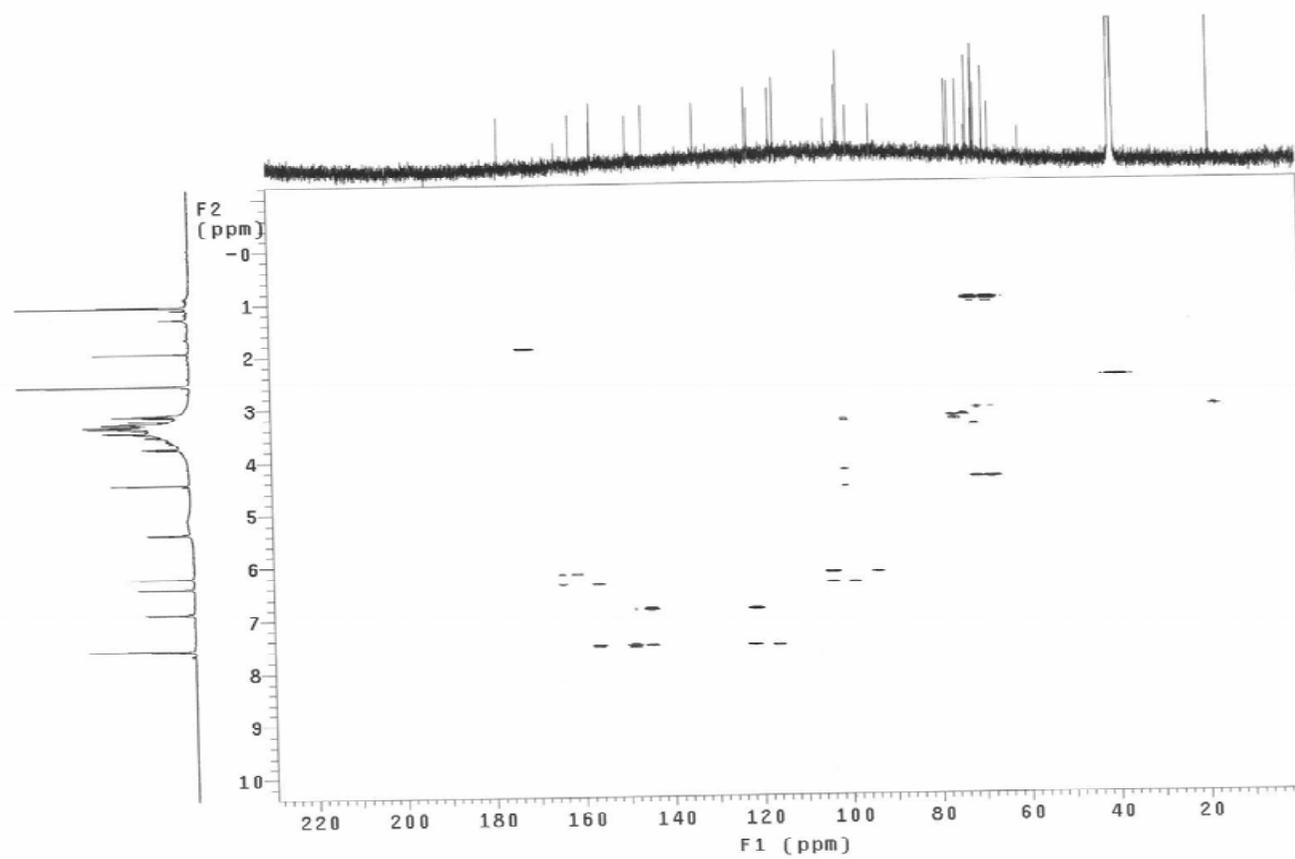


FIGURA 8B: AL-144-01, HMBC (DMSO-d₆)

