

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTIVIRAL DE  
*Mimosa xanthocentra* (MIMOSACEAE), UMA PLANTA DA  
DIETA DE CERVÍDEOS NO PANTANAL**

**Luiza Maria de Magalhães Camargo**

**Rio de Janeiro**

**2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

**Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais**

Bloco H, CCS, Cidade Universitária

21 941-902 Rio de Janeiro

"Composição química e potencial antiviral de *Mimosa xanthocentra*  
(Mimosaceae), uma planta da dieta de cervídeos no Pantanal"

**LUIZA MARIA DE MAGALHÃES CAMARGO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Sônia Soares Costa

Co-orientadora: Profa Dra Maria Teresa Villela Romanos

**Rio de Janeiro**

**Outubro, 2007**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais  
Bloco H, CCS, Cidade Universitária  
21 941-902 Rio de Janeiro

**"Composição química e potencial antiviral de *Mimosa xanthocentra* (Mimosaceae),  
uma planta da dieta de cervídeos no Pantanal"**

**LUIZA MARIA DE MAGALHÃES CAMARGO**

Dissertação submetida ao Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Rio de Janeiro, 30 de outubro de 2007.

Aprovada pelos Doutores:

---

Profa. Sônia Soares Costa  
NPPN - UFRJ (Presidente da Banca)

---

Prof. Massuo Jorge Kato  
Instituto de Química - USP

---

Profa. Norma Suely de Oliveira Santos  
Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes - UFRJ

---

Profa. Luzineide Wanderley Tinoco  
NPPN - UFRJ

---

Prof. Ricardo Machado Kuster  
NPPN - UFRJ (Suplente)

Camargo, Luiza Maria de Magalhães.

Composição química e potencial antiviral de *Mimosa xanthocentra* (Mimosaceae), uma planta da dieta de cervídeos no Pantanal/Luiza Maria de Magalhães Camargo. Rio de Janeiro:UFRJ/ NPPN, 2007.

XXII,198f.:il.; 31 cm.

Orientadora: Sônia Soares Costa

Co-orientadora: Maria Teresa Villela Romanos

Dissertação (mestrado) - UFRJ, NPPN, Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, 2007.

1. *Mimosa xanthocentra*. 2. Mimosaceae. 3. Pantanal. 4. Cervídeo. 5. Dieta. 6. Flavonóides. 7. Flavonas C-glicosídicas. 8. Isovitexina-2"-O-ramnopiranosídeo. 9. Vitexina-2"-O-ramnopiranosídeo. 10. Avicularina. 11. Reinoutrina. 12. Rotâmeros. 13. Atividade antiviral. 14. Sinergismo. 15. HSV-1. 16. HSV-2. 17. BHV-1. 18. SHV-1. 19: Polissacarídeo. 20. Ciclitol I. Costa, Sônia Soares. II. Romanos, Maria Teresa Villela. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais. IV. Título.

*A Deus, por ter me dado força e coragem durante toda a minha trajetória acadêmica, não me deixando nunca desistir de meus objetivos.*

*Aos meus queridos pais, Carlos Eugênio A. Camargo e  
Julieta Maria M. Camargo, pelo amor, força, carinho e  
formação; por terem me acompanhado e incentivado.*

*À professora Sônia Soares Costa, pela orientação, dedicação, carinho, ensinamentos e exemplo de profissionalismo, que tanto contribuíram para minha formação.*

*À professora Maria Teresa Villela Romanos pela orientação, ensinamentos e por ter me acolhido com carinho em seu laboratório.*

## AGRADECIMENTOS

- ❑ Aos professores Massuo Jorge Kato (USP), Norma Suely de O. Santos (UFRJ), Luzineide W. Tinoco (UFRJ) e Ricardo Machado Kuster (UFRJ) por terem aceitado fazer parte da banca examinadora desta dissertação de mestrado.
- ❑ A Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida durante a realização deste trabalho.
- ❑ Ao professor Luiz Flamarion Barbosa de Oliveira (MN-UFRJ) pela parceria no projeto pioneiro sobre o perfil químico e as possíveis implicações de substâncias envolvidas no binômio cervídeo-planta, na RPPN-SESC Pantanal. Esta dissertação é um desdobramento dessa colaboração.
- ❑ Ao SESC, na pessoa do Dr. Leopoldo Brandão, pelo apoio financeiro ao Projeto "Avaliação do Potencial Antiviral de Plantas Componentes da Dieta de Cervídeos na RPPN-SESC Pantanal", coordenado pela Profa. Sônia S. Costa, no qual se inseriu parte desta dissertação.
- ❑ À bióloga Anieli M. Manco e à Profa Sônia S. Costa pela coleta do material vegetal.
- ❑ À Dra. Daniela Barros de Oliveira pela preparação dos extratos vegetais e colaboração no início desse trabalho. Também pela amizade e carinho.
- ❑ À Dra. Isabela Cristina Simoni (Instituto Biológico, SP) pela parceria e colaboração em parte dos ensaios de atividade antiviral.
- ❑ Ao professor Carlos Roland Kaiser (Instituto de Química, UFRJ) pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.
- ❑ Ao Dr. Jean-Pierre Férézou (DCSO, Ecole Polytechnique, Palaiseau, França) pela realização do trabalho de modelagem molecular.
- ❑ À Dra Marli Pires Morim e Luis Fernando da Conceição (Jardim Botânico, RJ) pela foto da exsicata de *M. xanthocentra*.
- ❑ Aos professores do NPPN que contribuíram para minha formação.
- ❑ À professora Sônia Ubatuba pelo carinho e constante disponibilidade ao longo deste trabalho.
- ❑ A Coordenação de Ensino de Pós-Graduação do NPPN pelo apoio prestado.
- ❑ Aos técnicos Camila Barros de Oliveira Mansur, Francisco de Assis Vieira dos Santos e Gisele de Oliveira Siqueira (Central Analítica - NPPN) pela realização de alguns espectros de RMN, utilização do CLAE-UV e amizade.

- ❑ Aos funcionários do NPPN pelas gentilezas, em especial à Juliana da Conceição de Andrade.
- ❑ Ao colega de pós-graduação Cléber Bomfim Barreto Junior pela realização dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de **MxF3**.
- ❑ Aos doutorandos Maria Fernanda Paresqui Corrêa e Douglas Siqueira de Almeida Chaves pela amizade, momentos de descontração, disponibilidade e palavras de incentivo.
- ❑ À Dra. Angélica Ribeiro Soares pela amizade, carinho, incentivo e conhecimento transmitido.
- ❑ Às doutoras Giany Oliveira de Melo e Michelle Frazão Muzitano pela amizade, disponibilidade, incentivo e colaboração.
- ❑ Aos mestrandos Fabio Teixeira e Fernanda do Nascimento José pela companhia, palavras de incentivo e carinho.
- ❑ Às alunas de Iniciação Científica Carolina Soto Vargas e Fernanda Gouvêa Gomes pela amizade, carinho, alegria e grande ajuda na realização dessa dissertação.
- ❑ A todos os alunos de Iniciação Científica que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos (LPN-Bio), em especial à Luciana Santos de Oliveira e Isabel Cristina V. Silva que muito contribuíram para o clima familiar de nossa equipe.
- ❑ Aos colegas de laboratório do LEDAC (IMPPG, UFRJ) Gabriela S. Mendes, Marcela Cristina S. Robaína e Fernanda O. Martins pela disponibilidade, ajuda e carinho com que me acolheram durante a realização dos ensaios antivirais.
- ❑ A todos os colegas Pós-graduandos do NPPN, em especial Daniel Pais Pires Vieira, Camilla Djenne Buarque Muller, Chaquip Daher, Osman Feitos da Silva e Ricardo Moreira Borges pela ajuda, pelas palavras de incentivo e brincadeiras.
- ❑ Ao meu querido irmão João Pedro M. Camargo pelo amor, carinho e brincadeiras que deixaram minha vida mais alegre e menos tensa neste momento tão importante e decisivo.
- ❑ A toda minha família, em especial meus avós e minha madrinha pelo carinho, apoio e por sempre me incluírem em suas orações.
- ❑ As minhas queridas amigas, em especial Júlia Peralta Gonçalves e Juliana de Castro Brasil, pelo incentivo, momentos de descontração e por estarem sempre presentes nos momentos difíceis.
- ❑ A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, o meu sincero agradecimento.

## ÍNDICE GERAL

Índice da Dissertação	XII
Índice de Esquemas	XIII
Índice de Espectros	XIV
Índice de Figuras	XVI
Índice de Tabelas	XVIII
Lista de Abreviaturas	XIX
Resumo	XXI
Abstract	XXII

<b>APRESENTAÇÃO</b>	01
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	03
Aspectos gerais do Pantanal	04
Escolha do material vegetal e alvo biológico	06
O gênero <i>Mimosa</i> L.	10
A espécie <i>Mimosa xanthocentra</i> Mart.	14
Os Cervídeos	24
Nova ferramenta para a busca de substâncias bioativas	29
<b>Referências bibliográficas</b>	31
<b>OBJETIVOS</b>	38
<b>CAPÍTULO I: ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>M. xanthocentra</i></b>	40
Introdução	41
Materiais e Métodos	48
Elucidação Estrutural de <b>MxF1</b>	61
Elucidação Estrutural de <b>MxF2</b>	77
Atropoisomerismo em flavonas C-glicosiladas	90
Elucidação Estrutural de <b>MxF3</b>	98
<b>Referências bibliográficas</b>	116
<b>CAPÍTULO II: ATIVIDADE ANTIVIRAL DE <i>M. xanthocentra</i></b>	121
Introdução	122
Materiais e Métodos	137
Atividade antiviral e identificação de substâncias ativas	147
Atividade anti-HSV de isovitexina-2"- <i>O</i> -ramnopiranosídeo	169
Estudo de sinergismo em <i>M. xanthocentra</i>	176
<b>Referências bibliográficas</b>	186
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	196
<b>ANEXO</b>	A
Perfil químico por CLAE-UV	B
Perfil químico por RMN	I

## ÍNDICE DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1:</b> Partição do extrato aquoso com solventes orgânicos	49
<b>Esquema 2:</b> Fracionamento de <b>MxEA</b>	52
<b>Esquema 3:</b> Fracionamento de <b>MxBu</b>	53
<b>Esquema 4:</b> Fracionamento de <b>MxBu3</b>	54
<b>Esquema 5:</b> Fracionamento de <b>MxBu2'</b> e isolamento de <b>MxF1</b>	55
<b>Esquema 6:</b> Fracionamento de <b>MxBu2'B</b>	56
<b>Esquema 7:</b> Marcha para isolamento de <b>MxF2</b>	57
<b>Esquema 8:</b> Fracionamento de <b>MxBu4</b>	58
<b>Esquema 9:</b> Fracionamento de <b>MxBuFU</b>	58
<b>Esquema 10:</b> Fracionamento de <b>MxAc</b>	59
<b>Esquema 11:</b> Marcha para isolamento de <b>MxF3</b>	60
<b>Esquema 12:</b> Resumo esquemático do processo de preparação e fracionamento do extrato aquoso de <i>M. xanthocentra</i>	137
<b>Esquema 13:</b> Fracionamento de <b>MxAq</b>	140

## ÍNDICE DE ESPECTROS

<b>Espectro 1:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	61
<b>Espectro 2:</b> Expansão da região entre 6,0 - 8,0 ppm do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	62
<b>Espectro 3:</b> Expansão da região entre zero - 5,0 ppm do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	64
<b>Espectro 4:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	66
<b>Espectro 5:</b> Expansão da região entre 190 - 115 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	67
<b>Espectro 6:</b> Expansão da região entre 110 - 60 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (75 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	67
<b>Espectro 7:</b> Espectro de DEPT 135 (75 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	68
<b>Espectro 8:</b> Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	69
<b>Espectro 9:</b> Expansão da região entre zero - 5,0 ppm do espectro de RMN 2D COSY (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	70
<b>Espectro 10:</b> Espectro de RMN 2D HMQC (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	71
<b>Espectro 11:</b> Expansão da região entre 2,0 - 5,0 ppm do espectro de RMN 2D HMQC (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	71
<b>Espectro 12:</b> Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	72
<b>Espectro 13:</b> Expansão da região entre 120 - 180 ppm do espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	73
<b>Espectro 14:</b> Expansão da região entre 130 - 100 ppm do espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	73
<b>Espectro 15:</b> Expansão da região entre 30 - 80 ppm do espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF1</b>	74
<b>Espectro 16:</b> Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	77
<b>Espectro 17:</b> Expansão da região entre 6,0 - 8,0 ppm do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	78
<b>Espectro 18:</b> Expansão da região entre zero - 5,0 ppm do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	80
<b>Espectro 19:</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	81
<b>Espectro 20:</b> Expansão da região entre 180 - 114 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	81
<b>Espectro 21:</b> Expansão da região entre 110 - 18 ppm do espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (100 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	82
<b>Espectro 22:</b> Espectro de RMN 2D COSY (400 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	83
<b>Espectro 23:</b> Expansão da região entre 2,8 - 5,0 ppm do espectro de RMN 2D COSY (400 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	84
<b>Espectro 24:</b> Espectro de RMN 2D HSQC-ED (400 MHz; DMSO- $d_6$ ) de <b>MxF2</b>	85

<b>Espectro 25:</b> Expansão da região entre 2,8 - 4,2 ppm do espectro de RMN 2D HSQC-ED (400 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF2</b>	85
<b>Espectro 26:</b> Espectro de RMN 2D HMBC (400 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF2</b>	86
<b>Espectro 27:</b> Expansão da região entre 8,0 - 4,6 ppm do espectro de RMN 2D HMBC (400 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF2</b>	87
<b>Espectro 28:</b> Expansão da região entre 4,4 - 2,2 ppm do espectro de RMN 2D HMBC (400 Hz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF2</b>	87
<b>Espectro 29:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) a (A) 60° C e (B) 22° C de <b>MxF1</b>	93
<b>Espectro 30:</b> Expansão da região entre 0,7 - 0,4 ppm do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) à 22° C de <b>MxF1</b>	94
<b>Espectro 31:</b> Espectro de DEPT 135 (75 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) a (A) 60° C e (B) 22° C de <b>MxF1</b>	95
<b>Espectro 32:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	98
<b>Espectro 33:</b> Expansão da região entre 6,0 - 8,0 ppm do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	99
<b>Espectro 34:</b> Expansão da região entre 2,4 - 6,0 ppm do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	101
<b>Espectro 35:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (75 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	102
<b>Espectro 36:</b> Espectro de DEPT 135 (75 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	104
<b>Espectro 37:</b> Espectro de RMN 2D COSY (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	105
<b>Espectro 38:</b> Expansão da região entre 8,0 - 6,0 ppm do espectro de RMN 2D COSY (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	105
<b>Espectro 39:</b> Expansão da região entre 6,0 - 2,0 ppm do espectro de RMN 2D COSY (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	106
<b>Espectro 40:</b> Espectro de RMN 2D HMQC (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	107
<b>Espectro 41:</b> Expansão da região entre 8,0 - 5,0 ppm do espectro de RMN 2D HMQC (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	108
<b>Espectro 42:</b> Expansão da região entre 4,6 - 2,7 ppm do espectro de RMN 2D HMQC (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	109
<b>Espectro 43:</b> Espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	110
<b>Espectro 44:</b> Expansão da região entre 8,0 - 5,0 ppm do espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	111
<b>Espectro 45:</b> Expansão da região entre 5,0 - 2,5 ppm do espectro de RMN 2D HMBC (300 MHz; DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub> ) de <b>MxF3</b>	111
<b>Espectro 46:</b> Espectro de IV de <b>MxIn</b>	158
<b>Espectro 47:</b> Espectro de IV de <b>MxAq/PT</b>	161
<b>Espectro 48:</b> Espectro de IV de <b>MxAq/SN</b>	164
<b>Espectro 49:</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (50 MHz; D <sub>2</sub> O) de <b>MxAq/SN</b>	165
<b>Espectro 50:</b> Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (200 MHz; D <sub>2</sub> O) de <b>MxAq/SN</b>	166

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Localização geográfica e delimitações das sub-regiões do Pantanal Matogrossense	04
<b>Figura 2:</b> Cobertura vegetal na área de abrangência da RPPN SESC Pantanal, município de Barão de Melgaço/MT	06
<b>Figura 3:</b> Uso em medicina popular de espécies vegetais pertencentes aos gêneros das plantas da dieta dos cervídeos	07
<b>Figura 4:</b> Foto <i>Mimosa</i> sp.	11
<b>Figura 5:</b> Foto do fechamento dos folíolos de <i>M. pudica</i> após o toque	12
<b>Figura 6:</b> Estrutura dos fatores de movimento responsáveis pelo nictinastismo de <i>M. pudica</i>	13
<b>Figura 7:</b> Estrutura das substâncias responsáveis pelo tigonastismo em <i>M. pudica</i>	13
<b>Figura 8:</b> Foto da exsicata de <i>Mimosa xanthocentra</i> (Jardim Botânico, RJ).	14
<b>Figura 9:</b> Distribuição de espécies de <i>Mimosa xanthocentra</i> pela América do Sul	15
<b>Figura 10:</b> Aplicações etnomedicinais de plantas pertencentes ao gênero <i>Mimosa</i> L.	16
<b>Figura 11:</b> Estrutura dos alcalóides, com atuação no SNC, encontrados em <i>Mimosa</i> L.	20
<b>Figura 12:</b> Foto do veado-campeiro (à esquerda) e cervo-do-pantanal (à direita)	24
<b>Figura 13:</b> Alguns esqueletos básicos de flavonóides	42
<b>Figura 14:</b> Rota biossintética de flavonas e flavonóis	43
<b>Figura 15:</b> Rota biossintática da isovitexina (6-C-glucosilapigenina)	44
<b>Figura 16:</b> Estruturas das agliconas de flavonas e flavonóis encontradas em espécies de <i>Mimosa</i>	47
<b>Figura 17:</b> Estrutura da aglicona de <b>MxF1</b>	63
<b>Figura 18:</b> Estrutura de <b>MxF1</b>	75
<b>Figura 19:</b> Estrutura da aglicona de <b>MxF2</b>	79
<b>Figura 20:</b> Estrutura de <b>MxF2</b>	88
<b>Figura 21:</b> Estruturas das flavonas <b>A-I</b>	91
<b>Figura 22:</b> Dois confôrmeros de spinosina obtidos através de modelagem molecular (CS Chem 3D Pro)	96
<b>Figura 23:</b> Dois confôrmeros de isovitexina-2"-O-ramnopiranosídeo ( <b>MxF1</b> ) obtidos através de modelagem molecular	96
<b>Figura 24:</b> Estruturas das flavonas 8-C-glicosiladas relatadas por RAYYAN <i>et al.</i> , 2005	97
<b>Figura 25:</b> Estrutura da aglicona de <b>MxF3</b>	100
<b>Figura 26:</b> Estrutura de <b>MxF3A</b>	112
<b>Figura 27:</b> Estrutura de <b>MxF3B</b>	114
<b>Figura 28:</b> Modelo esquemático da partícula de HSV	123
<b>Figura 29:</b> Esquema das etapas de replicação Viral	124
<b>Figura 30:</b> Agentes anti-herpesvírus em uso clínico aprovados pelo FDA (Food & Drug Administration)	132

<b>Figura 31:</b> Estrutura da dipiranocumarina com atividade antiviral	134
<b>Figura 32:</b> Atividade antiviral de <b>MxEA</b> , frente aos quatro vírus testados, em porcentagem de inibição (PI)	148
<b>Figura 33:</b> Atividade antiviral de <b>MxIn</b> , <b>MxBu</b> , <b>MxAc</b> e <b>MxAq</b> frente aos quatro vírus testados, em porcentagem de inibição (PI)	154
<b>Figura 34:</b> Atividade antiviral de <b>MxAq</b> , <b>MxAq/PT</b> e <b>MxAq/SN</b> frente aos quatro vírus testados, em porcentagem de inibição (PI)	160
<b>Figura 35:</b> Estruturas do <i>myo</i> -inositol e demais ciclitóis monometoxilados	167
<b>Figura 36:</b> Atividade antiviral de <b>MxF1</b> frente ao HSV-1 e HSV-2, em porcentagem de inibição (PI)	170
<b>Figura 37:</b> Estruturas dos flavonóides do bálsamo de própolis com atividade anti-HSV	170
<b>Figura 38:</b> Estruturas dos glicosídeos de flavonol com atividade em vírus herpes	171
<b>Figura 39:</b> Estruturas das metoxiflavonas e furanoflavonas com atividade anti-HSV	172
<b>Figura 40:</b> Estruturas das bisflavonas com atividade anti-HSV	173
<b>Figura 41:</b> Estruturas das flavanonas e flavanas com atividade anti-HSV	174
<b>Figura 42:</b> Estruturas da quercetina, hesperitina e catquina	174
<b>Figura 43:</b> Estruturas das chalconas com atividade anti-HSV	175
<b>Figura 44:</b> Citotoxicidade de <b>MxEA</b> , suas frações e combinações binárias de frações, em relação à CMNT	178
<b>Figura 45:</b> Atividade antiviral de <b>MxIn</b> , <b>MxBu</b> , <b>MxAc</b> , <b>MxAq</b> e suas combinações binárias frente ao HSV-1, em porcentagem de inibição (PI)	179
<b>Figura 46:</b> Atividade antiviral (em Porcentagem de Inibição; PI) de <b>MxIN</b> , <b>MxBu</b> , <b>MxAc</b> , <b>MxAq</b> e sua combinações binárias frente ao HSV-2	180
<b>Figura 47:</b> Estruturas de alguns flavonóides com atividade sinérgica comprovada	182

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Plantas da dieta de cervos-do-pantanal e veados-campeiros na RPPN-SESC Pantanal e resultados gerais dos ensaios antivirais obtidos para os extratos das plantas da dieta dos cervídeos testados nas respectivas concentrações máxima não tóxicas (CMNT)	09
<b>Tabela 2:</b> Espécies de <i>Mimosa</i> com uso etnomedicinal e suas aplicações	18
<b>Tabela 3:</b> Principais patógenos que acometem cervídeos e incidência em outros hospedeiros	26
<b>Tabela 4:</b> Dados da coleta e preparação dos extratos aquosos de <i>M. xanthocentra</i>	51
<b>Tabela 5:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>MxF1</b> (DMSO- $d_6$ ). <b>A</b> e <b>B</b> referem-se, respectivamente, aos isômeros majoritário e minoritário	76
<b>Tabela 6:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>MxF2</b> (DMSO- $d_6$ )	89
<b>Tabela 7:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>MxF3A</b> (DMSO- $d_6$ )	113
<b>Tabela 8:</b> Dados de RMN de $^1\text{H}$ (300 MHz) e $^{13}\text{C}$ (75 MHz) de <b>MxF3B</b> (DMSO- $d_6$ )	115
<b>Tabela 9:</b> Principais características fisiopatológicas e clínicas das infecções por HSV	127
<b>Tabela 10:</b> Alvos terapêuticos virais e/ou mecanismo de ação de metabólitos de origem vegetal	135
<b>Tabela 11:</b> Proporções e concentração de cada fração nas combinações obtidas a partir de <b>MxIN</b> , <b>MxBu</b> , <b>MxAc</b> e <b>MxAq</b>	141
<b>Tabela 12:</b> Resultados gerais dos ensaios de citotoxicidade e antivirais obtidos para <b>MxEA</b> testado nas respectivas CMNT	147
<b>Tabela 13:</b> Plantas utilizadas na medicina popular com atividade anti-HSV	150
<b>Tabela 14:</b> Resultados dos ensaios de citotoxicidade para <b>MxIn</b> , <b>MxBu</b> , <b>MxAc</b> e <b>MxAq</b>	153
<b>Tabela 15:</b> Resultados gerais dos ensaios antivirais obtidos para <b>MxIn</b> , <b>MxBu</b> , <b>MxAc</b> e <b>MxAq</b> testadas nas respectivas CMNT	154
<b>Tabela 16:</b> Resultados dos ensaios de citotoxicidade para <b>MxAq/PT</b> e <b>MxAq/SN</b>	159
<b>Tabela 17:</b> Resultados dos ensaios antivirais obtidos para <b>MxAq/PT</b> e <b>MxAq/SN</b> testadas nas respectivas concentração máxima não-tóxica (CMNT)	159
<b>Tabela 18:</b> Resultados gerais dos ensaios de citotoxicidade e antivirais obtidos para <b>MxF1</b> testado na respectiva concentração máxima não-tóxica (CMNT)	169
<b>Tabela 19:</b> Resultados gerais dos ensaios de citotoxicidade e antivirais obtidos para as seis combinações de <b>MxIn</b> , <b>MxBu</b> , <b>MxAc</b> e <b>MxAq</b> , testado nas respectivas CMNT	177

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>2D</b>	bidimensional
<b><math>\alpha</math>-TIF</b>	$\alpha$ -Trans Inducing Factor
<b>APG II</b>	Angiosperm Phylogeny Group II
<b>APT</b>	Attached Proton Test
<b>BAW</b>	<i>n</i> -butanol/Ácido acético/Água
<b>BEW</b>	Butanol/etanol/água
<b>BHV-1</b>	Bovine herpesvirus type 1
<b>CC50</b>	Cytotoxic Concentration
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>CMNT</b>	Concentração Máxima Não-tóxica
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy
<b>CPE</b>	Cytopathogenic Effect
<b>DMSO-<i>d</i><sub>6</sub></b>	Hexadeuteriodimetil-sulfóxido
<b>DST</b>	Doença sexualmente transmissível
<b>FBN</b>	Fixação Biológica de Nitrogênio
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple-Bond Correlation Spectroscopy
<b>HMQC</b>	Heteronuclear Multiple-Quantum Coherence Experiment
<b>HSQC-ED</b>	Heteronuclear Single Quantum Coherence-Editing
<b>HSV</b>	Herpes simplex vírus
<b>HSV-1</b>	Herpes simplex vírus type 1
<b>HSV-2</b>	Herpes simplex vírus type 2
<b>IIV</b>	Índice de inibição viral
<b>IMPPG</b>	Instituto de Microbiologia professora Paulo de Góes
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>LEDAC</b>	Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas
<b>LPN-Bio</b>	Laboratório de Química de produtos Naturais Bioativos
<b>MEM</b>	Meio mínimo essencial
<b>MT</b>	Mato Grosso
<b>NPPN</b>	Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais
<b>PI</b>	Porcentagem de inibição
<b>PNE</b>	Parque Nacional das Emas
<b>RMN de <sup>13</sup>C</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono 13
<b>RMN de <sup>1</sup>H</b>	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

<b>RMN</b>	Ressonância Magnética Nuclear
<b>RP</b>	Reverse Phase
<b>RPPN</b>	Reserva Particular do Patrimônio Natural
<b>RSV</b>	Respiratory Syncytial virus
<b>SESC</b>	Serviço Social do Comércio
<b>SFB</b>	Soro fetal bovino
<b>SHV-1</b>	Suid herpesvirus type 1
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TCID</b>	Tissue culture infectious dose
<b>T<sub>R</sub></b>	tempo de retenção
<b>UFPR</b>	Universidade Federal do Paraná
<b>UFRJ</b>	Universidade Federal do Rio de Janeiro
<b>USP</b>	Universidade de São Paulo
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VHS</b>	Virion Host-Shutoff

## RESUMO

### Estudo químico e potencial antiviral de *Mimosa xanthocentra* (Mimosaceae), uma planta da dieta de cervídeos no Pantanal

LUIZA MARIA DE MAGALHÃES CAMARGO

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Sônia Soares Costa

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Maria Teresa Villela Romanos

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

*Mimosa xanthocentra* Mart. (dorme-dorme) é uma planta herbácea - pertencente a um gênero medicinal e utilizada na dieta de dois mamíferos ameaçados de extinção no Pantanal (cervos-do-pantanal e veados-campeiros) - para a qual não existem relatos de estudos químicos e biológicos. O presente estudo teve como objetivos conhecer a composição química e avaliar os possíveis efeitos benéficos, *in vitro*, que poderiam surgir da ingestão dessa planta pelos cervídeos, tendo como enfoque viroses de importância humana e veterinária.

O estudo fitoquímico de *M. xanthocentra* levou à identificação de quatro flavonóides. Foram isoladas duas flavonas, isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo e vitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo, e uma mistura dos flavonóis avicularina e reinoutrina. Exceto pela avicularina, este é o primeiro relato dos demais flavonóides na família Mimosaceae. A isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo apresentou-se sob a forma de rotâmeros em solução de DMDO-*d*<sub>6</sub>, cujas conformações diferem essencialmente no arranjo da unidade dissacarídica em relação ao plano do esqueleto da aglicona. A elucidação estrutural dos flavonóides baseou-se nas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, mono e bidimensionais.

O extrato aquoso de *M. xanthocentra* (**MxEA**) foi avaliado quanto à atividade antiviral, sendo possível evidenciar uma ação inibitória frente a HSV-1, HSV-2, SHV-1 e BHV-1. O fracionamento monitorado pelo ensaio antiviral permitiu a identificação de substâncias de classes químicas diferentes - flavonóides e carboidratos - contribuindo para a atividade antiviral, com destaque para a atividade anti-HSV-1 de isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo (200 µg/ml; 87,4% de inibição). Adicionalmente, verificou-se uma ação sinérgica entre as substâncias presentes em **MxEA**, o que poderia resultar em efeitos benéficos através do uso dessa espécie vegetal pelos cervídeos. Este é o primeiro relato de atividade antiviral no gênero *Mimosa* e de atividade anti-HSV de isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo.

Os resultados obtidos contribuíram para o conhecimento da composição química e do potencial terapêutico de *M. xanthocentra*. Este trabalho reflete uma abordagem inovadora e otimista ao buscar substâncias bioativas em uma planta pertencente à dieta de mamíferos não-primatas e sem relato de uso medicinal.

**Palavras-chave:** *Mimosa xanthocentra*; Mimosaceae; Pantanal; cervídeos; dieta; flavonóides; flavonas C-glicosídicas; isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo; vitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo; avicularina; reinoutrina; rotâmeros; atividade antiviral; sinergismo; HSV-1; HSV-2; BHV-1; SHV-1; polissacarídeos; ciclitol.

Rio de Janeiro

Outubro, 2007

## ABSTRACT

### Chemical study and antiviral potential of *Mimosa xanthocentra* (Mimosaceae), a plant composing the diet of deer in the Pantanal wetland

LUIZA MARIA DE MAGALHÃES CAMARGO

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Sônia Soares Costa

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup> Maria Teresa Villela Romanos

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao programa de Pós-graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

*Mimosa xanthocentra* Mart. (dorme-dorme) - an herbaceous plant that belongs to a medicinal genus and is consumed by two endangered mammals in Pantanal wetland (marsh deer and pampas deer) - was never studied before. The present work aims to investigate the chemical composition and evaluate the beneficial effect of this plant consumption by those animals, through the *in vitro* assessment of the antiviral activity against viruses pathogenic for men and animals.

The phytochemical investigation of *M. xanthocentra* led to the identification of four flavonoids. Two flavones, isovitexin-2"-*O*-rhamnopyranoside and vitexin-2"-*O*-rhamnopyranoside, and a mixture of the flavonol glycosides avicularin and reynoutrin were isolated. Except for avicularin, this work describes the first report of these flavonoids in Mimosaceae. The flavone isovitexin-2"-*O*-rhamnopyranoside was detected as two rotamers in DMSO-*d*<sub>6</sub>'s solution and a preliminary conformational analysis showed that their structures differ on the spatial arrangement of the disaccharide part. The structures of flavonoids were elucidated on the basis of spectroscopic <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data, including two-dimensional techniques.

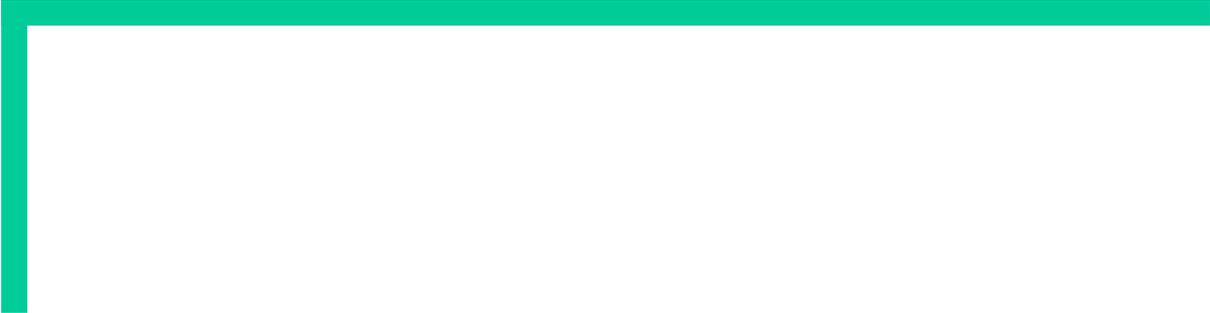
The effect of *M. xanthocentra* aqueous extract (**MxEA**) on the infectivity of herpes viruses was evaluated. **MxEA** was capable to inhibiting HSV-1, HSV-2, SHV-1 and BHV-1. The bioassay fractionation led to the identification of two distinct chemical classes (flavonoids and carbohydrates) of antiviral agents. The most interesting result was due to isovitexin-2"-*O*-rhamnopyranoside, which causes 87.4 % (200 µg/ml) of inhibition on HSV-1. Furthermore, the synergistic action between **MxEA**'s compounds was detected, which could result in benefits for the continuous use of this plant by both deer. This is the first report of antiviral activity for a *Mimosa* specie as well as for isovitexin-2'-*O*-rhamnopyranoside.

The results presented here contributed to the knowledge of the chemistry and the therapeutic potential of *M. xanthocentra*. This study reflects an innovative and hopeful approach in the search of bioactive compounds from a plant composing the diet of a non-primate mammal, without use in folk medicine.

**Key-words:** *Mimosa xanthocentra*; Mimosaceae; Pantanal wetland; deer; diet; flavonoids; flavone C-glycoside; isovitexin-2"-*O*-rhamnopyranoside; vitexin-2"-*O*-rhamnopyranoside; avicularin; reynoutrin; rotamers; antiviral activity; synergism; HSV-1; HSV-2; BHV-1; SHV-1; polysaccharides; cyclitol

Rio de Janeiro

Outubro, 2007



# *Apresentação*

---



Esta dissertação possui caráter interdisciplinar e tem como enfoque a espécie *Mimosa xanthocentra* (Mimosaceae), uma planta consumida pelos cervos-do-pantanal e veados-campeiros e até então nunca estudada. Através desse trabalho pretende-se conhecer a composição química dessa espécie vegetal e explorar, *in vitro*, os potenciais efeitos benéficos que poderiam surgir de sua ingestão pelos cervídeos.

Para efeito didático, os resultados aqui apresentados encontram-se divididos em dois capítulos, precedidos de uma **Introdução Geral**. Cada capítulo é composto de uma introdução, seguida pela descrição dos métodos empregados, resultados obtidos e discussão sobre os mesmos. As referências bibliográficas utilizadas são listadas no final de cada capítulo. As figuras, gráficos e tabelas encontram-se no decorrer de seus respectivos textos.

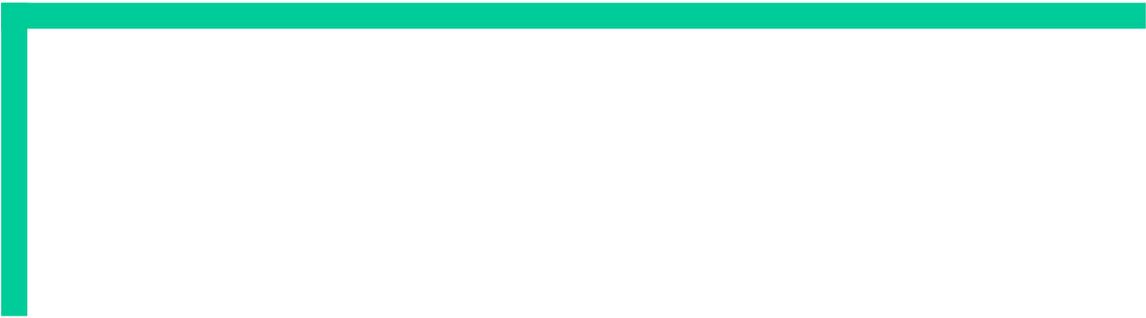
Na **Introdução Geral** são abordados os aspectos botânicos e etnomedicinais de *Mimosa xanthocentra* e do gênero *Mimosa*, além da descrição de seu habitat. Adicionalmente, esta seção relata a aplicabilidade de espécies de *Mimosa* na veterinária e agricultura, bem como a inserção dessas plantas no contexto dos cervídeos.

O **Capítulo I** aborda os aspectos químicos do gênero *Mimosa* e descreve o processo de identificação, isolamento e elucidação estrutural de quatro flavonóides obtidos a partir do decocto das partes aéreas de *M. xanthocentra*.

O **Capítulo II** é dedicado aos ensaios antivirais e à identificação de substâncias bioativas em *M. xanthocentra*. Busca-se nesta seção conhecer os eventuais efeitos benéficos que poderiam surgir do consumo dessa espécie, tendo como enfoque vírus de importância humana e veterinária.

As **Considerações Finais** concluem o trabalho e abordam algumas perspectivas futuras.

Esta dissertação é encerrada por um **ANEXO** constituído dos cromatogramas e espectros de RMN utilizados para análise do perfil químico.



## *Introdução Geral*

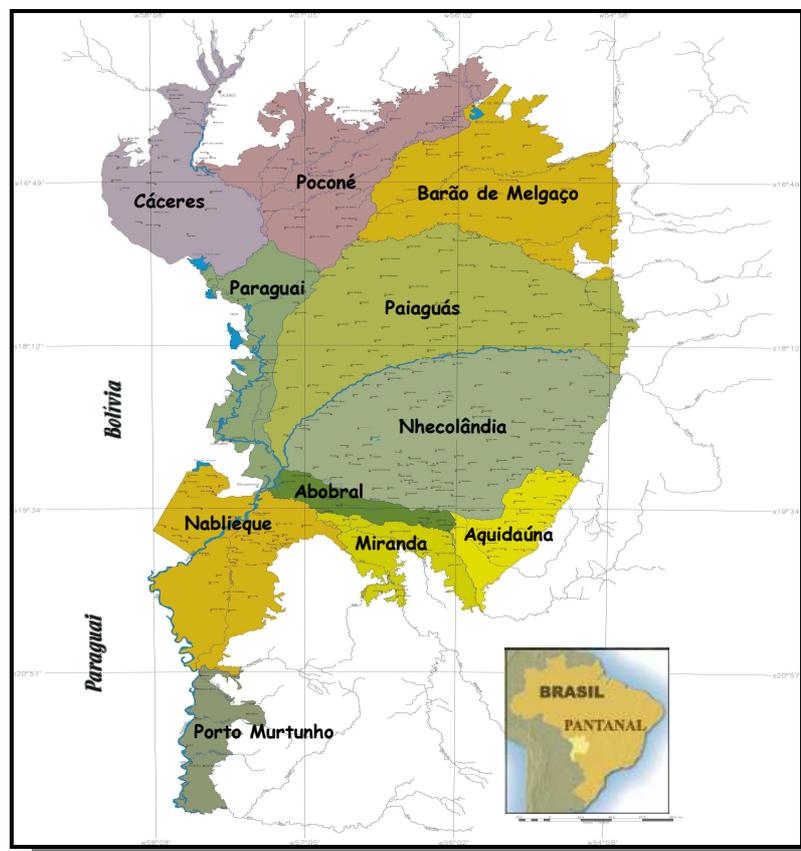
---



## ASPECTOS GERAIS DO PANTANAL

O Pantanal, reconhecido pela UNESCO como Reserva da Biosfera, é considerado um dos ecossistemas mais importantes, não somente pela sua biodiversidade, mas também pela sua produtividade natural (POLIDO & SARTORI, 2007). Constitui uma das maiores áreas alagáveis contínuas do planeta, cobrindo aproximadamente 140 000 km<sup>2</sup> da Bacia do Alto Paraguai e seus tributários, compartilhados por Brasil, Bolívia e Paraguai (JUNK *et al.*, 2006). No Brasil, estima-se que 64 % do Pantanal estejam situados no Estado do Mato Grosso do Sul e 36 % no Mato Grosso (CORRÊA, 2007).

A vegetação é heterogênea e influenciada por quatro biomas: Floresta Amazônica, Cerrado (predominante), Chaco e Floresta Atlântica (HARRIS *et al.*, 2005). Diferentes habitats, tipos de solos e regimes de inundação são responsáveis pela grande variedade de formações vegetais e pela heterogeneidade da paisagem, delimitando o Pantanal em onze sub-regiões distintas, com destaque para Nhecolândia (19,5 % do Pantanal), Paiaguás (19,4 %), Barão de Melgaço (13,15 %) e Cáceres (9,0 %) (SILVA & ABDON, 1998) (Figura 1).



**Figura 1:** Localização geográfica e delimitações das sub-regiões do Pantanal Matogrossense (adaptado de MAPAS E IMAGENS DO PANTANAL, 2007)

O fator ecológico que determina os padrões e processos no Pantanal é o pulso da inundação, que segue um ciclo anual mono-modal, com amplitudes que variam entre dois e cinco metros e com duração de três a seis meses. Em termos fitofisionômicos, a vegetação do Pantanal é considerada um mosaico, agregando 16 classes de vegetação, destacando-se os campos (31 %), cerradão (22 %), cerrado (14 %), campos inundáveis (7 %), floresta semidecídua (4 %), mata de galeria (2,4 %) e tapetes de vegetação flutuante ou "baceiros" (2,4%) como as mais representativas (POLIDO & SARTORI, 2007; HARRIS *et al.*, 2005).

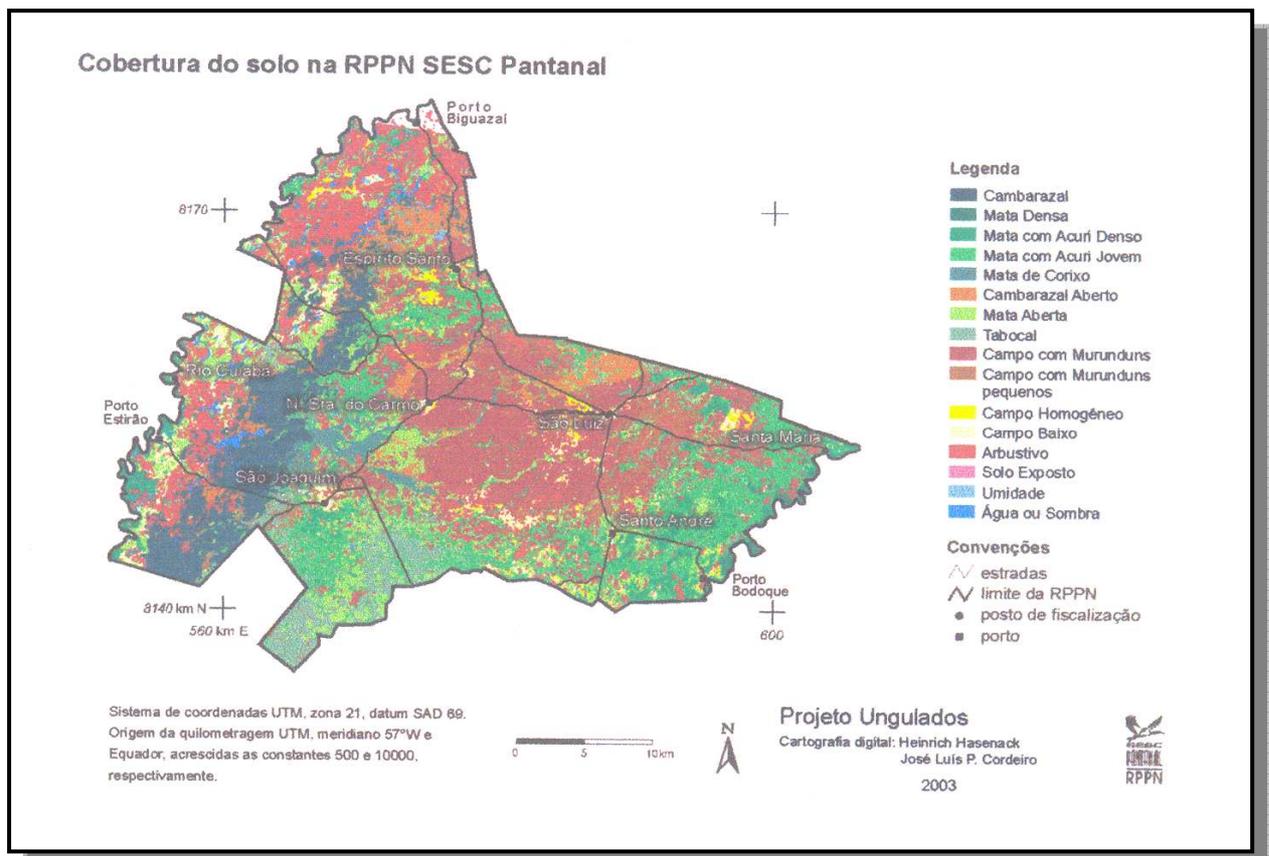
No Pantanal, foram repertoriadas 1863 espécies de plantas fanerógamas, sendo Leguminosae *latu sensu* (240 espécies), Poaceae (212), Cyperaceae (92), Asteraceae (82), Euphorbiaceae (78), Rubiaceae (62), Malvaceae (47) e Myrtaceae (45) as principais famílias. Os principais gêneros são representados por *Paspalum* (35), *Cyperus* (29), *Ipomoea* (24), *Panicum* (22), *Eugenia* (20), *Ludwigia* (19), *Mimosa* (18), *Rhynchospora* (18) e *Polygala* (17). As principais briófitas são aquáticas, como a *Salvinia* (3), *Azolla* (2) e *Marsilea* (2) (POTT & POTT, 2004).

A região destaca-se também por sua extraordinária concentração e abundância de vida silvestre. Cerca de 120 espécies de mamíferos ocorrem no Pantanal, compreendendo as maiores populações de espécies ameaçadas, como o veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), a ariranha (*Pteronura brasiliensis*) e a onça-pintada (*Panthera onca*). São observadas ainda 463 espécies de aves, sendo 117 ameaçadas de extinção, 41 espécies de anfíbios, 177 espécies de répteis e mais de 260 espécies de peixes (HARRIS *et al.*, 2005).

O frágil equilíbrio dos ecossistemas no Pantanal, definido pela sua dinâmica periódica de inundação, está sendo ameaçado pelas recentes tendências de desenvolvimento. Os modelos tradicionais de pesca e pecuária vêm sendo rapidamente substituídos pela exploração intensiva, acompanhada pelo desmatamento e degradação dos cursos hidrológicos (HARRIS *et al.*, 2005).

Como medida de conservação e preservação da biodiversidade do Pantanal, em 1996, o Serviço Social do Comércio (SESC) iniciou a compra de antigas fazendas de gado desativadas, entre os rios Cuiabá e São Lourenço, no município de Barão de Melgaço (MT), criando a Estância Ecológica SESC Pantanal, posteriormente reconhecida como Reserva Particular do Patrimônio Natural (RPPN) (De OLIVEIRA, 2005).

A RPPN-SESC Pantanal possui aproximadamente 106 000 hectares, com paisagem composta predominantemente por cerrado, seguido de floresta amazônica e chaco, apresentando fauna e flora ricas. Sua criação aumentou em um terço a área preservada do Pantanal do Mato Grosso (De OLIVEIRA, 2005).



**Figura 2:** Cobertura vegetal na área de abrangência da RPPN SESC Pantanal, município de Barão de Melgaço/MT, 56° a 57° W e 16° a 17° S (COSTA, 2004)

## ESCOLHA DO MATERIAL VEGETAL E ALVO BIOLÓGICO

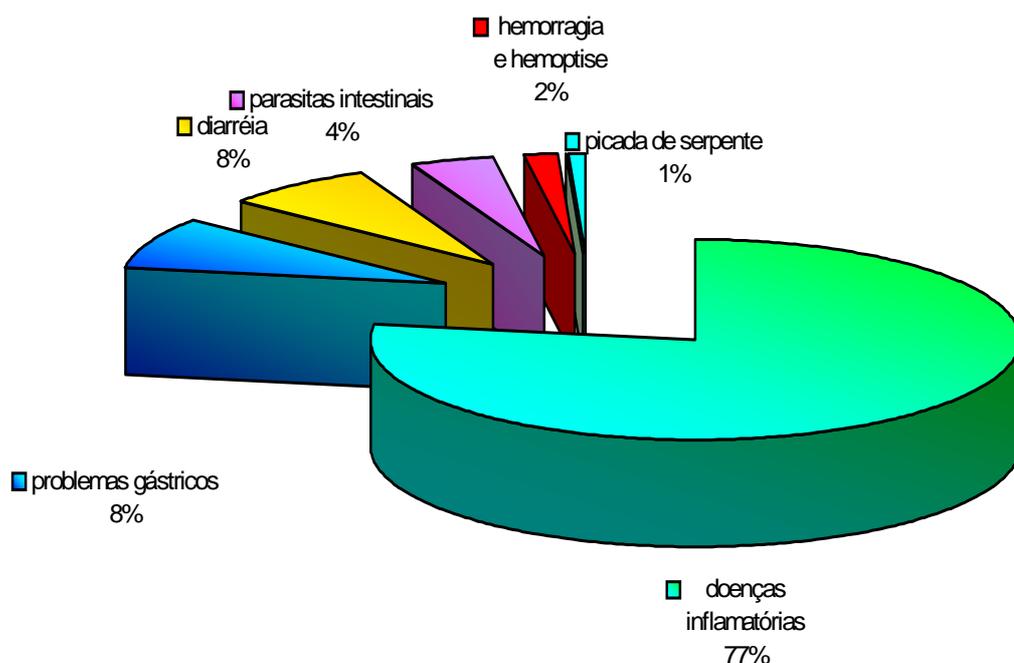
Estudos visando conhecer a biodiversidade da Reserva Particular do Patrimônio Natural-SESC Pantanal vêm sendo desenvolvidos por diferentes equipes de pesquisa, pertencentes a diversas instituições no País, sendo que esta dissertação de mestrado se inclui em dois desses projetos.

O primeiro projeto, intitulado "Perfil químico e possíveis implicações de substâncias potencialmente envolvidas na seleção e mecanismos de defesa nas relações

ungulado-planta na RPPN SESC Pantanal”, desenvolvido pelas equipes do Prof. Luiz Flamarion Barbosa de Oliveira (Seção de Mastozoologia, Museu Nacional, UFRJ) e da Prof<sup>a</sup>. Sônia Soares Costa (Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos, NPPN, UFRJ), focaliza, especialmente, os hábitos alimentares de veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) e cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), assim como os efeitos benéficos potenciais de componentes químicos das plantas da dieta desses cervídeos.

Para realização do projeto foi delimitada uma região de 6 661 hectares na RPPN, onde a vegetação predominante é o campo com murundus. Os cervídeos na região de estudo foram observados quanto à sua atividade de forrageamento, e as plantas componentes da dieta desses animais foram repertoriadas, classificadas e submetidas a estudos químicos e farmacológicos (COSTA *et al.*, 2006; De OLIVEIRA, 2005).

Através de um levantamento preliminar, verificou-se que vinte e duas plantas dicotiledôneas e monocotiledôneas de diversas famílias compõem a dieta daqueles animais na região escolhida para estudo na RPPN (Tabela 1). Observou-se, ainda, que algumas das plantas consumidas são tidas como medicinais para o homem; a maior parte utilizada para tratar problemas infecciosos, inflamatórios e intestinais (Figura 3).



**Figura 3:** Uso em medicina popular de espécies vegetais pertencentes aos gêneros das plantas da dieta dos cervídeos (COSTA *et al.*, 2002).

Esta dissertação de mestrado apresenta-se, ainda, como parte de um segundo projeto financiado pelo SESC, intitulado "**Avaliação do potencial antiviral de plantas componentes da dieta de cervídeos na RPPN-SESC Pantanal**", coordenado pela Prof<sup>ª</sup>. Sônia Soares Costa (Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos, NPPN, UFRJ) e em colaboração com as pesquisadoras Dra. Isabela Cristina Simoni (Instituto Biológico de São Paulo), Prof<sup>ª</sup>. Maria Teresa Villela Romanos (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas, IMPPG, UFRJ) e Prof<sup>ª</sup>. Márcia Dutra Wigg (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas, IMPPG, UFRJ).

Sabe-se que substâncias que fazem parte do mecanismo de proteção da planta contra ataques de predadores (herbivoria), podem também agir contra infecções provocadas por bactérias, fungos e vírus. Com base nesta assertiva, esse projeto teve como interesse principal buscar nas plantas consumidas por cervídeos na RPPN-SESC Pantanal substâncias potencialmente terapêuticas com enfoque sobre agentes antivirais, em uma abordagem pioneira sob o ponto de vista conceitual (COSTA, 2004).

Alguns vírus patogênicos de importância para a medicina veterinária e humana - vírus DNA e RNA - foram escolhidos para o desenvolvimento do projeto. Dentre os vírus de DNA, o projeto incluiu os vírus portadores de envelopes HSV-1 (herpes simplex tipo 1), HSV-2 (vírus herpes tipo 2), SHV-1 (vírus herpes suíno do tipo 1 ou vírus da doença de Aujeszky) e BHV-1 (vírus herpes bovino do tipo 1 ou vírus da rinotraqueíte infecciosa bovina). Já os vírus RNA utilizados pertencem à categoria dos não envelopados (rotavírus suíno, reovírus aviário e vírus da doença de Gumboro - IBDV).

Os resultados do projeto nos ensaios antivirais - vírus patogênicos para o homem e animais - para todos os extratos testados podem ser observados na **Tabela 1**. A atividade antiviral foi expressa na forma de Índice de Inibição Viral (IIV). Os valores acima de 2 indicam alta atividade antiviral, entretanto um índice de inibição inferior a 1 pode ser indicativo de uma atividade antiviral não desprezível (pode-se melhorar a resposta após fracionamento do extrato).

**Tabela 1:** Plantas da dieta de cervos-do-pantanal e veados-campeiros na RPPN-SESC Pantanal e resultados gerais dos ensaios antivirais obtidos para os extratos das plantas da dieta dos cervídeos testadas nas respectivas concentrações máximas não tóxicas (CMNT) (COSTA, 2004)

Plantas	Nome popular	Vírus Patogênicos para Mamíferos					Vírus Patogênicos para Aves	
		HSV-1 (Vero)	HSV-2 (Vero)	SHV-1 (MDBK)	BHV-1 (MDBK)	Rotavírus (MA-104)	Reovírus (Vero)	IBDV (RK-13)
<b>Dicotiledôneas</b>								
<i>Vernonia scabra</i> (Asteraceae)	Assa-peixe	3,25	1,98	1,26	1,00	0,30	0	0
<i>Polygonum acuminatum</i> (Polygonaceae)	Fumo-bravo	3,00	1,98	4,13	2,90	não testado	0	0,40
<i>Discolobium pulchellum</i> (Fabeaceae)	Cortiça-do-brejo	0	0	0	0	0,60	0,09	0,62
<i>Sida santaremensis</i> (Malvaceae)	Anxuma-amarela	0,30	0	0	0	0	0,50	0,13
<b><i>Mimosa xanthocentra</i> (Mimosaceae)</b>	Dorme-dorme	<b>4,13</b>	<b>1,78</b>	<b>2,00</b>	<b>1,15</b>	0,90	0	0,50
<i>Desmodium distortum</i> (Fabaceae)	Fumeirinho	0,7	0,50	0,01	0	0,50	0	0,50
<i>Cecropia pachystachya</i> (Cecropiaceae)	Embaúba	0,75	0	3,75	4,14	0,25	0,24	0,74
<i>Pavonia angustifolia</i> (Malvaceae)	Roseira-do-brejo	0,75	0,15	1,75	0,90	0,50	0,24	0,50
<i>Melochia villosa</i> (Sterculiaceae)	Malva	0,20	não testado	3,75	4,40	0,07	0,24	0
<i>Sida</i> sp (Malvaceae)	Anxumão	não testado	1,25	0,01	0	0,50	0,24	0,50
<i>Ludwigia nervosa</i> (Onagraceae)	Pinheiro-do-brejo	1,20 <sup>A</sup> -1,50 <sup>B</sup>	2,65 <sup>A</sup> -2,15 <sup>B</sup>	1,00	0	0,26 <sup>A</sup> -0,10 <sup>B</sup>	0,62	0,25
<i>Mimosa debilis</i> (Mimosaceae)	Dorme-dorme	0,25	0	1,74	1,13	0,90	0,38	0
<i>Sebastiania corniculata</i> (Euphorbiaceae)	Anxuma	0,30	0,85	1,50	0,50	0	0,62	0,40
<i>Phyllanthus amarus</i> (Euphorbiaceae)	Fura-pedra	0,70	1,10	1,74	1,17	0,19	0,38	-0,20
<i>Rynchanthera novemnervia</i> (Melastomataceae)	-	0	0	1,01	0	0,64	0,88	0,03
<i>Andira cuyabensis</i> (Fabaceae)	Fruta-do-veado	1,25	1,00	2,75	1,40	0,16	1,56	0,02
<i>Lippia alba</i> (Verbenaceae)	Erva-cidreira	0,25	0	0	0	0	1,43	0,15
<i>Sabicea aspera</i> (Rubiaceae)	Cipó	2,75	1,00	2,75	2,90	0	1,31	0,28
<b>Monocotiledônea</b>								
<i>Brachiaria humidicola</i> (Poaceae)	Capim africano	0,10	1,75	1,50	0,63	0,43	0,38	0,78
<i>Brachiaria</i> sp (Poaceae)	Capim-de-rola	2,20	2,75	2,00	2,40	0,50	0,38	0,78
<i>Oryza latifolia</i> (Poaceae)	Capim-arroz	1,00	0,19	0,37	0	0,40	0,50	0,53

Obs. (1) Os índices A e B se referem a partidas de planta coletadas em 2 épocas distintas na RPPN-SESC Pantanal. (2) A espécie *Axonopus purpusii* (Poaceae; Monocotiledônea), também consumida pelos cervídeos, não foi submetida aos ensaios antivirais.

Dentre os itens da dieta daqueles cervídeos se encontra a espécie *Mimosa xanthocentra* Mart. (Mimosaceae), nunca estudada sob o ponto de vista químico. Sob o aspecto biológico, esta espécie vegetal foi objeto de estudo em monografias de conclusão de curso de graduação, realizadas durante o desenvolvimento deste último projeto, no Instituto Biológico de São Paulo e Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - UFRJ (VASSALO, 2003; LUQUE, 2004; MANHA, 2004; ALMEIDA, 2005).

Esta espécie vegetal, que faz parte de um gênero botânico com uso difundido na medicina popular, foi escolhida como enfoque desta dissertação de mestrado tendo em vista o seu consumo por parte dos cervídeos e seu potencial valor terapêutico. Os vírus herpes foram escolhidos como alvo biológico para estudo nessa dissertação com base nos resultados obtidos nos ensaios antivirais de triagem realizados com as plantas da dieta de cervídeos no Pantanal (**Tabela 1**).

## O GÊNERO *Mimosa* L.

*Mimosa* L. é um dos maiores gêneros de leguminosas da subfamília Mimosaceae, contendo aproximadamente 500 espécies, compreendendo ervas, arbustos e, raramente, árvores. É originário das regiões centrais da América do Sul, estendendo-se desde as planícies tropicais do México até o nordeste da Argentina. O maior centro de diversificação de espécies de *Mimosa* é o Brasil central, que atualmente possui uma rica diversidade e elevado endemismo (HEARD & PETTIT, 2005).

Espécies de *Mimosa* podem ser encontradas nas margens de rios, em terras sazonalmente inundáveis, ao longo de valas e em savanas sazonalmente úmidas, sendo consideradas plantas daninhas capazes de infestar extensas áreas de agricultura, residências, lazer, beiras de estradas e áreas abandonadas (HEARD & PETTIT, 2005; YUSUF *et al.*, 2003).



**Figura 4:** Foto *Mimosa* sp (JUNGLE SEEDS & GARDENS, 2007)

O interesse nessas plantas surgiu da necessidade de se conhecer os aspectos químicos e biológicos associados com os movimentos de suas folhas (KIRK *et al.*, 2003). A maioria das espécies de *Mimosa*, muitas delas conhecidas como sensitivas, possuem folhas capazes de se fechar rapidamente quando estimuladas pelo toque ou calor (UEDA & YAMAMURA, 1999). Entretanto, atualmente são muitos os relatos existentes a respeito de sua importância na medicina popular, veterinária e fitoquímica.

#### **Movimento foliar em *Mimosa* L.**

A sensibilidade das plantas às perturbações mecânicas é um aspecto essencial do comportamento desses seres. A resposta a estímulos táteis pode ser responsável por comportamentos agressores, como captura de insetos e estrangulamento de árvores, ou "elegantes", como assegurar a polinização cruzada das flores e permitir a "navegação" das raízes através das barreiras do solo (PATIL & VAIJAPURKAR, 2007).

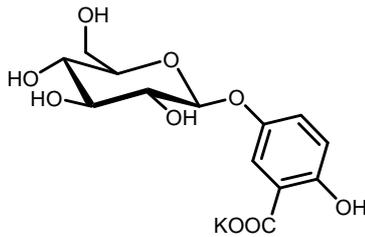
Para as espécies de *Mimosa*, dois movimentos foliares principais podem ser observados: a nictinastia e a tigmonastia. A **Figura 5** representa o movimento foliar

característico de plantas sensitivas, relacionado ao rápido fechamento dos folíolos quando estimulados pelo toque.



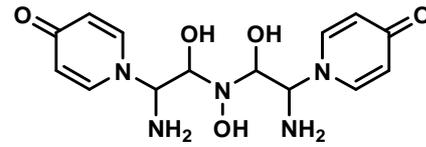
**Figura 5:** Foto do fechamento dos folíolos de *M. pudica* após o toque. À esquerda observam-se os folíolos abertos (antes do toque) e à direita, os folíolos fechados (após o toque) (ENCYCLOPEDIA BRITANNICA ON LINE, 2007)

Nictinastismos são movimentos rítmicos circadianos, ou seja, causados por fatores que variam conforme seja dia ou noite. São largamente observados em leguminosas, estando relacionado à abertura das folhas durante o dia e fechamento durante a noite (UEDA & NAKAMURA, 2006). O mecanismo fisiológico básico associado a este movimento resulta de variações na pressão de turgor nas células motoras, localizadas em lados opostos do pulvino, chamados zonas extensoras e flexoras. As mudanças no turgor são dependentes do fluxo de íons potássio e cloreto através das membranas celulares, juntamente com fluxos de água, afetando assim as propriedades osmóticas dessas células (MACHADO & RODRIGUES, 2004). Duas substâncias endógenas bioativas são responsáveis pelo controle deste movimento: o fator de abertura foliar (responsável por "acordar" a folha) e o fator de fechamento foliar (responsável por fazer a folha "dormir"). Estudos indicam que cada gênero de planta possui os seus próprios fatores foliares, contradizendo a hipótese de que este movimento seja controlado por fito-hormônios comuns a todas as plantas. Os fatores responsáveis pelo nictinastismo em espécies de *Mimosa* foram isolados de *M. pudica* e encontram-se representados na **Figura 6**.



5-O-β-glucopiranosil genistato de potássio

FATOR DE FECHAMENTO FOLIAR



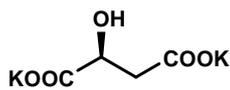
Mimopudina

FATOR DE ABERTURA FOLIAR

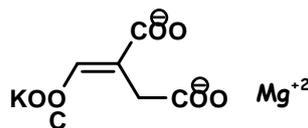
**Figura 6:** Estrutura química dos fatores de movimento responsáveis pelo nictinastismo de *M. pudica*

O tigonastismo é o movimento rápido em resposta a um estímulo mecânico. É responsável pelo fechamento rápido dos folíolos das plantas sensitivas quando tocadas e não se restringe ao local do toque, se propagando para os folíolos e folhas vizinhas (**Figura 5**). O mecanismo associado a este movimento assemelha-se ao nictinastismo, resultando também da perda de turgor das células motoras localizadas na base dos folíolos e do pecíolo. Ainda não se sabe ao certo como as células motoras distantes do sítio inicial de estímulo recebem o sinal, entretanto suspeita-se do envolvimento de sinalizadores elétricos e químicos (BRAAM, 2005).

Em 1999, UEDA & YAMAMAURA identificaram e isolaram três substâncias responsáveis pelo tigonastismo das folhas de *M. pudica*: L-malato de potássio, *trans*-aconitato de magnésio e o sal dimetilamônio (**Figura 7**). Estas substâncias, quando combinadas, foram capazes de induzir o movimento rápido das folhas, sem qualquer alteração do nictinastismo.



L - Malato de potássio

*Trans*-aconitato de potássio e magnésio

Sal de dimetilamônio

**Figura 7:** Estrutura das substâncias responsáveis pelo tigonastismo em *M. pudica*

## A ESPÉCIE *Mimosa xanthocentra* Mart.

*Mimosa xanthocentra* ou dorme-dorme, na cultura popular, foi descrita pela primeira vez por Martius, em 1838 (Figura 8).



**Figura 8:** Foto da exsicata de *Mimosa xanthocentra* (Jardim Botânico, RJ). Amostra coletada em Bela Vista, MS.

A descrição da espécie segue a seguinte classificação taxonômica categorizada em APG II (2003):

Angiospermae

Eudicotyledoneae

Eurosidae I

Fabales

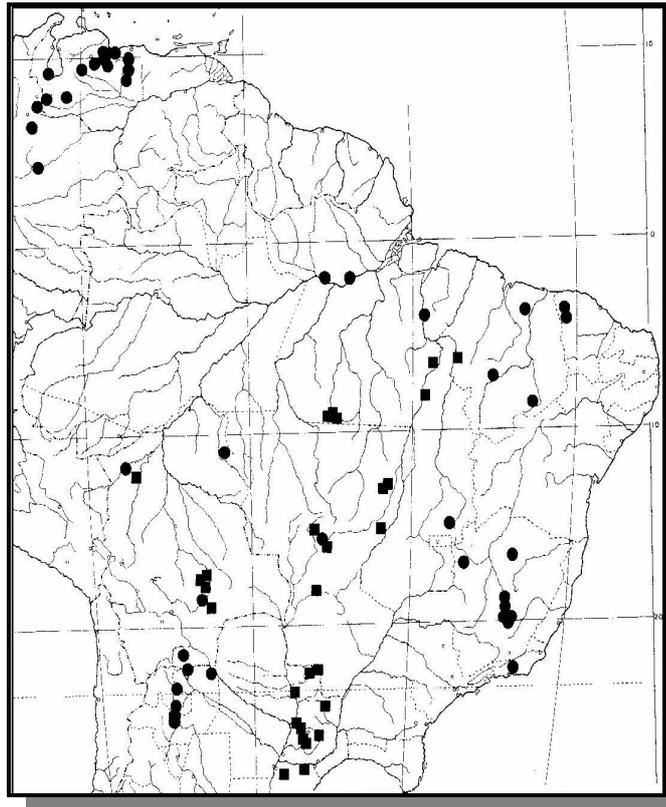
Fabaceae Lindl (1836)

Mimosaceae R. Br (1814)

*Mimosa* Linnaeus (1753)

*Mimosa xanthocentra* Mart. (1838)

*Mimosa xanthocentra* é uma espécie nativa da América do Sul, com relato de ocorrência em países como Brasil, Venezuela, Bolívia, Colômbia, Argentina e Paraguai. No Brasil, encontra-se amplamente disseminada, podendo ser encontrada nos estados do Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí, Rio de Janeiro, Rondônia, São Paulo e Tocantins (BARNEBY, 1992) (Figura 9).



**Figura 9:** Distribuição de espécies de *Mimosa xanthocentra* pela América do Sul (adaptado de BARNEBY, 1992)

É uma planta herbácea, com folhas bipinadas sensíveis ao toque. Possui inflorescências em espiga; flores pequenas, aglomeradas, hermafroditas, na cor rósea, e fruto craspédio (BARNEBY, 1992).

Não existem relatos acerca da utilização de *M. xanthocentra* na medicina popular ou de estudos químicos e biológicos relacionados a esta espécie, entretanto, a correlação desta planta com as demais espécies do gênero *Mimosa* L., para as quais são atribuídas propriedades etnomedicinais e nutritivas, permite justificar a sua presença entre as plantas consumidas pelos cervídeos no Pantanal.

### Usos etnomedicinais de outras espécies de *Mimosa* L.

Segundo COSTA *et al.* (2006), a subfamília Mimosaceae é uma das mais representativas quanto ao número de espécies contribuintes para a dieta dos cervídeos na RPPN-SESC Pantanal, sendo *Mimosa* L. um dos principais representantes entre os gêneros cujas espécies são utilizadas na medicina popular.

Espécies de *Mimosa* são amplamente utilizadas na medicina popular de diversos países, como Brasil, México, Paquistão, Índia e Indonésia (HUSSAIN *et al.*, 1979; GROSVENOR *et al.*, 1995; MORS *et al.*, 2000; DHILLON & CAMARGO-RICALDE, 2005;), com uma ampla variedade de usos.

Em um levantamento bibliográfico foram repertoriadas 19 espécies de *Mimosa* com relatos de uso etnomedicinal (Tabela 2). A maior aplicabilidade dessas plantas está relacionada, principalmente, ao tratamento de problemas dermatológicos, dores, febre, feridas e desordens no trato respiratório e geniturinário (Figura 10). Usos minoritários incluem tratamento de desordens relacionadas ao trato gastrointestinal, sistema nervoso central (SNC), ao sistema cardiovascular, entre outros. Na Tabela 2 encontram-se representadas as espécies de *Mimosa* com uso etnomedicinal, seus nomes populares e respectivas aplicações.

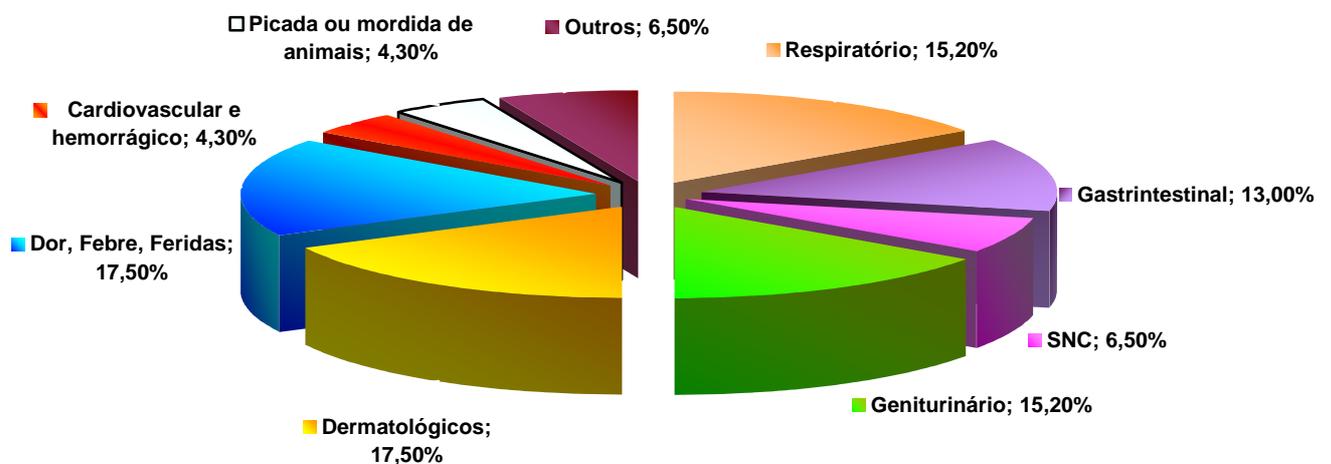


Figura 10: Aplicações etnomedicinais de plantas pertencentes ao gênero *Mimosa* L.

As partes utilizadas da planta, assim como as formas de uso e maneiras de administração são bastante variadas.

Em relação à *M. pigra*, as raízes são utilizadas em preparações para inalações no caso de gripes e resfriados; o decocto e infuso das folhas são utilizados, respectivamente, como enxágüe bucal nas dores de dente e no tratamento de insuficiência cardíaca e diarréia. Os frutos são utilizados para problemas nos olhos (MILLER,2004).

As cascas de *M. dystachia* são aproveitadas na cura de feridas na pele e como uma goma para estancar o sangramento na boca (DHILLION & CAMARGO-RICALDE, 2005). No estado da Paraíba, o decocto das cascas de *M. ophthalmocentra* e *M. tenuiflora*, ambas conhecidas popularmente como jurema, é utilizado para o tratamento de bronquite e tosses (AGRA *et al.*, 2007). O extrato alcoólico das partes aéreas de *M. hamata* é utilizado, na Índia e Paquistão, para o tratamento de infecções bacterianas (HUSSAIN *et al.*, 1979).

Tabela 2 (Parte I): Espécies de *Mimosa* com uso etnomedicinal e suas aplicações

Espécie	Nome vulgar	Uso popular
<i>M. acutistipula</i> <sup>1,2</sup>	Jurema; jurema-preta	Bebida alucinógena (vinho de jurema); tratamento de desordens no aparelho geniturinário feminino (dismenorréia, amenorréia, leucorréia, menopausa e infecções)
<i>M. adenocarpa</i> <sup>3</sup>	Arranha-gato	Úlcera <sup>3</sup>
<i>M. adherens</i>		
<i>M. alba</i>		
<i>M. albida</i> <sup>4</sup>		Doenças estomacais, insônia, dores no corpo
<i>M. bimucronata</i> <sup>1</sup>	Espinheiro; espinheiro-de-cerca; espinho-roxo; espinho-de-maricá; maricá; unha-de-gato	Asma; bronquite; febre; emoliente
<i>M. caesalpiniaefolia</i> <sup>1</sup>	Sabiá	Béquica
<i>M. dystachia</i> <sup>4</sup>		Feridas na pele e sangramento na boca
<i>M. hamata</i> <sup>5</sup>		Antibacteriana
<i>M. hostilis</i> <sup>1,6</sup>	Espinheiro; espinheiro-preto; jurema; jurema- preta	Bebida alucinógena (vinho de jurema); úlceras; bronquite e erisipela
<i>M. invisá</i> <sup>1</sup>	Malícia-de-mulher	Diurética, cálculos renais
<i>M. lacerata</i> <sup>4</sup>		Feridas na boca

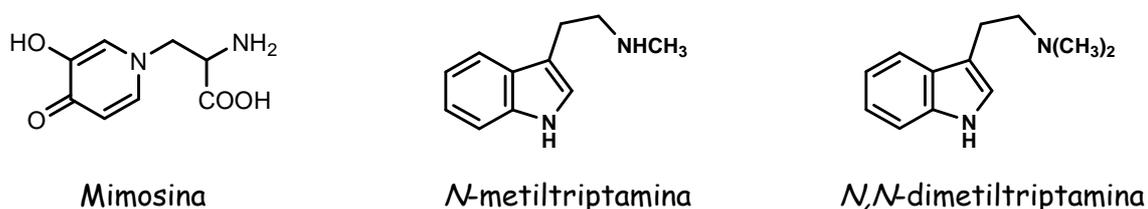
Referência de Tabela 2 (Parte I): <sup>1</sup>MORS *et al.*, 2000; <sup>2</sup>AGRA & DANTAS, 2006; <sup>3</sup>COELHO & Da SILVA, 2003; <sup>4</sup>DHILLION & CAMARGO-RICALDE, 2005; <sup>5</sup>HUSSAIN *et al.*, 1979; <sup>6</sup>OHSAKI *et al.*, 2006.

Tabela 2 (Parte II): Espécies de *Mimosa* com uso etnomedicinal e suas aplicações

Espécie	Nome vulgar	Uso popular
<i>M. ophthalmocentra</i> <sup>7,15</sup>	Jurema	Alucinógeno; bronquite e tosse
<i>M. pigra</i> <sup>8</sup>		Inalação em gripes; dor de dente; problemas nos olhos; picada de cobra; insuficiência cardíaca; diarreia.
<i>M. pudica</i> <sup>1,9,10</sup>	Dormideira; juquiri; malícia-de- mulher; sensitiva; vergonha	Purgativa; emética; reumatismo; difteria; tumores; leucorréia; tônico; gonorréia; furúnculo; cortes, feridas, asma, diarreia, hemoptíase, sedativo; veneno de cobra e picada de escorpião.
<i>M. tenuifolia</i> <sup>11,12,13</sup>	Tepescohuite; jurema	Queimaduras, inflamação; problemas de pele; bronquite; tosse.
<i>M. texana</i> <sup>4</sup>		Dor de cabeça, febre, reumatismo, fadiga.
<i>M. velloziana</i> <sup>1</sup>	Dorme-maria; dormideira; dormideira- grande; malícia- das-mulheres; sensitiva	Purgativa; emética; reumatismo; difteria; contra tumores e furúnculos; leucorréia; tônico; gonorréia.
<i>M. verrucosa</i> <sup>1,14</sup>	Jurema; jurema- preta	Sedativo; narcótico; adstringente; infecções externas; febrífugo; contra úlcera.

Referências Tabela 2 (Parte II): <sup>1</sup>MORS *et al.*, 2000; <sup>4</sup>DHILLION & CAMARGO-RICALDE, 2005; <sup>7</sup>AGRA *et al.*, 2007; <sup>8</sup>MILLER, 2004; <sup>9</sup>GIRISH *et al.*, 2004; <sup>10</sup>AHMAD & ISMAIL, 2003; <sup>11</sup>DOMINGUEZ *et al.*, 1989; <sup>12</sup>PALACIOS *et al.*, 1991; <sup>13</sup>AGRA *et al.*, 2007; <sup>14</sup>DESMARCHELIER *et al.*, 1999; <sup>15</sup>BATISTA *et al.*, 1999.

Os efeitos associados a alterações no SNC, como efeitos alucinógenos e sedativos, estão relacionados à presença de alcalóides em espécies de *Mimosa*. Na Malásia, o decocto das raízes de *M. pudica* pode ser ingerido para tratamento de neuroses e como tranqüilizante (efeito sedativo), em uma atividade atribuída ao alcalóide mimosina, encontrado nesta espécie. Nas espécies *M. ophthalmocentra*, *M. hostilis* e *M. verrucosa*, o efeito alucinógeno é atribuído aos alcalóides *N,N*-dimetiltriptamina e *N*-metiltriptamina (GUPTA *et al.*, 1979; BATISTA *et al.*, 1999; AHMAD & ISMAIL, 2003).



**Figura 11:** Estrutura dos alcalóides, com atuação no SNC, encontrados em *Mimosa* L.

Baseando-se nesses conhecimentos populares, estudos fitoquímicos e biológicos foram conduzidos de forma a confirmar o uso popular de algumas espécies de *Mimosa*.

Em relação à *M. pigra*, a atividade de seu extrato frente às bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e ao fungo *Candida albicans*, justifica o uso desta planta no tratamento de feridas infeccionadas e infecções nos olhos e pele. O seu uso no tratamento de diarreia não foi validado em estudos *in vitro* frente à *Escherichia coli* (MILLER, 2004).

Ao extrato alcoólico das partes aéreas *M. hamata* é atribuída uma atividade antibacteriana de amplo espectro. O extrato foi capaz de inibir *Salmonella typhosa*, *Salmonella para A e B*, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneriae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus jaecalis*, *Vibrio cholera*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Diplococcus pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*. A atividade desta planta é atribuída ao ácido gálico e galato de etila (HUSSAIN *et al.*, 1979).

*M. tenuiflora*, conhecida popularmente como "tepescohuite" e utilizada no tratamento de infecções cutâneas e queimaduras, foi avaliada quanto à atividade antibacteriana. Os extratos aquosos e etanólicos desta planta inibiram o crescimento de

bactérias (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Proteus vulgaris*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus subtilis*), do fungo *Candida albicans* e de dermatófitos (*Trychophyton mentagrophytes*, *Trychophyton rubrum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*) (LOZOYA *et al.*, 1989).

