

LUIZ CLAUDIO DA SILVA MALHEIROS

“ Isoeleuterol e Isoeleuterina: Potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) e atividades microbiológica e antioxidante”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa.

Co-orientador: Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira.

Belém-Pará

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

Malheiros, Luiz Claudio da Silva

Isoeleuterol e Isoeleuterina: Potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb. (Iridaceae) e atividades microbiológica e antioxidantes.

Belém, 2008.

67 p. il.; 30 cm

Orientador: Prof^o. Dr^o. Wagner Luiz Ramos Barbosa.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e Medicamentos - Universidade Federal do Pará.

1. Plantas medicinais. 2. *Eleutherine plicata* Herb. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Atividade antioxidante. 5. Isoeleuterol. 6. Isoeleuterina. I. Título.

LUIZ CLAUDIO DA SILVA MALHEIROS

“ Isoeleuterol e Isoeleuterina: Potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb (Iridaceae) e atividades microbiológica e antioxidante”

Belém, 30 de dezembro de 2008.

BANCA EXAMINADORA

1. _____
PROF. DR. WAGNER LUIZ RAMOS BARBOSA-UFPA

2. _____
PROF. DR. LEANDRO MACHADO ROCHA - UFF

3. _____
PROF^a. DR^a. ROSEANE MARIA RIBEIRO COSTA-UFPA

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me concedido o dom da vida e da inteligência.

Aos meus pais pelo amor e dedicação à minha formação.

À minha esposa Aline Nascimento pelo seu amor, compreensão, carinho, incentivo e paciência.

Ao Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa, meu orientador e amigo, pela dedicação e, que mesmo sabendo de todas as limitações impostas pelo trabalho, aceitou orientar-me.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello, pela oportunidade de realizar o isolamento dos constituintes químicos em seu laboratório e pela atenção dispensada.

Ao Prof. Dr. José Maria Vieira dos Santos Vieira, pela orientação na avaliação microbiológica.

Ao Prof. Dr. Rosivaldo pela orientação na avaliação da atividade antioxidante.

A farmacêutica-bioquímica Lúcia Carla de Vasconcelos Mendonça pelo auxílio na realização da avaliação da atividade microbiológica.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará pelos conhecimentos transmitidos.

Às acadêmicas de Farmácia Nádia Mileo pelo auxílio no início do trabalho e Myrth Nascimento pela sua ajuda essencial no desenvolvimento do trabalho.

RESUMO

A espécie *Eleutherine plicata* Herb. é uma Iridaceae, conhecida popularmente como marupazinho, muito utilizada pela população para o tratamento de diarreias. Com o bulbo da planta prepara-se um chá, que é utilizado no tratamento de infestações causadas por ameba. O material vegetal utilizado neste estudo foi coletado em Belém do Pará e sua identificação botânica foi realizada por comparação de exsicata depositada no Museu Paraense Emílio Goeldi sob nº 10543. O extrato etanólico (EE) foi preparado por percolação a partir do bulbo previamente seco e moído. Após a secagem o extrato etanólico foi suspenso em uma solução hidroalcoólica (1:1) e submetida a partição com solventes de polaridades crescente. Com o extrato etanólico e as frações foram realizados 18 testes para detectar classes de metabólitos secundários. O extrato etanólico e as frações hexânica e clorofórmica apresentaram resultado positivo para naftoquinonas, antraquinonas e esteróides e triperpenos. As análises por cromatografia em camada delgada do extrato etanólico e frações hexânica e clorofórmica mostraram zonas sensíveis à solução metanólica de KOH 10%, indicando a presença de quinonas nestas amostras. A avaliação da atividade antimicrobiana do referido extrato e frações com cepas de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* demonstrou que a fração clorofórmica é a mais ativa, apresentando os maiores halos de inibição de crescimento microbiano, possivelmente, contendo uma maior concentração de constituintes ativos. Da fração clorofórmica foram isolados os constituintes químicos isoeleuterol e isoeleuterina, os quais foram caracterizados quimicamente através de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN¹H) e carbono 13 (RMN ¹³C), em comparação com os dados da literatura. O extrato etanólico, isoeleuterol e isoeleuterina foram submetidos a avaliação de suas atividades antioxidantes, os quais apresentaram fraca atividade quando comparado com o padrão BHT.

