



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA E FARMACOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

MORFOLOGIA E ANATOMIA DE ÓRGÃOS AÉREOS, ESTUDO FITOQUÍMICO E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE *Acanthospermum australe* (Loelf.)

O. Kuntze (ASTERACEAE)

LÚCIA REGINA ROCHA MARTINS

MARINGÁ

2005

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**LÚCIA REGINA ROCHA MARTINS**

**MORFOLOGIA E ANATOMIA DOS ÓRGÃOS AÉREOS, ESTUDO FITOQUÍMICO E  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIVIRAL DE *Acanthospermum australe* (Loelf.)**

**O. Kuntze (ASTERACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez  
Departamento de Farmácia e Farmacologia –DFF/UEM

---

Prof. Milton Faccione  
Departamento de Química – DQ/UEL

---

Prof<sup>a</sup> Tânia Ueda Nakamura  
Departamento de Análises Clínicas – DAC/UEM

Aprovado em 28 de fevereiro de 2005.

À Dyrce: minha mãe, amiga e grande encorajadora.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, por ter-me presenteado com a oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Diógenes Aparício Garcia Cortez, mestre e amigo, quem primeiro acreditou neste trabalho e deu-me toda liberdade de produzi-lo, acompanhando e orientando cada fase de sua realização.

Agradeço ao Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura, pela oportunidade de realizar os experimentos de atividade antiviral e de microscopia eletrônica de varredura, além das sugestões na elaboração do trabalho final.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Káthia Socorro Mathias Mourão, mestre e amiga, pela excelente orientação nos trabalhos botânicos de descrição morfoanatômica, por sua dedicação e atenção ao meu trabalho e por sua preciosa amizade.

Agradeço ao Dr. Thomaz Aurélio Pagioro, pela disponibilização do aparelho de captação de imagens de microscopia ótica e do equipamento para elaboração do trabalho escrito, pelo incentivo, carinho, amizade, apoio e paciência.

À minha irmã, Lígia Cristina Rocha Martins, pelas sugestões, apoio e amizade nos momentos difíceis.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tânia Ueda Nakamura, pela orientação nos experimentos com cultura de células.

À Prof<sup>a</sup>. Adriana Lenita Meyer Albiero, pelo auxílio no preparo do material botânico, pela revisão feita no trabalho, pela amizade, paciência e dedicação que expressa em tudo que faz.

Agradeço aos professores do Departamento de Farmácia e Farmacologia: Dr. João Carlos Palazzo de Mello e Dr<sup>a</sup>. Izabel Cristina Piloto Ferreira, pela atenção, colaboração e amizade.

Aos professores do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos: Dr. Antônio Gilberto Ferreira, pela aquisição de espectros de RMN e orientação na elucidação estrutural e Dr. Edson Rodrigues Filho, pela obtenção dos espectros de massas.

Aos técnicos e funcionários do Laboratório de Preparação de Materiais do Departamento de Botânica da UEM: Nelson, Silvia e Izabel, pela atenção dispensada durante o preparo do laminário.

Ao professor Dr. Eduardo Radovanovic, do Departamento de Química da UEM, pela utilização do microscópio eletrônico de varredura (MEV) nas amostras vegetais.

À professora Dr. Sandra Mara Alessis Aristides Arraef, do Departamento de Imunologia Clínica da UEM, pela colaboração e disponibilização do equipamento de leitura de microplacas.

À técnica Ivânia, do Departamento de Química da UEM, pela ajuda na obtenção dos espectros de RMN e pela atenção que dispensou aos experimentos.

Ao técnico Admir Arantes, do Laboratório de Farmacognosia da UEM, pela amizade e colaboração em todos os passos do trabalho fitoquímico.

Ao Prof. Dr. Humberto Milani, pela concessão de uso do micrótomo, que foi indispensável para o trabalho botânico.

Aos colegas do Laboratório de Farmacognosia da UEM: Analice, Mislaine, Mariele, Juliana, Fátima, Marilene e Inês, pela amizade e auxílio sempre que necessário.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia da UEM: Adriana, Ivens, Patrícia Mincoff, Patrícia Shima, Tatiana, Raíssa, Cecília, Patrícia Santos, Marie, Zelita, Maria, Prisciliana, Nilza, Lígia Molinari.

Às secretárias Sônia e Helena, do Departamento de Farmácia e Farmacologia, pela paciência, atenção, colaboração e amizade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro.

A todos que torceram, incentivaram e/ou participaram de alguma forma para a realização deste trabalho, meu muito obrigada.



## RESUMO

A espécie *Acanthospermum australe* (Loelf.) O. Kuntze, um vegetal herbáceo, pertence à família Asteraceae e é amplamente distribuído no Brasil. É popularmente conhecido como “carrapichinho” e suas partes aéreas são usadas pela população em geral na forma de chá por infusão para o tratamento de diarreia, dispepsias, malária, febre, blenorragia, anemia, reumatismos, artrites, estagnações sangüíneas, inchaços e hemorragias. Para caracterização morfológica e anatômica, foram confeccionadas lâminas permanentes dos órgãos aéreos vegetativos (caule e folhas) e reprodutivos (flores e frutos). Para a análise ultraestrutural da superfície desses órgãos, foi realizada captura de imagens em Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Com a finalidade de obter dados de diagnose para identificação da droga vegetal, o pó das partes aéreas também foi examinado. Entre os elementos marcantes evidenciados pelo estudo microscópico, pode-se destacar a presença em grande quantidade de tricomas tectores pluricelulares e tricomas glandulares, que estão presente em todos os órgãos analisados. Das partes aéreas secas de *Acanthospermum australe*, obteve-se extrato bruto hidroetanólico 90%(v/v) pelo método de remaceração, que posteriormente foi liofilizado e mantido em freezer para garantir sua estabilidade. O fracionamento do extrato bruto liofilizado originou sete frações com composição em diferentes níveis de polaridade. Foram isolados dois flavonóides (quercetina e crisosplenol D) e uma lactona diterpênica (acetato de acantoaustralida). As substâncias foram identificadas por análises espectrais de UV, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HMQC, HMBC, NOE, TOCSY e EM/ESI e por comparação com os dados da literatura. O extrato bruto liofilizado e as frações dele obtidas foram investigadas quanto à atividade antiviral *in vitro*, utilizando cultura de

células Hep-2 (carcinoma de laringe humana) expostas à infecção por partículas virais de Herpesvirus bovino e Poliovirus vacinal, em diferentes concentrações. A avaliação da atividade antiviral se procedeu por método colorimétrico, utilizando microplacas de cultivo e leitor de ELISA a 550 nm. Os valores foram expressos como porcentagem de proteção celular, comparados ao controle de crescimento celular. Pelo mesmo método colorimétrico, analisou-se a citotoxicidade em células Hep-2 do extrato bruto liofilizado e suas frações, em diferentes concentrações. O extrato bruto liofilizado apresentou alta taxa de proteção celular nas concentrações entre 50 e 100 :g/ml sobre o Poliovírus vacinal, conferindo uma proteção celular entre 80 e 100%, respectivamente. As frações apresentaram valores variáveis de proteção celular em diferentes concentrações para Poliovirus vacinal e Herpesvirus bovino. Praticamente todas as frações apresentaram-se tóxicas para as células Hep-2 nas concentrações acima de 100:g/ml.

**Palavras chaves:** *Acanthospermum australe*, anatomia, microscopia eletrônica de varredura, flavonóides, lactona diterpênica, atividade antiviral.

## ABSTRACT

The species *Acanthospermum australe* (Loelf.) O. Kuntze is an herbaceous plant that appendage to Asteraceae family and is widely spread in Brazil. It is popularly known as “carrapichinho” and its aerial parts are used by population as tea by infusion for treatment of diarrhea, dyspepsias, malaria, fever, gonorrhoea, anaemia, rheumatism, arthritis, blood stagnation, swelling and bleeding. Aiming the morphologic and anatomic characterization of the plant, permanent slides of the aerial vegetative parts (stem and leaf) and reproductives (flower and fruit) were made. Image captures done in Scanning Electronic Microscopy were used for the overstructural analysis of the surface of the organs. Aiming to obtain data of diagnosis to plant identification, powder from aerial parts were also examined. Among the main features attained by microscopic study, can be detached the multicellulars tectors trichomes and glandulars trichomes that are in high amount in all analysed organs. From dried aerial parts of *Acanthospermum australe*, was obtained the crude hydroethanolic extract 90% (w/w), by remaceration method. The material to be used was liophilized and maintained in freezer for warrant its stability. The fractionation of liophilized crude extract resulted in seven fractions with different levels of polarity. Two flavonoids (quercetin and chrysoptanol D) and a diterpenic lacton (acanthoaustralide-1-O-acetate) were isolated. The compounds were identified through spectral analyses of UV, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT, COSY, HMQC, HMBC, NOE, TOCSY and ESI/MS and by confrontation with literature data. The liophilized crude extract and its fractions were evaluated for antiviral activity *in vitro*, using culture of Hep-2 cells (larynx carcinoma) infected by virals particles of bovine Herpesvirus and Poliovirus, in different concentrations. The evaluation of antiviral activity was made by

colorimetric method, using culture microplates and ELISA reader at 550 nm. The results were expressed as percentage of cellular growth. Using the same colorimetric method, the cytotoxicity was evaluated in Hep-2 cells for liophilized crude extract and fractions, in different concentration. The liophilized crude extract showed a high cellular protection in 50 and 100 :g/ml concentrations rate against Poliovirus, showing cellular protection between 80 and 100%, respectively. All the fractions showed variable values of cellular protection in different concentrations for Poliovirus and bovine Herpesvirus. Practically all fractions showed to be toxics for Hep-2 cells in concentration above 100 :g/ml.

**Key words:** *Acanthospermum australe*, anatomy, Scanning Electronic Microscopy, flavonoids, lacton diterpenic, antiviral activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figuras 1-3</b> – Aspecto geral da espécie <i>Acanthospermum australe</i> em seu habitat natural e desenho de parte de um ramo .....	31
<b>Figuras 4-8</b> – Anatomia do caule em estrutura primária e secundária .....	33
<b>Figuras 9-15</b> - Anatomia da folha – secções transversais, padrão de venação e cortes paradérmicos .....	36
<b>Figuras 16-21</b> – Microscopia eletrônica de varredura da superfície dos órgãos vegetativos de <i>Acanthospermum australe</i> .....	37
<b>Figuras 22-24</b> – Morfologia floral de <i>Acanthospermum australe</i> .....	38
<b>Figuras 25-27</b> – Anatomia das brácteas involucrais de <i>Acanthospermum australe</i> ..	40
<b>Figuras 28-34</b> – Microscopia eletrônica de varredura da superfície da inflorescência de <i>Acanthospermum australe</i> .....	41
<b>Figuras 35-44</b> – Anatomia da flor do disco de <i>Acanthospermum australe</i> .....	43
<b>Figuras 45-53</b> – Anatomia da flor do raio de <i>Acanthospermum australe</i> .....	46
<b>Figuras 54-63</b> – Desenvolvimento do fruto de <i>Acanthospermum australe</i> .....	49
<b>Figuras 64-73</b> – Fragmentos encontrados no pó de <i>Acanthospermum australe</i> .....	50
<b>Figura 74</b> – Cromatografia em camada delgada das frações obtidas a partir do Extrato Bruto Liofilizado de <i>Acanthospermum australe</i> .....	55
<b>Figura 75</b> – Espectro de UV de (1).....	60
<b>Figura 76</b> – Espectro de massas por Eletrospray de(1).....	61
<b>Figura 77</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H de (1) .....	62
<b>Figura 78</b> – Espectro bidimensional COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H de (1) .....	63
<b>Figura 79</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C de (1) .....	65
<b>Figura 80</b> – Espectro de RMN DEPT 135° e 90° de (1) .....	66

<b>Figura 81</b> – Espectro de RMN bidimensional HMQC de (1) .....	67
<b>Figura 82</b> – Espectro de RMN bidimensional HMBC de (1) .....	68
<b>Figura 83</b> – Espectros UV de (2).....	71
<b>Figura 84</b> – Espectro de massas por Eletrospray de (2).....	72
<b>Figura 85</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ de (2) .....	73
<b>Figura 86</b> – Espectro de RMN bidimensional COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de (2).....	74
<b>Figura 87</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de (2) .....	76
<b>Figura 88</b> - Espectro de RMN DEPT $135^\circ$ e $90^\circ$ de (2).....	77
<b>Figura 89</b> - Espectro de RMN bidimensional HMQC de (2).....	78
<b>Figura 90</b> - Espectro de RMN bidimensional HMBC de (2).....	79
<b>Figura 91</b> – Espectro UV de (3) .....	81
<b>Figura 92</b> – Espectro de massas por Eletrospray de (3).....	82
<b>Figura 93</b> - Espectro de RMN $^1\text{H}$ de (3) .....	83
<b>Figura 94</b> - Espectro de RMN bidimensional COSY $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ de (3) .....	84
<b>Figura 95</b> - Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ de (3).....	86
<b>Figura 96</b> - Espectro de RMN DEPT $135^\circ$ e $90^\circ$ de (3) .....	87
<b>Figura 97</b> - Espectro de RMN bidimensional HMQC de (3) .....	89
<b>Figura 98</b> - Espectro de RMN bidimensional HMBC de (3) .....	90
<b>Figura 99</b> - Correlações observadas em experimento de RMN NOE de (3).....	91
<b>Figura 100</b> - Correlações observadas em experimento de RMN TOCSY de (3).....	92
<b>Figura 101</b> – Diluição seriada do Extrato Bruto Liofilizado e frações para experimentos de citotoxicidade e atividade antiviral .....	98

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Sistemas Eluentes para coluna de fracionamento à vácuo do Extrato Bruto Liofilizado de <i>Acanthospermum australe</i> .....	54
<b>Tabela 2</b> – Sistemas Eluentes para Cromatografia em Coluna pelo método flash, para purificação da fração F4F .....	57
<b>Tabela 3</b> – Sistemas Eluentes em gradiente de polaridade crescente para Cromatografia em Coluna em sílica gel da fração diclorometano .....	58
<b>Tabela 4</b> – Sistemas Eluentes para Cromatografia em Coluna pelo método flash, para purificação da fração D9 .....	59
<b>Tabela 5</b> – Dados de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>1</b> e correlações obtidas no COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H .....	64
<b>Tabela 6</b> – Dados de <sup>13</sup> C e DEPT da substância <b>1</b> , comparados com dados da literatura .....	64
<b>Tabela 7</b> – Correlações de Carbono e hidrogênio HMQC e HMBC da substância <b>1</b> .....	69
<b>Tabela 8</b> – Dados de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>2</b> e correlações obtidas no COSY <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H .....	75
<b>Tabela 9</b> – Dados de RMN <sup>13</sup> C e DEPT da substância <b>2</b> , comparados com dados da literatura .....	75
<b>Tabela 10</b> – Correlações de carbono e hidrogênio HMQC e HMBC da substância <b>2</b> .....	81
<b>Tabela 11</b> – Dados de RMN <sup>1</sup> H da substância <b>3</b> , comparados com dados da literatura .....	86
<b>Tabela 12</b> – Dados de <sup>13</sup> C e DEPT da substância <b>3</b> .....	89

<b>Tabela 13</b> – Correlações de carbono e hidrogênio HMQC e HMBC da substância <b>3</b> .....	94
<b>Tabela 14</b> – Atividade antiviral do Extrato Bruto Liofilizado e frações obtidas de <i>Acanthospermum australe</i> para Herpesvirus bovino e Poliovirus vacinal .....	105
<b>Tabela 15</b> - Valores de citotoxicidade do Extrato Bruto Liofilizado e frações obtidas de <i>Acanthospermum australe</i> sobre células Hep-2 .....	105



## LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1** – Esquema de obtenção e fracionamento do Extrato Bruto Liofilizado hidroetanólico 90% (v/v) de *Acanthospermum australe* .....55
- Fluxograma 2** – Esquema de fracionamento e purificação da fração F4 .....57
- Fluxograma 3** – Esquema de fracionamento e purificação da fração F3 .....59

## LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

### ABREVIATURAS

BII	Bráctea Involucral Interna
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCV	Cromatografia em Coluna à Vácuo
COSY	Correlated Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EBL	Extrato Bruto Liofilizado
ES/EM	Eletrospray acoplada à Espectrometria de Massas
FM	Fase móvel
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear One Bond Coupling
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Ultravioleta-visível

### SÍMBOLOS

<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto

J	Constante de acoplamento
$\log \gamma$	Absortividade molar
<i>m</i>	Multiplete
$M^+$	Pico do íon molecular
$[M-H]^-$	Pico do íon pseudomolecular negativo
$[M-H]^+$	Pico do íon pseudomolecular positivo
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
<i>t</i>	Triplete
<i>s</i>	Singleto
*	Deslocamento químico

#### UNIDADES

Hz	Hertz
MHz	Megahertz
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{m}$	Micrômetro
ml	Mililitro
mM	Milimolar

## SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO .....	20
1.1 – Aspecto Botânico.....	21
1.2 – Atividade Antiviral.....	21
II – REVISÃO DE LITERATURA.....	23
2.1 – Família Asteraceae - Gênero <i>Acanthospermum</i> .....	23
2.2 – A espécie <i>Acanthospermum australe</i> (Loelf.) O. Kuntze.....	24
III – OBJETIVOS.....	27
IV – PARTE EXPERIMENTAL.....	28
PARTE 1 – MORFOLOGIA E ANATOMIA DOS ÓRGÃOS AÉREOS DE <i>Acanthospermum australe</i> (Loelf.) O. Kuntze (Asteraceae).....	28
1.1 – MATERIAIS E MÉTODOS .....	28
1.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
1.2.1 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	30
1.2.2 – ANATOMIA DE CAULE.....	31
1.2.3 – ANATOMIA DA FOLHA.....	34
1.2.4 – MORFOLOGIA FLORAL.....	38
1.2.5 – ANATOMIA DA INFLORESCÊNCIA.....	39
1.2.6 - Anatomia das flores do disco (monóclinas).....	40
1.2.7 – Anatomia das flores do raio (femininas).....	44
1.2.8 – ANATOMIA DO FRUTO.....	47
1.2.9 – DIAGNOSE DO PÓ.....	48
PARTE 2 – ESTUDO FITOQUÍMICO.....	51
2.1 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
2.2 – Preparo do material vegetal.....	52

<b>2.3 – Método extrativo.....</b>	<b>52</b>
<b>2.4 – Obtenção do Extrato Bruto Liofilizado.....</b>	<b>53</b>
<b>2.5 – Fracionamento do Extrato Bruto Liofilizado (EBL).....</b>	<b>53</b>
<b>2.6 – Purificação da fração F4.....</b>	<b>56</b>
<b>2.7 – Purificação da fração F3.....</b>	<b>57</b>
<b>2.8 – RESULTADOS – Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas.....</b>	<b>59</b>
<b>2.8.1 – Substância 1.....</b>	<b>59</b>
<b>2.8.2 – Substância 2 .....</b>	<b>70</b>
<b>2.8.3 – Substância 3.....</b>	<b>81</b>
<b>PARTE 3 – ATIVIDADE ANTIVIRAL.....</b>	<b>94</b>
<b>3.1 – MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>94</b>
<b>3.2 – Cultura de Células.....</b>	<b>94</b>
<b>3.3 – Partículas Virais.....</b>	<b>95</b>
<b>3.4 – Ensaio Antiviral.....</b>	<b>95</b>
<b>3.5 – Ensaio de Citotoxicidade.....</b>	<b>98</b>
<b>3.6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>99</b>
<b>V – CONCLUSÕES.....</b>	<b>105</b>
<b>VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>
<b>ANEXO I .....</b>	<b>115</b>

## I - INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pela população, em busca de cura para as mais variadas moléstias, é um costume muito difundido não só no Brasil, como em todo o mundo. Esta prática foi sedimentando-se ao longo do tempo, como resultado do acúmulo de conhecimentos sobre a ação das plantas por diversos grupos étnicos (ALBIERO, 2001).