Estudos recentes apontam para as propriedades cicatrizantes de *M. tenuiflora*, confirmadas pela redução em 92 % das varizes de pacientes tratados com o extrato desta planta. Esta atividade cicatrizante é atribuída aos taninos presentes nas cascas desta planta (RIVERA-ACRE *et al.*, 2007).

Outros usos populares também foram confirmados, como a utilização de *M. pudica* no tratamento de picadas de cobras e a utilização de *M. verrucosa* como agente antiinflamatório. Estudos mostraram que o extrato aquoso das raízes de *M. pudica* inibiu a atividade das enzimas hialuronidase e protease, presentes no veneno de cobra indiana, e o extrato de *M. verrucosa* apresentou uma considerável atividade antioxidante, que poderia estar contribuindo para a atividade antiinflamatória desta planta (DESMARCHELIER *et al.*, 1999; GIRISH *et al.*, 2004).

### **Usos de espécies de *Mimosa* L. na agricultura e dieta animal**

A Fixação Biológica de Nitrogênio (FBN) é a redução do nitrogênio molecular da atmosfera em amônia realizada por microorganismos que, quando em associação com as plantas, são capazes de suprir parte ou toda a necessidade de nitrogênio dessas plantas (MATOS *et al.*, 2005).

Quase todas as espécies pertencentes à família Fabaceae (também conhecida como Leguminosae), inclusive as do gênero *Mimosa* L., apresentam simbiose de suas raízes com bactérias do gênero *Rhizobium*, que captam o nitrogênio atmosférico, a partir do ar do solo, convertendo-o numa forma utilizável pela planta. O nitrogênio incorporado na biomassa da planta, além de contribuir para o seu desenvolvimento, torna-se disponível para outras plantas e para os animais que a consomem (WANG *et al.*, 1999; MATOS *et al.*, 2005).

O Nordeste brasileiro é uma região caracterizada por índices pluviométricos irregulares (longos períodos de estiagem e má distribuição de chuvas), o que compromete a produtividade dos rebanhos em regime de pastejo, devido, principalmente, à limitação das fontes protéicas e energéticas disponíveis. Entre as diversas formas de minimizar ou reduzir o problema de escassez de forragem durante o período de seca, destaca-se a utilização de espécies forrageiras leguminosas arbustivo-arbóreas. *Mimosa caesalpinifolia*, conhecida por sabiá, é uma leguminosa comum em alguns sítios ecológicos do Nordeste muito consumida pelos animais no período chuvoso, sendo utilizada também como suplemento alimentar nos períodos de escassez, quando fenada. Esta forrageira pode atingir até 7,0 m de altura e possui caules contendo, em média, 17 % de proteína bruta (VIEIRA *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado por MIRANDA & PASSOS (2004), visando conhecer os hábitos alimentares do bugio-ruivo (um dos macacos mais folívoros da região neotropical) na Floresta de Araucária (Paraná), verificou-se que *Mimosa scabrella* (bracatinga) estava entre as principais espécies ingeridas por esses animais, estando presente em sua dieta durante grande parte do ano, servindo como fonte de frutos e folhas. *M. scabrella*, assim como *Gochonatia polymorpha*, outra espécie também consumida por esses animais, são consideradas espécies pioneiras e se mostram bem presentes em vários estágios sucessionais da Floresta de Araucária e outras formações florestais comuns no Brasil (MIRANDA & PASSOS, 2004).

Jurema-preta (*Mimosa tenuiflora*) é uma leguminosa arbórea pioneira e altamente disseminada na região Nordeste do Brasil. Ele pode crescer abundantemente e suas folhas, talos e frutos são consumidos por ruminantes, contribuindo significativamente para a dieta animal, devido à sua baixa digestibilidade e evidência da redução da digestibilidade de gramíneas (BAKKE *et al.*, 2007).

Em relação à *Mimosa pigra*, são vários os relatos encontrados acerca de sua presença na dieta de animais. Esta espécie possui um elevado conteúdo protéico (20 a 23 % de peso bruto), constituindo um componente nutritivo na dieta de inúmeros animais, como carneiros, faisões e búfalos. Na Nigéria, *M. pigra* é encontrada como uma parte saborosa e estável do suplemento alimentar dos grandes herbívoros na reserva Yankari Game, sendo

observadas inúmeras trilhas, abertas por esses animais, entre os arbustos desta planta. Os elefantes envolvem os galhos com suas trombas, puxando suas folhas ou comendo todo o arbusto, enquanto búfalos e antílopes são encontrados pastando em *M. pigra*. Em outros países, como Austrália e Tailândia, rebanhos bovinos, caprinos e equinos também são encontrados pastando em plantações de *M. pigra*. Mesmo sendo amplamente utilizada, esta espécie vegetal continua crescendo durante a época seca e recupera sua condição de saúde na época úmida, quando os animais são afastados pelas cheias (MILLER, 2004).

Além da participação na dieta de animais, espécies de *Mimosa* podem ser usadas em associações de cultivo com espécies não leguminosas, melhorando a qualidade da biomassa (MATOS *et al.*, 2005). A biomassa resultante da poda das árvores, queda natural de ramos e folhas, e outras formas, pode ser incorporada ao solo, aumentando a disponibilidade de nitrogênio e outros nutrientes para as espécies vegetais crescendo nesta área (MATOS *et al.*, 2005).

Na Austrália, *M. pigra* é utilizada como adubo verde, sendo capaz de aumentar a fertilidade do solo, promovendo a redistribuição de nutrientes do solo mais profundo para a superfície. Seu valor como adubo está associado à sua simbiose com espécies de *Rhizobium*, responsável por elevar o nível de carbono orgânico, nitrogênio total, fósforo e zinco disponíveis no solo (MILLER, 2004).

No México, em um estudo realizado sobre os aspectos culturais e ecológicos das espécies de *Mimosa*, verificou-se que 50% das espécies encontradas neste país são utilizadas, em sua maioria, como fonte de madeira para combustível e construção de cercas e abrigos para animais. As espécies *M. aculeticarpa*, *M. dystachia*, *M. luisiana* e *M. polyantha* são utilizadas como cercas vivas para proteger campos de milho. *M. texana* é consumida por humanos e animais no estado de Guanajuato. *M. biuncifera* é usada na indústria de peles, na tanagem do couro e na fabricação de ferramentas de fazenda. *M. albida* e *M. mollis* é utilizada na ornamentação, enquanto *M. benthamii* serve de fonte de néctar para abelhas melíferas. Muitas espécies também são utilizadas no controle da erosão dos solos e na regeneração de seus nutrientes em terras não-cultivadas e campos de pastagens, uma vez que a presença de *Mimosa sp.* altera positivamente os fatores biológicos e físicos do solo sob suas copas (DHILLION & CAMARGO-RICALDE, 2005).

## OS CERVÍDEOS

Os cervídeos - ungulados da ordem Artiodactyla (mamíferos caracterizados pela presença de cascos com números pares de dedos de apoio) - constituem os ruminantes de vida silvestre mais distribuídos no mundo, sendo encontrados em quase todos os continentes. No mundo existem 17 gêneros e 45 espécies de cervídeos distribuídos nas Américas, Europa, Ásia e África (DUARTE, 1997; BERNDT, 2005). São encontrados em diferentes habitats (florestas, savanas, montanhas, regiões pantanosas e áridas), podendo ser do tipo "grazer" (ingestão de grande quantidade de material vegetal abundante e pouco digestível, como gramíneas) ou "browser" (seleção preferencial das partes mais digestivas das plantas, como folhas, brotos e flores) (LATHAM, 1999; De OLIVEIRA, 2005; BERNDT, 2005).

Os veados-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* L., 1758) e cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus* I., 1811) (Mammalia Cervidae) são cervídeos nativos da América do Sul e encontrados na região da RPPN-SESC Pantanal. Atualmente, essas espécies encontram-se em acentuado declínio populacional, principalmente pela alteração de habitat (destruição do ambiente para agricultura e confinamento), por doenças introduzidas pelo gado e caça indiscriminada (UHART *et al.*, 2003; WEBER & GONZALES, 2003; COSTA *et al.*, 2006).

Fotos cedidas pelo Prof. L. F. B. de Oliveira



**Figura 12:** Foto do veado-campeiro (à esquerda) e cervo-do-pantanal (à direita)

### Patógenos que acometem cervídeos

É crescente o reconhecimento de que a vida silvestre pode exercer um papel significativo na epidemiologia de doenças novas e emergentes, que representam sérios riscos ao bem-estar animal (doméstico e silvestre), saúde humana, conservação da vida silvestre e produtividade econômica (BÖHM *et al.*; 2006).

No Pantanal, assim como em outras localidades, é possível observar interações entre animais silvestres e domésticos, que compartilham habitats e recursos naturais e podem estar expostos às mesmas doenças infecciosas. Em relação à transmissão de doenças entre esses animais, há um especial interesse nos ungulados silvestres, que frequentemente se encontram em contato com rebanhos domésticos (BÖHM *et al.*, 2007; KÖPPEL *et al.*, 2007).

Originalmente, a maioria das infecções é introduzida na população de cervídeos através do contato com o gado infectado. Uma vez contaminado, o cervídeo pode migrar, favorecendo o espalhamento da doença para novas populações, tanto de cervos quanto de rebanhos domésticos. Como consequência, a erradicação e controle da doença tornam-se mais difícil, devendo envolver medidas de controle tanto na população silvestre quanto na doméstica. Ainda, a transmissão de doenças inter-específica pode favorecer a entrada de doenças zoonóticas na população humana, normalmente através da ingestão de carne, leite e água contaminados, ou através do contato ocupacional com os animais domésticos infectados (BÖHM *et al.*, 2007; KÖPPEL *et al.*, 2007).

Estudos indicam que os cervídeos podem ser infectados por um grande número de patógenos, muitos deles compartilhados com os animais domésticos e a população humana. Na **Tabela 3** encontram-se resumidos os principais patógenos que acometem cervídeos, incluindo bactérias, vírus, helmintos e protozoários.

Entre as viroses observadas em cervídeos, a febre aftosa, a diarréia viral bovina e a língua azul estão associadas a grandes perdas econômicas para a pecuária do Brasil e do mundo.

**Tabela 3 (Parte I):** Principais patógenos que acometem cervídeos e incidência em outros hospedeiros (adaptado de BÖHM *et al.*, 2007)

Patógeno	Outros hospedeiros
<b>Bactérias</b>	
<i>Mycobacterium avium</i>	Rebanhos bovino e caprino
<i>Mycobacterium bovis</i>	A maioria dos rebanhos domésticos e humanos (zoonose)
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Humanos (zoonose)
<i>Leptospira spp.</i>	Rebanhos bovino e suíno, cavalos e humanos (zoonose)
<i>Salmonella spp.</i>	A maioria dos rebanhos domésticos, aves domésticas e humanos (zoonose)
<i>Escherichia coli</i>	Humanos (zoonose)
<i>Brucella abortus</i> , <i>B. ovis</i> and <i>B. suis</i>	Rebanhos bovino, caprino e suíno e humanos (zoonose)
<i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i>	Rebanhos bovino, caprino e suínos, aves domésticas e humanos (zoonose)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	Humanos (zoonose)
<i>Ehrlichia phagocytophila</i>	Rebanhos bovino, caprino e ovino, cavalos e humanos (hospedeiros acidentais)
<b>Vírus</b>	
Vírus da febre aftosa	Rebanhos bovino, ovino, caprino e suíno e humanos (hospedeiro acidental)
Vírus da encefalomielite ovina (Louping Ill vírus)	Rebanhos ovino, bovino (ocasionalmente) e suíno, cavalos e humanos (zoonose)
Vírus do Vale do Nilo ocidental (West Nile vírus)	Cavalos e humanos (zoonose)
Vírus da Língua Azul	Rebanhos bovino e ovino e humanos (hospedeiro acidental)
Vírus da doença hemorrágica epizoótica	Rebanhos bovino, ovino (subclínica) e humanos (hospedeiro acidental)
Vírus da diarreia viral bovina	Rebanho bovino
Parapoxvírus	Rebanhos bovino, ovino e caprino e humanos (zoonose)
Vírus da meningoencefalite transmitida por carrapato	Humanos (zoonose)

**Tabela 3 (Parte II):** Principais patógenos que acometem cervídeos e incidência em outros hospedeiros (adaptado de BÖHM *et al.*, 2007)

Patógeno	Vias de transmissão	Outros hospedeiros
<b>Helmintos</b>		
<i>Trichostrongylus spp.</i>	Rebanhos bovino, ovino e caprino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Marshallagia marshalli</i>	Rebanho ovino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Teladorsagia sp.</i>	Rebanho ovino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Ostertagia sp.</i>	Rebanhos bovino e ovino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Skrjabinagia kolchida</i>	Rebanhos bovino, ovino e caprino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Haemonchus contortus</i>	Rebanho ovino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Trichuris ovis</i>	Ruminantes domésticos e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Cooperia spp.</i>	Rebanhos bovino, ovino e caprino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Oesophagostomum spp.</i>	Rebanhos bovino, ovino, caprino e suíno e humanos (zoonose na África)	
<i>Elaphostrongylus cervi</i>	Rebanhos ovinos e caprino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Dictyocaulus spp</i>	Rebanho bovino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Fascioloides magna</i>	Rebanhos bovino e ovino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Fasciola hepática</i>	Rebanhos bovino e ovino e humanos (hospedeiro acidental)	
<i>Echinococcus granulosus</i>	Humanos (zoonose)	
<i>Cysticercus tenuicollis</i> ( <i>Taenia hydatigena</i> )	Rebanhos bovino, ovino, caprino e suíno e humanos (hospedeiro acidental)	
<b>Protozoários</b>		
<i>Cryptosporidium spp.</i>	Humanos (zoonose)	
<i>Toxoplasma gondii</i>	Humanos (zoonose)	
<i>Sarcocystis spp.</i>	Rebanhos bovino e ovino e humanos (zoonose; raramente)	
<i>Neospora caninum</i>	Rebanho bovino	

A febre aftosa é uma enfermidade viral, muito contagiosa, de evolução aguda, que afeta naturalmente os animais biungulados domésticos e selvagens. A doença é causada por um vírus de RNA pertencente à família Picornaviridae, gênero *Aphthovirus*, e caracteriza-se por febre e formação de vesículas na cavidade bucal e espaços interdigitais. No Brasil, a febre aftosa é um fator limitante para o desenvolvimento econômico da indústria animal, pois afeta os produtores, empresários e famílias rurais por seus efeitos desfavoráveis

sobre a produção, produtividade e rentabilidade da pecuária. Os prejuízos econômicos de maior impacto devem-se à queda de produção, como também ao custo operacional de um programa de erradicação, à interferência da presença de animais domésticos de fazenda e exportação de carnes para outros países (CLAVIJO & KITCHING, 2003; ALEXANDERSEN *et al.*, 2003; GRUBMAN, 2005).

O vírus da diarreia viral bovina possui distribuição mundial e é considerado o agente viral mais importante de bovinos, após o vírus da febre aftosa. Trata-se de um vírus de RNA envelopado pertencente à família Flaviviridae, gênero *Pestivirus*, cuja infecção tem sido associada a uma ampla variedade de manifestações, que incluem desde infecções inaparentes até enfermidades altamente fatais, como a Doença das Mucosas. No Brasil, a infecção tem sido descrita desde o final da década de 60 e está amplamente difundida nos rebanhos de leite e corte. A situação epidemiológica atual da infecção no país ainda é pouco conhecida, entretanto vários estudos sorológicos revelaram uma prevalência de anticorpos que varia entre de menos de 10% em gado de corte a mais de 70% em gado de leite (FLORES, 2003; KÖPPEL *et al.*, 2007; PASSLER, 2007).

A Língua Azul é uma doença viral, não contagiosa, transmitida por dípteros do gênero *Culicoides*, que afeta ruminantes domésticos e selvagens. O vírus da Língua Azul é um *Orbivirus* da família Reoviridae cujo genoma é constituído de dupla fita de RNA. A infecção caracteriza-se por inflamação das membranas mucosas, hemorragia e edemas, com perdas econômicas atribuídas ao aborto, à queda do desempenho reprodutivo e à perda de condição corporal. Grande parte do território brasileiro encontra-se inserido dentro da zona epidêmica, com soroprevalência variando de 1,22%, para o Rio Grande do Sul a 89,69%, para o Sergipe, com soroprevalências altas também para os estados de Minas Gerais (76,3%), Rio de Janeiro (40,86%), São Paulo (53,73%) e Santa Catarina (37,75%) (BRÉARD *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2006).

### **Cervídeos e *M. xanthocentra***

Em qualquer continente ou região, a forma com que os animais percebem seu ambiente e tomam decisões de forrageamento são importantes para o entendimento das interações entre animais e plantas. O comportamento alimentar desses animais é

dependente da distribuição espacial e da disponibilidade quantitativa e qualitativa do alimento (BERNDT, 2005).

Tendo em vista a atual situação dos cervos-do-pantanal e veados-campeiros no Pantanal, o conhecimento dos hábitos alimentares desses animais pode contribuir para a sua conservação, através da manutenção e preservação do habitat destas espécies ou ainda através dos efeitos benéficos propiciados por esses alimentos, sob os aspectos nutritivos e medicinais.

As características nutritivas de *M. xanthocentra* foram avaliadas em um estudo realizado por BERNDT (2005), visando identificar as contribuições das diferentes espécies vegetais consumidas pelos veados-campeiros no Parque Nacional das Emas-GO (PNE). Assim como os cervídeos da RPPN-SESC Pantanal, os veados-campeiros do PNE também se alimentam de *M. xanthocentra*, ingerindo os brotos, botões, flores e frutos da planta (COSTA *et al.*, 2006; BERNDT, 2005).

Segundo BERNDT (2005), as folhas mostraram-se a parte mais nutritiva de *M. xanthocentra*, seguidas pelos brotos, frutos, sementes e flores. Em relação aos nutrientes analisados, o teor de proteínas mostrou-se o mais elevado (9,6 - 19,5 %), apresentando também um significativo teor de cinzas para folhas, frutos e sementes (4,7 %). Quanto aos macrominerais, o maior teor observado refere-se ao potássio (7,1 - 10,5 %), seguido de cálcio, fósforo, magnésio e enxofre.

Dessa forma, os dados apresentados quanto aos aspectos nutritivos de *M. xanthocentra* justificam, sob este ponto de vista, a sua escolha e consumo por esses animais.

## **NOVA FERRAMENTA PARA A BUSCA DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS**

Desde os tempos antigos, o homem tem sempre recorrido à natureza para as suas necessidades básicas, incluindo medicamentos. Ainda hoje, 80% da população mundial recorrem à fitoterapia como primeira alternativa de tratamento, enquanto os outros 20% utilizam produtos obtidos de plantas como componentes de inúmeros fármacos (CHATTOPADHYAY & NAIK, 2007).

A seleção de plantas com usos etnomedicinais, visando à identificação de substâncias bioativas, é uma das estratégias mais utilizadas na obtenção de novos fármacos, devido à maior probabilidade de sucesso e margem de segurança (De OLIVEIRA, 2005). Entretanto, a busca por substâncias potencialmente terapêuticas a partir de plantas consumidas por animais parece-nos também uma fonte confiável, sendo, inclusive, capaz de inferir sobre as propriedades medicinais dessas plantas.

É cada vez maior a evidência de que os animais, como insetos, pássaros e primatas, fazem a escolha de seus alimentos de modo a promover seu conforto e saúde. A observação de chimpanzés em atividade de alimentação revelou que algumas plantas consumidas por eles, quando feridos ou doentes, eram utilizadas popularmente no tratamento dos mesmos sintomas apresentados por esses animais, sendo evidenciada também uma diferença quanto aos hábitos alimentares dos animais saudáveis e doentes (KRIEF *et al.*, 2005).

Da mesma forma, o baixo índice parasitário observado para os chimpanzés pode ser atribuído ao consumo de plantas com propriedades antiparasitárias, uma vez que algumas espécies vegetais consumidas por eles são usadas na medicina popular para o tratamento de verminoses. Sugere-se que o acesso permanente a pequenas quantidades de uma grande diversidade de plantas está possivelmente fazendo o papel de "medicação preventiva", mantendo baixo o nível de patógenos e mantendo a doença em um estado subclínico (KRIEF *et al.*, 2005).

A ingestão de partes de plantas não-nutritivas, como as cascas de árvores, e o comportamento anômalo durante a alimentação, como mascar partes amargas da planta e engolir folhas inteiras (sem mastigar), associada às propriedades biológicas e medicinais relatadas para essas plantas, corroboram a assertiva de que a escolha de alimentos pelos animais é refletida em sua saúde.

De posse desses dados, o estudo de plantas componentes da dieta de animais nos parece uma alternativa bastante útil na busca de substâncias bioativas.

- AGRA, C. A.; DANTAS, I. C. Identificação dos fitoterápicos indicados pelos raizeiros e utilizados pelas mulheres no combate a enfermidades do aparelho geniturinário na cidade de Campina Grande-PB. *Revista de Biologia e farmácia*. Revista Eletrônica da Universidade Estadual da Paraíba (disponível em [www.uep.edu.br/eduep/biofar/pdf/identificacao.pdf](http://www.uep.edu.br/eduep/biofar/pdf/identificacao.pdf)), 2006.
- AGRA, M. F.; BARRACHO, G. S.; BASÍLIO, I. J. L. D.; COELHO, V. P. M. Medicinal and poisonous of the flora of "Cariri paraibano", Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 383-395, 2007.
- AHMAD, F. B.; ISMAIL, G. Medicinal plants used by Kadazandusun communities around crocker range. *ASEAN Review of Biodiversity and Enviromental Conservation (ARBEC). The Crocker Range Sócio-Cultural and Human Dimension*, v. 2, 2003. Disponível em: [www.arbec.com.my/pdf/art1jan,mar03.pdf](http://www.arbec.com.my/pdf/art1jan,mar03.pdf).
- ALEXANDERSEN, S.; ZHANG, Z.; DONALDSON, A. I.; GARLAND, A. J. M. The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease. *Journal of Comparative Pathology*, v. 129, p. 1-36, 2003.
- BAKKE, I. A.; BAKKE, O. A.; ANDRADE, A. P.; SALCEDO, I. H. Produção e qualidade da forragem de jurema-preta com e sem acúleos em plantio adensado. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 42, n. 3, p. 341-347, 2007.
- BARNEBY, R. C. Sensitive censitae: a description of the genus *Mimosa* Linnaeus (Mimosaceae) in the new world. *Memoirs of the New York Botanical Garden*, v. 65, 835p., 1992.
- BATISTA, L. M.; ALMEIDA, R. N.; Da CUNHA, E. V. L.; Da SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Isolation and identification of putative hallucinogenic constituents from the roots of *Mimosa ophthalmocentra*. *Pharmaceutical Biology*, v. 37, n. 1, p. 50-53, 1999.
- BERNDT, A. Nutrição e Ecologia Nutricional de cervídeos brasileiros em cativeiro e no Parque Nacional das Emas-Goiás. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, 2005.

- BÖHM, M.; WHITE, P. C. L.; CHAMBERS, J.; SMITH, L.; HUTCHINGS, M. R. Wild deer as a source of infection for livestock and humans in the UK. *The Veterinary Journal*, v. 174, p. 260-276, 2007.
- BRAAM, J. In Touch: plant responses to mechanical stimuli. *New Phytologist*, v. 165, p. 373-389, 2005.
- BRÉARD, E.; SAILLEAU, C.; HAMBLIN, C.; ZIENTARA, S. Bluetongue virus in the French Island of Reunion. *Veterinary Microbiology*, v. 106, p. 157-165, 2005.
- BERNDT, A. Nutrição e ecologia nutricional de cervídeos brasileiros em cativeiro e no Parque Nacional das Emas-Goiás. Tese de Doutorado, Escola Superior de Agricultura "Luiz Queiroz", Universidade de São Paulo, 2005.
- CHATTOPADHYAY, D.; NAIK, T. N. Antivirals of ethnomedicinal origin: structure-activity relationship and scope. *Mini-reviews in Medicinal Chemistry*, v. 7, p. 275-301, 2007.
- CLAVIJO, A.; KITCHING, P. The Nature and Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease. *Clinical Microbiology Newsletter*, v. 25, n. 11, p. 81-88, 2003.
- COELHO, M. F. B.; Da SILVA, A. C. Plantas de uso medicinal nos municípios de Pontes e Lacerda e de Comodoro, Mato Grosso, Brasil. *Revista Agricultura Tropical*, v. 7, n. 1, p. 53-66, 2003. Também disponível em: [www.ufmt.br/agtrop/revista7/doc/05.htm](http://www.ufmt.br/agtrop/revista7/doc/05.htm)
- CORRÊA, M. F. P. Aspectos químicos e potencial terapêutico de *Vochysia divergens* (Vochysiaceae), uma planta do pantanal matogrossense. Dissertação de Mestrado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- COSTA, J. R. R.; LOBATO, Z. I. P.; HERMANN, G. P.; LEITE, R. C.; HADDAD, J. P. A. Prevalência de anticorpos contra o vírus da língua azul em bovinos e ovinos do sudoeste e sudeste do Rio Grande do Sul. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.58, n.2, p.273-275, 2006.
- COSTA, S. S. Avaliação do potencial antiviral de plantas componentes da dieta de cervídeos na RPPN-SESC Pantanal. Programa multidisciplinar RPPN do SESC Pantanal: uma proposta de estudo de sua biodiversidade. Relatório Final, 2004.

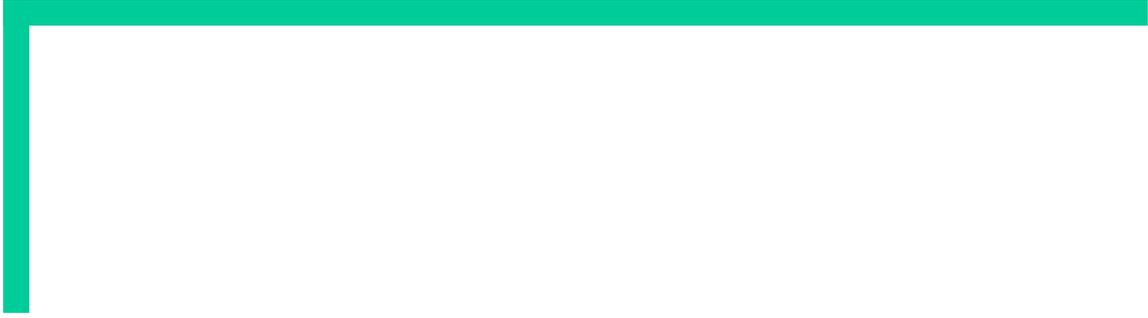
- COSTA, S. S.; OLIVEIRA, D. B.; MANÇO, A. M.; CORDEIRO, J. L. P. ; OLIVEIRA, L. F. B. Perfil químico e possíveis implicações de substâncias potencialmente envolvidas na seleção e mecanismos de defesa nas relações ungulados-plantas na RPPN SESC Pantanal. *Conhecendo o Pantanal*, Mato Grosso, v. 1, p. 79 - 84, 2002.
- COSTA, S. S.; OLIVEIRA, D. B.; MANÇO, A. M.; De MELO, G. O.; CORDEIRO, J. L. P.; ZANIOLO, S.; NEGRELLE, R.; OLIVEIRA, L. F. B. Plants composing the diet of marsh and pampas deer in the Brazilian Pantanal Wetland and their ethnomedicinal properties. *Journal of Biological Sciences*, v. 6, n. 5, p. 840-846, 2006.
- De OLIVEIRA, D. B. Aspectos químicos e etnomedicinais de plantas da dieta de cervídeos na Reserva Particular do Patrimônio Natural-SESC Pantanal. Tese de Doutorado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; CAUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the "Caatinga" region in northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 67, p. 69-77, 1999.
- DHILLION, S. S.; CAMARGO-RICALDE, S. L. The cultural and ecological roles of *Mimosa* species in the Tehuacán-Cuicatlán Valley, México. *Economic Botany*, v. 59, n. 4, p. 390-394, 2005.
- DOMINGUEZ, X. A.; G., S. G.; WILLIAMS, H. J.; ORTIZ, C.; SCOTT, A. I.; REIBENSPIES, J. H. Kukulkanins A and B, new chalcones from *Mimosa tenuifolia*. *Journal of Natural Products*, v. 32, n. 4, p. 864-867, 1989.
- DUARTE, J. M. B. Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos *Blastocerus*, *Ozotocerus* e *Mazama*. Jaboticaba/ FUNEP, 238 p., 1997.
- ENCYCLOPEDIA BRITANNICA ON LINE. Disponível em: [www.britannica.com/ebc/art-6592/Unstimulated-and-stimulated-sensitive-plant](http://www.britannica.com/ebc/art-6592/Unstimulated-and-stimulated-sensitive-plant) Acesso em: 07 out. 2007.
- FLORES, E. F. Divulgação técnica: vírus da diarreia viral bovina (BVDV). *Biológico*, São Paulo, v.65, n.1/2, p.3-9, 2003.
- GIRISH, K. S.; MOHANAKUMARI, H. P.; NAGARAJU, S.; VISHWANATH, B. S.; KEMPARAJU, K. Hyaluronidase and protease activities from Indian snake venoms: neutralization by *Mimosa pudica* root extract. *Fitoterapia*, v. 75, p. 378-380, 2004.

- GROSVENOR, P. W.; GOTHARD, P. K.; McWILLIAM, N. C.; SUPRIONO, A.; GRAY, D. O. Medicinal plants from Riau Province, Sumatra, Indonésia. Part 1: Uses. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 45, p. 75-95, 1995.
- GRUBMAN, M. J. Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals*, v. 33, p. 227-234, 2005.
- GUPTA, M. P.; ARIAS, T. D.; ETHEART, J.; HATFIELD, G. M. The occurrence of triptamine and N-methyltriptamine in *Mimosa somnians*. *Journal of Natural Products*, v. 42, n. 2, p. 234-236, 1979.
- HARRIS, M. B.; TOMAS, W. M.; MOURÃO, G.; Da SILVA, C. J.; GUIMARÃES, E.; SONODA, F.; FACHIM, E. Desafios para proteger o Pantanal Brasileiro: ameaças e iniciativas em conservação. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 156-164, 2005.
- HEARD, T. A.; PETTIT, W. Review and analysis of the surveys for natural enemies of *Mimosa pigra*: what does it tell us about surveys for broadly distributed hosts? *Biological Control*, v. 34, p. 247-254, 2005.
- HUSSAIN, N.; MODAN, M. H.; SHABBIR, S. G.; ZAIDI, S. A. H. Antibiotic principles in *Mimosa hamata*. *Journal of Natural Products*, v. 42, n. 5, p. 525-527, 1979.
- JUNGLE SEEDS & GARDENS - SPECIALISTS IN EXOTIC SEEDS & PLANTS. Disponível em : [www.jungleseeds.com/images/MimosaPudica.jpg](http://www.jungleseeds.com/images/MimosaPudica.jpg) Acesso em: 07 out. 2007.
- JUNK, W. J.; Da CUNHA, C. N.; WANTZEN, K. M.; PETERMANN, P.; STRÜSSMANN, C.; MAERQUES, M. I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. *Aquatic Sciences*, v. 68, p. 278-309, 2006.
- KIRK, L. F.; MØLLER, M. V.; CHRISTENSEN, J.; STÆRK, D.; EKPE, P.; JAROSZEWSKI, J. W. A 5-deoxyflavonol derivative in *Mimosa pudica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 103-105, 2003.
- KÖPPEL, C.; KNOPF, L.; THÜR, B.; VOGT, H. R.; MELI, M. L.; LUTZ, H.; STÄRK, K. D. C. Bovine virus diarrhoea and the vector-borne diseases Anaplasmosis and Bluetongue: a sero-surveillance in free-ranging red deer ( *Cervus elaphus* ) in selected areas of Switzerland. *European Journal of Wildlife Research*, v. 53, n. 3, p. 226-230, 2007.

- KRIEF, S.; HLADIK, C. M.; HAXAIRE, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 101, p. 1-15, 2005.
- LATHAM, J. Interspecific interactions of ungulates in European forests: an overview. *Forest Ecology and Management*, v. 120, p. 13-21, 1999.
- LOZOYA, X.; NAVARRO, V.; ARNASON, J. T.; KOURANY, E. Experimental evaluation of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Tepescohuite) I.- Screening of the antimicrobial properties of bark extracts. *Archivos de Investigacion Medica*, v. 20, n. 1, p. 87-93, 1989.
- MACHADO, S. R.; RODRIGUES, T. M. Anatomia e ultra-estrutura do pulvino primário de *Pterodon pubescens* Benth. (Fabaceae-Faboideae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 1, p. 135-147, 2004.
- MAPAS E IMAGENS DO PANTANAL. In: EMBRAPA PANTANAL. Disponível em: [www.cpap.embrapa.br/agencia/fazenda/fazesub.htm](http://www.cpap.embrapa.br/agencia/fazenda/fazesub.htm) Acesso em: 07 out. 2007.
- MATOS, L. V.; CAMPELLO, E. F. C.; De RESENDE, A. S.; PEREIRA, J. A. R.; FRANCO, A. A. Benefícios e vantagens do uso de leguminosas arbóreas na construção de cercas ecológicas. EMBRAPA - Centro Nacional de Pesquisa de Agrobiologia, v. 3. ISSN 1679-6721. Versão Eletrônica, 2005. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Moirao/MoiraoVivoCercaEcologica.htm>
- MILLER, I. L. Uses for *Mimosa pigra*. Third International Symposium on the Management of *Mimosa pigra*. De 22-25 de setembro de 2004, Darwin, Austrália.
- MIRANDA, J. M. D.; PASSOS, F. C. Hábito alimentar de *Alouatta guariba* (Humboldt) (Primates, Atelidae) em Floresta de Araucária, Paraná, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 21, n. 4, p. 821-826, 2004.
- MORS, W. B.; RIZZINI, C. T.; PEREIRA, N. A. Medicinal Plants of Brazil. Algonac, Michigan, 2000.

- OHSAKI, A.; YOKOYAMA, R.; MIYATAKE, H.; FUKUYAMA, Y. Two diterpene rhamnosides, mimosaside B and C, from *Mimosa hostilis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 54, n. 12, p. 1728-1729, 2006.
- PALACIOS, C.; REYES, R. E.; MARTINEZ, R. L.; De LEON, B.; PABLOS, J. L.; RUIZ-MALDONADO, R. Efectos cicatrizante, antibacteriano y antimicótico del tepescohuite em animales de experimentación. *La Revista de Investigación Clínica*, v. 43, n. 3, p. 205-210, 1991.
- PASSLER, T.; WALZ, P. H.; DITCHKOFF, S. S.; GIVENS, M. D.; MAXWELL, H. S.; BROCK, K. V. Experimental persistent infection with bovine viral diarrhoea virus in white-tailed deers. *Veterinary Microbiology*, v. 122, p. 350-356, 2007.
- PATIL, H. S.; VAIJAPURKAR, S. Study of the geometry and folding pattern of the leaves of *Mimosa pudica*. *Journal of Bionic Engineering*, v. 4, p. 19-23, 2007.
- POLIDO, C. A.; SARTORI, A. L. B. O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae-Dalbergieae) no Pantanal Brasileiro. *Rodriguésia*, v. 58, n. 2, p. 313-329, 2007.
- POTT, A.; POTT, V. J. Features and conservation of the Brazilian Pantanal wetland. *Wetlands Ecology and Management*, n. 12, p. 547-552, 2004.
- RIVERA-ARCE, E.; CHÁVEZ-SOTO, M. A.; HERRERA-ARELLANO, A.; ARZATE, S.; AGÜERO, J.; FERIA-ROMERO, I. A.; CRUZ-GUZMÁN, A.; LOZOYA, X. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extracts in venous leg ulceration treatment. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 109, p. 523-528, 2007.
- SILVA, J. S. V.; ABDON, M. M. Delimitação do Pantanal Brasileiro e suas sub-regiões. *Pesquisas Agropecuária Brasileira*, v. 33, p. 1703-1711, 1998.
- UEDA, M.; NAKAMURA, Y. Metabolites involved in plant movement and "memory": nyctinasty of legumes and trap movement in the *Venus* flytrap. *Natural Products Reports*, v. 23, p. 548-557, 2006.
- UEDA, M.; YAMAMURA, S. The chemistry of leaf-movement in *Mimosa pudica* L. *Tetrahedron*, v. 55, p. 10937-10948, 1999.

- UHART, M. M.; VILA, A. R.; BEADE, M. S.; BALCARCE, A.; KARESH, W. B. Health evaluation of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos Del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 39, n. 4, p. 887-893, 2003.
- VIEIRA, E. L.; De CARVALHO, F. F. R.; BATISTA, A. M. V.; FERREIRA, R. L. C.; Dos SANTOS, M. V. F.; LIRA, M. A.; Da SILVA, M. J.; Da SILVA, E. M. B. Composição química de forrageiras e seletividade de bovinos em Bosque-de-Sabiá (*Mimosa ceasalpiniifolia* Benth.) nos períodos chuvoso e seco. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 34, n. 5, p. 1505-1511, 2005.
- WANG, E. T.; ROGEL, M. A. ; Dos SANTOS, A. G.; MARTINEZ-ROMERO, J.; CEVALLOS, M. A.; MARTINEZ-ROMERO, E. *Rhizobium etli* bv. *Mimosae*, a novel biovar isolated from *Mimosa affinis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*, v. 49, p. 1479-1491, 1999.
- WEBER, M.; GONZALES, S. Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. *Écoscience*, v. 10, n. 4, p. 443-454, 2003.
- YUSUF, U. K.; ABDULLAH, N.; BAKAR, B.; ITAM, K.; ABDULLAH, F.; SUKARI, M. A. Flavonoid glycosides in the leaves of *Mimosa* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 443-445, 2003.



## *Objetivos*



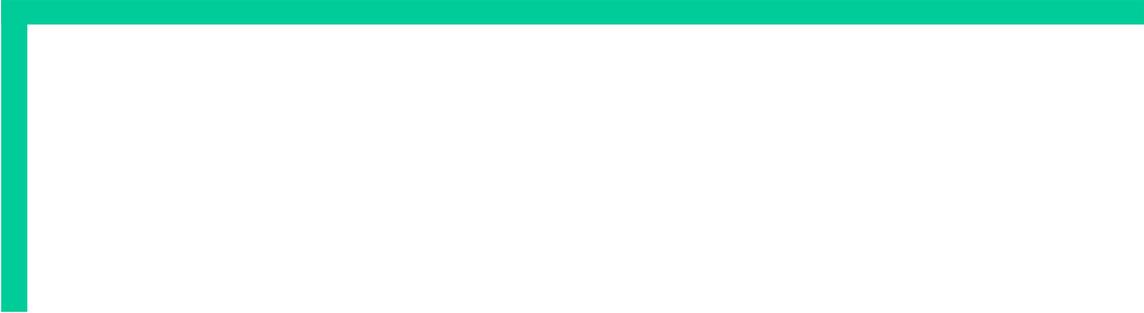
A inexistência de estudos químicos sobre *Mimosa xanthocentra* - uma planta da dieta de dois mamíferos ameaçados de extinção no Pantanal (cervos-do-pantanal e veados-campeiros) e pertencente a um gênero medicinal - e as propriedades antivirais reveladas nos ensaios de triagem anteriores justificaram o presente trabalho, cujos objetivos encontram-se abaixo descritos.

## OBJETIVO GERAL

Conhecer a composição química de uma planta consumida por cervídeos no Pantanal e avaliar os possíveis efeitos benéficos que poderiam surgir da ingestão dessa espécie vegetal, através de ensaios focalizando alguns vírus de importância na saúde humana e veterinária.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❑ Realizar um estudo fitoquímico das partes aéreas de *M. xanthocentra*, tendo como enfoque o isolamento e a caracterização estrutural de flavonóides;
- ❑ Confirmar a atividade antiviral do extrato aquoso de *M. xanthocentra*, com enfoque em vírus herpes de importância humana e veterinária;
- ❑ Caracterizar as substâncias ativas presentes no extrato aquoso de *M. xanthocentra*, monitorado pela atividade anti-herpética;
- ❑ Avaliar os eventuais efeitos sinérgicos que surgem da combinação das substâncias encontradas no extrato aquoso de *M. xanthocentra*



## *Capítulo I*

---

### *Estudo Fitoquímico de Mimosa xanthocentra*



Vegetais, microorganismos e, em menor escala, animais são possuidores de um arsenal metabólico capaz de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias não relacionadas de forma direta à manutenção de suas vidas, mas capazes de estabelecer uma interface química entre o organismo produtor e o ambiente circundante, garantindo vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie, em seu ecossistema (DOS SANTOS, 2003; GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Essas substâncias, denominadas metabólitos secundários, estão diretamente envolvidas com a adequação do produtor a seu meio, atuando em aspectos como a defesa contra herbívoros e microorganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e participação na alelopatia. A produção e acumulação de metabólitos secundários estão restritas a um número limitado de organismos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, caracterizando-se como elementos de diferenciação e especialização (DOS SANTOS, 2003).

## FLAVONÓIDES: ASPECTOS QUÍMICOS E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA

Os flavonóides compreendem uma classe de metabólitos secundários, de baixo peso molecular, derivados da condensação de uma molécula de ácido cinâmico com três unidades de malonil-CoA, formando uma estrutura básica polifenólica do tipo C6-C3-C6 (DEWICK, 2002). Exceto pelo coral marinho *Echinophora lamellosa* e os fungos *Aspergillus candidus* e *Phallus impudicus*, apenas as plantas possuem a capacidade de biossintetizar estas substâncias (IWASHINA, 2000).

A diversidade estrutural dos flavonóides pode ser atribuída ao nível de oxidação e às variações na complexidade do esqueleto carbônico básico, promovida por reações de alquilação glicosilação ou oligomerização. As modificações no anel central (anel C; **Figura 13**) desses compostos levam à diferenciação dos flavonóides em classes distintas, sendo os principais representantes as chalconas, flavanonas, flavanonol, flavonas, flavonol, isoflavonas, flavan-3-ol e antocianidinas (TAHARA, 2007).

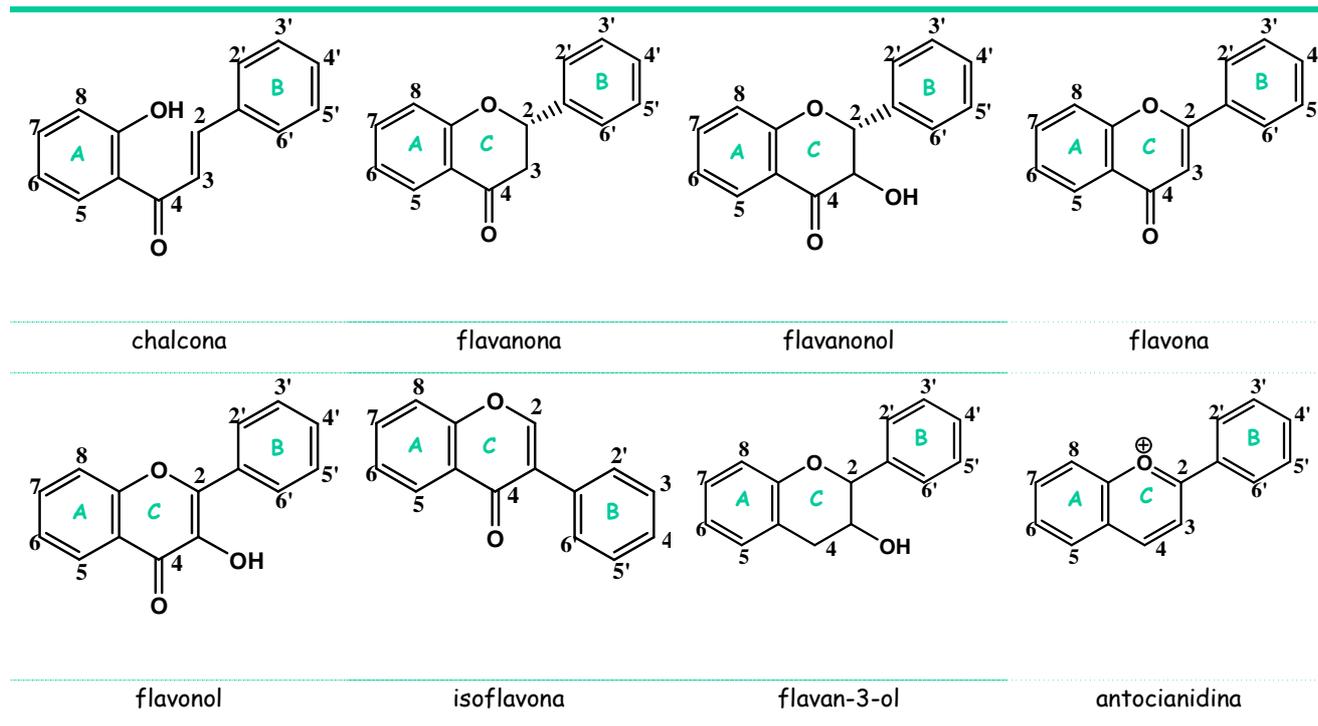


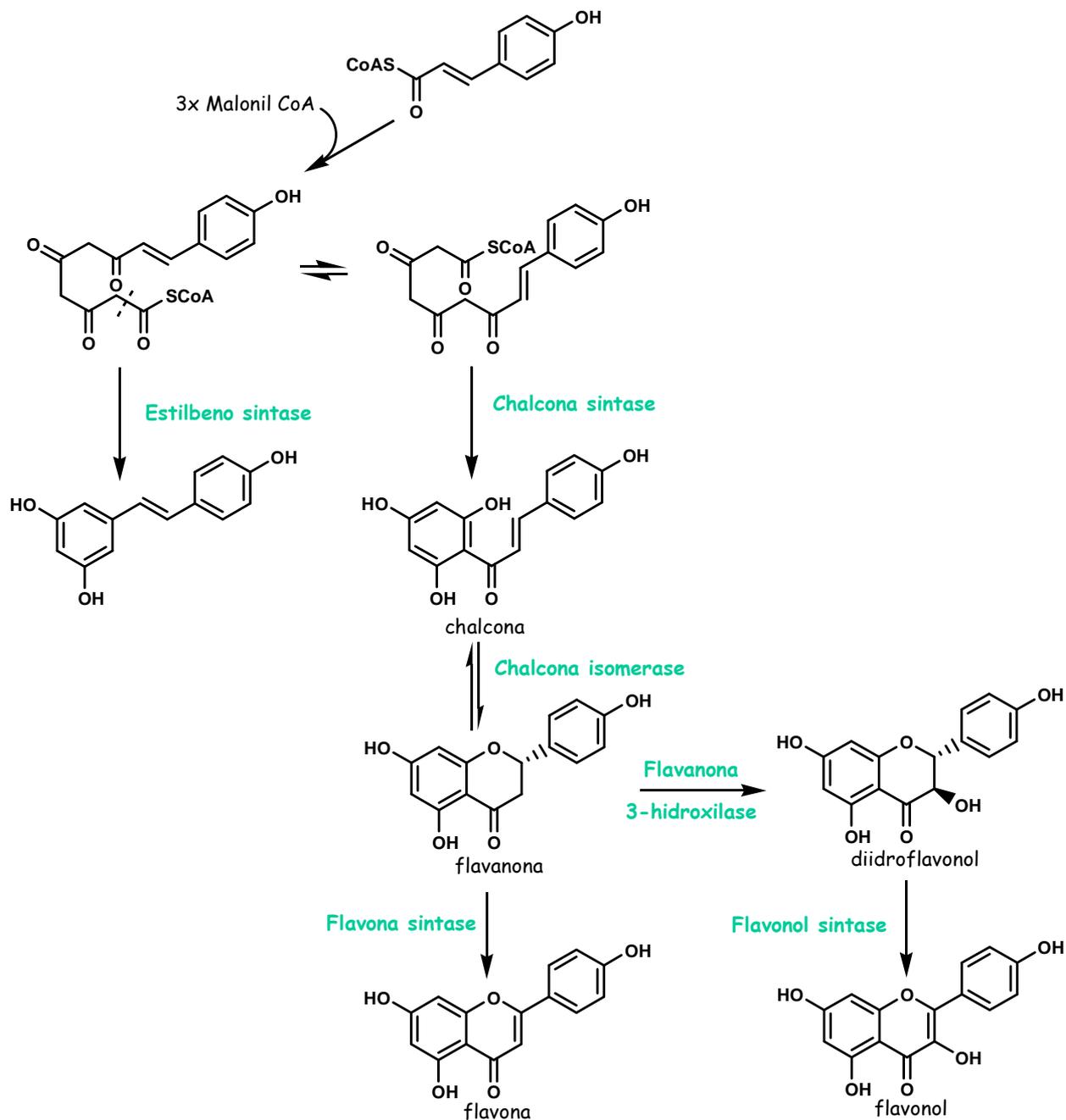
Figura 13: Alguns esqueletos básicos de flavonóides

Atualmente, são conhecidos aproximadamente 10 000 flavonóides diferentes. Estes podem ser encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, troncos, flores, chás e vinhos, representando um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (NIJVELDT *et al.*, 2001; ZUANAZZI & MONTANHA, 2003).

Diversas funções são atribuídas aos flavonóides nas plantas, como a proteção dos vegetais contra a incidência de raios ultravioleta (ação antioxidante e como filtro solar), proteção contra patógenos (bactérias, fungos e vírus) e herbivoria (inseticida), atuação na alelopatia e na sinalização química entre autótrofos e heterótrofos (simbiose, potogênese, alimentação e oviposição), controle da ação de hormônios vegetais, entre outros. A importância farmacológica desses compostos resulta, principalmente, de sua capacidade de modulação enzimática, gerando efeitos como neuro-estimulatório, analgésico, antitumoral, antibacteriano, antiviral, antialérgico, antiulcerogênico, entre outros (HARBORNE & WILLIAMS, 2000; ZUANAZZI & MONTANHA, 2003; TAHARA, 2007).

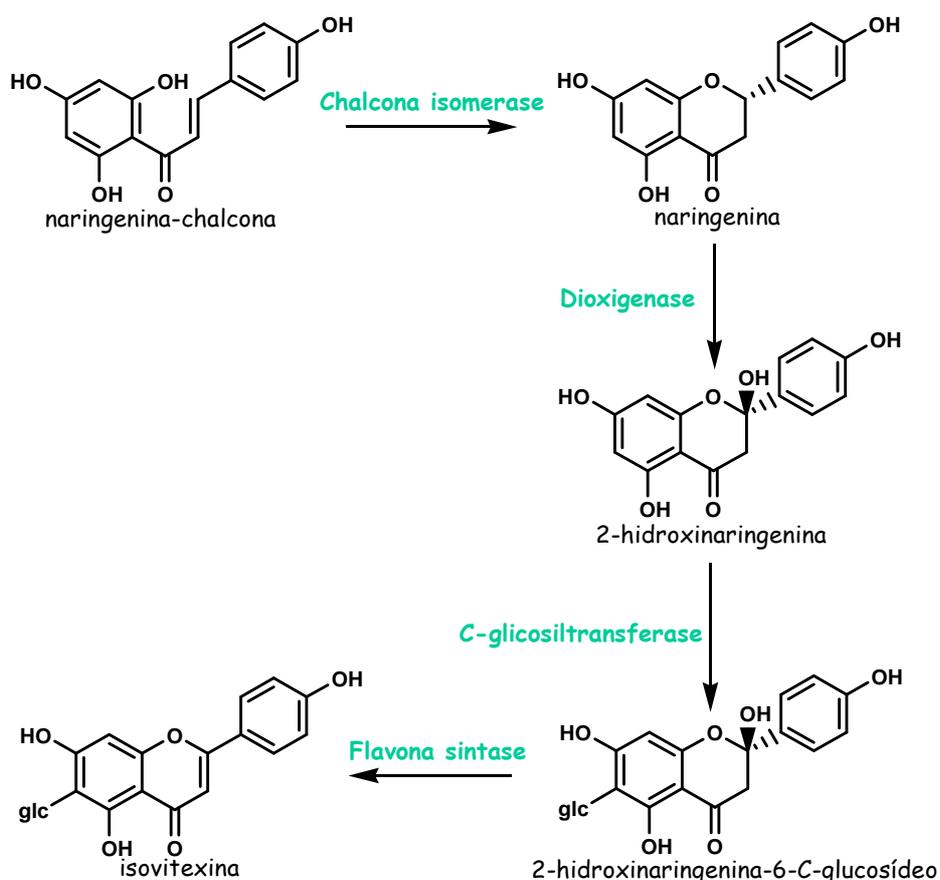
## Biossíntese de flavonóides

Segundo DEWICK (2002), a rota biossintética dos flavonóides pode ser esquematizada como mostra a **Figura 14**.



**Figura 14:** Rota biossintética de flavonas e flavonóis (adaptado de WINKEL-SHIRLEY, 2001; DEWICK, 2002).

As unidades de carboidrato são adicionadas após a completa biossíntese da aglicona, entretanto, no caso de *C*-glicosilflavonas, a adição do açúcar ocorre em uma etapa anterior à síntese da flavona, uma vez que o açúcar encontra-se diretamente ligado ao núcleo flavonoídico. Estudos indicam que a *C*-glicosilação ocorre após a oxidação da flavanona, mas a *C*-glicosiltransferase ainda não foi encontrada na natureza (**Figura 15**) (IWASHINA, 2000; MARINOVA *et al.*, 2007).



**Figura 15:** Rota biossintética da isovitexina (6-*C*-glicosilapigenina) (adaptado de MARINOVA *et al.*, 2007).

## ASPECTOS QUÍMICOS DO GÊNERO *Mimosa* L.

Apesar de nunca estudada quimicamente, *Mimosa xanthocentra* encontra-se inserida em um gênero para o qual já foram relatados o isolamento e caracterização de várias substâncias, como saponinas, alcalóides, terpenóides e, principalmente, flavonóides (LOBSTEIN *et al.*, 2002; DINDA *et al.*, 2006). A seguir serão apresentados os flavonóides descritos na literatura para espécies de *Mimosa*.

### Flavonóides em *Mimosa* L.

São poucos os estudos acerca da identificação de flavonóides em espécies de *Mimosa*, entretanto, um grande número de substâncias já foi isolado, compreendendo flavonóides da classe das flavonas, flavonóis, flavanonas e chalconas. Em relação às espécies investigadas, o maior número de trabalhos é atribuído à *Mimosa pudica*.

As espécies *M. pudica*, *M. longihirsuta*, *M. pigra* e *M. invisia* se encontram amplamente distribuídas na Malásia, onde são consideradas como plantas daninhas, devido à infestação de áreas de cultivo, beiras de estradas e terrenos abandonados. Em um estudo comparativo realizado com essas plantas, verificou-se que *M. pigra* e *M. invisia* são espécies intimamente relacionadas, apresentando um mesmo padrão flavonoídico. Foram relatados os isolamentos de agliconas (kaempferol; apigenina e acacetina) e glicosídeos de flavonol (quercetina 3-ramnosídeo; quercetina 3-rutinosídeo; quercetina 3,7-di-ramnosídeo; kaempferol 3-ramnosídeo; kaempferol 3,7-di-ramnosídeo) e flavona (luteolina 7-arabinosídeo) a partir dessas espécies (YUSUF *et al.*, 2003).

Em relação às demais espécies, os flavonóis kaempferol 7-rutinosídeo e kaempferol 3-glucosídeo-7-ramnosídeo foram identificados em *M. pudica*, enquanto o flavonol quercetina 3-glucosídeo-7-ramnosídeo foi obtido de *M. longihirsuta*. Estas duas espécies compartilham ainda os flavonóides quercetina 7-ramnosídeo, kaempferol-3-rutinosídeo, luteolina 3'-xilósídeo e acacetina 7-rutinosídeo. A aglicona 7-metoxiquercetina foi encontrada nas quatro espécies de *Mimosa* citadas acima (YUSUF *et al.*, 2003).

Dois espécimes de *M. pudica*, provenientes de Madagascar e da Colômbia, também foram comparados quimicamente, revelando que, apesar de se tratar das mesmas espécies vegetais, o ambiente tem uma ampla influência no tipo de flavonóide sintetizado. Para o

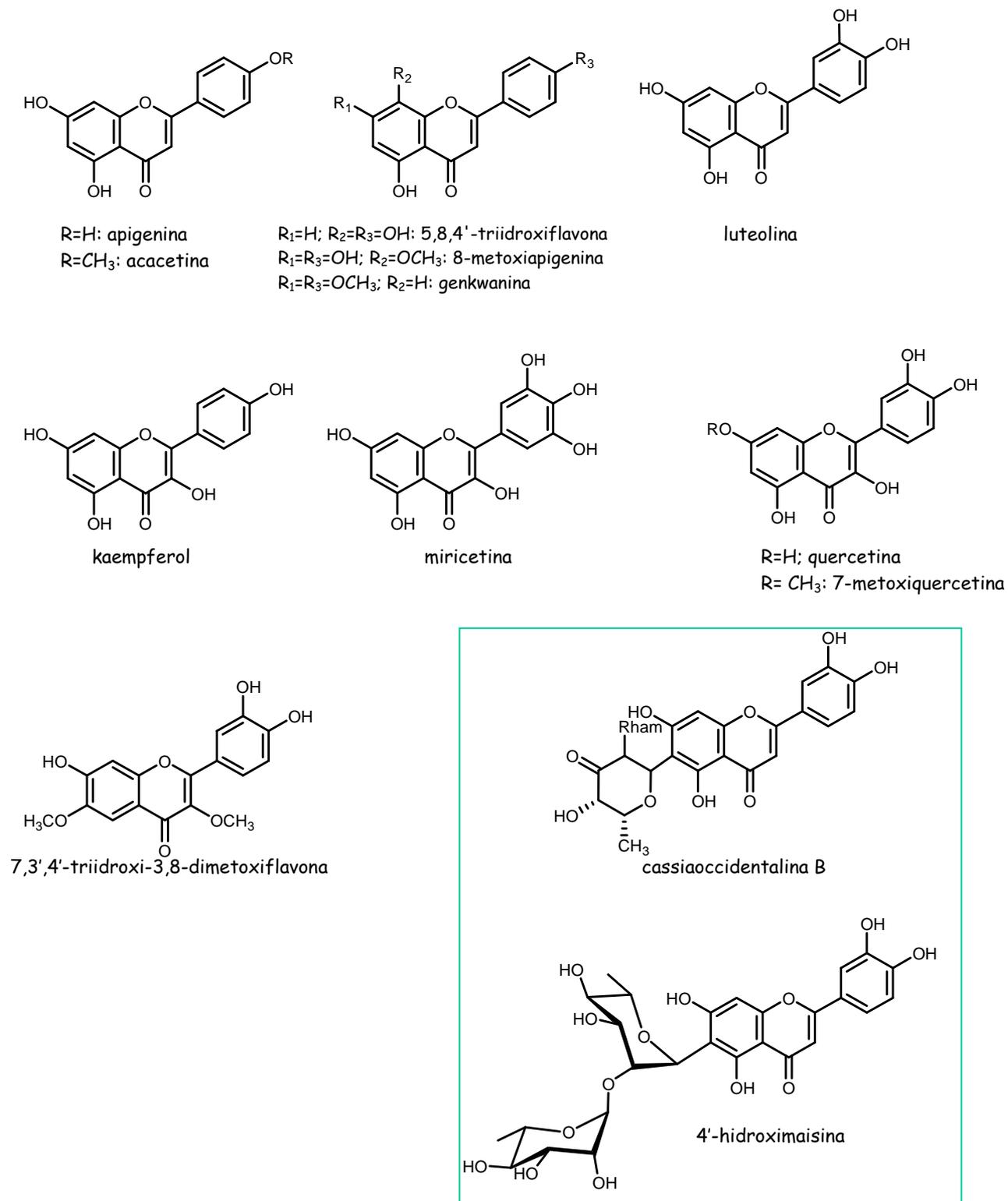
espécime coletado em Madagascar, foram identificados os flavonóides isoquercitrina, apigenina-7-glucosídeo, orientina, isoorientina e duas flavonas C-glicosídicas bastante raras, a 4'-hidroximaisina e cassiaoccidentalina B. Do espécime coletado na Colômbia foram obtidos os flavonóis miricetina, hiperina e quercitrina. O flavonol avicularina constitui a única substância comum aos dois espécimes. Entretanto, em nenhum desses exemplares foram identificadas as flavonas 2''-O-ramnosilorientina e 2''-O-ramnosilisoorientina, obtidas a partir de uma amostra de *M. pudica* coletada em Vanuatu (Melanésia, Oceania) (LOBSTEIN *et al.*, 2002).

Ainda em relação à *M. pudica*, também foi relatada a ocorrência de 7,3',4'-triidroxi-3,8-dimetoxiflavona. Trata-se de uma classe de flavonóides incomuns, em que a hidroxila em C-5 é perdida durante a biossíntese. Esses flavonóides foram observados em algumas espécies da família Leguminosae. Nesses casos observa-se a co-ocorrência de 5-hidroxi e 5-desoxiflavonóides como resultado de uma ação conjunta das enzimas chalcona redutase e chalcona sintase (KIRK *et al.*, 2003).

Recentemente, como parte de um estudo visando à obtenção de substâncias bioativas a partir de plantas medicinais brasileiras, procedeu-se à investigação fitoquímica das partes aéreas de *Mimosa hostilis* (jurema), resultando no isolamento de flavonóides e terpenóides. Em relação aos flavonóides, foram isoladas agliconas de flavona (5,8,4'-triidroxi-3,8-dimetoxiflavona; genkwanina; apigenina e 8-metoxiapigenina), flavanonas (4'-metoxinaringenina; 6-hidroxi-5,4'-dimetoxiflavanona, naringenina, sakuranetina e artocarpanona) e chalconas (isoliquiritingenina; 5,7-diidroxi-4'-metoxichalcona; 4'-metoxiisoliquiritingenina e 5,8,4'-triidroxichalcona) (OHSAKI *et al.*, 2006).

Outras chalconas também foram isoladas de espécies de *Mimosa*. Trata-se das kukulkaninas A e B, obtidas a partir de *M. tenuifolia*, uma planta usada historicamente no México para o tratamento de queimaduras e na prevenção de inflamação (DOMINGUEZ *et al.* 1989).

Na **Figura 16** encontram-se as estruturas das agliconas de flavonas e flavonóis encontradas em espécies de *Mimosa* L. Podem-se ainda observar as estruturas das duas flavonas C-glicosídicas raras que ocorrem nesse gênero.



**Figura 16:** Estruturas das agliconas de flavonas e flavonóis encontradas em espécies de *Mimosa*. Em destaque, a estrutura de cassiaoccidentalina B e 4'-hidroximaisina, duas flavonas raras isoladas de *M. pudica*.

## **MATERIAL VEGETAL**

As partes aéreas (folhas e caules) de *Mimosa xanthocentra* foram coletadas no Posto São Luiz, na Reserva Particular do Patrimônio Natural SESC-Pantanal (RPPN) (16° 41' 13.08"S; 56° 10' 29.89"O), Estado do Mato Grosso, Brasil. Uma amostra vegetal da espécie foi prensada e sua exsicata depositada e identificada no Herbário UPCB da Universidade Federal do Paraná, sob o registro número UPCB 48062, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Raquel Rejane Bonato Negrelle.

## **PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS**

A planta foi seca ao ar livre, cortada em pedaços pequenos e triturada. As partes aéreas secas e moídas foram extraídas, uma única vez, por decocção com água destilada (10% p/v). Após filtração em papel, os extratos foram congelados e liofilizados.

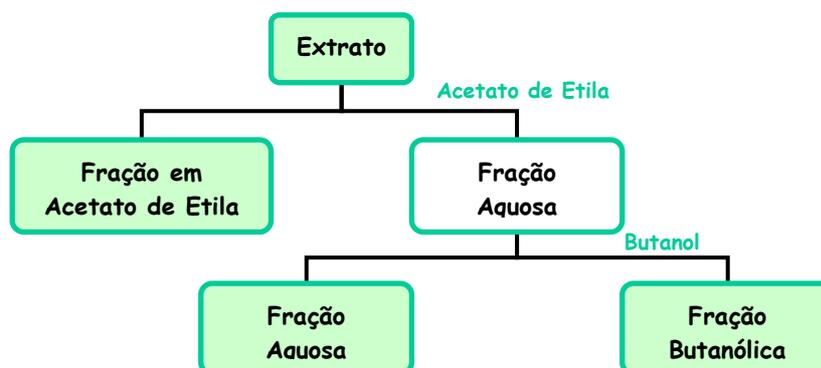
## **FRACIONAMENTO DO EXTRATO**

O fracionamento do extrato aquoso das partes aéreas de *M. xanthocentra*, visando o isolamento de flavonóides, foi feito com o auxílio de duas técnicas: partição com solventes orgânicos e cromatografia em coluna. Todos os processos de purificação foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD).

### **Partição com solventes orgânicos**

O extrato aquoso foi submetido a um processo de partição utilizando-se acetato de etila e *n*-butanol, em ordem crescente de polaridade. Este processo se baseia numa extração líquido-líquido, cuja separação ocorre por dissolução seletiva e distribuição entre as fases de dois solventes imiscíveis. As substâncias presentes no extrato são separadas em três faixas distintas de polaridade, obtendo-se uma fração em acetato de etila, uma fração butanólica e uma fração aquosa residual (**Esquema 1**). Na fração acetato de etila são separadas, em geral, moléculas de baixa e média polaridade, como por exemplo, ácidos graxos, flavonóides, terpenos e cumarinas. Já as moléculas de maior polaridade, como aquelas conjugadas com unidades de carboidratos, vão permanecer preferencialmente na

fase butanólica. Os carboidratos, aminoácidos e taninos, por exemplo, serão encontrados na fase aquosa residual (FALKENBERG *et al.*, 2004).



**Esquema 1:** Partição do extrato aquoso com solventes orgânicos.

### Cromatografia em coluna

Foram empregadas a cromatografia de adsorção em fase inversa, utilizando sílica silanizada RP-2 (70-230 mesh) ou RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ , Merck) e a cromatografia por exclusão molecular, utilizando gel Sephadex LH-20-100 lipofílico (25-100  $\mu\text{m}$ ; Sigma) ou gel Sephadex G-10 (40-120  $\mu\text{m}$ ; Pharmacia Fine Chemicals).

### Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Todos os processos de fracionamento e purificação foram monitorados por CCD utilizando sílica 60 F<sub>254</sub> em Alumínio (Merck) como suporte. As fases móveis utilizadas foram n-butanol / ácido acético / água (BAW) na proporção 8:1:1. Os cromatogramas foram visualizados sob luz ultravioleta em dois comprimentos de onda, 254 nm e 365 nm, e revelados com solução de sulfato cérico para detecção de substâncias fenólicas (especialmente flavonóides), seguidas de aquecimento (50° C) em chapa aquecedora Corning. Ao proceder à observação dos cromatogramas sob luz ultravioleta, as manchas referentes aos flavonóides mostram-se como manchas escuras em 254 nm e roxa, rosa ou avermelhada sob o comprimento de onda de 365 nm. Após revelação com sulfato cérico, as manchas referentes aos flavonóides revelam-se de amarelo a alaranjado (SABUDAK *et al.*, 2005).

## RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

Para elucidação estrutural das substâncias isoladas utilizaram-se espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , mono e bidimensionais, tendo como solvente deuterado o DMSO- $d_6$  utilizou-se os seguintes espectrômetros:

- Bruker DRX-400 ( $^1\text{H}$ : 400,14 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 100,61 MHz);
- Bruker DRX-300 ( $^1\text{H}$ : 300,13 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 75,48 MHz);

### Técnicas 2D utilizadas:

**COSY (CORrelation Spectroscopy)** - estabelece as correlações entre os hidrogênios que estão acoplados por duas ou três ligações ( $^{2-3}J_{\text{H,H}}$ ), geminais ou vicinais, possibilitando discernir a multiplicidade dos sinais observados no espectro de RMN  $^1\text{H}$  (NADJA *et al.*, 2005; KAISER, 2000).

**HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence)** - estabelece as correlações entre carbonos e hidrogênios diretamente ligados conectados ( $^1J_{\text{C,H}}$ ). O modo de detecção indireta fornece maior sensibilidade para a técnica, que gera espectros editados com o eixo horizontal correspondendo aos deslocamentos químicos dos hidrogênios ( $\delta_{\text{H}}$ ) e o eixo vertical correspondendo aos deslocamentos químicos dos carbonos ( $\delta_{\text{C}}$ ) (BREITMAIER, 2002; NADJA *et al.*, 2005).

**HSQC-ED (Heteronuclear Single Quantum Coherence - Editing)** - tem o mesmo aspecto de um HMQC, só que neste caso envolvendo transições quânticas simples e, além disso, é editado com os cruzamentos devidos a grupos  $\text{CH}_2$  em fase oposta a grupos  $\text{CH}$  e  $\text{CH}_3$ , como em um DEPT 135 (KAISER, 2000).

**HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Coherence)** - estabelece as correlações entre hidrogênios e carbonos acoplados à longa distância ( $^{2-3}J_{\text{C,H}}$ ). Assim como o HMQC, o modo de detecção indireta aumenta a sensibilidade do experimento. O espectro é apresentado com o eixo horizontal correspondendo aos  $\delta_{\text{H}}$  e o eixo vertical correspondendo aos  $\delta_{\text{C}}$  (BREITMAIER, 2002; NADJA *et al.*, 2005).

## MODELAGEM MOLECULAR

Os cálculos foram realizados em software CS Chem3D Pro, alternando simulações de dinâmica molecular e minimização de campo de força molecular MM2.

## PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO

No estudo fitoquímico de *M. xanthocentra*, foram utilizadas duas coletas de material vegetal (folhas e caules), em dois períodos de seca (junho de 2002 e setembro de 2003). O material vegetal obtido em cada coleta foi processado separadamente para preparação dos extratos.

**Tabela 4:** Dados da coleta de *M. xanthocentra*

Código	Período da Coleta	Massa de Material Vegetal Seco
MxA	Junho 2002	367,8 g
MxB	Setembro 2003	32,0 g

O extrato aquoso foi obtido através da decocção a 10% (p/v) das partes aéreas secas e moídas da planta. Neste processo, o material vegetal é colocado em contato com a água em aquecimento. Após 10 minutos em água fervente com constante agitação, o aquecimento é retirado e a preparação é deixada em repouso até seu resfriamento à temperatura ambiente. Uma vez filtrados, os extratos tiveram seu volume reduzido por evaporação em banho-maria, foram congelados e liofilizados.

Os extratos referentes às duas coletas foram cromatografados em CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), buscando-se os flavonóides. Nestas condições, ambos apresentaram o mesmo padrão de cromatograma, sendo observados dois flavonóides majoritários ( $R_f$ s iguais a 0,56 e 0,68), além de manchas flavonoídicas minoritárias.

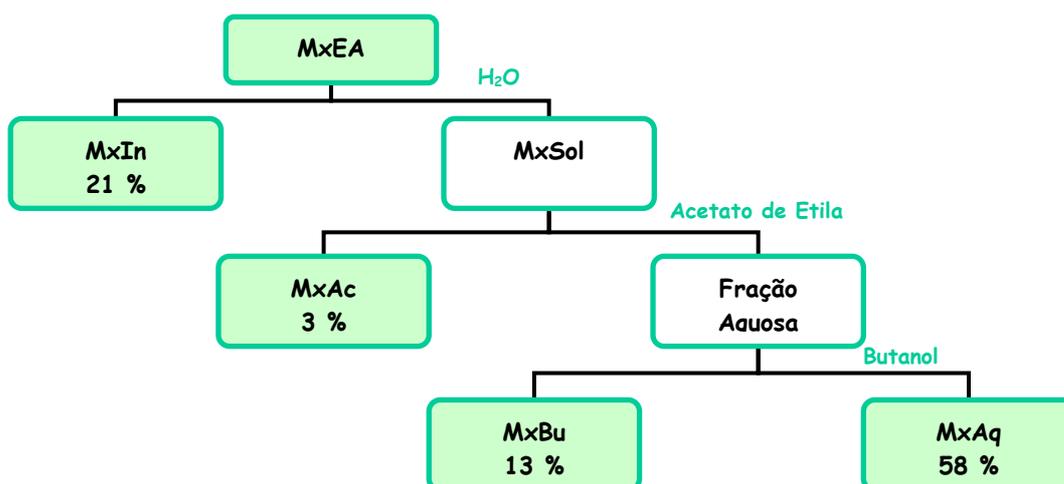
O perfil flavonoídico semelhante possibilitou a união dos extratos, obtendo-se assim 27,6 g de extrato aquoso, codificado como **MxEA** (Extrato Aquoso de *M. xanthocentra*). 2,0 g de **MxEA** foram separados para análises de perfil químico e atividade biológica.

### Fracionamento de MxEA

**MxEA** (25,6 g) foi ressuspenso em água destilada, porém, parte do extrato permaneceu insolúvel. As frações insolúvel (**MxIn**; 5,37 g) e solúvel (**MxSol**; 20,2 g) foram separadas por centrifugação.

**MxSol** foi particionada sucessivamente com acetato de etila e butanol, em ordem crescente de polaridade, obtendo-se três frações: **MxAc** (acetato de etila; 816,3 mg), **MxBu** (butanólica; 3,33 g) e **MxAq** (aquosa residual; 14,87 g). Para o cálculo do rendimento, todas as frações foram liofilizadas. Separou-se uma amostra de 100 mg de cada fração para análises de perfil químico e atividade biológica.

O **Esquema 2** resume o processo de partição de **MxEA**, com os rendimentos individuais de cada fração, em relação a **MxEA**.



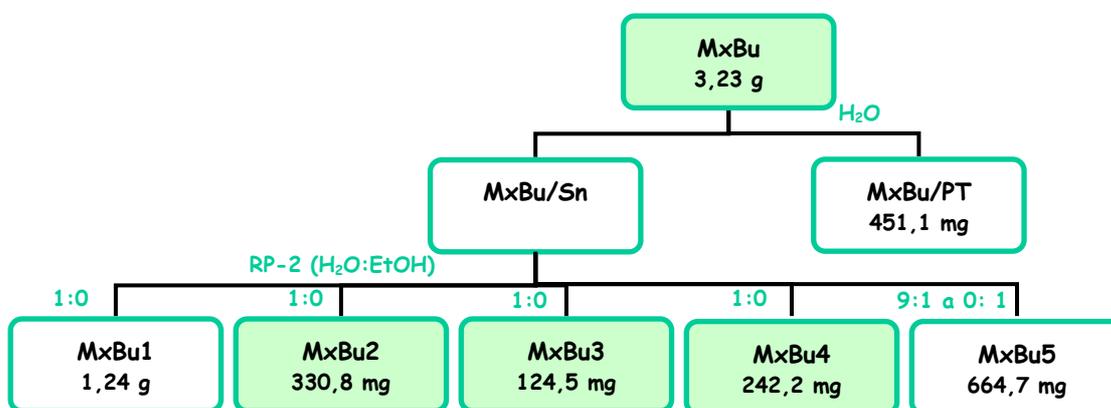
**Esquema 2:** Fracionamento de **MxEA**

Todas as frações obtidas a partir deste processo foram analisadas por CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), verificando-se que os flavonóides majoritários do extrato permaneceram preferencialmente na fração butanólica. Parte dos flavonóides majoritários e outros flavonóides minoritários de média e baixa polaridade (*R<sub>f</sub>*s entre 0,68 e 0,88) são encontrados na fração em acetato de etila.

## FRACIONAMENTO DE MxBu

MxBu foi solubilizada em água destilada, com formação de um precipitado marrom claro (MxBu/PT). A fração hidrossolúvel (MxBu/Sn) foi cromatografada em coluna de sílica de fase inversa RP-2 (29 x 2,8 cm; gradiente H<sub>2</sub>O/EtOH) fornecendo 5 frações (Esquema 3). Em MxBu2 e MxBu3, segundo perfil em CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), foi verificada a presença de dois flavonóides majoritários (R<sub>f</sub> 0,56 e 0,68), enquanto em MxBu4 observou-se apenas o flavonóide de R<sub>f</sub> 0,56. Uma terceira mancha flavonoídica (R<sub>f</sub> 0,41) foi observada em MxBu2.

O Esquema 3 resume o processo de fracionamento de MxBu, com as massas obtidas e o gradiente H<sub>2</sub>O/EtOH em que cada fração foi eluída.



Esquema 3: Fracionamento de MxBu

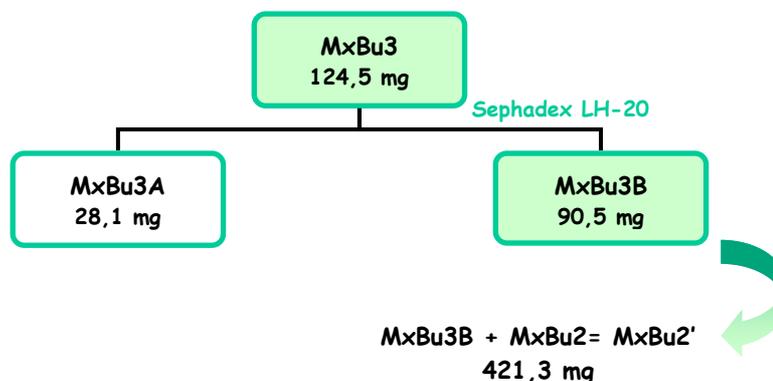
## FRACIONAMENTO DE MxBu3

O perfil cromatográfico de MxBu3, observado em CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), mostrou a presença de duas manchas majoritárias características de flavonóides (R<sub>f</sub> 0,56 e 0,68), além de manchas de menor intensidade relativas a substâncias não-flavonoídicas. Na tentativa de purificar os flavonóides aí presentes, esta fração foi submetida a uma cromatografia em coluna Sephadex LH-20 (22 x 2,5 cm; eluição com EtOH). Foram obtidas 2 subfrações: MxBu3A e MxBu3B (fração flavonoídica).

Após purificação, MxBu3B foi comparada a MxBu2 por CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico). Devido ao perfil cromatográfico bastante semelhante (o flavonóide de R<sub>f</sub> 0,41

contido nesta última era bastante minoritário), **MxBu3B** e **MxBu2** foram unidas e codificadas como **MxBu2'**.

O **Esquema 4** resume o processo de purificação de **MxBu3** e união de **MxBu2** e **MxBu3B**, com as massas de cada fração obtida.



**Esquema 4:** Fracionamento de **MxBu3**

## FRACIONAMENTO DE **MxBu2'**

**MxBu2'** foi fracionada em coluna de fase inversa RP-2 (24,0 x 1,4 cm; H<sub>2</sub>O/MeOH), originando 4 frações (**Esquema 5**). Por meio de análise por CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), foi verificada em **MxBu2'B** a presença dos flavonóides de *R<sub>f</sub>* 0,56 e 0,68, sendo o segundo o majoritário da fração. Em **MxBu2'C** só foi observada a presença do flavonóide de *R<sub>f</sub>* 0,56, enquanto que nas demais frações não são encontradas flavonóides.