PALAVRAS CHAVES: *Eleutherine plicata*, naftoquinonas, isoeleuterol, isoeleuterina e atividade antioxidante.

ABSTRACT

Eleutherine plicata Herb. is an Iridaceae, popularly known as marupazinho, widely used by people to treat diarrhea. With the bulb of the plant is about a cup of tea, which is used to treat infestations caused by amoeba. The plant material used in this study was collected in Belém do Pará and their identification by comparison of botany was deposited in exsiccates Paraense Emilio Goeldi Museum under n^o 10543. The ethanol extract was prepared by percolation from the bulb previously dried and crushed. After drying the ethanol extract was suspended in a solution hydroalcoholic (1:1) and subjected to partition with solvents of increasing polarity. With the ethanol extract and the fractions were performed eighteen tests to detect classes of secondary metabolites. The ethanol extract and the fractions hexanic and chloroform, showed a positive result for naphthoquinones, anthraquinones and steroids and triperpenoids. The analysis by thin-layer chromatography fractions of ethanol extract and hexane and chloroform, showed areas susceptible to methanolic solution of KOH 10%, indicating the presence of quinones in these samples. The evaluation of the antimicrobial activity of ethanol extract and fractions hexanic and chloroform with strains of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*, showed that the chloroform fraction is the most active, presenting the largest halos of inhibition of microbial growth, possibly containing a higher concentration of active constituents. The chemical constituents isoeleutherol and isoeleutherine were isolated from chloroform fraction, and were characterized chemically using RMN ¹H e ¹³C, compared with the literature. The ethanol extract, isoeleutherol and isoeleutherine were submitted to evaluation of their antioxidant activities, and showed weak activity when compared with BHT.

KEYWORDS: *Eleutherine plicata*, naphthoquinones, isoeleutherol, isoeleutherine and antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
01	<i>Eleutherine plicata</i> Herb. (marupazinho).....	16
02	Constituintes químicos isolados da espécie <i>Eleutherine bulbosa</i> Mill.....	18
03	Esquema resumido da inibição das enzimas topoisomerases I e II pelas naftoquinonas.....	19
04	Estrutura química básica dos compostos quinônicos.....	20
05	Estrutura química do lapachol.....	22
06	Ciclo redox reduzido induzido pelas quinonas.....	24
07	Exsicata de <i>Eleutherine plicata</i> Herb. elaborada para identificação botânica.....	32
08	Cromatograma obtido sobre gel de sílica de fase normal com eluente clorofórmio/acetona 99:1.....	43
09	Antibiograma realizado com <i>C. albicans</i>	45
10	Antibiograma realizado com <i>S. aureus</i>	46
11	Espectro de RMN ¹ H do Isoeleuterol (300MHZ; CDCl ₃).....	50
12	Espectro de RMN ¹³ C do Isoeleuterol (300MHZ; CDCl ₃).....	52
13	Espectro de RMN ¹ H da Isoeleuterina (300MHZ; CDCl ₃).....	56
14	Cromatograma obtido por CLAE do EE, no comprimento de onda de 250nm.....	58
15	Cromatograma obtido por CLAE da Fração Clorofórmica, no comprimento de onda de 250nm.....	59
16	Cromatograma obtido por CLAE do Isoeleuterol, no comprimento de onda de 250nm.....	59
17	Cromatograma obtido por CLAE da Isoeleuterina, no comprimento de onda de 250nm.....	60
18	Avaliação da atividade antioxidante do EE, Isoeleuterol e Isoeleuterina, frente ao DPPH.....	61