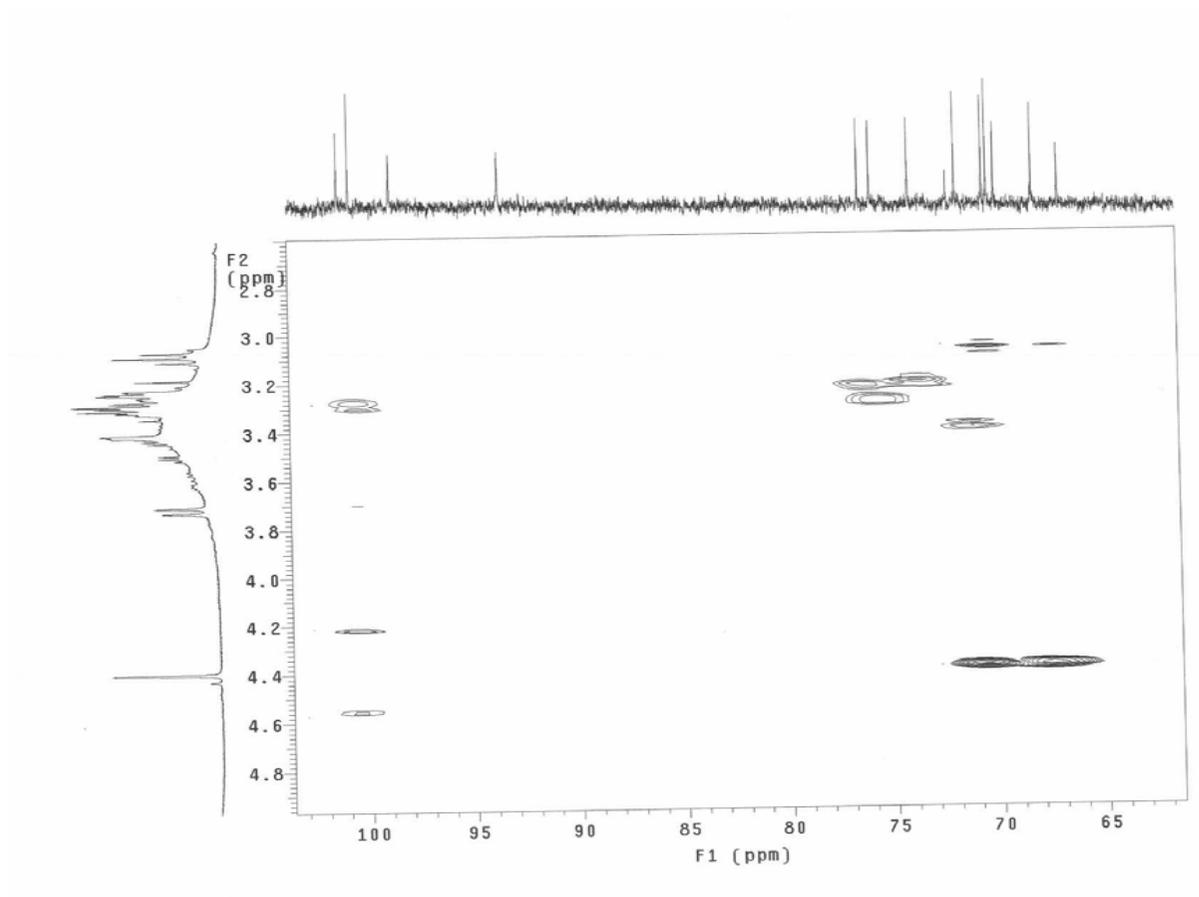


FIGURA 9B: AL-144-01, HMBC (DMSO-d6)