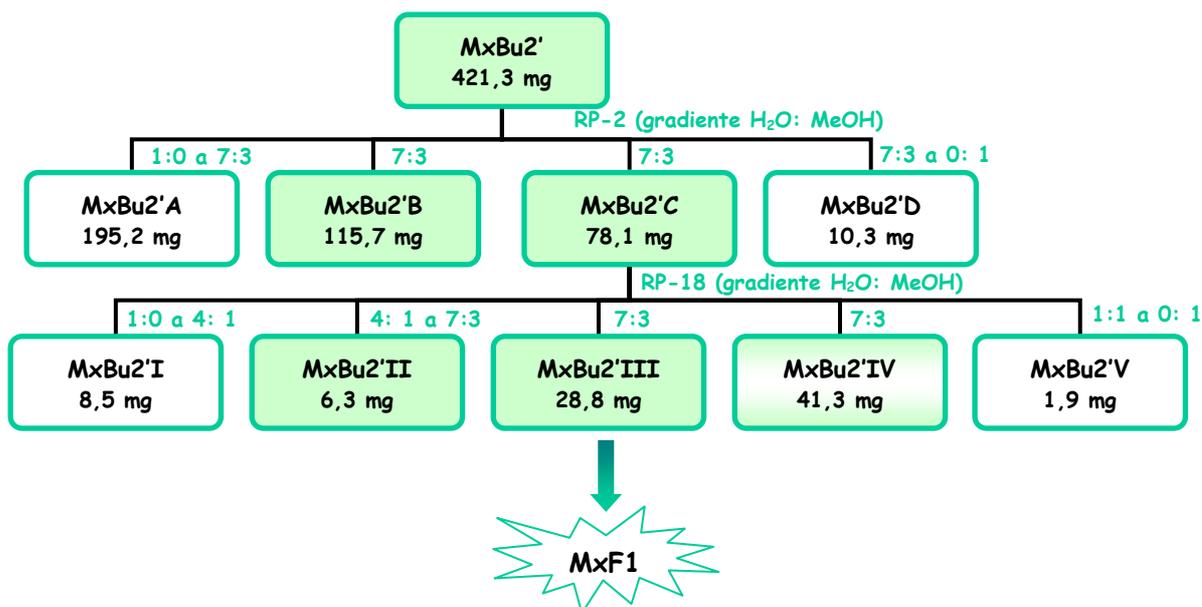
O fracionamento de **MxBu2'** encontra-se resumido no **Esquema 5**.

## ISOLAMENTO DE **MxF1**

O perfil cromatográfico de **MxBu2'C** (78,1 mg), observado em CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), indicava a presença de apenas 1 flavonóide (*R<sub>f</sub>* 0,56), além de manchas não-flavonoídicas. Visando a purificação do flavonóide aí presente, este foi submetido a uma cromatografia em coluna de sílica de fase inversa RP-18 (23 x 1,2 cm; gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH), originando 5 frações (**Esquema 5**). Em **MxBu2'II** ainda foi verificada a presença do flavonóide de *R<sub>f</sub>* 0,68, enquanto que em **MxBu2'IV** observou-se o flavonóide de *R<sub>f</sub>* 0,56, além de outras substâncias não-flavonoídicas. Em **MxBu2'III** foram obtidos 28,8

mg do flavonóide de  $R_f$  0,56 puro. Este foi codificado como **MxF1**, o primeiro flavonóide isolado de *M. xanthocentra*, e submetido às análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , experimentos mono e bidimensionais.

No **Esquema 5** encontra-se resumido o processo de obtenção de **MxF1**, com as massas das frações obtidas a partir da cromatografia em coluna RP-18 e o gradiente em que cada fração foi eluída.



**Esquema 5:** Fracionamento de **MxBu2'** e isolamento de **MxF1**

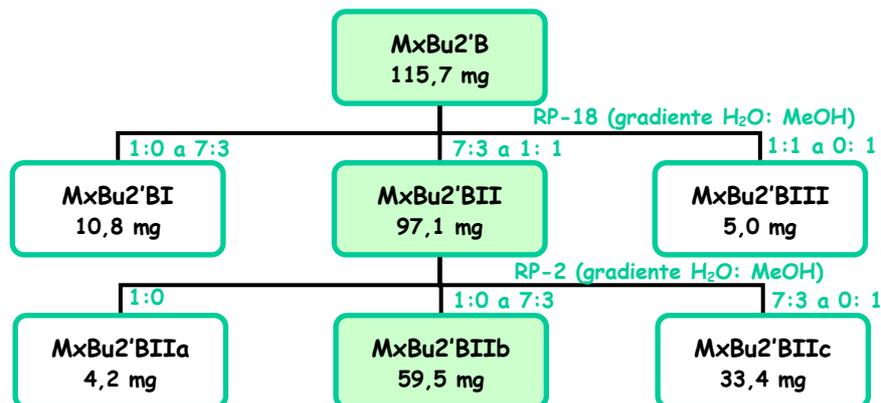
## FRACIONAMENTO DE **MxBu2'B**

Na tentativa de separar os dois flavonóides presentes em **MxBu2'B**, esta amostra foi cromatografada em coluna de fase inversa RP-18 (28,5 x 1,2 cm; gradiente  $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ ), fornecendo 3 frações (**Esquema 6**). Apenas na segunda fração (**MxBu2'II**) pôde ser observada a presença de flavonóides, segundo análise por CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico). Esta coluna mostrou-se ineficiente em separar os dois flavonóides principais de **MxBu2'B**, porém permitiu uma maior purificação da fração flavonoídica.

Analisando o perfil cromatográfico de **MxBu2'II** por CCD, ainda foi possível detectar a presença de manchas não-flavonoídicas. Visando uma maior purificação desta fração, esta foi re-cromatografada em coluna de sílica de fase inversa RP-2 (24,0 x 1,4 cm;

gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH), dando origem a três subfrações (**Esquema 6**), sendo que apenas na segunda (**MxBu2'BIIb**) foi observada a presença de flavonóides.

A marcha para fracionamento de **MxBu'B**, as massas das frações e o gradiente em que cada fração foi eluída encontram-se expostas no **Esquema 6**.

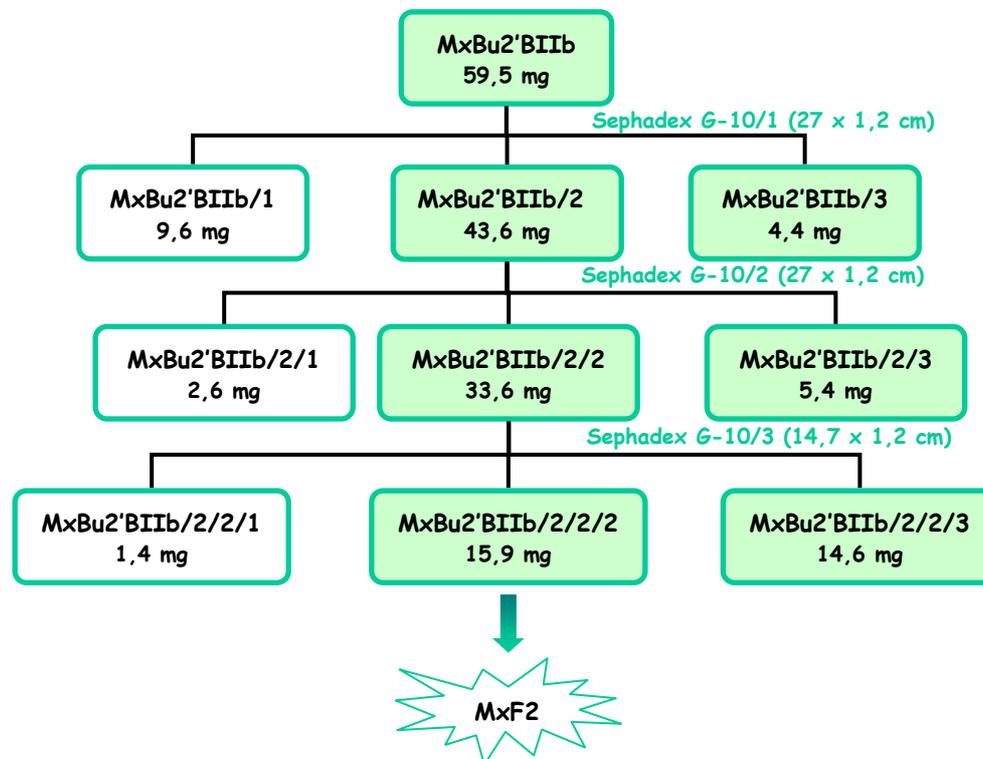


**Esquema 6:** Fracionamento de **MxBu2'B**

## ISOLAMENTO DE MxF2

Para isolamento do segundo flavonóide majoritário de *M. xanthocentra*, codificado como **MxF2** (*R<sub>f</sub>* 0,68), a partir de **MxBu2'IIb**, foram realizadas três cromatografias em coluna Sephadex G-10 (27,0 x 1,2 cm) sucessivas, todas utilizando água como eluente. Este tipo de suporte cromatográfico foi muito eficiente ao promover uma maior purificação da fração flavonoídica que, mesmo após sucessivas cromatografias em coluna de fase inversa, continuava apresentando impurezas (manchas não-flavonoídicas observadas em CCD-BAW 8:1:1; sulfato cérico), mostrando eficiência também em separar os dois flavonóides majoritários de *R<sub>f</sub>*s tão próximos. As segundas frações de cada coluna encontram-se sempre enriquecidas em **MxF2**, porém até a segunda coluna ainda pode ser detectada a presença de **MxF1** nesta fração. Através da terceira coluna, foi possível separar parte de **MxF2** de **MxF1**, o que é observado quando se analisa **MxBu2'BIIb/2/2/2** por CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico). Em **MxBu2'BIIb/2/2/3** ainda são detectados traços de **MxF1** e outras substâncias não flavonoídicas.

O **Esquema 7** sumariza todas as cromatografias em coluna Sephadex G-10 realizadas, culminando com o isolamento do flavonóide **MxF2**.



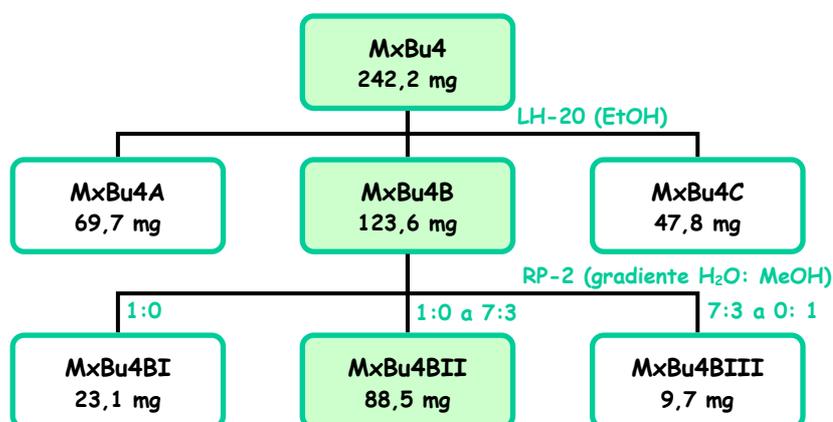
**Esquema 7:** Marcha para isolamento de **MxF2**

## FRACIONAMENTO DE **MxBu4**

O cromatograma obtido por CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico) de **MxBu4**, revelou que esta fração era composta majoritariamente por **MxF1** ( $R_f$  0,56). Na tentativa de purificar o flavonóide aí presente e obter mais massa de **MxF1**, esta fração foi cromatografada em coluna Sephadex LH-20 (18,5 x 1,2 cm; eluição com EtOH), fornecendo 3 subfrações (**Esquema 8**). Após esse processo, foi possível observar em **MxBu4B** a presença de **MxF2** ( $R_f$  0,68) e outras substâncias não-flavonoídicas juntamente com **MxF1**.

Levando-se em conta a ineficiência da cromatografia anterior em purificar e separar os flavonóides contidos em **MxBu4**, **MxBu4B** foi re-cromatografada em coluna de sílica de fase inversa RP-2 (24,0 x 1,4 cm; gradiente H<sub>2</sub>O/MeOH), originando 3 frações (**Esquema 8**). O conjunto flavonoídico **MxBu4BII**, contendo **MxF1** e **MxF2**, mostrou-se com maior grau de pureza, segundo análise por CCD.

O **Esquema 8** resume o processo de fracionamento e purificação de **MxBu4**, com as massas das frações e o gradiente de solvente em que cada fração foi obtida.

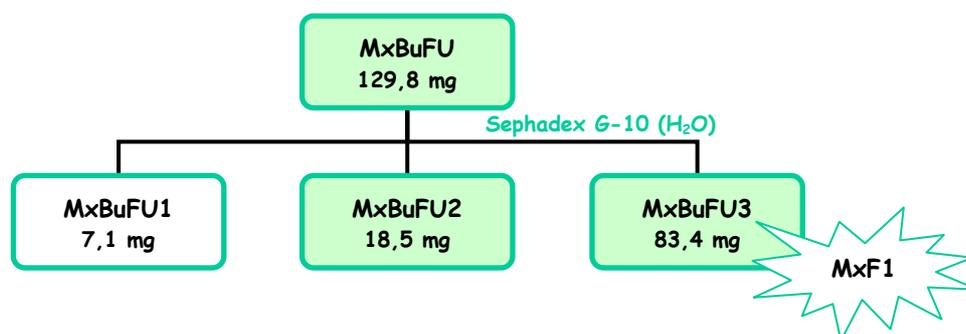


**Esquema 8:** Fracionamento de **MxBu4**

## FRACIONAMENTO DE **MxBuFU** e RE-ISOLAMENTO DE **MxF1**

**MxBu4BII** foi comparado a outras frações remanescentes de colunas anteriores através de CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico). **MxBu4BII** e **MxBu2'IV**, de perfis cromatográficos semelhantes, foram unidas e codificadas como **MxBuFU** (união de subfrações provenientes da fração butanólica).

Visando o isolamento de mais massa de **MxF1**, a fração **MxBuFU** foi cromatografada em coluna Sephadex G-10 (27,0 x 1,2 cm; eluição com H<sub>2</sub>O), originando 3 sub-frações (**Esquema 9**). Em **MxBuFU2**, segundo CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), foi detectada a presença de pelo menos dois flavonóides (*R<sub>f</sub>* 0,56 e 0,68), juntamente com outras substâncias de carácter não-flavonoídico, enquanto que em **MxBuFU3** observou-se apenas a presença de **MxF1**.



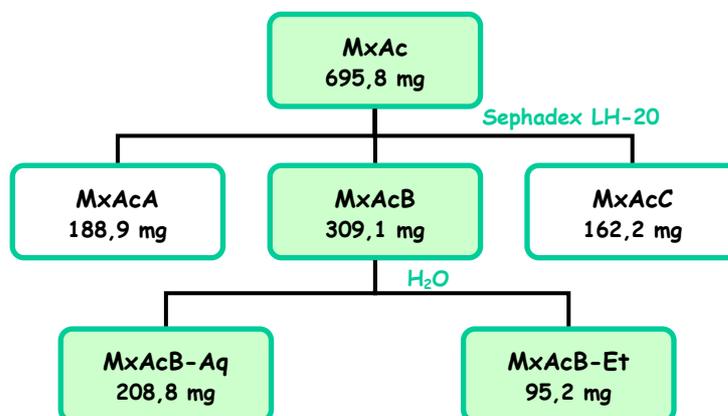
**Esquema 9:** Fracionamento de **MxBuFU**

## FRACIONAMENTO DE $MxAc$

Para uma primeira purificação, a fração em acetato de etila ( $MxAc$ ) foi fracionada em coluna Sephadex LH-20 (22 x 2,5 cm; eluição com EtOH), originando três subfrações (**Esquema 10**). Apenas em  $MxAcB$ , segundo análise por CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), foi verificada a presença de flavonóides.

$MxAcB$ , após liofilização, foi ressuspensa em água destilada. Parte do material permaneceu insolúvel, formando duas novas frações:  $MxAcB-Aq$  (fração hidrossolúvel) e  $MxAcB-Et$  (fração etanólica).

No **Esquema 10** encontra-se resumido o fracionamento de  $MxAc$  com as massas das frações obtidas através deste processo.



**Esquema 10:** Fracionamento de  $MxAc$

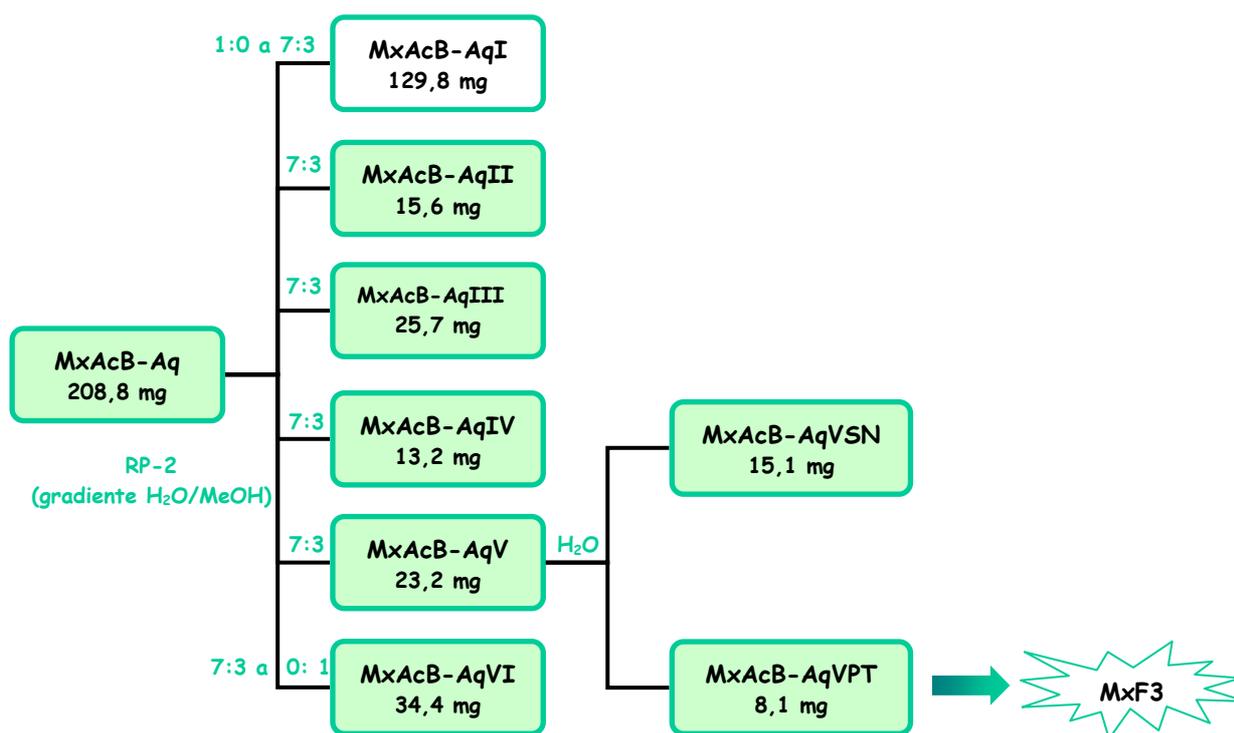
## ISOLAMENTO DE $MxF3$

A fração  $MxAcB-Aq$  foi cromatografada em coluna de sílica de fase inversa RP-2 (24,0 x 1,4 cm; gradiente  $H_2O/MeOH$ ) fornecendo 6 frações (**Esquema 11**). Da segunda a sexta frações foram encontrados flavonóides de perfis cromatográficos em CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico) bastante diferentes e variáveis ( $R_f$  entre 0,56 e 0,98). Todos os conjuntos foram liofilizados para quantificação.

Ao ressuspender  $MxAcB-AqV$  em água, houve a formação de um precipitado amarelo. Estes cristais ( $MxAcB-AqVPT$ ) foram separados por centrifugação, lavados exaustivamente com água destilada e comparados com o sobrenadante ( $MxAcB-AqVSN$ ) por CCD (BAW 8:1:1; sulfato cérico), mostrando tratar-se de um flavonóide puro de  $R_f$

0,86. Este flavonóide foi codificado como **MxF3**, o terceiro flavonóide isolado de *M. xanthocentra*. Em **MxAcB-AqVSN**, quando analisado por CCD, ainda foram encontrados traços de **MxF3**, juntamente com um segundo flavonóide de Rf 0,73.

O **Esquema 11** sumariza todas as etapas para isolamento do flavonóide **MxF3**, juntamente com as massas e o gradiente de solvente em que cada fração foi obtida através da cromatografia em coluna de sílica RP-2.



**Esquema 11:** Marcha para isolamento de **MxF3**

## ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE MxF1

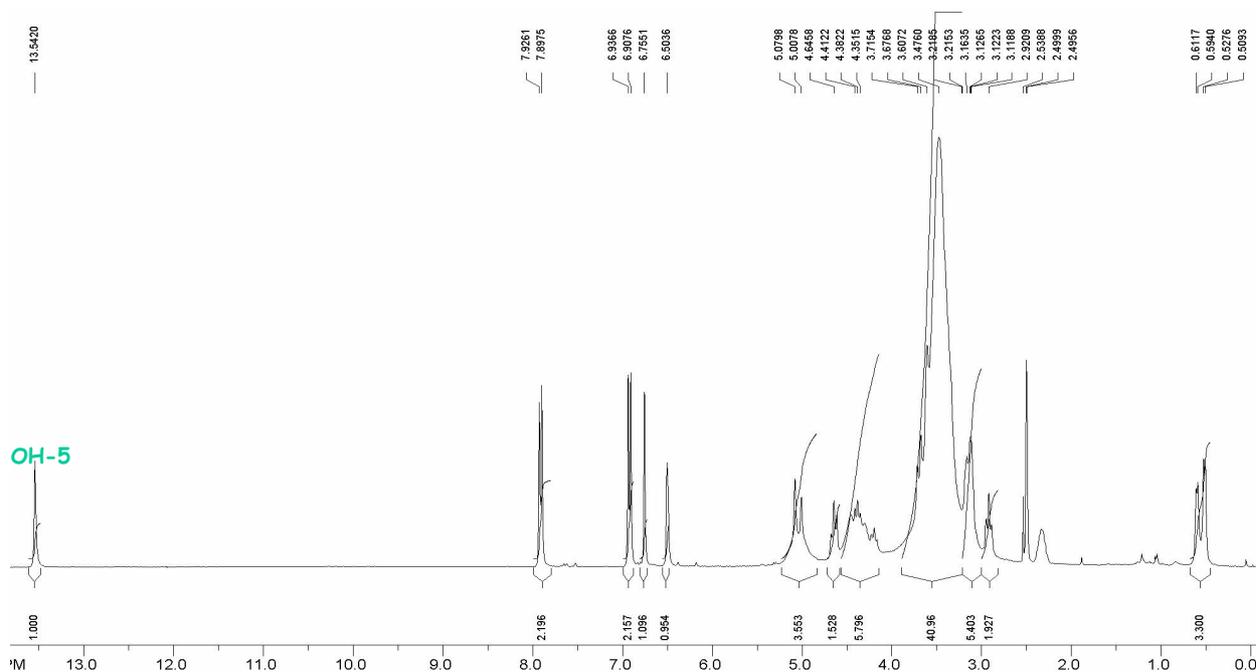
O flavonóide codificado como **MxF1** (28,8 mg; Rf 0,56; BAW 8:1:1), isolado da fração butanólica proveniente da partição do extrato aquoso de *Mimosa xanthocentra*, apresentou-se como um pó amorfo amarelo.

A proposta estrutural para **MxF1** foi baseada nos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, COSY, HMQC e HMBC obtidos em DMSO- $d_6$  (concentração: 48,0 mg/ml).

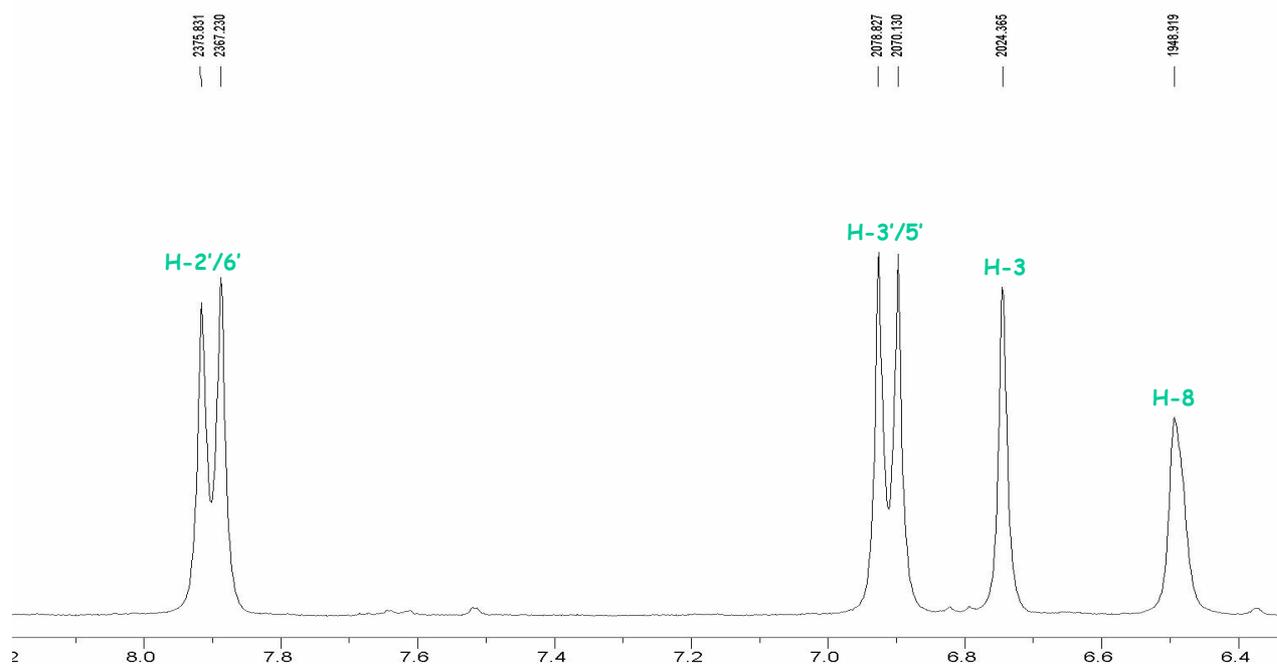
### RMN de $^1\text{H}$

Analisando-se o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para **MxF1** (**Espectro 1**) podemos observar sinais compatíveis para um flavonóide de natureza glicosídica (aglicona + carboidrato).

O sinal mais deslocado do espectro (simpleto; 13,54 ppm) corresponde ao hidrogênio de uma hidroxila localizada na posição 5 do anel A da aglicona. Este se encontra em ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila na posição 4, aumentando a sua desblindagem. Na região entre 6,0 e 8,0 ppm encontram-se os hidrogênios de núcleos aromáticos, enquanto que na região entre zero e 5,5 ppm encontram-se os hidrogênios da porção glicídica da molécula.



**Espectro 1:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF1** (300 MHz). Parâmetros: NS 32, SWH 7788 Hz, TD 32768, REF TMS TEMP 27°C. TMS: tetrametilsilano (substância de referência).



**Espectro 2:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF1** (300 MHz). Expansão da região entre 6,0 ppm e 8,0 ppm. Parâmetros: NS 32, SWH 7788 Hz, TD 32768, REF TMS TEMP 27°C.

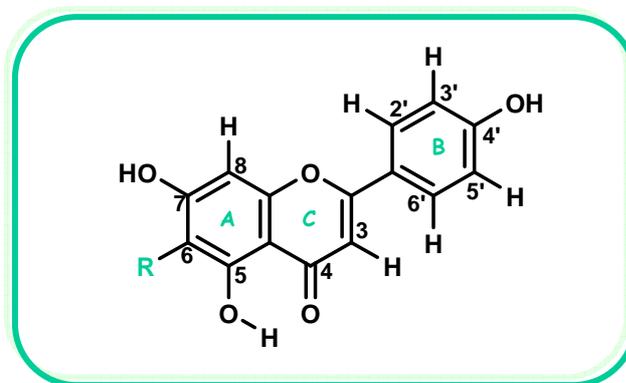
Os dupletos localizados em 6,92 ppm ( $J = 8,6$  Hz) e 7,91 ppm ( $J = 8,6$  Hz) (**Espectro 2**), com integração para dois hidrogênios cada um, são relativos aos hidrogênios do anel B da aglicona. As constantes de acoplamento na faixa de 8-9 Hz indicam uma correlação *orto* entre esses hidrogênios, revelando um padrão de anel aromático *para*-substituído (sistema tipo AA'XX'). Estes sinais são atribuídos respectivamente aos H-3'/5' e H-2'/6'. A equivalência em deslocamentos químicos ocorre devido à simetria apresentada por este anel, sendo característico de anel B substituído na posição 4' (padrão 4'-OH).

Em 6,75 ppm pode ser observado um simpleto característico de hidrogênio da posição 3 do anel C, indicando tratar-se de um flavonóide da classe das flavonas.

Para o anel A, além da presença de uma hidroxila em 5 (**Espectro 1**), foi observado um simpleto em 6,50 ppm (**Espectro 2**). Segundo MARKHAM & GEIGER (1994), um anel A 5,7-diidroxilado tem seus H-6 e H-8 com deslocamentos químicos na faixa de 6,16-6,25 ppm e 6,39-6,56 ppm, respectivamente. Hidroxilação, C-glicosilação ou C-alkilação em C-6 ou C-8 não causam alteração significativa no deslocamento químico do hidrogênio remanescente do anel A, enquanto que uma O-substituição em 7 é capaz de desblindar os

hidrogênios 6 e 8. Com base nesses dados, o sinal em 6,50 ppm é atribuído ao H-8 e a ausência de um segundo sinal entre 6,16-6,25 ppm indica uma substituição em C-6.

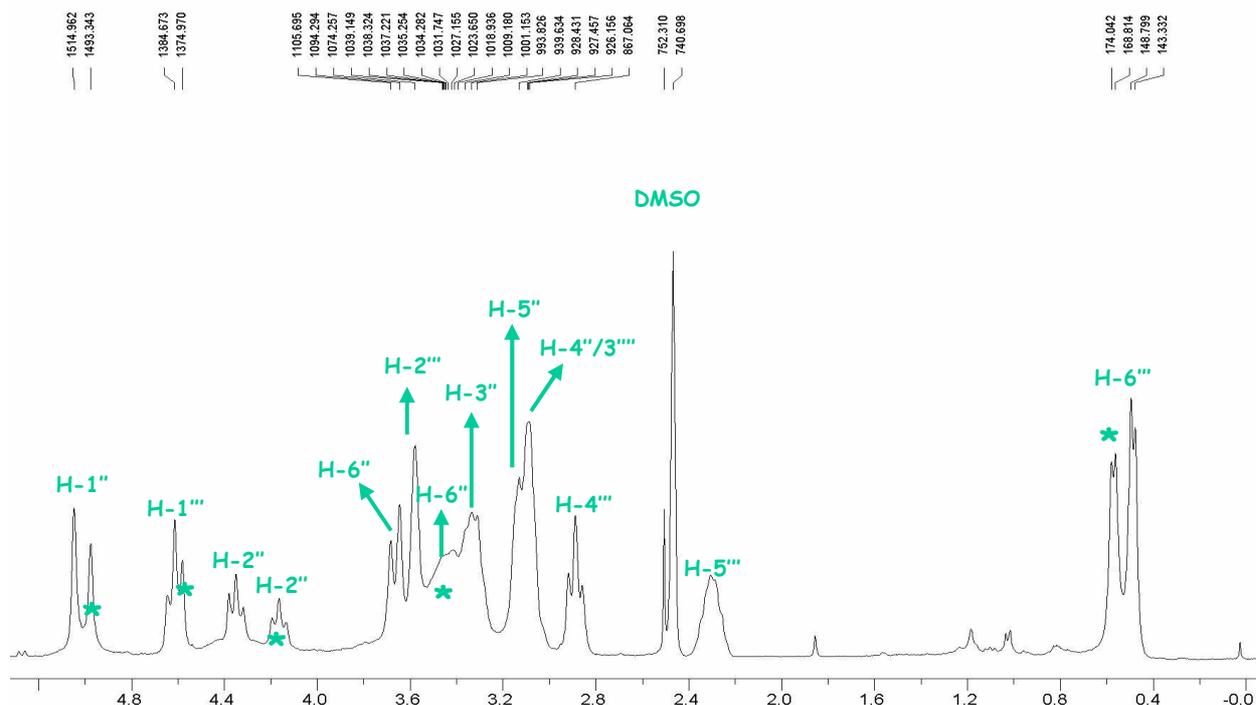
Esses dados permitem propor para a aglicona de **MxF1** a estrutura da apigenina (5,7,4'-triidroxiflavona; **Figura 17**), com substituição na posição 6 (anel A).



**Figura 17:** Estrutura da aglicona de **MxF1** (R = substituinte)

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para **MxF1** - principalmente na região entre zero e 5,0 ppm - assim como o espectro de  $^{13}\text{C}$ , discutido posteriormente, apresentam um elevado grau de complexidade devido à duplicidade de alguns sinais. Este fenômeno é decorrente da existência de dois isômeros rotacionais (rotâmeros) de **MxF1**, o que é comum em flavonas C-glicosiladas (RAYYAN *et al.*, 2005). O fenômeno de rotamerismo será abordado, em detalhes, mais adiante na seção **Atropoisomerismo em Flavonas C-glicosiladas**.

Na região do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  expandida no **Espectro 3** (zero - 5,0 ppm), encontram-se os hidrogênios referentes a duas unidades de carboidrato. São evidenciados dois sinais de hidrogênios anoméricos: um duplete em 4,64 ppm (visualizado como um tripleto devido à duplicidade), com deslocamento químico compatível com C-glicosilação, e um simpleto em 5,07 ppm (duplicado em 5,00 ppm), compatível com O-glicosilação (MARKHAM & GEIGER, 1994).



**Espectro 3:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF1** (300 MHz), com supressão de  $\text{H}_2\text{O}$ . Expansão da região entre 0,0 ppm e 5,0 ppm. Parâmetros: NS 16, SWH 7788 Hz, TD 32768, PULPROG zgpr, REF TMS TEMP 27°C. Os sinais marcados com \* correspondem aos hidrogênios duplicados devido ao rotamerismo.

A duplicidade, com conseqüente sobreposição de sinais, dificulta o cálculo da constante de acoplamento para os hidrogênios da porção sacarídica, porém, não impedindo algumas estimativas. A constante de acoplamento na faixa de 8,8-9,9 Hz observada para H-1'' (4,64 ppm) mostra uma relação *trans*-diaxial entre H-1'' e H-2''' indicando uma ligação do tipo  $\beta$ -C-glicosídica.

Um duplete em 0,51 ppm ( $J = 5,46$  Hz), duplicado em 0,59 ppm ( $J = 5,22$  Hz), é atribuído aos hidrogênios metílicos de uma ramnose. A pequena constante de acoplamento observada para o H-1''' (5,07 ppm) faz com que este sinal apareça como um simpleto largo, indicando uma relação *trans*-diequatorial entre H-1''' e H-2''' ( $J = 0-1$  Hz), característico de uma molécula de ramnose. Atribuímos, assim, o sinal em 5,07 ppm ao hidrogênio anomérico da ramnose.

O sinal de hidrogênio anomérico de um açúcar ligado a outro açúcar pode ser facilmente diferenciado do hidrogênio anomérico de um açúcar ligado à aglicona por ligação *O*-glicosídica, uma vez que o primeiro aparece mais blindado em relação ao segundo (MARKHAM & GEIGER, 1994). No caso da ramnose, H-1" possui deslocamento químico compatível com *O*-glicosilação a um segundo carboidrato.

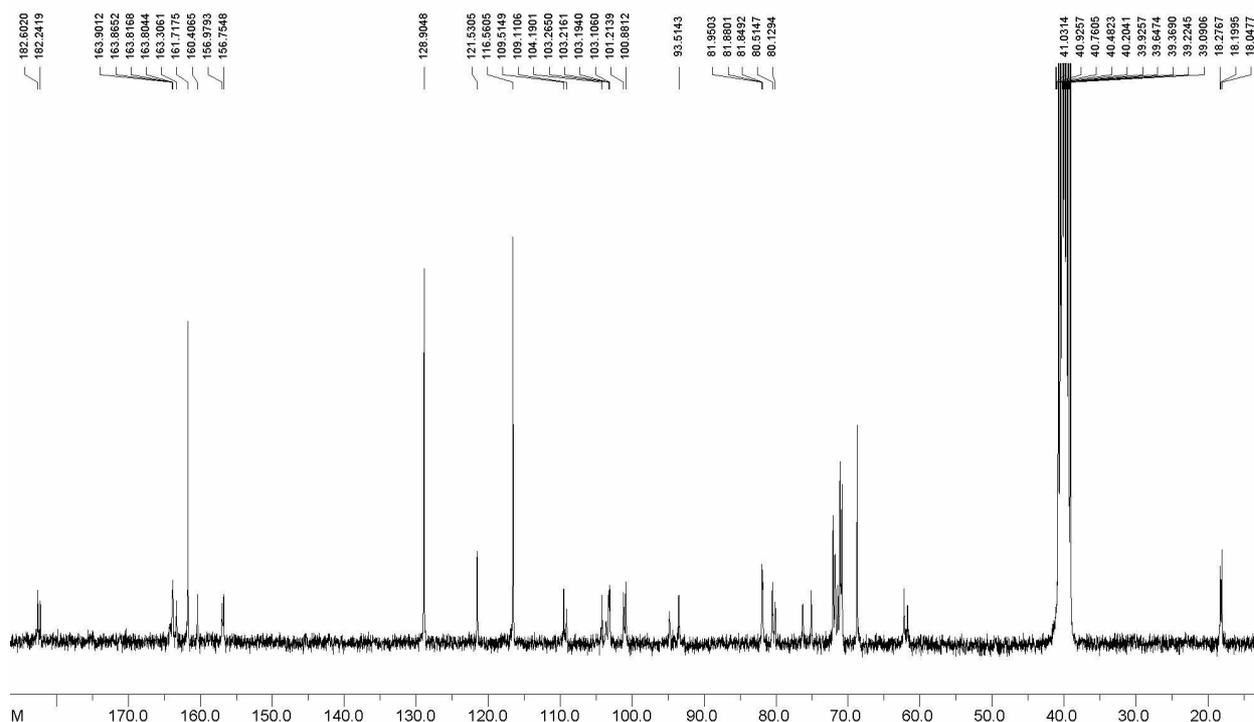
Com base nos dados parciais, pode-se propor para **MxFl** a estrutura de uma flavona com esqueleto de apigenina substituída na posição 6 por uma unidade de carboidrato (açúcar interno em *C*-glicosilação) que, por sua vez, se encontra ligada a uma molécula de ramnose (açúcar externo em *O*-glicosilação). A glicosilação em C-6 já havia sido evidenciada pela ausência do sinal correspondente ao H-6, neste caso, sendo confirmada pelo deslocamento químico de H-1".

### **RMN de <sup>13</sup>C e DEPT 135**

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C foram observados 35 sinais (**Espectro 4**), sendo 11 sinais duplicados devido ao rotamerismo. Dezoito sinais são atribuídos aos carbonos da aglicona do flavonóide e os dezessete restantes aos carbonos das duas unidades de carboidrato.

Na região entre 183 ppm e 103 ppm, e entre 95 ppm e 85 ppm, são encontrados os carbonos da aglicona, enquanto os carbonos dos açúcares possuem deslocamento químico na região entre 102 ppm e 100 ppm, e entre 83 ppm e 18 ppm.

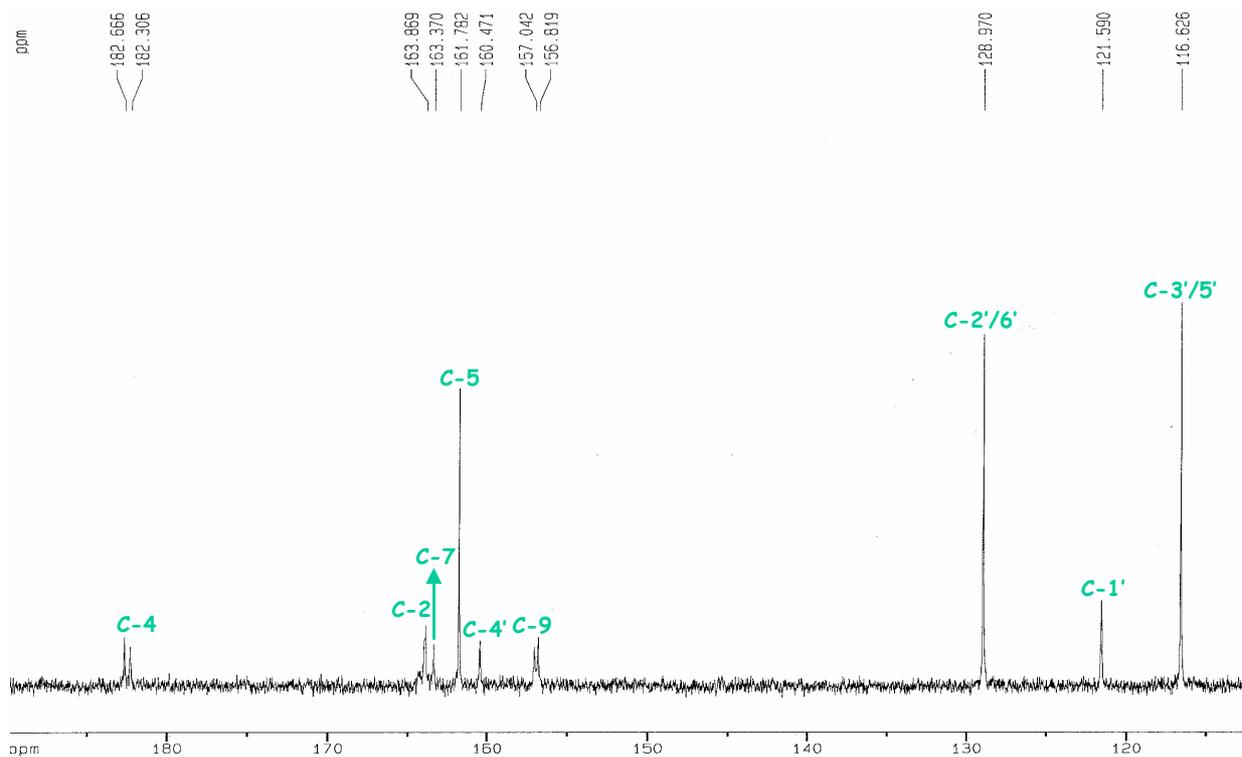
Os deslocamentos químicos referentes aos três carbonos centrais do anel C (C-2, C-3 e C-4) são diagnósticos para a distinção do tipo de flavonóide. Para C-4, uma carbonila cetônica α,β-insaturada, é atribuído o sinal mais desprotegido do espectro (182,66 ppm; duplicado em 182,30 ppm) (**Espectro 5**), característico de flavonas (176,3-184 ppm). Em 103,17 ppm é encontrado o sinal atribuído a C-3, cujo valor de deslocamento está relacionado à ausência de oxigenação neste mesmo carbono (no caso dos flavonóis, C-3 aparece na região entre 136-139 ppm). A não oxigenação em C-3 também influencia o deslocamento químico de C-2 (163,86 ppm), promovendo uma desproteção deste carbono (no caso de flavonóis, C-2 aparece na região entre 154-150 ppm) (MARKHAM & CHARI, 1982).



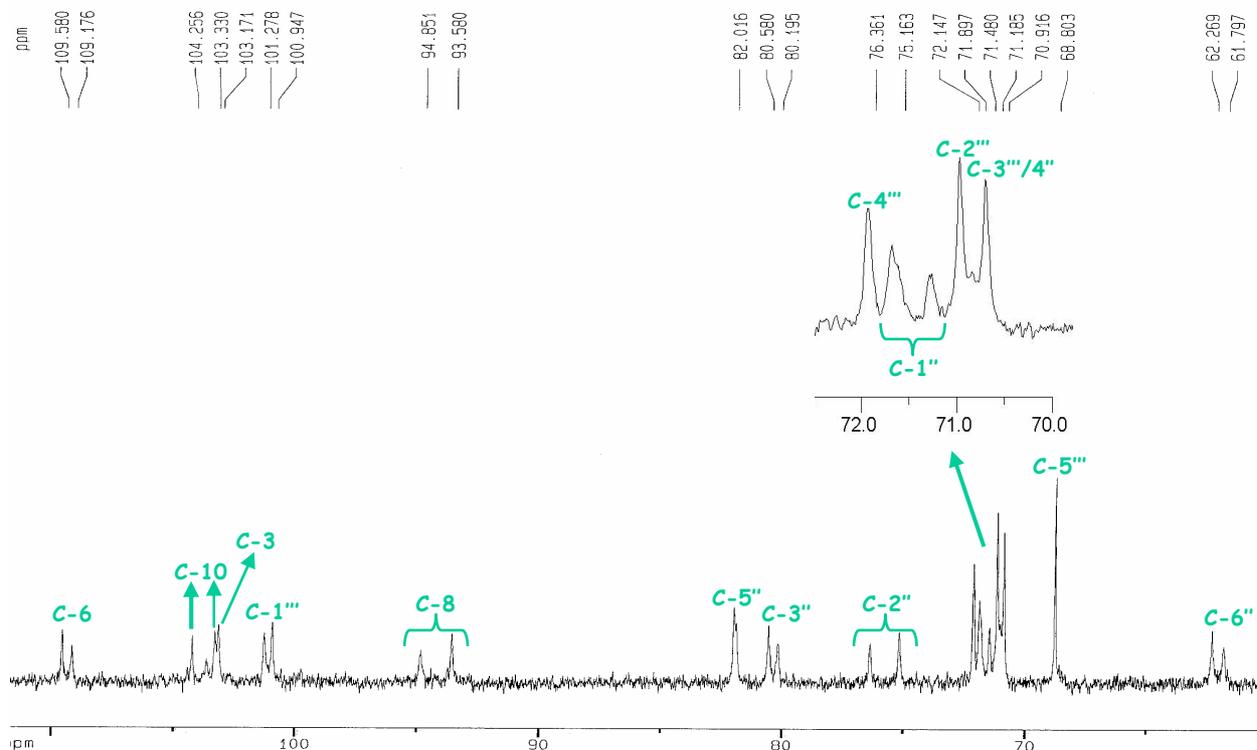
**Espectro 4:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **MxFl** (75 MHz). Parâmetros: NS 22528, SWH 21186 Hz, TD 65536, REF TMS, TEMP 27°C.

Apenas quatro sinais são observados para o anel B, uma vez que a simetria do anel promove uma equivalência em deslocamentos químicos para os carbonos 3' e 5' (116,62 ppm) e 2' e 6' (128,97 ppm).

Os sinais em 161,78 ppm e 163,37 ppm são atribuídos, respectivamente, aos carbonos 5 e 7 do anel A, apresentando deslocamentos químicos compatíveis com hidroxilação nestas posições. Observa-se ainda em 93,58 ppm (sinal duplicado em 94,85 ppm) e 109,58 ppm (sinal duplicado em 109,17 ppm) os sinais referentes aos C-8 e C-6 (**Espectro 6**), respectivamente, indicando uma C-glicosilação neste último carbono. Da mesma forma que no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , uma substituição em C-6 ou C-8, em um flavonóide 5,7-di-hidroxilado, não altera significativamente o deslocamento químico do carbono do metino aromático não-substituído. Como a faixa de deslocamentos químicos desses carbonos é distinta e não-sobreponível, uma substituição em um desses carbonos pode ser identificada sem ambigüidade (MARKHAM & CHARI, 1982).



**Espectro 5:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **MxF1** (75 MHz). Expansão da região entre 190 ppm e 115 ppm. Parâmetros: NS 22528, SWH 21186 Hz, TD 65536, REF TMS, TEMP 27°C.

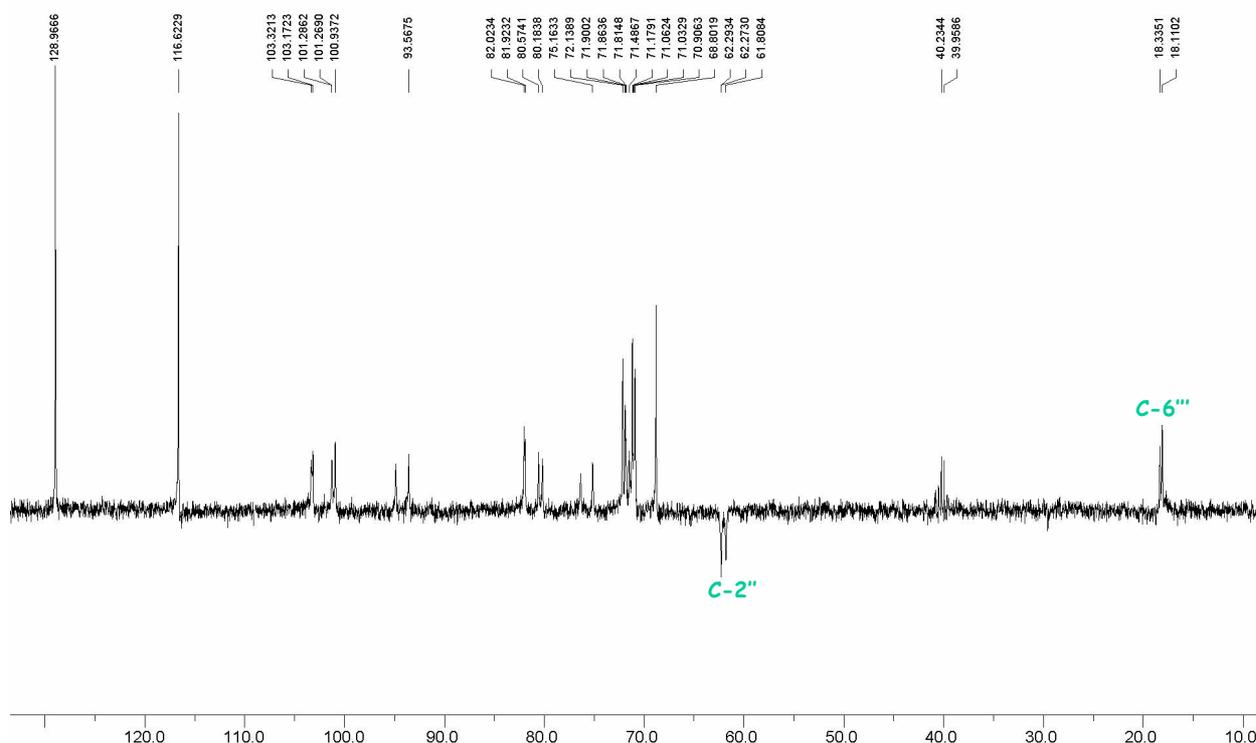


**Espectro 6:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **MxF1** (75 MHz). Expansão da região entre 110 ppm e 60 ppm. Parâmetros: NS 22528, SWH 21186 Hz, TD 65536, REF TMS, TEMP 27°C.

Para a porção glicosídica, os sinais em 71,89 ppm (duplicado em 71,48 ppm) e 100,94 ppm (duplicado em 101,27 ppm) são atribuídos aos carbonos anoméricos das duas unidades de carboidrato, sendo o primeiro referente ao açúcar interno em C-glicosilação com a aglicona, e o segundo à ramnose (açúcar externo).

A inversão do sinal em 62,26 ppm (duplicado em 61,79 ppm) no espectro de DEPT 135 (**Espectro 7**) indica a presença de um metileno (CH<sub>2</sub>) na molécula do açúcar interno. Excluindo-se os sinais referentes à molécula de ramnose, os demais sinais são compatíveis com os observados para a glucose.

Segundo MUZITANO (2006), o C-2 da glucose possui um deslocamento químico em torno de 74,2 ppm, em DMSO-*d*<sub>6</sub>, quando o mesmo não se encontra substituído. A presença de um sinal mais desblindado atribuído a este carbono (75,16 ppm, duplicado em 76,36 ppm) indica a presença de uma ponte interglicosídica nesta posição, ou seja, a glucose é o açúcar diretamente ligado à aglicona e, ligado ao C-2 da glucose, temos a ramnose.

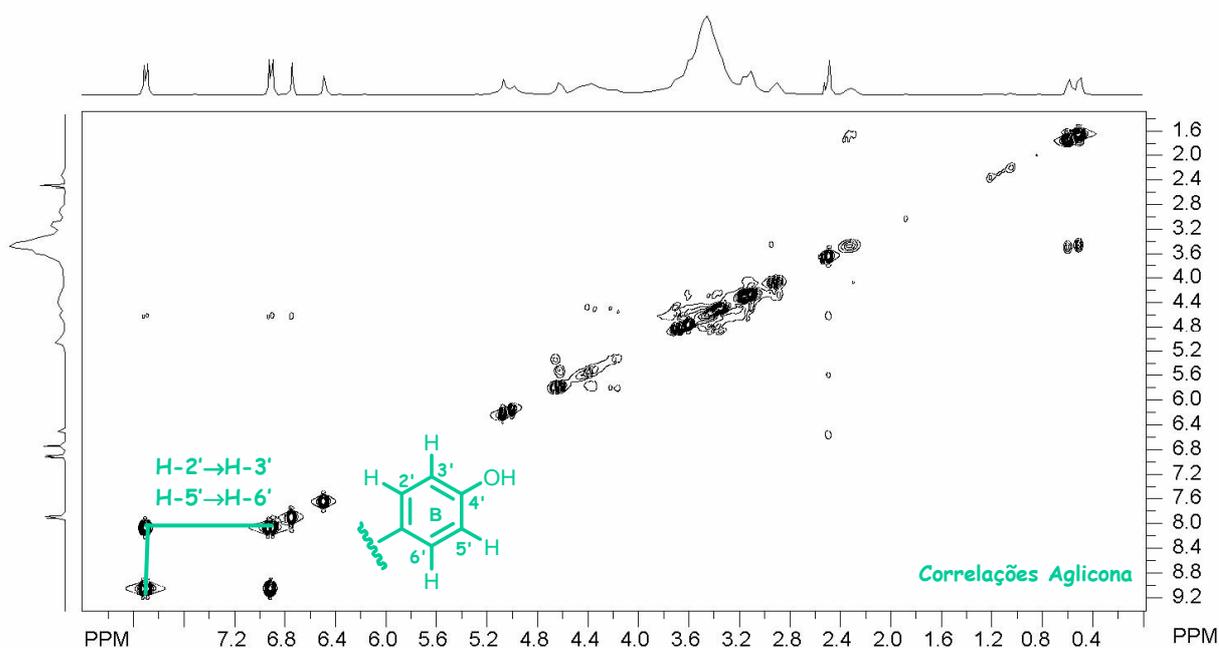


**Espectro 7:** : Espectro de DEPT 135 de MxF1 (75 MHz). Parâmetros: NS 3072, SWH 21186 Hz, REF TMS, TEMP 27°C.

A partir dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135, além dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , pode-se propor para **MxF1** a estrutura da apigenina 6-*C*-(2''-*O*-ramnopiranosil-glucopiranosídeo). Esta será confirmada através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC).

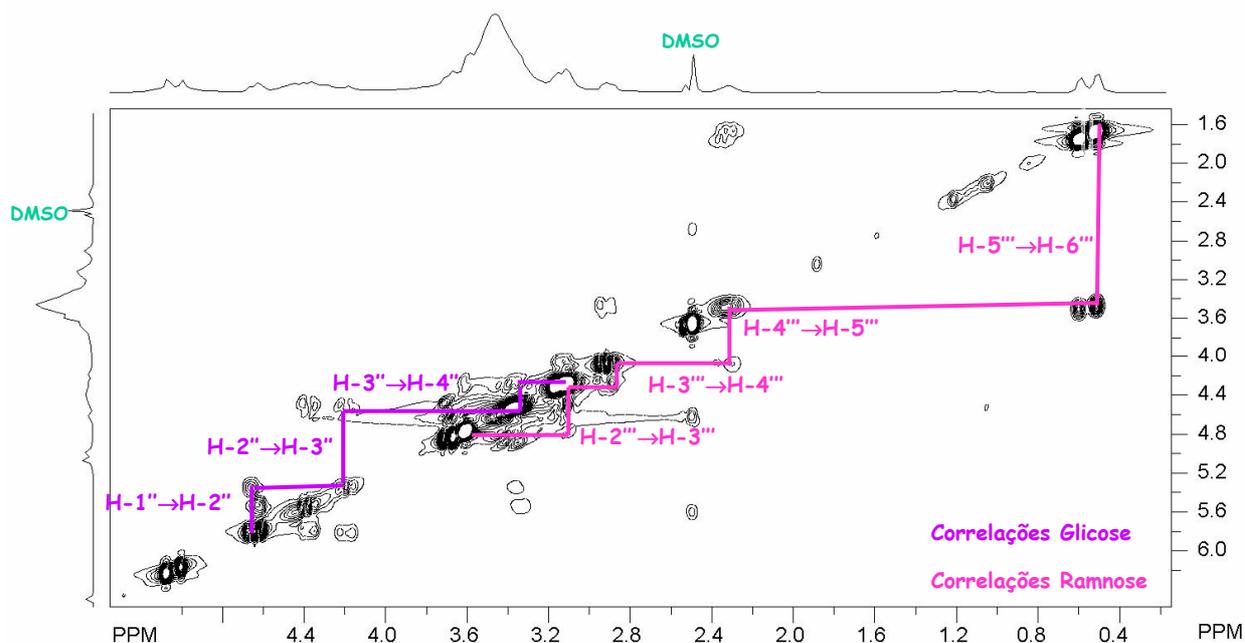
### COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$

A partir da análise do COSY (correlação homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) foi possível identificar os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios da molécula através de seus acoplamentos seqüenciados (**Espectro 8**). Através do acoplamento entre H-2',6' e H-3',5' pode ser confirmado o padrão 4'-OH evidenciado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .



**Espectro 8:** Espectro de RMN 2D - COSY 90 de **MxF1** (300 MHz). Parâmetros: NS 8, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

Na expansão entre zero e 5,0 ppm (**Espectro 9**) são observados os acoplamentos seqüenciados dos hidrogênios das duas moléculas de açúcar, corroborando com os assinalamentos dos sinais no espectro de  $^1\text{H}$ .

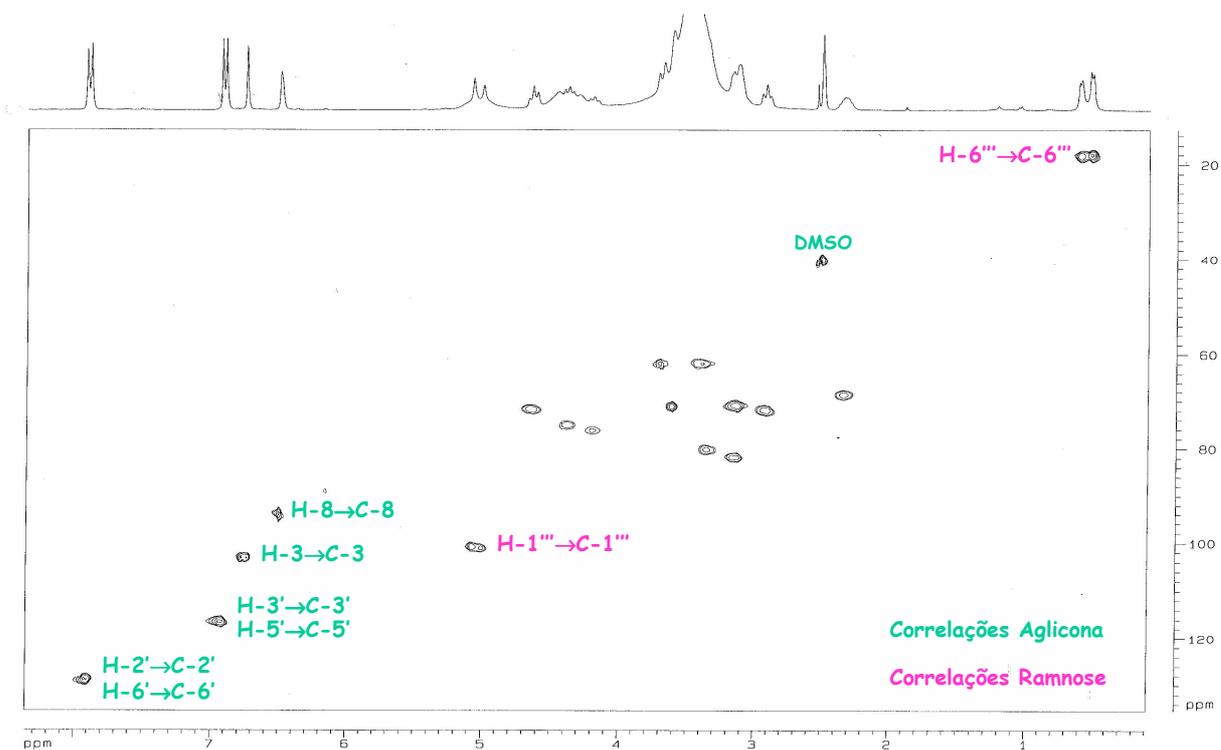


**Espectro 9:** Espectro de RMN 2D - COSY 90 de MxF1 (300 MHz). Expansão da região entre 0,0 e 5,0 ppm. Parâmetros: NS 8, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

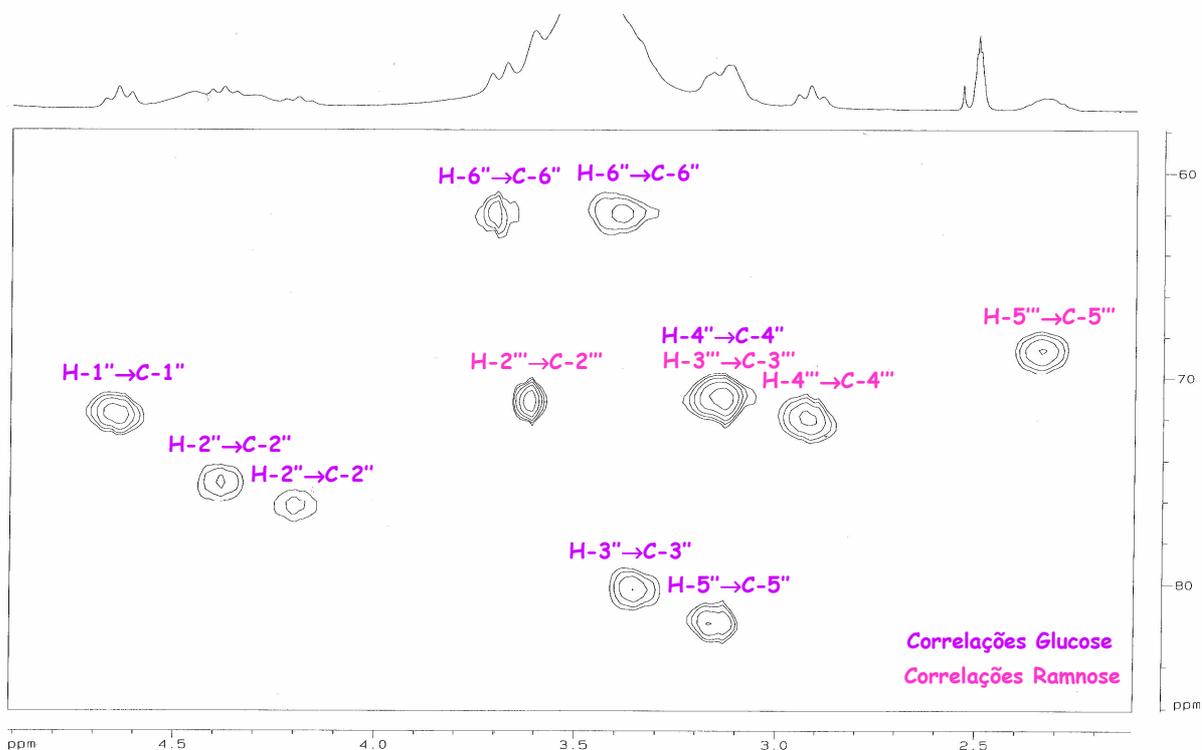
## HMQC

A partir dos dados do espectro de HMQC foi possível estabelecer a correlação direta heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  dos hidrogênios do açúcar e da aglicona com seus respectivos carbonos.

Devido à complexidade dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , relativo à duplicidade de alguns sinais, o espectro de HMQC (**Espectros 10 e 11**), juntamente com o COSY, foi uma ferramenta importante para o assinalamento dos deslocamentos químicos dos hidrogênios e carbonos de MxF1, sem ambigüidade.



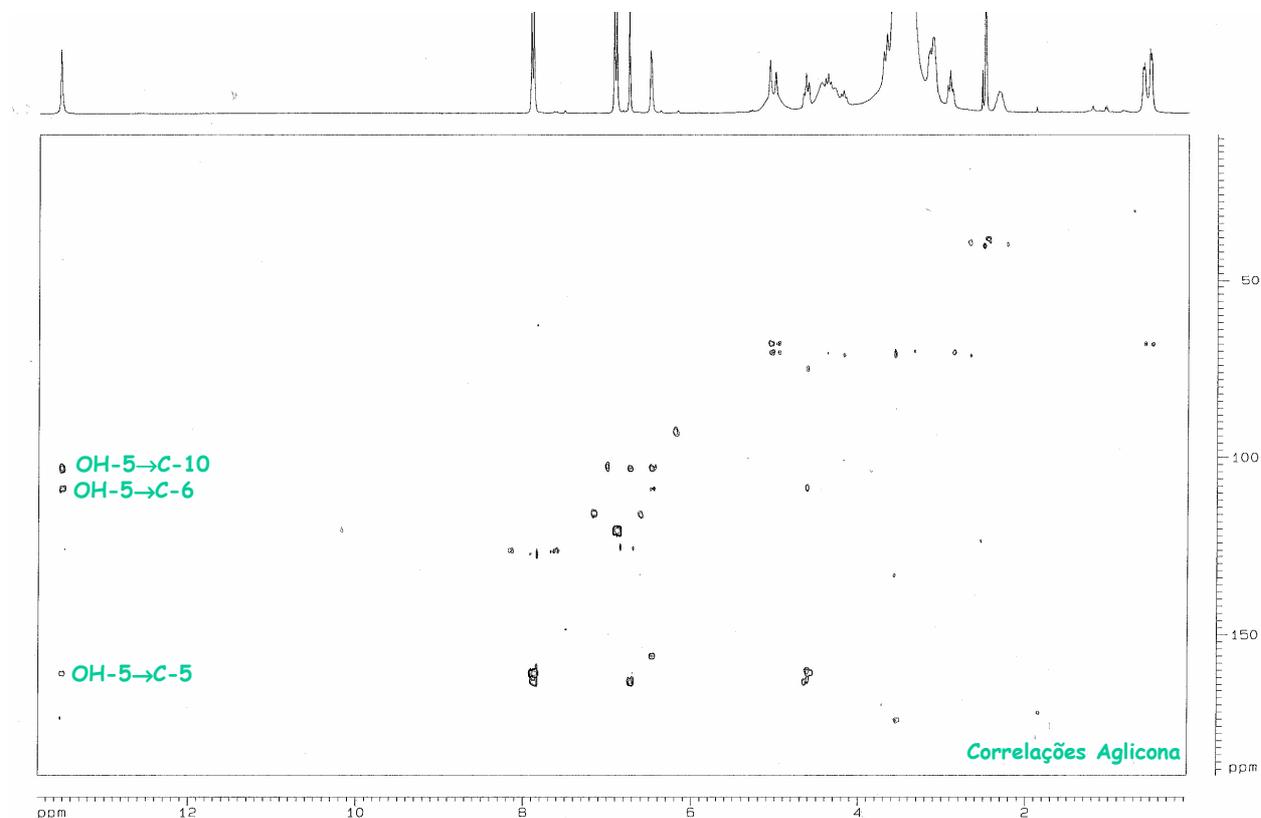
**Espectro 10:** Espectro de RMN 2D - HMQC de **MxF1** (300 MHz; 75 MHz). Parâmetros: NS 32, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.



**Espectro 11:** Espectro de RMN 2D - HMQC de **MxF1** (300 MHz; 75 MHz). Expansão da região entre 2,0 e 5,0 ppm. Parâmetros: NS 32, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

## HMBC

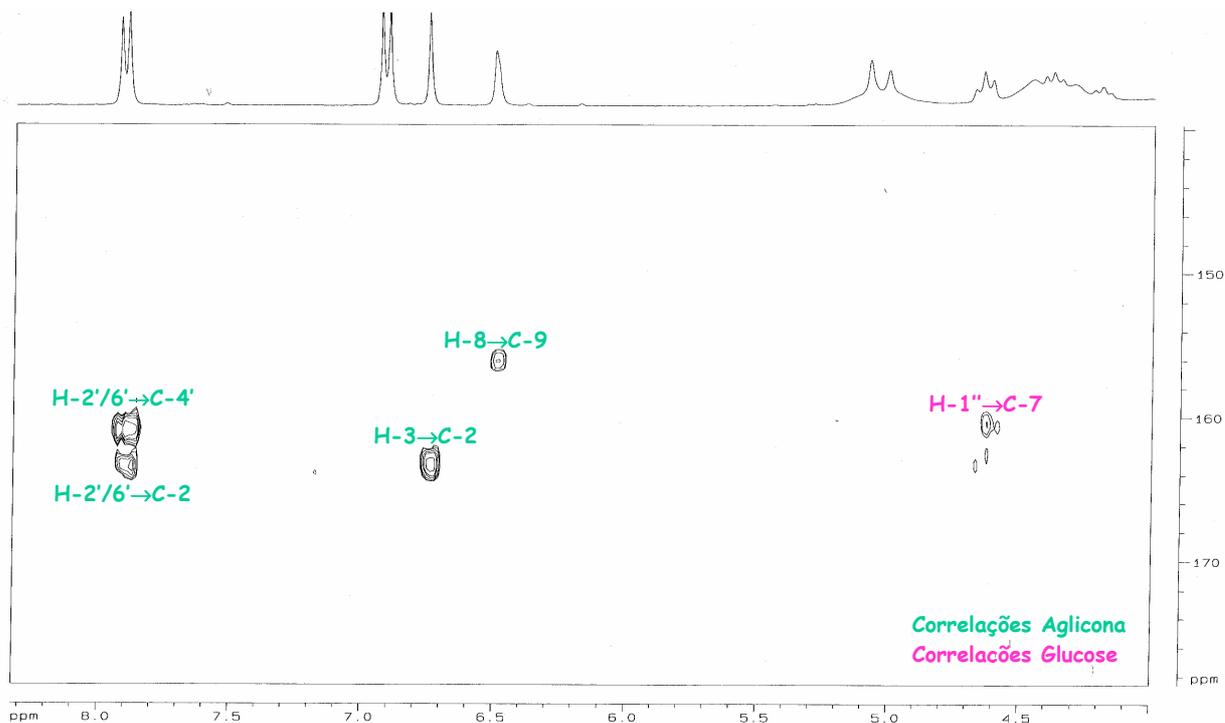
O espectro de HMBC (**Espectros 12 a 15**) mostrou as correlações à longa distância  $^{2-3}J_{H,C}$  para os hidrogênios da aglicona e das duas unidades de carboidrato.



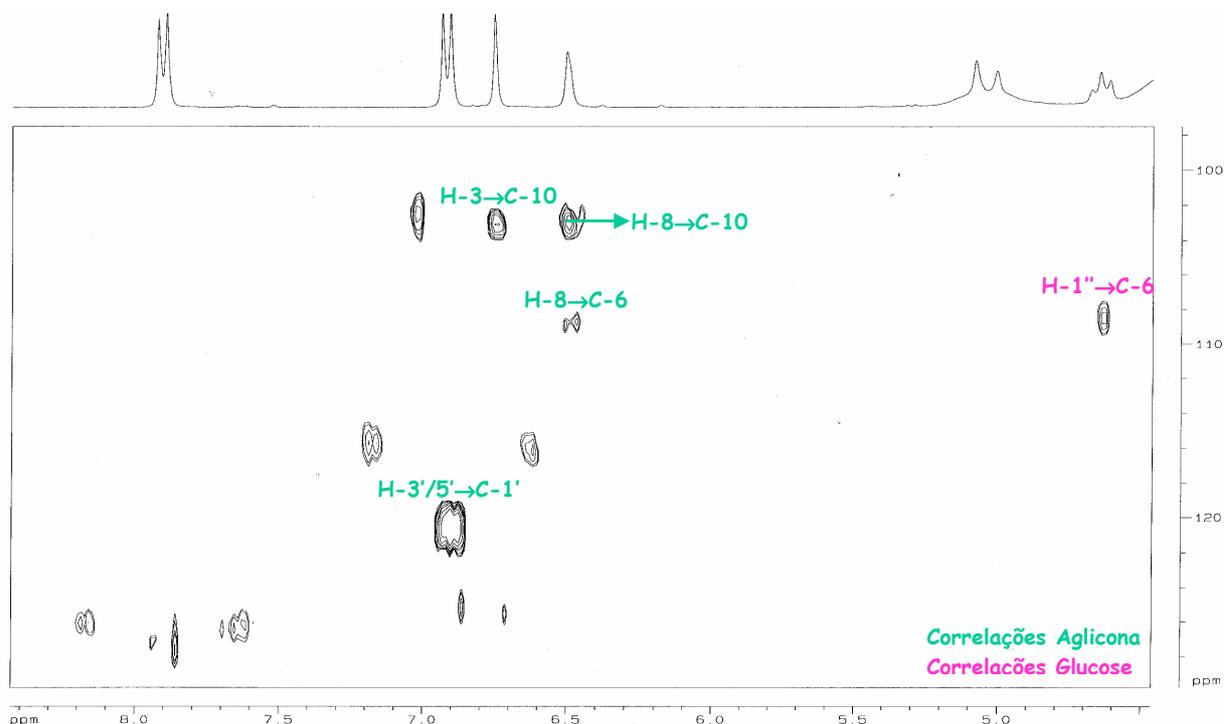
**Espectro 12:** Espectro de RMN 2D - HMBC de **MxF1** (300 MHz; 75 MHz). Parâmetros: NS 128, SWH 4807 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.

Para os anéis A e C da aglicona foram observadas apenas correlações à longa distância  $^2J_{H,C}$ . Foram correlacionados o sinal de OH-5 (13,54 ppm) com C-10 (103,33 ppm) e C-6 (109,58 ppm), além de sua correlação direta com C-5 (161,78 ppm). Detectaram-se também as correlações entre H-3 (6,75 ppm) e C-2 (163,86 ppm) e entre H-8 (6,50 ppm) e C-9 (156,81 ppm).

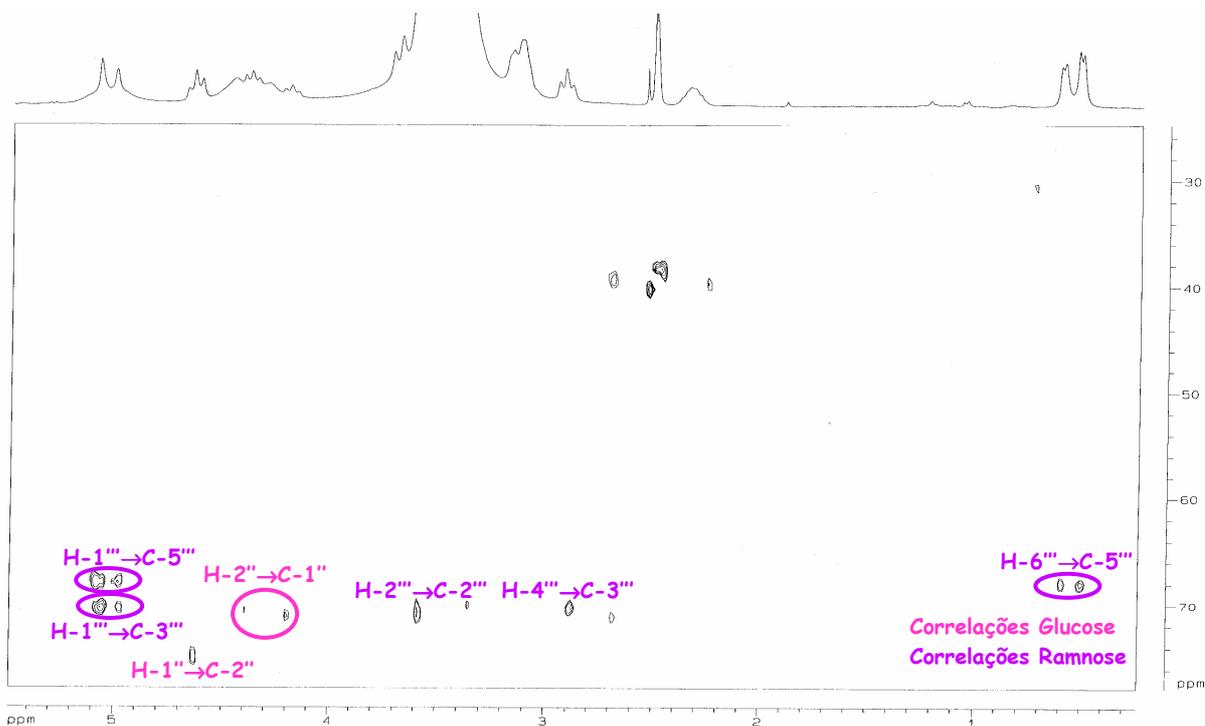
O espectro apresentou, para o anel B da aglicona, correlações  $^3J_{J,C}$  entre H-2',6' (7,91 ppm), C-4' (160,47 ppm) e C-2 (163,86 ppm) e entre H-3',5' (6,92 ppm) e C-1' (121,59 ppm).



**Espectro 13:** Espectro de RMN 2D - HMBC de Mx<sub>F</sub>1 (300 MHz; 75 MHz). Expansão da região entre 120 e 180 ppm. Parâmetros: NS 128, SWH 4194 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.



**Espectro 14:** Espectro de RMN 2D - HMBC de Mx<sub>F</sub>1 (300 MHz; 75 MHz). Expansão da região entre 100 e 130 ppm. Parâmetros: NS 128, SWH 4194 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.

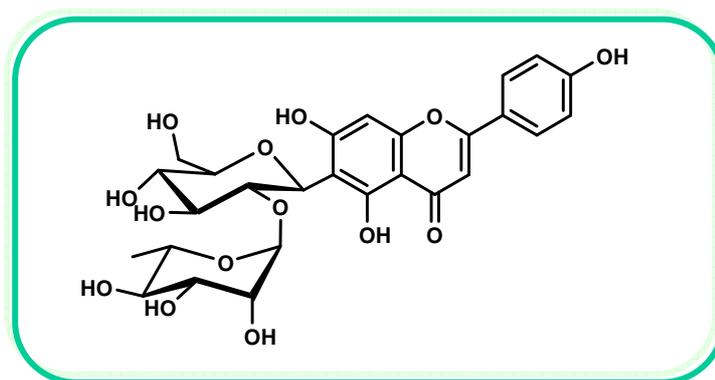


**Espectro 15:** Espectro de RMN 2D - HMBC de **MxF1** (300 MHz). Expansão da região entre 30 e 80 ppm. Parâmetros: NS 128, SWH 4194 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.

Para as moléculas de carboidrato também foram observadas correlações à longa distância que permitiram corroborar o tipo de substituição proposta. Para a glucose, a principal correlação ocorre entre H-1" (4,64 ppm) e C-6 (109,58 ppm), confirmando a  $\alpha$ -glucosilação na posição 6 da aglicona. Não pôde ser evidenciada a correlação entre H-1" (5,07 ppm) e C-2" (75,16 ppm), porém os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , quando comparados aos dados da literatura (MARKHAM & CHARI, 1982; RAYYAN *et al.*, 2005), confirmam a presença de uma ligação interglicosídica do tipo (1 $\rightarrow$ 2). Esta unidade dissacarídica composta por ramnose e glucose, ligadas entre si através da posição 1 da ramnose com a posição 2 da glucose, é conhecida como neo-hesperidose (HARBORNE & WILLIAMS, 1982).

### Proposta Estrutural

Após comparação com os dados da literatura (RAYYAN *et al.*, 2005) confirma-se para **MxF1** a estrutura da flavona apigenina-6-*C*- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -glucopiranosídeo (**Figura 18**), também conhecida como isovitexina-2''-*O*-ramnopiranosídeo. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a molécula estão listados na **Tabela 5** e corroboram a estrutura proposta.



**Figura 18:** Estrutura de **MxF1**.

Esta substância foi descrita pela primeira vez em 1976, a partir de *Crataegus monogyna* (Rosaceae) (JAY, 1994). Este é o primeiro relato dessa flavona na família Mimosaceae.

São raros os estudos sobre a atividade biológica de isovitexina-2''-*O*-ramnopiranosídeo, sendo relatados sua propriedade de atrair agentes polinizadores (IWASHINA, 2003) e sua atividade anti-hepatotóxica (HOFFMANN BOHM *et al.*, 1992).

**Tabela 5:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  (75 MHz) de MxF1 (DMSO- $d_6$ ). **A** e **B** referem-se, respectivamente, aos isômeros majoritário e minoritário.