O Brasil tem uma enorme variedade de plantas com potenciais medicinais ainda não pesquisados e que são promissoras fontes de inovações terapêuticas e farmacológicas para as mais diversas áreas da saúde humana. A importância medicinal, econômica e ecológica de espécies nativas brasileiras, bem como o risco de sua extinção pela ação predatória do homem, têm motivado os estudos destas plantas, visando sua preservação e aproveitamento racional pelo homem (SOUZA et al., 2003).

Segundo Yunes e Calixto (2001), o panorama para a fitoquímica é muito mais importante e decisivo para o Brasil, num futuro próximo, ao considerarmos sua grande riqueza vegetal ainda sem estudo, e as possibilidades que observamos para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações da medicina popular. Já é do conhecimento que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas orientadas pelo seu uso na medicina popular do que em plantas escolhidas ao acaso (Houghton; Raman, 1998).

## **1.1 – ASPECTO BOTÂNICO**

Um dos aspectos mais delicados da fitoterapia é a identidade das plantas, que pode variar para cada região do Brasil, devido à diversidade de nomes vernaculares que lhes são atribuídos (LORENZI; MATOS, 2002). Assim, um trabalho com fitoterápico se inicia com a correta identificação da espécie estudada. Dentre as evidências utilizadas para esse fim, as características morfológicas e anatômicas estão entre as mais baratas e acessíveis. Considerando que os fitoterápicos são comercializados, em grande parte, sob a forma de pó, ou seja, bastante fragmentados, as descrições morfoanatômicas estão entre as primeiras a serem utilizadas para o controle de qualidade.

## **1.2 – ATIVIDADE ANTIVIRAL**

Infecções virais são um importante problema de saúde em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos, devido à alta morbidade e mortalidade (KOTT et al., 1999). Desde a identificação do retrovírus HIV (human immunodeficiency vírus) como o agente causador da AIDS (acquired immunodeficiency syndrome), houve uma maior incidência de várias infecções causadas por vírus, tais como vírus do herpes simples, da varicela-zoster, citomegalovírus e Epstein-Barr vírus, em pacientes imunocomprometidos. Além disso, o impacto socioeconômico de infecções virais do trato respiratório (influenza, adeno, corona e rinovirose) e do trato gastrointestinal (rotavírus) também têm contribuído para impulsionar a pesquisa de novos agentes antivirais e novas

modalidades de tratamentos com quimioterápicos antivirais (VLIETINCK; BERGHE, 1991).

O desenvolvimento de novos agentes antivirais é uma tarefa árdua, devido aos efeitos tóxicos, que são comuns, e ao desenvolvimento rápido de resistência viral (KOTT et al., 1999).

Os métodos normalmente utilizados para avaliar a atividade antiviral *in vitro* de substâncias puras ou misturas (p. ex., em extratos vegetais brutos) baseiam-se na habilidade de inibir a replicação da partícula viral em cultura de células. Alguns vírus podem causar efeitos citopáticos (danos celulares) ou promover a formação de placas (destruição celular), outros são capazes de acarretar transformações nas funções celulares. A replicação viral em cultura de células também pode ser monitorada pela detecção de produtos virais, tais como DNA, RNA ou polipeptídeos virais. Todavia o custo, simplicidade, reprodutibilidade e também seletividade, especificidade e sensibilidade são fatores a serem considerados na escolha por um método de detecção, principalmente para extratos vegetais (COWAN, 1999; VLIETINCK; BERGHE, 1991).

Entre as várias plantas já pesquisadas em trabalhos de screening para avaliação do potencial antiviral, a família Asteraceae é uma das mais pesquisadas (PALOMINO et al. , 2002; SUMMERFIELD et al., 1997; SEMPLE et al., 1999). Isto se deve, em parte, à presença de compostos polifenólicos, marcadamente flavonóides, na grande maioria das espécies dessa família e à já comprovada atividade antiviral desse grupo de compostos (COWAN, 1999; VLIETINCK; BERGHE, 1991).



## II - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 – Família Asteraceae - Gênero *Acanthospermum*

A família Asteraceae é cosmopolita, contando com aproximadamente 1.100 gêneros e 25.000 espécies, encontradas em regiões tropicais, subtropicais e temperadas, sendo mais abundantes nas regiões áridas do que nas florestas tropicais úmidas. No Brasil está representada por cerca de 180 gêneros. Na grande maioria, as espécies de Asteraceae são vegetais herbáceos, anuais ou perenes, subarbustivos ou arbustivos e raramente, vegetais arbóreos (BARROSO, 1991).

O Gênero *Acanthospermum* compreende 4 espécies descritas e conhecidas botanicamente: *A. australe*, *A. hispidum*, *A. humile* e *A. xanthioides*. Dentre elas, a espécie *Acanthospermum hispidum* tem sido muito utilizada em pesquisas de atividades biológicas, baseado na utilização popular dessa espécie em várias partes do mundo, sob a forma de chás, para o tratamento de verrugas, como descreve Madge (1998), para o tratamento de úlcera péptica, segundo Noumi e Dibakto (2000), dentre outras aplicações.

Em 1997, Summerfield et al. determinaram a atividade antiviral do extrato aquoso de folhas de *Acanthospermum hispidum*, obtendo forte atividade sobre alfa herpesvirus. Em 2002, Ali et al. avaliaram o potencial de extratos metanólicos de plantas, entre elas *Acanthospermum hispidum*, quanto à atividade in vitro sobre HIV-1-RT, além de sua citotoxicidade.

Em 2003, Fleischer, Ameade e Sawyer pesquisaram a atividade antimicrobiana de extratos etanólicos de *Acanthospermum hispidum*, obtendo diferentes níveis de atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram positivas. Também em 2003, Sanon

et al. pesquisaram a atividade antiplasmodial *in vitro* de vários extratos de plantas, sendo que a espécie *A. hispidum* apresentou relevante atividade sobre o agente etiológico da malária.

## **2.2 – A espécie *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze**

A espécie herbácea *Acanthospermum australe* (Loefl.) O. Kuntze pertence à família Asteraceae, tribo Heliantheae e subtribo Melampodinae. É comumente conhecida no Brasil como: carrapichinho, carrapicho de carneiro, carrapicho-rasteiro, amor-de-negro, mata-pasto, picão-da-praia, maroto, dentre outros. É anual, prostrada ou decumbente, ramificada, de caules arroxeados e pubescentes, de 20-40 cm de comprimento, nativa da América tropical. Apresenta folhas simples, opostas, inteiras ou de margens irregularmente serradas, cartáceas, de 1,5-3,5 cm de comprimento. As inflorescências são capítulos terminais e axilares, com poucas flores de cor amarelada. O fruto é do tipo aquênio, provido de projeções rígidas. Multiplica-se apenas por sementes. Esta planta é amplamente dispersa no país, onde cresce com grande vigor em solos agrícolas, principalmente os originados de campos e cerrados de textura mais arenosa, em pastagens e terrenos baldios, sendo considerada uma planta daninha pelos agricultores (SINGH, 1973; LORENZI & MATOS, 2002).

Segundo o trabalho de pesquisa etnobotânica de Rodrigues e Carvalho (2001) e também de Lorenzi e Matos (2002), os ramos contendo as folhas e as raízes de *Acanthospermum australe* são amplamente empregadas na medicina tradicional brasileira, na forma de chá por infusão ou decocção, sendo considerada tônica, diaforética, eupéptica, vermífuga, antidiarréica, mucilagínosa, antimalárica,

aromática, antiblenorrágica, febrífuga e antianêmica. Em uso externo, na forma de banho, é indicado contra dores lombares, renais ou nos membros, úlceras, feridas e micoses.

No trabalho de Shimizu et al. (1987), relata-se o uso de *A. australe* no tratamento de estagnações sangüíneas, reumatismos e artrites por via oral, além do uso externo em inchaços e hemorragias.

Estudos químicos e farmacológicos, visando validar as propriedades atribuídas pela medicina tradicional, levaram ao isolamento de flavonóides e do acantostal, um germacranolídeo com atividade inibitória de tumores cancerosos (MATSUNAGA, 1996). Shimizu et al. (1987), já haviam estudado e analisado o extrato bruto etanólico de *A. australe* quanto à atividade inibitória sobre a enzima aldose redutase em ratos. Neste trabalho, foram isolados cinco flavonóides (5,7,4'-triidroxil-3,6-dimetoxiflavona, trifolin, hiperin, rutina e quercetina) e ácido cafeico da fração n-butanólica, sendo que a flavona triidroxilada foi considerada a responsável pela atividade encontrada.

Foi constatado por Carvalho et al. (1991), que o extrato bruto de *Acanthospermum australe* foi parcialmente ativo contra *Plasmodium falciparum* em ratos infectados. Também na revisão feita por Krettli et al. (2001), cita-se o extrato hexânico e etanólico da espécie *A. australe*, pela presença de atividade sobre espécies de *Plasmodium*.

Em 1997, Macêdo et al. pesquisaram a atividade larvicida de diversos extratos vegetais, dentre eles *Acanthospermum australe*, sobre larvas de *Aedes fluviatilis*. Em 1999, Mendes et al. pesquisaram, através de experimento de "screening" com diversos extratos vegetais da família Asteraceae, a atividade moluscicida do extrato etanólico de *A. australe*. Em 2001, Portillo et al. pesquisaram em extratos de

diferentes espécies vegetais do Paraguai, dentre elas *A. australe*, a atividade antifúngica sobre fungos leveduriformes e dermatófitos.

Análises fitoquímicas das partes aéreas de *Acanthospermum australe* constataram a presença de muitas lactonas sesquiterpênicas e diterpênicas e de óleo essencial rico em elemeno, cariofileno, cardineno e germavreno A (BOHLMANN et al., 1981; BOHLMANN, 1984; HERZ, 1975; MORAIS, 1997).

Debenedetti et al. (1987) isolaram quatro metoxi-flavonóides das partes aéreas de *A. australe*, sendo eles: penduletina, crisosplenol D, axilarina e 5,7,4'-triidroxí-3,6-dimetoxiflavona.

Segundo Lorenzi e Matos (2002), "(...) o amplo emprego desta planta nas práticas caseiras da medicina tradicional,(...), se constituem em motivo suficiente para sua seleção, como tema de estudos mais aprofundados, com vista a um medicamento seguro e eficaz".

### III – OBJETIVOS

- 1) Realizar a descrição morfoanatômica das partes aéreas (estruturas vegetativas e reprodutivas) da espécie *Acanthospermum australe*, contribuindo para o conhecimento do seu perfil farmacognóstico.
- 2) Purificar e isolar substâncias químicas presentes no extrato hidroetanólico 90% (v/v), obtido a partir de partes aéreas (flores, frutos, folhas e caules) de *Acanthospermum australe*, buscando com isso contribuir com a quimiosistemática da espécie.
- 3) Realizar ensaios biológicos *in vitro* para avaliar a atividade antiviral do extrato bruto hidroetanólico de *Acanthospermum australe*, assim como das subfrações dele derivadas, utilizando cultura de células expostas à infecção por Herpesvirus bovino e Poliovírus vacinal.
- 4) Realizar ensaios biológicos *in vitro* para avaliar a citotoxicidade do extrato bruto hidroetanólico de *Acanthospermum australe*, assim como das subfrações dele derivadas, sobre cultura de células Hep-2 (carcinoma de laringe humana).

## IV - PARTE EXPERIMENTAL

### PARTE 1 – MORFOLOGIA E ANATOMIA DOS ÓRGÃOS AÉREOS DE *Acanthospermum australe* (Loelf.) O. Kuntze (Asteraceae)

#### 1.1 - MATERIAIS E MÉTODOS

As partes aéreas (caule, folhas, flores e frutos) de *Acanthospermum australe* (**Fig. 1**) foram coletadas em abril de 2003, na periferia da cidade de Campo Grande/MS, em uma região de cerrado. Parte do material vegetal foi herborizado e depositado como documento taxonômico sob número de registro HUM 10.508 no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (HUM).

As análises morfológicas e anatômicas foram feitas em material vegetal fresco e fixado em solução de FAA 50 e conservado em etanol 70% (v/v), segundo técnica descrita por Johansen (1940).

A análise morfológica macroscópica do vegetal fresco e fixado foi feita através da observação em lupa estereoscópica Leica. Os desenhos e diagramas foram elaborados com auxílio de câmara clara, projetando-se, nas mesmas condições ópticas, a escala correspondente.

Foram realizados cortes transversais a mão livre do caule em dois estágios de desenvolvimento. A partir desse material, foram preparadas lâminas semipermanentes com os cortes descorados em solução de hipoclorito de sódio a 20%, lavados em água destilada e corados com safranina 1% e solução de azul de Astra a 1% (GERLACH, 1969), montados entre lâmina e lamínula com gelatina

glicerinada e observados em microscópio ótico. Da mesma forma, foram preparados cortes paradérmicos das folhas.

Devido à fragilidade dos tecidos, as folhas, flores e frutos foram incluídos em historresina de metacrilato (Leica Historesin), segundo as técnicas descritas por Guerrits (1991) e Carmello-Guerreiro (1995). O material vegetal fixado foi desidratado com série etanólica (etanol 70%, 96% e 100%, ficando 2 horas em cada), parainfiltrado à temperatura ambiente em uma mistura de etanol:resina líquida (1:1) por 4 horas a vácuo, infiltrado com uma solução de ativador em pó a 1% em resina líquida por 24 horas a vácuo e, posteriormente, a resina líquida foi polimerizada com o acréscimo de endurecedor. Essa mistura foi colocada nos moldes (histomold) e os fragmentos vegetais foram dispostos na orientação adequada, permanecendo em estufa a 40°C até completo endurecimento e então cortados. A espessura dos cortes variou entre 8 e 12µm e foram corados com solução aquosa de azul de toluidina 1% (O'BRIEN, FEDER e McCULLY, 1964) e montadas em Permount.

O pó das partes aéreas foi analisado microscopicamente, para que se pudesse obter dados de diagnose e controle de qualidade do vegetal. Foram montadas lâminas semipermanentes do pó (20 mesh), clarificado com solução de hipoclorito de sódio a 20%, durante 3 minutos, lavado sucessivas vezes com água destilada e corado com safranina e azul de Astra. Após nova lavagem foi centrifugado (1000 rpm por 2 minutos) e montado entre lâmina e lamínula com gelatina glicerinada (ALBIERO et al., 2001).

Para que se pudesse observar com clareza o padrão de distribuição dos feixes vasculares nas folhas, foi realizada a diafanização das mesmas, seguindo as técnicas descritas por Handro (1964) e Felipe e Alencastro (1966), com algumas

modificações. Folhas inteiras e sem defeitos foram lavadas em água corrente por 60 minutos e colocadas em solução aquosa de NaOH a 3% até que ficassem amareladas. Lavou-se por 60 minutos em água corrente e colocou-se em solução de hipoclorito de sódio 20% até o total branqueamento. Após nova lavagem, desidratou-se em série alcoólica até álcool 50%. As folhas foram coradas com solução aquosa de safranina 1% e continuou-se a desidratação a partir do álcool 50% até 100%; passou-se pela série xilóica e montou-se entre lâmina e lamínula com Permount.

A análise da superfície das folhas, caule e inflorescências foi realizada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). O material vegetal, previamente fixado em solução FAA 50, foi submetido ao ponto crítico em aparelho BALZERS CPD 030, posteriormente foi metalizado com ouro e a visualização e captura de imagens foi feita em aparelho SHIMADZU SS-550.

Os aspectos anatômicos dos cortes das folhas, caule, frutos e flores foram observados, descritos e ilustrados utilizando-se microscópio ótico. As fotomicrografias foram obtidas pelo programa de imagem Pro-Plus, versão 4.0 (Media Cybernetics) e as escalas referentes às ilustrações foram obtidas utilizando-se régua milimetrada e lâmina micrométrica, nas mesmas condições óticas utilizadas para cada caso.

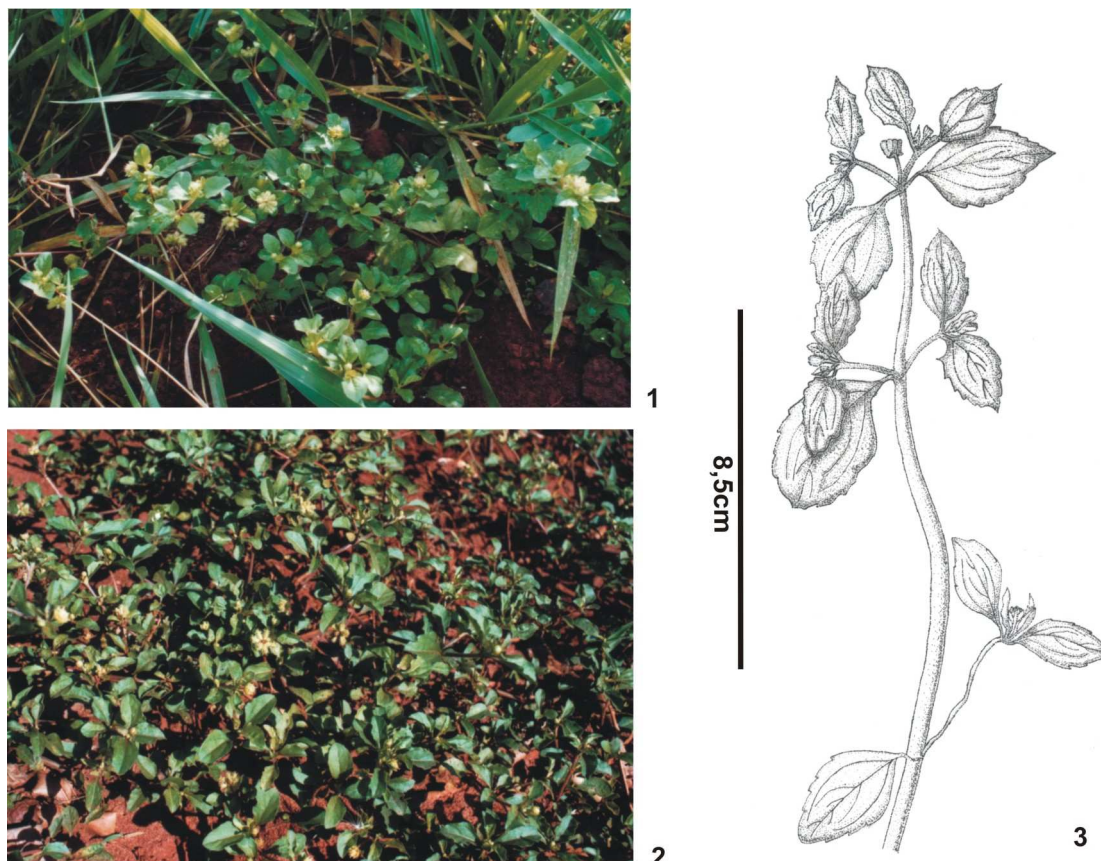
## **1.2 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **1.2.1 – ASPECTOS MORFOLÓGICOS**

*Acanthospermum australe* apresenta hábito arbustivo, com os ramos cilíndricos prostados e bastante ramificados, de aproximadamente 20 cm de



comprimento. As folhas são opostas, inteiras, com margens serradas e comprimento médio de três centímetros. As inflorescências são levemente amareladas e envoltas por brácteas membranáceas externas (**Fig. 1-3**).