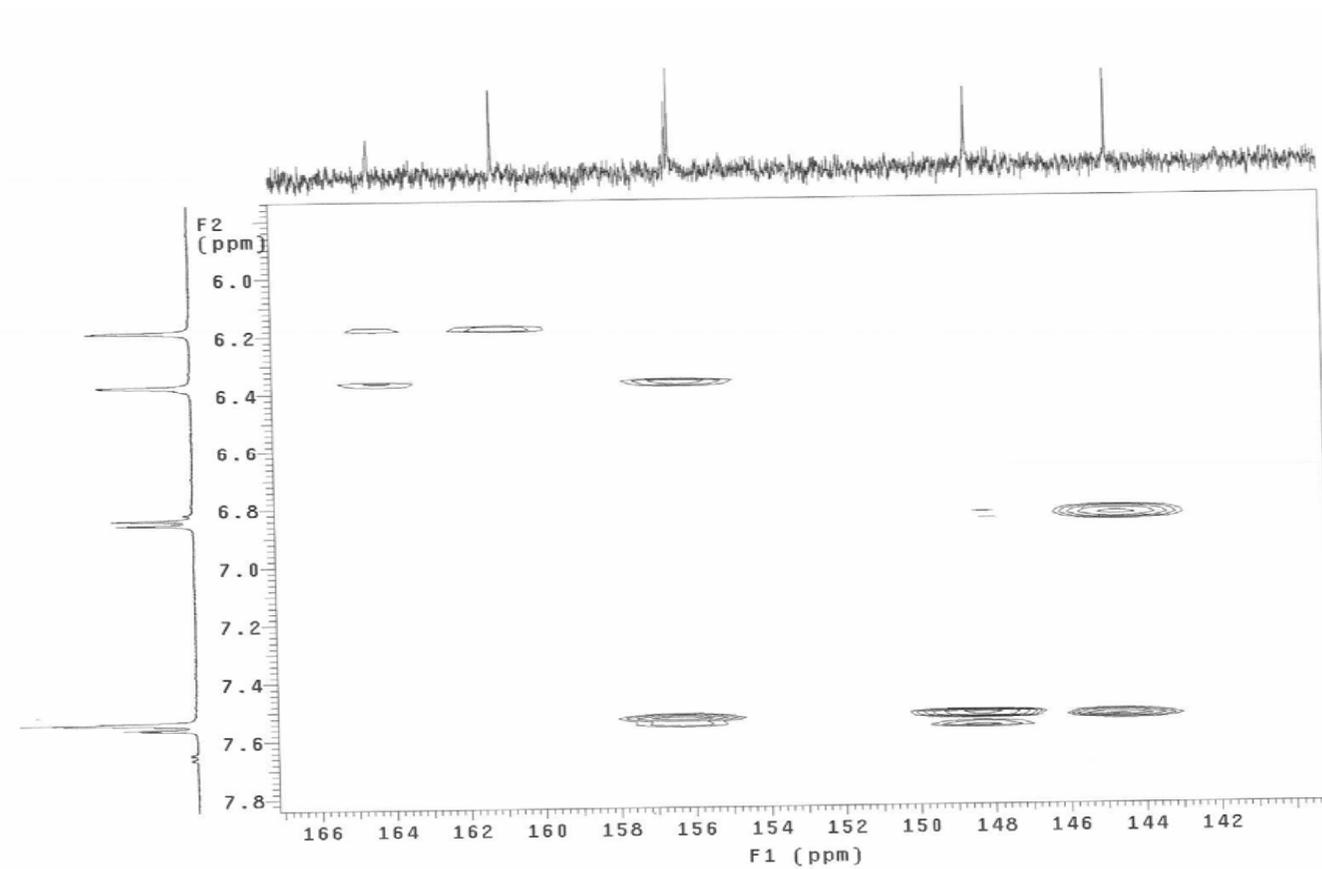


FIGURA 10B: AL-144-01, HMBC (DMSO-d₆)