	$\delta_c$ (ppm)		$\delta_H$ (ppm): m: $J$ (Hz)		Correlações HMBC
<b>Aglicona: apigenina</b>					
	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	
2	163,86				
3	103,17		6,75; s		H-3 $\rightarrow$ C-2, C-10
4	182,66	182,30			
5	161,78				OH-5 $\rightarrow$ C-5, C-6, C-10
6	109,58	109,17			
7	163,37				
8	93,58	94,85	6,50; s		H-8 $\rightarrow$ C-6, C-9, C-10
9	156,81	157,04			
10	103,33	104,25			
1'	121,59				
2', 6'	128,97		7,91; d; 8,6		H-2'/6' $\rightarrow$ C-2, C-4'
3', 5'	116,62		6,92; d; 8,6		H-3'/5' $\rightarrow$ C-1'
4'	160,47				
<b>Açúcar interno: 6-C-glucopiranoose</b>					
1''	71,89	71,48	4,64; d		H-1'' $\rightarrow$ C-6, C-7, C-2''
2''	75,16	76,36	4,35; t	4,15; t	H-2'' $\rightarrow$ C-1''
3''	80,58	80,19	3,35		
4''	70,91		3,11		
5''	82,01		3,16		
6''	62,26	61,79	3,70	3,47	
<b>Açúcar externo: 2''-O-ramnopiranoose</b>					
1'''	100,94	101,27	5,07	5,00	H-1''' $\rightarrow$ C-3''', C-5'''
2'''	71,18		3,60		H-2''' $\rightarrow$ C-2'''
3'''	70,91		3,11		
4'''	72,14		2,93		H-4''' $\rightarrow$ C-3'''
5'''	68,80		2,50		
6'''	18,11	18,34	0,51; d; 5,46	0,59; d; 5,18	H-6''' $\rightarrow$ C-5'''

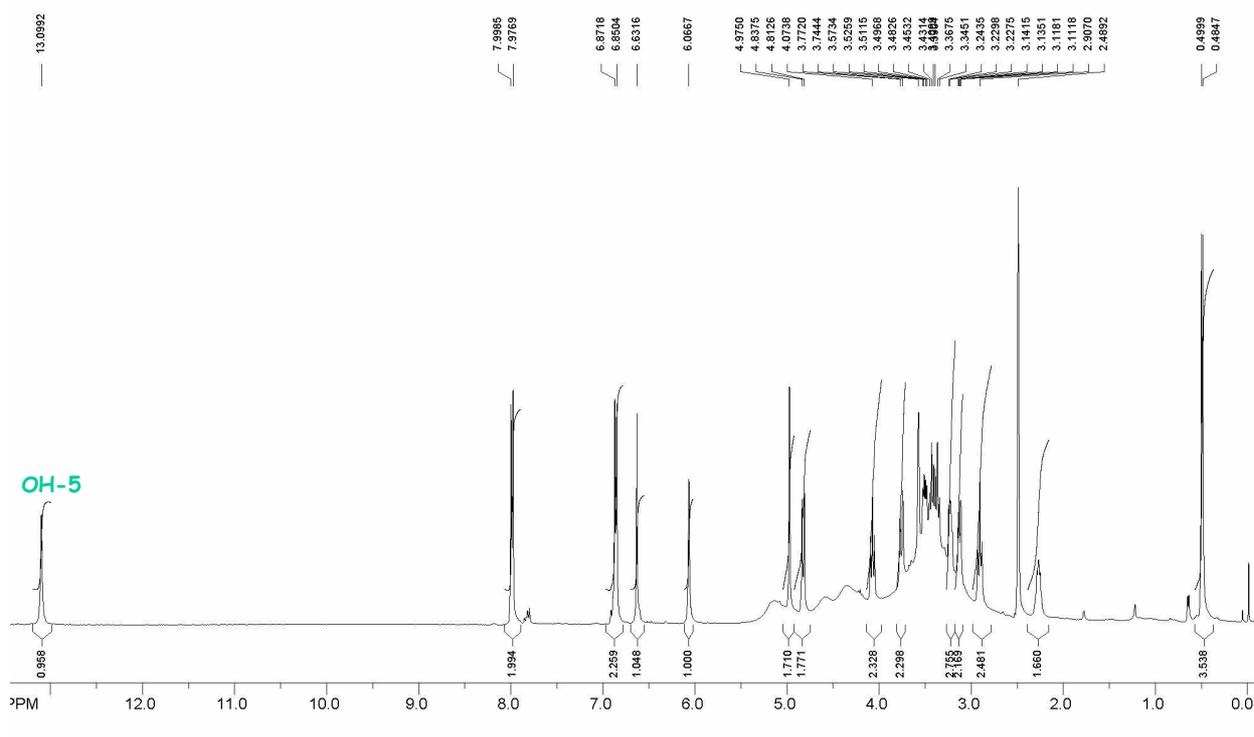
## ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE MxF2

O flavonóide codificado como **MxF2** (15,9 mg; Rf 0,68; BAW 8:1:1), isolado da fração butanólica proveniente da partição do extrato aquoso de *Mimosa xanthocentra*, apresentou-se como um pó amorfo amarelo.

A proposta estrutural para **MxF2** foi baseada nos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , DEPT 135, COSY, HMQC e HMBC obtidos em DMSO- $d_6$  (concentração: 26,5 mg/ml).

### RMN de $^1\text{H}$

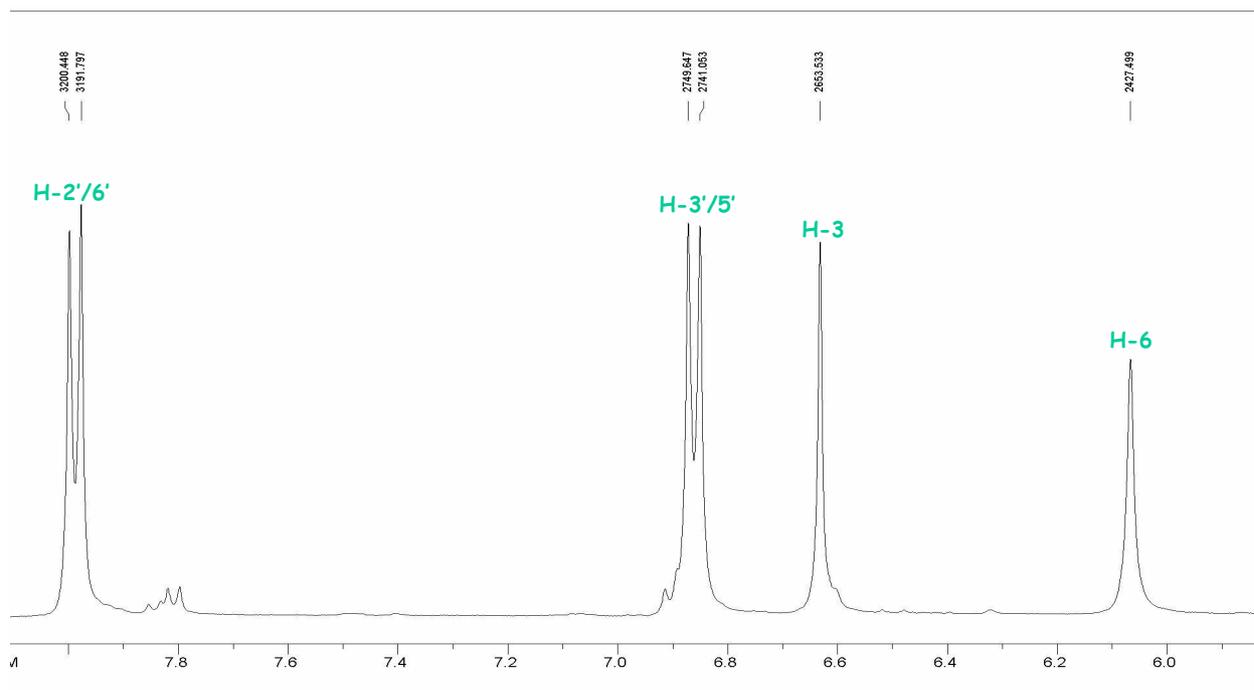
O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  para **MxF2** (**Espectro 16**) apresentou sinais com padrão semelhante aos observados para **MxF1**, mostrando-se tratar também de um flavonóide de natureza C-glicosídica.



**Espectro 16:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF2** (400 MHz). Parâmetros: NS 16, TD 32768, REF TMS TEMP 27°C.

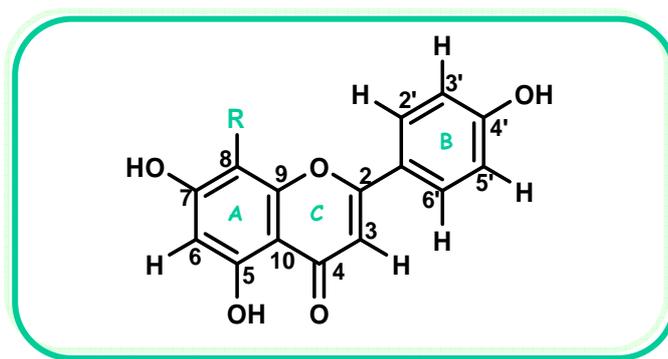
Para o anel B foi verificado um padrão 4'-OH, justificado pela observação de dois dupletos (**Espectro 17**) - 7,98 ppm ( $J = 8,62$  Hz) e 6,87 ppm ( $J = 8,62$  Hz) - integrados para dois hidrogênios cada um (sistema tipo AA'XX'). Estes sinais são atribuídos respectivamente aos H-2'/6' e H-3',5', e a magnitude da constante de acoplamento indica uma correlação *orto* entre eles.

Os sinais observados para os anéis A e C caracterizam uma flavona C-glicosilada, sendo os três simpletos em 13,09 ppm, 6,63 ppm e 6,06 ppm atribuídos respectivamente aos OH-5, H-3 e H-6. Ao contrário de **MxF1**, o sítio de substituição na aglicona de **MxF2** é a posição 8, o que é corroborado pelo deslocamento químico de H-6 e pela ausência do sinal referente a H-8 (6,39-6,56 ppm) (MARKHAM & GEIGER, 1994).



**Espectro 17:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF2** (400 MHz). Parâmetros: NS 16, TD 32768, REF TMS TEMP 27°C. Expansão da região entre 8,0 e 6,0 ppm.

Esses dados permitem propor para a aglicona de **MxF2** a estrutura da apigenina (5,7,4'-triidroxiavona; **Figura 19**), com substituição na posição 8 (anel A).



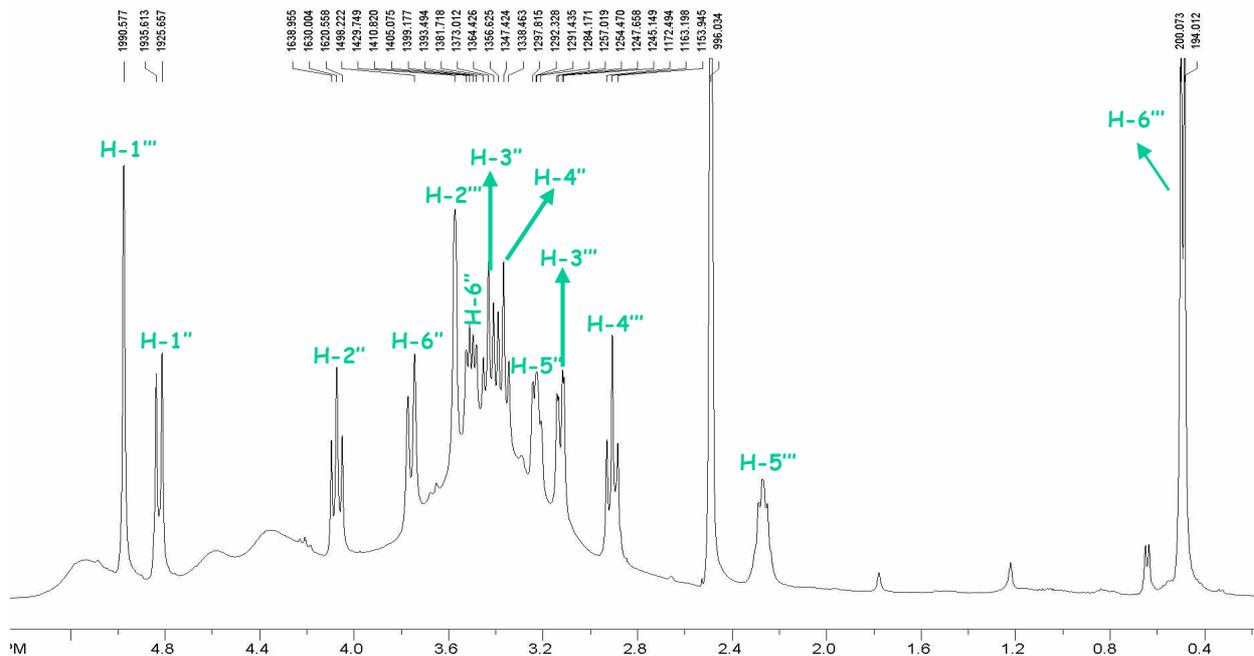
**Figura 19:** Estrutura da aglicona de **MxF2** (R = substituinte)

Os dois sinais de hidrogênios anoméricos (**Espectro 18**) revelam a presença de duas moléculas de carboidrato. O duplete em 4,82 ppm ( $J = 9,45$  Hz), condizente com  $\beta$ -glicosilação, é atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1'') de um açúcar diretamente ligado à aglicona, enquanto o simpleto em 4,99 ppm é atribuído ao hidrogênio anomérico (H-1''') de um açúcar externo.

Em 0,48 ppm ( $J = 6,06$  Hz) observa-se um duplete referente aos hidrogênios metílicos de uma ramnose. O simpleto atribuído a H-1''' (relação *trans*-diequatorial entre H-1''' e H-2''') e seu deslocamento químico característico de  $O$ -glicosilação a uma segunda molécula de açúcar, corroboram para a atribuição da ramnose como açúcar externo.

A constante de acoplamento na faixa de 8,8 - 9,9 Hz observada para H-1'' mostra uma relação *trans*-diaxial entre H-1'' e H-2''. Comparando-se os dados de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF2** e **MxF1**, suspeita-se que, assim como em **MxF1**, o açúcar interno também seja uma molécula de glucose.

Com base nos dados parciais, pode-se propor para **MxF2** a estrutura da flavona apigenina substituída na posição 8 por um dissacarídeo, sendo a unidade externa uma molécula de ramnose.



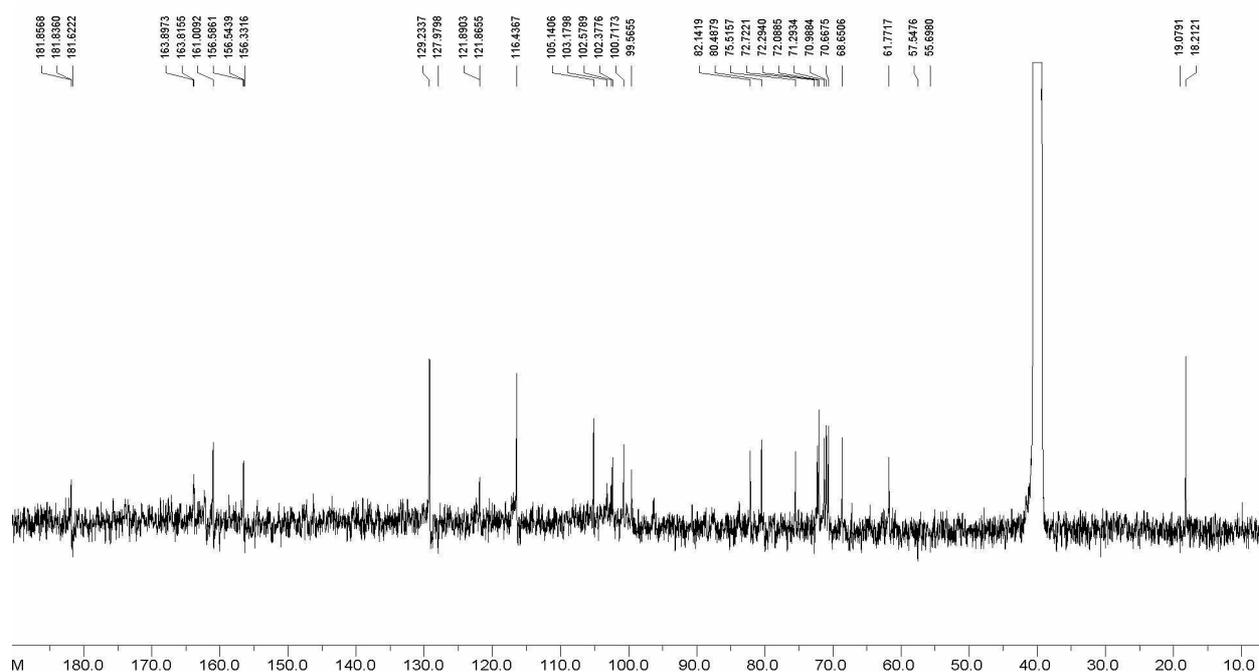
**Espectro 18:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF2** (400 MHz). Parâmetros: NS 16, TD 32768, REF TMS TEMP 27°C. Expansão da região entre 8,0 e 6,0 ppm.

### RMN de $^{13}\text{C}$

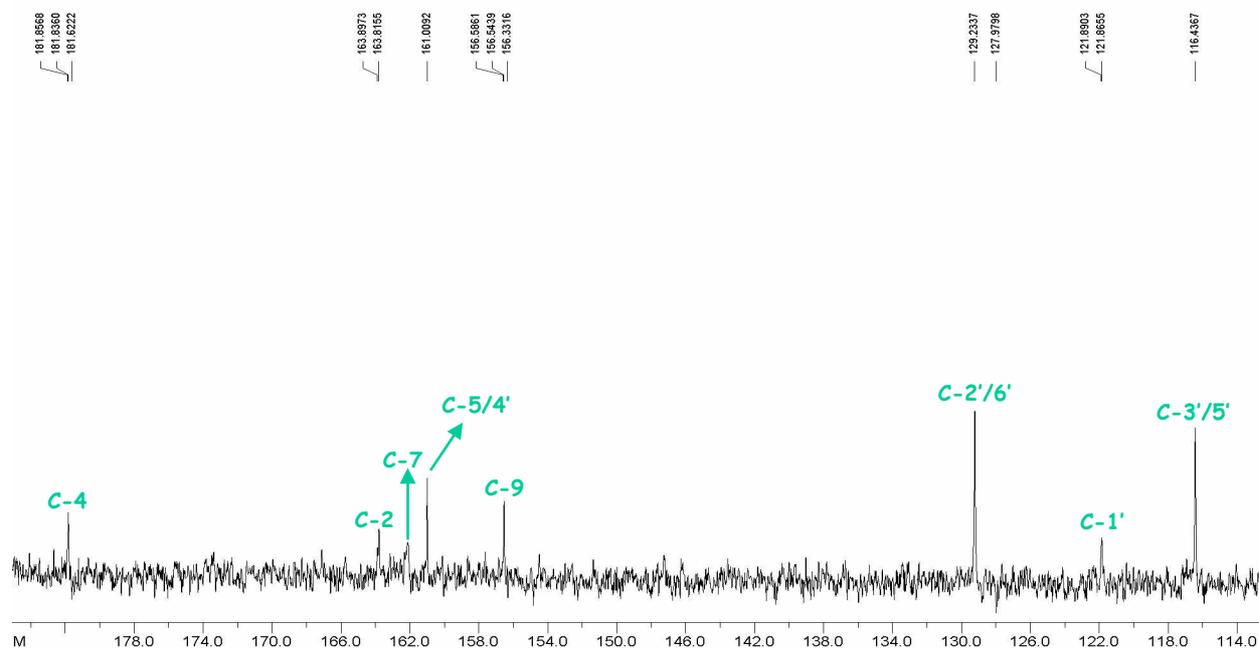
No espectro de  $^{13}\text{C}$  foram observados 23 sinais (**Espectro 19**), sendo 11 referentes à aglicona e 12 às duas unidades de carboidrato.

O padrão de sinais observados confirma a estrutura da aglicona de **MxF2** e sua substituição por um dissacarídeo (**Espectro 20**). Os sinais da carbonila cetônica (C-4) em 181,62 ppm e de C-3 em 102,37 ppm reforçam a existência de uma flavona, cujo esqueleto (apigenina) é atribuído com base nos sinais em 129,23 ppm (C-2',6') e 116,43 ppm (C-3',5'). A C-glicosilação na posição 8 é confirmada pelos deslocamento químicos de C-6 (99,56 ppm) e C-8 (105,14 ppm).

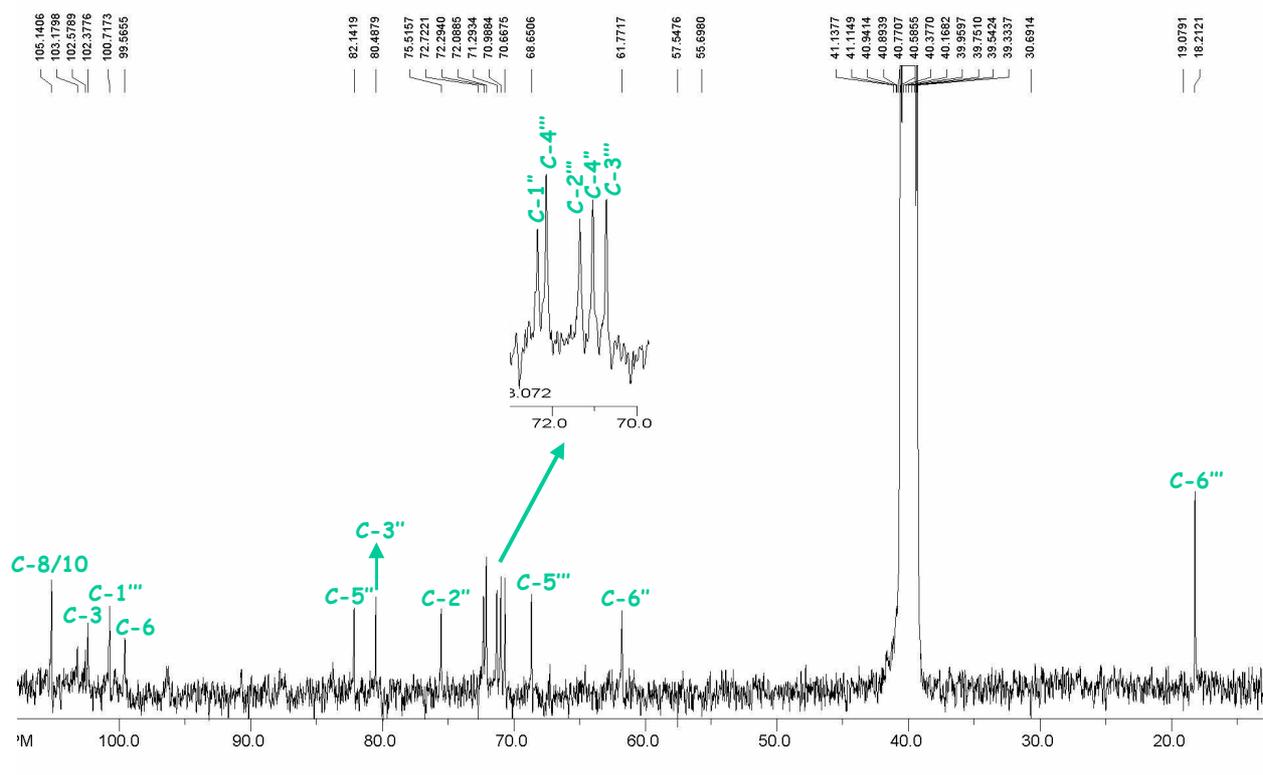
A presença de duas unidades de carboidrato é corroborada pela existência de dois carbonos anoméricos (**Espectro 21**). O sinal em 72,72 ppm é atribuído ao C-1'' do açúcar interno em C-glicosilação, enquanto que o sinal em 100,71 ppm é compatível com O-glicosilação a uma segunda molécula de açúcar.



**Espectro 19:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de Mx<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (100 MHz). Parâmetros: NS 4096, TD 32768, REF TMS, TEMP 27°C.



**Espectro 20:** Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de Mx<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (100 MHz). Expansão da região entre 180 e 114 ppm. Parâmetros: NS 4096, TD 32768, REF TMS, TEMP 27°C.



**Espectro 21:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **MxF2** (100 MHz). Expansão da região entre 110 e 18 ppm. Parâmetros: NS 4096, TD 32768, REF TMS, TEMP 27°C.

Os deslocamentos químicos dos carbonos da porção glicídica são compatíveis com uma glucose e uma ramnose. O sinal mais blindado do espectro em 18,21 ppm (carbono metílico) corrobora a presença de uma ramnose, enquanto que o sinal em 61,77 ppm (metileno) confirma a presença de uma glucose. À ramnose é atribuída a posição externa no dissacarídeo e a sua ligação ao carbono 2 da glucose pode ser confirmada pelo sinal em 75,5 ppm (C-2'').

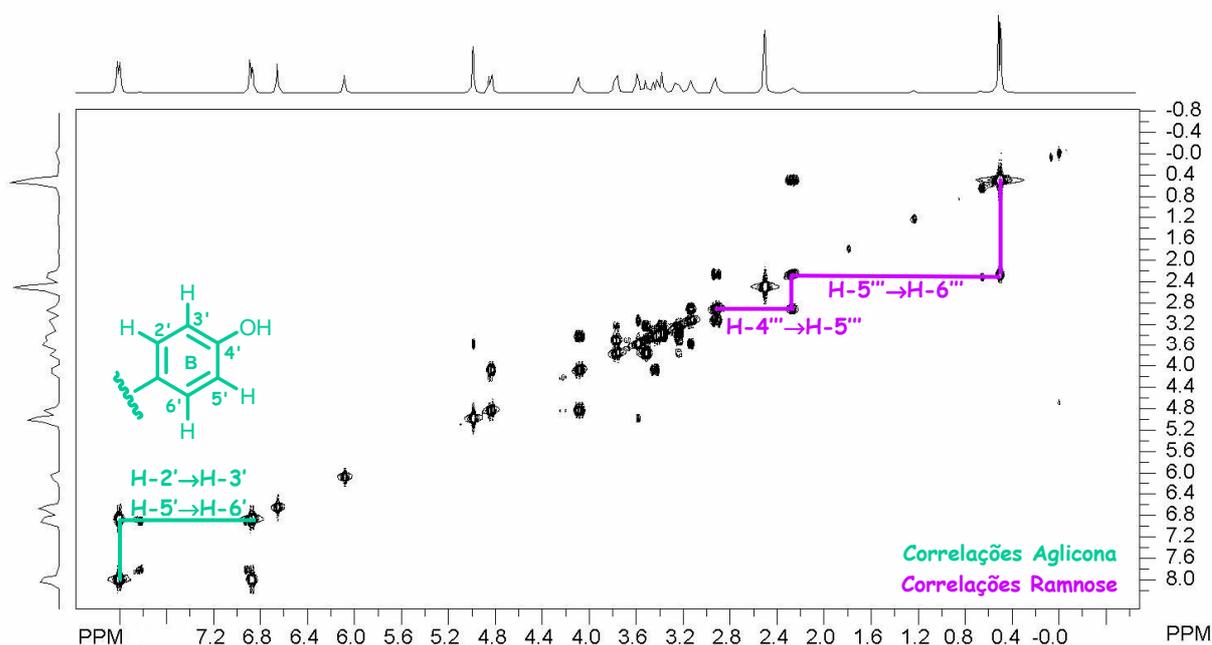
A partir dos dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  pode-se propor para **MxF2** a estrutura da apigenina 8-C-(2''-O-ramnopiranosil - glucopiranosídeo). Esta será confirmada através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC).

Para mais detalhes sobre os critérios de atribuição dos sinais, veja a seção sobre a **Elucidação Estrutural de MxF1**.

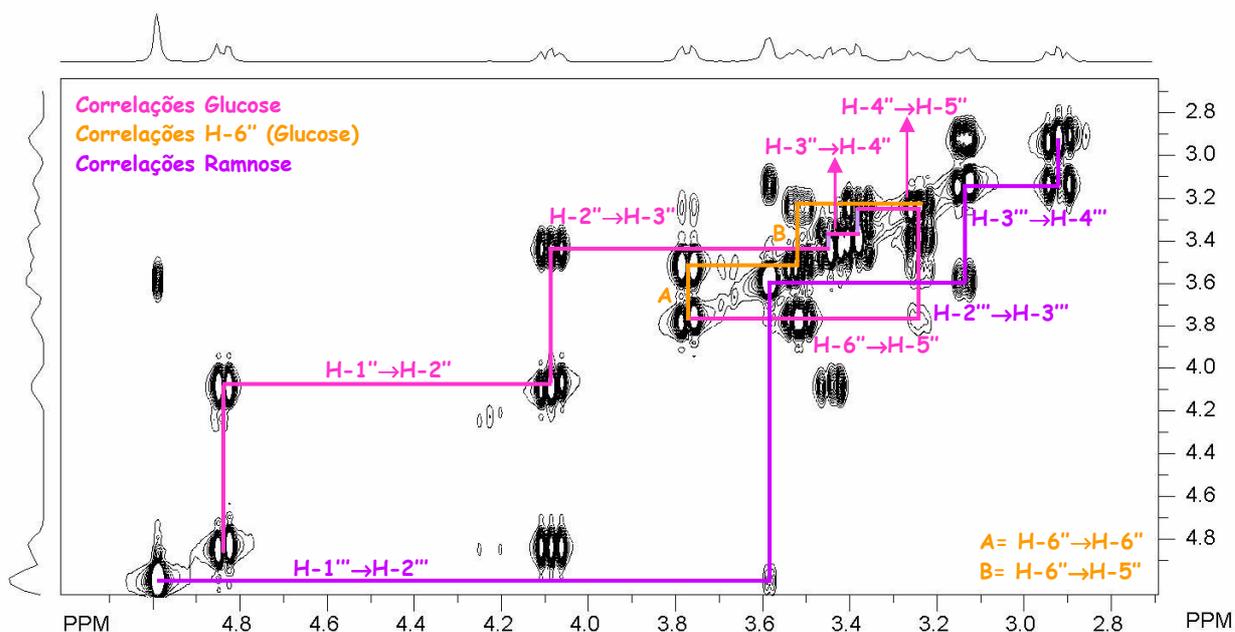
## COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$

A partir da análise do COSY (correlação homonuclear  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) foi possível identificar os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios da molécula através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios (**Espectro 22**).

Na expansão entre 2,8 e 5,0 ppm (**Espectro 23**) são destacados os acoplamentos que foram cruciais para o assinalamento dos sinais de hidrogênio das duas moléculas de açúcar. Em amarelo encontram-se os acoplamentos referentes aos hidrogênios diastereotópicos do metileno da glicose (H-6'') (A= H-6'' $\rightarrow$ H-6''; B= H-6'' $\rightarrow$ H-5'').



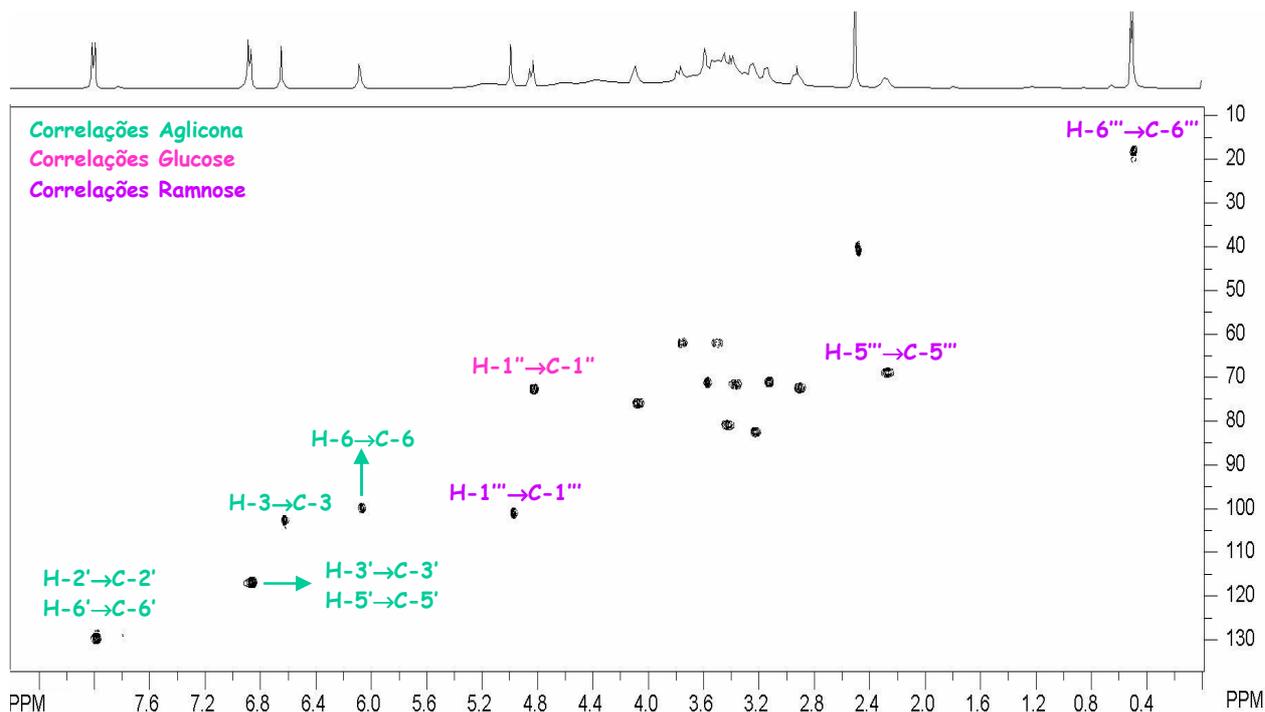
**Espectro 22:** Espectro de RMN 2D - COSY GP de MxF2 (400 MHz). Parâmetros: NS 8, SWH 6410 Hz, TD 4096, REF TMS, TEMP 27°C.



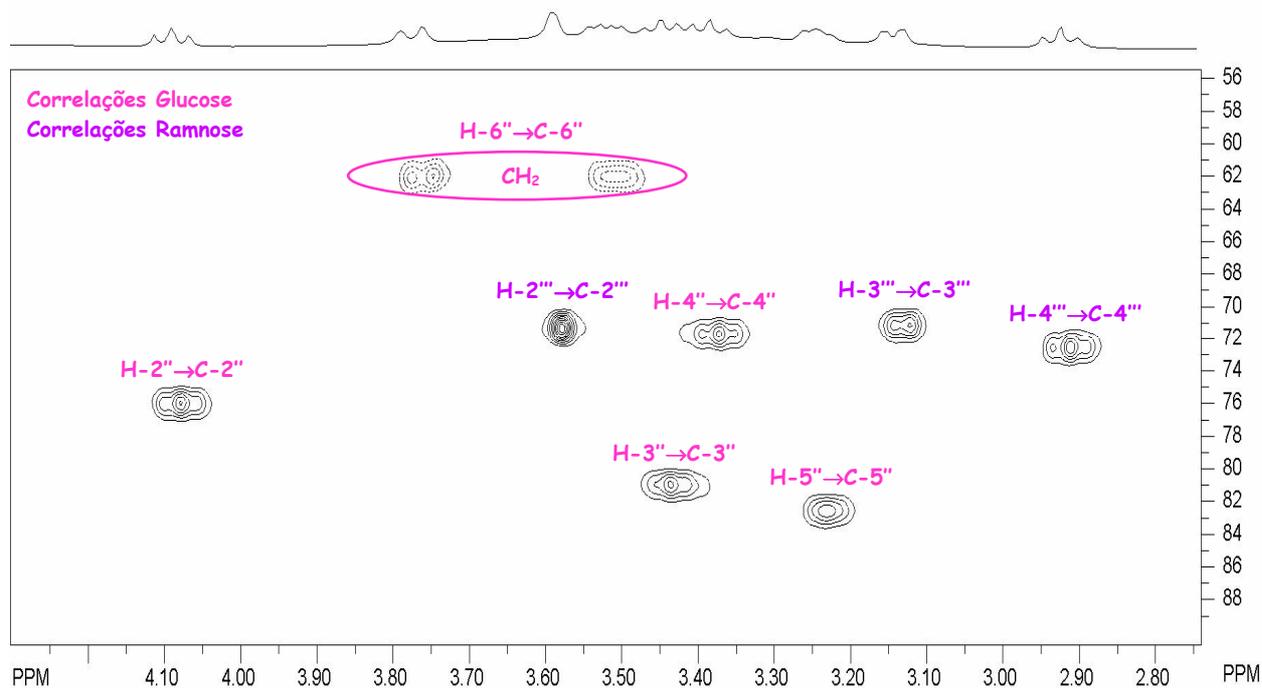
**Espectro 23:** Espectro de RMN 2D - COSY GP de **MxF2** (400 MHz). Expansão da região entre 5,0 e 2,8 ppm. Parâmetros: NS 8, SWH 6410 Hz, TD 4096, REF TMS, TEMP 27°C.

## HSQC-ED

A partir dos dados do espectro de HMQC foi possível estabelecer a correlação direta heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  dos hidrogênios do açúcar e da aglicona aos seus respectivos carbonos (**Espectros 24 e 25**), confirmando-se assim os deslocamentos químicos atribuídos através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e COSY.



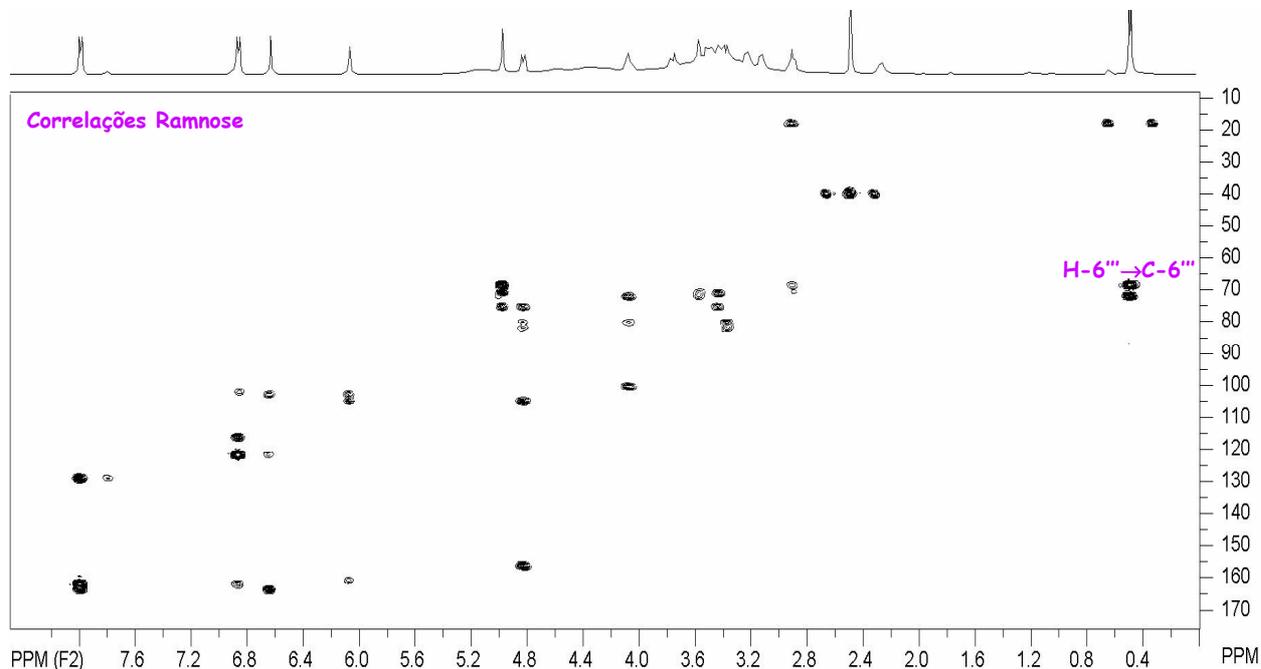
**Espectro 24:** Espectro de RMN 2D - HSQC-ED de Mx<sub>F</sub>2 (400 MHz; 100 MHz).  
Parâmetros: NS 16, SWH 6410 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.



**Espectro 25:** Espectro de RMN 2D - HSQC-ED de Mx<sub>F</sub>2 (400 MHz; 100 MHz). Expansão da região entre 4,2 e 2,8 ppm. Parâmetros: NS 16, SWH 6410 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.

## HMBC

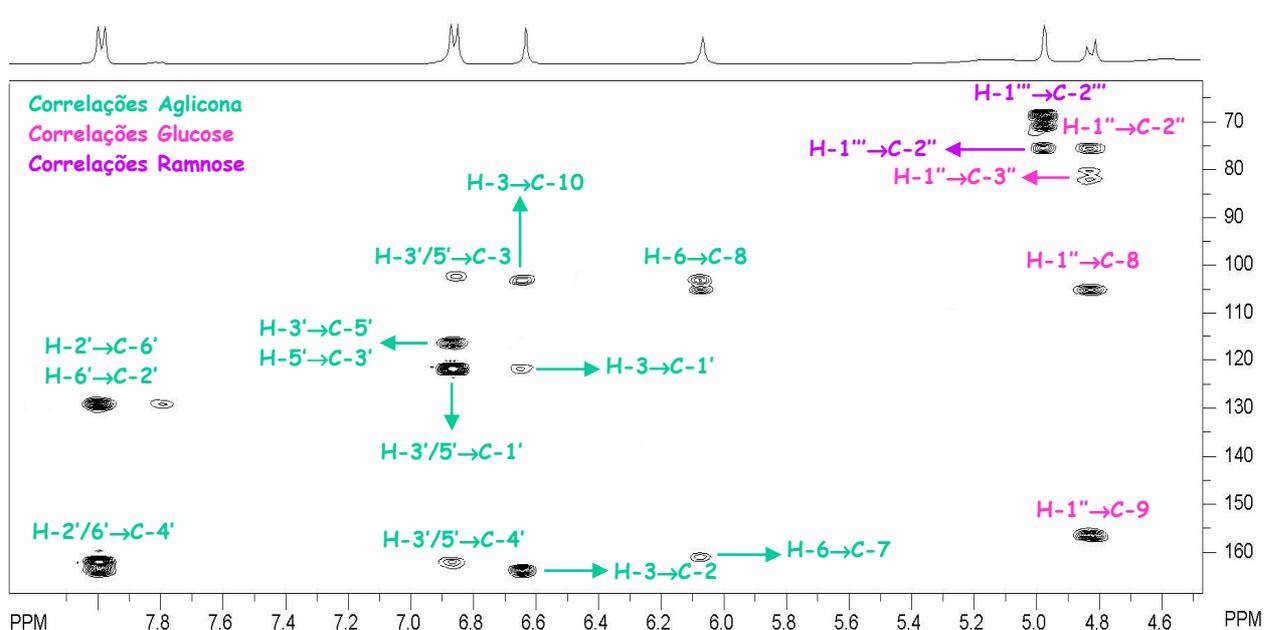
O espectro de HMBC (Espectros 26 a 28) mostrou as correlações à longa distância  $^{2-3}J_{H,C}$  para os hidrogênios da aglicona e das duas unidades de carboidrato.



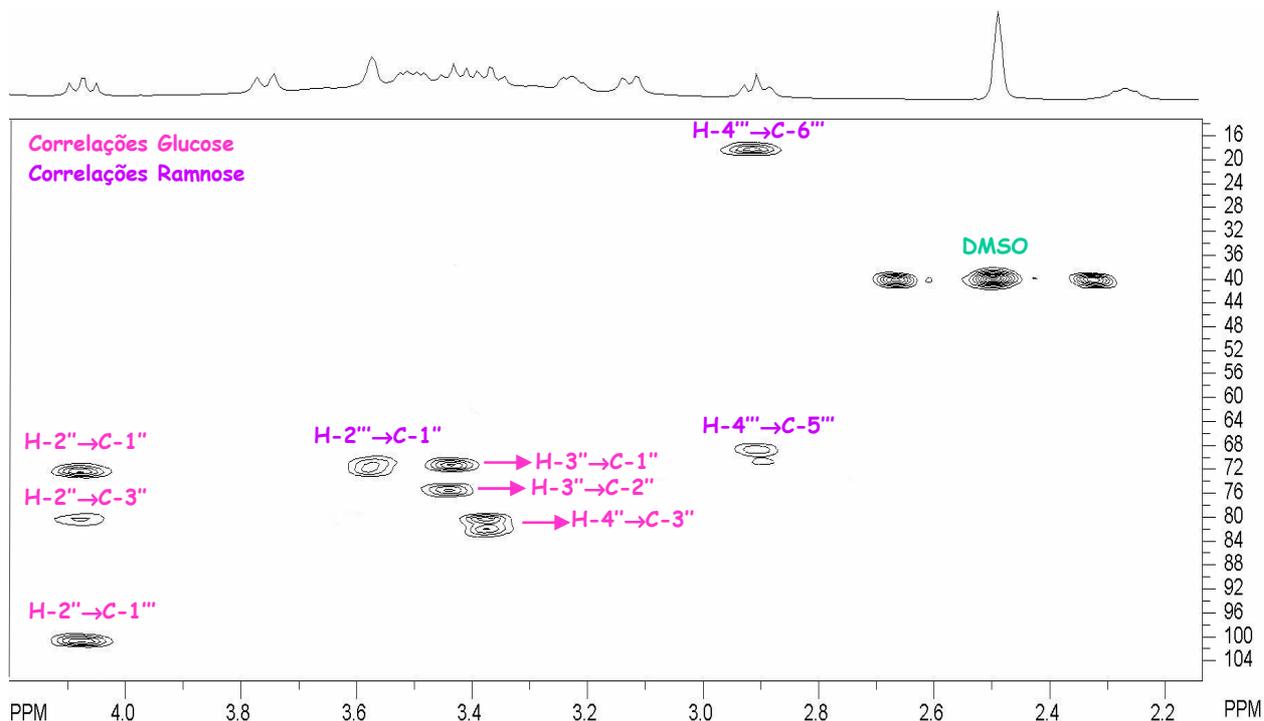
**Espectro 26:** Espectro de RMN 2D - HMBC de Mx<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (400 MHz; 100 MHz). Parâmetros: NS 16, SWH 5630 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

Para os anéis A e C da aglicona foram observadas correlações à longa distância  $^2J_{H,C}$  e  $^3J_{H,C}$ . Foram correlacionados o sinal de H-6 (6,06 ppm) com C-7 (162,51 ppm) e C-8 (105,14 ppm), além da correlação de H-3 (6,63 ppm) com C-2 (163,8 ppm), C-10 (105,14 ppm) e C-1' (121,88 ppm).

Em relação ao anel B da aglicona, foram detectadas correlações  $^3J_{H,C}$  entre H-2',6' (7,98 ppm), C-4' (161,0 ppm) e C-2',6' (129,23 ppm) e entre H-3',5' (6,89 ppm), C-1' (121,88 ppm) e C-3',5' (116,4 ppm). Verificou-se também a correlação  $^2J_{H,C}$  entre H-3',5' (6,89 ppm), C-3 (102,37 ppm) e C-4' (161,0 ppm).



**Espectro 27:** Espectro de RMN 2D - HMBC de MxF2 (400 MHz; 100 MHz). Expansão da região entre 8,0 e 4,6 ppm. Parâmetros: NS 16, SWH 5630 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

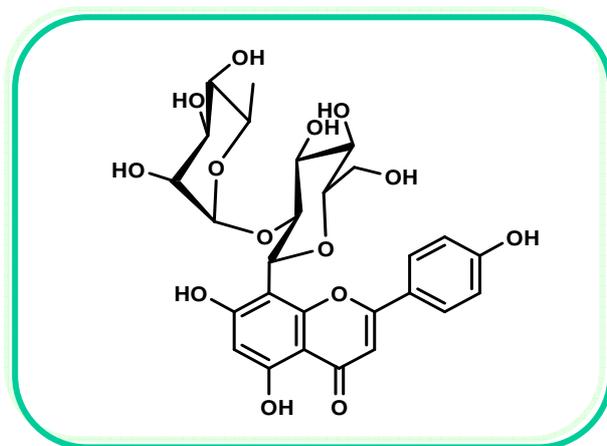


**Espectro 28:** Espectro de RMN 2D - HMBC de MxF2 (400 MHz; 100 MHz). Expansão da região entre 4,4 e 2,2 ppm. Parâmetros: NS 16, SWH 5630 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

Para as moléculas de carboidrato também foram observadas correlações à longa distância que permitiram corroborar o tipo de substituição proposta. Para a glucose, a principal correlação ocorre entre H-1" (4,82 ppm) e C-8 (105,14 ppm), confirmando a  $\alpha$ -glucosilação na posição 8 da aglicona. Em relação à ramnose, a correlação entre H-1''' (4,99 ppm) e C-2" (75,51 ppm) confirma a presença de uma ligação interglicosídica do tipo (1 $\rightarrow$ 2). Esta unidade dissacarídica composta por ramnose e glucose, ligadas entre si através da posição 1 da ramnose com a posição 2 da glucose, é conhecida como neo-hesperidose (HARBORNE & WILLIAMS, 1982).

### Proposta Estrutural

Após comparação com os dados da literatura (RAYYAN *et al.*, 2005) confirma-se para **MxF2** a estrutura da flavona apigenina-8- $\alpha$ -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -glucopiranosídeo (**Figura 20**), também conhecida como vitexina-2"- $\alpha$ -ramnopiranosídeo. Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a molécula estão listados na **Tabela 6**.



**Figura 20:** Estrutura de **MxF2**.

Esta substância, assim como **MxF1**, foi descrita pela primeira vez em 1976, a partir de *Crataegus monogyna* (Rosaceae) (JAY, 1994), sendo este o primeiro relato para a família Mimosaceae. Para este flavonóide são atribuídas atividades antioxidante, antimutagênica frente a células de câncer de mama (NINFALI *et al.*, 2007) e anti-hepatotóxica. (HOFFMANN BOHM *et al.*, 1992).

**Tabela 6:** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) e <sup>13</sup>C (75 MHz) de Mx<sub>2</sub>F<sub>2</sub> (DMSO-d<sub>6</sub>)

	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm); m; $J$ (Hz)	Correlações HMBC
<b>Aglicona: apigenina</b>			
2	163,8		
3	102,37	6,63; s	H-3 → C-2, C-10, C-1'
4	181,6		
5	161,0		
6	99,56		H-6 → C-7, C-8
7	162,51		
8	105,14	6,06; s	
9	156,33		
10	105,14		
1'	121,88		
2', 6'	129,23	7,98; d; 8,6	H-2'/6' → C-2', C-4', C-6'
3', 5'	116,4	6,89; d; 8,6	H-3'/5' → C-3, C-1', C-3'/5', C-4'
4'	161,0		
<b>Açúcar interno: 8-C-glucopiranosose</b>			
1''	72,72	4,82; d	H-1'' → C-8, C-9, C-2'', C-3''
2''	75,51	4,09; t	H-2'' → C-1'', C-3'', C-1'''
3''	80,48	3,45	H-3'' → C-1'', C-2''
4''	72,29	3,36	H-4'' → C-3''
5''	82,14	3,26	
6''	61,77	3,77 e 3,50; d	
<b>Açúcar externo: 2''-O-ramnopiranosose</b>			
1'''	100,71	4,99; s	H-1''' → C-2'', C-2'''
2'''	71,29	3,56; s	H-2''' → C-1''
3'''	70,66	3,14; dd	
4'''	70,98	2,92; t	H-4''' → C-5''', C-6'''
5'''	68,65	2,28	
6'''	18,21	0,48; d	H-6''' → C-6'''

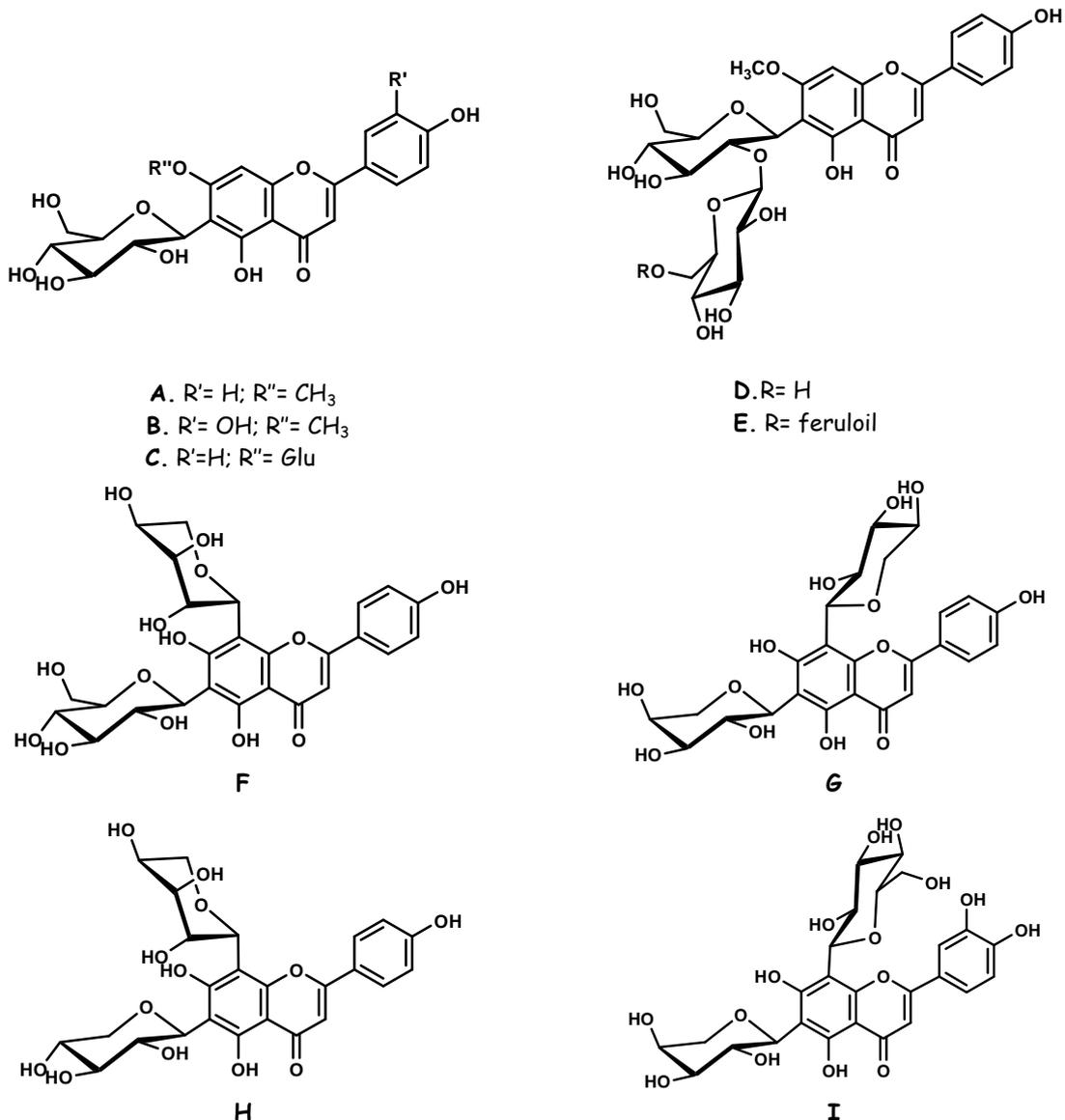
## ATROPOISOMERISMO EM FLAVONAS C-GLICOSILADAS

O atropoisomerismo, isomerismo rotacional ou rotamerismo é um tipo de estereoisomerismo característico de sistemas em que a rotação em torno de uma ligação simples é impedida, produzindo uma barreira energética suficientemente elevada, de modo a permitir o isolamento ou simplesmente a detecção dos diferentes rotâmeros ou atropoisômeros. Este fenômeno pode ser observado por sistemas  $sp^2-sp^2$ ,  $sp^2-sp^3$ , ou mesmo em sistemas  $sp^3-sp^3$  (Dos SANTOS *et al.*, 2007).

Tratando-se de flavonóides, o atropoisomerismo é comumente observado em flavonas C-glicosiladas (XIE *et al.*, 2003). Os rotâmeros são criados pelo impedimento rotacional em torno da ligação  $C(sp^3)-C(sp^2)$  do açúcar com a aglicona, podendo ser evidenciada pelo alargamento ou duplicação dos sinais nos espectros de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  (JAY, 1994; MARKHAM & GEIGER, 1994; LEWIS *et al.*, 2000; RAYYAN *et al.*, 2005).

O primeiro relato de rotamerismo em flavonas relacionava-se exclusivamente às flavonas contendo um substituinte 8-C-hexosil, não sendo observados para os análogos 6-C-hexosil (JAY, 1994). Segundo RAYYAN (2005), este fenômeno era atribuído à interação entre o anel B da flavona e o substituinte 8-C-hexosil, restringindo a rotação do anel B e/ou da hexose, levando a uma mistura de rotâmeros distinguíveis por RMN em razão da duplicidade de sinais. A distância entre o substituinte 6-C-hexosil e o anel B dificultava a interação entre eles, não sendo detectáveis os sinais duplicados ou rotâmeros.

Para os flavonas 6-C-glicosiladas, os primeiros rotâmeros só foram detectados no caso de 6-C-glucosilflavonas substituídas na posição 7 por uma metoxila ou um grupo  $O-\beta$ -glucosil, o que era explicado pelo impedimento estérico do substituinte em *orto*, levando à restrição da rotação em torno do eixo C-6-C-1" (LEWIS *et al.*, 2000). Quanto mais volumoso fosse o substituinte em C-7, maior era o impedimento estérico e o número de sinais duplicados no espectro de  $^{13}C$ . Foram relatados os rotâmeros de swertisina e swertiajaponina (DAVOUST *et al.*, 1980). Em concordância com os relatos anteriores está o rotamerismo verificado para as flavonas isovitexina 7-O- $\beta$ -D-glucopiranosídeo (NØRBÆK *et al.*, 2000), spinosina e 6"-feruloilspinosina (CHENG *et al.*, 2000) (Figura 21).



**Figura 21:** Estruturas das flavonas **A-I**. **(A)** swertisina, **(B)** swertiajaponina, **(C)** isovitexina 7-O-β-D-glucopiranosídeo, **(D)** spinosina, **(E)** 6'''-feruloilspinosina, **(F)** schaftosídeo, **(G)** apigenina- 6-C-α-L-arabinopiranosil-8-C-β-D-xilopiranosídeo, **(H)** apigenina 6-C-β-D-xilopiranosil-8-C-α-L-arabinopiranosídeo e **(I)** isocarlinosídeo .

Segundo XIE *et al.* (2003), a presença de um substituinte adicional no anel A, estando ele localizado em C-7 ou C-8, seria o requisito necessário para a existência de dois rotâmeros sobre o eixo C-6-C-1'. Em seu trabalho é relatada a existência de rotâmeros para as flavonas 6,8-di-C-glicosiladas, como o schaftosídeo, a apigenina- 6-C-α-L-arabinopiranosil-8-C-β-D-xilopiranosídeo, a apigenina 6-C-β-D-xilopiranosil-8-C-α-L-arabinopiranosídeo e isocarlinosídeo (Figura 21).

## ROTÂMEROS DE MxF1

Como abordado anteriormente na seção sobre a **Elucidação Estrutural de MxF1**, a análise dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para **MxF1** revelou a presença de sinais alargados e/ou duplicados, sugerindo a existência de dois rotâmeros desta flavona em solução de  $\text{DMSO}-d_6$ .

A presença destes dois estereoisômeros pode ser facilmente verificada através da variação da temperatura durante os experimentos de RMN. O aumento da temperatura leva à rápida interconversão dos dois rotâmeros, provocando a coalescência dos sinais duplicados. A baixa temperatura e/ou a temperatura ambiente reduz a velocidade de rotação em torno da ligação C-glicosídica, tornando possível a detecção dos dois rotâmeros (LEWIS *et al.*, 2000).

De forma a confirmar a presença de dois rotâmeros para **MxF1**, em solução de  $\text{DMSO}-d_6$ , foram realizados experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 29**) e DEPT 135 (**Espectro 31**) em duas temperaturas,  $22^\circ\text{C}$  e  $60^\circ\text{C}$ , mantendo-se constantes os demais parâmetros.

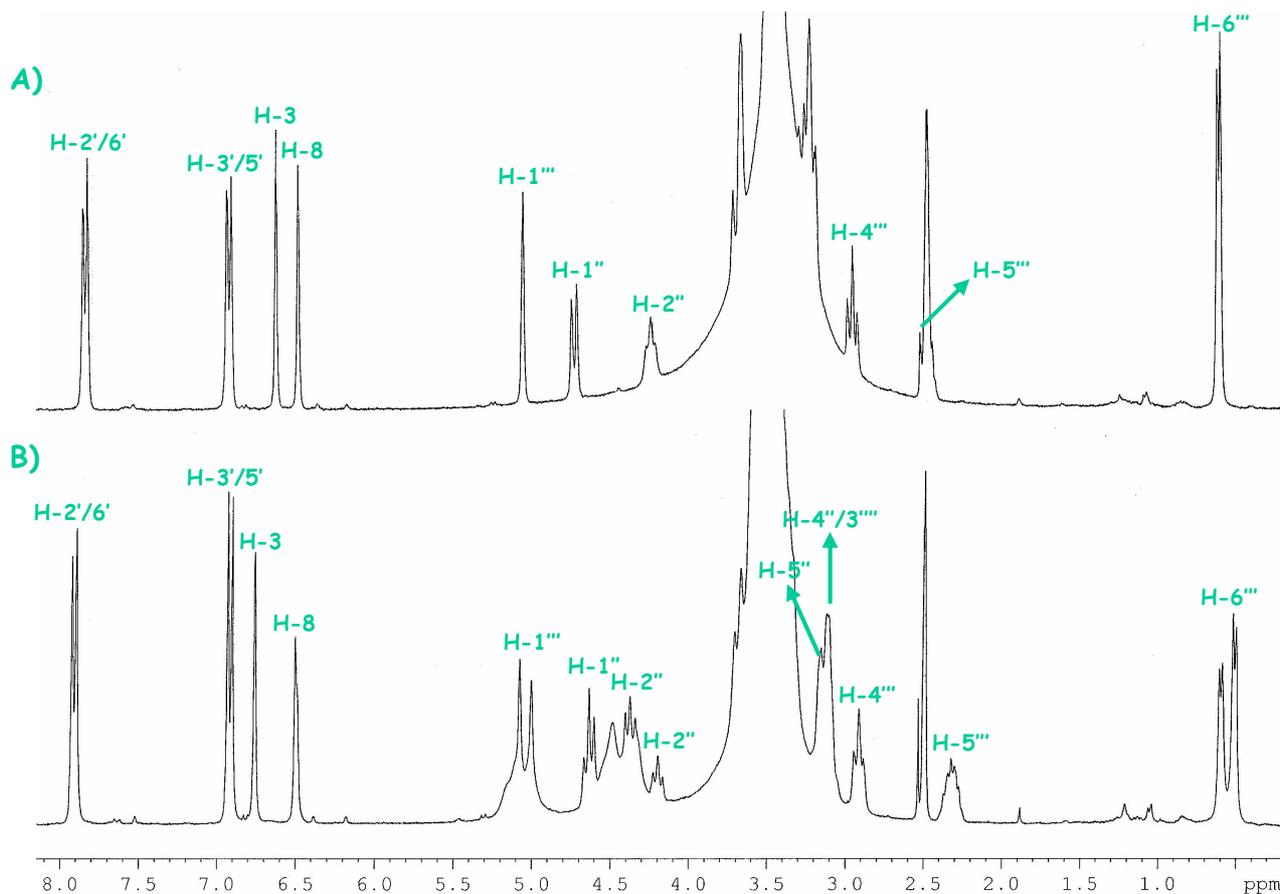
### RMN de $^1\text{H}$

Analisando-se o espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 29**), observa-se que, com o aumento da temperatura, os sinais que se encontravam duplicados a  $22^\circ\text{C}$  aparecem como um único sinal a  $60^\circ\text{C}$ , confirmando a existência de dois rotâmeros de **MxF1**.

O efeito deste tipo de isomerismo apresenta-se mais pronunciado nos hidrogênios da porção sacarídica, o que é verificado observando a coalescência dos sinais referentes aos H-1'' (4,64 ppm), H-2'' (4,35 e 4,15 ppm), H-1''' (5,07 e 5,00 ppm), H-6''' (0,51 e 0,59 ppm), além do deslocamento dos H-5''' (2,33 ppm) e H-4''' (2,92 ppm) para campo mais baixo. Os sinais que aparecem na região entre 3,0 e 4,0 ppm não puderam ser analisados devido à sobreposição com os sinais das hidroxilas alcoólicas das duas unidades de carboidrato.

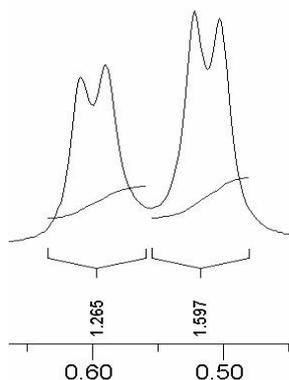
O anel B da aglicona parece ser insensível a este fenômeno, uma vez que, após a variação de temperatura, não são detectadas quaisquer alterações nos sinais referentes

aos H-2'/6' (7,91 ppm) e H-3'/5' (6,92 ppm). Este comportamento pode ser atribuído à distância do anel B ao sítio de glicosilação, o que corrobora com a afirmativa de que este efeito está relacionado com a ligação C(sp<sup>3</sup>)-C(sp<sup>2</sup>) do açúcar com a aglicona. Nos anéis A e C, o efeito do rotamerismo pode ser verificado pelo alargamento dos sinais referentes a H-3 (6,75 ppm) e H-8 (6,50 ppm).



**Espectro 29:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **MxF1** (300 MHz). **A:** Parâmetros: NS 16, SWH 7788 Hz, TD 32768, REF TMS, TEMP 60°C. **B:** Parâmetros: NS 16, SWH 7788 Hz, TD 32768, REF TMS, TEMP 22°C.

Através da integração dos sinais duplicados dos hidrogênios metálicos da ramnose (H-6''') (**Espectro 30**) verificamos que os dois rotâmeros de **MxF1** encontram-se a uma proporção de 44:56, em solução de DMSO-*d*<sub>6</sub>.



**Espectro 30:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF1** (300 MHz). Expansão da região entre 0,7 e 0,4 ppm. Parâmetros: NS 16, SWH 7788 Hz, TD 32768, REF TMS, TEMP 22°C.

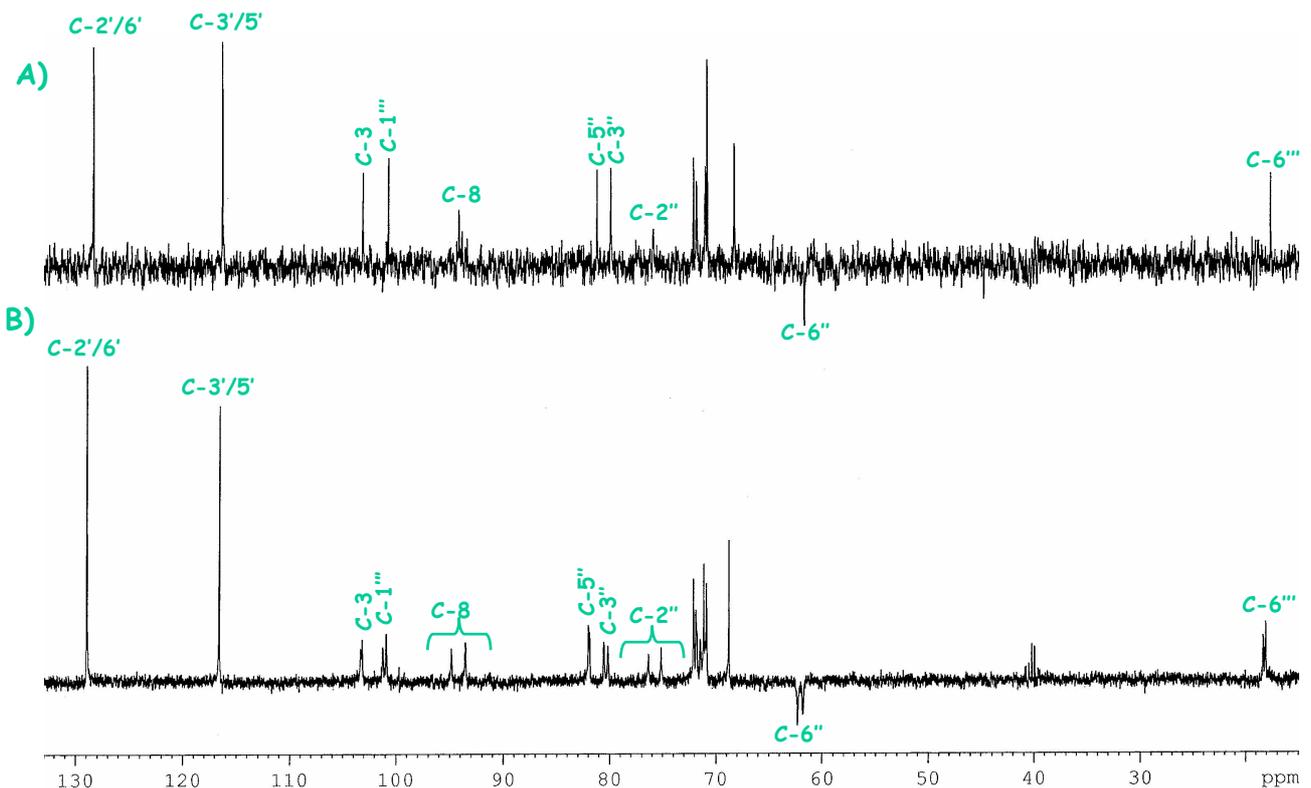
### DEPT 135

O espectro de DEPT 135 para **MxF1** (**Espectro 31**), assim como o espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , apresentou coalescência de sinais quando a temperatura é elevada para 60°C.

Para o anel B, o aumento da temperatura não promoveu quaisquer alterações nos sinais dos C-2'/6' (128,97 ppm) e C-3'/5' (116,62 ppm). Entretanto, é perfeitamente claro o efeito do rotamerismo sobre os anéis A e C, o que é corroborado pela união dos sinais referentes aos C-3 (103,33 e 103,17 ppm) e C-8 (94,85 e 93,58 ppm).

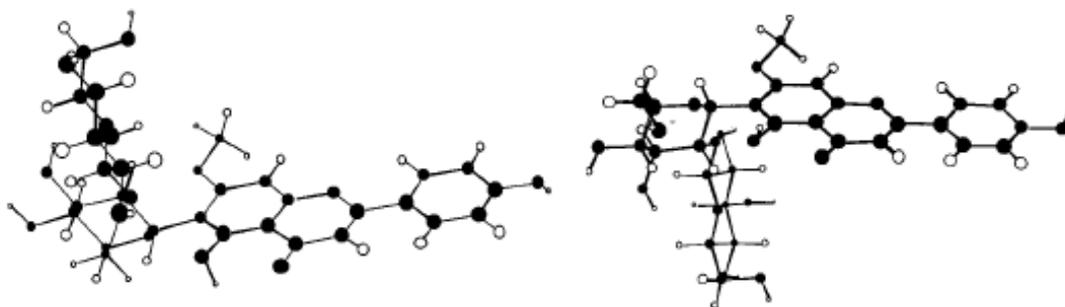
As moléculas de glucose e ramnose, como já observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , mostraram-se altamente sensíveis ao rotamerismo, uma vez que a maioria dos sinais atribuídos à porção sacarídica apresentou coalescência com o aumento da temperatura, sendo ressaltados os sinais dos C-1'' (71,89 e 71,48 ppm), C-2'' (76,36 e 75,16 ppm), C-6'' (62,26 e 61,79 ppm), C-1''' (101,27 e 100,94 ppm), C-6''' (18,34 e 17,11 ppm).

Em contraposição com a afirmativa acerca da existência de rotâmeros apenas para os análogos 7-O ou 8-C-substituídos das flavonas 6-C-glicosiladas, verificamos a presença destes isômeros para isovitexina-2''-O-ramnopiranosídeo (**MxF1**), que não possui qualquer substituinte diferente de uma hidroxila em C-7. Recentemente, RAYYAN *et al.* (2005) relataram a existência de rotâmeros para este mesmo flavonóide, quando em solução de DMSO- $d_6$ , revelando que a rotação restrita em torno da ligação C(sp<sup>3</sup>)-C(sp<sup>2</sup>) entre o açúcar e a aglicona também poderia ser observada em algumas flavonas substituídas na posição 6 por uma porção sacarídica volumosa.



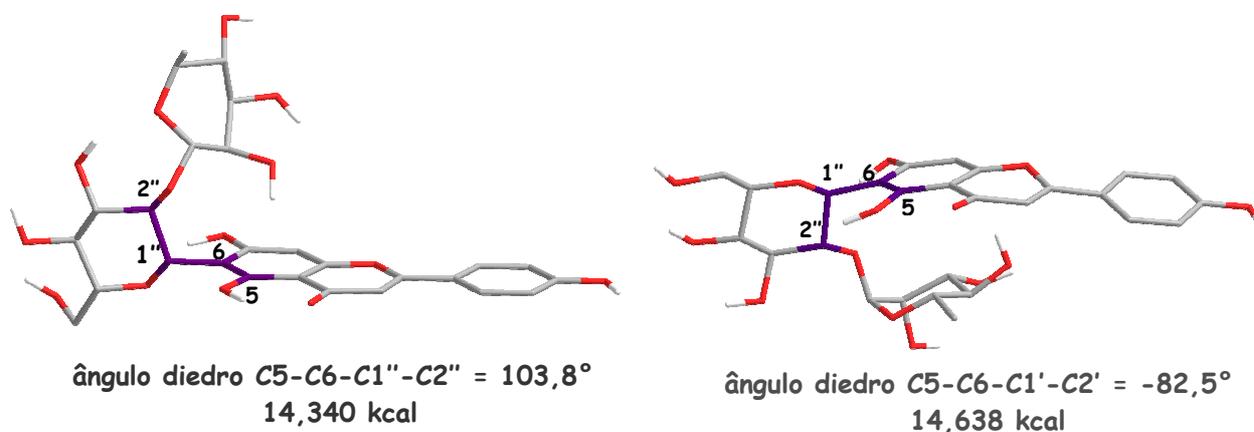
**Espectro 31:** Espectro de DEPT 135 de **MxF1** (75 MHz). **A:** Parâmetros: NS 3072, SWH 21186 Hz, REF TMS, TEMP 60°C. **B:** Parâmetros: NS 3072, SWH 21186 Hz, REF TMS, TEMP 22°C.

Com base em análises conformacionais, CHENG *et al.* (2000) excluíram a existência de rotâmeros para a flavona isovitexina-2''-O-glucopiranosídeo à temperatura ambiente. Segundo os autores, a presença de uma metoxila em C-7 como na spinosina, aumenta a barreira energética entre dois mínimos de energia, corroborando para a existência de dois confôrmeros predominantes nos espectros de RMN (**Figura 22**). A ausência desta metoxila (isovitexina-2''-O-glucopiranosídeo) reduz significativamente a barreira energética entre os dois mínimos de energia, sendo possível a rápida interconversão dos diferentes confôrmeros à temperatura ambiente.



**Figura 22:** Dois confôrmeros de spinosina obtidos através de modelagem molecular (CS Chem 3D Pro) (CHENG et al., 2000).

A partir dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  realizados à  $22^\circ\text{C}$  e  $60^\circ\text{C}$ , fica explícita a existência de dois isômeros rotacionais para **MxF1** em solução de  $\text{DMSO-d}_6$ , cujas estruturas tridimensionais puderam ser propostas com base em análises de modelagem molecular (**Figura 23**). As estruturas conformacionais para os dois rotâmeros diferem essencialmente no arranjo da unidade dissacarídica em relação ao plano do esqueleto da parte aglicona.



**Figura 23:** Dois confôrmeros de isovitexina-2''-*O*-ramnopiranosídeo (**MxF1**) obtidos através de modelagem molecular.

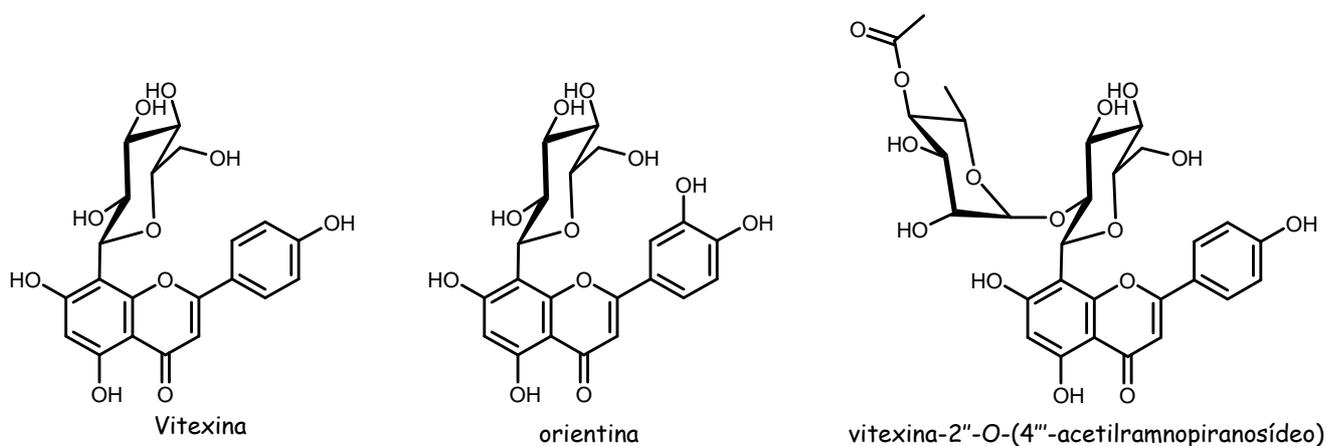
## ROTÂMEROS DE MxF2

Analisando-se os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para **MxF2** (Espectros 16 e 19), não é detectada a presença sinais duplicados, indicando que não há rotâmeros para este flavonóide.

Em contradição com o fato aqui observado, RAYYAN *et al.* (2005) relatam a existência de rotâmeros para a mesma substância, vitexina-2''-O-ramnopiranosídeo (**MxF2**), revelada pela presença de sinais (a maioria dos sinais referentes à aglicona e ao açúcar) duplicados no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Para as flavonas 8-C-glicosiladas orientina, vitexina-2''-O-(4'''-acetilramnopiranosídeo) e vitexina também é verificada a presença destes isômeros (**Figura 24**).

Sabe-se que a presença de flavonas rotaméricas e suas proporções relativas são influenciadas pelo solvente utilizado, pela posição de ligação na aglicona e pela estrutura do açúcar (RAYYAN *et al.*, 2005). Para **MxF2**, o fator limitante da presença de rotâmeros pode ser atribuído ao uso de  $\text{DMSO-}d_6$ , ao contrário do  $\text{CD}_3\text{OD}$  utilizado por RAYYAN. Em estudo comparativo utilizando  $\text{DMSO-}d_6$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ , verificou-se que as proporções dos rotâmeros minoritários aumentavam consideravelmente quando os compostos eram solubilizados em  $\text{CD}_3\text{OD}$ . Tal fato sugere que o metanol estaria contribuindo para a estabilização de duas conformações principais, provocando um aumento na barreira energética de equilíbrio entre os confôrmeros e, assim, permitindo a detecção dos rotâmeros por RMN.

A substituição do  $\text{DMSO-}d_6$  pelo  $\text{CD}_3\text{OD}$  na realização dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  permitirá confirmar a existência de rotâmeros para o flavonóide **MxF2** (vitexina-2''-O-ramnopiranosídeo).