**Figuras 1-3.** *Acanthospermum australe* (Loelf) O. Kuntze. **1 e 2** - Aspecto geral de espécimes em seu habitat natural; **3** – Desenho de parte de um ramo.

### 1.2.2- ANATOMIA DE CAULE

O caule em estrutura primária apresenta epiderme com células cúbicas, na qual se observam tricomas pluricelulares, unisseriados, de extremidades afiladas (**Fig. 16-17**), além de tricomas glandulares, pluricelulares, sésseis, de formato ovóide, constituído por cerca de 5 séries de células secretoras e cutícula distendida no ápice (**Fig. 6 e 17**).

Na região interna do caule em estrutura primária, o córtex é constituído por 4 camadas de colênquima subepidérmico contínuo, com espessamento angular-lamelar; abaixo do colênquima encontram-se cerca de 3 camadas de parênquima clorofiliano, onde ocorrem ductos secretores dispostos alternadamente aos feixes vasculares. A endoderme é estrutura distinta e constituída por bainha amilífera (**Fig. 4 e 7**).

No cilindro vascular ou central encontram-se feixes colaterais separados por parênquima interfascicular largo. A medula é parenquimática e, nas proximidades dos feixes vasculares, encontram-se também ductos secretores de diâmetro variável, contendo 4 a 5 células, apresentando formato rosulado (**Fig. 4**). Fahn (1979) relata a família Asteraceae como uma das principais famílias onde são encontrados ductos secretores de substâncias lipofílicas, que podem conter terpenos polissacarídicos e outros componentes.

O caule de *Acanthospermum australe* apresenta apenas crescimento secundário inicial, sendo este o crescimento típico do caule de dicotiledôneas. A epiderme se mantém e os tricomas tornam-se mais espaçados. No colênquima, o espessamento lamelar se acentua. Nesta fase, calotas de fibras encontram-se bem diferenciadas sobre o floema (**Fig. 5 e 8**).



### 1.2.3 - ANATOMIA DA FOLHA

As folhas apresentam células epidérmicas com formato tabular, revestidas por cutícula fina e são maiores na face adaxial. É anfiestomática, com estômatos anomocíticos num nível acima das demais células epidérmicas (**Fig. 14,15 e 20**). Em ambas as faces do limbo foliar, nota-se a presença de tricomas tectores pluricelulares esparsos e aglomerados sobre as nervuras, acompanhando os feixes vasculares. Tricomas glandulares também estão uniformemente distribuídos por todo o limbo (**Fig. 18-21**).

Em corte transversal, a folha apresenta parênquima paliádico constituído por uma única camada de células colunares de disposição compacta, exceto quando limitam as câmaras subestomáticas. O parênquima lacunoso é constituído por células, na maioria, isodiamétricas, com cerca de 4 a 5 camadas, de disposição pouco compacta (**Fig. 9-11**).

No ápice foliar, a região da nervura central é formada por um único feixe vascular de tamanho bastante reduzido, circundado por 1 camada de parênquima e com um grande ducto secretor na face superior da folha. Há pouco colênquima subepidérmico nas duas faces. No meio foliar, a nervura principal apresenta um único feixe colateral de maior calibre. Colênquima subepidérmico é observado tanto na face superior quanto inferior (**Fig. 10**).

Na base da folha, são observadas três nervuras de grande calibre, sendo a central a maior delas. Na região dessas nervuras, as de menor porte são constituídas por um único feixe colateral aberto e na nervura central observam-se 3 feixes colaterais. Os feixes são circundados por parênquima, no qual ocorrem ductos secretores, ocorrendo colênquima em ambas as faces (**Fig. 11**).

No pecíolo, ocorrem cinco feixes vasculares, formados pela confluência dos feixes vasculares na base da folha (**Fig. 12**).

A anatomia das folhas de *Acanthospermum australe* é compatível com as descrições feitas por Melo-de-Pinna e Menezes (2002), que descreveram a estrutura de órgãos vegetativos de *Ianthopappus corymbosus*, outra espécie de Asteraceae, principalmente com relação à distribuição das estruturas epidérmicas e dos feixes vasculares. A presença de estômatos anomocíticos em ambas as faces do limbo foliar (adaxial e abaxial) também foi relatado em 1998, na descrição anatômica comparativa de várias espécies vegetais da família Asteraceae, por Breitwieser e Ward e também no trabalho sobre estruturas foliares de *Inula viscosa* (Asteraceae) de Nikolakaki e Christodoulakis (2004) .

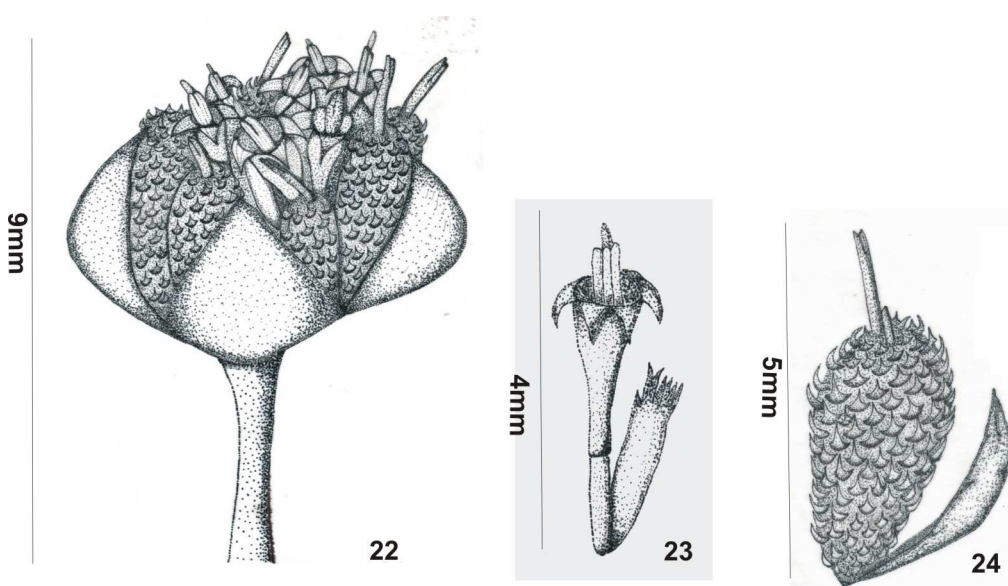
Segundo a classificação do padrão de venação proposto por Hickey (1973), as folhas de *Acanthospermum australe* são simétricas, de base assimétrica, formato oval largo, de ápice obtuso e base aguda. As margens são serreadas côncavo-retas e a textura é cartácea. A venação é acródromo basal do tipo imperfeito. Quanto à nervura primária, apresenta curso reto e calibre pequeno. As nervuras secundárias apresentam ângulo de divergência agudo, com curso sinuoso (ver desenho do padrão de venação na próxima página). As nervuras terciárias têm padrão ortogonal reticulado, sendo as aréolas do tipo quadrangular, com vênulas terminais bifurcadas uma vez (**Fig. 13**).





### 1.2.4 - MORFOLOGIA FLORAL

As flores estão reunidas em capítulos racemosos, com a aparência de uma flor isolada, cujo receptáculo é côncavo. Há apenas um verticilo de brácteas involucrais foliáceas (**Fig. 22**), denominadas filárias, que têm o papel de sépalas. Segundo Barroso (1991), os capítulos são classificados como pleiomorfos e são caracterizados pela simetria radial e quantidade definida de flores do raio.



**Figuras 22-24.** *Acanthospermum australe*. **22.** Capítulo floral inteiro. **23.** Flor masculina do disco. **24.** Flor feminina do raio

As flores do raio (marginais) são femininas e estão individualmente envolvidas por bráctea involucral interna em forma de urna, apresentando espinhos curvos que, segundo Souza (2003), servem à dispersão posterior do fruto; é monoclamídea e de corola ligulada (**Fig. 24,31-33**).

As flores do disco são monóclinas e nascem na axila de uma bráctea, sendo funcionalmente masculinas. São monoclamídeas e apresentam corola gamopétala,

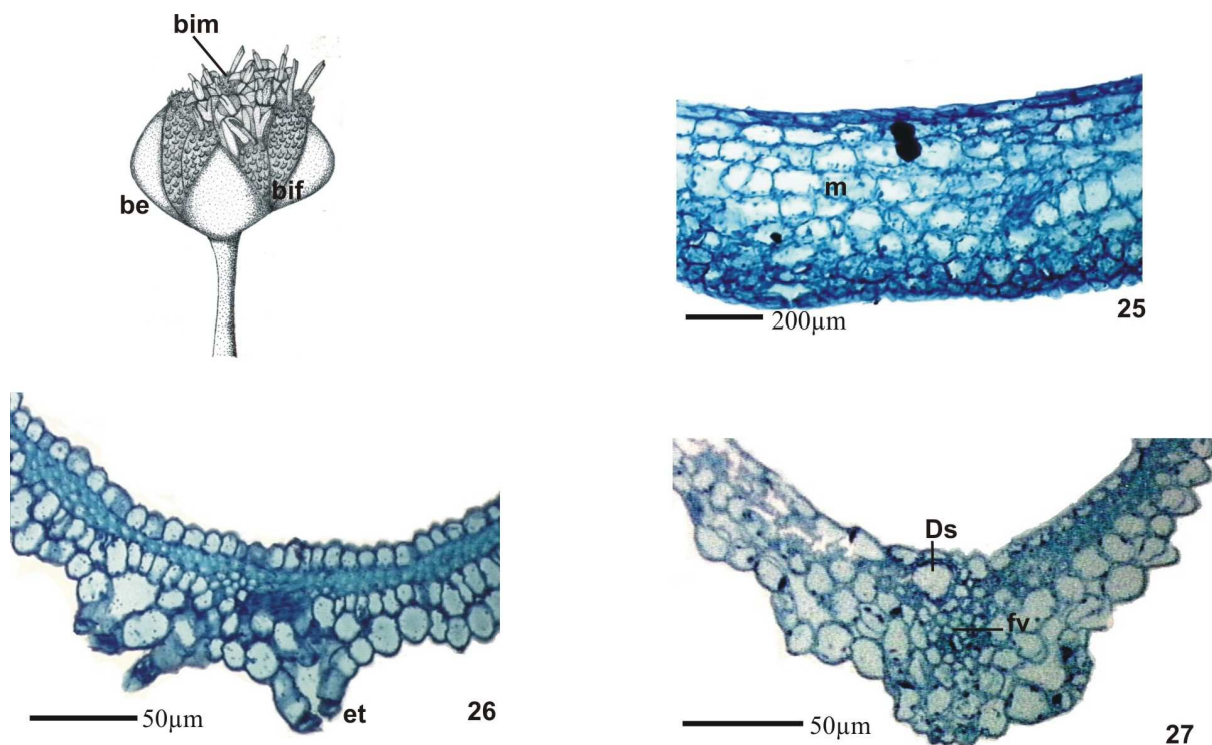


infundibuliforme e com cinco lobos livres, de coloração amarela e recurvados para trás. Os estames são epipétalos e apresentam anteras sinânteras (**Fig. 23, 33-34**).

### 1.2.5 - ANATOMIA DA INFLORESCÊNCIA

A bráctea involucrel externa apresenta epiderme unisseriada, contendo tricomas tectores (**Fig. 28-29**). É anfiestomática e o mesofilo é constituído por parênquima homogêneo de células isodiamétricas (**Fig. 25**). É percorrida por 3 nervuras, sendo a central de maior calibre. Os feixes dessas nervuras são colaterais e sobre o xilema observa-se um ducto secretor bem evidente.

Nas brácteas das flores do disco, a epiderme também é unisseriada. Tricomas tectores pluricelulares unisseriados e tricomas glandulares pluricelulares ocorrem em ambas as faces da bráctea (**Fig. 33-34**). Estômatos ocorrem apenas na face inferior, nas proximidades e na nervura central. O mesofilo na região da lâmina é constituído por células esclerificadas cujo número de camadas varia de 1 (na margem) até 3 em direção à nervura central. A nervura central é constituída por um feixe colateral muito pequeno, sobre o qual se encontra um grande ducto secretor e onde ocorrem camadas de parênquima clorofiliano homogêneo (**Fig. 26 e 27**).



**Figuras 25-27.** Inflorescência de *Acanthospermum australe*. (**be** = bráctea foliácea externa, **bim** = bráctea interna da flor do disco; **bif** = bráctea involucrel interna da flor do raio). **25.** Secção transversal da bráctea involucrel externa; **m** = mesofilo. **26-27.** Secção transversal da bráctea involucrel interna da flor do disco, detalhe para os estômatos (**et**), ducto secretor (**Ds**) e feixe vascular (**fv**).

### 1.2.6 - Anatomia das flores do disco (monóclinas)

A estrutura do tubo da corola é semelhante, do ápice até a base, com mesofilo constituído por tecido parenquimático com poucas camadas na base, às quais diminuem na região mediana e desaparecem no ápice (**Fig. 36-39**). Cada pétala fusionada é percorrida por um feixe colateral central. Na região apical do tubo, ocorre migração dos feixes vasculares, que se tornam marginais nos lobos da corola; a epiderme interna nesta região é papilosa (**Fig. 44**).



O filete é constituído por tecido parenquimático, revestido por epiderme uniestratificada de células cúbicas e percorrido por um único feixe, que se origina por divisão do feixe da corola (**Fig. 36-37**).

As anteras são bitecas, apresentando conectivo estreito, no qual termina o feixe vascular. A parede da antera em fase de pré-antese é constituída por epiderme e pelo endotécio uniestratificado com espessamento anticlinal (**Fig. 35 e 43**).

A estrutura do estilete é semelhante à do ápice do ovário. Na região superior, ocorre estreitamento do estilete e separação em duas metades. No ápice, a epiderme é papilosa (**Fig. 35**).

O ápice do ovário é constituído por tecido compacto de células parenquimáticas, aproximadamente isodiamétricas, havendo um fenda central margeada por cada feixe vascular colateral carpelar (**Fig. 39-40**). Nesta região, a separação entre o hipanto e a parede do ovário torna-se nítida, sendo a parede do hipanto constituída por células parenquimáticas isodiamétricas de tamanhos variados e de conteúdo menos denso (**Fig. 40**). Neste parênquima, encontram-se imersos 5 feixes vasculares colaterais que se continuam no tubo da corola (**Fig. 36-40**).

A base do pistilódio é constituída por tecido parenquimático maciço, revestido por epiderme uniestratificada de células cúbicas, ocorrendo tricomas tectores pluricelulares unisseriados e tricomas glandulares nesta região (**Fig. 41-42**). No tecido parenquimático encontram-se imersos 5 feixes colaterais (**Fig. 42**). Na região mediana, a estrutura da parede do pistilódio é a mesma, observando-se, entretanto, um lóculo central sem óvulo e revestido por epiderme interna de células alongadas tangencialmente (**Fig. 41**).



### 1.2.7 - Anatomia das flores do raio (femininas)

A bráctea involucral interna apresenta, externamente, espinhos curvados para cima (**Fig. 33**). Sua epiderme externa é uniestratificada, constituída por células cúbicas, na qual se inserem tricomas tectores pluricelulares unisseriados e tricomas glandulares (**Fig. 32**) pluricelulares que apresentam formato piramidal quando vistos em corte longitudinal, com sete séries de células e cutícula dilatada, apresentando duas células na base.

A epiderme interna da bráctea involucral interna é constituída por células tabulares. O mesofilo parenquimático é percorrido por feixes de células procambiais; cerca de 5 a 7 camadas de células subepidérmicas à epiderme interna apresentam paredes bastantes espessadas e são alongadas tangencialmente (**Fig. 48 e 52**). Em corte transversal, as células procambiais acompanham os feixes vasculares que estão presentes em cada espinho (**Fig. 50**). Próximo à região do estilete, não ocorrem espinhos e as células procambiais estão menos alongadas tangencialmente.

O ovário é revestido por hipanto, cuja epiderme externa é formada por células levemente alongadas em sentido anticlinal, seguida de duas camadas subepidérmicas de células parenquimáticas, também alongadas no mesmo sentido; abaixo dessa camada encontram-se imersos em parênquima, feixes vasculares colaterais que percorrem o ovário longitudinalmente. Abaixo da camada de feixes, ocorrem cerca de 2 a 3 camadas de células parenquimáticas isodiamétricas. A epiderme interna é constituída por células levemente alongadas tangencialmente (**Fig.49**).

O óvulo é anátropo, de placentação basal, unitegmentado e seu funículo é preso na base do ovário (**Fig. 51 e 53**). O traço vascular do óvulo, situado logo abaixo da epiderme externa do tegumento, percorre o curto funículo e a rafe, continuando-se após a calaza.

A corola é simples, sendo constituída por epiderme unisseriada contendo tricomas glandulares (**Fig. 31**) e mesofilo parenquimático homogêneo de células isodiamétricas; é percorrida por quatro feixes vasculares (**Fig. 45-48**).

O estilete cilíndrico é revestido por epiderme uniestratificada de células cúbicas. É sólido na região basal, com tecido de transmissão margeado por dois feixes vasculares, ambos envoltos por parênquima (**Fig. 47 e 48**). A estrutura se mantém por grande extensão do estilete, surgindo uma fenda nas proximidades da bifurcação (**Fig. 46**). No ápice, o estilete é bífido e cada metade é percorrida por um feixe vascular colateral. É revestido por epiderme unisseriada e papilosa internamente (**Fig. 45**).





### 1.2.8 - ANATOMIA DO FRUTO

A estrutura da bráctea involucral mantém-se como na flor do raio, havendo maior espessamento da parede das células que estão dispostas tangencialmente ao eixo longitudinal da unidade de dispersão (**Fig. 60**). As células parenquimáticas isodiamétricas das camadas mais externas da bráctea involucral apresentam maior tamanho, quando comparadas com a da fase de flor em antese (**Fig. 59 e 60**).

No fruto jovem, a estrutura do pericarpo é semelhante à da parede do ovário, apresentando-se aderido (ou quase totalmente aderido) à parede da bráctea involucral, por meio de células exocárpicas alongadas obliquamente ao eixo longitudinal do fruto. Nesta fase a semente, muito jovem, mantém-se anátropa e já ocupa praticamente toda a cavidade do fruto. O embrião, em estágio globular, encontra-se mergulhado em endosperma celular (**Fig. 54**).