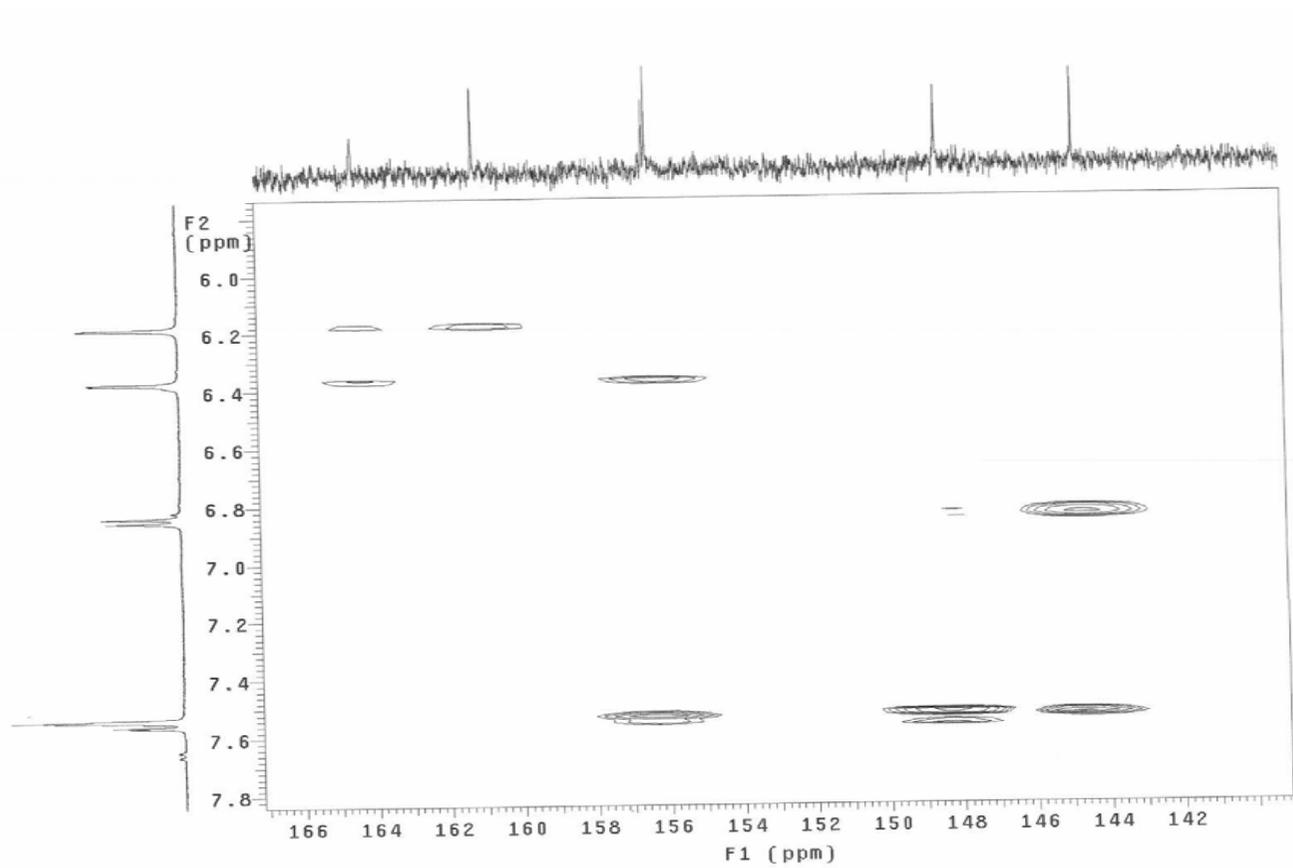


FIGURA 11B: AL-144-01, HMBC (DMSO-d6)

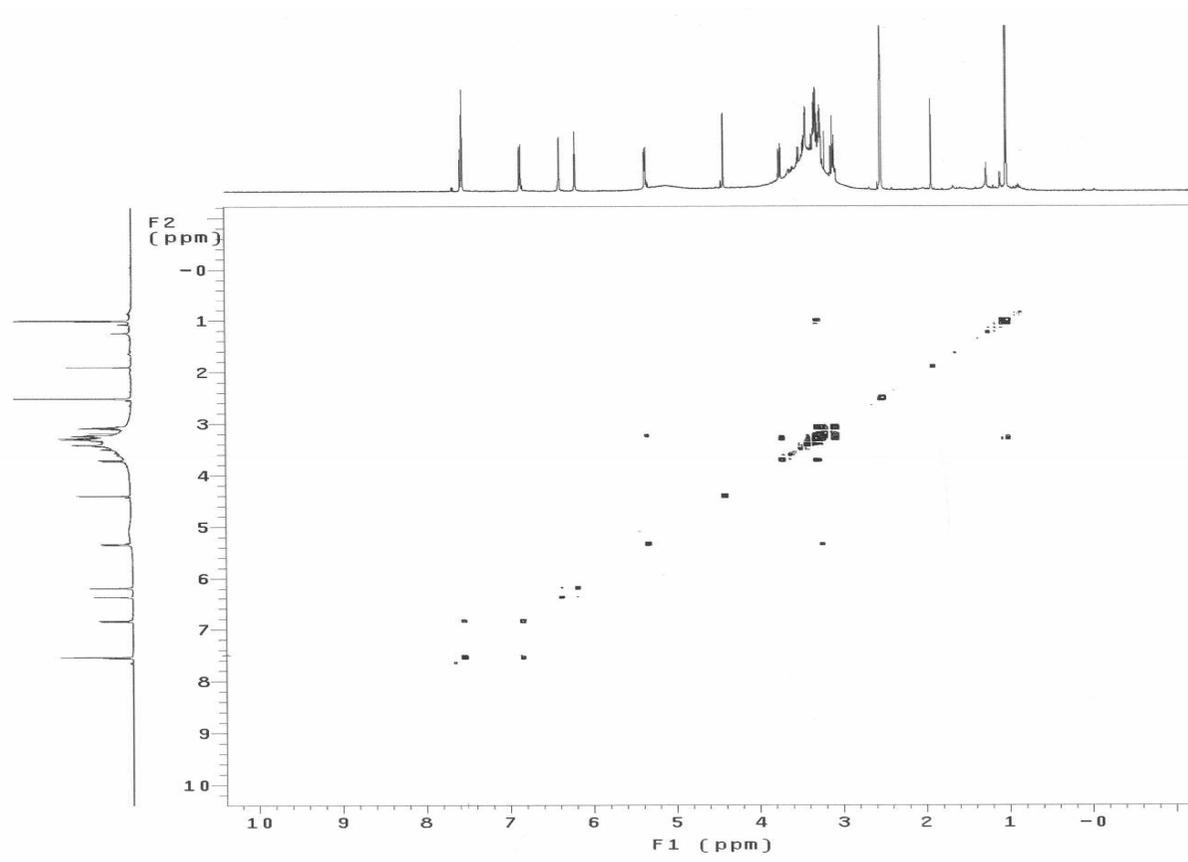


FIGURA 12B: AL-144-01, COSY (DMSO-d6)