**Figura 24:** Estruturas das flavonas 8-C-glicosiladas relacionadas por RAYYAN *et al.*, 2005

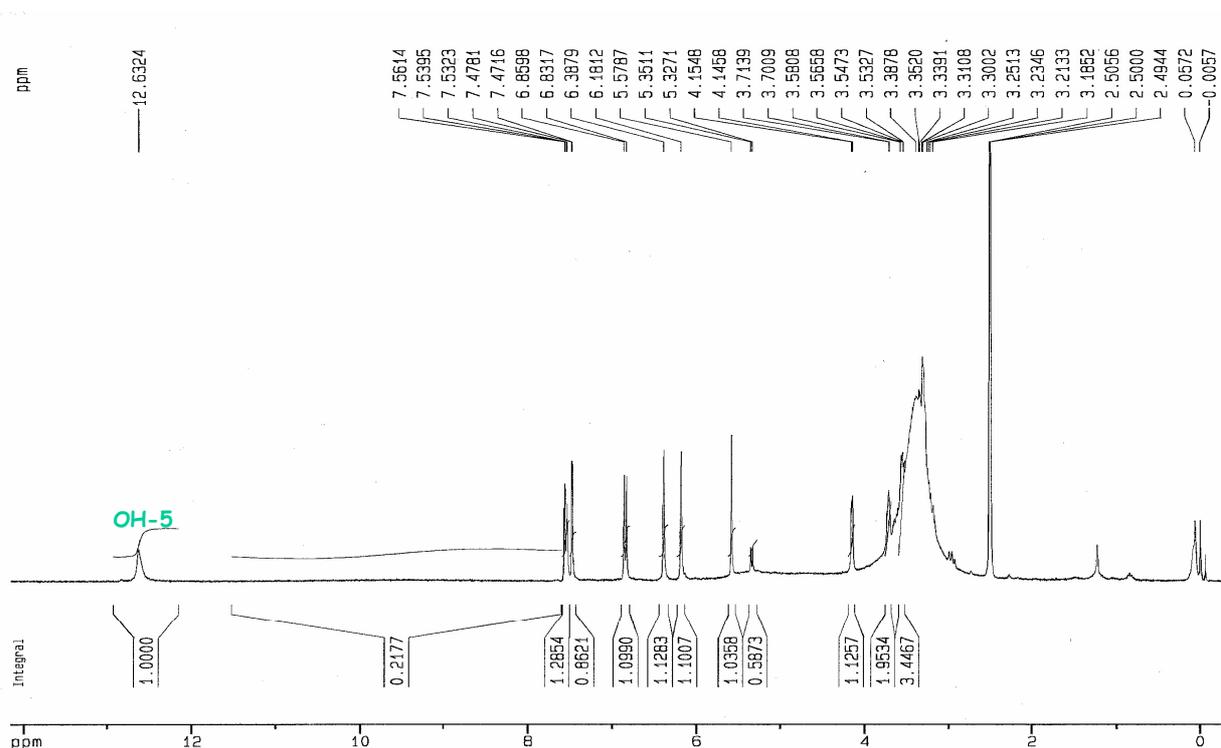
## ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE Mx<sub>F</sub>3

O material flavonoídico codificado como **Mx<sub>F</sub>3** (8,1 mg; R<sub>f</sub> 0,86; BAW 8:1:1), isolado da fração acetato de etila proveniente da partição do extrato aquoso de *Mimosa xanthocentra*, apresentou-se sob a forma de grânulos amarelos.

A proposta estrutural para **Mx<sub>F</sub>3** foi baseada nos dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, DEPT 135, HQC, HMBC e COSY obtidos em DMSO-d<sub>6</sub> (concentração 13,5 mg/ml)

### RMN de <sup>1</sup>H

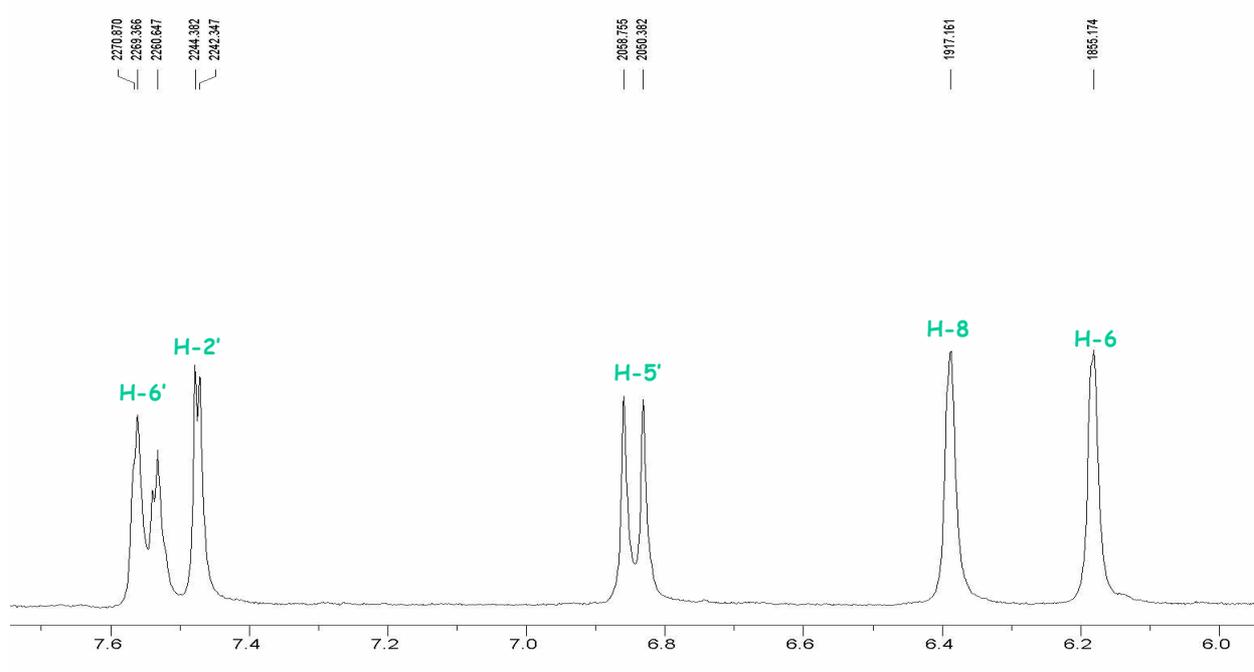
Analisando-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H para **Mx<sub>F</sub>3** (**Espectro 32**) podemos observar sinais compatíveis para um flavonóide de natureza glicosídica (aglicona + carboidrato).



**Espectro 32:** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de **Mx<sub>F</sub>3** (300 MHz). Parâmetros: NS 32, SWH 7788 Hz, TD 32768, REF TMS, TEMP 27°C.

O sinal mais desblindado do espectro (simpleto; 12,63 ppm) corresponde ao hidrogênio de uma hidroxila localizada na posição 5 do anel A da aglicona, em ligação de hidrogênio com o oxigênio da carbonila em 4. Na região entre 6,0 e 8,0 ppm encontram-se os hidrogênios de núcleos aromáticos, enquanto que na região entre 2,0 e 5,5 ppm encontram-se os hidrogênios da porção glicídica da molécula.

Para o anel B foi verificado um padrão diferente do observado para Mx<sub>F</sub>1 e Mx<sub>F</sub>2 (**Espectro 33**). Os sinais em 7,56 ppm (dd;  $^1J = 8,38$  Hz;  $^2J = 2,0$  Hz), 7,47 ppm (d;  $J = 2,0$  Hz) e 6,84 ppm (d;  $J = 8,38$  Hz) evidenciam um sistema ABX, sendo atribuídos, respectivamente, aos H-6', H-2' e H-5'. O acoplamento *meta* entre H-2' e H-6' e o acoplamento *orto* entre H-5' e H-6' caracterizam um anel B substituído na posição 3' e 4' (padrão 3',4'-OH).

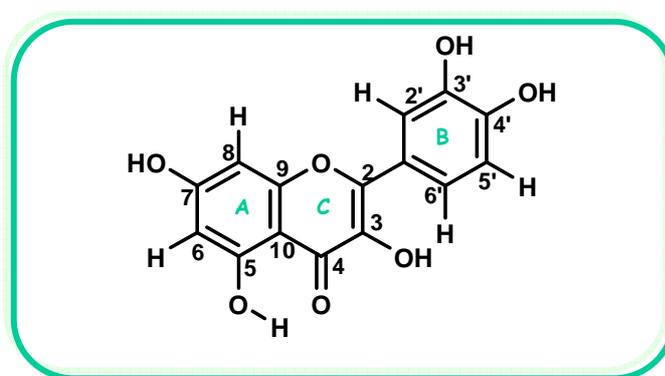


**Espectro 33:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de Mx<sub>F</sub>3 (300 MHz). Expansão da região entre 6,0 e 8,0 ppm. Parâmetros: NS 32, SWH 7788 Hz, TD 32768, REF TMS, TEMP 27°C.

Para o anel A são observados simpletos em 6,38 ppm e 6,18 ppm, correspondentes respectivamente aos H-8 e H-6. A magnitude dos deslocamentos químicos observados para esses dois hidrogênios corrobora com um padrão 5,7-diidroxilado e com a ausência de metilação ou glicosilação nessas posições (substituição em OH-7 desloca os sinais de H-6 e H-8 para campo baixo) (MARKHAM & GEIGER, 1994).

A ausência de um sinal referente à H-3 evidencia a presença de um flavonol.

Esses dados permitem propor para a aglicona de **MxF3** a estrutura da quercetina (3,5,7,3',4'-pentaidroxiflavonol; **Figura 25**). O provável sítio de substituição na aglicona é a posição 3, uma vez que já foram descartadas as demais posições.



**Figura 25:** Estrutura da aglicona de **MxF3**.

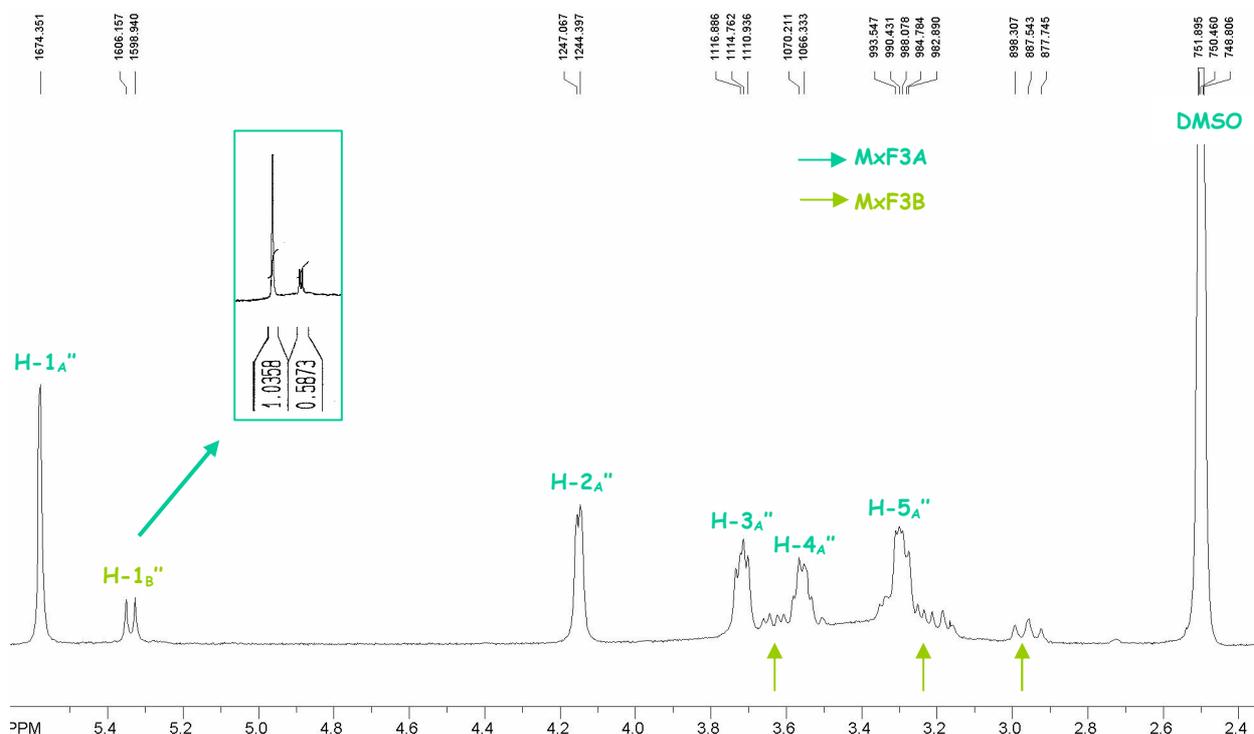
Na região dos hidrogênios da porção glicosídica (**Espectro 34**) encontram-se os hidrogênios referentes a duas unidades de carboidrato. São evidenciados dois hidrogênios anoméricos: um simpleto em 5,57 ppm e um duplete em 5,33 ppm ( $J = 7,21$  Hz), ambos com deslocamento químico característico de O-glicosilação direta à aglicona.

A diferente intensidade dos sinais dos hidrogênios anoméricos e outros hidrogênios da porção glicídica, associada à presença de sinais relativos a uma única aglicona e com deslocamentos químicos que evidencie apenas um sítio de substituição, sugere a presença de dois flavonóides em **MxF3**. Dessa forma, **MxF3** corresponde a uma mistura de dois flavonóides - um flavonóide majoritário (será denominado **MxF3A**, H-1<sub>A</sub>'' em 5,57 ppm) e um minoritário (será denominado **MxF3B**, H-1<sub>B</sub>'' em 5,33 ppm) - que compartilham a mesma

aglicona e posição de substituição, mas diferem quanto à identidade do açúcar. A integração dos sinais relativos aos hidrogênios anoméricos indica que esses flavonóides encontram-se na proporção de 2:1.

Em relação ao flavonóide **MxF3A**, são observados apenas cinco sinais de hidrogênios de carboidrato, sugerindo a presença de uma pentose. Excetuando-se o duplete em 4,15 ppm ( $J = 2,67$  Hz), os demais sinais aparecem como multipletos, impossibilitando a determinação da constante de acoplamento.

Para **MxF3B**, a sobreposição de seus sinais aos de **MxF3A** dificulta inferir sobre o número de hidrogênios da molécula de açúcar e seus deslocamentos químicos.



**Espectro 34:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxF3** (300 MHz), com supressão de  $\text{H}_2\text{O}$ . Expansão da região entre 2,4 e 6,0 ppm. Parâmetros: NS 32, SWH 7788 Hz, TD 32768, REF TMS, TEMP 27°C.

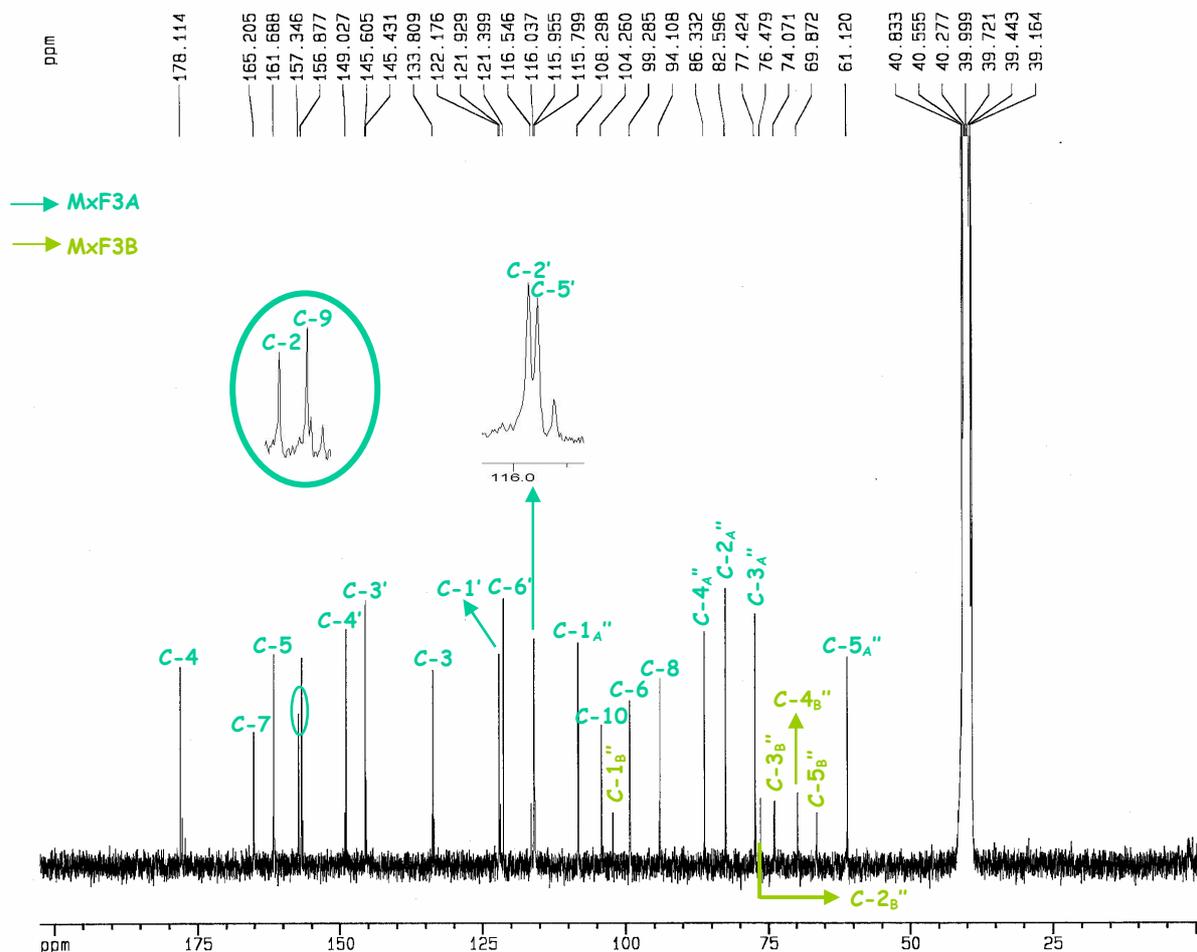
Com base nos dados parciais, pode-se propor que **MxF3** seja constituído por dois flavonóis com esqueleto de quercetina (**MxF3A** e **MxF3B**), ambos substituídos na posição 3

por uma unidade de carboidrato em ligação *O*-glicosídica. Os sinais dos hidrogênios da porção glicídica de **MxF3A** sugerem a presença de uma pentose como açúcar.

### RMN de $^{13}\text{C}$ e DEPT 135

O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  forneceu 24 sinais (**Espectro 35**). Quatorze sinais são atribuídos aos carbonos da aglicona e os dez sinais restantes aos carbonos de duas unidades de carboidrato, indicando a presença de duas pentoses.

Os sinais em 116,0 ppm (C-2' e C-5'), 145,6 ppm (C-3'), 149,0 ppm (C-4') e 121,4 ppm (C-6') confirmam o padrão 3',4'-diidroxilado para o anel B. O padrão 5,7-diidroxilado do anel A é confirmado pelo deslocamento químico dos C-6 (99,3 ppm), C-7 (165,2 ppm) e C-8 (94,1 ppm).



**Espectro 35:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **MxF3** (75 MHz). Parâmetros: NS 67584, SWH 21186 Hz, TD 65536, REF TMS, TEMP 27°C.

Os deslocamentos químicos dos carbonos do anel C corroboram a presença de um flavonol. A oxigenação na posição 3 provoca a desproteção dos sinais referentes a C-4 (178,1 ppm) e C-3 (133,1 ppm), e a proteção de C-2 (157,3 ppm), o que é evidenciado em **Mx<sub>F</sub>3** (MARKHAM & CHARI, 1978).

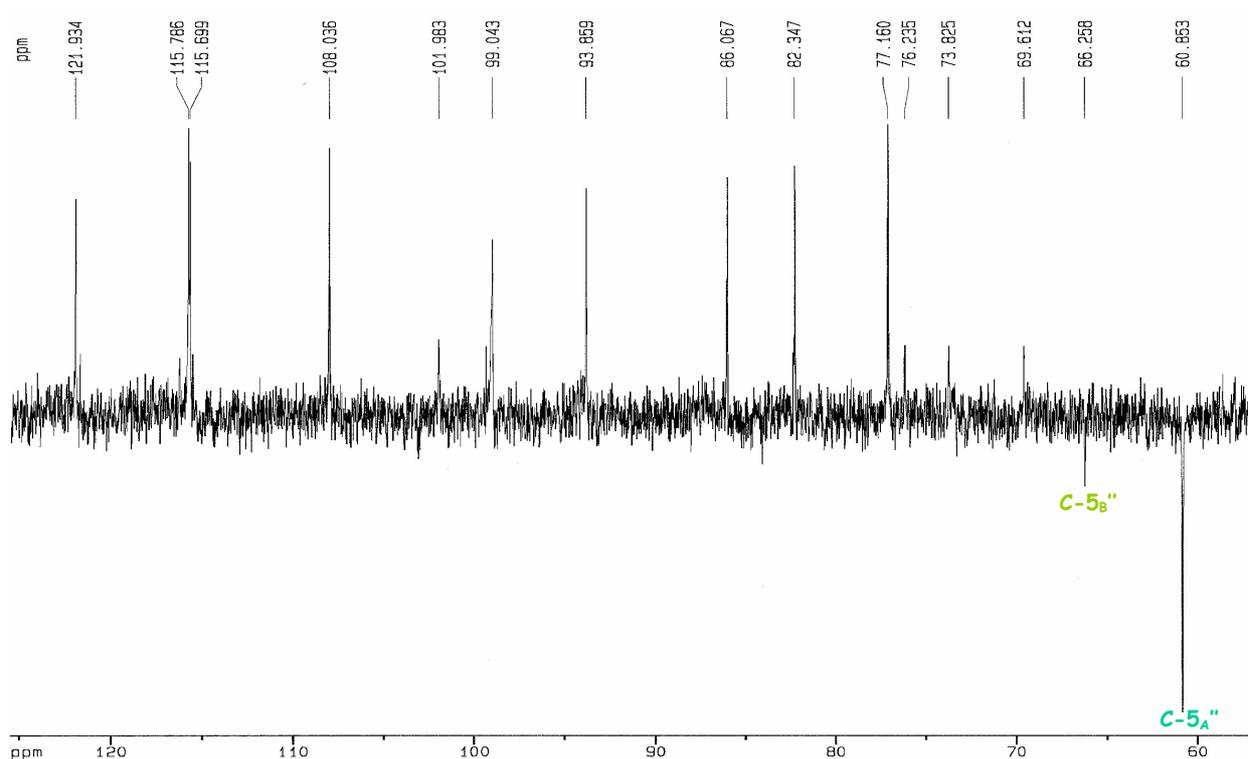
O sítio de *O*-glicosilação pode ser facilmente diagnosticado analisando-se os deslocamentos químicos da aglicona do flavonóide. Em termos gerais, a presença de uma glicosilação promove a proteção do carbono substituído, enquanto que o carbono *orto* ou *para* em relação à posição de glicosilação sofre uma desproteção. A ausência desses efeitos exclui a posição 7 como possível sítio de substituição (MARKHAM & CHARI, 1982).

No caso de glicosilação na OH-3, além da proteção já esperada para C-3 (aproximadamente 2,0 ppm), a desproteção de C-2 (carbono em relação *orto* a C-3) é especialmente pronunciada, sendo da ordem de 9,2 ppm (MARKHAM & CHARI, 1982). Comparando-se os deslocamentos químicos de C-2 e C-3 com as faixas esperadas para um flavonol (145-150 ppm para C-2 e 136-139 ppm para C-3), podemos afirmar sem ambigüidade que o sítio de glicosilação na aglicona de **Mx<sub>F</sub>3** é a posição 3.

A diferente intensidade dos sinais relativos às duas unidades de carboidrato corrobora a presença de dois flavonóides em **Mx<sub>F</sub>3** (**Mx<sub>F</sub>3A** e **Mx<sub>F</sub>3B**), ambos compartilhando a mesma aglicona.

Em relação à **Mx<sub>F</sub>3A** (flavonóide majoritário), o deslocamento químico relativamente alto do carbono anomérico (C-1<sub>A</sub>) revela que, além da *O*-glicosilação, esta pentose encontra-se sob a forma furanosídica. A inversão do sinal em 60,85 ppm (C-5) no espectro de DEPT 135 (**Espectro 36**) indica a presença de um metileno (CH<sub>2</sub>) na molécula de açúcar. Os sinais da porção glicídica são compatíveis com os observados para a arabinofuranose.

Para **Mx<sub>F</sub>3B** (flavonóide minoritário), o deslocamento químico do carbono anomérico (C-1<sub>B</sub>) sugere a presença de uma pentose sob a forma piranosídica. Assim como observado para o flavonóide majoritário, a inversão do sinal em 66,25 ppm no espectro de DEPT 135 (**Espectro 36**) indica a presença de um metileno (CH<sub>2</sub>) na molécula de açúcar. Os sinais da porção glicídica desse flavonóide são compatíveis com os observados para a xilopirranose.

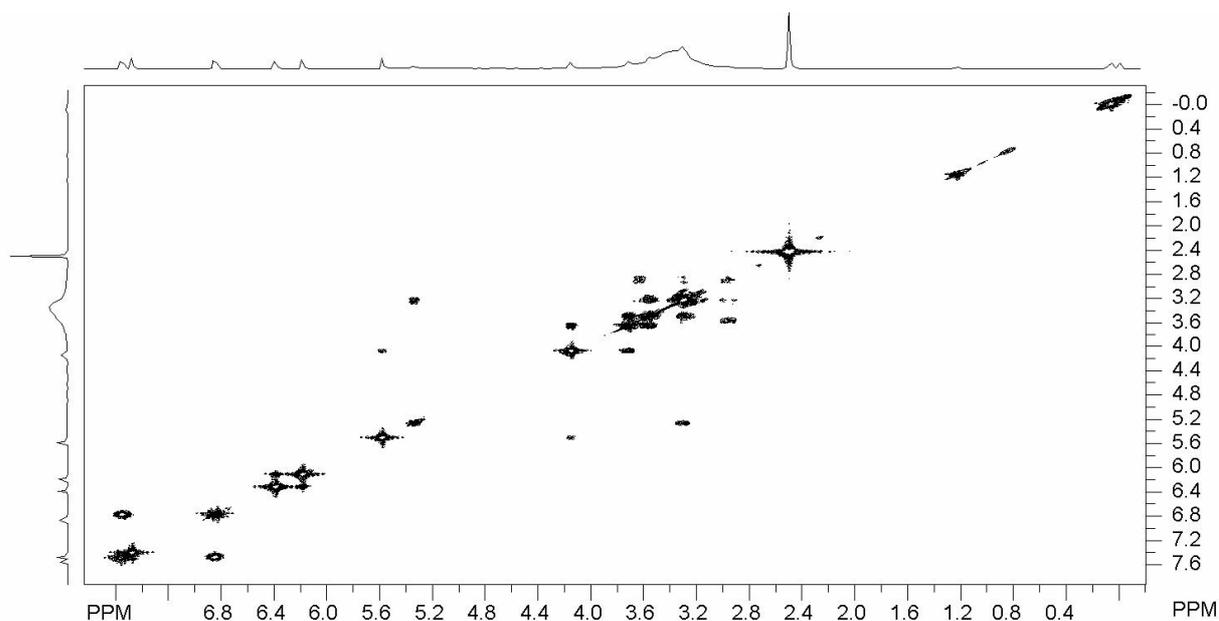


**Espectro 36:** Espectro de DEPT 135 de **MxF3** (75 MHz). Parâmetros: NS 4096, SWH 21186 Hz, REF TMS, TEMP 27°C.

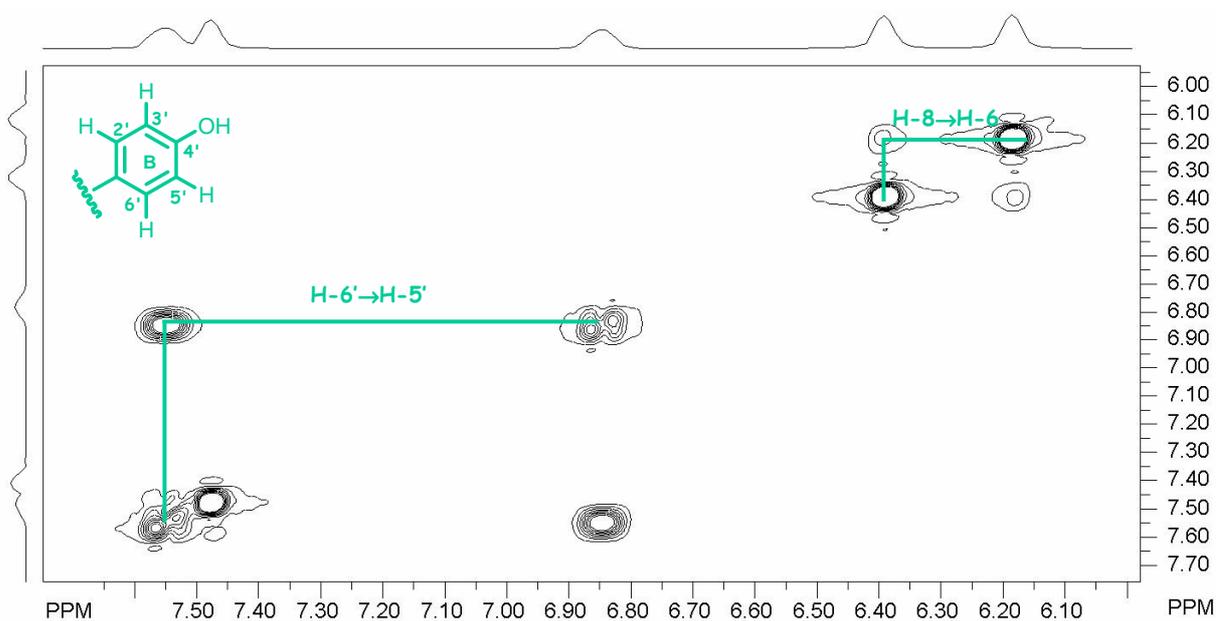
A partir dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135, além dos dados de RMN de  $^1\text{H}$ , verifica-se que **MxF3** corresponde a uma mistura de dois flavonóis de mesma aglicona e sítio de substituição (**MxF3A** e **MxF3B**). Pode-se propor para **MxF3A** a estrutura da quercetina 3-*O*-arabinofuranosídeo e para **MxF3B** a estrutura da quercetina 3-*O*-xilopiranosídeo. Estas serão confirmadas através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  bidimensionais (COSY, HMQC e HMBC).

### COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$

A partir da análise do COSY (correlação homonuclear  $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) foi possível identificar os deslocamentos químicos de todos os hidrogênios dos dois flavonóides presentes em **MxF3**, através do acoplamento seqüenciado dos hidrogênios (**Espectro 37**).

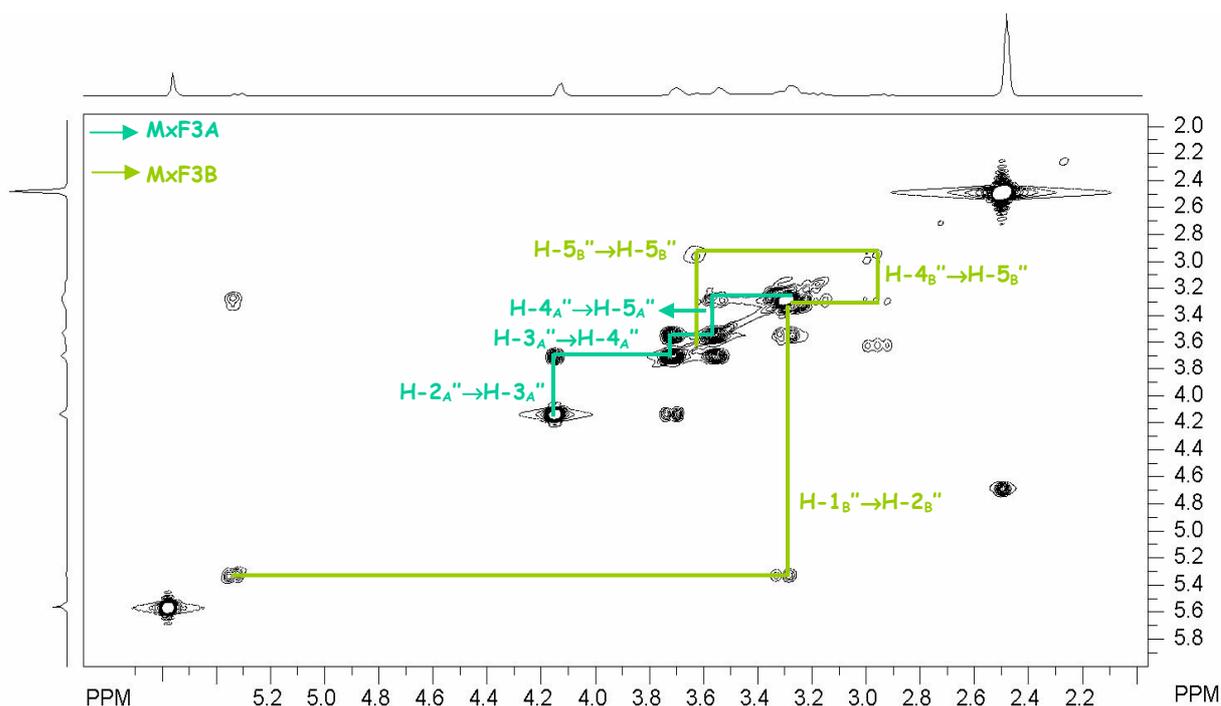


**Espectro 37:** Espectro de RMN 2D - COSY 90 de MxF3 (300 MHz). Parâmetros: NS 8, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.



**Espectro 38:** Espectro de RMN 2D - COSY 90 de MxF3 (300 MHz). Expansão da região entre 8,0 e 6,0 ppm. Parâmetros: NS 8, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

Na expansão entre 6,00 e 8,00 ppm (**Espectro 38**), observou-se o acoplamento entre H-6' e H-5'. Embora não tenha sido possível visualizar o acoplamento de H-6' com H-2', as informações fornecidas pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , juntamente com o espectro de COSY, evidenciam o padrão 3',4'-diidroxilado para o anel B. Da mesma forma, observou-se a correlação entre H-6 e H-8 corroborando o padrão 5,7-diidroxilado para o anel A da aglicona.

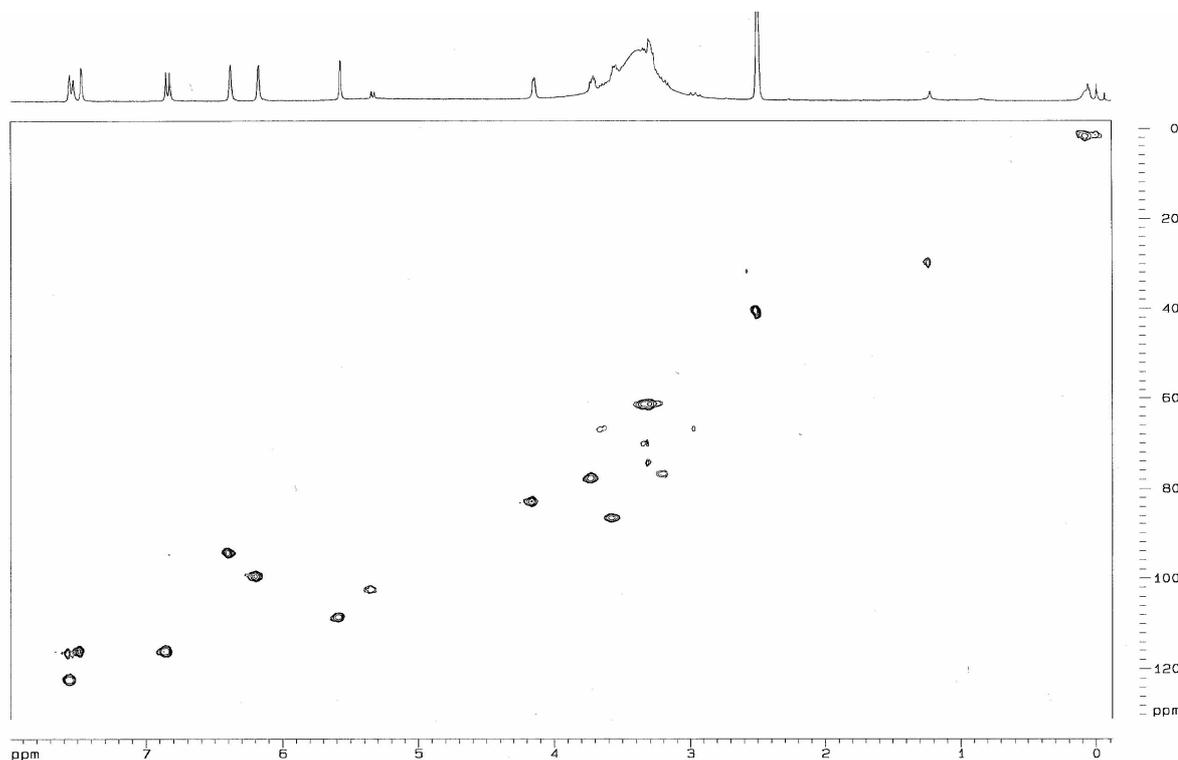


**Espectro 39:** Espectro de RMN 2D - COSY 90 de **MxF3** (300 MHz). Expansão da região entre 6,0 e 2,0 ppm. Parâmetros: NS 8, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

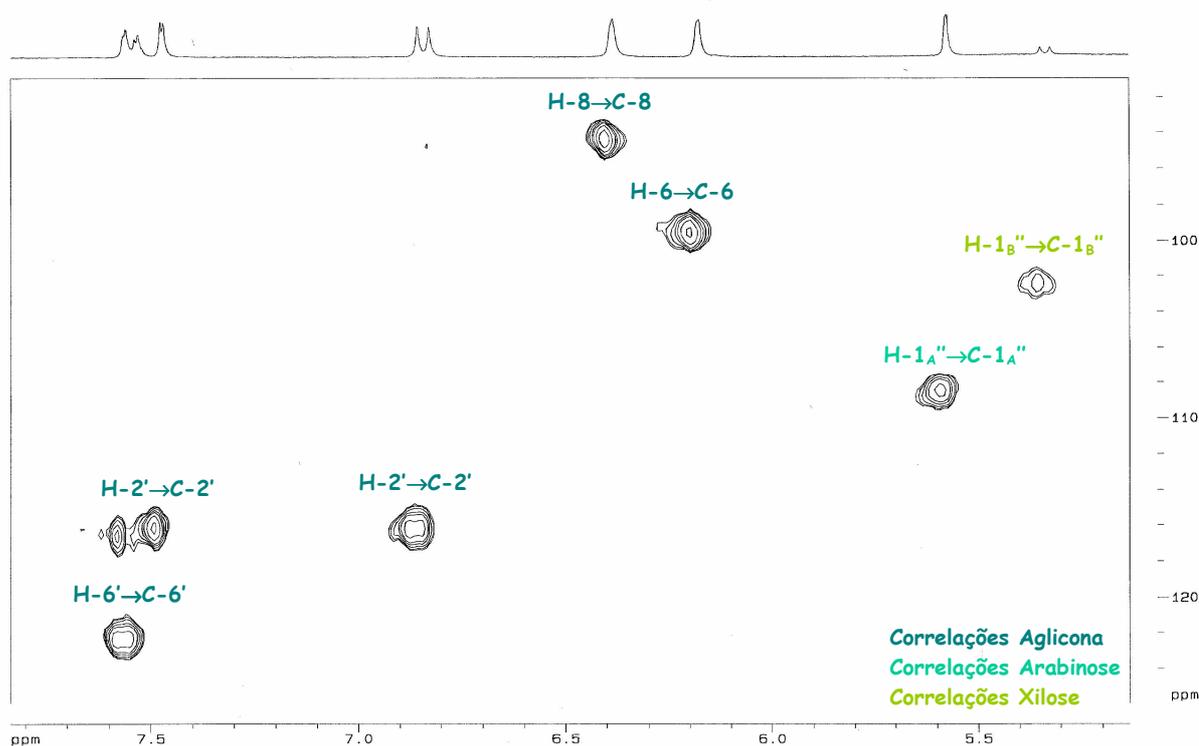
Na expansão da região entre 6,0 e 2,0 ppm (**Espectro 39**) podem-se observar as correlações seqüenciadas dos hidrogênios das moléculas de arbinose (**MxF3A**) e xilose (**MxF3B**). Em relação a **MxF3B**, a resolução do espectro de COSY impossibilitou a observação das correlações entre H-2<sub>B</sub>'' → H-3<sub>B</sub>'' e H-3<sub>B</sub>'' → H-4<sub>B</sub>''.

## HMQC

O espectro de HMQC (Espectros 40,41 e 42), através da correlação direta heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  entre os hidrogênios do açúcar e da aglicona aos seus respectivos carbonos, permitiu corroborar os deslocamentos químicos previamente estabelecidos pelos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e COSY.

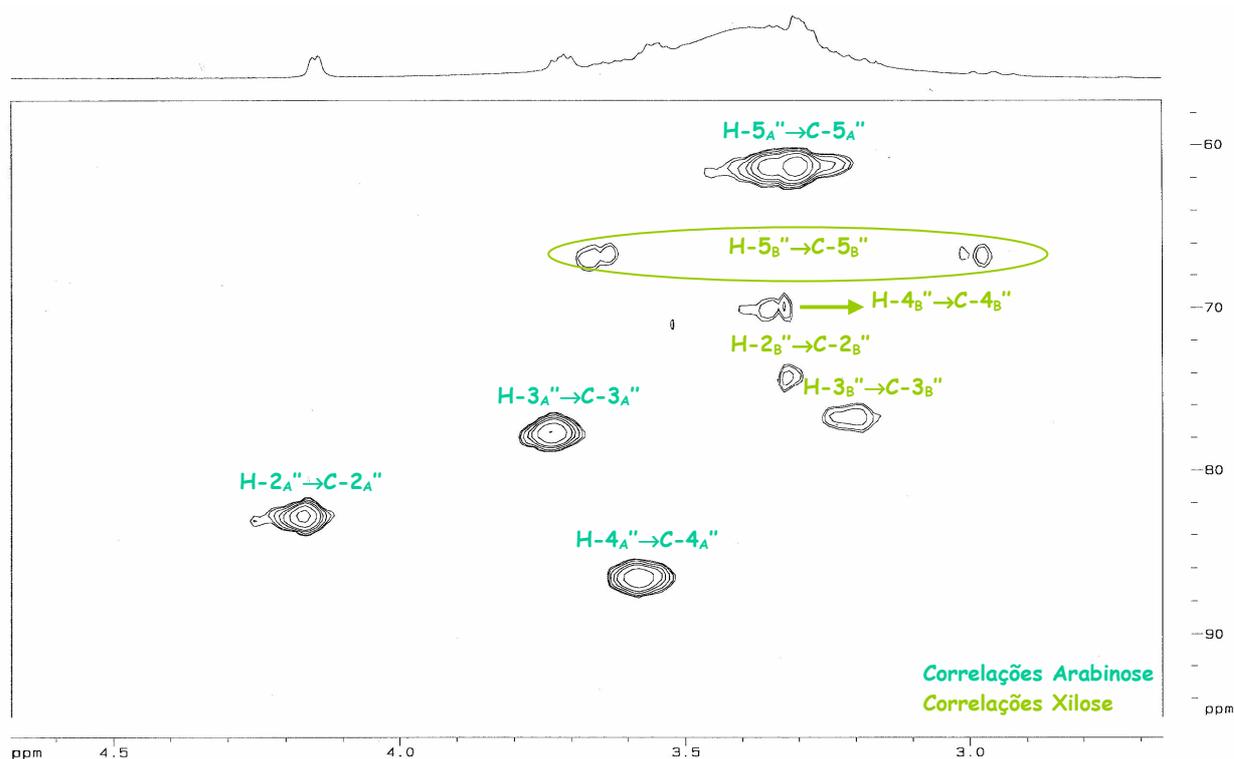


**Espectro 40:** Espectro de RMN 2D - HMQC de **MxF3** (300 MHz; 75 MHz). Parâmetros: NS 32, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.



**Espectro 41:** Espectro de RMN 2D - HMQC de **MxF3** (300 MHz; 75 MHz). Expansão da região entre 8,0 e 5,0 ppm. Parâmetros: NS 32, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

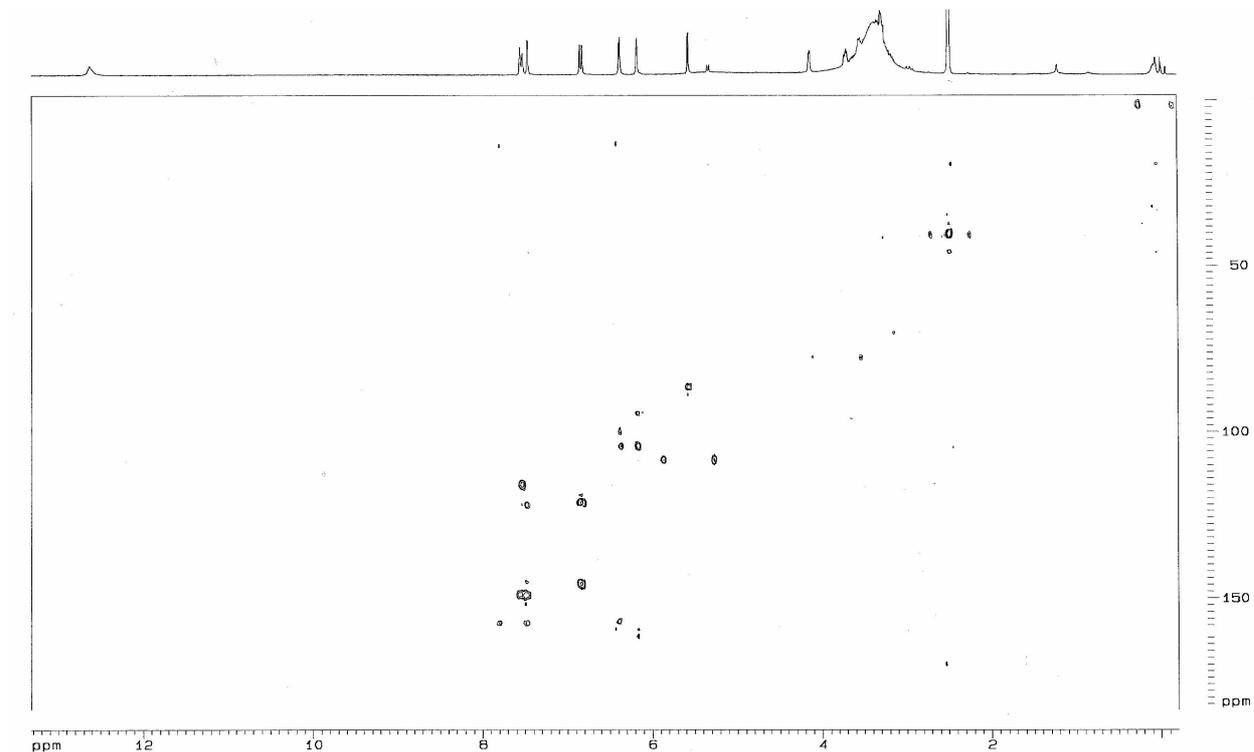
As correlações evidenciadas no espectro de HMQC foram fundamentais para a atribuição dos deslocamentos químicos de todos os hidrogênios da molécula de açúcar do flavonóide **MxF3B** (Espectro 42).



**Espectro 42:** Espectro de RMN 2D - HMQC de **MxF3** (300 MHz; 75 MHz). Expansão da região entre 4,6 e 2,7 ppm. Parâmetros: NS 32, SWH 3004 Hz, TD 1024, REF TMS, TEMP 27°C.

## HMBC

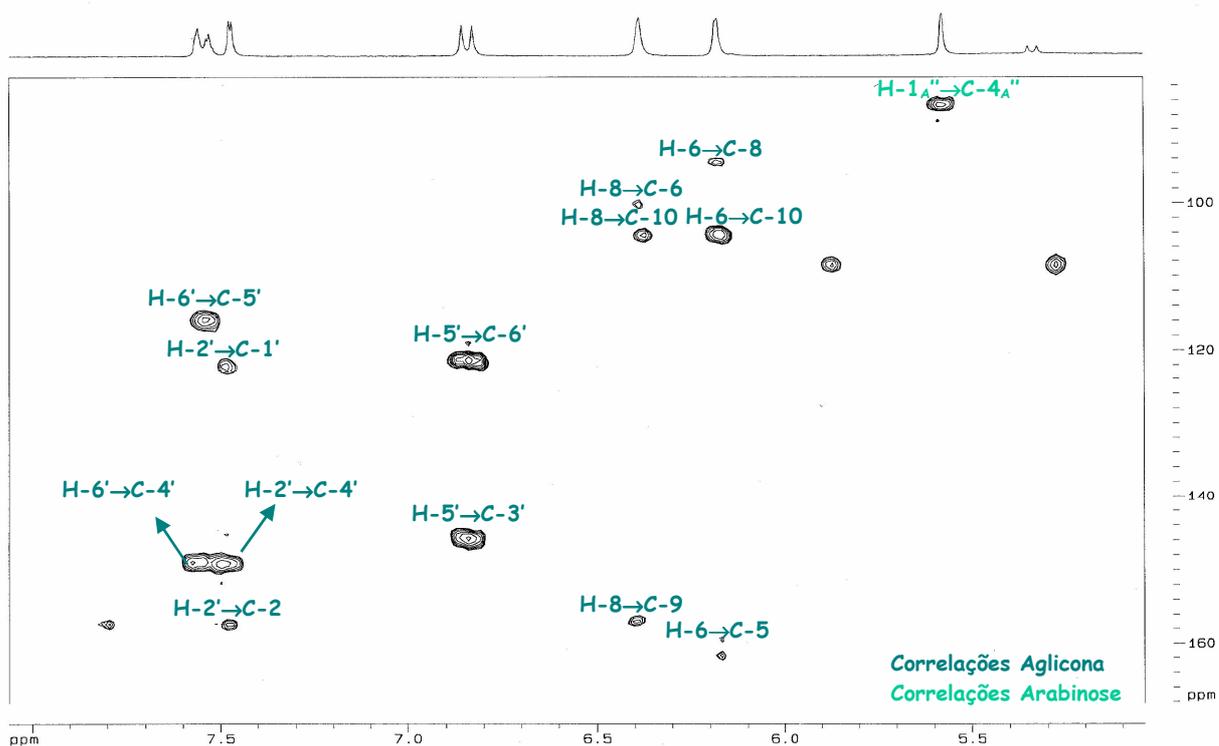
O espectro de HMBC (**Espectro 43**) mostrou as correlações à longa distância  $^{2-3}J_{H,C}$  para os hidrogênios da aglicona e da molécula de arabinose do flavonóide **MxF3A**. Em relação à **MxF3B**, as correlações à longa distância não puderam ser determinadas sem ambigüidade devido à menor proporção desse flavonóide em **MxF3**.



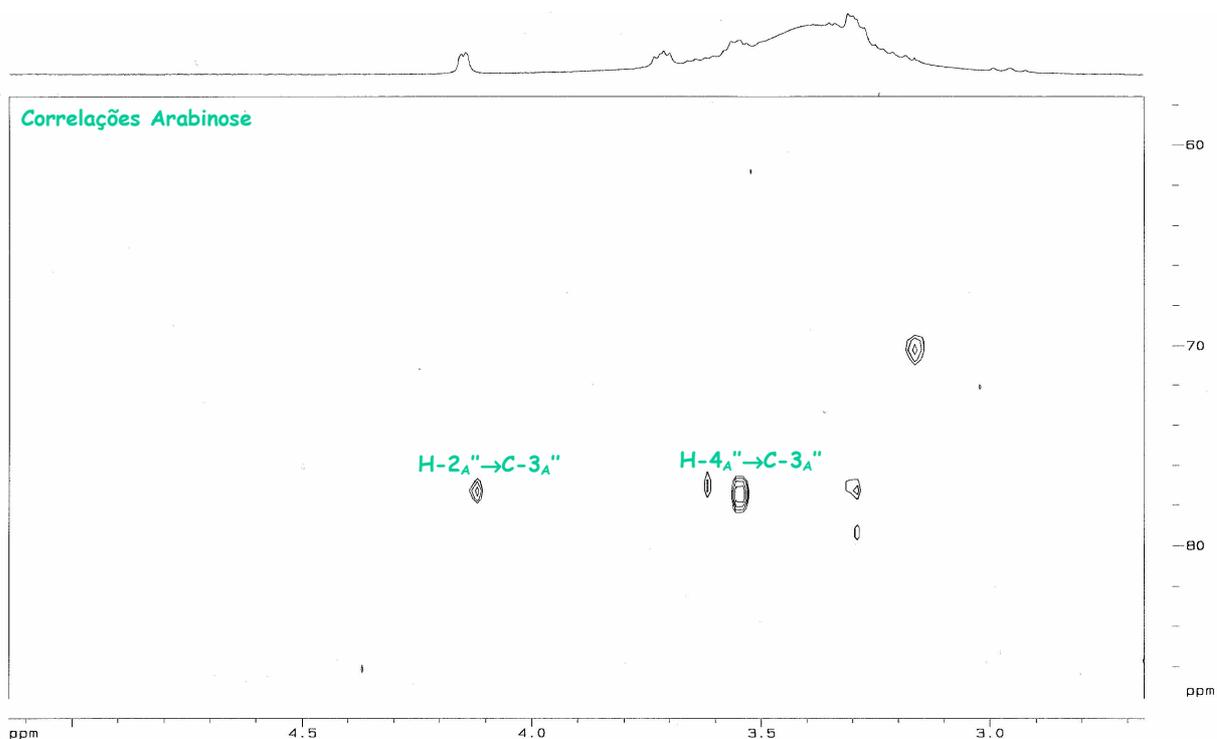
**Espectro 43:** Espectro de RMN 2D - HMBC de **Mx<sub>F</sub>3** (300 MHz; 75 MHz). Parâmetros: NS 96, SWH 4807 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.

Para o anel A da aglicona (**Espectro 44**) observam-se correlações  $^3J_{H,C}$  de H-8 (6,38 ppm) com C-6 (99,3 ppm) e C-10 (104,2 ppm), assim como correlações entre H-6 (6,18 ppm) e os carbonos 8 (94,1 ppm) e 10 (104,2 ppm). Foram detectadas também correlações  $^2J_{H,C}$  entre H-8 e C-9 (156,8 ppm) e H-6 e C-5 (161,6 ppm).

O padrão 3',4'-disubstituído do anel B pode ser corroborado ao observarmos, no espectro de HMBC, apenas correlações à longa distância para os hidrogênios 2', 5' e 6'. Para H-6' (7,56 ppm) observam-se correlações com C-5' (115,9 ppm) e C-4' (149,0 ppm), enquanto H-5' (6,84 ppm) correlaciona-se com C-3' (145,6 ppm) e C-6' (121,4 ppm). São observadas ainda correlações de H-2' (7,47 ppm) com os carbonos 1' (122,2 ppm) e 4' (149,0 ppm), além de sua correlação com o C-2 (157,3 ppm) do anel C.



**Espectro 44:** Espectro de RMN 2D - HMBC de MxF3 (300 MHz; 75 MHz). Expansão da região entre 8,0 e 5,0 ppm. Parâmetros: NS 96, SWH 4807 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.

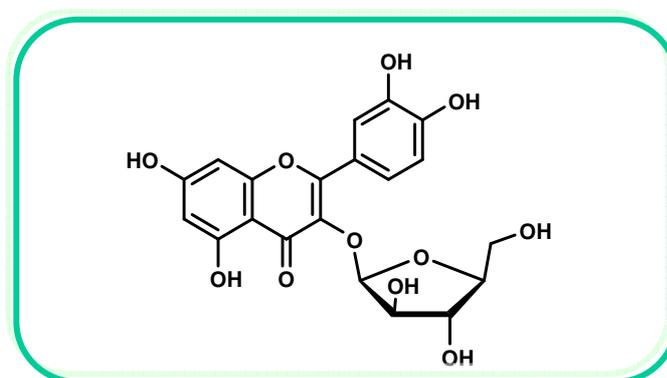


**Espectro 45:** Espectro de RMN 2D - HMBC de **MxF3** (300 MHz; 75 MHz). Expansão da região entre 5,0 e 2,5 ppm. Parâmetros: NS 96, SWH 4807 Hz, TD 2048, REF TMS, TEMP 27°C.

Para a molécula de arabinose (**MxF3A**) (**Espectro 44 e 45**), são observadas correlações  $^2J_{H,C}$  de H-2" e H-4" com C-3". A correlação  $^3J_{H,C}$  entre H-1" e C-4" corrobora com a proposta da forma furanosídica para a molécula de arabinose. Apesar dos dados do espectro de HMBC não permitirem a confirmação da posição de glicosilação, os dados obtidos no espectro de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$ , em comparação com dados da literatura, são suficientes para confirmar, sem ambigüidade, a *O*-glicosilação na posição 3 do anel C.

### Proposta Estrutural

Após comparação com os dados da literatura (MARKHAM & CHARI, 1982) confirma-se para **MxF3A** a estrutura do flavonol quercetina-3-*O*- $\beta$ -arabinofuranosídeo (**Figura 26**), também conhecida como avicularina. Os dados de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  para a molécula estão listados na **Tabela 7** e corroboram a estrutura proposta.



**Figura 26:** Estrutura de **MxF3A**.

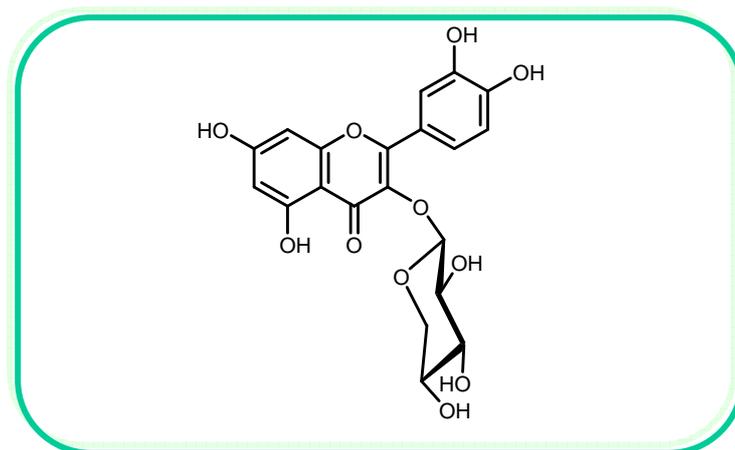
Esta substância foi descrita pela primeira vez em 1940, a partir de *Polygonum aviculare* (KHADEM & MOHAMMED, 1958). Em 2002 foi relatada a presença deste flavonol em *Mimosa pudica* (Mimosaceae) (LOBSTEIN *et al.*, 2002).

Este flavonóide é bastante comum, sendo a ele atribuídas atividades biológicas como antioxidante, hepatoprotetora (AN *et al.*, 2005) e inibidor das enzimas aldose redutase (SHIMIZU *et al.*, 1984) e ácido graxo sintase (WANG *et al.*, 2006).

**Tabela 7:** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) e <sup>13</sup>C (75 MHz) de **Mx<sub>F</sub>3A** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm); m; <i>J</i> (Hz)	Correlações HMBC
<b>Aglicona: quercetina</b>			
2	157,3		
3	133,8		
4	178,1		
5	161,6	OH; 12,63; s	
6	99,3	6,18; s	H-6→C-5, 8, 10
7	165,2		
8	94,1	6,38; s	H-8→C-6, 9, 10
9	156,8		
10	104,2		
1'	122,2		
2'	116,0	7,47; d; 2,0	H-2'→C-2, 1', 4'
3'	145,6		
4'	149,0		
5'	115,9	6,84; d; 8,38	H-5'→C-3', 6'
6'	121,4	7,56; dd; 2,0 e 8,38	H-6'→C-4', 5'
<b>Açúcar: 3-<i>O</i>-arabinofuranose</b>			
1''	108,3	5,57; s	H-1''→C-4''
2''	82,6	4,15; d	H-2''→C-3''
3''	77,4	3,70	
4''	86,3	3,55	H-4''→C-3''
5''	61,1	3,38	

Em relação à **MxF3B**, os dados obtidos através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em comparação com os dados da literatura permitem propor para esse flavonóide minoritário a estrutura da quercetina-3-O- $\beta$ -xilopiranosídeo (**Figura 27**), também conhecido como reinoutrina (DICK *et al.*, 1987; LU & FOO, 1997). Os dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para a molécula estão listados na **Tabela 8** e corroboram a estrutura proposta.



**Figura 27:** Estrutura de **MxF3B**.

Esta substância foi descrita pela primeira vez em 1956, sendo encontrada em frutas como maçãs, pêras e uvas (DICK *et al.*, 1987; NACZK & SHAHIDI, 2006). São poucos os estudos relacionados a esse flavonóide, sendo a ele atribuída apenas a atividade antioxidante (YAN *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2004). Este constitui o primeiro relato de quercetina-3-O-xilopiranosídeo na família Mimosaceae.

**Tabela 8:** Dados de RMN de <sup>1</sup>H (300 MHz) e <sup>13</sup>C (75 MHz) de **Mx<sub>F</sub>3B** (DMSO-*d*<sub>6</sub>)

	$\delta_c$ (ppm)	$\delta_H$ (ppm); m; $J$ (Hz)	Correlações HMBC
<b>Aglicona: quercetina</b>			
2	157,3		
3	133,8		
4	178,1		
5	161,6	OH; 12,63; s	
6	99,3	6,18; s	H-6→C-5, 8, 10
7	165,2		
8	94,1	6,38; s	H-8→C-6, 9, 10
9	156,8		
10	104,2		
1'	122,2		
2'	116,0	7,47; d; 2,0	H-2'→C-2, 1', 4'
3'	145,6		
4'	149,0		
5'	115,9	6,84; d; 8,38	H-5'→C-3', 6'
6'	121,4	7,56; dd; 2,0 e 8,38	H-6'→C-4', 5'
<b>Açúcar: 3-<i>O</i>-xilopiranosose</b>			
1''	101,98	5,33; d; 7,21	
2''	73,82	3,30	
3''	76,26	3,20	
4''	69,61	3,40	
5''	66,25	3,7 e 3,0	

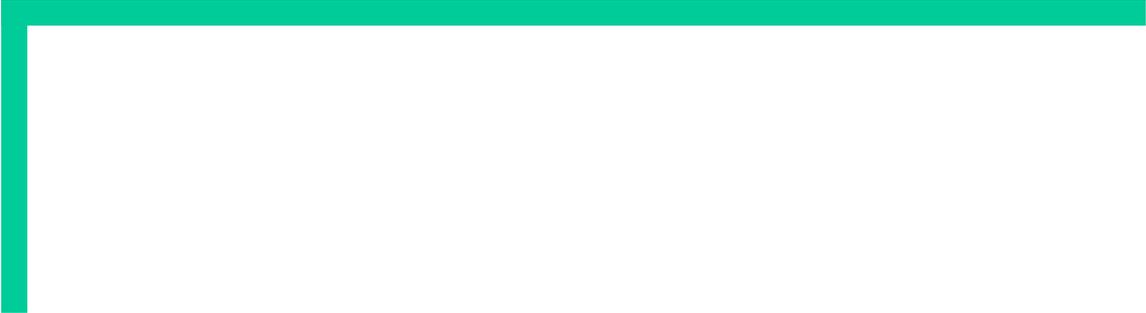
- AN, R. B.; KIM, H. C.; TIAN, Y. H. KIM, Y. C. Free radical scavenging and hepatoprotective constituents from the leaves of *Juglans sinensis*. *Archives of Pharmacal Research*, v. 28, n. 5, p. 529-533, 2005.
- BREITMAIER, E. Recognition of Structural Fragments by NMR. In: BREITMAIER, E. Structure elucidation by NMR in organic chemistry. A practical guide. Edited by John Wiley & Sons, p. 11-67, 2002
- CHENG, G.; BAI, Y.; ZHAO, Y.; TAO, J.; LIU, Y.; TU, G.; MA, L.; LIAO, N.; XU, X. Flavonoids from *Ziziphus jujuba* Mill var. *spinosa*. *Tetrahedron*, v. 56, p. 8915-8920, 2000.
- DAVOUST, D.; MASSIAS, M.; MOLHO, D. <sup>13</sup>C NMR investigation of flavonoids C-β-D-glucosides. Detection of a conformational equilibrium. *Organic Magnetic Resonance*, v. 13, n. 3, p. 218-219, 1980.
- DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products - a Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, LTD, second edition, 2002.
- DICK, A. J.; REDDEN, P. R.; DeMARCO, A. C.; LIDSTER, P. D.; GRINDLEY, T. B. Flavonoid glycoside of Spartan apple peel. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 35, p. 529-531, 1987.
- DINDA, B.; GHOSH, B.; ARIMA, S.; SATO, N.; HARIGAYA, Y. Steroids and terpenoids from *Mimosa pudica* roots. *Journal of Indian Chemical Society*, v. 38, n. 10, p. 1044-1046, 2006.
- DOMINGUEZ, X. A.; G., S. G.; WILLIAMS, H. J.; ORTIZ, C.; SCOTT, A. I.; REIBENSPIES, J. H. Kukulkanins A and B, new chalcones from *Mimosa tenuifolia*. *Journal of Natural Products*, v. 32, n. 4, p. 864-867, 1989.
- Dos SANTOS, A. R.; PINHEIRO, A. C.; SODERO, A. C. R.; CUNHA, A. S.; PADILHA, M. C.; De SOUSA, P. M.; FONTES, S. P. Atropoisomerismo: o efeito da quiralidade axial em substâncias bioativas. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p. 125-125, 2007.

- Dos SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; De MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade - UFRGS, p. 403-434, 2003.
- FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; Farmacognosia: da planta ao medicamento. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade - UFRGS, p. 229-246, 2003.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Flavone and flavonol glycosides, In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. The flavonoids: Advances in Research, p. 19-134, Chapman and Hall, 1982.
- HOFFMANN BOHM, K.; LOTTER, H.; SELIGMANN, O.; WAGNER, H. Antihepatotoxic C-glycosylflavones from the leaves of *Allophylus edulis* var. *edulis* and *gracilis*. *Planta Medica*, v. 58, n. 06, p. 544-548, 1992.
- IWASHINA, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research*, v. 113, p. 287-299, 2000.
- IWASHINA, T. Flavonoid function and activity to plants and other organisms. *Biological Sciences in Space*, v. 17, n. 01, p. 24-44, 2003.
- JAY, M. Naturally occurring C-glycosylflavonoids, In: HARBORNE, J.B. *The flavonoids. Advances in research since 1986*, p.441-497, Florida: Chapman & Hall, 1994.
- KAISER, C. R. RMN 2D: detecção inverse e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. *Química Nova*, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.
- KHADEM, H. E.; MOHAMMED, Y. S. Constituents of the leaves of *Psidium guajava*, L. Part II. Quercetin, avicularin and guaijaverin. *Journal of Chemical Society*, p. 3320-3323, 1958.

- KIM, M. Y.; KIM, Y. C.; CHUNG, S.K. Identification and in vitro biological activities of flavonoids in garlic and shoot: inhibition of soybean lipoxygenase and hyaluronidase activities and scavenging of free radicals. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, n. 4, p. 633-640, 2004.
- KIRK, L. F.; MØLLER, M. V.; CHRISTENSEN, J.; STÆRK, D.; EKPE, P.; JAROSZEWSKI, J. W. A 5-deoxyflavonol derivative in *Mimosa pudica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 103-105, 2003.
- LEWIS, K. C.; MAXWELL, A. R.; McLEAN, S.; REYNOLDS, W. F.; ENRIQUEZ, R. G. Room-temperature ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) and variable-temperature ( $^1\text{H}$ ) NMR studies on spinosin. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 38, p. 771-774, 2000.
- LOBSTEIN, A.; WENIGER, B.; UM, B. H.; STEINMETZ, M.; DECLERCQ, L.; ANTON, R. 4"-Hydroximaysin and cassiaoccidentalinal B, two unusual C-glycosylflavones from *Mimosa pudica*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 30, p. 375-377, 2002.
- LU, Y.; FOO, L. Y. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. *Food Chemistry*, v. 59, n. 2, p. 187-194, 1997.
- MARKHAM, K.R.; GEIGER, H.  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoids and their glycosides in hexadeuterodimethylsulfoxide. In: HARBORNE, J.B. *The flavonoids. Advances in research since 1986*, p.441-497, Florida: Chapman & Hall, 1994.
- MARKHAM, K. R.; CHARI, V. M. Carbon-13 NMR spectroscopy of flavonoids, In: HARBORNE, J. B.; MABRY, T. J. *The flavonoids: Advances in Research*, p. 19-134, Chapman and Hall, 1982.
- MARINOVA, K.; KLEINSCHMIDT, K.; WEISSENBOCK, G.; KLEIN, M. Flavonoid biosynthesis in Barley primary leaves requires the presence of the vacuole and controls the activity of vacuolar flavonoid transport. *Plant Physiology*, v. 144, p. 432-444, 2007.

- MUZITANO, M. F. Flavonóides de *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae): Avanços na pesquisa da utilização desta espécie medicinal no tratamento da leishmaniose cutânea. Tese de Doutorado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais-NPPN, UFRJ, 2006.
- NACZK, M.; SHAHIDIT, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 41, p. 1523-1542, 2006.
- NADJA, B-W.; KIIHN, T.; MOSKAU, D.; ZERBE, O. Strategies and tools for structure determination of natural products using modern methods of NMR spectroscopy. *Chemistry & Biodiversity*, v. 2, p. 147-177, 2005.
- NIJVELDT, R. J.; Van NOOD, E.; Van HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; Van NORREN, K.; Van LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential application. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, p. 418-428, 2001.
- NINFALI, P.; BACCHIOCCAM, M.; ANTONELLI, A.; BIAGIOTTI, E.; Di GIACCHINO, A. M.; PICCOLI, G.; STOCCHI, V.; BRANDI, G. Characterization and biological activity of the main flavonoids from Swiss Chard (*Beta vulgaris* subspecies *cycla*). *Phytomedicine*, n. 14, p. 216-221, 2007.
- NØRBÆK, R.; BRANDT, K.; KONDO, T. Identification of flavone C-glycosides including a new flavonoid chromophore from Barley Leaves (*Hordeum vulgare* L.) by improved NMR techniques. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 48, p. 1703-1707, 2000.
- OHSAKI, A.; YOKOYAMA, R.; MIYATAKE, H.; FUKUYAMA, Y. Two diterpene rhamnosides, mimosaside B and C, from *Mimosa hostilis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 54, n. 12, p. 1728-1729, 2006.
- RAYYAN, S.; FOSSEN, t.; NATELAND, H. S.; ANDERSEN, Ø. M. Isolation and identification of flavonoids, including flavone rotamers, from the herbal drug 'Crataegi Folium Cum Flore' (Howthorn). *Phytochemical Analysis*, v. 16, p. 334-341, 2005.
- SABUDAK, T.; DEMIRKIRAN, O.; OYMAN, Ü. Flavonoids from *Ornithogalum umbellatum* L. *Trakya University Journal of Science*, v. 6, n. 2, p. 88-92, 2005.

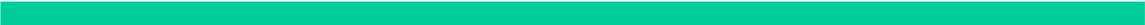
- SHIMIZU, M.; ITO, T.; TERASHIMA, S.; TOSHIMITSU, H.; ARISAWA, M.; MORITA, N.; KUROKAWA, S.; ITO, K.; HASHIMOTO, Y. Inhibition of lens aldose reductase by flavonoids. *Phytochemistry*, v. 23, n. 9, p. 1885-1888, 1984.
- TAHARA, S. A journey of twenty-five years through the ecological biochemistry of flavonoids. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v. 71, n. 6, p. 1387-1404, 2007.
- WANG, Y.; ZHANG, S. Y.; MA, X. F. ; TIAN, W. X. Potent inhibition of fatty acid synthase by parasitic loranthus [*Taxillus chinensis* (DC.) Danser] and its constituent avicularin. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 21, n. 1, p. 87-93, 2006
- XIE, C.; VEITCH, N. C.; HOUGHTON, P. J.; SIMMONDS, M. S. J. Flavone C-glycosides from *Viola yedoensis* MAKINO. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 51, n. 10, p. 1204-1207, 2003.
- YAN, X.; MURPH, B. T.; HAMMOND, G. B.; VINSON, J. A.; NETO, C. C. Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 5844-5849, 2002.
- YUSUF, U. K.; ABDULLAH, N.; BAKAR, B.; ITAM, K.; ABDULLAH, F.; SUKARI, M. A. Flavonoid glycosides in the leaves of *Mimosa* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, p. 443-445, 2003.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoids. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; De MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade - UFRGS, p. 577-614, 2003.



## *Capítulo II*

---

### *Atividade Antiviral de Mimosa xanthocentra*



As lesões herpéticas têm sido documentadas desde os tempos antigos, na Grécia, por Hipócrates (460/377 a.C.), e em Roma, por Heródoto (484/425 a.C.), historiador que descreveu a doença como causadora de pequenas vesículas na boca, ulcerações nos lábios e febre (MIRANDA, 2002).

A família Herpesviridae, a que pertencem os vírus herpes, pode ser dividida em três subfamílias principais, *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae*, as quais diferem entre si pelo tipo de célula em que a latência se estabelece e pela extensão de seu ciclo replicativo produtivo (EFSTATHIOU *et al.*, 2005).

Os vírus pertencentes à subfamília alfa compartilham a mesma estrutura viral, organização e estratégias de expressão do genoma, e um ciclo baseado em uma infecção latente e duradoura no sistema nervoso periférico (TOMISHIMA *et al.*, 2001). Possuem o maior número de hospedeiros e tendem a se replicar rapidamente, produzindo partículas virais e efeito citopático em questão de horas. Entre outros, compreendem os vírus Herpes simplex dos tipos 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2), Herpes Bovino tipo 1 (BHV-1) e Herpes Suíno tipo 1 (SHV-1), sendo os dois primeiros pertencentes ao gênero *Simplexvirus*, e os últimos ao gênero *Varicellovirus* (POMERANZ *et al.*, 2005).

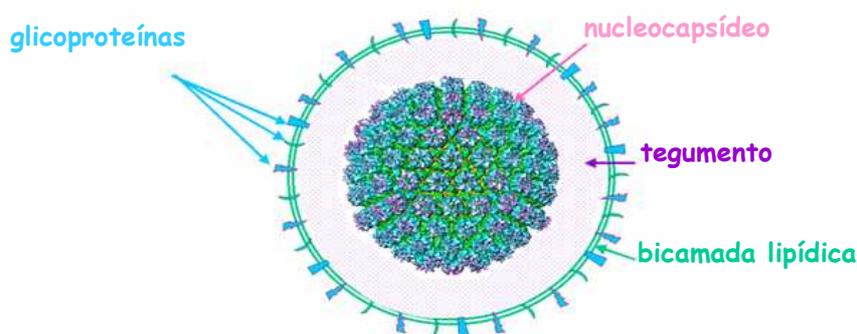
Os HSV-1 e HSV-2 compreendem os patógenos mais amplamente distribuídos entre os herpesvírus humanos, sendo que o HSV-1 é adquirido cedo na vida e resulta, na maioria das vezes, em infecções orais, enquanto o HSV-2 é adquirido sexualmente e resulta em infecções genitais (EFSTATHIOU *et al.*, 2005). O BHV-1 e o SHV-1 são membros economicamente importantes da família dos herpesvírus (BUSH & PRITCHETT, 1985), estando associados às infecções respiratórias (BHV-1 e SHV-1), genitais (BHV-1) e do sistema nervoso central (SHV-1) em suínos e ruminantes (GERDTS *et al.*, 2000).

A infecção pelos vírus herpes possui uma ampla distribuição mundial. Estima-se que aproximadamente 80% da população mundial apresentem anticorpos séricos anti-HSV (tipo 1 ou 2), sendo que este número aumenta para 95% em pacientes HIV-positivos (BROWN *et al.*, 2002). O BHV-1 e o SHV-1 estão presentes de forma enzoótica no Brasil há vários anos, com evidências sorológicas da infecção em, virtualmente, todos os locais onde foram pesquisados (ROEHE *et al.*, 1997).

## ESTRUTURA VIRAL

Os herpesvírus são vírus de DNA com simetria cúbica (icosaédrica), dotado de envelope e com diâmetro entre 150 a 200 nm (NETO *et al.*, 1991).

A partícula infecciosa consiste em quatro componentes (**Figura 28**): **(1)** um core contendo o DNA linear de fita dupla, protegido por um cerne em forma de tora; **(2)** um capsídeo icosaédrico (GARNER, 2003); **(3)** um tegumento, onde se encontram inseridas duas proteínas importantes:  $\alpha$ -TIF ( $\alpha$ -Trans Inducing Factor), responsável por acionar a cascata de replicação viral, e a VHS (Virion Host Shut-Off), responsável pelo bloqueio da síntese de macromoléculas da célula hospedeira (MIRANDA, 2002) e; **(4)** um envelope contendo glicoproteínas susceptíveis ao sistema imune hospedeiro (GARNER, 2003).



**Figura 28:** Modelo esquemático da partícula de HSV (adaptado de pathmicro.med.sc.edu).

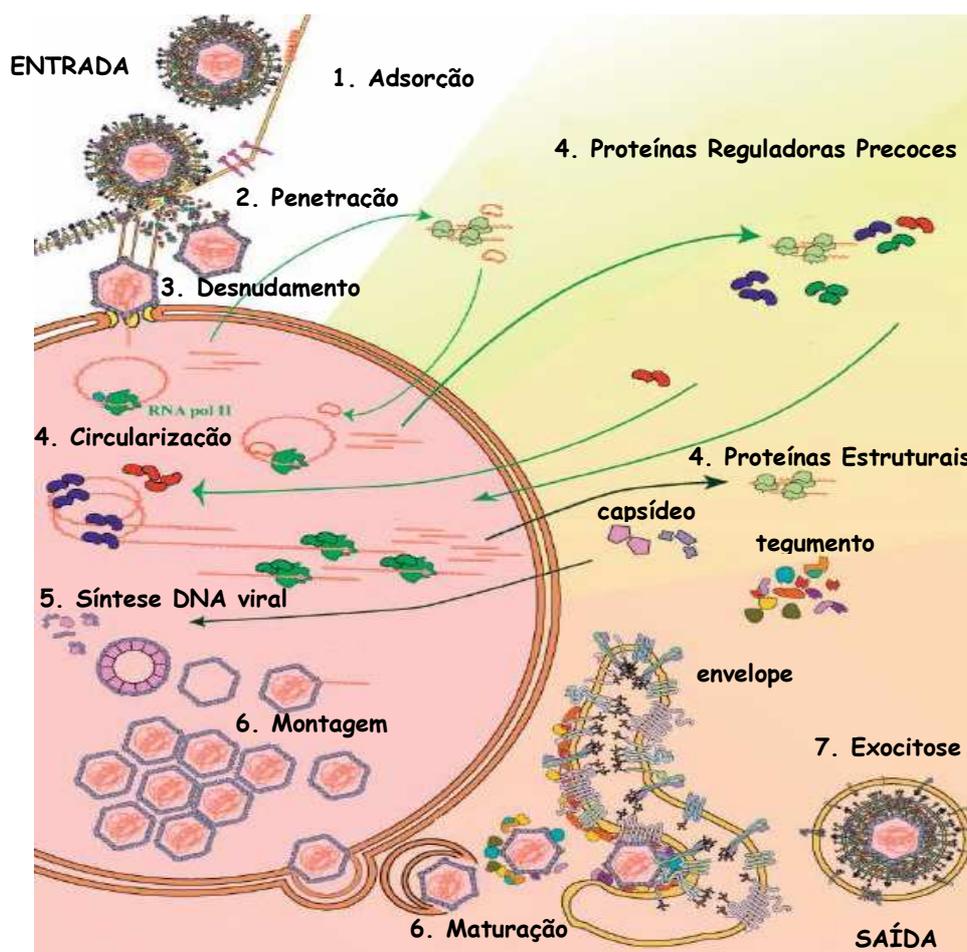
## PROPRIEDADES BIOLÓGICAS

Segundo WHITLEY *et al.* (2001), as propriedades biológicas dos herpesvírus que controlam o curso de suas infecções são: **(1)** neuroinvasividade (capacidade de invadir o cérebro); **(2)** neurotoxicidade (capacidade de multiplicar e destruir o cérebro) e; **(3)** latência (capacidade de permanecer na forma não-replicativa nos neurônios dos gânglios da raiz dorsal e do sistema nervoso autônomo).