No fruto imaturo, a estrutura da bráctea involucral mantém-se, ocorrendo a completa lignificação das fibras que a percorrem tangencialmente (**Fig. 59 e 62**). A estrutura do pericarpo assemelha-se à do fruto jovem, observando-se leve desorganização do endocarpo e das camadas subjacentes a ele (aproximadamente 5 camadas celulares). O exocarpo e as duas camadas subjacentes a ele começam a mostrar espessamento na parede, com a camada que delimita as fibras que acompanham os feixes vasculares começando a escurecer (**Fig. 59 e 62**).

O tegumento seminal está constituído por cerca de 10 camadas de células alongadas no sentido longitudinal, sendo a exotesta constituída também por células alongadas, que apresentam paredes com projeções na forma de espinhos. As camadas mais internas são parenquimáticas e mostram leve desorganização (**Fig. 59 e 62**).

No fruto maduro, o exocarpo e as duas camadas subjacentes apresentam as paredes completamente escurecidas. As fibras que acompanham os feixes vasculares encontram-se completamente lignificadas. As demais camadas (endocarpo e camadas subjacentes) tornam-se colapsadas (**Fig. 60 e 63**).

A semente madura anátropa, unitegumentada é exalbuminosa. O tegumento único reduz-se a apenas duas camadas de células com paredes levemente espessadas (**Fig. 60 e 63**).

### 1.2.9 – DIAGNOSE DO PÓ

No pó das partes aéreas de *Acanthospermum australe*, os elementos marcantes observados, que facilitam a identificação da espécie e avaliação da qualidade para comercialização foram: fragmentos de limbo, nos quais se observam estômatos aba e adaxiais, terminações dos feixes vasculares e parênquima paliçádico (**figuras 64, 69, 71 e 72**). Tricomas tectores pluricelulares unisseriados estão esparsos por todos os campos observados, devido a sua abundância nas estruturas aéreas da espécie (**figuras 64-68**). Fragmentos de espinhos (**fig. 67**) e células parenquimáticas com paredes espessadas provenientes da bráctea involucrel que envolve o fruto (**fig. 73**). Também podem ser observados tricomas glandulares esparsos por todo o material (**fig. 70**).

Segundo Fahn (1979), é comum encontrar tricomas glandulares em espécies de Asteraceae, sendo-lhes atribuída a função secretora de óleo essencial, que acumula-se entre a cutícula superior e a parede celulósica da superfície celular.





## PARTE 2 – ESTUDO FITOQUÍMICO

### 2.1– MATERIAIS E MÉTODOS

Os solventes utilizados nos processos de preparação de extrato bruto, purificação e isolamento de substâncias químicas puras foram grau P.A. da marca Synth®.

As análises das frações, subfrações e substâncias puras foram feitas por CCD, utilizando placas de vidro de 5 x 10 cm preparadas com uma espessura de 0,5 mm de sílica gel GF<sub>254</sub> (Merck®), ativadas a 105°C ou cromatoplasmas de alumínio (Merck®) em gel de sílica 60 F<sub>254</sub>. A observação das substâncias nas placas foi feita pela utilização de irradiação com luz UV (254 e 366 nm) e posterior revelação em Reativo de Godin (**Anexo I**).

Para a obtenção dos espectros na região do UV (ultravioleta) foi usado um espectrofotômetro modelo CARY IE UV-Vis – VARIAN.

Os espectros de massas foram obtidos em aparelho com interface API (ES/EM, modos negativo e positivo) MICROMASS QUATRO LC.

As análises de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) unidimensionais de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, DEPT e bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC foram realizadas em espectrômetro VARIAN, modelo GEMINI 2000 BB, 300 MHz para <sup>1</sup>H e 75,45 MHz para <sup>13</sup>C e espectrômetro BRUKER, modelo AVANCE, 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100,6 MHz para <sup>13</sup>C. Foram utilizados solventes deuterados marca Aldrich® e como referência interna o tetrametilsilano (TMS) como  $\delta = 0,0$  ppm.

## **2.2 – Preparo do material vegetal**

O material vegetal coletado foi previamente lavado em água corrente para retirada de sujidades do solo e posteriormente seco em estufa de ar circulante (marca Quimis®, modelo Q-31) a 40°C sobre folha de papel pardo durante 5 dias. Após esse período, a planta apresentava-se quebradiça ao toque em todas as suas partes (caule, folhas, flores e frutos).

O vegetal seco foi moído em moinho de facas rotativas (marca Tecnal®) para obter um pó bastante fino, que foi acondicionado e armazenado em local seco e ao abrigo da luz.

## **2.3– Método extrativo**

No momento da extração, 679g do pó da planta foram transferidos para frascos de vidro âmbar limpos, de forma a preencher 1/3 (um terço) do volume interno do frasco. O pó foi umedecido com solução hidroetanólica 90%(v/v), adicionando-se até completar 2/3 (dois terços) do volume do frasco.

O método utilizado para extração foi o processo de remaceração descrito por Sonaglio et al. (2001). Os frascos de maceração foram mantidos em temperatura ambiente, sob agitação em agitador mecânico durante 4 horas/dia. A cada 36 horas, o líquido extrator foi retirado do frasco e filtrado em funil de Büchner acoplado a kitasato. O filtrado obtido foi concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador (marca Büchi, modelo R-114) a 40°C. O extrato bruto líquido assim obtido foi transferido para outro frasco âmbar e mantido sob refrigeração.

O álcool etílico resultante da concentração do filtrado foi novamente diluído em água, perfazendo uma solução hidroetanólica a 90%(v/v), que novamente retornou ao frasco onde se encontrava o pó da planta. O macerado foi, então, novamente homogeneizado e submetido a agitação mecânica de 4 horas/dia até ser novamente filtrado. Esse processo foi repetido até obter-se um filtrado límpido, momento considerado o ponto final da extração ou o esgotamento da planta, que demorou 30 dias para ser obtido.

#### **2.4 – Obtenção do Extrato Bruto Liofilizado**

Após a extração, o extrato bruto líquido foi novamente concentrado em rotaevaporador para a retirada de etanol residual. Distribuiu-se o líquido em balões de fundo redondo que, após congelados em nitrogênio líquido, foram liofilizados em aparelho liofilizador (marca Christ®, modelo alpha). O liofilizado assim obtido foi denominado Extrato Bruto Liofilizado (EBL), que foi mantido em vidro âmbar hermeticamente fechado em freezer a -20 °C. Após o término da extração, foram obtidos 96,9 g de EBL de *A. australe*, o que representa um rendimento de 14,3% do processo extrativo.

#### **2.5 – Fracionamento do Extrato Bruto Liofilizado (EBL)**

O EBL foi fracionado pelo método de Cromatografia em Coluna de adsorção à pressão reduzida (CCV). Esse sistema utiliza uma coluna de vidro empacotada com a fase estacionária adicionada da amostra, acoplada a um kitasato e este a um sistema de vácuo, o que otimiza a passagem da fase móvel através da sílica.

Foram misturados em almofariz: 90g do EBL de *Acanthospermum australe* e 160g de sílica gel 60 (70-230 mesh) até obter um pó homogêneo. Essa mistura foi empacotada em coluna de 6,0 X 30,0 cm e umedecida com hexano.

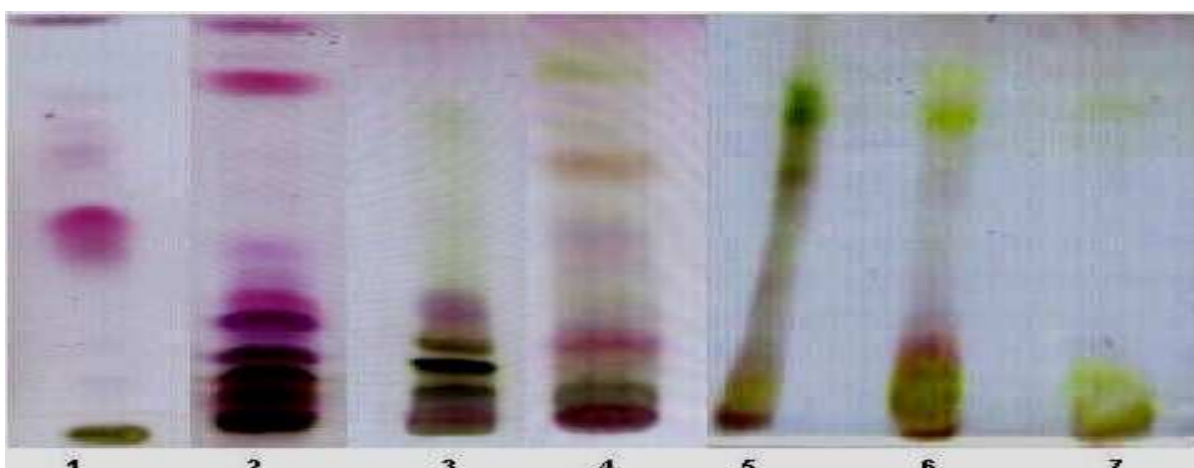
O sistema de eluição da coluna obedeceu uma ordem crescente de polaridade do solvente, como apresentado na Tabela 1, e cada fase móvel foi aplicado ao sistema até que o líquido obtido ficasse límpido. As frações assim obtidas foram concentradas em rotaevaporador até obter um líquido xaroposo. Posteriormente, foi transferido para frasco de vidro âmbar previamente pesado e evaporado até o resíduo, à temperatura ambiente. Apenas a fração metanol:água (9:1 v/v) teve que ser liofilizada. Essas frações foram pesadas e mantidas em freezer.

As 7 frações obtidas foram analisadas por CCD (**Fig. 74**). O fluxograma 1 ilustra a obtenção das frações obtidas no primeiro estágio de purificação.

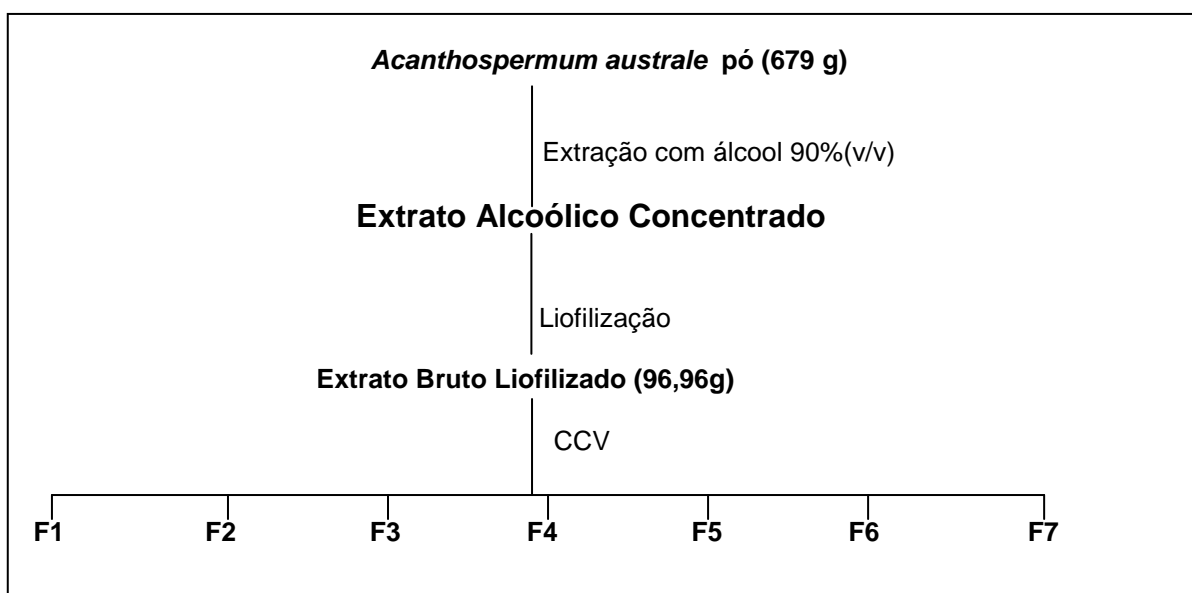
**Tabela 1:** Sistemas eluentes para coluna de fracionamento à vácuo do Extrato Bruto Liofilizado de *Acanthospermum australe* e suas respectivas frações obtidas

Sistema Eluente	Proporção	Volume utilizado (l)	Fração	Rendimento (g)
Hexano	Puro	1	F1	4,92
Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1:1	1	F2	5,29
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Puro	1	F3	2,74
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	1:1	1	F4	7,96
AcOEt	Puro	1	F5	2,34
MetOH	Puro	1,5	F6	48,69
MetOH:H <sub>2</sub> O	9:1	1	F7	1,68





**Fig. 74** – Cromatografia em camada delgada das pré-frações obtidas a partir do extrato bruto liofilizado (EBL) de *Acanthospermum australe*: 1. fração hexano (FM= hexano:clorofórmio 8:2); 2. fração hexano-diclorometano (FM=hexano:clorofórmio 1:1); 3. fração diclorometano (FM= hexano:clorofórmio 1:4); 4. fração diclorometano-acetato de etila (FM=clorofórmio:acetona 9:1); 5,6 e 7. frações acetato de etila, metanol e metanol-água, respectivamente (FM= clorofórmio:acetato de etila:ácido fórmico 5:4:2). Foram aplicados 20 µg de cada fração; revelador: Reativo de Godin.



**Fluxograma 1.** Esquema de obtenção e fracionamento do extrato bruto hidroetanólico de *Acanthospermum australe*

As frações obtidas do Extrato Bruto Liofilizado foram purificadas por técnicas cromatográficas em coluna de adsorção e filtração em gel. Neste trabalho, foram descritas apenas as metodologias de purificação das frações a partir das quais foram obtidas substâncias de valor farmacognóstico para a espécie em estudo.

## 2.6 – Purificação da fração F4

Uma parte da fração F4 (2,1182g) foi purificada através de Cromatografia em Coluna (CC) de SEPHADEX LH-20 de dimensões 35,0 x 3,0cm, em sistema isocrático, utilizando clorofórmio:metanol (1:1 v/v) como fase móvel. Foram coletados 23 tubos, que foram reunidos em nove subfrações cromatograficamente semelhantes, denominadas F4A a F4I.

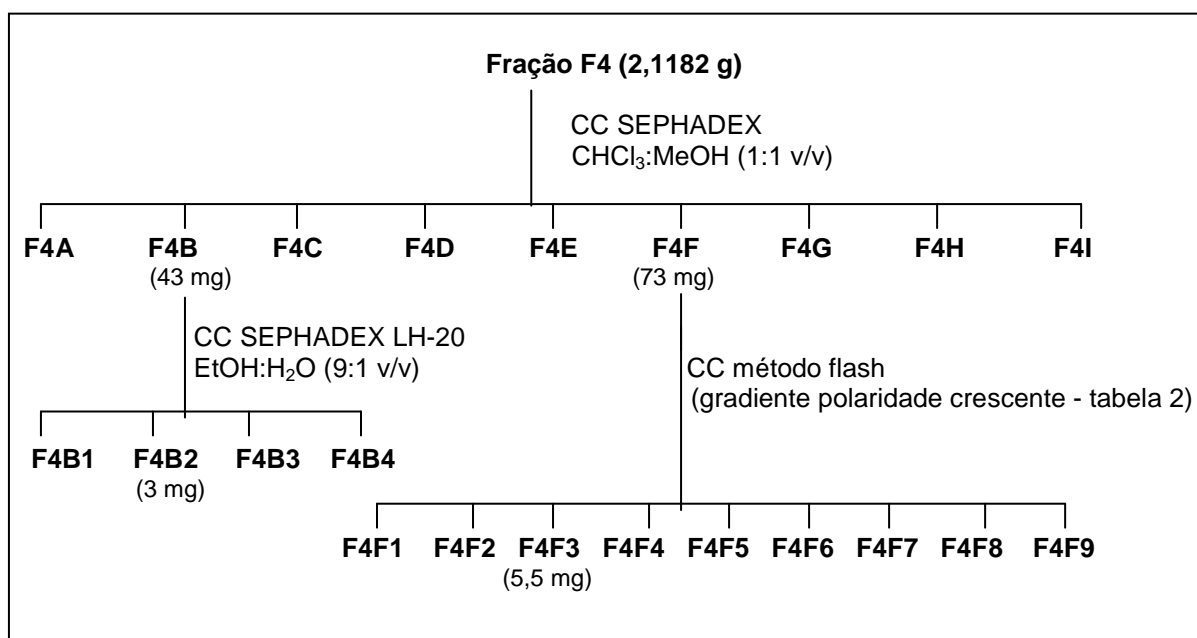
A fração F4B (43 mg) foi recromatografada em coluna de SEPHADEX LH-20, de dimensões 25,0 x 1,8 cm, em sistema isocrático, utilizando como fase móvel álcool etílico 90%(v/v). Foram obtidas quatro subfrações denominadas: F4B1, F4B2, F4B3 e F4B4, que foram cromatografadas em placas de CCD e reveladas com Reativo de Godin.

A subfração F4B2 apresentou mancha na CCD com perfil de pureza cromatográfica e foi encaminhada para análise espectroscópica. O fluxograma 2 demonstra esquematicamente o processo de purificação.

A fração F4F (73mg) foi recromatografada em CC com sílica gel 60 (230-400 mesh Merck®) pelo método flash (adsorção, com fase móvel sob pressão positiva) segundo Still (1978), utilizando gradiente de polaridade crescente, desde clorofórmio até metanol. Foram coletados 38 tubos, posteriormente reunidos de acordo com a identidade cromatográfica em CCD em nove subfrações, denominadas F4F1 a F4F9 (tabela 2 e fluxograma 2). Na evaporação da subfração F4F3 houve formação de cristais, que apresentaram, na CCD, característica de pureza. Posteriormente, essa amostra foi encaminhada para análise espectroscópica e identificação de sua composição.

**Tabela 2:** Sistemas eluentes em gradiente de polaridade crescente para CC em sílica gel 60 (230-400 mesh) pelo método flash da fração F4F

Sistema Eluente	Proporção	Volume utilizado (ml)	Tubos
CHCl <sub>3</sub>	Puro	200	1-9
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	98:2	100	10-14
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	95:5	100	15-20
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	9:1	100	21-25
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	8:2	100	26-28
CHCl <sub>3</sub> :AcOEt	1:1	150	29-32
AcOEt	Puro	100	33-35
MetOH	Puro	150	36-38



**Fluxograma 2.** Esquema de fracionamento e purificação da fração F4 (diclorometano:acetato etila 1:1 v/v)

## 2.7 – Purificação da fração F3

Uma parte da fração F3 (1,16g) foi purificada através de Cromatografia em Coluna (CC) com 30g de sílica gel 60 (70-230 mesh) em coluna de 2,5 x 30,0 cm, empacotada com hexano e eluída com misturas de solventes em gradiente de polaridade crescente, como fase móvel (Tabela 3), sendo coletados 124 tubos. As

frações que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, foram reunidas e obteve-se treze subfrações, denominadas D1 a D13 (Fluxograma 3).