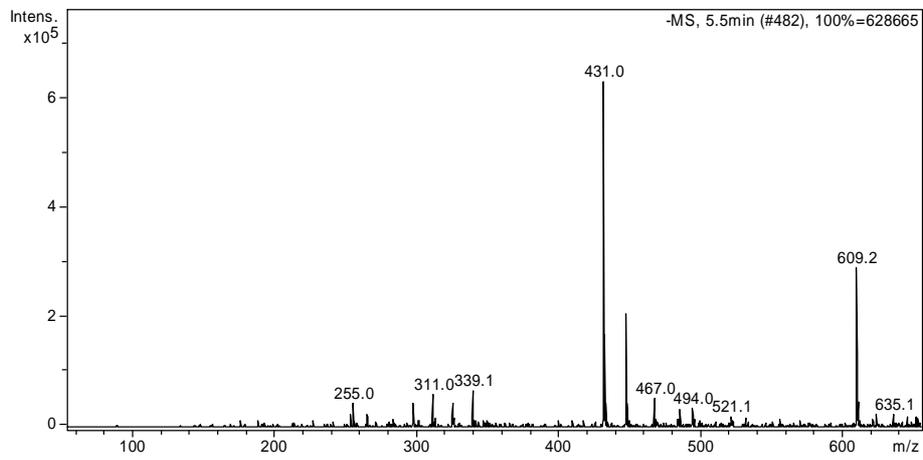


FIGURA 13B: AL-144-01, MS¹ (609=M-1)

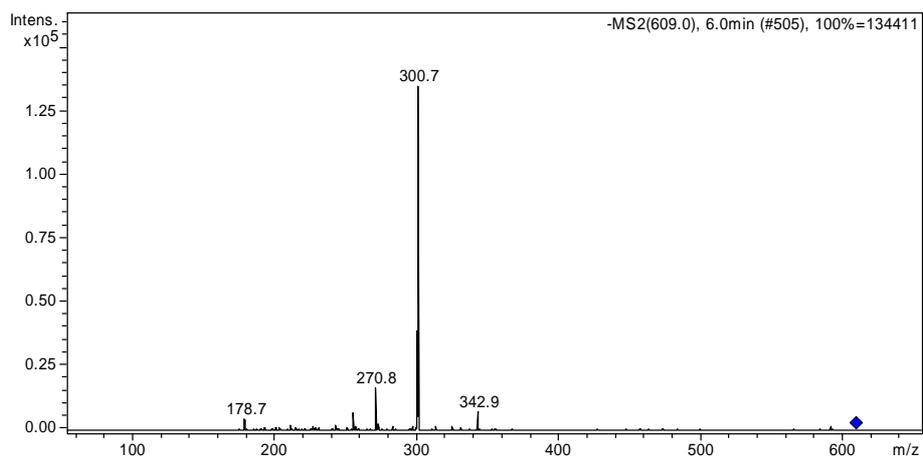


FIGURA 14B: AL-144-01, MS² (301=M-1-309)

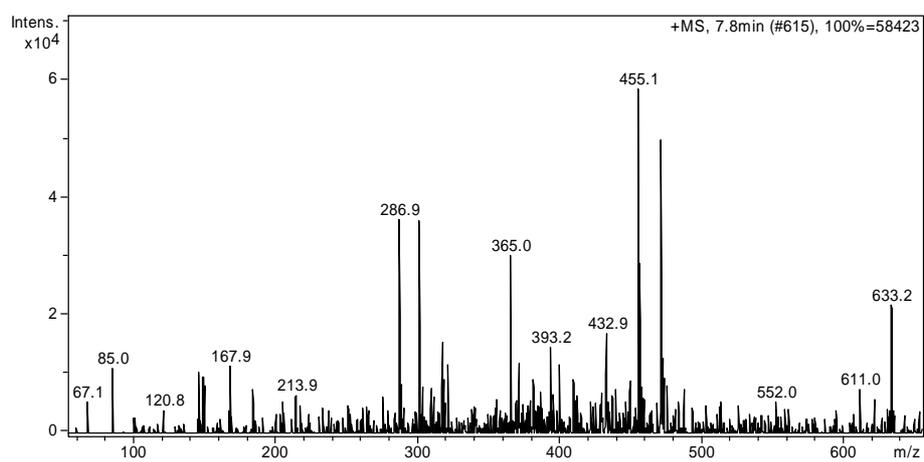


FIGURA 15B: AL-144-01, MS¹ (633=M+Na⁺)