Em humanos, associada a essas propriedades encontra-se o fato do HSV aumentar o risco de infecção por HIV, estimulando a replicação desse vírus após infecção (SACKS *et al.*, 2004), com conseqüente aumento da liberação de partículas virais no plasma, favorecendo a progressão para AIDS (MIRANDA, 2002).

## REPLICAÇÃO VIRAL

Em termos gerais, a replicação dos vírus herpes pode ser resumida nas seguintes etapas (**Figura 29**): **(1)** adsorção às células hospedeiras suscetíveis e penetração nessas células através da fusão direta do envelope viral com a membrana citoplasmática; **(2)** liberação do nucleocapsídeo e proteínas virais no citoplasma da célula e migração para o núcleo; **(3)** desnudamento do ácido nucléico viral; **(4)** circularização do DNA viral, com conseqüente síntese de proteínas reguladoras precoces, proteínas funcionais (por exemplo, polimerases de ácidos nucléicos) e proteínas estruturais; **(5)** replicação do genoma viral pela DNA polimerase viral; **(6)** montagem do capsídeo viral e maturação das partículas virais, com aquisição das proteínas do tegumento e do envelope com as glicoproteínas; e **(7)** liberação da célula por exocitose (MIRANDA, 2002; POMERANZ *et al.*, 2005).



**Figura 29:** Esquema das etapas de replicação Viral (adaptado de POMERANZ *et al.*, 2005)

## **PATOGÊNESE**

### **Entrada e Disseminação**

A principal porta de entrada para HSV-1 e HSV-2 é a presença de abrasões nas camadas de células epiteliais das mucosas oral ou genital. As células epiteliais infectadas servem como fonte original de partículas virais e correspondem ao sítio primário de replicação e amplificação do inóculo viral (GARNER, 2003). A transmissão do HSV-1 dá-se por contato direto com as lesões ou através de secreções orofaríngeas - havendo geralmente necessidade de contato íntimo, enquanto a do HSV-2 pode ocorrer durante relações sexuais ou verticalmente, da mãe para o recém-nascido (no momento do parto) ou para o feto (transplacentariamente) (NETO *et al.*, 1991).

A infecção natural por SHV-1 e BHV-1 normalmente ocorre pela via oronasofaríngea, sendo este último também adquirido via trato genital (NAUWYNCK *et al.*, 2007; MUYLKENS *et al.*, 2007). As mucosas do trato respiratório superior e genital correspondem ao sítio primário de infecção e replicação, entretanto, o SHV-1, após replicação primária nas células do trato respiratório superior, dissemina-se através dos nervos cranianos até o sistema nervoso central e através do sistema linfático e sanguíneo até outros órgãos internos, sendo os órgãos reprodutivos os principais alvos. A replicação viral nesses sítios é responsável por causar desordens respiratórias, nervosas e reprodutivas em suínos (NAUWYNCK *et al.*, 2007).

Para esses vírus de importância veterinária, em caso de infecção no trato respiratório, o contato direto focinho-focinho é a forma preferencial de transmissão, entretanto a transmissão por aerossol também pode ocorrer. A infecção genital requer contato direto no acasalamento, podendo também ser transmitida através de sêmen contaminado (MUYLKENS *et al.*, 2007).

Uma vez no interior da célula alvo, os vírus dão início ao ciclo de replicação lítica, que corresponde a uma expressão seqüencial dos genes virais que podem levar tanto à produção de nova progênie viral ou à morte celular (GARNER, 2003). A morte celular pode ser resultante de processos de necrose ou apoptose durante a replicação viral (MUYLKENS *et*

*al.*, 2007). As novas partículas virais liberadas penetram pelas terminações nervosas que inervam os epitélios infectados e são transportados pelos axônios, em um sentido retrógrado ao estímulo nervoso, para os corpos celulares dos neurônios dos gânglios sensoriais, onde o vírus é replicado, causando infecção no SNC, ou assumir o estado de latência (GARNER, 2003; TOMISHIMA *et al.*, 2001).

### **Latência e Reativação**

O sucesso dos vírus herpes enquanto patógenos e a chave para sua manutenção estão na sua capacidade de estabelecer latência duradoura dentro do hospedeiro infectado (EFSTATHIOU *et al.*, 2005). A reativação do vírus latente pode ocorrer após exposição a estímulos predisponentes estressantes que diminuem sua resistência imunológica (BARBOSA *et al.*, 2005). Uma vez reativados, os vírus iniciam novo ciclo replicativo culminando com a transmissão para indivíduos não infectados sem, necessariamente apresentar sintomas clínicos (MUYLKENS *et al.*, 2007).

São fatores responsáveis pela reativação do HSV latente: **(1)** estímulos físicos como dano tecidual periférico e irradiação pela luz UV; **(2)** estimulação sistêmica; **(3)** estresse emocional ou físico; **(4)** desequilíbrio hormonal; **(5)** menstruação; **(6)** hipertermia transitória e; **(7)** fármacos que estimulam a síntese de prostaglandinas (GONÇALVES, 1999).

No caso dos animais, constituem fatores estressantes: **(1)** aparecimento de doenças concomitantes; **(2)** transporte veicular; **(3)** aclimação a um novo ambiente; **(4)** nascimento de crias e **(5)** tratamento com imunossuppressores, por exemplo, corticosteróides (POMERANZ *et al.*, 2005).

### **MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS**

A infecção por HSV pode se apresentar de formas diferentes, possuindo graus de gravidade que variam desde infecções subclínicas até aquelas que induzem à incapacidade permanente ou morte (JONES & ISAAC, 2004). A **Tabela 9** resume as manifestações

clínicas mais comuns que ocorrem nas infecções causadas por HSV-1 e HSV-2.

**Tabela 9:** Principais características fisiopatológicas e clínicas das infecções por HSV (NETO *et al.*, 1991; MIRANDA, 2002)

<b>Infecções</b>	<b>Formas Clínicas</b>	<b>Manifestações Clínicas e Sintomas</b>
Orofaringe	Gengivoestomatite (P)**  Herpes labial (R)**	Assintomática ou febre, úlceras na garganta, lesões vesiculares e ulcerativas, edema, linfadenopatia localizada, anorexia e/ou dor.
Genital	Herpes genital (P, R)**	Máculas, pápulas, vesículas, pústulas e crosta. Febre, disúria, linfadenopatia inguinal e mal-estar.
Ocular	Ceratoconjuntivite (P,R)**	Adenopatia pré-auricular, fotofobia, lacrimejamento, edema e lesões dendríticas da córnea.
Cutâneas	Eczema herpético (P,R)**	Dor, queimação, coceira, formigamento, erupção de vesículas, pústula e crosta.
*SNC	Encefalite (P,R)**	Encefalite focal, febre, alterações de consciência, comportamento bizarro, desordem mental e alterações neurológicas.
Neonatal	Herpes neonatal (P)**	Irritabilidade, perturbação mental, tremores, anorexia, instabilidade de temperatura, elevação das fontanelas, distúrbios piramidais, falência respiratória, hepatite, sangramento, choque, vesículas, ceratoconjuntivite, coriorrinite, microoftalmia e displasia da retina.
Disseminada	Herpes Disseminada (P,R)**	Invasão progressiva do trato respiratório superior, esôfago e trato gastrintestinal, lesões extensas nos órgãos genitais internos, períneo e reto.

\*Sistema Nervoso Central      \*\*Infecção Primária (P) ou Recorrente (R)

O SHV-1, também conhecido como vírus da Pseudorraiva, é o agente etiológico da Doença de Aujeszky, uma séria enfermidade que acomete animais domésticos e silvestres, podendo causar grandes perdas em criações de suínos, devido à alta mortalidade de leitões de até três semanas de idade, à perda de peso em animais adultos, e ainda à alta taxa de abortamentos e a mortalidade perinatal (CUNHA *et al.*, 2003; GERDTS *et al.*, 2000). Nos suínos adultos predominam os sintomas respiratórios e conseqüente perda de peso, com casos mais raros de anormalidades do SNC, que variam desde tremores musculares leves até violentas convulsões (POMERANZ *et al.*, 2005).

A gravidade da doença causada pelo BHV-1 é influenciada por fatores como: grau de virulência da cepa viral, resistência e imunidade do hospedeiro, idade e potencial infecção bacteriana concomitante (MUYLKENS *et al.*, 2007). Constituem manifestações clínicas da infecção por BHV-1: conjuntivite, pneumonia, desordens genitais, abortos e infecções no trato respiratório superior. Este vírus é capaz de induzir à imunossupressão, predispondo às infecções bacterianas secundárias (*Pasteurella haemolytica*, *Pasteurella multocida* e *Haemophilus somnus*) e conseqüente pneumonia (JONES, 2003).

## IMPORTÂNCIA E INCIDÊNCIA

O BHV-1 tem distribuição mundial, apresentando-se mais comumente em rebanhos confinados e em grandes fazendas de criação (BARBOSA *et al.*, 2005). Pesquisas sorológicas no rebanho bovino da Austrália e Nova Guiné mostraram que 74% dos rebanhos e 30% dos bovinos transportam títulos significativos de anticorpos contra esse vírus. Normalmente a infecção não costuma ser fatal, e as mortes, em grande parte, devem-se aos abortos e à redução da condição corporal e produção de leite. Nos rebanhos leiteiros, os prejuízos podem situar-se entre 25 e 50 dólares por cabeça (CAVALCANTE, 2000).

A infecção pelo vírus causador da Doença de Aujeszky ocorre em quase todos os países do mundo com expressão na suinocultura (POMERANZ *et al.*, 2005), caracterizando-se por sintomas nervosos e respiratórios, por um alto índice de mortalidade entre leitões não imunes e por graves transtornos reprodutivos em porcas prenhes. As perdas

econômicas derivadas da infecção por este vírus decorrem do elevado índice de mortalidade e morbidade entre leitões, queda de produtividade das matrizes e redução no desenvolvimento dos animais em crescimento e terminação (JUNQUEIRA, 2003).

Atualmente, a infecção por HSV constitui um grande problema de saúde pública, confirmado pela epidemia de herpes genital e pelo aumento da aquisição do HIV em associação com o HSV (LIESEGANG, 2001). O HSV-1 infecta 60-80% da população mundial, enquanto a prevalência do HSV-2 em adultos pode variar de 7 a 80% dependendo do país e das práticas sexuais e contraceptivas (CUNNINGHAM *et al.*, 2006), sendo que a soroprevalência mundial é de 22% (COREY & HANDSFIELD, 2000).

O HSV-2 é a causa de uma das doenças sexualmente transmissíveis (DST) mais comuns de todo o mundo, o herpes genital (é uma das três DSTs mais prevalentes nos Estados Unidos), que ocasionalmente pode levar ao herpes neonatal, resultando em severa morbidade e morte (CUNNINGHAM *et al.*, 2006; COREY & HANDSFIELD, 2000). O HSV-1 é responsável pelo herpes ocular, a maior causa de cegueira no mundo ocidental, e pela encefalite esporádica, resultando em severa morbidade e mortalidade. O HSV-1 tem sido encontrado, em um número crescente de casos, como agente etiológico do herpes genital, particularmente em adolescentes (CUNNINGHAM *et al.*, 2006).

Estudos indicam que a infecção prevalente pelo HSV-2 constitui um fator de risco significativo para aquisição do HIV, tanto em homens quanto em mulheres, aumentando em três vezes a chance de adquirir o HIV (FREEMAN *et al.*, 2006). Da mesma forma, indivíduos imunocomprometidos, como os portadores do HIV, constituem um grupo de risco nas infecções por HSV. Nesses pacientes, a infecção lítica ou persistente pelo HSV estimula a replicação do HIV, com conseqüente aumento da liberação de partículas virais no plasma, favorecendo a progressão para AIDS (SACKS *et al.*, 2004). Além disso, a imunossupressão promovida pelo HIV estimula a replicação do HSV nas células epiteliais, promovendo lesões herpéticas mais invasivas e dolorosas, contribuindo ainda para a disseminação das partículas virais em outros órgãos (MIRANDA, 2002).

## **VÍRUS HERPES EM CERVÍDEOS**

A primeira evidência de infecção herpética em cervídeos, observada na década de oitenta, foi puramente sorológica, identificada através da neutralização cruzada com BHV-1. Atualmente, não se sabe ao certo se os cervídeos estejam infectados com BHV-1 ou outro vírus a ele relacionado, entretanto já foram relatados o isolamento de alfa-herpesvírus (todos relacionados ao BHV-1) exclusivos de cervídeos, como o herpesvírus cervídeo tipo 1 (CerHV-1), herpesvírus rangiferina (RanHV) e elk herpesvírus (ElkHV) (DEREGT *et al.*; 2005; THIRY *et al.*, 2006).

O CerHV-1 foi isolado de secreções ocular e nasal de um cervo vermelho escocês (*Cervus elaphus elaphus*) com lesões oculares. Este vírus é responsável por causar conjuntivite e lesões nasais em filhotes de cervos vermelhos estressados. RanHV, um isolado genital, também conhecido como herpesvírus cervídeo tipo 2, foi isolado de secreção vaginal do cervídeo *Rangifer tarandus* após injeção de corticosteróides, utilizadas para reativação do vírus latente. ElkHV, outro isolado genital, foi obtido a partir do sêmen de um alce macho do Canadá. Este último, assim como o RanHV, é responsável por causar infecções genitais subclínicas em suas espécies hospedeiras (DEREGT *et al.*; 2005; THIRY *et al.*, 2006).

## **TRATAMENTO DAS INFECÇÕES HERPÉTICAS**

Como os vírus compartilham muitos dos processos metabólicos da célula hospedeira, é difícil encontrar fármacos que sejam seletivos para o patógeno. Todavia, existem algumas enzimas que são específicas do vírus e que podem constituir alvos potenciais para os fármacos (RANG *et al.*, 2004).

### **BHV-1 e SHV-1**

Em relação a esses vírus, não existe tratamento específico. Após um surto, pouco pode ser feito para alterar o curso da doença no rebanho. Quando não for decidido pela eliminação total do plantel, recomenda-se administrar antibióticos para evitar infecções

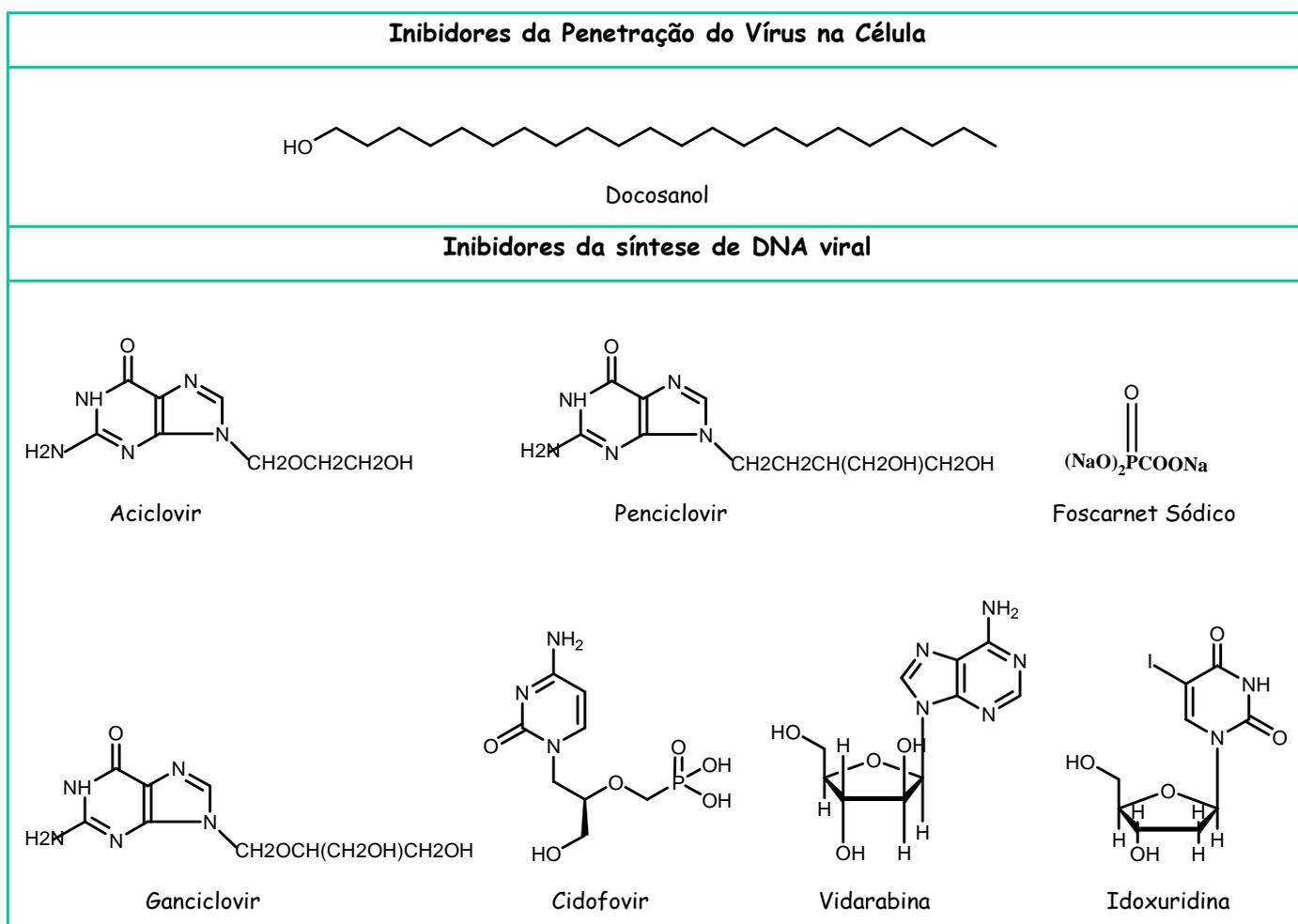
secundárias. Entretanto podem-se tomar medidas profiláticas: **(1)** vacinação; **(2)** eliminação do animal infectado; **(3)** sacrifício de todos os animais da granja e desinfecção rigorosa. Constituem desvantagens da vacinação: **(1)** necessidade de conviver com o vírus; **(2)** impossibilidade de introduzir animais sadios sem vacinação; **(3)** necessidade de vacinação nas granjas vizinhas e **(4)** adoecimento de bezerros e aborto em fêmeas gestantes, no caso do BHV-1 (CAVALCANTE, 2000; JONES, 2003; JUNQUEIRA, 2003).

### **HSV-1 e HSV-2**

Para o tratamento de infecções causadas pelos vírus Herpes simplex dos tipos 1 e 2, encontram-se disponíveis alguns fármacos antivirais, cujos mecanismos de ação estão associados à inibição da DNA polimerase viral ou da adsorção do vírus à célula hospedeira (RANG *et al.*, 2004).

Dentre os fármacos anti-herpesvírus, o mais utilizado é o aciclovir. Este representa o protótipo de um grupo de agentes antivirais que sofrem fosforilação intracelular por uma cinase viral (timidinocinase), transformando-se em inibidores da síntese do DNA viral. Uma limitação do aciclovir está relacionada ao desenvolvimento de resistência, que tem sido associada a um de três mecanismos: ausência ou produção parcial de timidinocinase viral, alteração da especificidade de substrato da timidinocinase ou alteração da DNA polimerase viral (HAYDEN, 2003).

A seguir, encontram-se representados os agentes anti-herpesvírus disponíveis no mercado (**Figura 30**):



**Figura 30:** Agentes anti-herpesvírus em uso clínico aprovados pelo FDA (Food & Drug Administration)

## PROBLEMÁTICA DA TERAPIA ANTIVIRAL

A eficácia da terapia antiviral encontra algumas implicações práticas, tais como:

- ❑ Interferência no metabolismo da célula normal hospedeira (HAYDEN *et al.*, 2003);
- ❑ Mutação viral para escapar das ações dos fármacos e da defesa imunológica, o que leva à resistência aos agentes antivirais (KHAN *et al.*, 2005);
- ❑ Com a resistência, acaba-se alterando a posologia, utilizando-se equivocadamente doses cada vez mais altas, potencializando as reações adversas graves no hospedeiro (KHAN *et al.*, 2005);

- ❑ Os agentes antivirais inibem apenas a replicação ativa, de modo que a replicação do vírus pode recomeçar após a interrupção do fármaco (HAYDEN *et al.*, 2003);
- ❑ Nenhum agente antiviral elimina o vírus latente ou que não se encontra em fase de replicação (HAYDEN *et al.*, 2003).

Estas implicações fazem com que novos agentes antivirais, com diferentes mecanismos de ação, sejam extremamente necessários.

## **PLANTAS MEDICINAIS NA BUSCA POR NOVOS AGENTES ANTIVIRAIS**

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana e, por muito tempo, produtos de origem mineral, animal e vegetal foram as principais fontes de fármacos (RATES, 2001). Ainda hoje, nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (MACIEL *et al.*, 2002).

Na luta pela sobrevivência, as plantas desenvolveram mecanismos de proteção através da defesa química. Estas substâncias ou metabólitos secundários, embora não essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie (McRAE *et al.*, 2007). São funções atribuídas a esses compostos: defesa contra herbivoria, defesa contra microorganismos (bactérias, fungos e vírus), defesa contra outras plantas competindo por nutrientes, luz e proteção contra danos causados pela luz UV (ACAMOVIC & BROOKER, 2005).

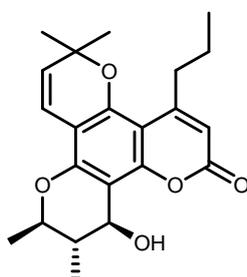
As diversas classes químicas de metabólitos secundários incluem terpenos, taninos, alcalóides, saponinas, flavonóides e polissacarídeos (Dos SANTOS, 2003). Tendo em vista a diversidade estrutural dessas substâncias, estes são capazes de interagir com diferentes alvos celulares e moleculares, incluindo enzimas, receptores hormonais, receptores para neurotransmissores e transportadores de membrana, produzindo então seu efeito terapêutico (ACAMOVIC & BROOKER, 2005).

Os produtos naturais derivados de plantas representam aproximadamente 25% do

número total de fármacos em uso clínico, incluindo clássicos como atropina, codeína, digoxina, morfina e quinina (PHILLIPSON, 2007). No início do século XX, antes do advento da "Era Sintética", 80% de todos os remédios eram obtidos de raízes, troncos e folhas (McCHESNEY *et al.*, 2007). Entre 1981 e 2002, 60 e 75% dos fármacos contra o câncer e doenças infecciosas, respectivamente, foram obtidos a partir de fontes naturais (LAM, 2007). De fato, mais de 90% das classes terapêuticas disponíveis no mercado são produtos naturais ou seus derivados sintéticos e, curiosamente, ainda hoje, aproximadamente dois terços da população mundial recorre às plantas medicinais como primeiro tratamento (McCHESNEY *et al.*, 2007).

Tendo em vista a problemática da terapia antiviral atualmente disponível, principalmente no que concerne ao desenvolvimento de resistência, a busca por produtos naturais que apresentem atividade antiviral é um dos métodos alternativos e as pesquisas nesta área vêm crescendo nas últimas décadas.

Em 2005, nos Estados Unidos, um dos quatro fármacos em fase final de estudos clínicos era uma substância de origem natural com atividade antiviral. A Calanolida A, uma dipiranocumarina isolada de *Calophyllum lanigerium* var *austrocoriaceum* (Whitmore) P. F. Stevens (Clusiaceae), uma árvore da floresta tropical da Malásia, é um fármaco anti-HIV, com um mecanismo de ação único. Possui especificidade para a transcriptase reversa do HIV-1, sendo efetivo contra cepas resistentes ao AZT (BALUNAS & KINGHORN, 2005).



Calanolida A

**Figura 31:** Estrutura da dipiranocumarina com atividade antiviral

Outros metabólitos secundários também são capazes de interferir em diversas etapas do ciclo de replicação viral, como pode ser observado na **Tabela 10**.

**Tabela 10:** Alvos terapêuticos virais e/ou mecanismo de ação de metabólitos de origem vegetal (Adaptado de JASSIM & NAJI, 2003)

Classe de substância	Alvo terapêutico/ Mecanismo de ação
Furanocumarinas e furanocromonas	Interação com DNA e RNA na presença de luz UVA
Alcalóides	Interação com DNA, polinucleotídeos e proteínas virais
Policetídeos	Interação com a membrana viral
Polissacarídeos	Inibição da adsorção viral
Tiofenos	Interação com membrana viral
Flavonóides	Inibição da adsorção e síntese de ácidos nucleicos virais
Terpenos	Inibição da síntese de DNA viral
Lignanas	Inibição da replicação de vírus de DNA e RNA
Proteínas e peptídeos	Interação com a função ribossomal da célula hospedeira, inibição da síntese de proteínas virais e da transcriptase reversa do HIV

### JUSTIFICATIVA DO BINÔMIO *M. xanthocentra* - ATIVIDADE ANTIVIRAL

A escolha do estudo das propriedades antivirais de *Mimosa xanthocentra* - uma espécie para a qual não existem relatos sobre a composição química e atividades biológicas - pode ser atribuída a três fatores:

- Apesar de não apresentar um uso popular no tratamento de doenças, esta planta pertence a um gênero reconhecidamente medicinal, havendo relatos da utilização

de outras espécies de *Mimosa* no tratamento de infecções;

- ❑ Substâncias pertencentes a classes químicas reconhecidamente antivirais, como saponinas, alcalóides, terpenos, flavonóides e polissacarídeos, já foram identificadas em espécies do gênero *Mimosa*;
- ❑ Esta planta é componente da dieta de cervídeos no Pantanal. Estudos indicam que a escolha dos alimentos por animais como insetos, pássaros e primatas está associada à sua saúde e bem-estar, sugerindo que os metabólitos secundários auxiliem esses animais no combate e tratamento de doenças (KRIEF *et al.*, 2005). Adicionalmente, em pesquisa realizada por UHART *et al.* (2003) visando avaliar o estado de saúde dos veados-campeiros na Reserva Campos Del Tuyú Wildlife, Argentina, verificou-se que todos os animais examinados apresentaram boas condições físicas, quando comparados aos ruminantes domésticos (gado bovino), o que poderia ser atribuído às plantas consumidas pelos primeiros, cujo uso contínuo poderia estar atuando na prevenção ou cura das doenças adquiridas por esses animais.

Desta forma, este estudo visa a identificação de substâncias potencialmente terapêuticas em *M. xanthocentra* e a avaliação dos potenciais efeitos benéficos que poderiam surgir da ingestão desta espécie vegetal pelos cervídeos, tendo como enfoque viroses de importância humana e veterinária.

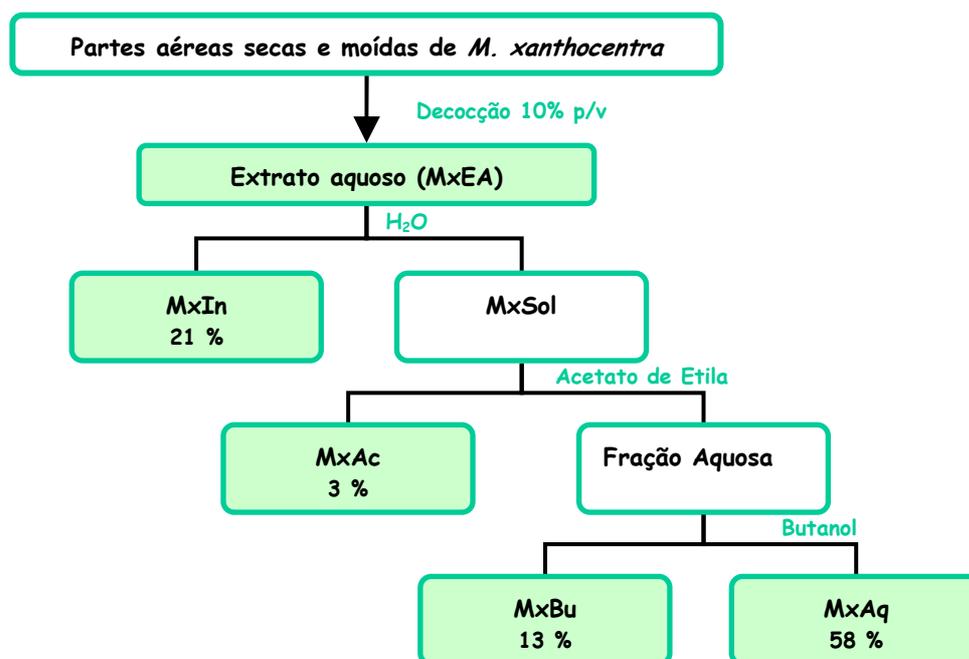
Os ensaios antivirais para HSV-1 e HSV-2 foram realizados por mim, sob orientação direta da Profa. Maria Teresa V. Romanos (LEDAC, IMPPG/UFRJ), enquanto que os experimentos com SHV-1 e BHV-1 foram realizados pela equipe da Dra Isabela Cristina Simoni (Instituto Biológico, SP).

## PARTE FITOQUÍMICA

### PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO AQUOSO

A preparação do extrato aquoso de *M. xanthocentra*, assim como seu fracionamento inicial através da partição com solventes orgânicos, segue o protocolo detalhadamente descrito na seção **Materiais e Métodos, Capítulo I**.

No **Esquema 12** encontra-se resumido o processo de preparação e fracionamento do extrato aquoso de *M. xanthocentra*, com os rendimentos (em porcentagem de massa) de cada fração em relação ao extrato. As frações marcadas em verde foram triadas quanto à atividade anti-HSV.



**Esquema 12:** Resumo esquemático do processo de preparação e fracionamento do extrato aquoso de *M. xanthocentra*.

## **FRACIONAMENTO BIOMONITORADO**

Após triagem inicial, as frações mais ativas frente aos vírus herpes foram submetidas a um processo de fracionamento bioguiado com o auxílio de técnicas de precipitação com etanol e cromatografia em coluna. Todos os processos foram monitorados por cromatografia em camada delgada (CCD).

### **Precipitação com etanol**

A precipitação com etanol foi realizada visando à separação dos macrometabólitos, como os polissacarídeos e proteínas, dos micrometabólitos (monossacarídeos, dissacarídeos, ácidos fenólicos, aminoácidos, entre outros). O etanol adicionado em meio aquoso, na proporção de 1:1, compete com as moléculas em solução pela interação com a água. A maior proporção de etanol e a maior facilidade de acesso a essa molécula fazem com que a água se ligue preferencialmente ao etanol provocando a precipitação das macromoléculas. As micromoléculas permanecem solúveis, pois são facilmente solvatadas pelo etanol (CUI *et al.*, 2007).

Após a precipitação, sobrenadante e precipitado foram separados por centrifugação (3000 rpm; 20 min). O precipitado, retomado em água, e o sobrenadante, após evaporação do etanol, foram liofilizados e quantificados.

### **Cromatografia em coluna**

Como métodos cromatográficos foram realizadas a cromatografia de adsorção em fase reversa e exclusão molecular, segundo métodos descritos na seção **Materiais e Métodos, Capítulo I**.

### **Cromatografia em Camada Delgada (CCD)**

A detecção de substâncias fenólicas em CCD segue os mesmos procedimentos descritos na seção **Materiais e Métodos, Capítulo I**.

Para detecção dos carboidratos em CCD utilizou-se sílica 60 F<sub>254</sub> em Alumínio (Merck) como suporte e n-butanol/ etanol/ água (BEW) na proporção 40:11:19 como fase

móvel. Os cromatogramas foram visualizados sob luz ultravioleta em dois comprimentos de onda, 254 nm e 365 nm, e revelados com solução de sulfato cérico, seguidas de aquecimento (50° C) em chapa aquecedora Cornig. Após revelação com sulfato cérico, as manchas referentes aos açúcares revelam-se marrom escuro.

## **INSTRUMENTOS**

Para avaliação do perfil químico das frações ativas utilizaram-se as técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Infravermelho (IV).

### **Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker AC200A (<sup>1</sup>H: 200,16 MHz; <sup>13</sup>C: 50,33 MHz), obtendo-se espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C utilizando D<sub>2</sub>O como solvente deuterado.

### **Infravermelho**

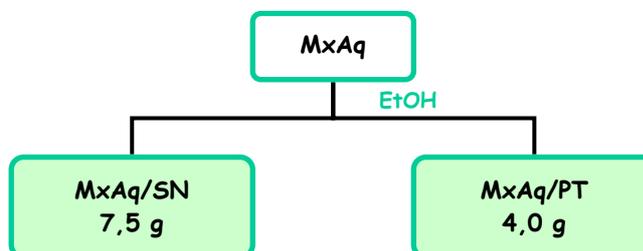
Para realização dos espectros de Infravermelho, utilizou-se o aparelho Nicolet Magna-IR-760. As amostras foram preparadas em pastilha de KBr ou filme de Nujol.

## **FRACIONAMENTO DE MxAq**

A fração MxAq (13,0 g) foi solubilizada em água destilada na proporção de 8 ml/g e a solução resultante foi precipitada com etanol na proporção 1:1. Uma alíquota de MxAq (1,8 g) foi separada para a realização dos espectros de RMN e para os ensaios biológicos.

O sobrenadante (MxAq/SN) de coloração castanho-claro e o precipitado de coloração marrom-escuro (MxAq/PT) foram separados por centrifugação, colocados em banho-maria para evaporação do etanol e liofilizados para posterior ensaio antiviral.

O Esquema 13 resume o processo de fracionamento de MxAq, com as massas obtidas de cada fração.



Esquema 13: Fracionamento de MxAq

## ISOLAMENTO DO FLAVONÓIDE MxF1

Tendo em vista os numerosos relatos existentes na literatura a respeito da atividade antiviral de flavonóides, resolveu-se avaliar o efeito de MxF1 (isovitexina-2"-O-ramnopiranosídeo), o flavonóide majoritário de *M. xanthocentra*, frente aos vírus Herpes simplex dos tipos 1 e 2.

O isolamento desta substância segue o protocolo detalhadamente descrito na seção **Materiais e Métodos, Capítulo I**.

## PREPARO DAS AMOSTRAS PARA TESTE

As amostras foram pesadas em balança analítica e solubilizadas em água destilada para uma concentração inicial de 400 µg/ml. Para as amostras pouco solúveis em água, fez-se a adição de DMSO em até 1,0% do volume final. As soluções foram filtradas em membrana Millipore (0,22 µm), aliqüotadas e conservadas à temperatura de -20°C.

### Combinações de Frações

As combinações foram preparadas a partir das soluções estoque (400 µg/ml) de MxIn, MxBu, MxAc e MxAq, imediatamente antes de cada experimento. A concentração de cada fração na combinação binária foi estabelecida segundo as proporções relativas em que

estas se encontravam no extrato, baseando-se nos rendimentos observados (**Esquema 13**). A partir da união (v/v) de pares de frações foram obtidas soluções a 400 µg/ml de cada combinação, que foram diluídas para a realização dos experimentos de citotoxicidade e antivirais.

Na **Tabela 11** encontram-se as proporções relativas (v/v) e as concentrações de cada fração na combinação.

**Tabela 11:** Proporções e concentração de cada fração nas combinações obtidas a partir de MxIN, MxBu, MxAc e MxAq.

Combinação (A + B)		Proporção (ml fração/ ml combinação)		Concentração (µg/ml)	
A	B	A	B	A	B
MxIn	MxBu	0,6	0,4	240	160
MxIn	MxAc	0,9	0,1	360	40
MxIn	McAq	0,45	0,55	180	220
MxBu	MxAc	0,75	0,25	300	100
MxBu	MxAq	0,22	0,78	88	312
MxAc	MxAq	0,055	0,945	2	378

## ENSAIOS ANTIVIRAIS

### SISTEMA HOSPEDEIRO

A infecção e patogênese virais dependem da síntese de proteínas e ácidos nucleicos no interior da célula infectada (JENSEN *et al.*, 2000), uma vez que os vírus não possuem maquinaria metabólica própria, necessitando usurpar a de uma célula hospedeira (HAYDEN, 2003).

O emprego da cultura de células como sistema hospedeiro constitui a base dos experimentos biológicos, principalmente no que concerne ao estudo de agentes antivirais (JENSEN *et al.*, 2000). Além de ser um método prático e economicamente viável, permite a triagem de um grande número de substâncias (HU & HSIUNG, 1989).

No presente estudo utilizou-se cultura de células Vero (rim de macaco verde africano; *Cercopitheccus aethiops*) para os vírus Herpes simplex e MDBK (rim bovino; Mardin and Darby Bovine Kidney) para os vírus Herpes suíno e bovino.

### **Preparo da cultura de células**

- Células Vero: uma vez tripsinizadas, as células foram ressuspensas em meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM-Eagle) acrescido de 0,03 mg/ml de glutamina, 50 µg/ml de gamicina, 2,5 mg/ml de fungizona, solução de bicarbonato de sódio a 0,25%, HEPES 10 mM e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células em cultura foram incubadas a 37°C por 48 horas, de modo a formar uma monocamada confluenta.

- Células MDBK: mantidas em MEM-Eagle acrescidos de 10% de soro fetal bovino (SFB) (MANHA, 2004).

### **Efeito Citopatogênico (CPE)**

A avaliação, *in vitro*, da eficácia de um agente antiviral pode se dar por diferentes métodos, sendo que o mais comumente utilizado envolve redução do título viral através da comparação da morfologia das células infectadas não-tratadas (controle) e tratadas. A alteração morfológica da célula, chamada Efeito Citopatogênico (CPE), inclui fenômenos como fusão e arredondamento celulares, com eventual perda do contato célula-célula à medida que as células arredondadas se destacam da monocamada confluenta (FISCHER *et al.*, 2001).

Para vírus que causam um indubitável CPE, como os vírus herpes, a visualização deste efeito através de um microscópio óptico invertido constitui um método rápido e prático de

avaliação da atividade antiviral, uma vez que permite a triagem de um grande número de substâncias (SMEE *et al.*, 2002).

## **AMOSTRA VIRAL**

As amostras de HSV-1 e HSV-2, ambas resistentes ao aciclovir (HSV-ACVr), pertencem à coleção do LEDAC (Laboratório Experimental de Drogas Antivirais e Citotóxicas) e foram isoladas a partir do fluido de vesículas características de herpes labial (HSV-1) e herpes genital (HSV-2).

As amostras de BHV-1 e SHV-1 pertencem ao Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, Instituto Biológico, São Paulo.

## **Titulação Viral**

A titulação dos vírus foi realizada para se estabelecer a dose que produz efeito citopatogênico (CPE) em 50% das culturas de células inoculadas (TCID<sub>50</sub>/ml), de acordo com o cálculo estabelecido por REED & MUENCH (1938).

Monocamadas de células confluentes, crescidas de meio de manutenção celular (MEM sem SFB), foram inoculadas com diluições logarítmicas decimais (10<sup>-1</sup> a 10<sup>-7</sup>) dos vírus, realizadas utilizando-se o meio de manutenção celular como diluente. As sete diluições virais foram analisadas em sextuplicata (microplaca de 96 poços) e as células inoculadas foram incubadas a 37°C por 48 horas em ambiente de 5% de CO<sub>2</sub>.

## **CITOTOXICIDADE**

Previamente à avaliação da atividade antiviral de uma substância é necessário determinar sua toxicidade para o sistema hospedeiro empregado, de forma a garantir a atuação exclusiva da substância sobre o vírus. A citotoxicidade será avaliada segundo dois critérios: alteração morfológica e viabilidade celular (WALKER *et al.*, 1972; NEYNDORFF *et al.*, 1990).

## **Alteração morfológica celular**

### **1. Células Vero**

Diluições seriadas ao dobro de todas as substâncias, utilizando meio de manutenção celular como diluente, foram colocadas em contato com as monocamadas de células confluentes. As sete concentrações (200 µg/ml; 100 µg/ml; 50 µg/ml; 25 µg/ml; 12,5 µg/ml; 6,2 µg/ml; 3,1 µg/ml) foram analisadas em quadruplicata e as células deixadas incubar a 37°C em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

Após 48 horas de incubação, as células foram examinadas ao microscópio óptico invertido e comparadas com o controle (células + meio de manutenção) buscando-se possíveis alterações morfológicas (células arredondadas, vacúolos e/ou deslocamentos da monocamada da superfície suporte) (RODRIGUEZ *et al.*, 1990). A maior concentração da substância que não causou alteração celular, ou seja, efeito citotóxico, é denominada Concentração Máxima Não-Tóxica (CMNT), sendo utilizada para os estudos antivirais.

### **2. Células MDBK**

Em uma microplaca de 96 poços foram semeadas  $3,0 \times 10^4$  células/ml em cada poço. Após 24 horas de incubação a 37°C em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub>, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se em cada poço 100 µl das diluições ao dobro das amostras, com duas repetições para cada diluição. Após 96 horas de incubação, as células foram examinadas ao microscópio óptico invertido buscando-se as possíveis alterações morfológicas. A concentração das amostras que não provocou alterações morfológicas nas células foi considerada a Concentração Máxima Não-Tóxica (CMNT) (MANHA, 2004).

## **Viabilidade celular**

A viabilidade celular na presença das substâncias foi avaliada segundo a técnica "dye-uptake" (NEYNDORFF *et al.*, 1990), com modificações. Esta técnica consiste na dosagem,

em espectrofotômetro (492 nm), do corante Vermelho Neutro incorporado seletivamente pelas células vivas.

A porcentagem de células viáveis é obtida pela fórmula:

$$\frac{(\text{DO substância}) - (\text{DO controle de células})}{(\text{DO corante}) - (\text{DO controle de células})} \times 100$$

Plotando-se os valores de porcentagem de células viáveis (obtidos para cada concentração de substância) em um gráfico, obtém-se a concentração capaz de causar efeito tóxico em 50% das culturas de células ( $CC_{50}$ ).

Esta técnica foi aplicada apenas para as células Vero.

Mediante a apresentação das metodologias empregadas para avaliação da citotoxicidade, cabe aqui ressaltar que as diferenças existentes entre as técnicas apresentadas estão relacionadas à execução dos experimentos em laboratórios diferentes, como foi dito anteriormente (pág 136). As concentrações máximas utilizadas, a partir da qual são realizadas as diluições, são aleatórias e padronizadas para cada laboratório. Da mesma forma, a avaliação da viabilidade celular e cálculo da  $CC_{50}$  fazem parte da rotina no LEDAC, mas não no Instituto Biológico. Isto justifica a ausência destes dados nos experimentos realizados em células MDBK.

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL**

Monocamadas de células (Vero e MDBK) foram tratadas com as substâncias na CMNT, imediatamente inoculadas com diluições logarítmicas decimais dos vírus e incubadas durante 48 h (células Vero) ou 96 h (células MDBK) a 37°C, em ambiente contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Paralelamente fez-se a titulação viral em cultura de células não-tratadas (controle de vírus).

O título viral em cultura de células tratadas e não-tratadas foi determinado segundo método estatístico de Reed & Muench (ALMEIDA, 2005).

A atividade antiviral, dada pela redução do título viral das células tratadas em relação ao controle, foi expressa em Índice de Inibição Viral (IIV) e Porcentagem de Inibição (PI).

**IIV** (LAGROTA; 1978)

$$\text{IIV} = \text{Título Controle Vírus} - \text{Título Células Tratadas}$$

**PI** (NISHIMURA, TOKU & FUKUYASU; 1977)

Sendo T as unidades infecciosas na cultura de células tratadas, e C as unidades infecciosas do controle de vírus, temos que:

$$\text{PI} = \left( \frac{1 - \text{antilog } T}{\text{antilog } C} \right) \times 100$$

## ATIVIDADE ANTIVIRAL DE *M. xanthocentra*

De modo a avaliar a atividade antiviral de *M. xanthocentra*, seu extrato aquoso (MxEA) foi testado frente a HSV tipos 1 e 2 (cepas resistentes ao aciclovir, o principal fármaco de escolha para o tratamento de lesões herpéticas), SHV-1 e BHV-1.

### Citotoxicidade

Para a avaliação do efeito inibitório de uma substância ou composto frente aos vírus é necessário, primeiramente, conhecer seu efeito sobre as células. Avaliar a citotoxicidade de uma substância é fundamental para excluir uma falsa atividade antiviral em virtude de seu efeito lesivo sobre as células (ALMEIDA, 2005).

A determinação do efeito citotóxico baseou-se nas alterações morfológicas das células, permitindo estabelecer a Concentração Máxima Não-Tóxica (CMNT) de cada extrato, fração ou substância. Para as células Vero, avaliou-se também a sua viabilidade, determinando a porcentagem de células vivas (viáveis) e a  $CC_{50}$  (Concentração capaz de produzir efeito Citotóxico em 50% das culturas de células).

Cada substância submetida aos ensaios antivirais teve a sua citotoxicidade avaliada e os resultados serão discutidos juntamente com os resultados antivirais.

### Atividade antiviral de MxEA

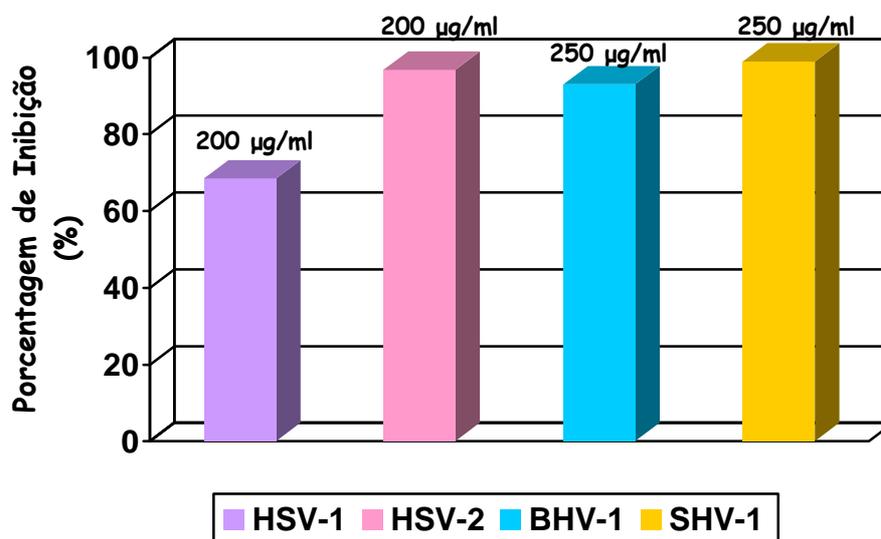
Na Tabela 12 podem ser encontrados os resultados dos ensaios antivirais obtidos para MxEA frente a HSV-1, HSV-2, BHV-1 e SHV-1.

**Tabela 12:** Resultados gerais dos ensaios de citotoxicidade e antivirais obtidos para MxEA testado nas respectivas CMNT (N/A: Não avaliada)

Vírus	Célula	CMNT ( $\mu\text{g/ml}$ )	$CC_{50}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	IIV	PI (%)
HSV-1	Vero	$\geq 200$	$> 200$	0,50	68,4
HSV-2	Vero	$\geq 200$	$> 200$	1,50	96,8
BHV-1	MDBK	250	N/A	1,15	93,0
SHV-1	MDBK	250	N/A	2,00	99,0

Analisando-se os resultados, verificamos que **MxEA** apresentou baixa toxicidade para ambas as células utilizadas, com valores de  $CMNT$  variando de 200 a 250  $\mu\text{g/ml}$ . Para as células Vero, cuja viabilidade foi avaliada, verificamos que a  $CC_{50}$  foi superior a 200  $\mu\text{g/ml}$  ( $CMNT$ ).

Em relação aos ensaios antivirais, **MxEA** foi capaz de atuar, em cultura de células, frente à vírus de importância na veterinária e na medicina humana. Exceto para o HSV-1, **MxEA** foi capaz de inibir em mais de 90% a infecciosidade dos vírus testados, destacando-se o SHV-1, cuja inibição atingiu 99%. Para o HSV-1 foi verificada apenas uma inibição moderada (68,4%).



**Figura 32:** Atividade antiviral de **MxEA**, frente aos quatro vírus testados, em porcentagem de inibição (PI)

De posse dos dados obtidos, *M. xanthocentra* pode ser considerada uma fonte promissora de substâncias antivirais. Apesar de não existirem relatos acerca do uso desta espécie na medicina popular, plantas pertencentes ao gênero *Mimosa* são frequentemente usadas medicinalmente contra diferentes processos infecciosos. Dessa forma, parece-nos plausível supor que moléculas com propriedades terapêuticas estejam presentes nesta planta, sendo capazes de promover efeitos benéficos para humanos e animais.

### Plantas medicinais com atividade antiviral

São inúmeros os dados encontrados na literatura sobre o uso de extratos de plantas e de substâncias isoladas a partir desses extratos contra infecções causadas por vírus, sendo que uma grande variedade dessas espécies vegetais é utilizada pela população com aparente sucesso no combate a processos infecciosos.

Em um recente estudo realizado por NOLKEMPER *et al.* (2006), verificou-se que seis plantas da família Lamiaceae - *Melissa officinalis* (erva-cidreira), *Mentha piperita* (hortelã-pimenta), *Prunella vulgaris* (brígula ou erva-férrea), *Rosmarinum officinalis* (alecrim), *Salvia officinalis* (sálvia) e *Thymus vulgaris* (tomilho) - amplamente utilizadas na medicina popular para o tratamento de doenças inflamatórias e digestivas, apresentaram atividade frente aos vírus Herpes simplex dos tipos 1 e 2.

Plantas pertencentes à medicina popular de povos das mais diferentes culturas também tiveram sua atividade antiviral avaliada. *Pongamia pinnata* (Fabaceae), utilizada na medicina popular indiana para o tratamento de lesões dermatológicas e genitais, apresentou atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2 (ELANCHEZHIAN *et al.*, 1993). Da medicina tradicional chinesa, *Agrimonia pilosa* (Rosaceae), *Pithecellobium clypearia* (Fabaceae) e *Punica granatum* (Lythraceae) foram capazes de atuar frente ao HSV-1, enquanto que *Blumea laciniata* (Asteraceae), *Elephantopus scaber* (Asteraceae), *Laggera pterodonta* (Asteraceae), *Mussaenda pubescens* (Rubiaceae), *Schefflera octophylla* (Araliaceae) e *Scutellaria indica* (Labiatae) foram capazes de atuar frente ao RSV (Vírus Respiratório Sincicial), um vírus de RNA (LI *et al.*, 2004).

Pesquisas visando selecionar plantas brasileiras com atividade antiviral contra vírus humanos e animais estão cada vez mais difundidas. *Persea americana* (Lauraceae; abacateiro), cujas folhas são utilizadas na medicina popular brasileira no tratamento de infecções urinárias, bronquite e reumatismo, apresentou uma potente atividade frente ao SHV-1, BHV-1, adenovírus tipo 3 e HSV-1 (ALMEIDA *et al.*, 1998). *Stryphnodendron adstringens* (Leguminosae), conhecida como barbatimão e usada empiricamente como agente cicatrizante, adstringente, antimicrobiano, antifúngico, antidiarréico e hipoglicemiante, e *Guazuma ulmifolia* (Sterculiaceae), conhecida como mutamba e usada medicinalmente como cicatrizante, anti-ulcerogênico, hipoglicemiante e antimicrobiano,

foram capazes de reduzir a infecciosidade promovida pelos vírus Herpes bovino (BHV-1) e Poliovírus tipo 1, sendo este último um vírus de RNA (FELIPE *et al.*, 2006).

A **Tabela 13** fornece-nos uma visão geral sobre os relatos encontrados na literatura a respeito de espécies medicinais com atividade inibidora de vírus herpes. Essas espécies vegetais são usadas, principalmente, no tratamento de lesões e infecções da pele, na maioria dos casos.

**Tabela 13 (Parte I):** Plantas utilizadas na medicina popular com atividade anti-HSV.

Família da planta e nome científico	País e uso tradicional	Vírus
Saxifragaceae		
<i>Bergenia ligulata</i>	Nepal Febre, bolhas e oftalmia.	HSV-1 <sup>1</sup>
Ulmaceae		
<i>Holoptelia integrifolia</i>	Nepal Inchaço reumático	HSV-1 <sup>1</sup>
Apocynaceae		
<i>Carissa edulis</i>	Quênia Infecções dermatológicas, doenças parasitárias, problemas abdominais, enxaqueca e doenças sexualmente transmissíveis	HSV-1 <sup>2</sup> HSV-2 <sup>2</sup>
<i>Acokanthera schimperi</i>	Etiópia Escabiose, lepra	HSV-1 <sup>8</sup>
Geraniaceae		
<i>Geranium sanguineum</i>	Bulgária Erupções cutâneas, alívio de prurido, coceira e lesões na pele	HSV-1 <sup>3</sup> HSV-2 <sup>3</sup>

Referências da Tabela 13 (Parte I): <sup>1</sup>RAJBHANDARI *et al.*, 2001; <sup>2</sup>TOLO *et al.*, 2006 ; <sup>3</sup>SERKEDJIEVA *et al.* ; <sup>8</sup>GEBRE-MARIAM *et al.*, 2006.

Tabela 13 (Parte II): Plantas utilizadas na medicina popular com atividade anti-HSV.

Família da planta e nome científico	País e uso tradicional	Vírus
Asteraceae		
<i>Baccharis ginistelloides</i>	Bolívia Anti-helmíntico, tratamento de úlceras e resfriado	HSV-1 <sup>4</sup>
<i>Inula confertiflora</i>	Etiópia Herpes, micoses, feridas e eczemas	HSV-1 <sup>8</sup>
Lamiaceae		
<i>Satureja boliviana</i>	Bolívia Tratamento de resfriado, anti- séptico, anti-helmíntico e inseticida	HSV-1 <sup>4</sup>
Polygonaceae		
<i>Polygonum punctatum</i>	Argentina Desinfetante, remédio para lavagem de pústulas, feridas e rachaduras e no tratamento de hemorróidas	HSV-1 <sup>5</sup>
Anacardiaceae		
<i>Lithraea molleoides</i>	Argentina Diurético, tratamento de doenças digestivas, e respiratórias	HSV-1 <sup>5</sup>
Lythraceae		
<i>Cuphea carthagenensis</i>	Brasil Anti-hipertensivo, doenças cardiovasculares, febre, laxante, diurético e diaforético	HSV-1 <sup>7</sup>

Referências da Tabela 13 (Parte II): <sup>4</sup>ABAD *et al.*, 1999; <sup>5</sup>KOTT *et al.*, 1999 ;  
<sup>7</sup>ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2005; <sup>8</sup>GEBRE-MARIAM *et al.*, 2006

Tabela 13 (Parte III): Plantas utilizadas na medicina popular com atividade anti-HSV.

Família da planta e nome científico	País e uso tradicional	Vírus
Euphorbiaceae		
<i>Sebastiania brasiliensis</i>	Argentina Anti-séptico para feridas	HSV-1 <sup>5</sup>
<i>Sebastiania klotzschiana</i>	Argentina Anti-séptico para feridas	HSV-1 <sup>5</sup>
<i>Euphorbia cotinifolia</i>	Colômbia	HSV-2 <sup>9</sup>
<i>Euphorbia tirucalli</i>	Úlcera, câncer, tumores, feridas	
Bromeliaceae		
<i>Tillandsia usneoides</i>	Hipertensão, reumatismo, hemorróidas, colagogo, diurético, doenças renais e oftalmológicas	HSV-1 <sup>7</sup>
Ebenaceae		
<i>Euclea schimperi</i>	Etiópia Escabiose, lepra	HSV-1 <sup>8</sup>
Leguminosae		
<i>Melilotus elegans</i>	Etiópia Hemorróidas, inflamações bucais e feridas laceradas	HSV-1 <sup>8</sup>

Referências da Tabela 13 (Parte III): <sup>5</sup>KOTT *et al.*, 1999; <sup>7</sup>ANDRIGHETTI-FRÖHNER *et al.*, 2005; <sup>8</sup>GEBRE-MARIAM *et al.*, 2006; <sup>9</sup>KHAN *et al.*, 2005

Além de espécies vegetais utilizadas na medicina popular, o estudo de plantas ingeridas por animais pode ser considerado uma fonte alternativa na busca de substâncias potencialmente terapêuticas.

Estudos apontam que a seleção de alimentos por parte de alguns animais, como pássaros, insetos e primatas, está associada com seu estado de saúde, sugerindo uma possível ação das substâncias presentes nessas plantas no combate e tratamento de

doenças (KRIEF *et al.*, 2005). Da mesma forma, a seleção de alimentos pelos cervos-do-pantanal e veados-campeiros, pode estar condicionada aos possíveis efeitos benéficos do forrageamento desses cervídeos. As propriedades antivirais destas plantas poderiam estar beneficiando os animais através do uso contínuo, sendo, por isso, fundamentais para sua saúde e conservação. Estas plantas, por sua vez, podem ser consideradas uma arma importante para a descoberta de agentes antivirais menos tóxicos e com um espectro de ação mais abrangente, principalmente para vírus resistentes aos fármacos em uso clínico.

### ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES DE MxEA

A pesquisa de substâncias derivadas de plantas está baseada no potencial dos metabólitos secundários como fonte de produtos naturais bioativos, uma vez que essas substâncias que fazem parte do mecanismo de proteção da planta podem também agir contra infecções provocadas por fungos, bactérias e vírus.

De forma a determinar a classe química e até a substância envolvida com a atividade antiviral de *M. xanthocentra*, MxEA foi submetida a um fracionamento. As frações insolúvel (MxIn), butanólica (MxBu), acetato de etila (MxAc) e aquosa (MxAq), obtidas no processo de partição com solventes orgânicos (*n*-butanol e acetato de etila) foram as primeiras frações selecionadas quanto à atividade antiviral.

As Tabelas 14 e 15 resumem os resultados dos ensaios de citotoxicidade e antivirais, respectivamente, obtidos para as frações testadas.

**Tabela 14:** Resultados dos ensaios de citotoxicidade para MxIn, MxBu, MxAc e MxAq.

Amostra	Células Vero		Células MDBK	
	CMNT (µg/ml)	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	CMNT (µg/ml)	CC <sub>50</sub> (µg/ml)
MxIn	100	> 200	N/A	N/A
MxBu	100	> 200	500	N/A
MxAc	50	200	125	N/A
MxAq	100	> 200	500	N/A

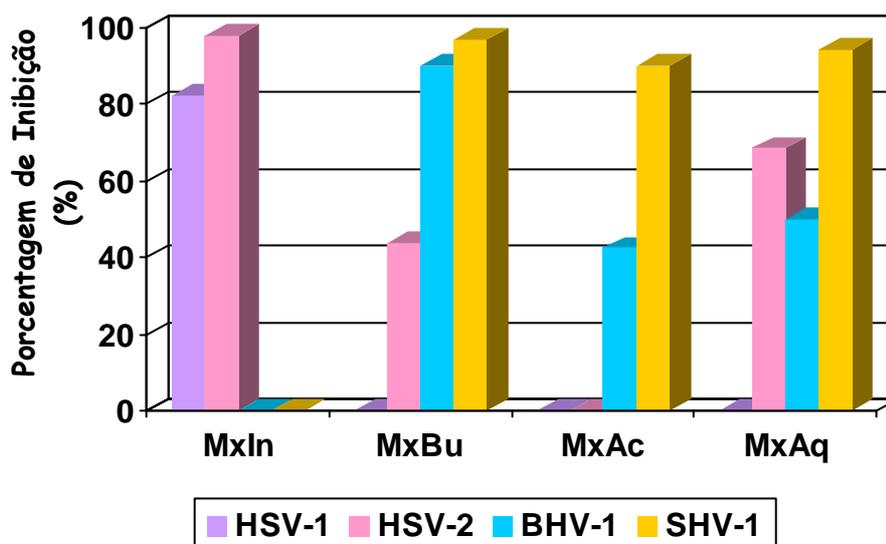
N/A: Não avaliada

Das frações avaliadas, **MxAc** mostrou-se a mais tóxica para ambas as linhagens celulares. Para as células Vero, à medida que se avança no sentido da fração mais purificada, ocorre um aumento da toxicidade, uma vez que todas as frações testadas apresentaram uma CMNT inferior à obtida para o extrato aquoso. Entretanto, para as células MDBK ocorre justamente o oposto, exceto para **MxAc**.

**Tabela 15:** Resultados gerais dos ensaios antivirais obtidos para **MxIn**, **MxBu**, **MxAc** e **MxAq** testadas nas respectivas CMNT

Amostra	HSV-1		HSV-2		BHV-1		SHV-1	
	IIV	PI (%)						
MxIn	0,75	82,2	1,65	97,8	N/A	N/A	N/A	N/A
MxBu	0	0	0,25	43,8	1,0	90,0	1,50	96,8
MxAc	0	0	0	0	0,24	42,5	1,0	90,0
MxAq	0	0	0,50	68,4	0,30	49,9	1,24	94,2

N/A: Não avaliada



**Figura 33:** Atividade antiviral de **MxIn**, **MxBu**, **MxAc** e **MxAq** frente aos quatro vírus testados, em porcentagem de inibição (PI)

Para os herpesvírus humanos, **MxIn** mostrou-se a fração mais ativa, seguida das frações **MxAq** e **MxBu**, respectivamente (**Figura 33**).

Analisando-se os resultados obtidos para HSV-1 verificamos que a atividade encontrada no extrato está concentrada em **MxIn**. As demais frações não apresentaram qualquer efeito sobre este vírus.

Em relação ao HSV-2, a fração **MxIn** mostrou-se a mais ativa, apresentando uma inibição superior ao extrato com apenas metade de sua concentração. Entretanto, podemos observar a participação das substâncias encontradas em **MxBu** e **MxAq** na atividade de **MxEA**, uma vez que estas frações foram capazes de inibir de forma fraca a moderada a infecciosidade deste vírus. A fração **MxAc** não apresentou qualquer efeito sobre este vírus.

Para os vírus de origem animal, a maior atividade inibidora foi encontrada em **MxBu**. Entretanto, a inibição promovida por esta fração não foi capaz de exceder a do extrato, mesmo com o dobro de sua concentração. As frações **MxAc** e **MxAq** realizaram uma fraca inibição de BHV-1, enquanto que para SHV-1 a inibição ocorreu na faixa de 90%. **MxIn** não foi avaliada frente a esses vírus.

Apesar dos quatro vírus testados pertencerem à mesma família (Alphaherpesviridae), podemos observar uma seletividade das substâncias encontradas no extrato em relação a esses vírus. No caso de HSV-1, **MxIn** foi a única fração a apresentar alguma atividade. As substâncias presentes em **MxAc** parecem atuar apenas frente ao BHV-1 e SHV-1, que por sua vez pertencem a gêneros diferentes de HSV-1 e HSV-2. Dos quatro vírus, o SHV-1 parece ser o mais sensível às substâncias presentes em **MxBu**, **MxAc** e **MxAq**.

#### **Composição química de MxBu, MxAc, MxAq e MxIN**

O comportamento de cada fração obtida a partir de **MxEA** em relação aos vírus testados está relacionado à suas diferentes composições químicas, assim como às diferenças entre os vírus.

Os perfis químicos das frações **MxBu**, **MxAc** e **MxAq** foram estabelecidos por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-UV), enquanto que o perfil químico de **MxIn** foi estabelecido por Infravermelho (IV).

Os cromatogramas e espectros obtidos para **MxEa** e suas frações (**MxBu**, **MxAc** e **MxAq**) encontram-se disponíveis para análise no **ANEXO**.

### 1. **MxBu**

Um elevado número de substâncias fenólicas pode ser observado em **MxBu**, sendo os flavonóides (principalmente as flavonas) as substâncias majoritárias em relação à massa. Dentre as substâncias minoritárias presentes nesta fração destacam-se os ácidos fenólicos e os carboidratos de baixo peso molecular.

De posse destes dados, parece-nos plausível supor que os flavonóides são as substâncias que respondem pela atividade antiviral de **MxBu**. Posteriormente será discutida a existência de flavonóides com atividade antiviral.

### 2. **MxAc**

Para **MxAc** verifica-se também a presença de um grande número de substâncias fenólicas, sendo que a variedade de flavonóides (principalmente flavonóis) encontradas nesta fração é superior à de **MxBu**. Observam-se também substâncias de baixa polaridade, como aquelas derivadas de ácidos graxos e alguns poucos ácidos fenólicos. Das frações analisadas, **MxAc** tem o menor conteúdo sacarídico.

Os dados obtidos sugerem que os flavonóides também sejam as substâncias que respondem pela atividade antiviral de **MxAc**.

### 3. **MxAq**

A fração **MxAq** é a mais pobre em substâncias fenólicas, sendo possível observar alguns poucos ácidos fenólicos, com base em CLAE-UV. A classe de substâncias predominantes nesta fração são os carboidratos, devendo estes ser os responsáveis pela sua atividade antiviral. Posteriormente será discutida a existência de carboidratos com atividade antiviral.

#### 4. MxIn

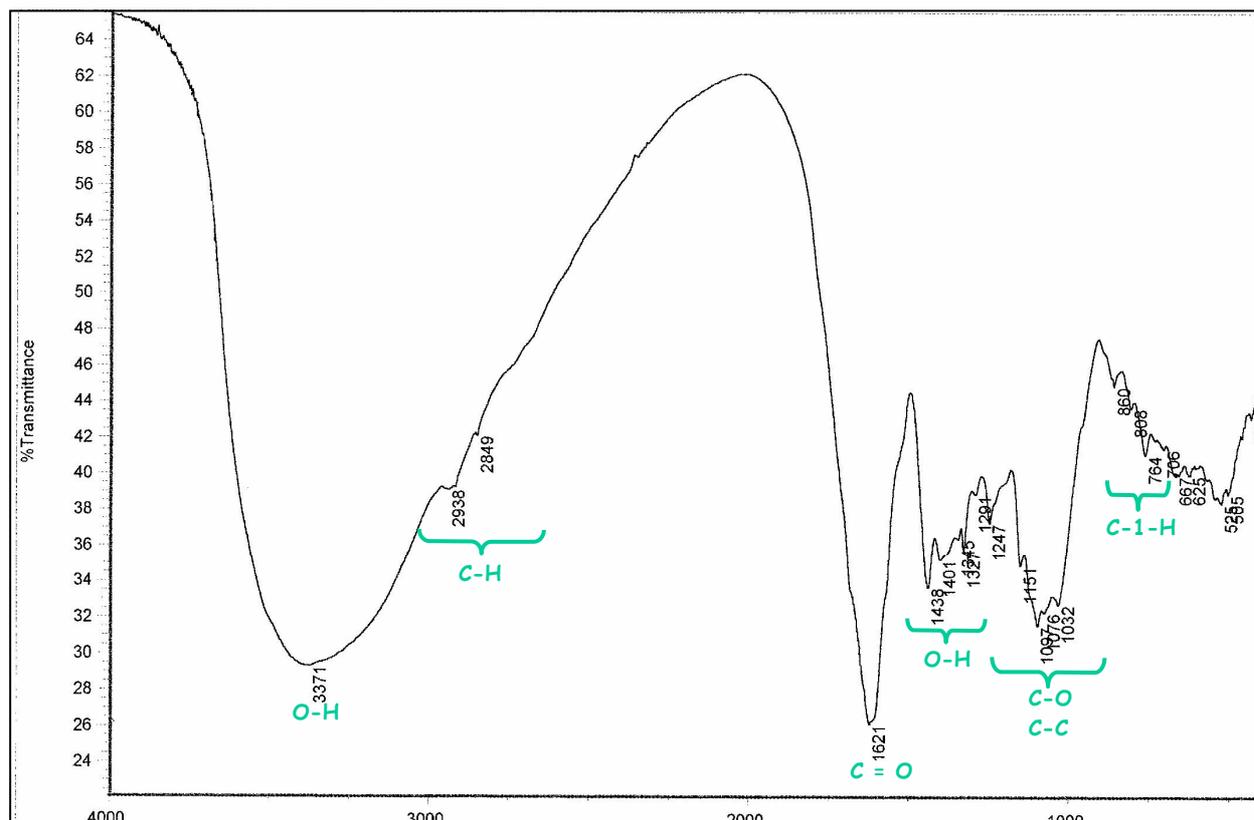
O espectro de IV (**Espectro 46**) obtido para **MxIn** (sólido amorfo) apresentou absorções em  $1621\text{ cm}^{-1}$ ,  $1400\text{ cm}^{-1}$  e  $1247\text{ cm}^{-1}$  caracterizando um polissacarídeo (HUANG *et al.*, 2007).

A banda intensa e larga em  $3371\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração de deformação axial da ligação O-H, em ligação de hidrogênio intra e intermolecular. Em  $2938\text{ cm}^{-1}$  e  $2849\text{ cm}^{-1}$  observa-se a deformação axial simétrica e assimétrica da ligação C-H e em aproximadamente  $1420\text{-}1330\text{ cm}^{-1}$ , a vibração da deformação angular no plano de O-H. As absorções entre  $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  referem-se às deformações axiais das ligações C-O e C-C do anel, enquanto que na região entre  $950\text{ cm}^{-1}$  e  $750\text{ cm}^{-1}$  são observadas as vibrações C-H do carbono anomérico (CHARLES *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*; 2007; FIGUEIRÓ *et al.*; 2004).

A presença de absorções intensas em  $1621\text{ cm}^{-1}$ ,  $1400\text{ cm}^{-1}$  e  $1240\text{ cm}^{-1}$  pode ser justificada pelo elevado conteúdo protéico da fração, sendo atribuída respectivamente às deformações axiais de C=O (Banda de amida I), angulares de N-H (Banda de amida II) e axiais de C-N (Banda II de amida) (CHARLES *et al.*, 2008; BOULET *et al.*, 2007; CUNHA *et al.*; 2007).

Esses dados permitem confirmar a presença majoritária de um polissacarídeo em **MxIn**, porém não são suficientes para a identificação estrutural deste carboidrato.

Posteriormente será discutida a existência de polissacarídeos com atividade antiviral.



**Espectro 46:** Espectro de IV de **MxIn**. Parâmetros: Pastilha de KBr, NS: 16, RES: 4000, SG: 2,0; MV: 0,6329, AP: 90,0, DETEC: DTGSKBr

### ATIVIDADE ANTIVIRAL DAS FRAÇÕES OBTIDAS DE **MxAq**

Tendo em vista a sensibilidade de três dos quatro vírus testados frente à **MxAq**, resolveu-se proceder a um estudo mais aprofundado desta fração.

Uma solução aquosa de **MxAq** foi adicionada de etanol, na proporção 1:1, visando a precipitação das macromoléculas (precipitado; **MxAq/PT**) e sua separação das micromoléculas (sobrenadante; **MxAq/SN**). De forma a verificar quais destes metabólitos estariam respondendo pela atividade de **MxAq**. As frações **MxAq/PT** e **MxAq/SN** foram submetidas aos ensaios frente aos quatro vírus.

As **Tabelas 16** e **17** resumem os resultados obtidos dos ensaios de citotoxicidade e antivirais, respectivamente, obtidos para as frações testadas.

**Tabela 16:** Resultados dos ensaios de citotoxicidade para **MxAq/PT** e **MxAq/SN**.

Amostra	Células Vero		Células MDBK	
	CMNT ( $\mu\text{g/ml}$ )	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMNT ( $\mu\text{g/ml}$ )	CC <sub>50</sub> ( $\mu\text{g/ml}$ )
MxAq/PT	100	> 200	500	N/A
MxAq/SN	$\geq 200$	> 200	500	N/A

N/A: Não avaliada

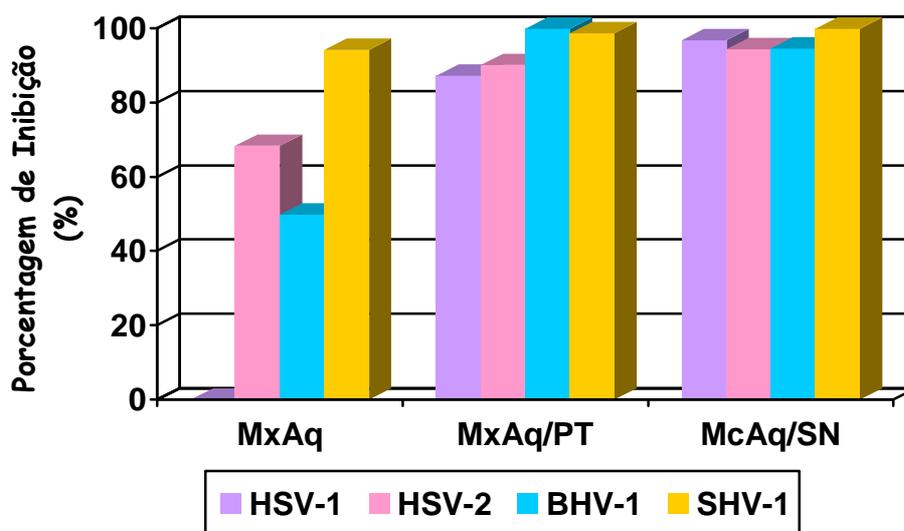
Os resultados obtidos mostraram uma baixa toxicidade para as frações avaliadas, com uma CMNT variando de 100 a 500  $\mu\text{g/ml}$ . Pode-se observar também um comportamento diferenciado quando as duas linhagens celulares são analisadas. Ambas as frações comportam-se de maneira semelhante nas células MDBK, enquanto que as células Vero parecem ser mais sensíveis a **MxAq/PT**.

**Tabela 17:** Resultados dos ensaios antivirais obtidos para **MxAq/PT** e **MxAq/SN** testadas nas respectivas concentração máxima não-tóxica (CMNT).

Amostra	HSV-1		HSV-2		BHV-1		SHV-1	
	IIV	PI (%)						
MxAq/PT	0,89	87,1	1,00	90,0	2,76	99,8	1,89	98,7
MxAq/SN	1,50	96,8	1,25	94,4	1,26	94,5	2,62	99,8

De posse dos resultados dos ensaios antivirais verifica-se que à medida que se caminha no sentido da fração mais purificada, ocorre um aumento da atividade (**Figura 34**).

Para o HSV-1 observamos que a atividade antiviral aumenta em mais de 80% com o fracionamento de **MxAq**. O fato de **MxAq** não ter qualquer efeito sobre este vírus pode estar relacionado à interação existente entre os macro e micrometabólitos de **MxAq/PT** e **MxAq/SN**, respectivamente, o que impediria a aproximação dessas moléculas ao sítio ativo do vírus.



**Figura 34:** Atividade antiviral de **MxAq**, **MxAq/PT** e **MxAq/SN** frente aos quatro vírus testados, em porcentagem de inibição (PI)

Em relação ao HSV-2, também observamos um aumento significativo da atividade antiviral, porém em menor magnitude do que a observada para o HSV-1. Ambas as frações realizaram uma forte inibição do vírus, entretanto **MxAq/PT** apresentou uma atividade bastante semelhante a **MxAq/SN** com apenas metade de sua concentração.

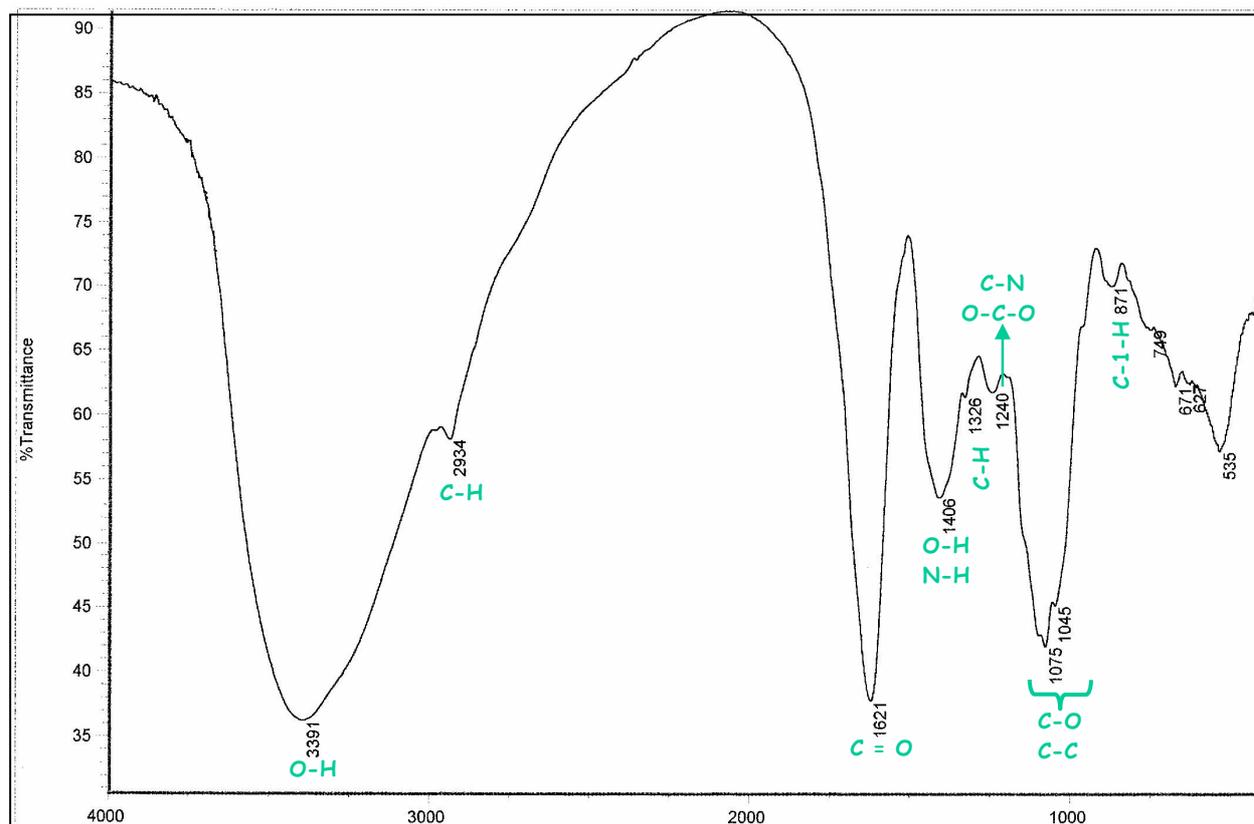
Para os vírus de origem animal, a maior potencialização da atividade com o fracionamento está relacionada ao BHV-1, em que se pode observar um aumento da atividade de aproximadamente 50% quando se compara com a fração mãe (**MxAq**). Apesar de BHV-1 e SHV-1 pertencerem ao mesmo gênero, verifica-se um comportamento antagônico desses vírus em relação às frações. Enquanto o BHV-1 apresenta-se mais sensível às macromoléculas presentes em **MxAq/PT**, a maior sensibilidade do SHV-1 está relacionada às micromoléculas de **MxAq/SN**. Entretanto, ambas as frações foram capazes de inibir de maneira eficaz a infecciosidade promovida por esses vírus, com uma inibição superior a 90%.

### Composição química de MxAq/PT e MxAq/SN

O perfil químico de MxAq/PT foi estabelecido com base no espectro de IV, enquanto que MxAq/SN foi avaliada segundo espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e IV. Por problemas de solubilidade da amostra e sensibilidade do aparelho, não foi possível obter os espectros de RMN de MxAq/PT.

#### 1. MxAq/PT

Analisando-se o espectro de IV de MxAq/PT (Espectro 47) verificamos um perfil bastante semelhante ao obtido para MxIn, entretanto o espectro do primeiro encontra-se melhor resolvido devido à maior purificação da fração. Os dados do espectro de IV, aliados ao princípio da precipitação visando a separação dos macro e micrometabólitos, sugerem a presença majoritária de polissacarídeos em MxAq/PT.