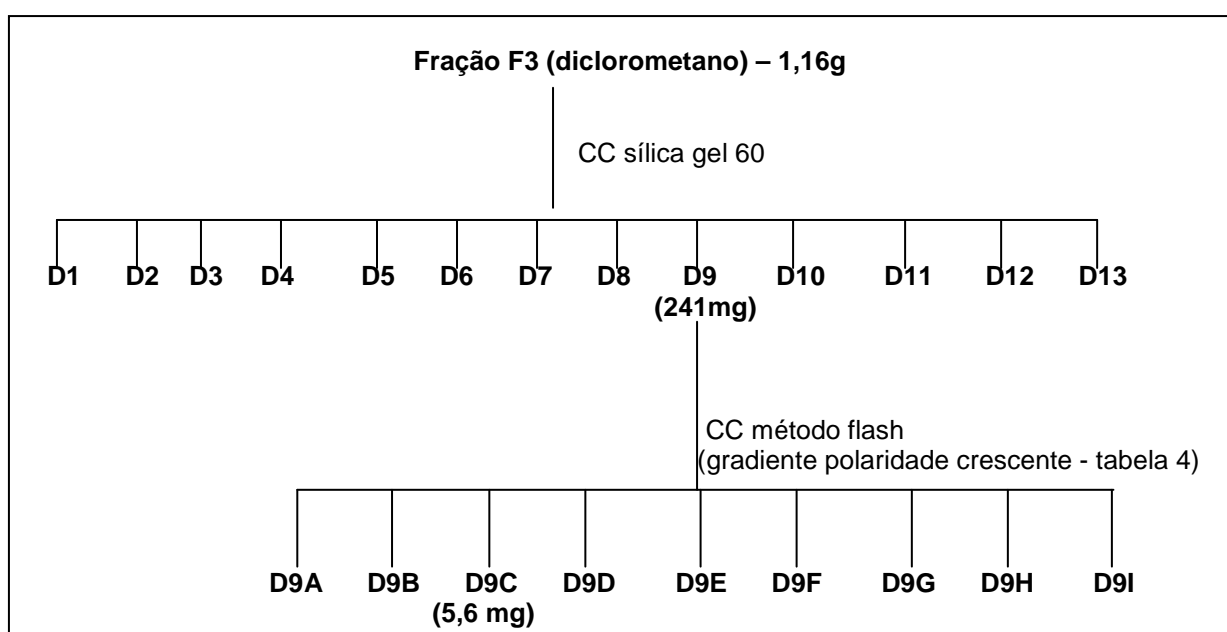
A fração D9 (241 mg) foi recromatografada em CC pelo método flash (STILL, 1978), em sistema com gradiente crescente de polaridade, conforme Tabela 4. Foram obtidos quarenta e sete tubos, reunidos em nove subfrações por semelhança cromatográficas e denominadas D9A a D9I. A subfração D9C apresentou perfil de pureza cromatográfica e, posteriormente, foi encaminhada para análise espectroscópica. O fluxograma 3 demonstra esquematicamente o processo de purificação.

**Tabela 3:** Sistemas eluentes em gradiente de polaridade crescente para CC em sílica gel 60 (70-230 mesh) da fração F3, obtida do fracionamento do Extrato Bruto Liofilizado (EBL) de *A. australe*

Sistema Eluente	Proporção	Volume utilizado (ml)	Tubos
Hexano	puro	50	1-3
Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	98:2	50	4-5
Hexano: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	95:5	50	6-8
Hexano: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	9:1	100	9-13
Hexano: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	8:2	100	14-18
Hexano: CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1:1	100	19-22
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Puro	200	23-36
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	98:2	100	37-41
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	95:5	150	42-70
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	9:1	200	71-78
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	8:2	250	79-88
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	1:1	150	89-96
AcOEt	Puro	200	97-104
AcOEt:Acetona	1:1	150	105-112
MetOH	Puro	150	113-119
MetOH:H <sub>2</sub> O	9:1	100	120-124

**Tabela 4:** Sistemas eluentes para CC pelo método flash, com gradiente crescente de polaridade, para purificação da subfração D9.

Sistema Eluente	Proporção	Volume utilizado (ml)	Tubos
Hexano:CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	1:1	150	-
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Puro	300	1-18
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	96:4	400	19-30
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :AcOEt	9:1	150	30-43
MeOH	Puro	100	43-47



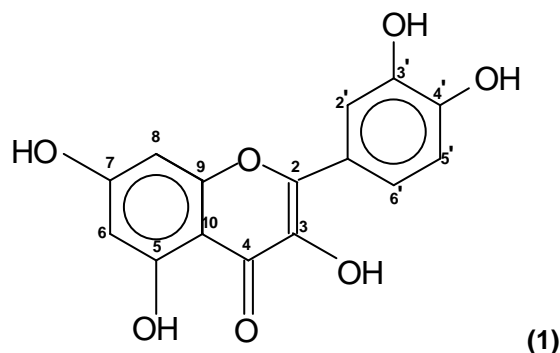
**Fluxograma 3:** Esquema de fracionamento e purificação da fração F3

## 2.8– RESULTADOS - Determinação Estrutural das Substâncias Isoladas

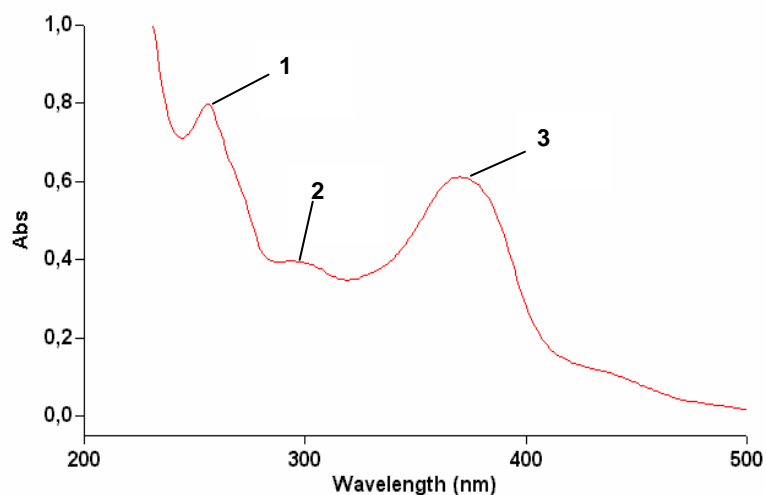
### 2.8.1- Substância F4B2

A substância F4B2 (3 mg) foi isolada da fração diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v) e analisada por UV, EM por eletrospray no modo negativo, RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C. Seus dados espectrais, assim como a comparação com dados da literatura (NIASSY, B. et al., 2004), auxiliaram na determinação da fórmula molecular

(C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>O<sub>7</sub>) para a substância F4B2, identificada como sendo o flavonóide quercetina (1).



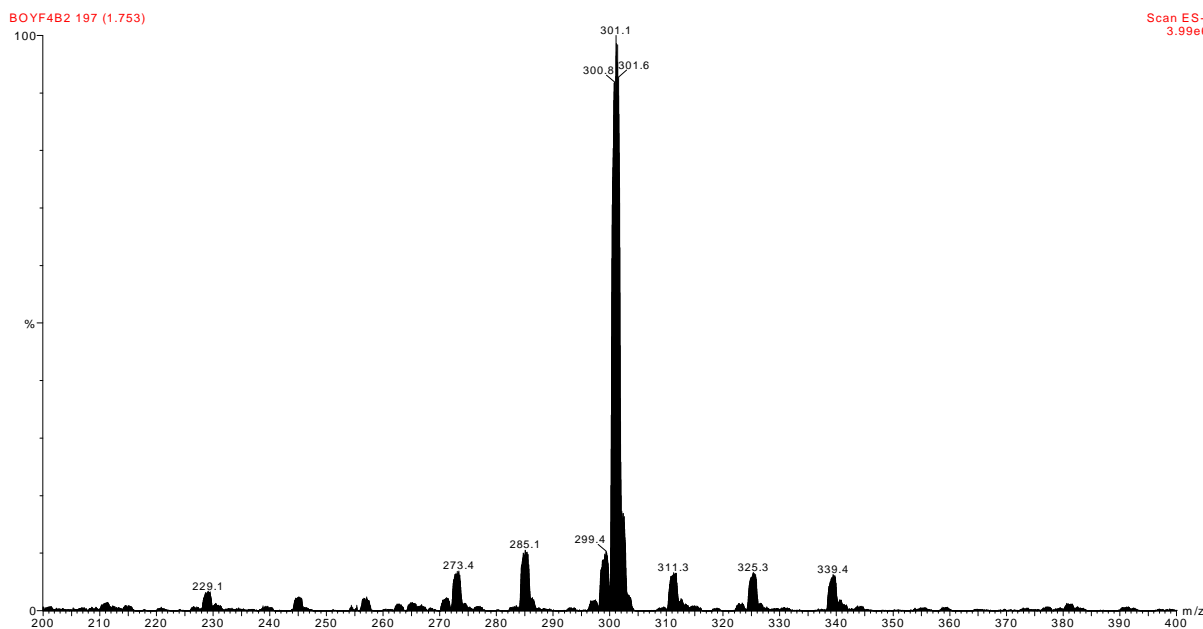
O espectro no UV de (1) foi obtido dissolvendo-se 2,6mg em 10 ml de metanol e, a partir dessa solução, foi feita nova diluição 1:1(v/v) em metanol para que se pudesse observar os picos na região de até 1,0 de absorbância (**Fig. 75**). Foram observadas bandas de absorção em 255, 298 e 370 nm.



PICO	$\lambda_{\text{máx.}}$ (nm)	Log $\epsilon$
1	255	1,57
2	298	0,77
3	370	1,23

**Figura 75** – Espectro UV de (1)

No espectro de massas (**Fig. 76**) obtido por ES (eletrospray) no modo negativo, a substância (**1**) apresentou o pico referente ao íon pseudomolecular  $[M - H]^-$  em  $m/z$  301,1 (100%).



**Figura 76.** Espectro de massa obtido por ES modo negativo de (**1**)

Os espectros RMN unidimensionais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT, além dos bidimensionais de COSY, HSQC e HMBC estão representados nas figuras 77 a 82. As tabelas 5, 6 e 7 relacionam os dados espectroscópicos extraídos dos experimentos de RMN e atribui os valores de deslocamento químico (\*) aos respectivos átomos de carbono e hidrogênio da estrutura estabelecida.

O flavonóide quercetina (**1**) foi isolado da espécie *Acanthospermum australe* pela primeira vez em 1987, por Shimizu et al., a partir do extrato hidroetanólico (70% v/v) das partes aéreas.

**Figura 77.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância F4B2 (300 MHz; DMSO)



**Fig.78**—Espectro de RMN bidimensional COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância F4B2

**Tabela 5:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  de (1) (300 MHz) em DMSO e correlações observadas no  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY (300 MHz)\*

H	$\delta\text{H}$ (1)	F4B2 – $^1\text{Hx}^1\text{H}$ -COSY
6	6,17 (d; 2,1)	H-8
8	6,39 (d; 1,8)	H-6
2'	7,66 (d; 2,4)	H-6'
5'	6,86 (d; 8,4)	H-6'
6'	7,52 (dd; 8,4; 2,4)	H-5'; H-2'

\*  $\delta$  em ppm e J (entre parênteses) em Hz.

**Tabela 6:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (75,5 MHz) em DMSO- $d_6$  de (1), comparados com os valores da quercetina (75 MHz) em MeOH- $d_4$ , descritos na literatura (NIASSY, B. et al., 2004).

C	$\delta\text{C}$ (1)	QUERCETINA – $^*\text{C}$
C-2	156,3	156,7
C-3	135,9	133,4
C-4	176,0	177,4
C-5	160,9	161,3
C-7	164,1	164,1
C-9	156,3	156,5
C-10	103,1	104,0
C-1'	122,1	121,3
C-3'	145,2	144,8
C-4'	147,9	148,4
<b>CH</b>		
C-6	98,3	98,7
C-8	93,5	93,7
C-2'	115,2	116,4
C-5'	115,8	115,2
C-6'	120,2	121,7

\* $\delta$  em ppm .

**Fig. 79** – Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz; DMSO)

**Fig. 80** - DEPT 90° e 135° da substância F4B2 (75,5 MHz; DMSO)

**Figura 81.** Espectro bidimensional HMQC da substância F4B2.

**Figura 82.** Espectro bidimensional HMBC da substância F4B2

**Tabela 7:** Correlações entre carbono e hidrogênio através de uma ligação ( $^1J_{CH}$ ) e à longa distância ( $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$ ), observados nos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear (300 MHz) HSQC e HMBC, em DMSO- $d_6$ , de (1)\*.

C	$^1H \times ^{13}C$ - HMQC – $^1J_{CH}$		$^1H \times ^{13}C$ - HMBC – $^nJ_{CH}$	
	$\delta C$	$\delta H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	156,3			
3	135,9			
4	176,0			
5	160,9			
7	164,1		H-8	
9	156,3		H-8	
10	103,1			H-8
1'	122,1			H-5'
3'	145,2		H-2'	
4'	147,9		H-5'	H-2'
<b>CH</b>				
6	98,3	6,17 (d; 2,1)		H-8
8	93,5	6,39 (d; 1,8)		
2'	115,2	7,66 (d; 2,4)		
5'	115,8	6,86 (d; 8,4)		
6'	120,2	7,52 (dd; 8,4; 2,4)		H-2'

\*  $\delta$  em ppm e J (entre parênteses) em Hz.

### Dados Físicos e Espectrométricos de (1) – Quercetina

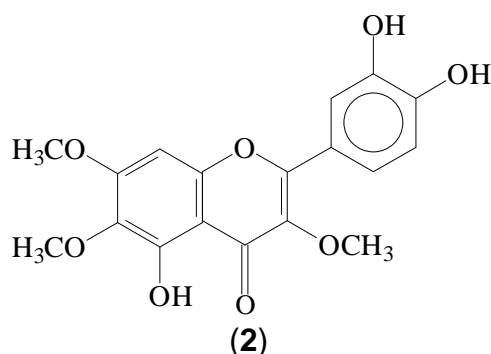
Sólido amarelo (3 mg)

UV  $\lambda_{max}$  em CH<sub>3</sub>OH, nm (log  $\gamma$ ): 255 (1,57); 298 (0,77); 370 (1,23).

ESI-MS  $m/z$  (int.rel.%): 301 (100) [M-H]<sup>-</sup>.

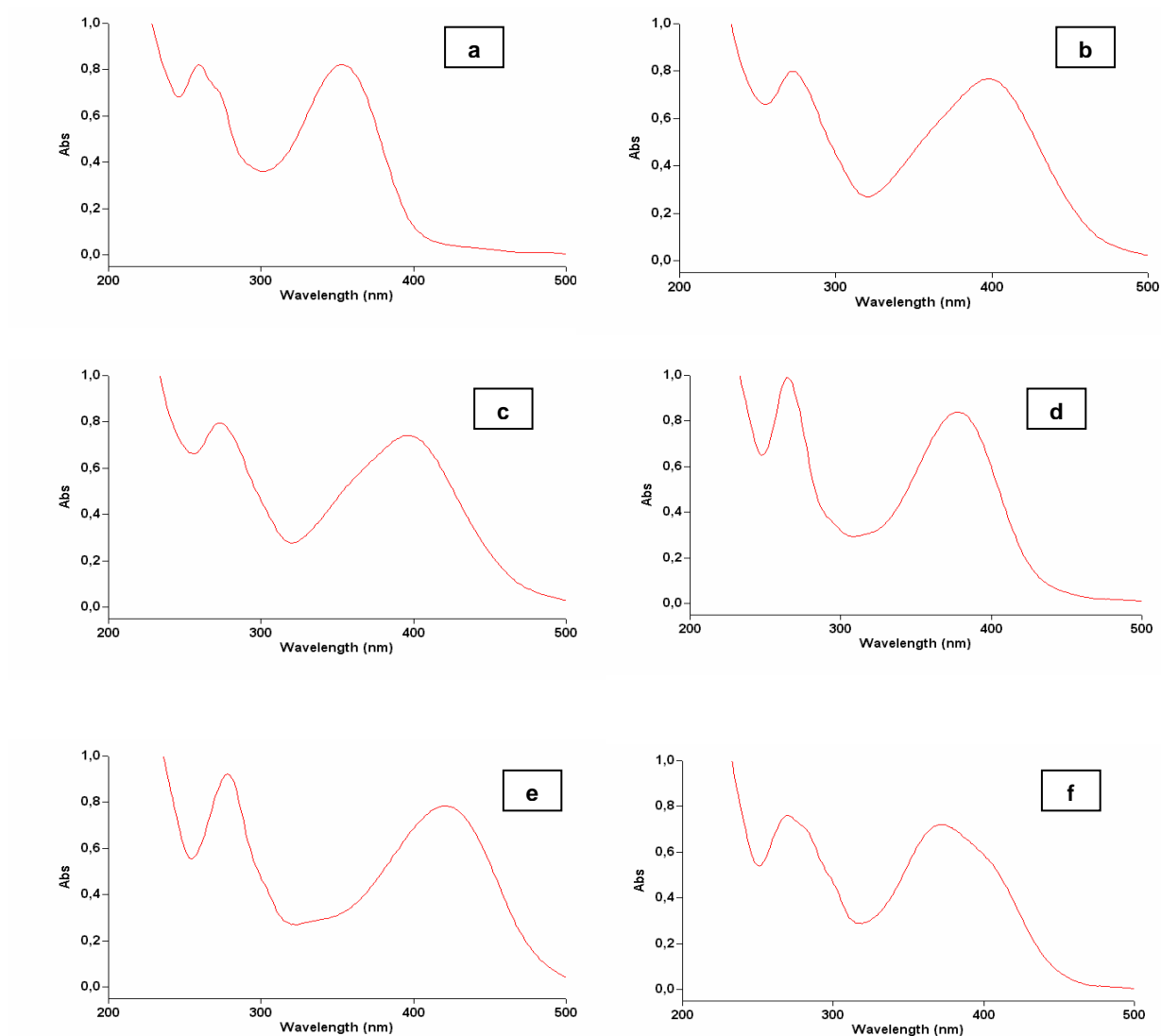
### 2.8.2 - Substância F4F3

A substância F4F3 (5,5 mg) foi isolada da fração diclorometano:acetato de etila (1:1 v/v) e analisada por UV, EM por eletrospray no modo negativo, RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Seus dados espectrais, assim como a comparação com dados da literatura (WANG, Y. et al., 1989), auxiliaram na determinação da fórmula molecular ( $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{O}_8$ ) para a substância F4F3, como sendo o flavonóide crisosplenol D (**2**). Este flavonóide trimetoxilado já havia sido isolado da espécie *Acanthospermuma australe* por Debenedetti et. al., em 1987.



O espectro no UV de (**2**) foi obtido dissolvendo-se 5,5mg em 10 ml de metanol e, a partir dessa solução, foi feita nova diluição 1:3(v/v) em metanol para que se pudesse observar os picos na região de até 1,0 de absorvância (**Fig. 83**). Foram observadas bandas de absorção em 260 e 355 nm. Além do espectro de varredura convencional, foram feitas reações e posteriores leituras, para observar efeitos batocrômicos e hipsocrômicos de absorção, além de visualizar, através de reação com cloreto de alumínio em metanol, a reação de complexação que ocorre entre a hidroxila C-5 e a carbonila em C-4.