**Espectro 47:** Espectro de IV de MxAq/PT. Parâmetros: Pastilha de KBr, NS: 16, RES: 4000, SG: 2,0; MV: 0,6329, AP: 90,0, DETEC: DTGSKBr

O espectro de IV apresentou absorções em  $1621\text{ cm}^{-1}$ ,  $1406\text{ cm}^{-1}$  e  $1240\text{ cm}^{-1}$ , características de polissacarídeos, sendo atribuídas, respectivamente, à deformação axial da ligação C=O, à deformação angular no plano de O-H e à vibração da ligação acetal (HUANG *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2007). A absorção entre  $3391\text{ cm}^{-1}$  é atribuída à deformação axial da ligação O-H, em ligação de hidrogênio intra e intermolecular e em  $2934\text{ cm}^{-1}$  observa-se a deformação axial simétrica e assimétrica da ligação C-H. A banda em  $1326\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuída à deformação angular no plano de C-H (FIGUEIRÓ *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2007; CHARLES *et al.*, 2008).

As absorções entre  $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  referem-se a vibrações de deformação axial das ligações C-O e C-C da hexopiranosose, sendo as bandas em  $1075\text{ cm}^{-1}$  e  $1045\text{ cm}^{-1}$  atribuídas ao estiramento da ligação C-O (FIGUEIRÓ *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2007; CHARLES *et al.*, 2008;).

Apesar do maior grau de purificação em relação a **MxIN**, o conteúdo protéico de **MxAq/PT** ainda é elevado, o que é corroborado pelas absorções intensas em  $1621\text{ cm}^{-1}$ ,  $1406\text{ cm}^{-1}$  e em  $1240\text{ cm}^{-1}$ , que em caso de proteínas são atribuídas respectivamente às deformações axiais de C=O (Banda de amida I), angulares de N-H (Banda de amida II) e axiais de C-N (Banda II de amida) (CUNHA *et al.*, 2007; CHARLES *et al.*, 2008).

A sobreposição de absorções na região de ligação C-H de anomérico ( $950 - 750\text{ cm}^{-1}$ ) torna esta parte do espectro complexa. Entretanto, as bandas podem ser únicas para cada açúcar que constitui o polissacarídeo, fornecendo informações adicionais aos dados fornecidos pelas absorções entre  $1200\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$  (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000).

Segundo dados da literatura, as absorções em  $871\text{ cm}^{-1}$  e  $1075\text{ cm}^{-1}$  caracterizam moléculas de galactana (KAČURÁKOVÁ *et al.*, 2000; HANG *et al.*, 2007), sugerindo que um dos carboidratos constituintes do polissacarídeo de **MxAq/PT** seja a galactose.

As galactomananas são polissacarídeos constituídos de uma cadeia polimérica de resíduos de  $\beta$ -D-manopiranosose em ligação do tipo (1 $\rightarrow$ 4), substituídos na posição O-6 por unidades de  $\alpha$ -D-galactopiranosose. São produzidas comercialmente em larga escala, com aplicabilidade nas indústrias de alimentos, tintas, cosméticos e fármacos, devido às suas propriedades reológicas (GANTER *et al.*, 1997).

As galactomananas representam o único polissacarídeo já relatado para o gênero *Mimosa*. Galactomananas foram isolados de *Mimosa scabrella* (Mimosaceae), comumente conhecida como bracatinga, uma árvore leguminosa muito abundante no sul do Brasil (GANTER *et al.*, 1997).

Segundo FIGUEIRÓ *et al.*, (2004), o espectro de IV das galactomananas possui duas bandas de absorção características em  $812\text{ cm}^{-1}$  e  $871\text{ cm}^{-1}$ . Como visto anteriormente, a segunda absorção refere-se à galactana, sendo a primeira atribuída à manana.

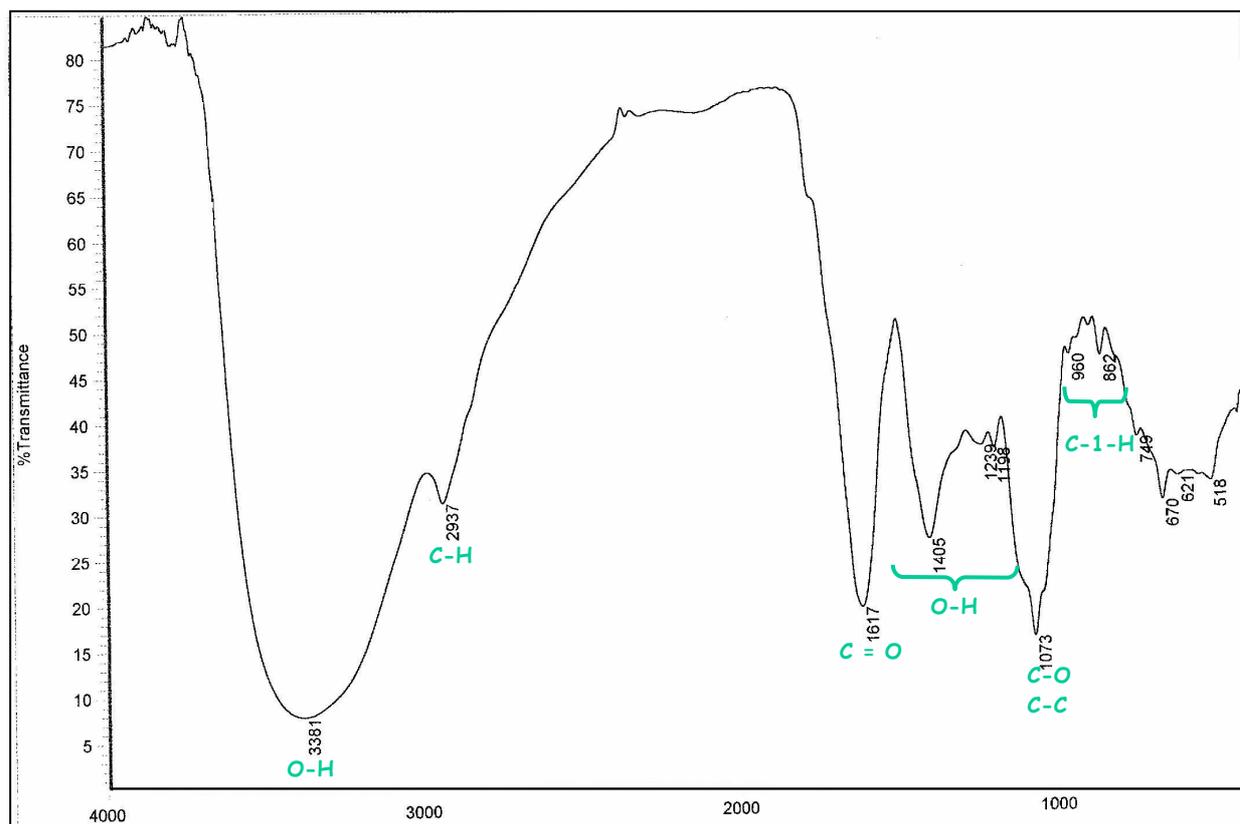
Analisando-se o espectro de IV de **MxAq/PT** não é possível observar a absorção em  $812\text{ cm}^{-1}$ . Esta poderia estar presente em sobreposição com outra banda, uma vez que não se trata de um polissacarídeo puro.

De posse desses dados, pode-se sugerir que **MxAq/PT** apresenta majoritariamente polissacarídeo na sua composição e que a galactose seja um dos carboidratos que constituem a estrutura desta molécula. Entretanto a elucidação estrutural completa deste polissacarídeo depende de novas etapas de purificação e de dados espectroscópicos e espectrométricos complementares.

## 2. **MxAq/SN**

O espectro de IV de **MxAq/SN** (Espectro 48) apresenta um perfil bastante semelhante aos espectros obtidos para **MxIn** e **MxAq/PT**.

As absorções em  $1627\text{ cm}^{-1}$ ,  $1405\text{ cm}^{-1}$  e  $1239\text{ cm}^{-1}$  também sugerem a presença de carboidratos em **MxAq/SN**. As bandas em  $3381\text{ cm}^{-1}$  e  $2937\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas, respectivamente, à um grupo O-H em ligação de hidrogênio e ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H. A menor intensidade da banda em  $1617\text{ cm}^{-1}$  (C=O) sugere um menor conteúdo protéico em relação às duas frações anteriores. Assim como para **MxIn** e **MxAq/PT**, as absorções entre  $1200\text{-}800\text{ cm}^{-1}$  referem-se a vibrações das ligações C-O e C-C do anel, enquanto que na região entre  $950\text{ cm}^{-1}$  e  $750\text{ cm}^{-1}$  são observadas as vibrações C-H do carbono anomérico (FIGUEIRÓ *et al.*, 2004; CUNHA *et al.*, 2007; CHARLES *et al.*, 2008).

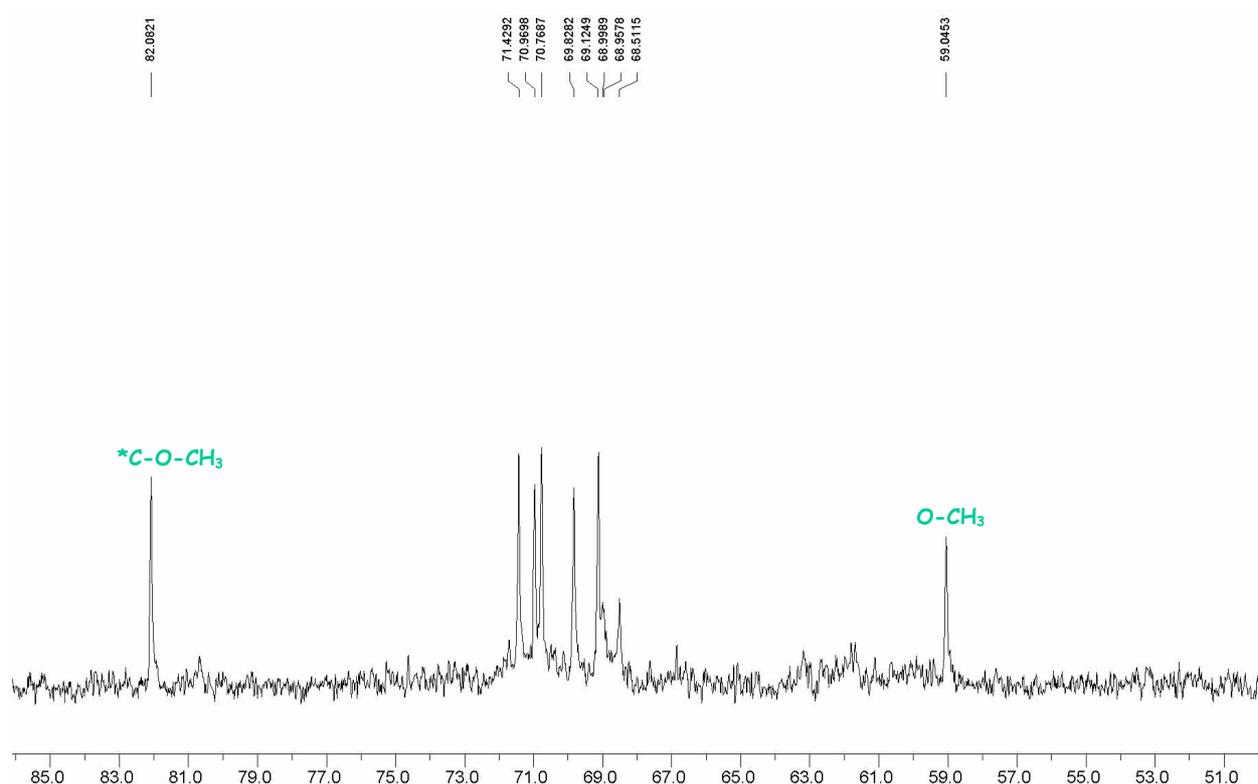


**Espectro 48:** Espectro de IV de **MxAq/SN**. Parâmetros: Filme de Nujol, NS: 16, RES: 4000, SG: 2,0; MV: 0,6329, AP: 90,0, DETEC: DTGSKBr

Apesar do espectro de IV de **MxAq/SN** apresentar absorções semelhantes aos espectros de **MxIn** e **MxAq/PT** (provável presença de polissacarídeos), os dados obtidos com base no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para esta fração indicam a presença majoritária de um carboidrato de baixo peso molecular, o que é coerente com a técnica utilizada para o fracionamento de **MxAq**.

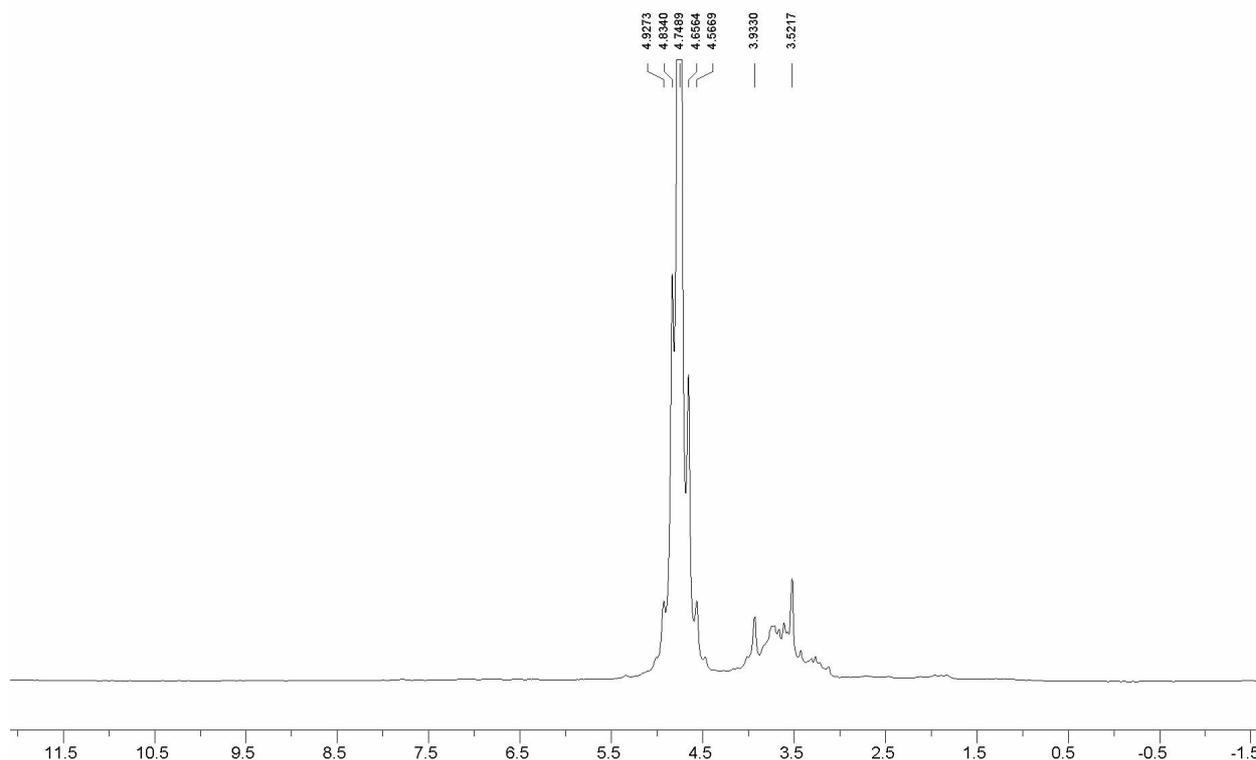
No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (**Espectro 49**) para **MxAq/SN** podem ser observados sete sinais. A ausência de sinal referente a carbono anomérico e o padrão dos sinais observados sugerem a presença de um ciclitol em **MxAq/SN**.

O sinal de carbono mais blindado do espectro é atribuído a uma metoxila (59,04 ppm), enquanto que o sinal mais desprotegido representa o sítio de metilação (82,08 ppm). Os demais sinais (71,42; 70,96; 70,76; 69,82 e 69,12 ppm) são atribuídos aos cinco carbonos restantes que formam o anel de seis membros do ciclitol (OBENDORF *et al.*, 2005; JAIN *et al.*, 2007).



**Espectro 49:** Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **MxAq/SN** (50 MHz). Parâmetros: NS 15000, SWH 14992 Hz, TD 30016, REF TMS, TEMP 27°C.

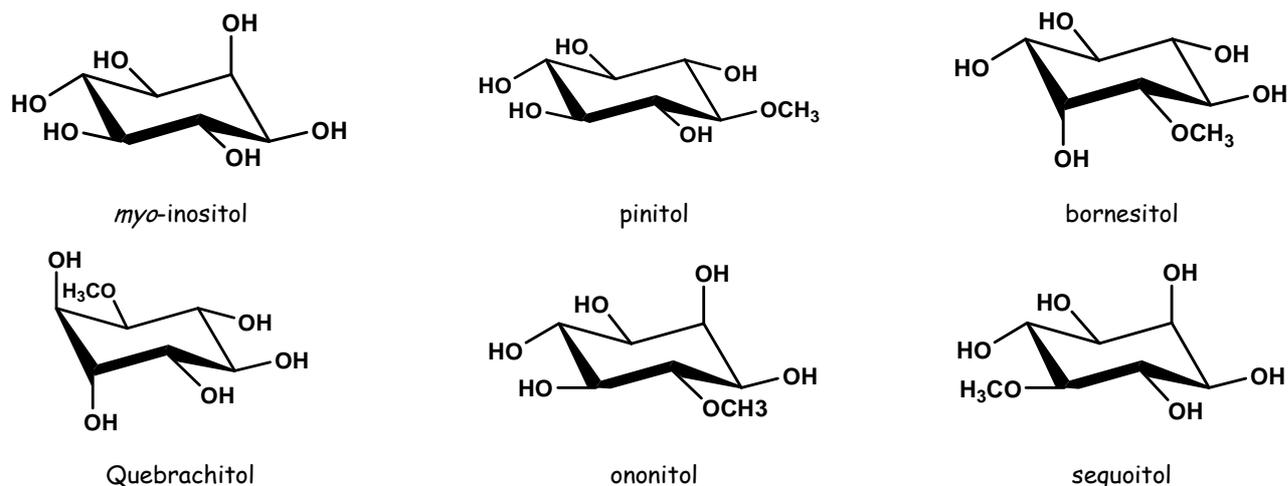
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**Espectro 50**), apenas dois sinais (3,41 e 3,82 ppm) podem ser observados de maneira nítida, uma vez que os demais se encontram em sobreposição com os sinais das hidroxilas alcoólicas da molécula, impossibilitando a identificação de suas multiplicidades. O fato do sinal mais desprotegido do espectro (3,82 ppm) aparecer como um simpleto largo sugere a existência de uma pequena constante de acoplamento, como a observada em sistemas do tipo  $\text{H}_{\text{eq}}\text{-H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{eq}}$  e  $\text{H}_{\text{ax}}\text{-H}_{\text{eq}}\text{-H}_{\text{ax}}$ . Entretanto, a baixa resolução do espectro impossibilita afirmar sem ambigüidade a presença de um desses sistemas. Em 3,41 ppm encontra-se o simpleto atribuído aos hidrogênios da metoxila, enquanto que o sinal em 3,88 ppm é atribuído ao hidrogênio do sítio de metoxilação (OBENDORF *et al.*, 2005; JAIN *et al.*, 2007).



**Espectro 50:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxAq/SN** (200 MHz). Parâmetros: NS 64, SWH 3000 Hz, TD 16000, REF TMS, TEMP 27°C.

Carboidratos de baixo peso molecular, assim como polissacarídeos, já foram isolados de *Mimosa scabrella*. Dentre os metabólitos solúveis em etanol, foram identificados oligossacarídeos (ajugose, verbascose, stachiose, rafinose e sacarose), oligossacarídeos derivados de ciclitóis (*O*- $\alpha$ -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\alpha$ -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-*O*- $\alpha$ -D-galactopiranosil (1 $\rightarrow$ 2)-D-3-metil-*chiro*-inositol), monossacarídeos (glucose, galactose, frutose), polióis (glicerol, eritritol, arabinitol, manitol, galactiol e sorbitol) e ciclitóis (*myo*-inositol e pinitol) (GANTER *et al.*, 1991).

Os dados obtidos nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para **MxAq/SN** são insuficientes para a determinação estrutural do ciclitol dessa fração, entretanto, a comparação com dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  da literatura permite excluir o *myo*-inositol, pinitol, bornesitol, sequoitol, ononitol e quebrachitol como os prováveis ciclitóis presentes em *M. xanthocentra* (Figura 35) (BOLIN *et al.*, 1984; MISRA & SIDDIQI, 2004; SURESHAN *et al.*, 2004).



**Figura 35:** Estruturas do *myo*-inositol e demais ciclitolis monometoxilados

De posse desses dados, sugere-se que o principal constituinte de **MxAq/SN** seja um metoxi-ciclitol. Para elucidação estrutural completa são necessários dados espectroscópicos e espectrométricos complementares do derivado peracetilado da amostra.

### Carboidratos com atividade antiviral

A maioria dos relatos sobre atividade antiviral de polissacarídeos está restrita ao grupo dos polissacarídeos sulfatados, principalmente os isolados de algas marinhas. Como regra geral, para estas substâncias, a atividade antiviral é atribuída a uma estrutura polimérica e à presença de uma carga elétrica negativa, que na maioria das vezes é fornecida por grupos sulfatos (MASTROMARINO *et al.*, 1997). O mecanismo de ação desses polissacarídeos aniônicos está relacionado à inibição de uma etapa da replicação subsequente à internalização viral ou à inibição da adsorção do vírus à célula hospedeira (LIU *et al.*, 2004).

Em um estudo realizado por CHATTOPADHYAY *et al.* (2007) verificou-se uma potente atividade anti-HSV-1 e anti-HSV-2 (cepas resistentes ao aciclovir) do extrato aquoso da alga *Grateloupia indica*. A atividade antiviral desta espécie é atribuída a uma galactana sulfatada. Este polissacarídeo é constituído de resíduos de galactopiranosose em ligação  $\alpha$ - (1→4) e  $\alpha$ -(1→3). Os grupos sulfatos, quando presentes, podem estar localizados nos carbonos 2, 4 ou 6, sendo essenciais para a atividade antiviral.

As galactanas sulfatadas são os principais polissacarídeos extracelulares produzidos por algas vermelhas, podendo ser do tipo carragenanas e agaranas. Ambas são formadas por um esqueleto repetitivo de resíduos de  $\beta$ -galactopiranosil ligadas (1 $\rightarrow$ 3) alternado com resíduos de  $\alpha$ -galactopiranosil ligadas (1 $\rightarrow$ 4), sendo o primeiro pertencente à série D e o segundo à série L. Tendo em vista o seu elevado potencial antiviral frente ao HSV-2, as carragenanas isoladas da alga *Meristiella gelidium* são consideradas as mais ativas dentre os polissacarídeos sulfatados obtidos de algas vermelhas. Para este mesmo carboidrato foi verificada uma atividade frente ao vírus Dengue tipo 2 (F-TISCHER *et al.*, 2006).

São poucos os relatos encontrados na literatura a respeito de polissacarídeos neutros com atividade antiviral.

De *Polygonatum cyrtonema* (Liliaceae), uma erva usada na medicina tradicional chinesa, foi isolada uma frutana com atividade anti-HSV-2. A frutana em questão é um polissacarídeo neutro com ramificações constituídas por dois resíduos de  $\beta$ -D-frutofuranosil ligados (2 $\rightarrow$ 6) a cada três resíduos de  $\beta$ -D-frutofuranose em ligação (2 $\rightarrow$ 1), que formam o esqueleto principal. Apesar da atividade atribuída à frutana natural, a sulfatação deste carboidrato aumenta em dez vezes a sua atividade, o que mostra a importância desses grupos negativamente carregados para a atividade antiviral de polissacarídeos.

Para os carboidratos de baixo peso-molecular, em especial os ciclitóis, as atividades só são observadas em substâncias sintéticas cujo precursor é uma molécula pertencente a esta classe (EKBLAD *et al.*, 2006; SHASTINA *et al.*, 2003). Tendo em vista a extensão dessas modificações estruturais, a atividade destas substâncias foge ao escopo deste trabalho e não justifica a provável atividade antiviral do ciclitol presente em *M. xanthocentra*.

## ATIVIDADE ANTIVIRAL DE ISOVITEXINA-2"-O-RAMNOPIRANOSÍDEO

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos é amplamente distribuída no reino vegetal (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003), sendo encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores, chás e vinhos (NIJVELDT *et al.*, 2001).

Tendo em vista o amplo espectro de atividades atribuído a estes compostos (antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, etc.) e o grande número de relatos existente na literatura acerca de sua atividade antiviral, resolveu-se avaliar o efeito de isovitexina-2"-O-ramnopiranosídeo (**MxF1**), o flavonóide majoritário de *M. xanthocentra*, frente aos vírus Herpes simplex dos tipos 1 e 2.

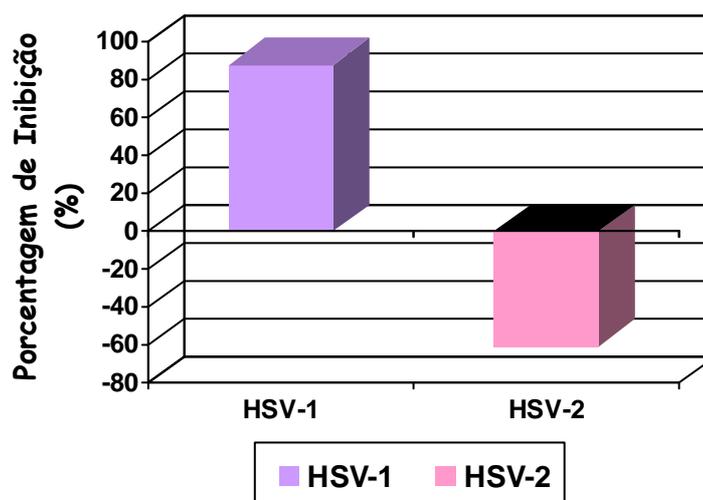
Na **Tabela 18** podem ser encontrados os resultados dos ensaios antivirais obtidos para **MxF1** frente ao HSV-1 e ao HSV-2.

**Tabela 18:** Resultados gerais dos ensaios de citotoxicidade e antivirais obtidos para **MxF1** testado na respectiva concentração máxima não-tóxica (CMNT).

Vírus	Célula	CMNT (µg/ml)	CC <sub>50</sub> (µg/ml)	IIV	PI (%)
HSV-1	Vero	≥ 200	> 200	0,90	87,4
HSV-2	Vero	≥ 200	> 200	-0,40	-60,2

Os resultados obtidos indicam um efeito antagônico de **MxF1** em relação aos dois vírus (**Figura 36**), ou seja, enquanto para o HSV-1 é observada uma inibição superior a 80%, o HSV-2 parece ser estimulado pelo flavonóide, uma vez que a infecciosidade viral aumenta de 60,2% em relação ao controle não tratado. Não foi observado qualquer efeito citotóxico para **MxF1** na concentração utilizada.

Este é o primeiro relato de atividade antiviral atribuída a este flavonóide, e representa também o primeiro relato de atividade anti-herpética para uma flavona glicosilada.

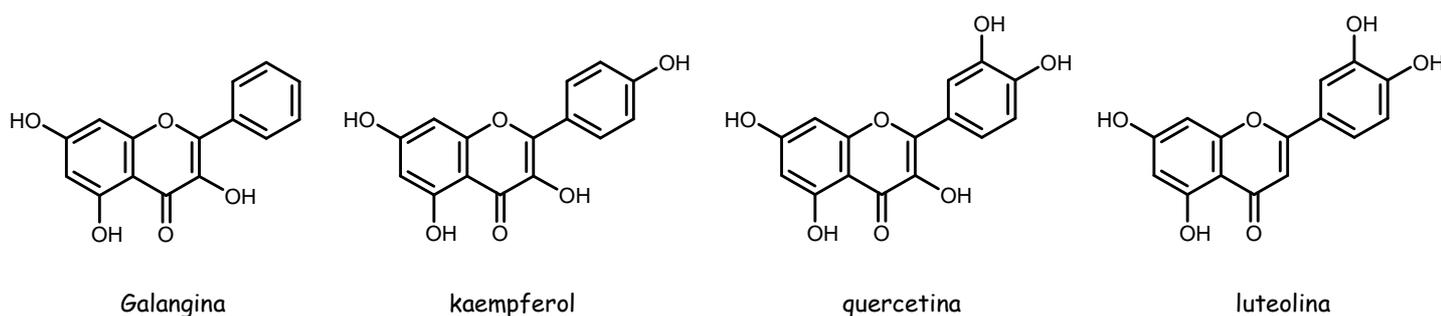


**Figura 36:** Atividade antiviral de **MxF1** frente ao HSV-1 e HSV-2, em porcentagem de inibição (PI)

#### Atividade de flavonóides frente à Vírus Herpes

A maioria dos estudos sobre a atividade antiviral de flavonóides restringe-se ao grupo das flavonas de maior ocorrência, flavonóis, chalconas e seus análogos sintéticos (ZUANAZZI & MONTANHA, 2003), sendo os flavonóis os mais amplamente estudados.

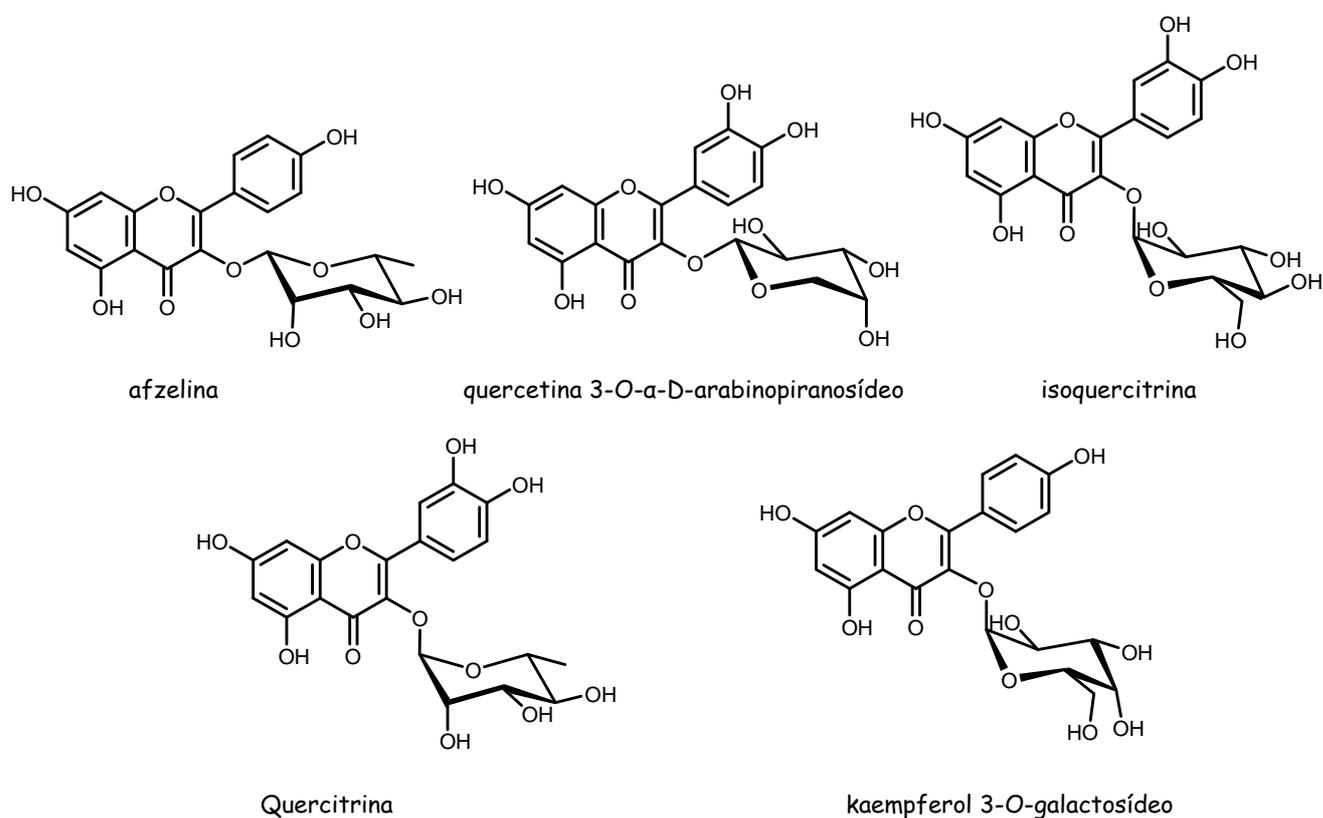
A atividade anti-HSV-1 *in vitro* dos principais flavonóides isolados do bálsamo de própolis foi investigada por AMOROS *et al.* (1992). Os flavonóis galangina, kaempferol e quercetina mostraram-se ativos frente ao HSV-1, enquanto apenas uma flavona, a luteolina, apresentou tal atividade. Uma análise da relação estrutura-atividade para esses compostos mostrou que os flavonóis parecem ser mais ativos que as flavonas. No entanto, a atividade dos flavonóis decresce com o aumento do número de hidroxilas (galangina > kaempferol > quercetina).



**Figura 37:** Estruturas dos flavonóides do bálsamo de própolis com atividade anti-HSV

Os glicosídeos de flavonol (Figura 38) também são capazes de reduzir a infecciosidade dos vírus herpes, como a afzelina e quercetina 3-O- $\alpha$ -D-arabinopiranosídeo (atividade anti-HSV-1, cepas resistentes ao Aciclovir), isolados das folhas do abacateiro (*Persea americana*; Lauraceae) (ALMEIDA *et al.*, 1998), a isoquercitrina, responsável pela atividade anti-HSV-1 de *Waldsteinia fragarioides* (Michx) Tratt. (Rosaceae) (ABOU-KARAM *et al.*, 1992) e o kaempferol-3-O-galactosídeo, responsável pela atividade anti-herpética de *Linum capitatum* Kit (Linaceae) (ILIE *et al.*, 2004). Para a quercitrina e sua aglicona quercetina foi verificada a capacidade de reduzir a infecciosidade do HSV-1 e vírus pseudorraiva (Vírus herpes Suíno tipo 1) (MUCSI *et al.*, 1985).

A quercetina é o flavonóide mais amplamente distribuído entre os alimentos e talvez o mais estudado. O mecanismo de sua atividade antiviral é principalmente virucida, sendo também capaz de atuar por um mecanismo de ação intracelular, inibindo a replicação viral (KAUL *et al.*, 1985). Esta atividade está relacionada à sua capacidade de se ligar a proteínas do capsídeo viral e a polimerases, interferindo na síntese de ácido nucléico viral ou provocando danos ao DNA (KAUL *et al.*, 1985; FORMICA *et al.*, 1995).



**Figura 38:** Estruturas dos glicosídeos de flavonol com atividade em vírus herpes

A maioria dos relatos sobre atividade anti-herpética de flavonas está relacionada às flavonas metoxiladas, como a 5,6,7-trimetoxiflavona (TMF), isolada de *Callicarpa japonica* (Verbenaceae) (HAYASHI *et al.*, 1997), a pectolinarigenina, isolada de *Hebe cupressoide* (Scrophulariaceae) (PERRY *et al.*, 1994) e a acacetina, isolada de *Scoparia dulcis* (Scrophulariaceae) (HAYASHI *et al.*, 1993). As furanoflavonas (ovalifolina e o pongol metil éter) (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 2005) assim como as bisflavonas (robustaflavona, amentoflavona e ginkgetina) também são capazes de reduzir a infecciosidade dos vírus herpes (HAYASHI *et al.*, 1992; LIN *et al.*, 1998). Não há relatos sobre a atividade anti-herpética de glicosídeos de flavona.

A ginkgetina, originalmente isolada de *Ginkgo biloba* (Ginkgoaceae), foi obtida como o componente ativo de *Cephalotaxus drupacea* Siebold e Zuccarini (Cephalotaxaceae), sendo capaz de atuar frente ao HSV-1 e HSV-2 através, principalmente, da supressão da síntese de proteínas virais e da replicação viral e, mais fracamente, através de um mecanismo de ação virucida (HAYASHI *et al.*, 1992). Robustaflavona e amentoflavona foram isolados de *Rhus seccedaneae* L. (Anacardiaceae) e *Garcinia multiflora* Champ. (Guttiferae) como parte de um programa para buscar novos agentes antivirais de fontes naturais. Robustaflavona foi a mais ativa, inibindo tanto o HSV-1 quanto o HSV-2, quando comparados ao controle positivo (Aciclovir). A amentoflavona mostrou uma fraca atividade frente ao HSV-1, não apresentando nenhum efeito sobre HSV-2 (LIN *et al.*, 1998).

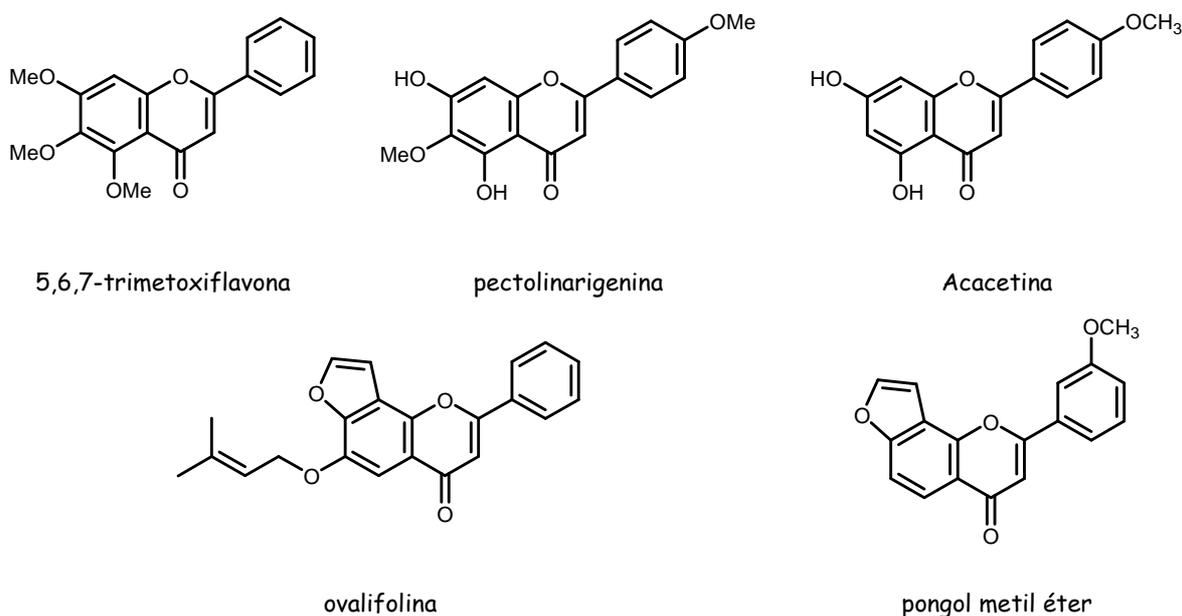
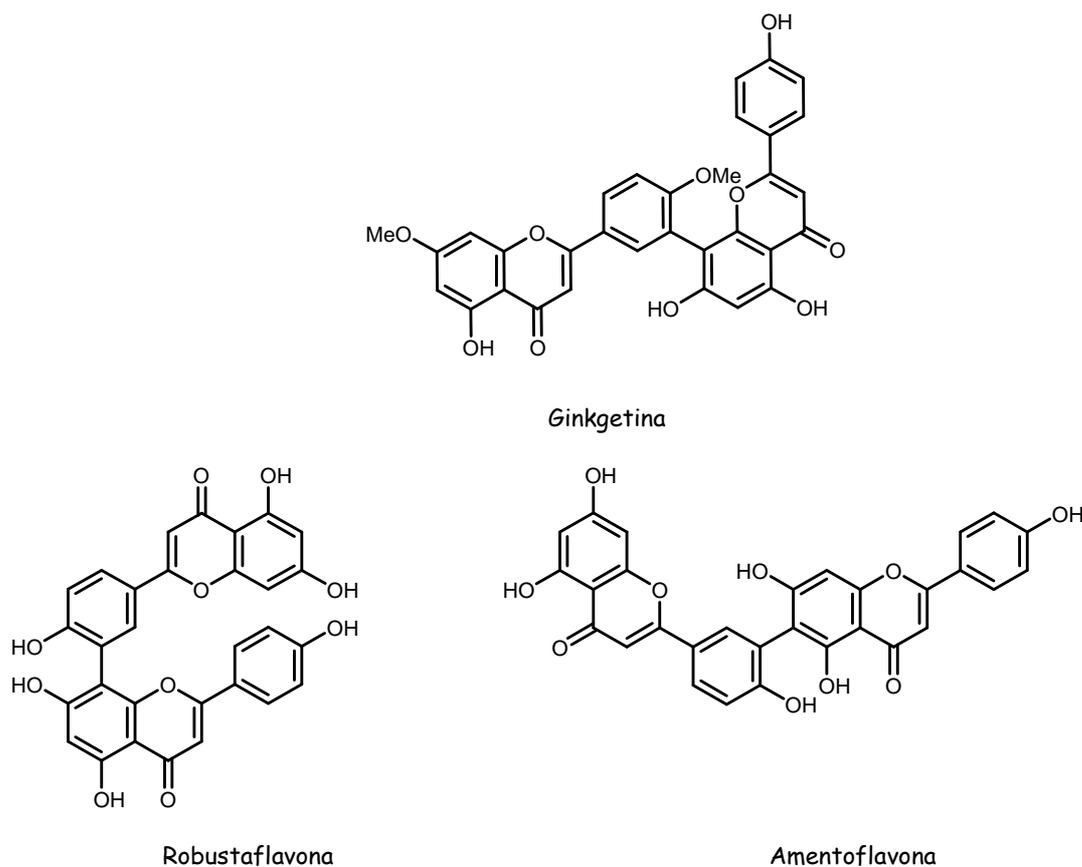


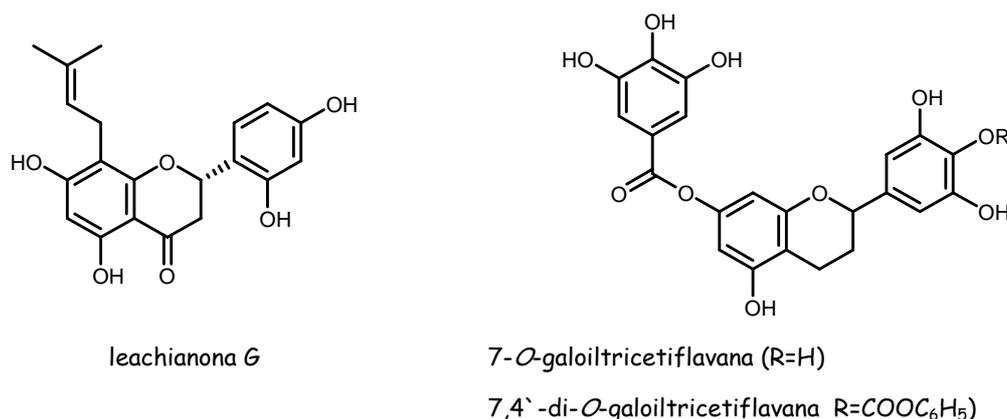
Figura 39: Estruturas das metoxiflavonas e furanoflavonas com atividade anti-HSV



**Figura 40:** Estruturas das bisflavonas com atividade anti-HSV

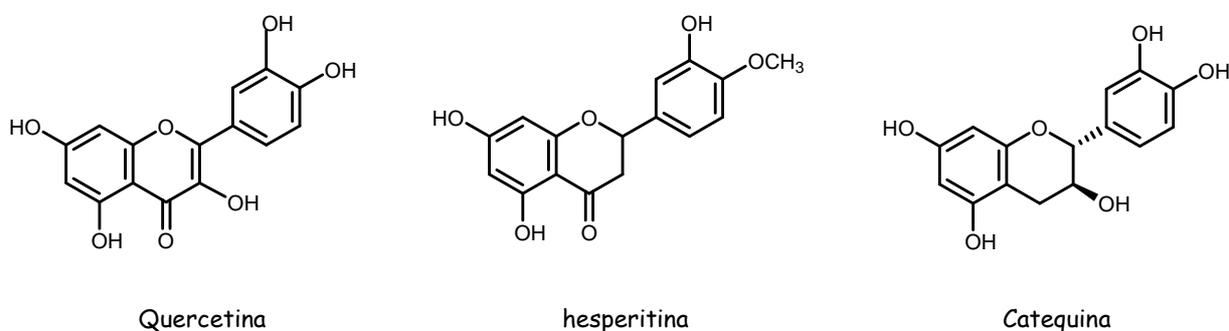
Das cascas de raízes da amoreira (*Morus alba* L., Moraceae), foi isolado um flavonóide com atividade anti-herpética, a Leachianona G. Trata-se de uma flavanona prenilada que, quando comparada com o aciclovir (Controle positivo), é capaz de atuar de forma eficaz sobre o HSV-1 (DU *et al.*, 2003).

Às flavanas e flavanóis - flavonóides que perderam a carbonila cetônica durante sua biossíntese - também é atribuída atividade anti-herpética. 7-*O*-galoiltricetilflavana e 7,4'-di-*O*-galoiltricetilflavana, duas flavanas isoladas de *Pithecellobium clypearia* (Fabaceae alt. Leguminosae), são capazes de atuar frente ao HSV-1 (LI *et al.*, 2006). *P. clypearia* é uma erva usada na medicina popular chinesa para o tratamento de infecções no trato respiratório (LI *et al.*, 2006).



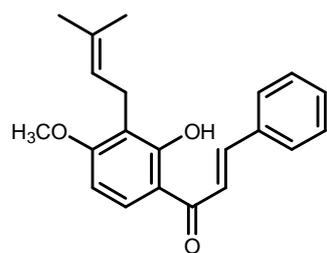
**Figura 41:** Estruturas das flavanonas e flavanas com atividade anti-HSV

A flavanona hesperitina e o flavanol catequina são flavonóides também encontrados nos alimentos. Estudos de mecanismo de ação para essas substâncias revelaram que enquanto a catequina é capaz de reduzir a infecciosidade do HSV-1 através de uma interação irreversível com o vírus (efeito virucida), a hesperitina atua através de um mecanismo de ação intracelular, inibindo a replicação viral (KAUL *et al.*, 1985).

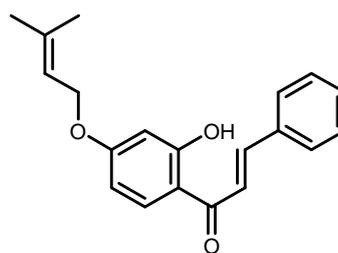


**Figura 42:** Estruturas da quercetina, hesperitina e catequina

Não menos importante, porém mais rara, é a atividade antiviral das chalconas, o precursor biossintético dos demais tipos de flavonóides. Em sua dissertação de mestrado, GONÇALVES (1999) demonstrou a atividade anti-HSV-1-ACVr para as chalconas derricina e derricidina, isoladas de *Derris sericea* (Leguminosae). Em relação ao mecanismo de ação, praticamente toda a atividade antiviral apresentada pela derricidina foi intracelular, não apresentando nenhuma atividade extracelular. Por outro lado, o mecanismo de ação da derricina foi principalmente virucida.



derricina



Derricidina

**Figura 43:** Estruturas das chalconas com atividade anti-HSV

## SINERGISMO DE FRAÇÕES DE MxEA FRENTE À HSV-1 E HSV-2

A grande maioria dos fitoterápicos disponíveis no mercado é encontrada sob a forma de extratos de plantas ou suas combinações. Segundo os fitoterapeutas, as interações sinérgicas existentes entre os componentes individuais dessas preparações seriam fundamentais para a sua eficácia, o que seria corroborado pelo fato dos supostos princípios ativos estarem presentes em uma concentração muito baixa para exercer qualquer efeito terapêutico (WILLIAMSON *et al.*, 2001).

Tendo em vista a atividade antiviral observada para o extrato de *M. xanthocentra* e suas frações, resolveu-se avaliar os potenciais efeitos benéficos que surgem da combinação das substâncias encontradas nas diferentes frações. Adicionalmente às razões acima apresentadas, esta análise é também justificada pelo fato de que a planta é consumida pelos cervídeos como um todo, sendo plausível supor que as diferentes classes químicas de metabólitos presentes na planta possam atuar em conjunto nos efeitos antivirais já observados para MxEA e suas frações.

Para este estudo foram realizadas combinações binárias das frações insolúvel (MxIn), butanólica (MxBu), acetato de etila (MxAc) e aquosa (MxAq), utilizando-se a proporção em que as mesmas se encontram presentes no extrato. Cada combinação teve sua citotoxicidade avaliada e os ensaios antivirais foram realizados com as combinações em suas respectivas CMNT.

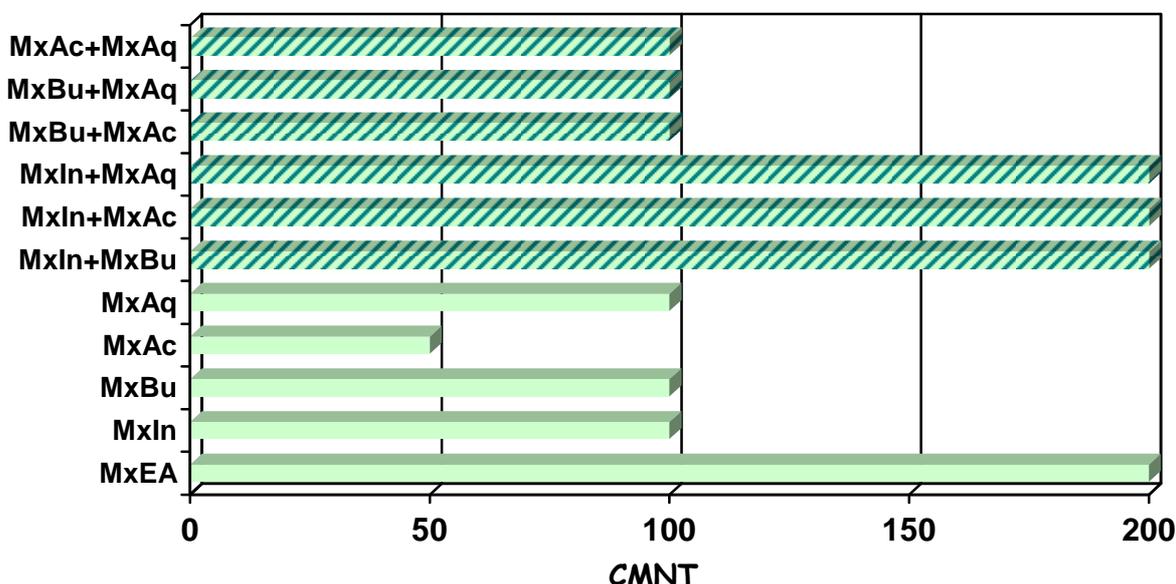
Na Tabela 19 podem ser encontrados os resultados dos ensaios de citotoxicidade e antivirais para as seis combinações das frações frente ao HSV-1 e HSV-2.

**Tabela 19:** Resultados gerais dos ensaios de citotoxicidade e antivirais obtidos para as seis combinações de **MxIn**, **MxBu**, **MxAc** e **MxAq**, testado nas respectivas CMNT

Amostra	CMNT	CC <sub>50</sub>	HSV-1		HSV-2	
			IIV	PI (%)	IIV	PI (%)
MxIn	100	> 200	<b>0,75</b>	<b>82,2</b>	1,65	97,8
MxBu	100	> 200	0	0	0,25	43,8
MxAc	50	200	0	0	0	0
MxAq	100	> 200	0	0	0,50	68,4
MxIn + MxBu	≥ 200	> 200	0,20	36,90	<b>2,00</b>	<b>99,0</b>
MxIn + MxAc	≥ 200	> 200	0	0	1,35	95,5
MxIn + MxAq	≥ 200	> 200	0,10	20,5	<b>2,00</b>	<b>99,0</b>
MxBu + MxAc	≥ 100	> 200	<b>-0,15</b>	<b>-29,5</b>	<b>1,35</b>	<b>95,5</b>
MxBu + MxAq	≥ 100	> 200	0	0	0,5	68,4
MxAc + MxAq	≥ 100	> 200	0	0	<b>1,0</b>	<b>90,0</b>

Os resultados obtidos mostraram uma baixa toxicidade para as combinações avaliadas, com os valores de CMNT variando de 100 a 200 µg/ml. Exceto por **MxBu + MxAq**, cuja CMNT manteve-se a mesma de suas frações isoladas, as demais combinações apresentaram uma redução de suas citotoxicidades quando comparadas a pelo menos um de seus constituintes isolados, destacando-se **MxIn + MxAc**, cuja CMNT apresentou um aumento de 150% em relação à fração mais tóxica (**MxAc**; CMNT = 50 µg/ml).

A redução do efeito tóxico, além do aumento de uma determinada atividade biológica, é um dos benefícios que podem surgir da interação entre uma ou mais substâncias. Este efeito é observado através da combinação de **MxIn**, **MxBu**, **MxAc** e **MxAq**, uma vez que cinco das seis combinações mostraram-se menos citotóxicas quando comparadas a pelo menos um de seus constituintes isolados, sendo que três combinações atingiram valores de CMNT semelhantes à **MxEA** (200 µg/ml) (**Figura 44**).



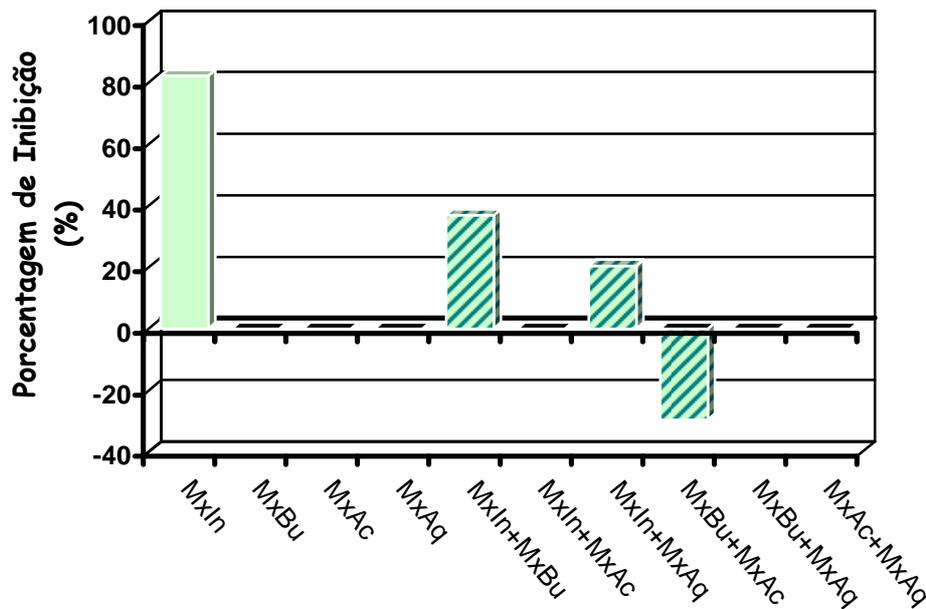
**Figura 44:** Citotoxicidade de **MxEA**, suas frações e combinações binárias de frações, em relação à CMNT

Comparando-se os resultados obtidos para **MxIn**, **MxBu**, **MxAc**, **MxAq** e suas combinações binárias frente ao HSV-1 (**Figura 45**), verificamos que, assim como para as frações isoladas, este vírus apresentou-se pouco sensível às combinações obtidas a partir dessas frações, entretanto parece haver interações diferenciadas entre as frações isoladas e as combinações e o vírus.

As combinações **MxIn + MxBu**, **MxIn + MxAq** e **MxIn + MxAc** apresentaram uma atividade antiviral quase nula quando comparadas à **MxIn**, a fração mais ativa frente ao HSV-1. Este comportamento parece estar relacionado à um antagonismo entre as substâncias presentes nessas frações, com destaque para ação antagônica existente entre **MxIn** e **MxAc**, em que se observa uma anulação da inibição viral promovida por **MxIn** (redução da atividade em aproximadamente 82%).

Ao contrário do antagonismo anterior, as frações **MxAc** e **MxBu**, quando combinadas, parecem atuar em sinergismo. Esta ação conjunta, entretanto, ocorre no sentido de estimular a infecciosidade viral, podendo ser observado pelo aumento em 29,5% do título viral quando comparado ao controle não-tratado e às próprias frações isoladas, cujas atividades eram nulas.

Para as combinações **MxBu + MxAq** e **MxAc + MxAq** não foi detectado qualquer efeito sobre o vírus, uma vez que as atividades das combinações permaneceram nulas assim como as frações isoladas.



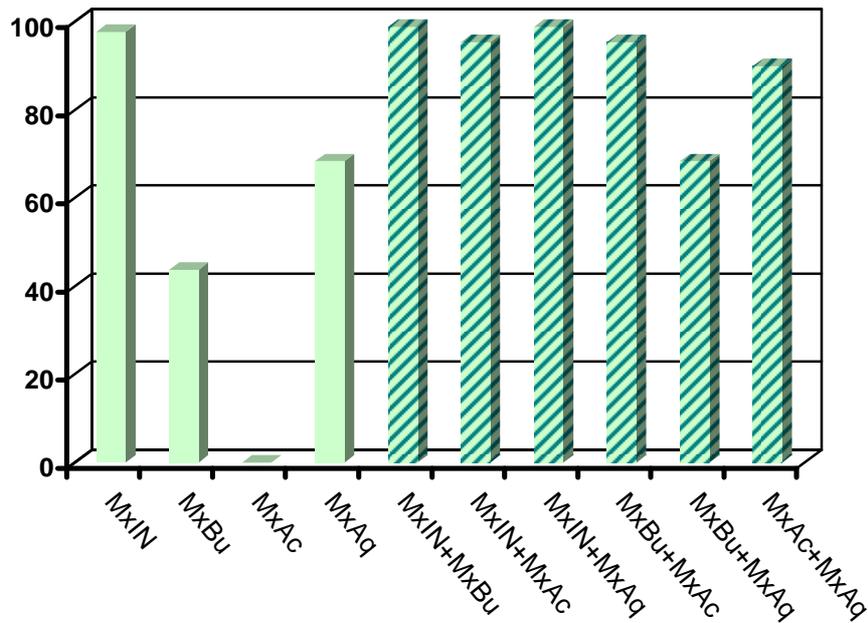
**Figura 45:** Atividade antiviral de **MxIn**, **MxBu**, **MxAc**, **MxAq** e suas combinações binárias frente ao HSV-1, em porcentagem de inibição (PI)

Analisando-se o desempenho das mesmas combinações e frações isoladas em relação ao HSV-2 (**Figura 46**), observamos um comportamento bastante distinto do observado para o primeiro vírus. Todas as combinações mostraram-se ativas frente ao HSV-2, com uma atividade entre moderada e alta.

As frações **MxIn** e **MxAc**, quando combinadas, parecem atuar de maneira antagônica frente ao HSV-2, assim como observado para HSV-1, uma vez que a atividade de **MxIn + MxAc** é inferior à **MxIn**, a fração mais ativa.

As combinações **MxIn+ MxBu** e **MxIn + MxAq** apresentaram uma atividade superior à das frações isoladas, o que pode ser atribuído à um possível sinergismo entre as substâncias presentes nessas frações. Entretanto, como as atividades dessas combinações apresentam valores próximo à soma das atividades das frações isoladas, essa maior inibição da infecciosidade viral pode estar relacionada a um efeito aditivo e não sinérgico. Como as

substâncias presentes nas frações isoladas e nas combinações encontram-se em concentrações diferentes, fica difícil inferir, sem ambigüidade, se o aumento da atividade está relacionada ao sinergismo ou ao efeito aditivo.



**Figura 46:** Atividade antiviral (em Porcentagem de Inibição; PI) de **MxIN**, **MxBu**, **MxAc**, **MxAq** e suas combinações binárias frente ao HSV-2

Para as combinações **MxBu + MxAc** e **MxAc + MxAq** são observados os aumentos mais significativos na atividade antiviral. Nesses casos, a presença de interações sinérgicas entre os componentes químicos de cada fração é claramente detectada, uma vez que a atividade das combinações é muito superior à de suas frações isoladas, mesmo estas últimas estando em concentração superior à primeira. A grande discrepância de valores entre as atividades antivirais de **MxBu**, **MxAq** e suas combinações exclui a existência de efeito aditivo. Ainda em relação à **MxBu + MxAc**, é possível observar um comportamento oposto quando se compara os dois vírus estudados. Ao contrário do que observamos com o HSV-1, esta combinação é capaz de inibir em mais de 90% a infecciosidade promovida pelo HSV-2.

A combinação **MxBu + MxAq** parece não apresentar qualquer efeito sobre HSV-2, uma vez que sua atividade antiviral apresenta o mesmo valor que a fração mais ativa que compõe esta combinação.

De posse dos dados apresentados, é possível comprovar a existência de interações entre as substâncias presentes em **MxEA**, o que poderia ser responsável pelos potenciais efeitos benéficos que surgiriam da ingestão das partes aéreas de *M. xanthocentra* pelos cervídeos, seja pela redução da toxicidade ou pela potencialização da atividade antiviral associada à determinadas substâncias.

A teoria do efeito da combinação de fármacos sugere que apenas substâncias com diferentes mecanismos de ação podem apresentar sinergismo, podendo resultar de bloqueios em seqüência, inibição competitiva ou complementar (AMOROS *et al.*, 1992). Como não se conhece o mecanismo de ação de cada fração, estes experimentos apenas confirmam a possibilidade de interações sinérgicas entre uma ou mais substâncias presentes em **MxEA**. Entretanto, a presença de substâncias de classes químicas diferentes nessas frações reforça a idéia de sinergismo, levando-nos a crer que os carboidratos e flavonóides aí presentes estariam atuando por mecanismos distintos.

### **Sinergismo em produtos naturais**

Sabe-se que compostos fenólicos como os flavonóides, amplamente distribuídos nos alimentos e formulações fitoterápicas, podem potencializar a atividade biológica de outras substâncias por sinergismo ou mecanismos semelhantes (KAMATOU *et al.*, 2006).

Em um estudo sobre a ação antimalárica, *in vitro*, da **artemisinina**, verificou-se que sua atividade era potencializada pelos flavonóides **artemetina** e **casticina** (WILLIAMSON *et al.*, 2001). Em outro estudo foi verificada a atividade antitumoral de combinações binárias obtidas a partir dos flavonóides genisteína, baicaleína, naringenina e quercetina. Dentre as combinações possíveis, apenas **naringenina + genisteína** não apresentou sinergismo na inibição do crescimento de células de câncer de mama, sendo este comportamento atribuído à similaridade estrutural dessas substâncias (WILLIAMSON *et al.*, 2001).

A atividade sinérgica de flavonóides frente à vírus também foi verificada. Em um estudo realizado por AMOROS *et al.* (1992) com os flavonóides isolados do bálsamo de própolis, constatou-se a eficácia de combinações binárias de flavonas e flavonóis não glicosilados contra HSV-1, sendo os melhores resultados derivados das seguintes combinações: **kaempferol + apigenina; quercetina + crisina; galangina + apigenina; kaempferol + luteolina e quercetina + apigenina.**

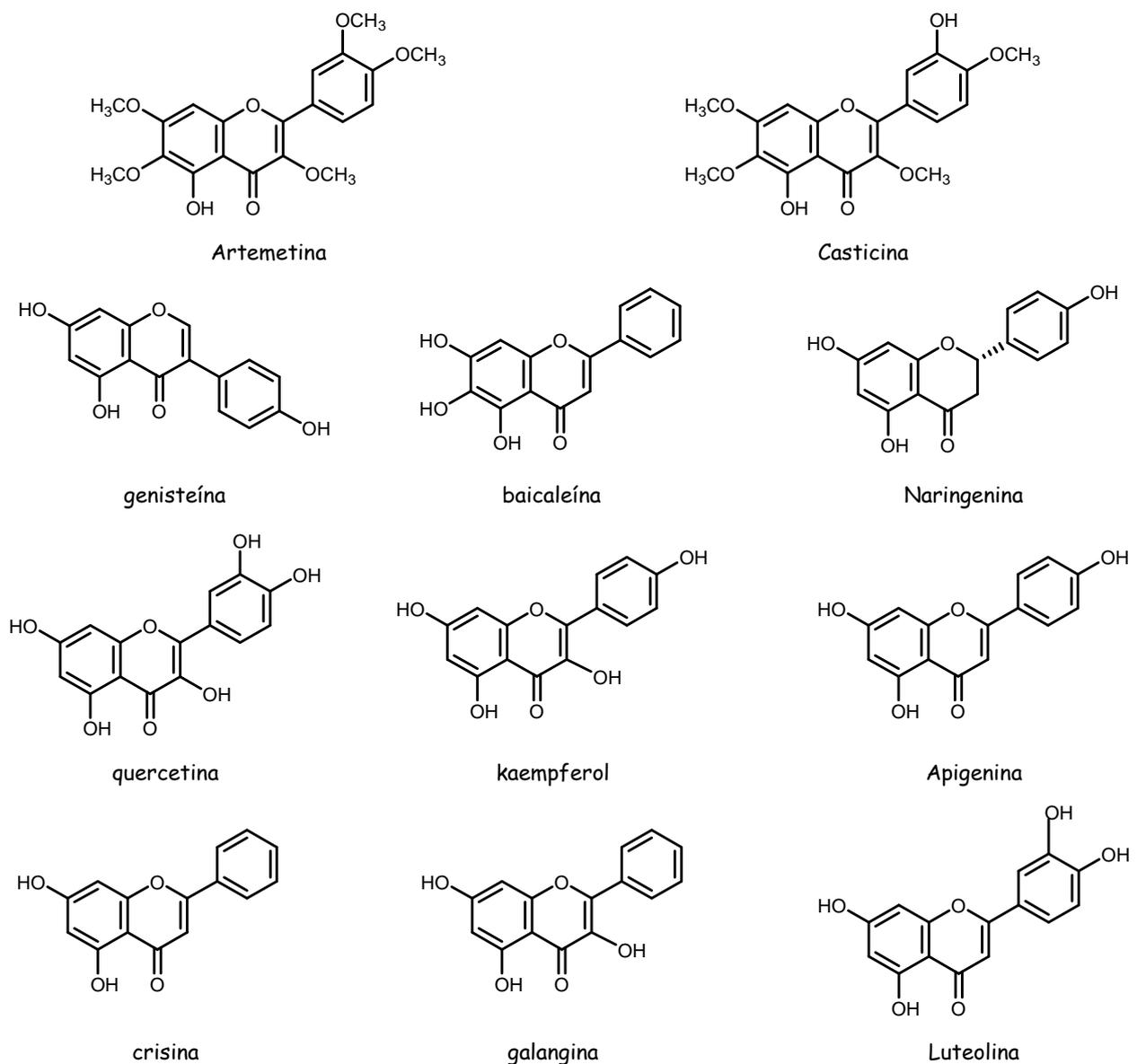


Figura 47: Estruturas de alguns flavonóides com atividade sinérgica comprovada.

A combinação de fármacos tem se tornado padrão para o tratamento de infecções causadas por alguns vírus, como o HIV e o vírus da hepatite C. As vantagens dessa terapia antiviral combinada resultam do sinergismo entre os fármacos, com potencialização dos efeitos antivirais, e da supressão do aparecimento de resistência, uma vez que o vírus é capaz de sofrer mutações e da defesa imunológica (DREW, 2006; KHAN *et al.*, 2005). Ainda não é claro se as experiências observadas com esses vírus de RNA podem ser aplicadas aos vírus de DNA, porém a pesquisa nessa área vem crescendo consideravelmente.

O aciclovir e a vidarabina são dois fármacos utilizados no tratamento de infecções causadas por vírus herpes, sendo o aciclovir o fármaco de primeira escolha devido à sua eficácia e segurança. Ambos os fármacos sofrem ativação no interior da célula através da fosforilação por uma timidinocinase viral (aciclovir) ou por uma cinase celular (vidarabina), tornando-se inibidores da síntese de DNA viral. Quando combinados, esses fármacos foram capazes de atuar sinergicamente frente às cepas selvagens do vírus do Varicella-zoster (VZV), HSV-1 e HSV-2. Para as cepas resistentes ao aciclovir (mutação na timidinocinase viral), a suscetibilidade à vidarabina não foi alterada na presença do aciclovir, indicando que a fosforilação de ambos os fármacos é essencial para o sinergismo. Verificou-se também que uma mutação na DNA polimerase viral é capaz de abolir o efeito sinérgico, o que pode ser atribuído à uma alteração na especificidade do substrato para ambos os fármacos, comprovando que a natureza do sítio de ligação na DNA polimerase é importante para seus efeitos antivirais sinérgicos frente aos vírus herpes (SUZUKI *et al.*, 2006).

Como visto anteriormente, as plantas medicinais, quando combinadas, podem ter seus efeitos terapêuticos alterados, uma vez que existe sempre a possibilidade de sinergismo entre duas ou mais substâncias, que em conjunto podem fornecer importantes atividades biológicas (JASSIM & NAJI, 2003). Este mesmo princípio tem sido aplicado na combinação de fármacos antivirais com extratos de plantas ou produtos naturais obtidos a partir desses extratos, tendo como objetivo de reduzir os efeitos tóxicos ou potencializar os efeitos benéficos.

Em um estudo realizado por CORINA *et al.* (1999) verificou-se que a combinação dos extratos de *Actium lappa* (Asteraceae), *Calendula officinalis* (Asteraceae) e *Geranium robertianum* (Geraniaceae) com o aciclovir mostrou-se mais eficiente no combate à ceratite herpética do que a monoterapia com aciclovir.

Interações sinérgicas entre flavonóides, polissacarídeos e fármacos antivirais também são relatadas na literatura. A robustaflavona é uma bisflavona isolada de *Rhus seccedaneae* (Anacardiaceae) capaz de inibir a infecciosidade dos vírus Herpes simplex dos tipos 1 e 2 (LIN *et al.*, 1998). Quando em combinação com a lamivudina e o penciclovir, dois análogos nucleosídicos utilizados no combate ao vírus da Hepatite B (HBV), verificou-se que a robustaflavona era capaz de atuar sinergicamente potencializando a atividade antiviral desses fármacos (ZEMBOWER *et al.*, 1998).

Para a 5,6,7-trimetoxiflavona (TMF) foi demonstrada sua ação sinérgica com o aciclovir, sendo atribuída ao aumento do "pool" intracelular do fármaco promovido pelo flavonóide. Outros flavonóides como a quercetina, apigenina e quercitrina também são capazes de interagir *in vivo* e *in vitro* com o aciclovir (HAYASHI *et al.*, 1997).

Sabe-se que os polissacarídeos, em especial os sulfatados, são capazes de inibir os primeiros estágios da infecção viral, como a adsorção do vírus à célula hospedeira ou a penetração viral. Em um estudo realizado por OH *et al.*, (2000), verificou-se que o APBP, uma proteína ácida ligada a um polissacarídeo, apresentou uma potente atividade contra o HSV-1 e HSV-2, em cultura de células. A combinação deste polissacarídeo com o aciclovir e a vidarabina foi capaz de potencializar a atividade antiviral frente ao HSV-1, através de interações sinérgicas. Em relação ao HSV-2, a combinação de APBP com o aciclovir também promoveu uma potencialização da atividade antiviral através de sinergismo, entretanto, a combinação do polissacarídeo com a vidarabina reduziu a atividade anti-HSV-2, indicando um antagonismo entre essas substâncias.

As várias razões para uma quimioterapia antiviral combinada incluem sinergia dos efeitos antivirais, antagonismo na toxicidade ou distribuição da toxicidade entre os sistemas orgânicos, prevenção do surgimento de cepas resistentes e aumento da resposta imunológica (OH *et al.*, 2000). A identificação de compostos antivirais com estruturas

moleculares diferentes dos análogos nucleosídicos é de suma importância para se estabelecer tratamentos eficientes, uma vez que se buscam substâncias que possam atuar por mecanismos de ação diferentes. Dessa forma, parece-nos plausível propor que os extratos brutos de plantas e seus produtos naturais, como os flavonóides e polissacarídeos, possam ser utilizados em uma terapia combinada para o tratamento de infecções causadas por vírus, possibilitando uma redução significativa da dose dos agentes antivirais visando uma redução da toxicidade, aumento da eficácia terapêutica e supressão do aparecimento de cepas resistentes.

- ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; GONZALES, E.; IGLESIAS, I.; IRURZUN, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of Bolivian plant extracts. *General Pharmacology*, v. 32, n. 4, p. 499-503, 1999.
- ABOU-KARAM, M.; SHIER, W. T. Isolation and characterization of an antiviral flavonoid from *Waldsteinia fragarioides*. *Journal of Natural Products*, v. 55, n. 10, p. 1525-1527, 1992.
- ACAMOVIC, T.; BROOKER, J. D. Symposium on 'Plants as animal foods: a case of catch 22? Biochemistry of plant secondary metabolites and their effects in animals. *Proceedings of Nutrition Society*, v. 64, p. 403-412, 2005.
- ALMEIDA, A. P.; MIRANDA, M. M. F. S.; SIMONI, I. C.; WIGG, M. D.; LAGROTA, M. H. C.; COSTA, S. S. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. *Phytotherapy Research*, v. 12, p. 562-567, 1998.
- ALMEIDA, N. M. R. Efeito Inibitório de extratos de plantas coletadas na reserva Particular do Patrimônio Natural - SESC sobre o vírus Herpes Simplex Tipo 2 resistente ao Aciclovir. Monografia de conclusão de curso, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- AMOROS, M.; SIMÕES, C. M. O.; GIRRE, L. Synergistic Effect of Flavones and Flavonols Against Herpes Simplex Virus Type 1 in Cel Culture. Comparison with the Antiviral Activity of Propols. *Journal of Natural Products*, v. 55, n.12, p. 1732-1740, 1992.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; SINCERO, T. C. M.; DA SILVA, A. C.; SAVI, L. A.; GAIDO, C. M.; BETTEGA, J. M. R.; MANCINI, M.; DE ALMEIDA, M. T. R.; BARBOSA, R. A.; FARIAS, M. R.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Antiviral evaluation of plants from Brazilian Atlantic Tropical Forest. *Fitoterapia*, v. 76, p. 374-378, 2005.
- BARBOSA, A. C. V. D.; DE BRITO, W. M. E. D.; ALFAIA, B. T. Soroprevalência e fatores de risco para a infecção pelo herpesvírus bovino tipo 1 (BHV-1) no Estado de Goiás, Brasil. *Ciencia Rural*, v. 35, n. 6, p. 1368-1373, 2005.
- BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sciences*, v. 78, p. 431-441, 2005.
- BOLIN, H. R.; STAFFORD, A. E.; FLATH, R. A. Cyclitols of soybean leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 32, P. 685-687, 1984.

- BOULET, J. C.; WILLIAMS, P.; DOCO, T. A fourier transform infrared spectroscopy study of wine polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, v. 69, p. 79-85, 2007.
- BROWN, T. J.; McCRARY, M.; TYRING, S. K. Antiviral agents: nonantiviral drugs. *Journal of the American Academy of Dermatology*, v. 47, p. 581-599, 2002
- BUSH, C. E.; PRITCHETT, R. F. A Comparison of the Genomes of Bovine Herpesvirus Type 1 and Pseudorabies Virus. *Journal of General Virology*, v. 66, p. 1811-1817, 1985.
- CAVALCANTE, F. A. Rinotraqueíte infeccios bovina (nariz vermelho), diagnóstico e controle. *Instruções Técnicas*, n. 28, p. 1-2, EMBRAPA-Acre, 2000.
- CHARLES, A. L., HUANG, T. C.; CHANG, Y. H. Structural analysis and characterization of a mucopolysaccharide isolated from roots of cassava (*Manihot esculenta* Crantz L.). *Food Hydrocolloids*, v. 22, n. 1, p. 184-191, 2008.
- CHATTOPADHYAY, K.; MATEU, C. G.; MANDAL, P.; PUJOL, C. A.; DAMONTE, E. B.; RAY, B. Galactan sulfate of *Grateloupia indica*: Isolation, structural features and antiviral activity. *Phytochemistry*, v. 68, n. 10, p. 1428-1435, 2007.
- COREY, L.; HANDSFIELD, H. Genital Herpes and Public Health. *Journal of the American Medical Association*, v. 283, n. 6, p. 791-794, 2000.
- CORINA, P.; DIMITRIS, S.; EMANUIL, T.; NORA, R. Treatment with acyclovir combined with a new Romanian product from plants. *Oftalmologia*, v. 46, p. 55-57, 1999.
- CUI, F. J.; TAO, W. Y.; XU, Z. H.; GUO, W. J.; XU, H. Y.; AO, Z. H.; JIN, J.; WEI, Y. Q. Structural analysis of anti-tumor heteropolysaccharide GFPS1b from the cultured mycelia of *Grifola frondosa* GF9801. *Bioresource Technology*, v. 98, p. 395-401, 2007.
- CUNHA, E.M.S.; NASSAR, A.F.C.; LARA, M.C.C.S.H.; BERSANO, J.G.; VILLALOBOS, E.M.C.; LOURENÇO, A.T.A. Detecção de anticorpos contra o Vírus da Doença de Aujeszky (VDA) em Javalis (*Sus scrofa*) no estado de São Paulo, Brasil: Dados preliminares. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v.70, 2003. Suplemento Trabalho apresentado na REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO, 16., 2003, São Paulo. Resumo 129.
- CUNHA, P. L. R.; MACIEL, J. S.; SIERAKOWSKI, M. R.; DE PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A. Oxidation of cashew tree gum exudate polysaccharide with TEMPO reagent. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 1, p. 85-92, 2007.
- CUNNINGHAM, A. L.; DIEFENBACH, R. J.; MIRANDA-SAKSENA, M.; BOSNJAK, L.; KIM, M.; JONES, C.; DOUGLAS, M. W. The Cycle of Human Herpes Simplex Virus

- Infection: Virus Transport and Immune Control. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 194, n. 1, p. 11-18, 2006.
- Dos SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: : SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; De MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade - UFRGS, p. 403-434, 2003.
- DREW, L. W. Is combination antiviral therapy for CMV superior to monotherapy?. *Journal of Clinical Virology*, v. 35, n. 4, p. 485-488, 2006.
- DU, J.; HE, Z-D.; JIANG, R-W.; YE, W-C.; XU, H-X.; BUT, P. P-H. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry*, v. 62, p. 1235-1238, 2003.
- EFSTATHIOU, S.; PRESTON, C.M. Towards an understanding of the molecular basis of herpes simplex virus latency. *Virus Research*, v. 111, n. 2, p. 108-119, 2005.
- EKBLAD, M.; BERGSTRÖM, T.; BANWELL, M. G.; BONNET, M.; RENNER, J.; FERRO, V.; TRYBALA, E. Anti-herpes simplex virus activities of two novel disulphated cyclitols. *Antiviral chemistry & chemotherapy*, v. 17, n. 2, p. 97-106, 2006.
- ELANCHEZHIAN, M.; RAJARAJAN, S.; RAJENDRAN, P.; SUBRAMANIAN, S.; THYAGARAJAN, S. P. Antiviral properties of the seed extract of an Indian medicinal plant, *Pongamia pinnata*, Linn., against herpes simplex viruses: *in-vitro* studies on Vero cells. *Journal of Medical Microbiology*, v. 38, n. 4, p. 262-264, 1993.
- FELIPE, A. M. M.; RINCÃO, V. P.; BENATI, F. J.; LINHARES, R. E. C.; GALINA, K. J.; DE TOLEDO, C. E. M.; LOPES, G. C.; DE MELLO, J. C. P.; NOZAWA, C. Antiviral effect of *Guazuma ulmifolia* and *Stryphnodendron adstringens* on Poliovirus and Bovine Herpesvirus. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, v. 29, n. 6, p. 1092-1095, 2006.
- FIGUEIRÓ, S. D.; GÓES, J. C.; MOREIRA, R. A.; SOMBRA, A. S. B. On the physico-chemical and dielectric properties of glutaraldehyde crosslinked galactomannan-collagen films. *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 313-320, 2004.
- FISCHER, N. O.; MBUY, G. N. K.; WOODRUFF, R. I. HSV-2 disrupts gap junctional intercellular communication between mammalian cells in vitro. *Journal of Virological Methods*, v. 91, p. 157-166, 2001.
- FORMICA, J. V.; REGELSON, W. Review of the biology of quercetina and related bioflavonoids. *Food and Chemical Toxicology*, v. 33, n. 12, p. 1061-1080, 1995.

- FREEMAN, E. E.; WEISS, H.A.; GLYNN, J. R.; CROSS, P. L.; WHITWORTH, J. A.; HAYES, R. J. Herpes Simplex Virus 2 Infection Increases HIV Acquisition in Men and Women: Systematic review and meta-analysis of Longitudinal Studies. *AIDS*, v. 20, p. 73-83, 2006.
- F. -TISCHER, P. C. S.; TALARICO, L. B.; NOSEDA, M. D.; GUIMARÃES, M. P. B.; DAMONTE, E. B.; DUARTE, M. E. R. Chemical structure and antiviral activity of carrageenans from *Meristiella gelidium* against herpes simplex and dengue virus. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 459-465, 2006.
- GANTER, J. L. M. S.; CARDOSO, A. T. M.; KAMINSKI, M.; REICHER, F. Galactomannan from the seeds of *Mimosa scabrella*: a scale-up process. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 21, p. 137-40, 1997.
- GANTER, J. L. M. S.; CORRÊA, J. B. C.; REICHER, F.; HYERAUD, A.; RINAUDO, M. Low molecular weight carbohydrate composition of *Mimosa scabrella* (bracatinga) seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 29, n. 2, p. 139-146, 1991.
- GARNER, J. A. Herpes simplex virion entry into and intracellular transport within mammalian cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 55, n. 11, p. 1497-1513, 2003.
- GEBRE-MARIAM, T.; NEUBERT, R.; SCHMIDT, P. C.; WUTZLER, P.; SCHMIDTKE, M. Antiviral activities of some Ethiopian medicinal plants used for the treatment of dermatological disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, p. 1-15, 2006.
- GERDTS, V.; BEYER, J.; LOMNICZI, B.; METTENLEITER, T. C. Pseudorabies virus expressing bovine herpesvirus 1 glycoprotein B exhibits altered neurotropism and increased neurovirulence. *Journal of Virology*, v. 74, n. 2, p. 817-827, 2000.
- GONÇALVES, J. L. S. Efeito dos flavonóides na propagação do Vírus Herpes Simplex Tipo 1 e Vírus da Diarréia Vira Bovina em células HEp-2. Dissertação de Mestrado, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1999.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; MORITA, N. Mechanism of action of the antiherpesvirus biflavone ginkgetin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 36, n. 9, p. 1890-1893, 1992.
- HAYASHI, K.; HAYASHI, T.; OTSUKA, H.; TAKEDA, Y. Antiviral activity of 5,6,7-trimethoxyflavone and its potentiation of the antiherpes activity of acyclovir. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 39, p. 821-824, 1997.

- HAYASHI, K; HAYASHI, T.; ARISAWA, M.; MORITA, N. Antiviral agents of plant origin. Antiherpetic activity of acacetin. *Antiviral chemistry & chemotherapy*, v. 4, n.1, p. 49-53, 1993.
- HAYDEN, F. G. Antimicrobianos (continuação). Agentes antivirais (não-retrovirais). In: GOODMAN & GILMAN. As bases farmacológicas da terapêutica. Editora McGraw-Hill, 10ª Edição, p. 985-1010, 2003.
- HUANG, Q.; JIN, Y.; ZHANG, L.; CHEUNG, P. C. K.; KENNEDY, J. F. Structure, molecular size and antitumor activities of polysaccharides from *Poria cocos* mycelia produced in fermenter. *Carbohydrate Polymers*, v. 70, n. 3, p. 324-333, 2007.
- HU, J. M.; HSIUNG, G. D. Evaluation of new antiviral agents: I. In vitro perspectives. *Antiviral Research*, v. 11, p. 217-232, 1989.
- ILIÉ, S. B.; KONSTANTINIVIÉ, S. S.; TODOROVIÉ, Z. B. Antimicrobial activity of bioactive componet from flower of *Linum capitatum* Kit. *Physics, Chemistry and Technology*, v. 3, n. 1, p. 73-77, 2004.
- JAIN, R.; JAIN, S.; SHARMA, A.; ITO, H.; HATANO, T. Isolation of (+)-pinitol and other constituents from the root bark of *Tamarindus indica* Linn. *Journal of Natural Medicines*, v. 61, n. 3, p. 355-356, 2007.
- JASSIM, S. A. A.; NAJI, M. A. Novel Antiviral Agents: A Medicinal Plant Perspective. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 412-427, 2003.
- JENSEN, L. H.; NORRILD, B. The effects of cell pasajes on the cell morphology and the outcome of herpes simples virus type 1 infection. *Journal of Virological Methods*, v. 84, p. 139-152, 2000.
- JONES, C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 16, n .1, p. 79-95, 2003.
- JONES, C. A.; ISAACS, D. Management of Herpes Simplex Virus Infections. *Current Paedriatics*, v.14, p. 131-136, 2004.
- JUNQUEIRA, O. M. Doença de Aujeszky. Boletins Técnicos, Serrana Nutrição Animal. Disponível em [www.serrana.com.br/n\\_boletins.asp](http://www.serrana.com.br/n_boletins.asp)
- KACURÁKOVÁ, M.; CAPEK, P.; SASINKOVÁ, V.; WELLNER, N.; EBRINGEROVÁ, A. FT-IR study of plant cell wall model compounds: pectic polysaccharides and hemicelluloses. *Carbohydrate Polymers*, v. 43, p. 195-203, 2000.

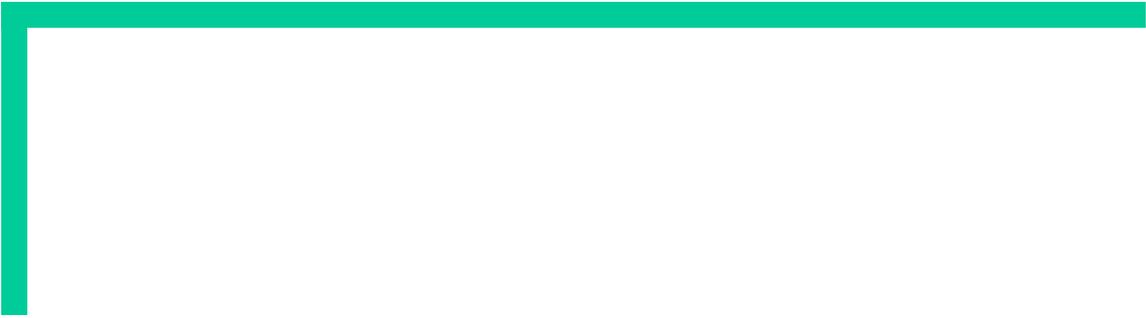
- KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; THOMPSON, K.D.; GAMBARI, R. Extracts and molecules from medicinal plants against herpes simplex viruses. *Antiviral Research*, v. 67, p.107-119, 2005.
- KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; VAN VUUREN, S. F.; VAN ZYL, R.L. *In vitro* Evidence of Antimicrobial Synergy Between *Salvia chamelaeagnea* and *Leonotis leonurus*. *South African Journal of Botany*, v. 72, p. 634-636, 2006.
- KAUL, T. N.; MIDDLETON, E.; OGRA, P. L. Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *Journal of Medical Virology*, v. 15, p. 71-79, 1985.
- KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUAÑES, M.; MUÑOZ, J. DE D.; VIVOT, E.; CRUAÑES, J.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, n. 1, p. 79-84, 1999.
- KRIEF, S.; HLADIK, C. M.; HAXAIRE, C. Ethnomedicinal and Bioactive Properties of Plants Ingested by Wild Chimpanzees in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 110, p. 1-15, 2005.
- LAGROTA, M. H. C. Atividade antiviral in vitro de substâncias sintéticas e naturais. Dissertação de Mestrado, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978.
- LAM, K. S. New aspects of natural products in drug discovery. *Trends in Microbiology*, v. 15, n. 6, p. 279-289, 2007.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; SRITULARAK, B.; BENCHANA, K.; LIPIPUN, V.; MATHEW, J.; RAYMOND F. SCHINAZI, R. F Phenolics with antiviral activity from *Millettia Erythrocalyx* and *Artocarpus Lakoocha*. *Natural Product Research*, v. 19, n. 2, p. 177-182, 2005.
- LIMA, A. M. F.; ANDREANI, L.; SOLDI, V. Influência da adição de plastificante e do processo de reticulação na morfologia, absorção de água e propriedades mecânicas de filmes de alginato de sódio. *Química Nova*, v. 30, n. 4, p. 832-837, 2007.
- LIN, Y-M.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F-C.; SIDWELL, R.; BARNARD, D. L.; HUFFMAN, J. H.; KERN, E. R. Antiviral activities of biflavonoids. *Planta Medica*, v. 65, p. 120-125, 1998.
- LIESEGANG, T. J. Herpes Simplex Virus Epidemiology an Ocular Importance. *Cornea*, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2001.

- LIU, F.; LIU, Y.; MENG, Y.; YANG, M.; HE, K. Structure of polysaccharide from *Polygonatum cyrtoneuma* Hua and the antiherpetic activity of its hydrolyzed fragments. *Antiviral Research*, v. 63, n. 3, p. 183-189, 2004.
- LI, Y.; LEUNG, K-T.; YAO, F., OOI, L. S. M.; OOI, V. E. C. Antiviral flavans from the leaves of *Pithecellobium clypearia*. *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 833-835, 2006.
- LI, Y.; OOI, L. S. M.; WANG, H.; BUT, P. P. H.; OOI, V. E. C. Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China. *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 9, p. 718-722, 2004.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.
- MANHA, A. P. dos S. Atividade antiviral da plantas brasileiras contra Herpes Bovino e vírus da Doença de Gumboro. Monografia de conclusão de curso, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Metodista de São Paulo, 2004.
- MASTROMARINO, P.; PETRUZZIELLO, R.; MACCHIA, S.; RIETI, S.; NICOLETTI, R.; ORSI, N. Antiviral activity of natural and semisynthetic polysaccharides on early steps of rubella vírus infection. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy*, v. 39, p. 339-345, 1997.
- McCHESNEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: back to future or into extinction? *Phytochemistry*, v. 68, p. 2015-2022, 2007.
- McRAE, J.; YANG, Q.; CRAWFORD, R.; PALOMBO, E. Review of the methods used for isolating pharmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants. *Environmentalist*, v. 27, p. 165-174, 2007.
- MIRANDA, M. M. F. S. Viroses dermatrópicas. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. Introdução à virologia humana. 1ª Edição, Editora Guanabara Koogan S. A., p. 75-99, 2002.
- MISRA, L. N.; SIDDIQI, S. A. Dhaincha (*Sesbania bispinosa*) leaves: a good source of antidiabetic (+)-pinitol. *Current Science*, v. 87, n. 11, p. 1507, 2004.
- MUCSI, I.; PRÁGAI, B. M. Inhibition of virus multiplication and alteration of cyclic AMP level in cell cultures by flavonoids. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 41, n. 7, p. 930-931, 1985.

- MUYLKENS, B.; THIRY, J.; KIRTEN, P.; SCHYNTS, F.; THIRY, E. Bovine herpesvirus 1 infection and infectious bovine rhinotracheitis. *Veterinary Research*, v. 38, n. 2, p. 181-209, 2007.
- NAUWINCK, H.; GLORIEUX, S.; FAVOREEL, H.; PENSAERT, M. Cell Biological and molecular Characteristics of Pseudorabies Virus Infections in Cell Cultures and in Pigs with Emphasis on the Respiratory tract. *Veterinary Research*, v. 38, p. 229-241, 2007.
- NEYNDORFF, H. C.; BARTEL, D. L.; TUFARO, F.; LEVY, J. G. Development of a model to demonstrate photosensitizer-mediated viral inactivation in blood. *Transfusion*, v. 30, p. 485-490, 1990.
- NETO, V. A; BALDY, J. L. S. Doenças Transmissíveis. Editora Sarvier, 3ª edição, 509-511, 1991.
- NISHIMURA, T.; TOKU, K.; FUKUYASU, H. Antiviral compounds. XII. Antiviral activity of aminohydrazones of alkoxyphenyl substituted carbonyl compounds against influenza vírus in eggs and mice. *Kitasato Archives of Experimental Medicine*, v. 50, p. 39-46, 1977.
- NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELENS, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanism of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 74, p. 418-425, 2001.
- NOLKEMPER, S.; REICHLING, J.; STINTZING, F. C.; CARLE, R.; SCHNITZLER, P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of the Lamiaceae family against Herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. *Planta Medica*, v. 72, n. 15, p.1378-1382, 2006.
- OBENDORF, R. L.; MCINNIS, C. E.; HORBOWICZ, M.; KERESZTES, I.; LAHUTA, L. B. Molecular structure of lathyritol, a galactosylbornesitol from *Lathyrus odoratus* seeds, by NMR. *Carbohydrate Research*, v. 340, n. 7, p. 1441-1446, 2005.
- OH, K. W.; LEE, C. K.; KIM, Y. S.; EO, S. K.; HAN, S. S. Antiherpetic Activities of Acidic Protein Bound Polissacharide Isolated from *Ganoderma lucidum* alone and in combinations with acyclovir and Vidarabine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 72, p. 221-227, 2002.
- PERRY, N. B.; FOSTER, L. M. Antiviral and antifungal flavonoids, plus triterpene, from *Hebe cupressoides*. *Planta Medica*, v. 60, p. 491-492, 1994.
- PHILLIPSON, J. D. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*, article in press (doi:10.1016/j.phytochem.2007.06.028), 2007

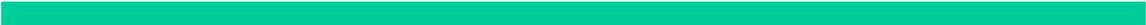
- POMERANZ, L. E.; REYNOLDS, A. E.; HENGARTNER, C. J. Molecular Biology of Pseudorabies Virus: Impact on Neurovirology and Veterinary Medicine. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 69, n. 3, p. 462-500, 2005.
- RAJBHANDARI, M.; WEGNER, U.; JULICH, M.; SCHOPKE, T.; MENDEL, R. Screening of Nepalese medicinal plants for antiviral activity. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 74, n. 3, p. 251-255, 2001.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Fármacos antivirais. In: RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. Farmacologia, Editora Elsevier, 5ª Edição, 2004.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.
- REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percents endpoints. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene*, v. 27, p. 493-497, 1938.
- ROEHE, P. M.; Da SILVA, T. C.; NARDI, N. B.; OLIVEIRA, L. G.; ROSA, J. C. A. Diferenciação entre os virus da rinotraqueíte infecciosa bovina (BHV-1) e herpesvírus da encefalite bovina (BHV-5) com anticorpos monoclonais. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 17, n. 1, p. 41-44, 1997.
- RODRIGUEZ, D. J.; CHULIA, J.; SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; MARIOTTE, A. M.; GIRRE, L. Search for in vitro antiviral activity of a new isoflavone glycoside from *Ulex europaeus*. *Planta Medica*, v. 56, p. 59-62, 1990.
- SACKS, S. L.; GRIFFITHS, P. D.; COREY, L.; COHEN, C.; CUNNINGHAM, A.; DUSHEIKO, G. M.; SELF, S.; SPRUANCE, S.; STANBERRY, L. R.; WALD, A.; WHITLEY, R. J. Introduction: Is viral shedding a surrogate marker for transmission of genital herpes? *Antiviral Research*, v. 63S1, p. S3-S10, 2004
- SERKEDJIEVA, J.; IVANCHEVA, S. Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, n. 1, p. 59-68, 1999.
- SHASTINA, N. S.; TUCHNAYA, O. A.; EINISMAN, L. I.; KASHIRICHEVA, I. I.; STEPANOV, A. E.; YURKEVICH, A. M.; SHVETS, V. I. Asymmetrically Substituted *myo*-Inositols. XXXIX. The Synthesis of Conjugate of 2',3'-Didehydro-3'-deoxythymidine with Phosphatidylinositol: A New Nucleoside Phospholipid with Potential Anti-HIV Activity. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 29, n. 3, p. 267-273, 2003.
- SMEE, D. F.; MORRISON, A. C.; BARNARD, D. L.; SIDWELL, R. W. Comparison of colorimetric, fluorometric, and visual methods for determinig anti- influenza (H1N1

- and H3N2) virus activities and toxicities of compounds. *Journal of Virological Methods*, v. 106, p. 71-79, 2002.
- SURESHAN, K. M.; MIYASOU, T.; WATANABE, Y. Total synthesis of the proposed structure of "brahol" and the structural revision. *Tetrahedron Letters*, v. 45, p. 3197-3201, 2004.
- SUSUKI, M., OKUDA, T.; SHIRAKI, K. Synergistic Antiviral Activity of Acyclovir and Vidarabine against Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 and Varicella-zoster virus. *Antiviral Research*, v.72, p. 157-161, 2006.
- TOLO, F. M.; RUKUNGA, G. M.; MULI, F. W.; NJAGI, E. N.; NJUE, W.; KUMON, K.; MUNGAI, G. M.; MUTHAURA, C. N.; MULI, J. M.; KETER, L. K.; OISHI, E.; KOFITSEKPO, M. W. Anti-viral activity of the extracts of a Kenyan medicinal plant *Carissa edulis* against herpes simplex virus. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 104, p. 92-9, 2006.
- TOMISHIMA, M. J; SMITH, G. A.; ENQUIST, L. W. Sorting and Transport of Alpha Herpesviruses in Axons. *Traffic*, v. 2, p. 429-436, 2001.
- UHART, M. M.; VILA, A. R.; BEADE, M. S.; BALCARCE, A.; KARESH, W. B. Health evaluation of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos Del Tuyú Wildlife Reserve, Argentina. *Journal of Wildlife Diseases*, v. 39, n. 4, p. 887-893, 2003.
- WALKER, W. E.; WAISBREN, B. A.; MARTINS, R. R.; BATAYAS, G. E. A method for determining sensitivities of antiviral drugs in vitro for possible use as clinical consultation. *Applied Microbiology*, v. 23, p. 232-235, 1972.
- WHITLEY, R. J.; ROIZMAN, B. Herpes simplex virus infections. *Lancet*, v. 357, p. 1513-1518, 2001.
- WILLIAMSON, E. M. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine*, v. 8, n. 5, p. 401-409, 2001.
- ZEMBOWER, D. E.; LIN, Y.-M.; FLAVIN, M. T.; CHEN, F.-C.; KORBA, B. E. Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent. *Antiviral Research*, v. 39, n. 2, p. 81-88, 1998.
- ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A. Flavonoids. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; De MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade - UFRGS, p. 577-614, 2003.



## *Considerações Finais*

---



Os estudos realizados nessa dissertação de mestrado contribuem para o conhecimento dos aspectos químicos e biológicos de *Mimosa xanthocentra*, uma espécie vegetal até então nunca estudada.

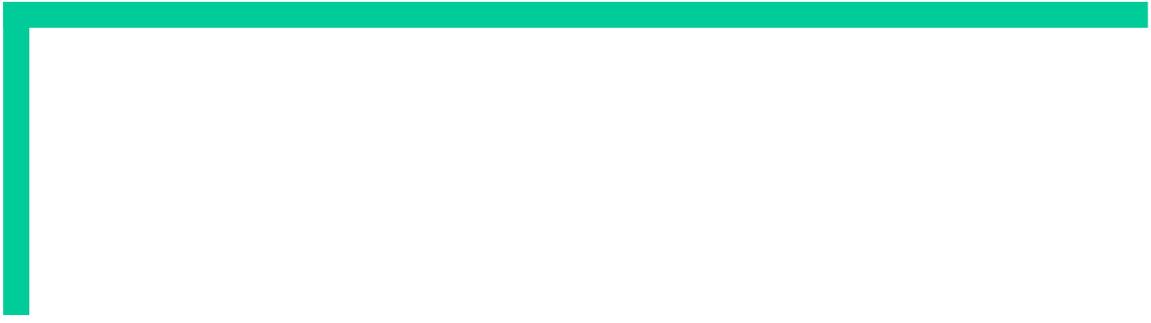
Neste estudo pioneiro sobre essa espécie, foram identificados três flavonóides inéditos na família Mimosaceae - isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo, vitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo e reinoutrina - e um flavonol relatado pela segunda vez no gênero *Mimosa* (avicularina). Além disso, a flavona isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo apresentou-se sob a forma de rotâmeros em solução de DMSO-*d*<sub>6</sub>, sendo possível verificar, através de estudos preliminares de modelagem molecular, duas conformações principais para este flavonóide. O trabalho em questão é o segundo relato de rotamerismo para esse flavonóide e representa a primeira proposta de estrutura tridimensional dos dois rotâmeros.

O potencial terapêutico de *M. xanthocentra* foi comprovado pela atividade anti-HSV-1, HSV-2, SHV-1 e BHV-1 apresentada por seu extrato aquoso (**MxEA**) e pela identificação de substâncias antivirais de diferentes classes químicas (flavonóides e carboidratos), com destaque para isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo, cuja atividade anti-HSV-1 constitui o primeiro relato de atividade antiviral para esse flavonóide e de atividade anti-HSV para uma flavona glicosídica. Além disso, estudos de sinergismo permitiram a comprovação da existência de interações entre as substâncias presentes em **MxEA**. Este constitui o primeiro relato de identificação de substâncias antivirais em *M. xanthocentra* e no gênero *Mimosa*.

Numerosos estudos relatam a busca por substâncias bioativas a partir de plantas empregadas medicinalmente pelo homem, portanto, utilizando a etnofarmacologia como ferramenta. Alguns estudos mostram que plantas consumidas por primatas - hábito considerado como auto-medicação por especialistas - são fontes de substâncias potencialmente terapêuticas. Considerando-se as duas estratégias, a abordagem da presente dissertação é bastante inovadora e otimista ao buscar substâncias bioativas em uma planta pertencente à dieta de mamíferos não-primatas, sem relato de uso medicinal.

No Pantanal, cervos-do-pantanal e veados-campeiros encontram-se em contato com o gado, o que contribui para a transmissão de doenças a partir desses animais domésticos. Dessa forma, com base nos resultados obtidos *in vitro*, pode-se extrapolar que a ingestão de plantas com atividade antiviral, como *M. xanthocentra*, poderia trazer vantagens para aqueles cervídeos ameaçados de extinção, que se beneficiariam através do uso contínuo dessa espécie vegetal, contribuindo para sua saúde e conservação.

Os resultados significativos observados nessa dissertação justificam uma posterior investigação do comportamento dessa planta sobre vírus de DNA sem envelope e vírus de RNA envelopados, permitindo conhecer melhor o perfil de atuação das substâncias presentes em *M. xanthocentra*. Pretende-se ainda dar continuidade aos ensaios antivirais dos flavonóides, verificando o comportamento de isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo frente aos vírus animais e a atividade antiviral dos demais flavonóides isolados. Adicionalmente, serão realizados novos esforços visando isolar e caracterizar estruturalmente o ciclitol e o polissacarídeo de *M. xanthocentra*, com subsequente estudo do mecanismo de inibição viral dessas substâncias.



*Anexo*



**PERFIL QUÍMICO DE *Mimosa xanthocentra* POR CLAE-UV**

As análises em CLAE modo analítico foram executadas em cromatógrafo SHIMADZU® LC-10AD com detector "Diode Array" (SHIMADZU® modelo SPD-M10A) e controladas por uma estação de trabalho SHIMADZU® modelo CMB-10A. Coluna de fase inversa RP-18 (5 µm, 4,6 x 250 mm, Symmetry Shield™, WATERS®, USA). Os espectros do UV foram adquiridos na escala de 200-400 nm.

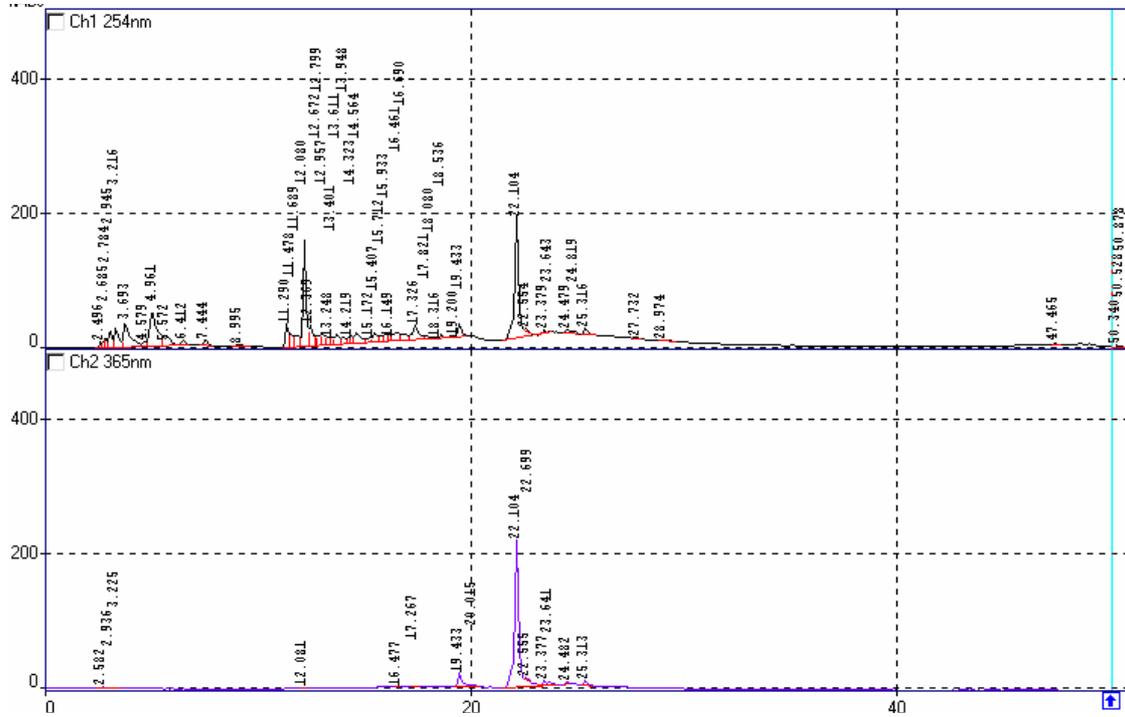
A determinação de compostos fenólicos das amostras (conc. 10 mg/ml) foi realizada utilizando um gradiente de H<sub>2</sub>O contendo 0,01% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (A) e Acetonitrila (B). O fluxo de eluição foi de 1 ml/min com volume de injeção de 20 µl.

**Tabela:** Esquema do gradiente de solventes (CLAE-UV).

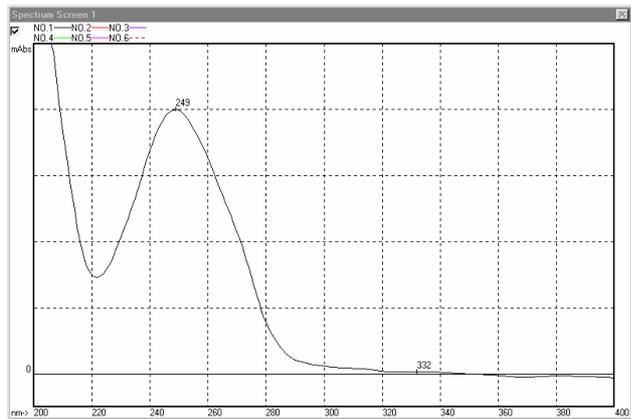
Tempo (minutos)	Solvente A (H <sub>2</sub> O %)	Solvente B (Acetonitrila %)
5	90	10
10	80	20
15	78	22
20	70	30
30	65	35
35	60	40
40	50	50
45	0	100

A seguir serão apresentados os cromatogramas do extrato aquoso (**MxEA**) e frações butanólica (**MxBu**), acetato de etila (**MxAc**) e aquosa (**MxAq**), acompanhados dos espectros de UV obtidos para os picos majoritários. O flavonóide isovitexina-2"-*O*-ramnopiranosídeo foi eluído nas mesmas condições e utilizado como padrão (tempo de retenção igual a 21,51 min).

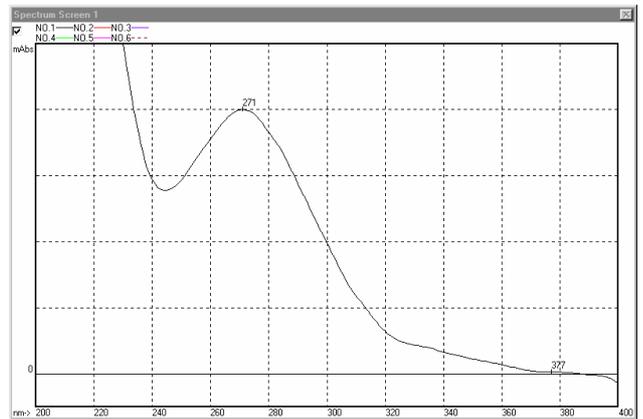
Amostra: MxEA (Espectros 1-4)



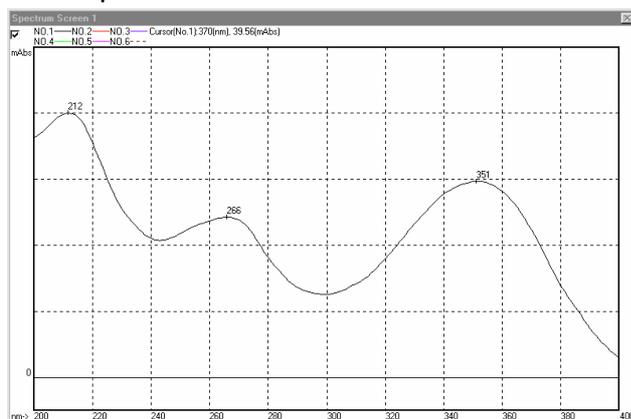
1. Espectro em 3,69 min e 4,96 min



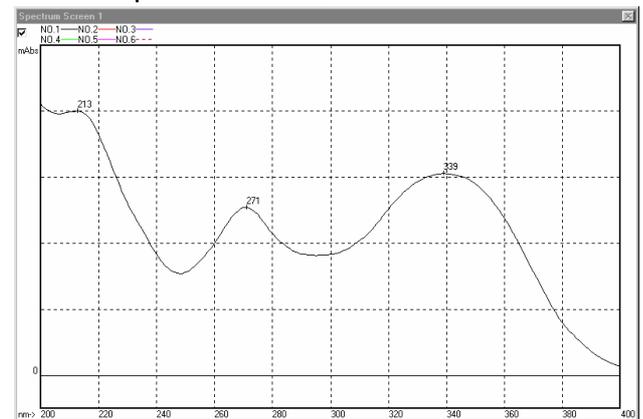
2. Espectro em 12,08 min



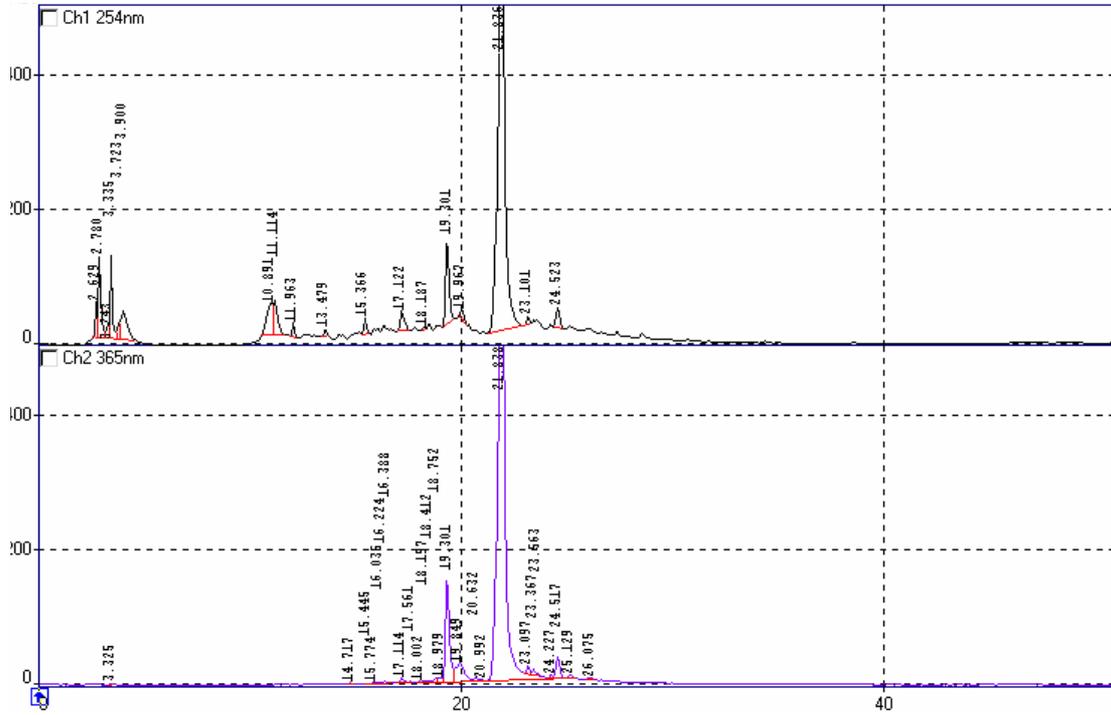
3. Espectro em 19,43 min



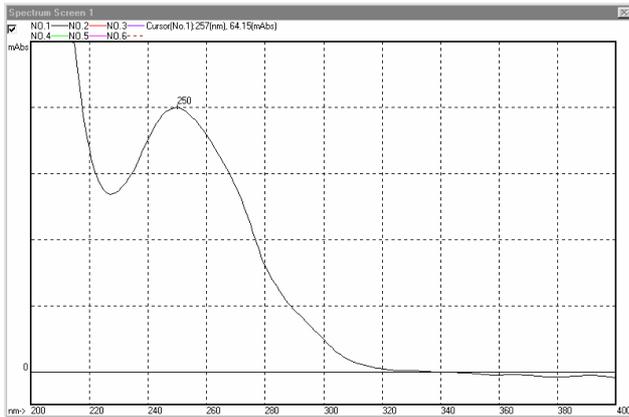
4. Espectro em 22,10 min



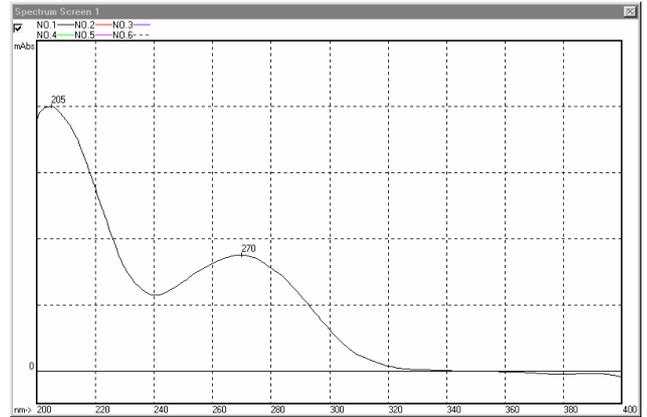
Amostra: MxBu (Espectros 1-6)



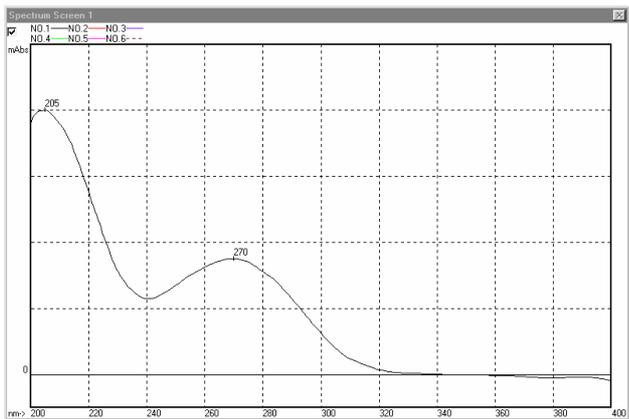
1. Espectro em 2,78 min



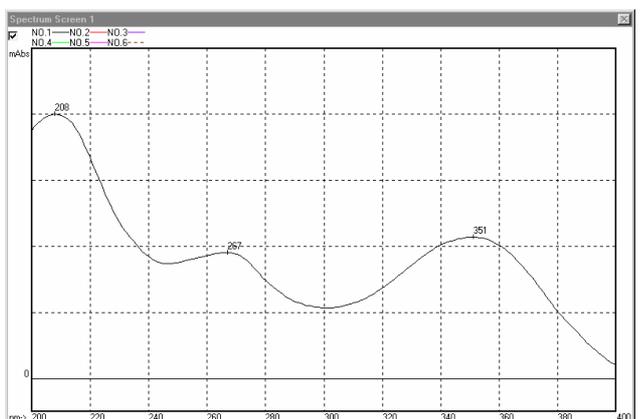
2. Espectro em 3,35 min



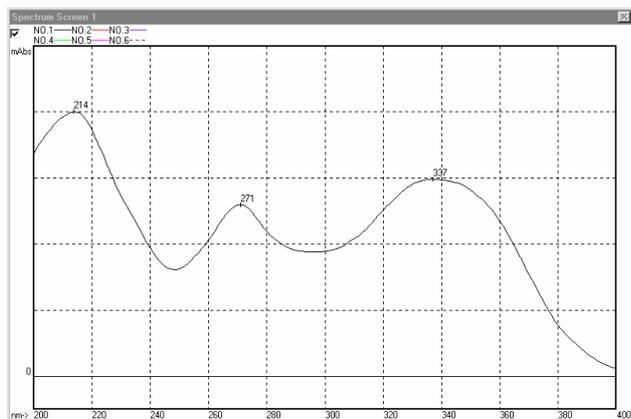
3. Espectro em 10,89 min



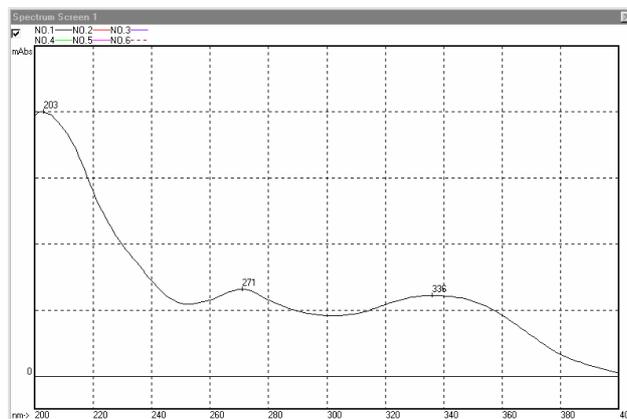
4. Espectro em 19,30 min



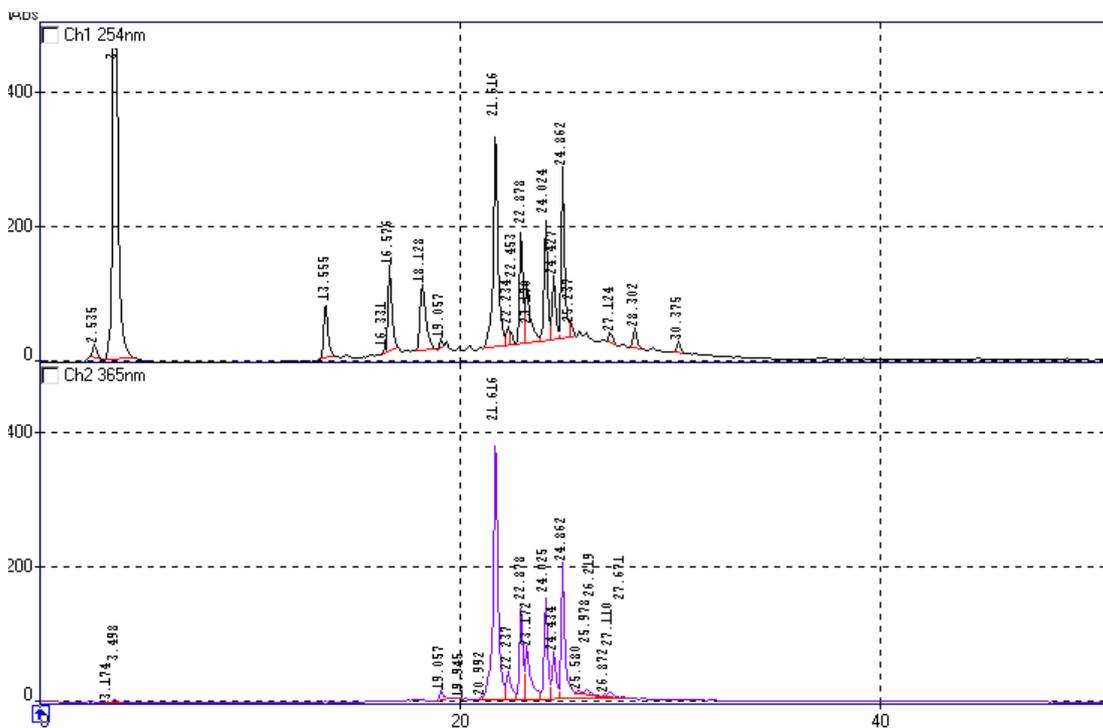
5. Espectro em 21,83 min



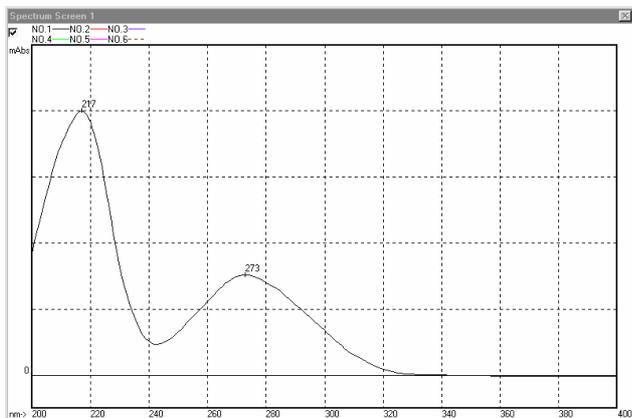
6. Espectro em 24,52 min



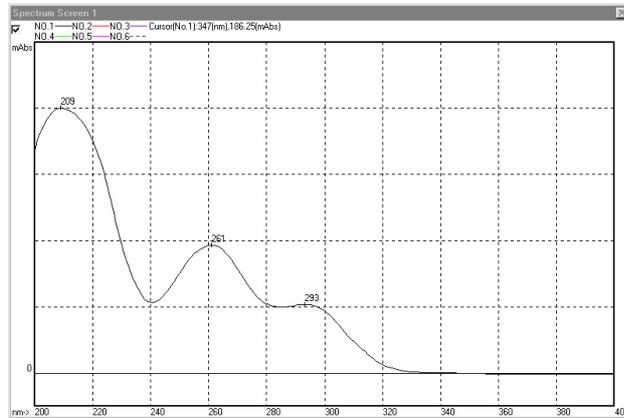
Amostra: MxAc (Espectros 1-8)



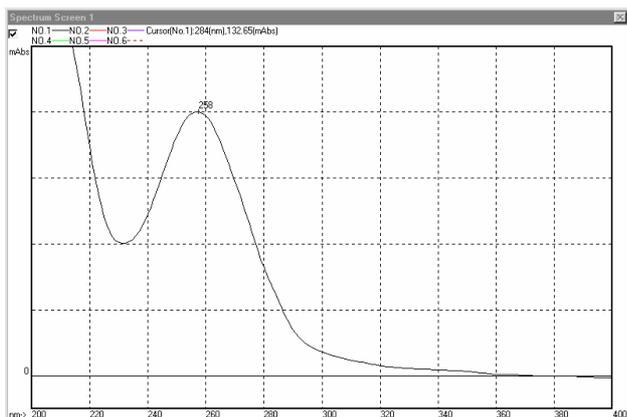
1. Espectro em 3,0 min



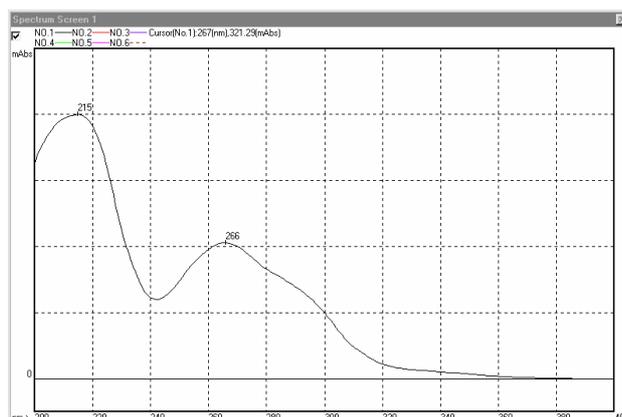
2. Espectro em 13,55 min



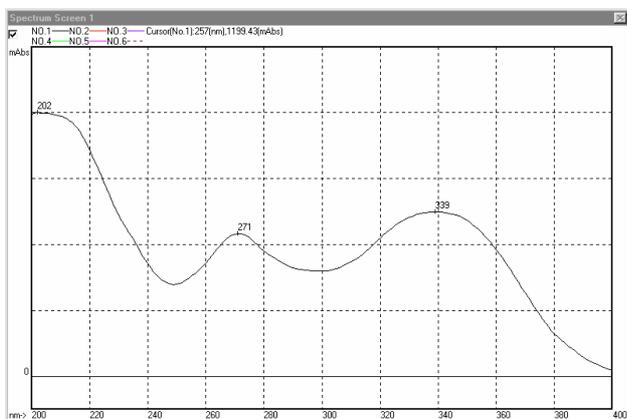
3. Espectro em 16,57 min



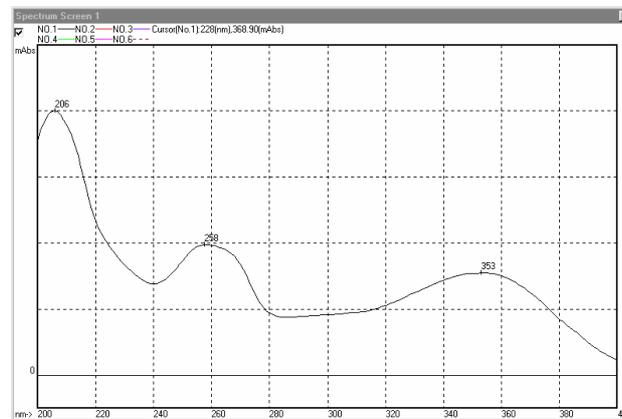
4. Espectro em 18,12 min



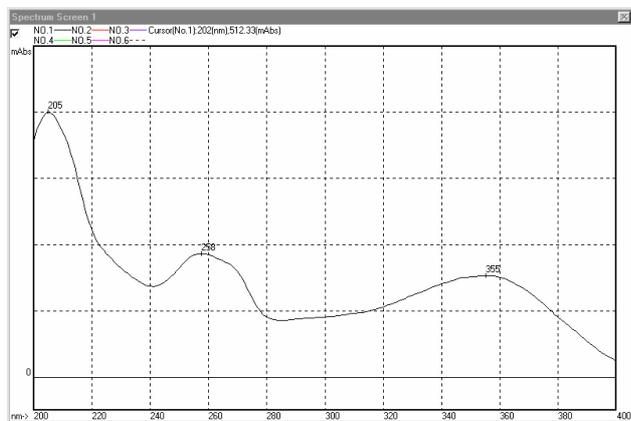
5. Espectro em 21,61 min



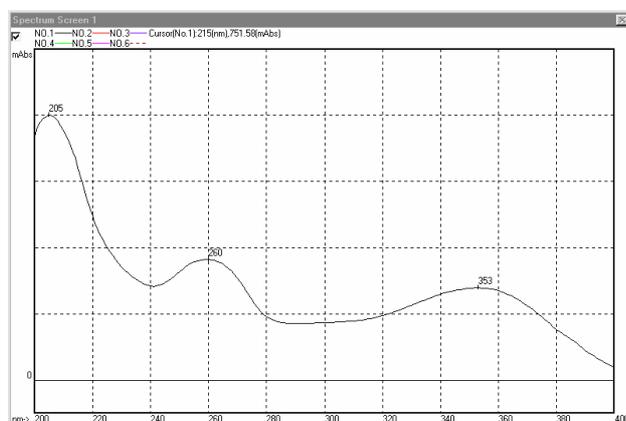
6. Espectro em 22,87 min



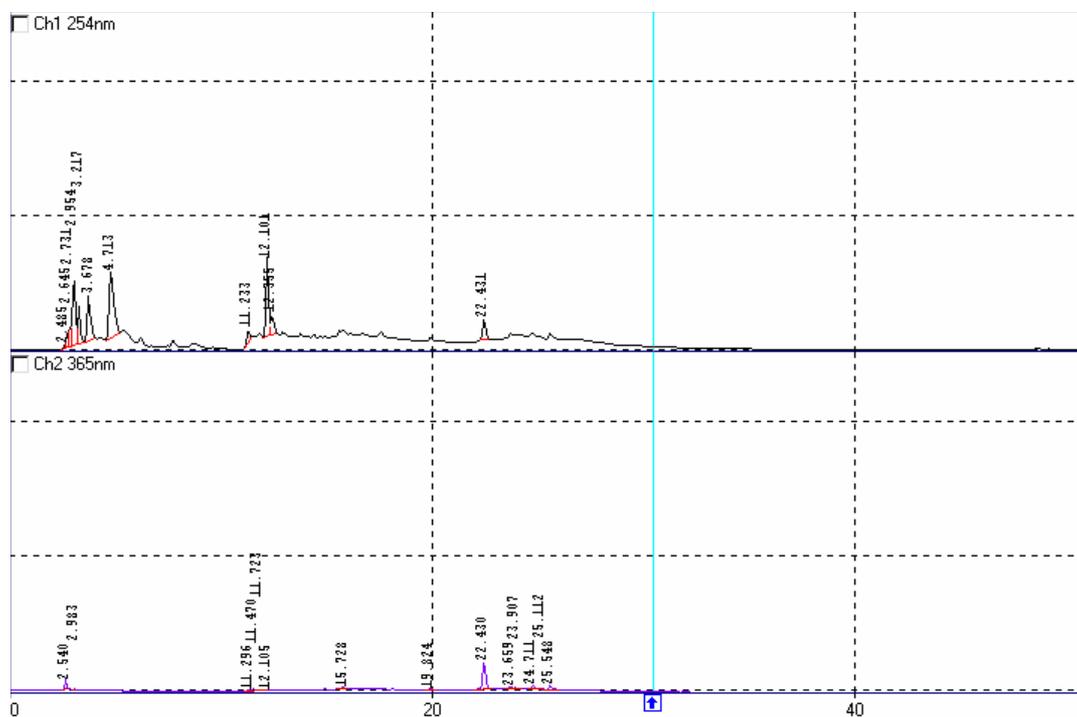
### 7. Espectro em 24,02 min



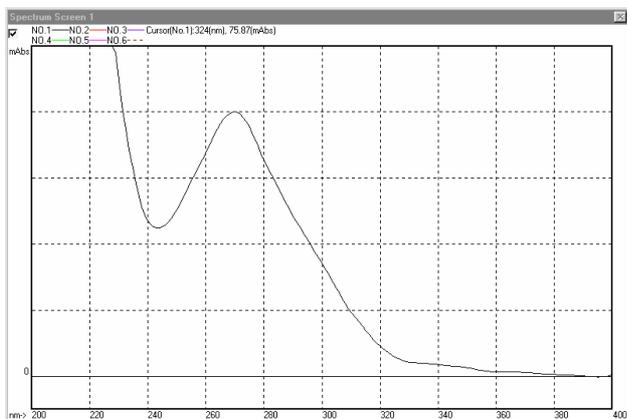
### 8. Espectro em 24,86 min



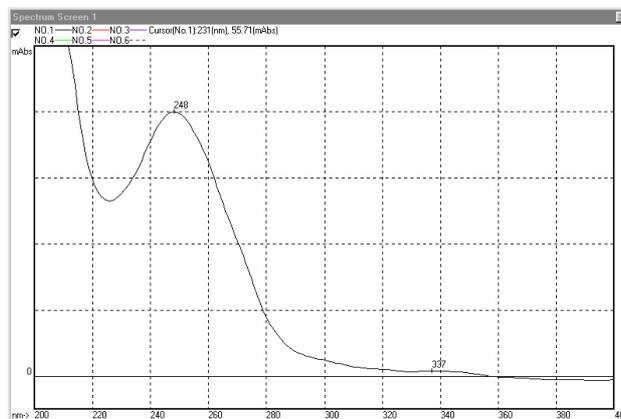
### Amostra: MxAq (Espectros 1-5)



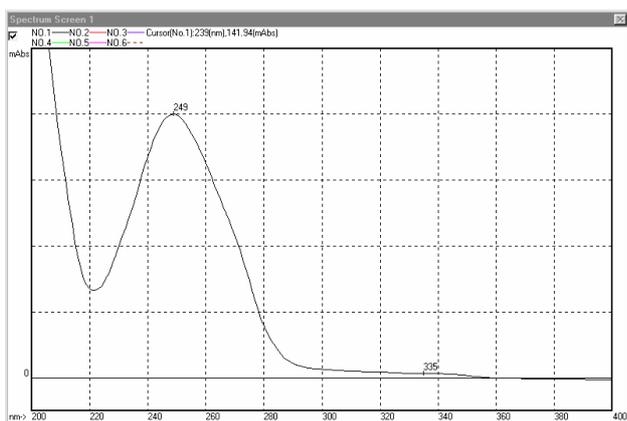
1. Espectro em 3,21 min



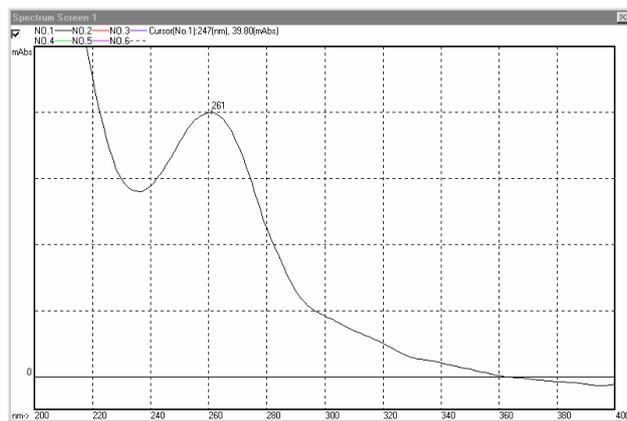
2. Espectro em 3,67 min



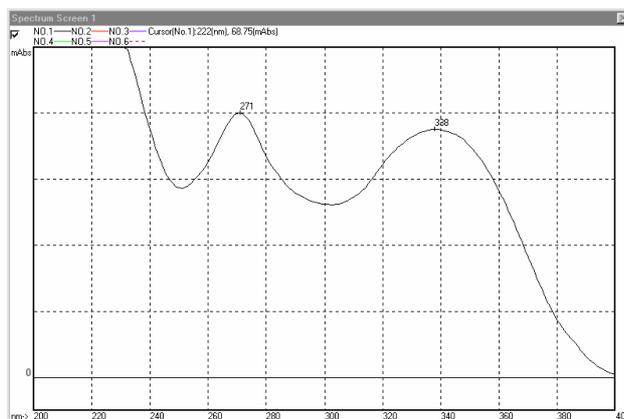
3. Espectro em 4,71 min



4. Espectro em 12,10 min



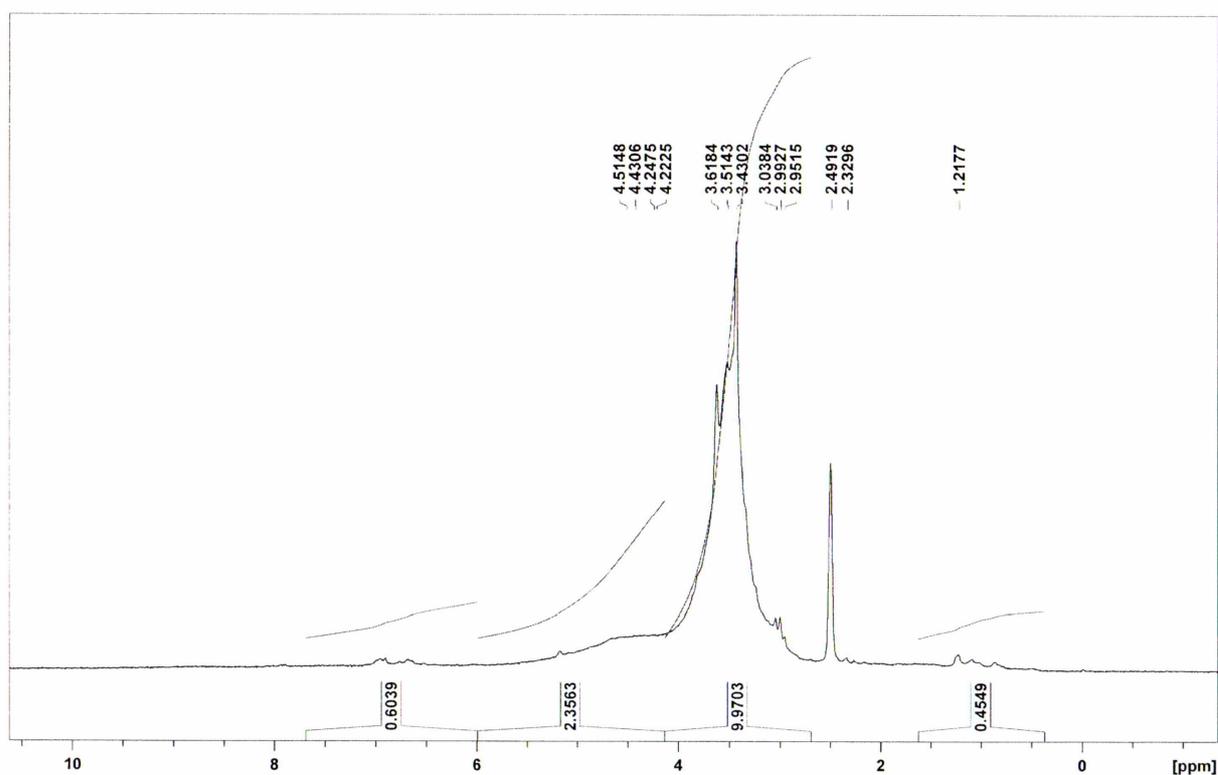
5. Espectro em 22,43 min



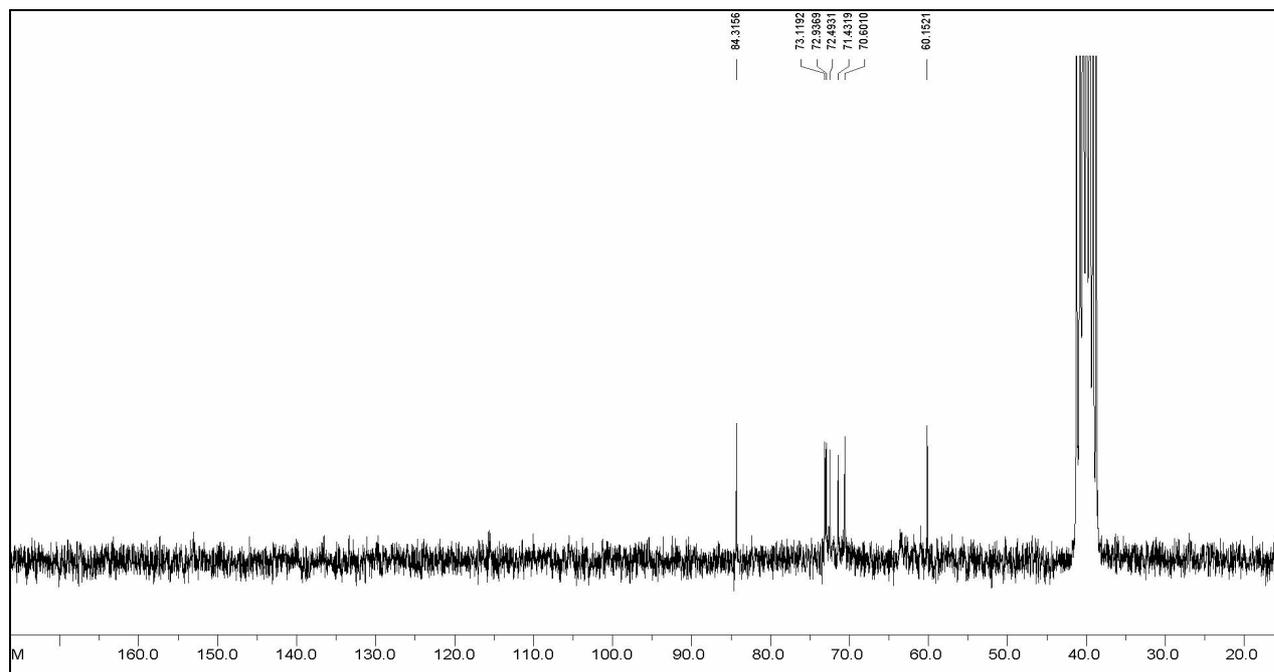
## PERFIL QUÍMICO DE *Mimosa xanthocentra* POR RMN DE $^1\text{H}$ E $^{13}\text{C}$

A seguir serão apresentados os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  obtidos para o extrato aquoso (MxEA) e frações butanólica (MxBu), acetato de etila (MxAc) e aquosa (MxAq), utilizando o espectrômetro Bruker AC200A ( $^1\text{H}$ : 200,16 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 50,33 MHz).

### Amostra: MxEA

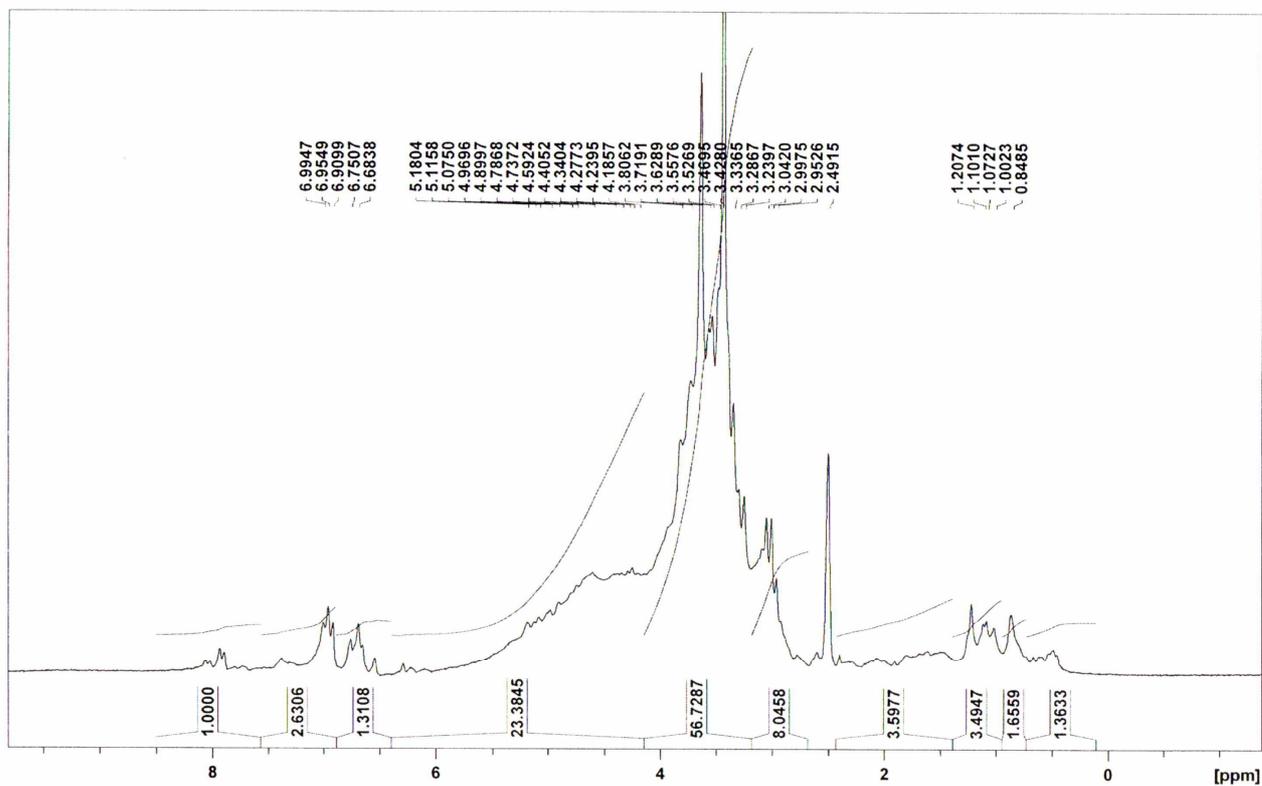


Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de MxEA ( $\text{DMSO}-d_6$ )

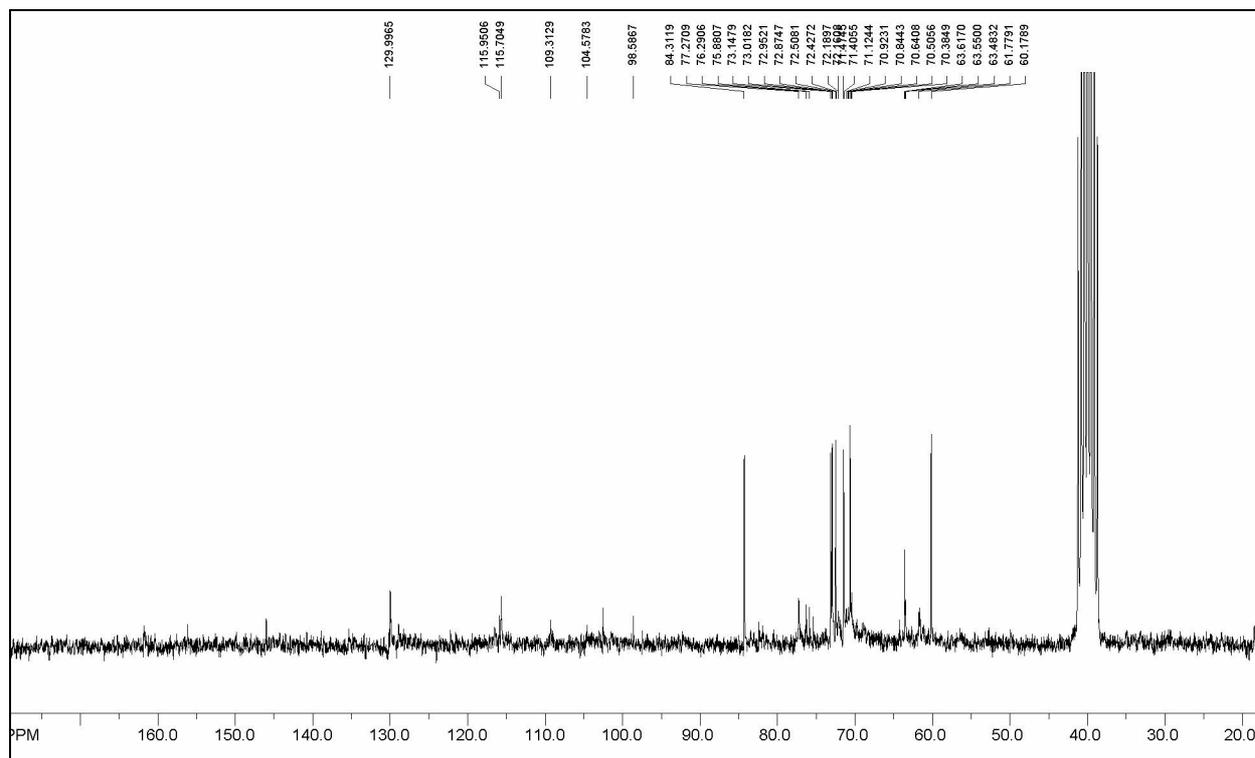


Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **MxEA** ( $\text{DMO-d}_6$ )

**Amostra: MxBu**

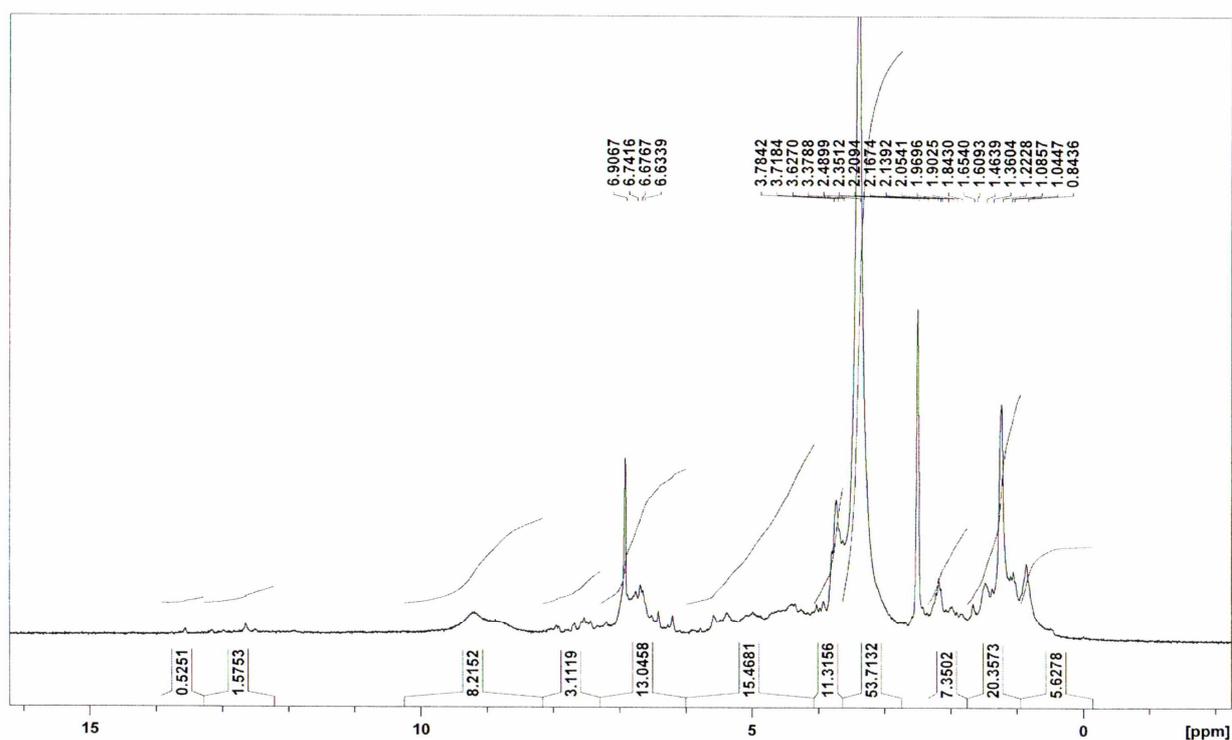


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxBu** ( $\text{DMSO-d}_6$ )

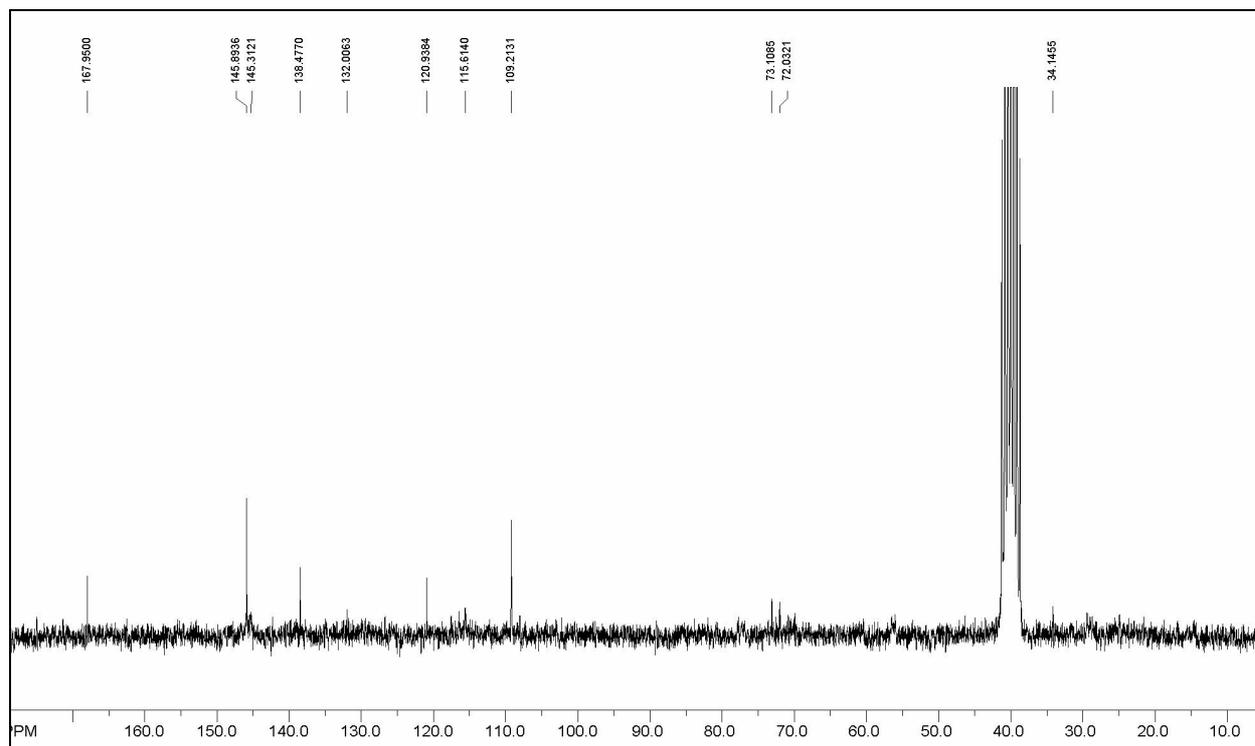


Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de **MxBu** ( $\text{DMSO}-d_6$ )

**Amostra: MxAc**

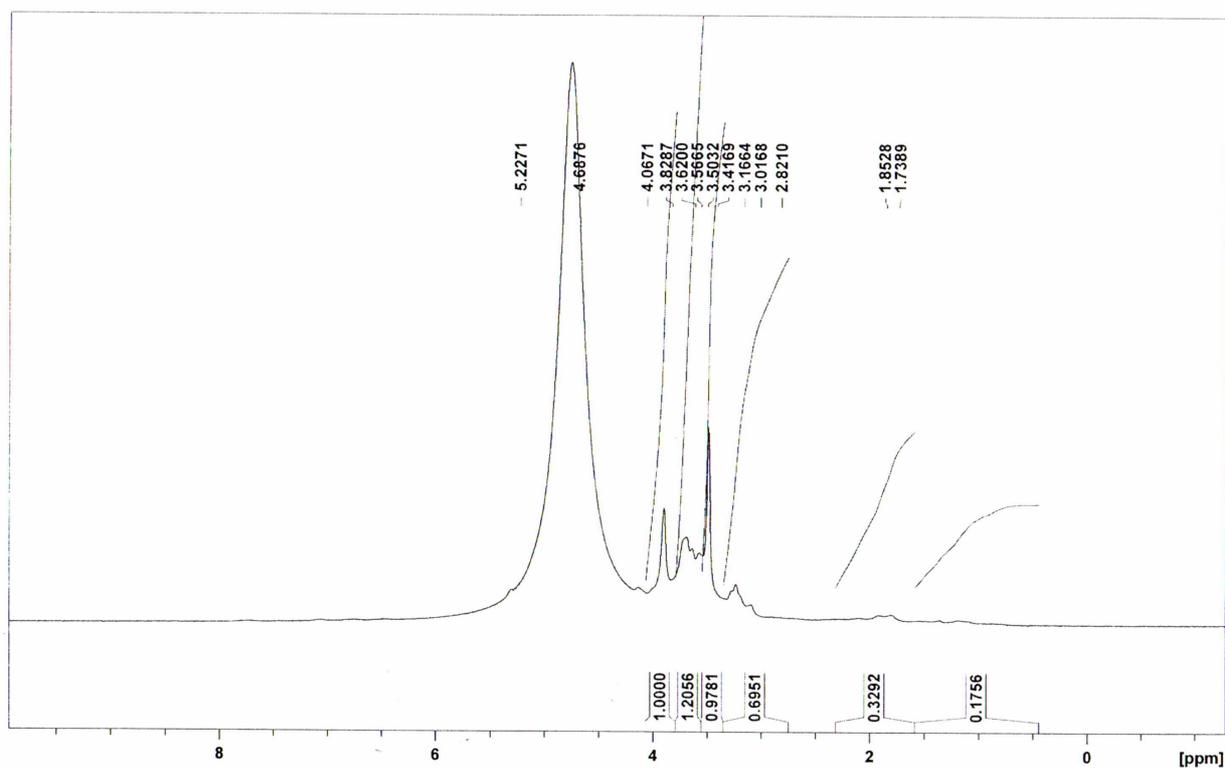


Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **MxAc** ( $\text{DMSO}-d_6$ )

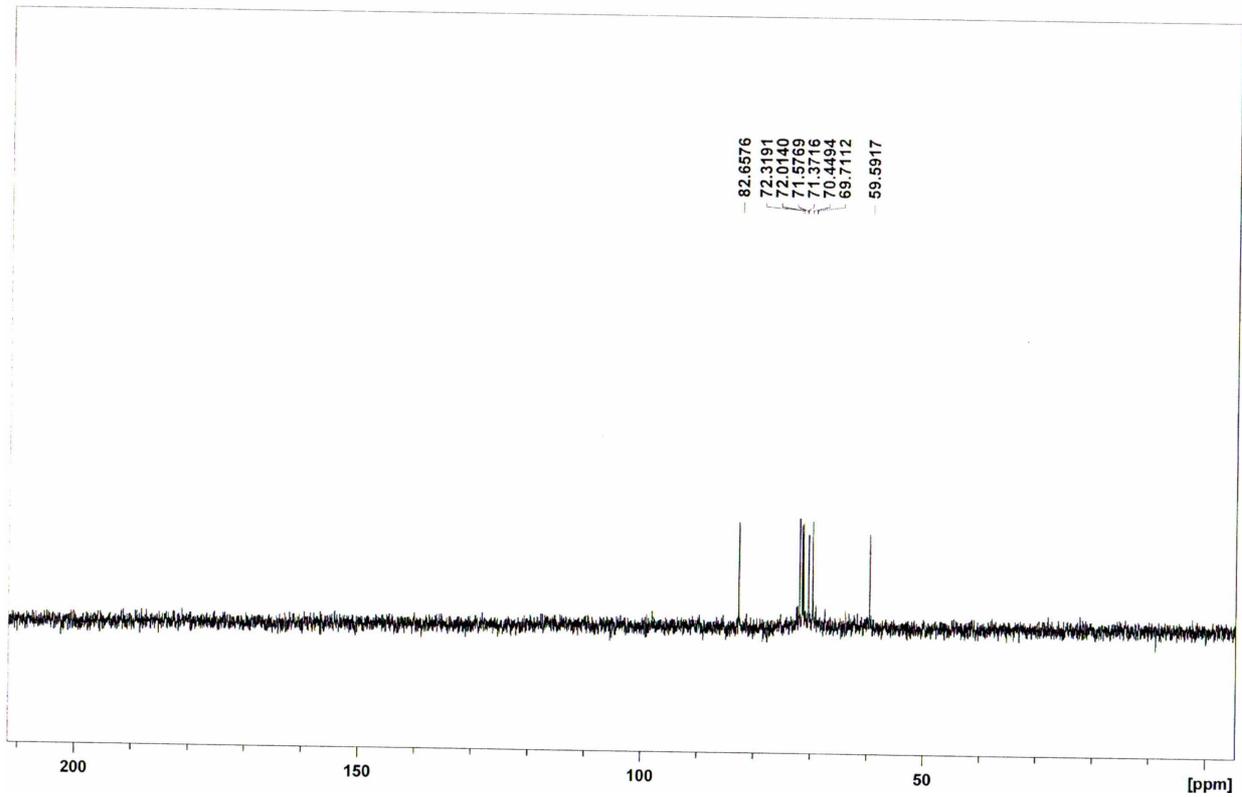


Espectro de RMN de <sup>13</sup>C de MxAc (DMSO-d<sub>6</sub>)

**Amostra: MxAq**



Espectro de RMN de <sup>1</sup>H de MxAq (D<sub>2</sub>O)



Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de  $\text{MxAq}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ )

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)