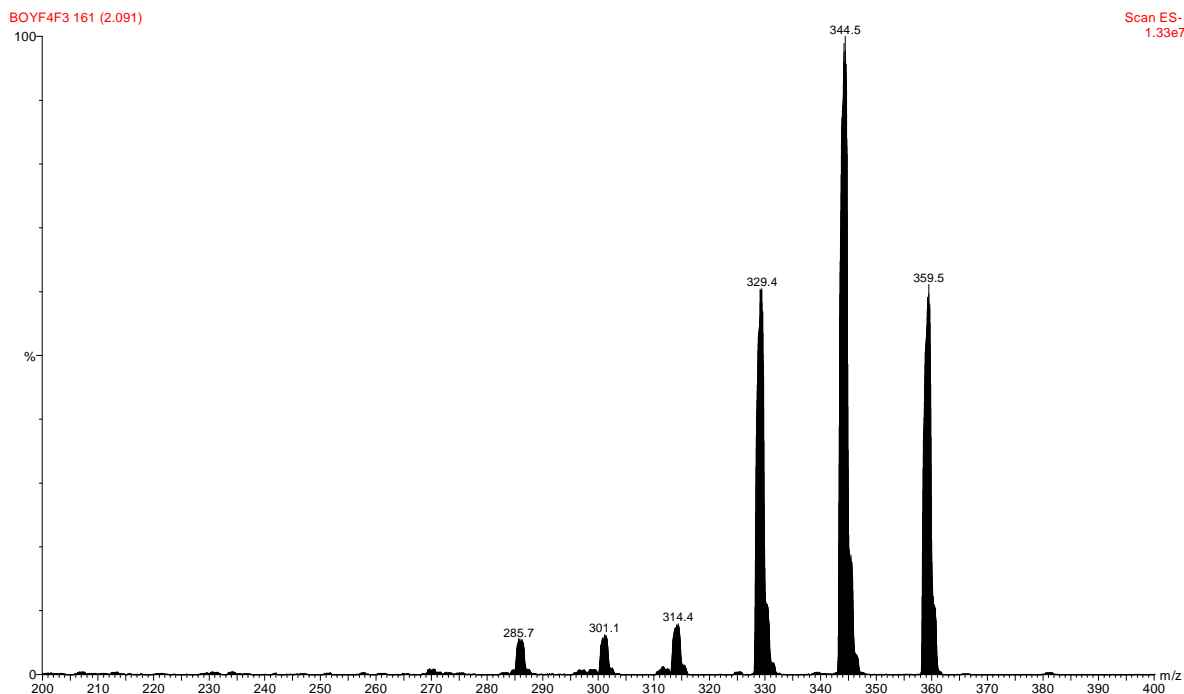




**Figura 83:** Espectros UV de (2) em seqüência de reações: varredura simples (a), após adição de NaOH 2M (b), após adição de acetato de sódio (c) e ácido bórico (d). Reação com  $\text{AlCl}_3$  em metanol(e) e após adição de HCl concentrado (f).

EXPERIMENTOS	PICO 1		PICO 2	
	$\lambda_{(\text{max})}(\text{nm})$	Log $\epsilon$	$\lambda_{(\text{max})}(\text{nm})$	Log $\epsilon$
Antes das reações	260	1,63	355	1,63
Após adição de NaOH 2M	273	1,60	398	1,54
Após adição AcOEtNa	273	1,60	395	1,48
Após adição de Ácido Bórico	263	1,97	378	1,69
Após adição de $\text{AlCl}_3$	278	1,85	420	1,57
Após adição de HCl	270	1,54	373	1,45

O espectro de massas (**Fig. 84**) obtido por ES (eletrospray) no modo negativo apresentou o pico referente ao íon pseudomolecular  $[M - H]^-$  em  $m/z$  359,5 (61,4%).



**Figura 84.** Espectro de massa obtido por ES modo negativo da substância (**2**)

Os espectros RMN unidimensionais de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT, além dos bidimensionais de COSY, HMQC e HMBC estão representados nas figuras 85 a 90.

As tabelas 8, 9 e 10 relacionam os dados espectroscópicos extraídos dos experimentos de RMN e atribui os valores de \* aos respectivos átomos de carbono e hidrogênio da estrutura estabelecida, comparando as atribuições com os dados obtidos da literatura.

**Figura 85.** Espectro de  $^1\text{H}$  da substância F4F3

**Figura 86.** Espectro bidimensional  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY da substância F4F3.

**Tabela 8:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  de (2) (300 MHz) em  $\text{DMSO-}d_6$  e correlações observadas no  $^1\text{H-}^1\text{H-COSY}$  (300 MHz)\*

H	$\delta^{\text{H}}$ (2)	$^1\text{Hx}^1\text{H-COSY}$
3-OCH <sub>3</sub>	3,78 (s)	
6-OCH <sub>3</sub>	3,71 (s)	
7-OCH <sub>3</sub>	3,90 (s)	
8	6,85 (s)	
2'	7,58 (d; 2,4)	H-6'
5'	6,88 (d; 8,4)	H-6'
6'	7,48 (dd; 8,4; 2,4)	H-2';H-5'

\*  $\delta$  em ppm e J (entre parênteses) em Hz**Tabela 9:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e DEPT (75,5 MHz) em  $\text{DMSO-}d_6$  de (2), comparados com os valores do crisosplenol D (50,30 MHz) em  $\text{DMSO-}d_6$ , descritos na literatura (WANG et al., 1989)\*.

C	$\delta^{\text{C}}$	CRISOSPENOL D – *C
C-2	156,3	151,68
C-3	137,8	137,64
C-4	178,4	178,18
C-5	151,9	151,68
C-6	131,8	131,54
C-7	158,8	158,58
C-9	151,9	155,95
C-10	105,7	105,51
C-1'	120,7	120,73
C-3'	145,6	145,26
C-4'	149,3	148,82
<b>CH</b>		
C-8	91,5	91,20
C-2'	115,6	115,68
C-5'	115,9	115,53
C-6'	120,9	120,61
OCH <sub>3</sub> (3)	59,8	59,61
OCH <sub>3</sub> (7)	56,6	56,41
OCH <sub>3</sub> (6)	60,2	60,01

\*  $\delta$  em ppm.

Os valores de  $\delta$  encontrados para os carbonos C2 e C9 diferem da literatura em 4 ppm (ver tabela 9). Aparentemente, estes valores estariam trocados entre si porém, observando-se o espectro bidimensional HMBC, nota-se as correlações entre o hidrogênio ligado ao carbono 2' com o C2 e entre o hidrogênio ligado ao carbono 8 com o C9. Dessa forma, tornam-se inquestionáveis as atribuições conferidas aos carbonos C2 e C9.

**Figura 87.** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz; DMSO)

**Figura 88** - DEPT 90° e 135° da substância F4F3 (75,5MHz; DMSO)

**Figura 89.** Espectro bidimensional HMQC da substância F4F3.



**Figura 90.** Espectro bidimensional HMBC da substância F4F3.

**Tabela 10:** Correlações entre carbono e hidrogênio de (2) através de uma ligação ( $^1J_{CH}$ ) e à longa distância ( $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$ ), observados nos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear (300 MHz) HSQC e HMBC, em  $DMSO-d_6$ .\*

C	$^1H \times ^{13}C$ - HMQC – $^1J_{CH}$		$^1H \times ^{13}C$ - HMBC – $^nJ_{CH}$	
	$\delta^C$	$\delta^H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
2	156,3			H-2'
3	137,8			OCH <sub>3</sub> (3)
4	178,4			
5	151,9			H-8
6	131,8			H-8, OCH <sub>3</sub> (6)
7	158,8		H-8	OCH <sub>3</sub> (7)
8	91,5	6,88 (s)		
9	151,9			
10	105,7			H-8
1'	120,7		H-2'	
2'	115,6	7,58 (d; 2,4)		H-6'
3'	145,6		H-2'	H-5'
4'	149,3		H-5'	H-2'; H-6'
5'	115,9	6,88 (d; 8,4)		
6'	120,9	7,48 (dd; 2,4; 8,4)	H-5'	
OCH <sub>3</sub> (3)	59,8	3,78 (s)		
OCH <sub>3</sub> (7)	56,6	3,90 (s)		
OCH <sub>3</sub> (6)	60,2	3,71 (s)		

\*  $\delta$  em ppm e J (entre parênteses) em Hz.

### Dados Físicos e Espectrométricos de (2) – Crisosplenol D

Cristais amarelos (5,5 mg)

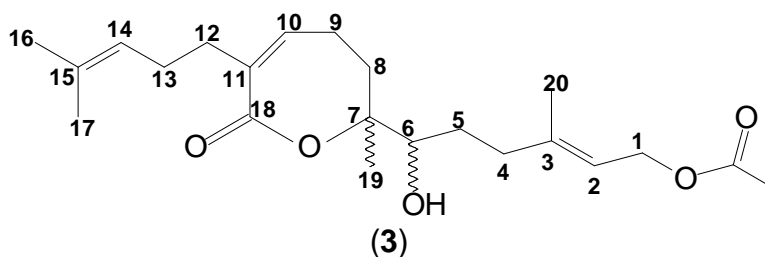
Ponto de fusão: 248-250° C, metanol [ literatura 238-240° C; ORABI et al., 2000]

UV  $\lambda_{max}$  em CH<sub>3</sub>OH, nm (log  $\gamma$ ): 260 (1,63); 355 (1,63)

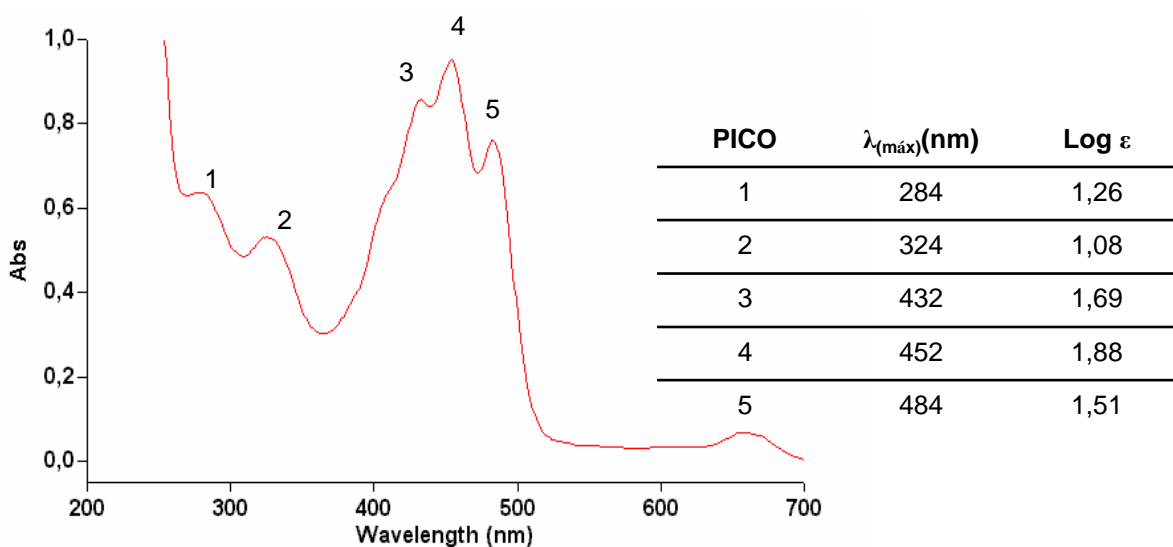
ESI-MS  $m/z$  (int.rel.%): 359 (61) [M-H]<sup>-</sup>; 344 (100) [M-CH<sub>3</sub>]; 329 (60) [344-CH<sub>3</sub>].

### 2.8.3 - Substância D9C

A substância D9C (5,6 mg) foi isolada da fração diclorometano (F3). As análises espectrais de UV, EM obtido por eletrospray no modo positivo e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , assim como a comparação com dados da literatura (BOHLMANN et al., 1980), auxiliaram na sua identificação. Trata-se da lactona diterpênica de fórmula molecular ( $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_5$ ), **acetato de acantoaustralida (3)**.

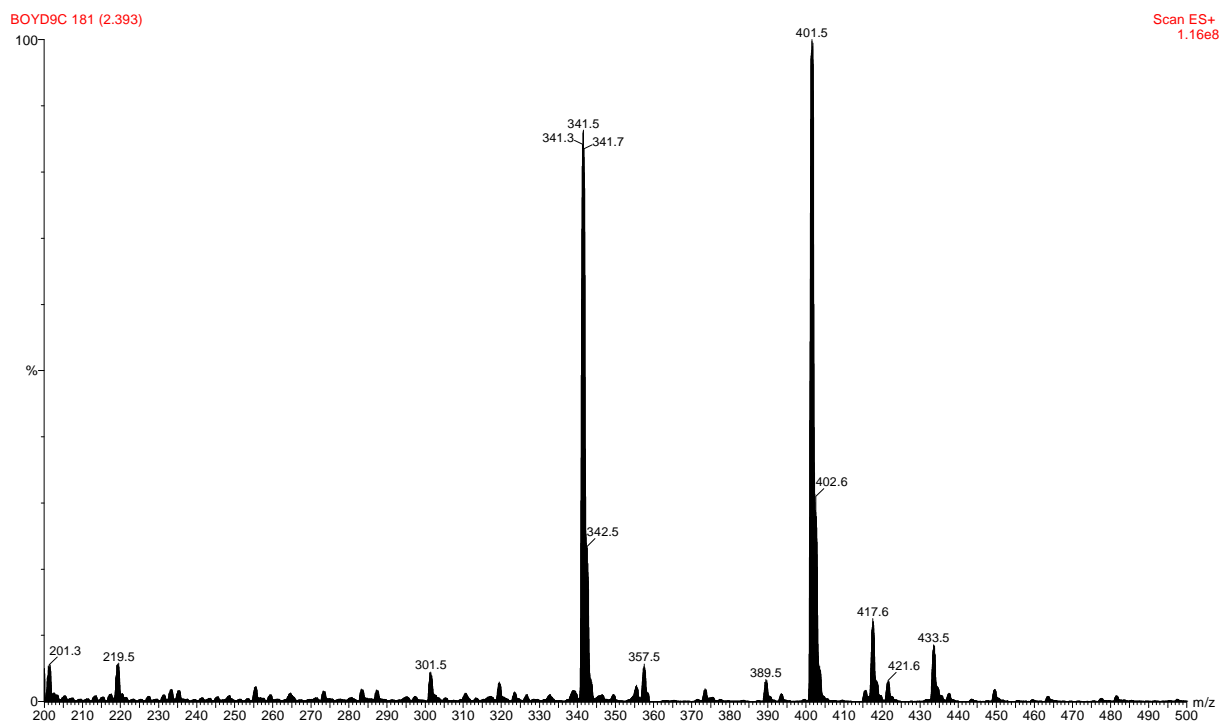


O espectro no UV de **(3)** foi obtido dissolvendo-se 43,2 mg em 50 ml de clorofórmio e, a partir dessa solução, foi feita nova diluição 1:4(v/v) em metanol, para que se pudesse observar os picos na região de até 1,0 de absorbância (**Fig. 91**). Foram observadas bandas de absorção em 284, 324, 432, 452 e 484 nm.



**Figura 91.** Espectro de UV de **(3)**

O espectro de massas (**Fig. 92**) obtido por ES (eletrospray) no modo positivo apresentou o pico referente ao íon pseudomolecular somado ao átomo de sódio  $[M+Na]^+$  em  $m/z$  401,5 (100%).



**Figura 92.** Espectro de massa obtido por ES modo positivo de **(3)**.

Os espectros RMN unidimensionais de  $^1H$ ,  $^{13}C$  e DEPT, além dos bidimensionais de COSY, HMQC, HMBC, NOE e TOCSY estão representados nas figuras 93 a 100.

As tabelas 11, 12 e 13 relacionam os dados espectroscópicos extraídos dos experimentos de RMN e atribui os valores de  $\delta$  aos respectivos átomos de carbono e hidrogênio da estrutura estabelecida, comparando as atribuições com os dados obtidos da literatura.

**Figura 93.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância D9C (400 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )

**Figura 94.** Espectro bidimensional COSY  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  da substância D9C.

**Tabela 11:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (300 MHz) em  $\text{CDCl}_3$ , comparados com os valores de acetato de acantoaustralida (270 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) descritos na literatura (BOHLMANN, F. et al., 1981) para **(3)**

H	$\delta^{\text{H}}$ ( <b>3</b> )	Acetato de acantoaustralida
1	4,63 (t; 12)	4,66 dd
1'	4,59 (dd; 12)	4,60 dd
2	5,38 (t; 16)	5,38 br.t
4	2,29 (m)	2,31 m
4'	2,36 (m)	-
5	1,70 (m)	1,77 m
5'	1,46 (m)	1,50 m
6	3,49 (dd; 12)	3,50 dd
8	1,89 (m)	-
8'	2,13 (m)	-
9	2,51 (m)	2,50 m
9'	2,44 (m)	-
10	6,29 (t; 8)	6,28 br.t
12	2,24 (m)	2,15 m
12'	2,52 (m)	-
13	2,10 (m)	-
13'	2,15 (m)	-
14	5,08 (t; 12)	5,09 br.t
16	1,67 (s)	1,60 br.s
17	1,59 (s)	1,69 br.s
19	1,34 (s)	1,35 s
20	1,76 (s)	1,78 br.s
( $\text{CH}_3\text{COO-}$ )	2,06 (s)	2,06 s

\*  $\delta$  em ppm e J (entre parênteses) em Hz

A lactona diterpênica acetato de acantoaustralida (**3**) foi isolada pela primeira vez em 1980, por Bohlmann et. al., a partir do extrato acetato de etila:éter de petróleo (1:2) das partes aéreas de *Acanthospermum australe* e teve sua estrutura elucidada baseada em experimentos de RMN  $^1\text{H}$ , IR e EM.

**Figura 95.** Espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (75,5 MHz;  $\text{CDCl}_3$ )



**Figura 96.** DEPT 90° e 135° (75,5 MHz; CDCl<sub>3</sub>) da substância D9C.

**Tabela 12:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  (100,6 MHz) e DEPT (75,5 MHz) em  $\text{CDCl}_3$  de **(3)**.

<b>C</b>	<b><math>\delta^{\circ}\text{C}</math> (3)</b>
C-3	141,9
C-7	84,7
C-11	134,1
C-15	132,5
C-18	168,4
<b>CH</b>	
C-2	120,1
C-6	76,7
C-10	139,7
C-14	123,9
<b>CH<sub>2</sub></b>	
C-1	61,1
C-4	28,5
C-5	28,6
C-8	31,4
C-9	26,6
C-12	36,6
C-13	27,5
<b>CH<sub>3</sub></b>	
C-16	25,9
C-17	17,8
C-19	19,4
C-20	23,4
CH <sub>3</sub> -COO	21,1
C=O	171,2

\*  $\delta$  em ppm ( $^{\circ}\text{C}$ ).

**Figura 97.** Espectro bidimensional HMQC da substância D9C

**Figura 98.** Espectro bidimensional HMBC da substância D9C

**Figura 99.** Espectro bidimensional NOE da substância D9C

**Figura 100.** Espectro bidimensional TOCSY da substância D9C

**Tabela 13:** Correlações entre carbono e hidrogênio através de uma ligação ( $^1J_{CH}$ ) e à longa distância ( $^2J_{CH}$  e  $^3J_{CH}$ ), observados nos espectros bidimensionais de correlação heteronuclear para HMQC (300 MHz) e HMBC (400 MHz), em  $CDCl_3$ , de **(3)**\*.

C	$^1H \times ^{13}C$ - HMQC – $^1J_{CH}$		$^1H \times ^{13}C$ - HMBC – $^nJ_{CH}$	
	$\delta^C$	$\delta^H$	$^2J_{CH}$	$^3J_{CH}$
C-1	61,1	4,59 (dd; 12); 4,63 (t; 12)	H2	-----
C-2	120,1	5,38 (t; 16)	H1, H1'	H4, H4', H20
C-3	141,9	-	H20, H4, H4'	H1, H1', H5, H5'
C-4	28,5	2,36 (m); 2,29 (m)	-----	H2, H20, H6
C-5	28,6	1,46 (m); 1,70 (m)	H6, H4, H4'	-----
C-6	76,7	3,49 (dd; 12)	H5	H4, H4', H8, H19
C-7	84,7		H6, H19, H8	H9, H9'
C-8	31,4	1,89 (m); 2,13 (m)	H9, H9'	H10, H6, H19
C-9	26,6	2,44 (m); 2,51 (m)	H8, H8', H10	-----
C-10	139,7	6,29 (t; 8)	H9, C11	H8, H8', H12, H12', H13, H13'
C-11	134,1		H10	H9, H9', H12, H12', H13, H13'
C-12	36,6	2,24 (m); 2,52 (m)	H13	H14, H10, H16, H17
C-13	27,5	2,10 (m); 2,15 (m)	H14, H12, H12'	-----
C-14	123,9	5,08 (t; 12)	H13, H13'	H17, H16, H12, H12'
C-15	132,5		H17, H16	-----
C-16	25,9	1,67 (s)	-----	H17, H14
C-17	17,8	1,59 (s)	-----	H16, H14
C-18	168,4	-	-----	H10, H12, H12'
C-19	19,4	1,34 (s)	-----	H6
C-20	23,4	1,76 (s)	-----	H2, H4, H4'
C=O	171,2		-----	H1, H1', H(CH <sub>3</sub> )

\*  $\delta$  em ppm e J (entre parênteses) em Hz.

### Dados Físicos e Espectrométricos de **(3)** – Acetato de acantoaustralida

Óleo amarelo-escuro (5,6 mg)

UV  $\lambda_{max}$  em  $CHCl_3$ , nm (log  $\gamma$ ): 284 (1,26); 324 (1,08); 432 (1,69); 452 (1,88); 484

(1,51).

ESI-MS  $m/z$  (int.rel.%): 379  $[M+H]^+$ ; 418 (13)  $[M+k]^+$ ; 402 (100)  $[M+Na]^+$ ; 342 (86)

$[M-HOAc]^+$ .

## **PARTE 3 – ATIVIDADE ANTIVIRAL**

### **3.1– MATERIAIS E MÉTODOS**

A atividade antiviral do Extrato Bruto Liofilizado (EBL) das partes aéreas de *Acanthospermum australe* e suas pré-frações (F1 a F7) foi avaliada através de técnica de ensaio *in vitro*, utilizando cultura de células infectas com partículas virais. A análise da susceptibilidade viral foi feita pelo método colorimétrico descrito por Skehan et al. (1990) e modificado por Papazisis et al. (1997), com algumas alterações. Esses ensaios foram realizados no laboratório de Microbiologia Aplicada aos Produtos Naturais e Sintéticos, do Departamento de Análises Clínicas da UEM.

### **3.2 – Cultura de Células**

Foram utilizadas células tumorais de linhagem contínua Hep-2 (carcinoma de laringe humano), cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 2mM de L-glutamina, 0,14% de bicarbonato de sódio e 50µg/ml de gentamicina. As células foram mantidas em estufa úmida à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>, em frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup>, com tamparosca e dispositivo para a entrada do CO<sub>2</sub>. As células foram observadas em microscópio invertido diariamente. O meio de cultura foi substituído sempre que o pH estava ácido, observado através da mudança de coloração do meio, de rosa para tons alaranjados. O crescimento da população celular resulta na formação de uma monocamada confluenta de células, que fica aderida à parede interna do frasco.



Para manter o crescimento contínuo das células Hep-2 e utilizá-las nos experimentos durante a fase exponencial de multiplicação celular, elas foram renovadas a cada 72 horas. Retira-se o meio de cultura dos frascos e adiciona-se solução de tripsina à 37°C por 90 segundos, o que promove o descolamento da camada celular; as células são ressuspensas em meio DMEM e uma sexta parte dessa suspensão obtida é novamente incubada nas mesmas condições iniciais.

### **3.3 – Partículas Virais**

As células cultivadas foram infectadas com suspensões de partículas virais de Herpesvírus bovino e de Poliovírus vacinal, obtidas do Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina (Londrina, PR). Essas suspensões de partículas virais permaneceram congeladas em meio DMEM (Gibco) a -20°C e, antes de serem utilizadas, foram previamente descongeladas, diluídas e tituladas para que se determinasse o índice de infectividade da suspensão.

Nos experimentos que avaliam a atividade antiviral *in vitro*, inoculou-se uma quantidade de partículas virais capazes de destruir aproximadamente 75% da totalidade de células incubadas. Neste trabalho, esse título foi obtido com uma diluição da ordem de  $10^{-4}$ , a partir da suspensão-estoque mantida em freezer.

### **3.4 - Ensaio Antiviral**

A técnica utilizada neste trabalho para a avaliação da atividade antiviral do EBL e frações obtidas de *A. australe* seguiu o trabalho descrito por Skehan et al. (1990) e modificado por Papazisis et al. (1997), com algumas alterações.

Primeiramente, obteve-se uma suspensão de células Hep-2, a partir dos frascos cultivados como descrito no item 3.2. Uma alíquota das células foi previamente diluída em solução de salina 0,85% e contada em câmara hematócitométrica de Neubauer (Improved Double Neubauer Ruling). A partir da contagem, fez-se a diluição da suspensão celular, a fim de se obter  $2,0 \times 10^5$  células/ml.

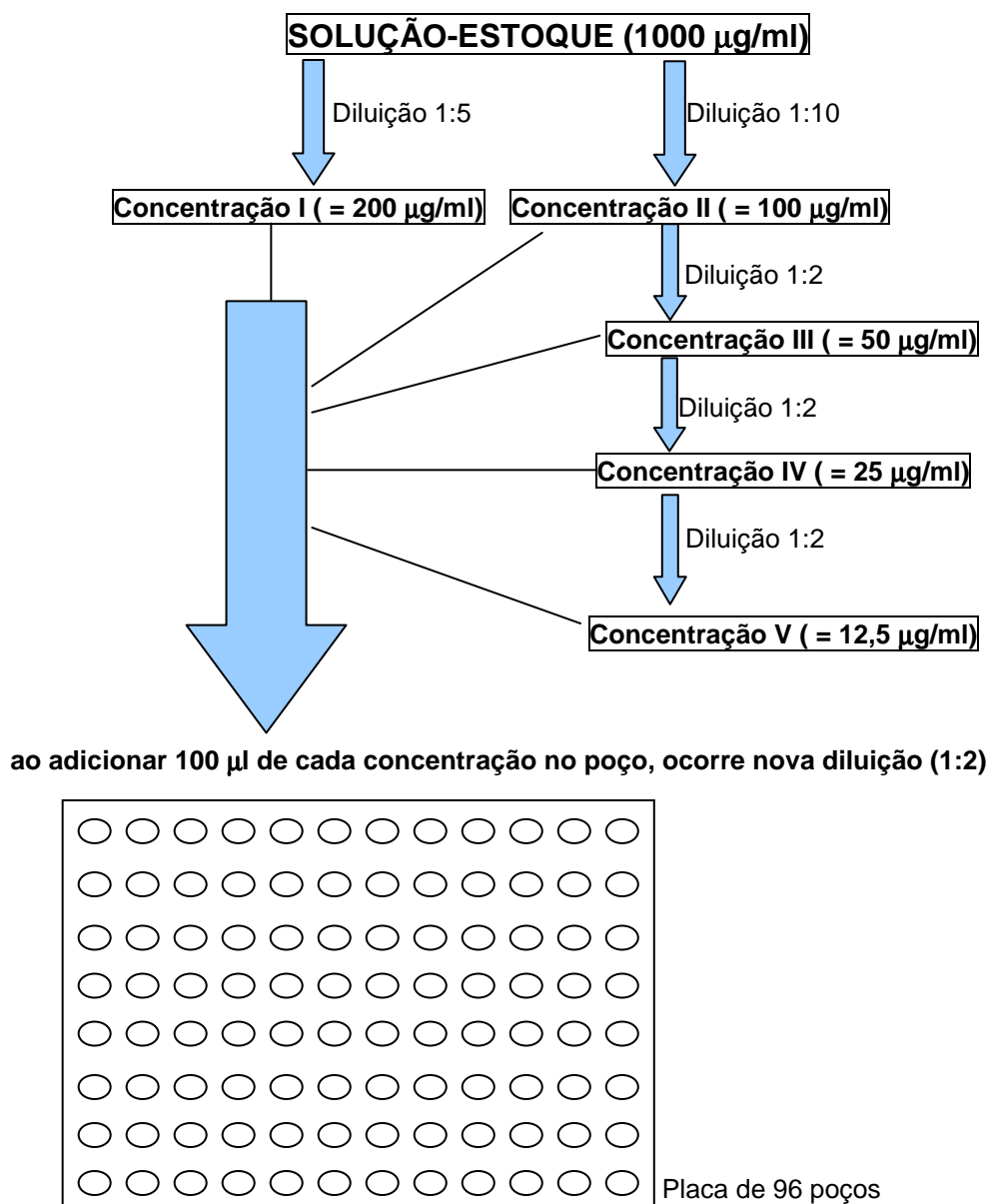
Foram distribuídos 100µl da suspensão acima em cada poço de uma microplaca de 96 poços, o que corresponde a  $2 \times 10^4$  células/poço. As células foram incubadas em estufa a 37°C com tensão de 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 h, para a formação de uma monocamada confluyente de células. Após esse período, o meio de cultura sobrenadante foi retirado e inoculou-se 25 µl da suspensão de partículas virais previamente diluídas como descrito no item 3.4. As células foram mantidas em contato com as partículas virais durante 60 minutos a 37°C, tempo suficiente para que ocorra adsorção à membrana celular. Em seguida, foram adicionados 75µl de meio de cultura (DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2mM de L-glutamina, 0,14% de bicarbonato de sódio e 50 µg/ml de gentamicina) em cada poço da microplaca, perfazendo um total de 100 µl em cada poço.

O EBL e as frações foram diluídas conforme ilustra a figura 101, utilizando meio DMEM para o preparo de todas as concentrações. Adicionou-se 100 µl de cada concentração testada, em triplicata, na placa de 96 poços.

Para obter um controle do crescimento celular, seis poços ficaram sem receber o inóculo viral (denominado “controle de células”). Dessa forma, ao final do experimento, pode-se saber se as células utilizadas estavam completamente viáveis; esse crescimento celular é utilizado como comparação com os poços infectados e tratados com as substâncias testadas.

Para o controle de infectividade viral, seis poços permaneceram apenas com as células e as partículas virais, recebendo somente mais 100 µl de meio de cultura. Dessa forma, ao final do experimento, pode-se obter o valor (em porcentagem) de destruição celular causada pelo inóculo viral, tendo como referência o crescimento celular (“controle de células”).

Incubou-se novamente a placa a 37°C em estufa úmida com 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Retirou-se o meio de cultura sobrenadante de cada poço, lavou-se com 50 µl de solução salina, para retirar fragmentos celulares. As células viáveis foram fixadas à placa com 50 µl de solução aquosa de ácido tricloroacético 10% (v/v) por 60 minutos em refrigerador. Lavou-se a placa 5 vezes com água corrente e aguardou-se a secagem em temperatura ambiente. Adicionou-se 50 µl de solução 4%(v/v) de sulforodamina B em ácido acético 1%. Após 30 minutos, lavou-se a placa 4 vezes com solução de ácido acético 1%(v/v). Adicionou-se 150 µl de tampão tris-base em cada poço, homogeneizou-se por 25 minutos. A leitura foi feita em leitor de ELISA a 550 nm.



**Figura 101:** Diluição seriada do Extrato Bruto Liofilizado e frações, de modo a obter as concentrações necessárias para os experimentos de citotoxicidade e atividade antiviral.

### 3.5 - Ensaio de Citotoxicidade

O extrato bruto liofilizado (EBL) e as frações obtidas de *Acanthospermum australe* foram avaliados quanto ao potencial citotóxico *in vitro*. Foram utilizadas células da mesma linhagem usada na avaliação da atividade antiviral (Hep-2). Esse experimento tem a finalidade de avaliar a interferência do EBL e das frações testadas sobre a viabilidade das células, de tal forma que se possa analisar a

ocorrência de destruição celular devido à toxicidade das substâncias contidas no extrato vegetal e a partir de qual concentração ocorre essa destruição.

As células Hep-2 foram inoculadas e cultivadas em placa de 96 poços, conforme anteriormente descrito para o ensaio antiviral, no item 3.4.

Em seguida, foram adicionados 100 µl das diluições do EBL e das frações de *Acanthospermum australe*, previamente preparadas como mostra a figura 101.

Para o controle de crescimento celular, seis poços ficaram somente com o inóculo de células e o meio de cultura (denominado “controle de células”). Dessa forma, ao final do experimento, pode-se avaliar a viabilidade celular durante todo o experimento. Esse crescimento celular é utilizado como comparação com os poços tratados com o EBL e as frações testadas.

Após 48 horas de incubação, o meio de cultura sobrenadante for retirado, os poços foram lavados com salina, as células viáveis foram fixadas e coradas por uma solução de sulforodamina B e analisou-se a viabilidade celular pela técnica colorimétrica que utiliza sulforodamina B e leitor de ELISA a 550 nm.

### **3.6 – RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A tabela 14 apresenta os resultados obtidos a partir dos experimentos com o EBL e as frações (F1 a F7) testadas para Herpesvirus bovino e Poliovirus vacinal. Os resultados são expressos em percentagem de proteção celular das amostras testadas, tendo como controles a média dos valores de densidade ótica obtidos: 1) a partir do crescimento celular (“controle de células”), isento de vírus e 2) a partir do controle de infectividade viral (“controle de vírus”), no qual ocorre destruição, em média, de 75% das células. Dessa forma, pode-se calcular o índice de proteção

celular, tendo como base o crescimento celular isento de vírus e também a destruição das células, causada pelo vírus. Os resultados apresentados foram obtidos de sete experimentos, utilizando cada concentração testada em triplicata.

A tabela 15 apresenta os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade do EBL e das frações, tendo como controle a média dos valores de densidade ótica obtidos dos poços de controle de células.

O Extrato Bruto Liofilizado (EBL) de *Acanthospermum australe* apresentou resultados significativos de atividade antiviral, conferindo proteção celular à 50% das células ( $EC_{50}$ ) nas concentrações de 80  $\mu\text{g/ml}$  para o Herpesvirus bovino e 38  $\mu\text{g/ml}$  para o Poliovirus vacinal. As frações F3, F4 e F6 apresentaram, dentre as frações testadas, os resultados mais significativos quanto à atividade antiviral sobre Herpervirus, pois apresentaram valores de  $EC_{50}$  (Concentração Efetiva de proteção à 50% das células) abaixo de 25  $\mu\text{g/ml}$ .

O **gráfico 1** representa a atividade antiviral do EBL e frações F3, F4 e F6 sobre o Herpesvirus bovino. Pode-se observar que o EBL apresentou um valor de  $EC_{50}$  de aproximadamente 80  $\mu\text{g/ml}$ . A fração F3 apresentou  $EC_{50}$  de 6,25  $\mu\text{g/ml}$ , porém o aumento da concentração causou declínio na atividade. A fração F4 apresentou uma proteção celular de quase 60% na concentração de 12,5  $\mu\text{g/ml}$ , porém essa atividade decresceu com o aumento da concentração. A fração F6 apresentou uma curva de atividade antiviral ascendente entre 6,25 e 25  $\mu\text{g/ml}$ , porém a porcentagem de proteção celular declinou com o aumento da concentração.

O declínio observado da atividade antiviral para as frações F3, F4 e F6 pode ser explicado, ao observar-se o **gráfico 3**, que representa os valores de citotoxicidade para as frações acima descritas. As concentrações tóxicas para 50% das células ( $CC_{50}$ ) coincide com as concentrações a partir das quais observa-se

declínio na atividade antiviral. Pode-se, pois, concluir que as frações F3, F4 e F6, nas concentrações acima de 12,5µg/ml (para F3 e F4) e 25µg/ml (para F6), são tóxicas para as células Hep-2.

O **gráfico 2** representa a atividade antiviral sobre Poliovirus vacinal, do EBL e das frações F3, F4 e F6. Pode-se observar que apenas a fração F6 atingiu a proteção de 50% das células, na concentração de 22,7 µg/ml, que aumentou até um pico de aproximadamente 70% de proteção, na concentração de 50 µg/ml. Nas concentrações acima de 50 µg/ml, houve queda na atividade antiviral, sendo justificada pela citotoxicidade dessa fração sobre as células Hep-2, a partir da concentração de 25µg/ml. As demais frações não apresentaram atividade significativa sobre o Poliovírus vacinal.

Comparando-se os valores de atividade antiviral obtidos com EBL, tanto para Herpesvirus quanto para Poliovirus, com os valores obtidos para as frações, pode-se perceber que o EBL foi relativamente mais ativo que as suas frações. Isso pode ocorrer devido à ação sinérgica dos componentes do EBL, notadamente os polifenólicos, como flavonóides, cuja atividade antiviral já foi constatada por diversos pesquisadores (VLIETINCK, A. J. e BERGHE, D. A. V., 1991; SEMPLE, S.J. et al., 1999; YAO-LAN LI et al., 2002; JASSIM, S. A.A. e NAJI, M. A., 2003; JIANG DU et al., 2003). Ao serem separadas por diferença de polaridade, essas substâncias perdem sua potência antiviral, pois estão em menor número, enquanto que as substâncias tóxicas para as células alcançam uma concentração relativa maior. Dessa forma, ocorre diminuição da atividade antiviral devido aos efeitos citotóxicos sobre as células.

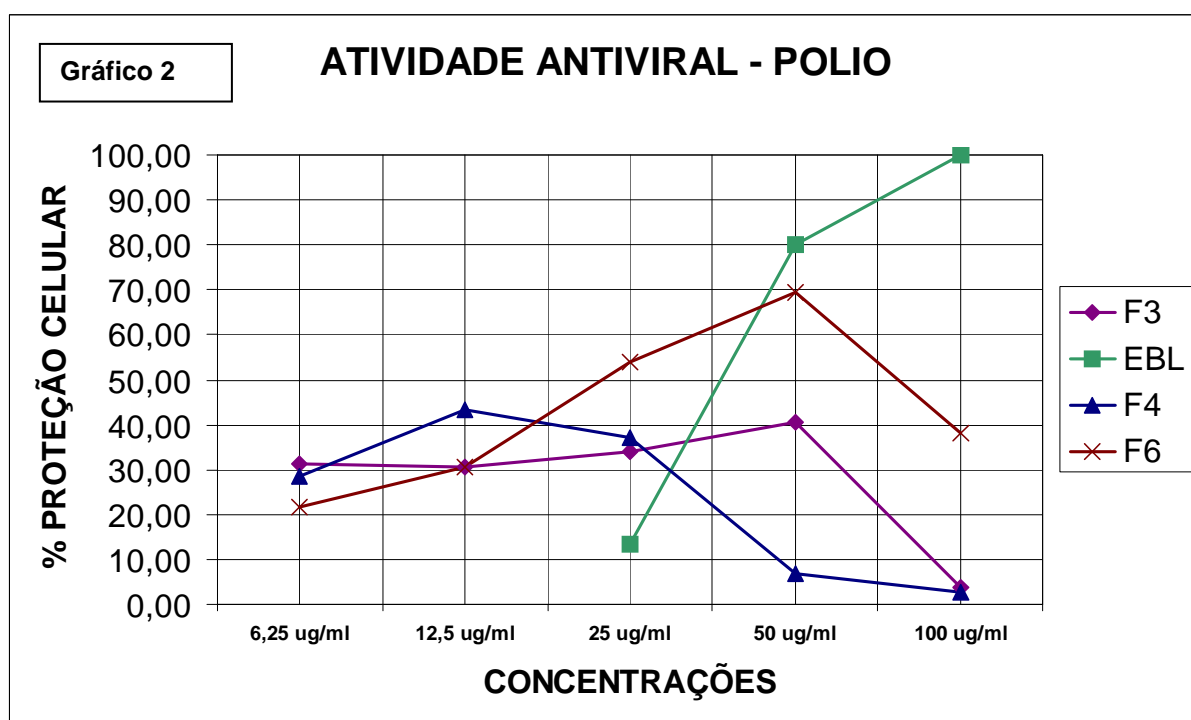
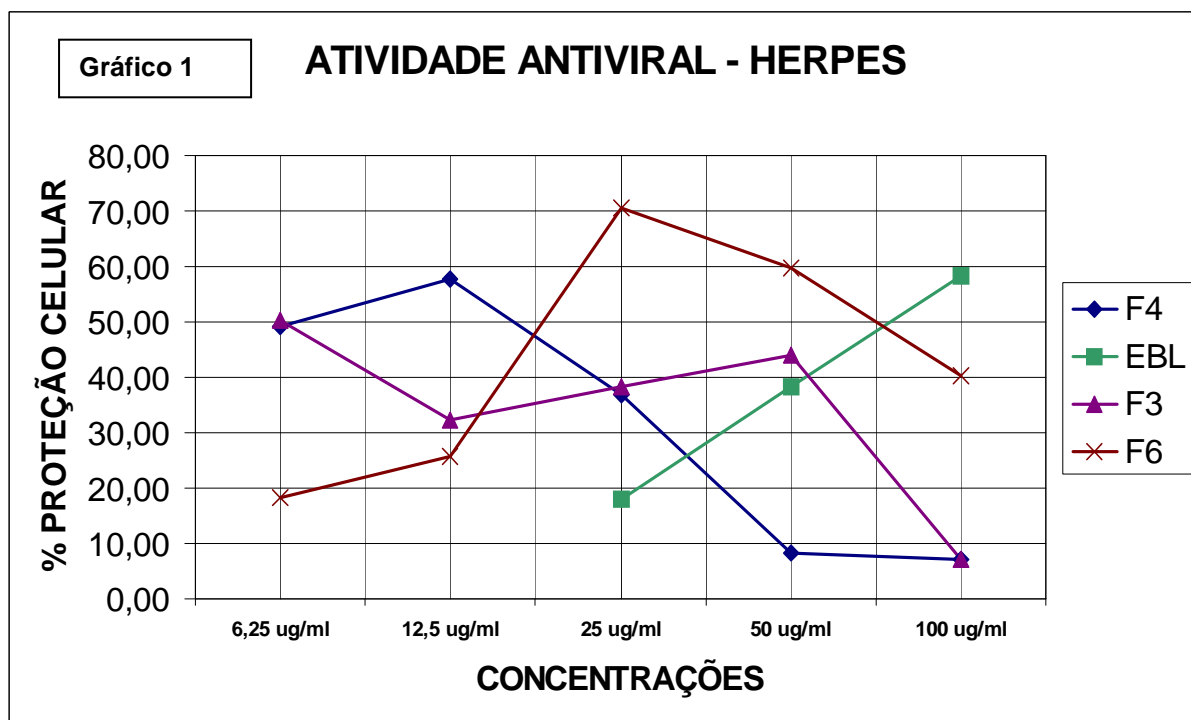
**Tabela 14** - Atividade antiviral do Extrato Bruto Liofilizado (EBL) e das frações obtidas de *Acanthospermum australe* para Herpes vírus bovino e Poliovírus Vacinal (expressos em porcentagem de proteção celular), comparada ao controle de crescimento celular e ao controle de infectividade viral.

	HERPESVÍRUS BOVINO					POLIOVÍRUS VACINAL				
	CONCENTRAÇÕES (µg/ml)					CONCENTRAÇÕES (µg/ml)				
	6,25	12,5	25	50	100	6,25	12,5	25	50	100
<b>EBL</b>	-	-	18,0 ± 0,3	38,4 ± 0,0	58,2 ± 7,6	-	-	13,4 ± 1,7	80,2 ± 0,0	100 ± 0,0
<b>F1</b>	26,1 ± 4,6	30,9 ± 5,7	44,6 ± 6,8	74,1 ± 14,3	61,6 ± 12,2	20,0 ± 4,1	40,7 ± 7,7	11,6 ± 7,4	67,6 ± 8,2	78,6 ± 10,1
<b>F2</b>	30,5 ± 5,9	18,0 ± 3,5	35,8 ± 8,1	19,3 ± 7,2	21,2 ± 8,2	24,7 ± 2,9	41,4 ± 10,7	32,9 ± 4,3	11,7 ± 3,6	15,9 ± 0,9
<b>F3</b>	50,3 ± 7,7	32,3 ± 0,9	38,3 ± 6,4	44,0 ± 1,4	7,0 ± 3,3	31,3 ± 7,1	30,7 ± 4,1	34,1 ± 5,1	40,4 ± 3,0	3,7 ± 1,5
<b>F4</b>	49,0 ± 4,3	57,8 ± 7,6	37,0 ± 1,8	8,2 ± 1,1	7,2 ± 2,3	28,4 ± 6,4	43,2 ± 7,7	37,2 ± 9,5	7,0 ± 3,0	2,8 ± 0,0
<b>F5</b>	26,6 ± 1,5	36,1 ± 3,9	19,6 ± 3,3	55,0 ± 18,3	47,4 ± 5,7	36,4 ± 6,8	17,2 ± 2,1	19,8 ± 3,8	65,2 ± 0,6	14,1 ± 3,5
<b>F6</b>	18,2 ± 5,3	25,7 ± 8,6	70,4 ± 4,2	59,6 ± 16,2	40,3 ± 13,3	21,6 ± 5,6	30,7 ± 8,6	53,8 ± 5,9	69,5 ± 28,9	38,1 ± 9,1
<b>F7</b>	17,9 ± 3,4	24,3 ± 8,7	20,9 ± 5,0	13,7 ± 4,3	13,7 ± 5,2	22,2 ± 3,1	21,1 ± 4,5	26,1 ± 6,8	16,3 ± 8,0	32,1 ± 0,3

**Tabela 15-** Citotoxicidade do Extrato Bruto Liofilizado e frações obtidas de *A. australe*, resultados expressos em porcentagem de crescimento celular.

	CONCENTRAÇÕES (µg/ml)							
	12,5	25	50	100	250	500	750	1000
<b>EBL</b>	-	97,1 ± 0,64	92,0 ± 5,23	73,6 ± 11,1	-	-	-	-
<b>F1</b>	44,2	90,8	35,4	15,5	25,1	20	21,2	20,8
<b>F2</b>	83,4	22,8	67,7	21	21,2	26,1	25,3	23,6
<b>F3</b>	74	32,6	14,8	17,7	17,7	22,9	17,1	21,7
<b>F4</b>	56,6	14,3	19	21,3	22,3	22,1	25,2	29,7
<b>F5</b>	66,7	59,6	91,3	53,6	14,9	17,5	20,5	20
<b>F6</b>	119,5	98,5	30,3	19	31,2	33,2	21	16,9
<b>F7</b>	112,8	52,6	21,5	26,6	31,7	29,9	22,4	28,1





**Gráficos 1-2.** Atividade antiviral do Extrato Bruto Liofilizado (EBL) e frações: **F3** (diclorometano), **F4** (diclorometano:acetato de etila 1:1v/v) e **F6** (metanol) sobre Herpesvirus bovino e Poliovirus vacinal.

**Gráfico 3.** Citotoxicidade das frações **F3**, **F4** e **F6** sobre as células Hep-2.

## V – CONCLUSÕES

- 1) Os dados obtidos com o estudo da morfologia e anatomia das partes aéreas (caule, folhas, flores e frutos) de *Acanthospermum australe* foram importantes para sua correta identificação e avaliação da droga vegetal na forma de pó, contribuindo com dados de controle de qualidade para comercialização desta espécie como droga vegetal.
- 2) Da fração F4 (diclorometano:acetato de etila 1:1 v/v) foram obtidos dois flavonóides: a **quercetina**, que já havia sido isolada da mesma espécie em 1987, por Shimizu et. al. e o flavonóide trimetoxilado **crisosplenol D**, isolado em 1987 de *Acanthospermum australe*, por Debenedetti et al.. Da fração F3 (diclorometano) foi isolada uma lactona diterpênica denominada **acetato de acantoaustralida**, que já havia sido isolada da espécie por Bohlmann et al., em 1980.
- 3) O Extrato Bruto Liofilizado apresentou atividade antiviral *in vitro* significativa para os vírus testados, provavelmente devido a efeitos sinérgicos das substâncias químicas presentes na mistura. As frações F3, F4 e F6 mostraram-se efetivas na atividade antiviral *in vitro*, embora tenham apresentado citotoxicidade em concentrações apenas um pouco acima das ativas.
- 4) Os resultados obtidos neste trabalho para a espécie vegetal *Acanthospermum australe*, acerca da identificação botânica, purificação, isolamento e identificação de substâncias químicas e ensaios de atividade biológica *in vitro* contribuíram

como um primeiro passo para mais pesquisas e futura utilização dessa espécie como droga vegetal.

## VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBIERO, A.L.M.; BACCHI, E.M.; MOURÃO, K.S.M. Caracterização anatômica das folhas, frutos e sementes de *Sapindus saponaria* L. (Sapindaceae). *Acta Scientiarum*, Maringá/PR, v. 23, n.2, p. 549-560, 2001.

ALI, H. et al. Evaluation of selected Sudanese medicinal plants for their in vitro activity hemoflagellates, selected bactéria, HIV-1-RT and tyrosine kinase inhibitory, and for citotoxicity. *Journal of Ethnopharmacology*, New York, v. 83, p. 219-228, 2002.

BARROSO, G. M. *Sistemática de angiospermas do Brasil*. 3. ed. Viçosa: UFV (Impr. Univ.),1991, v. 3, p. 237-274.

BOHLMANN, F. et al. Two sesquiterpene and three diterpene lactones from *Acanthospermum australe*. *Phytochemistry*, New York, v. 20; p. 1081-1083, 1981.

BOHLMANN, F. SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; JAKUPOVIC, J. Neue Melampolide aus *Acanthospermum australe*. *Planta Medica*, v. 50, p. 37-39, 1984.

BREITWIESER, I.; WARD, J. M. Leaf anatomy of *Raoulia* Hook.f. (Compositae, Gnaphalieae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, Londres, v. 126, p. 217-235, 1998.

CARMELLO-GUERREIRO, S. M. *Técnica de inclusão de material vegetal em historresina*. Botucatu: Departamento de Botânica da UNESP, 1995.

CARVALHO, L. H. et al. Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied "in vivo" in *Plasmodium berghei*-infected mice and "in vitro" against *Plasmodium falciparum* in culture. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, São Paulo, v. 24, p. 1113-1123, 1991.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 12(4), p. 564-582, 1999.

DEBENEDETTI, S. et al. 6-Methoxy flavonoids from *Acanthospermum australe*. *Journal of Natural Products*, v. 50(2), p. 325, 1987.

FAHN, A. *Secretory Tissues in Plants*. London: Academic Press, 1979, 301 pp..

FELIPE, G. M.; ALENCASTRO, F. M. M. R. Contribuição ao estudo da nervação foliar das compostas de cerrado. I – Tribos Helinieae, Heliantheae, Inuleae, Mutisieae e Senecioneae. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 38(supl.): 125-158, 1966.

FLEISCHER, T. C., AMEADE, E. P.; SAWER, I. K. Antimicrobial activity of the leaves and flowering tops of *Acanthospermum hispidum*. *Fitoterapia*, v. 74, p. 130-132, 2003.

GERLACH, G. *Botanische microtechnik, eine einföhrung*. Georg. Thiem Verlag, Stuttgart ; 1969.

GUERRITS, P. O. *The application of Glycol Methacrylate in Histotechnology; some fundamentals principles*. Netherlands: Department of Anatomy and Embryology , State University; Gröningen, 1991.

HANDRO, W. Contribuição ao estudo de venação e anatomia foliar das Amarantáceas dos cerrados. *Annais da Academia Brasileira de Ciências*, Rio de Janeiro, v. 36(4): 479-499, 1964.

HERZ, W.; KALYANARAMAN, P. S. Acanthospermal-A and Acanthospermal-B, two new melampolides from *Acanthospermum* species. *Journal of Organic Chemistry*, EUA, v. 40, p. 3486-3491, 1975.

HICKEY, L. J. Classification of the architecture of dicotyledons leaves. *American Journal of Botany*, v. 60 (1), p. 17-33, 1973.

HOUGHTON, S.A.; RAMAN, A. *Laboratory Handbook for the Fractionation of Natural Extracts*. Chapman & Hall, Londres, 1998.

JASSIM, S. A. A. & NAJI, M. A. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. *Journal of Applied Microbiology*, v. 95, p. 412-427, 2003.

JIANG DU et al. Antiviral flavonoids from the root bark of *Morus alba* L. *Phytochemistry*, v. 62, p. 1235-1238, 2003.

JOHANSEN, D. A. *Plant microtechnique*. McGraw-Hill Book Company, New York, 1940.

KOTT, V. et al. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 79-84, 1999.

KRETTLI, A. U. et al. The Search for New Antimalarial Drugs from Plantas Used to Treat Fever and Malaria or Plants Randomly Selected: a Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, vol. 96(8), p. 1033-1042, Novembro 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002, p. 127.

MADGE, C. Therapeutic landscapes of the Jola, The Gambia, West Africa. Grã-Bretanha: *Health & Place*, v. 4 (4), p. 293-311, 1998.

MATSUNAGA, K.; SAITOH, M.; OHIZUMI, Y. Acanthostral, a Novel Antineoplastic cis-cis-cis-germacranolide from *Acanthospermum australe*. Great Britain, *Tetrahedron Letters*, v. 37(9), p. 1455-1456, 1996.



MELO-DE-PINNA, G. F. A.; MENEZES, N. L. Vegetative organ anatomy of *Ianthopappus corymbosus* Roque & Hind (Asteraceae-Mutisieae). *Revista Brasileira de Botânica*, v. 25, n. 4, p. 505-514; dez. 2002.

MENDES, N. M. et al. Screening of Asteraceae (Compositae) Plant Extracts for Molluscicidal Activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, vol. 94(3), p. 411-412, 1999.

MORAIS, S. M. et al. Essential oil of *Acanthospermum australe* DC. *Journal of Essential Oil Research*, v. 9, p. 601-602, 1997.

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

NIKOLAKAKI, A.; CHRISTODOULAKIS, N. S. Leaf structure and cytochemical investigation of secretory tissues in *Inula viscosa*. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 144, p. 437-448, 2004.

NOUMI, E.; DIBAKTO, T. W. Medicinal plants used for peptic ulcer in the Bangangte region, western Cameroon. *Fitoterapia*, v. 71, p. 406-412, 2000.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; McCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue O. *Protoplasma*, v. 59, n. 2, p. 368-373; 1964.

ORABI, K. Y. et al. New eudesmane sesquiterpenes from *Plectranthus cylindraceus*. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1665-1668, 2000.

PAPAZISIS, K. T. et al. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 208, p. 151-158, 1997.

PALOMINO, S. S. et al. Screening of South American Plants against Human Immunodeficiency Virus: Preliminary Fractionation of Aqueous Extract from *Baccharis trinervis*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, Tokio, v. 25(9), p. 1147-1150, 2002.

PORTILLO, A. et al. Antifungal activity of Paraguayan plants used in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 76, p. 93-98, 2001.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais do Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. *Ciências Agrotécnicas*, Lavras, v.25, n.1, p. 102-123, 2001.

SANON, S. et al. Ethnobotanical survey and in vitro antiplasmodial activity of plants used in traditional medicina in Burkina Faso. *Journal of Ethnopharmacology*, New York, v. 86, p. 143-147, 2003.

SEMPLE, S. J. et al. Antiviral flavonoid from *Pterocaulon sphacelatum*, an Australian Aboriginal medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, New York, v. 68, p. 283-288, 1999.

SHIMIZU, M. et al. Chemical and Pharmaceutical Studies on Medicinal Plants in Paraguay. I. Isolation and Identification of Lens Aldose Reductase Inhibitor from “Tapecué”, *Acanthospermum australe* O.K. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.35(3), p. 1234-1237; 1987.

SINGH, V. A new distributional record for *Acanthospermum australe* (Loefl.) Ktze. *Current Science*, v. 42, n. 2, p. 68-69, 1973.

SKEHAN, P. et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anti-cancer-drug screening. *Journal National of the Cancer Institute*, v.82, p. 1107, 1990.

SONAGLIO, D. et al. Desenvolvimento Tecnológico e Produção de Fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2001, p. 250.

SOUZA, L.A. et al. Morfología e anatomia da flor de *Pilocarpus pennatifolius* Lem. (Rutaceae). *Revista Brasileira de Botânica*, v.26, n.2, p. 175-184, 2003.

STILL, W. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. *Journal Organic Chemical*, v.43 [S.1.], p. 2923-2924, 1978.

SUMMERFIELD, A. et al. Antiviral activity of an extract from leaves of the tropical plant *Acanthospermum hispidum*. *Antiviral Research*, v. 36, p. 55-62, 1997.

VLIETINCK, A. J.; BERGHE, D. A. V. Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *Journal of Ethnopharmacology*, v. 32, p. 141-153, 1991.

WANG, Y.; HAMBURGER, M.; GUEHO, J.; HOSTETTAMNN, K. Antimicrobial flavonoids from *Psiadia trinervia* and their methylated and acetylated derivatives. *Phytochemistry*, v. 28, p. 2323-2327, 1989.

YAO-LAN LI et al. Antiviral activities of flavonoids and organic acid from *Trollius chinensis* Bunge. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 79, p. 365-368, 2002.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. (Ed.) *Plantas Mediciniais – sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Santa Catarina: Argos, , 2001, p. 43.

## Anexo I

### Reativo de Godin

**Solução A:** Vanilina 1% (m/v) em etanol

**Solução B:** Ácido Perclórico 3% (v/v) em água

No momento do uso, misturar ambas soluções em partes iguais.

Borrifar sobre a placa de CCD e levar ao aquecimento em estufa a 105°C.

# 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](#)