LISTA DE QUADROS

QUADRO		PÁGINA
01	Estrutura química e atividade biológica dos principais constituintes químicos isolados de algumas espécies do gênero <i>ELEUTHERINE</i>	21
02	Reação enzimática mediada por radicais livres.....	28
03	Classes de metabólitos secundários detectados no EE, FH, FC, FA e FR.....	41
04	Determinação da IC ₅₀ do EE, Isoeleuterol e Isoeleuterina.....	62

LISTA DE TABELAS

TABELA		PÁGINA
01	Condições cromatográficas de obtenção do perfil por CLAE do EE, FC, Isoeleuterol e Isoeleuterina.....	39
02	Resultado da avaliação da atividade antimicrobiana do EE, FH, FC, FA e FR.....	44
03	Resultado da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EE e FC.....	47
04	Dados de RMN ¹ H da substância Ep1, em comparação com o Isoeleuterol.....	51
05	Dados de RMN ¹³ C da substância Ep1, em comparação com o Isoeleuterol.....	54
06	Dados de RMN ¹ H da substância Ep2, em comparação com a Isoeluterina.....	55

LISTA DE FLUXOGRAMAS

FLUXOGRAMA		PÁGINA
01	Fracionamento do EE, utilizando-se solventes de polaridades crescente.....	33
02	Isolamento das substâncias Ep1 e Ep2 a partir da FC.	37

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância
APT	Adenosina trifosfato
BHT	Butil hidroxi tolueno
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
Cu^{+2}	Íon cobre 2
<i>d</i>	Dupleto
<i>dd</i>	Duplo dupleto
<i>dl</i>	Dupleto largo
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPPH·	2,2-difenil-1-picril-hidrazila- radical
δ	Deslocamento químico
EE	Extrato Etanólico
EROs	Espécies Reativas do Oxigênio
FA	Fração acetato de etila
FC	Fração clorofórmica
Fe^{+2}	Íon ferro 2
FH	Fração hexânica
FR	Fração residual
GPX	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reductase
KOH	Hidróxido de potássio
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
Hz	Hertz
IC_{50}	Quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH·

<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
MHz	Mega hertz
NO	Óxido nítrico
NOs	Óxido nítrico sintetase
O ₂ ⁻	Ânion-radical superóxido
OH [·]	Íon hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integradas e Complementares de Saúde
ppm	Partes por milhão
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
Rf	Fator de retenção (Retention factor)
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
Rt	Tempo de retenção (Retention time)
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo
SUS	Sistema Único de Saúde
SOD	Superóxido dismutase
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

I – INTRODUÇÃO.....	12
II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
1 – ASPECTOS BOTÂNICOS.....	15
1.1 – Família Iridaceae.....	15
1.2 – Gênero <i>Eleutherine</i>	16
2 – ASPECTOS BIOLÓGICOS.....	17
3 – ASPECTOS QUÍMICOS.....	20
4 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	25
5 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	27
III – OBJETIVOS.....	30
IV – METODOLOGIA.....	31
1 – MATERIAIS E EQUIPAMENTOS.....	31
2 – COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO.....	32
3 – SECAGEM E TRITURAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	32
4 – OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	33
5 – FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO.....	33
6 – ABORDAGEM FITOQUÍMICA.....	34
7- CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA.....	34
8 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	35
9 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	36
10 – ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOELEUTEROL E ISOELEUTERINA.....	37
11 – CARACTERIZAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS	39
12 – OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÃO CLOROFÓRMICA.....	39
13 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EE, ISOELEUTEROL E ISOELEUTERINA.....	40

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
1 – IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	41
2 – OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EE.....	41
3 – ABORDAGEM FITOQUÍMICA.....	41
4 – ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA.....	42
5 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).....	44
5.1 – Avaliação da atividade antimicrobiana.....	44
5.2 – Determinação da concentração inibitória mínima	47
6 – ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	48
7 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS.....	49
7.1 - Caracterização da substância Ep1-Isoeleuterol.....	49
7.2 – Caracterização da substância Ep2-Isoeleuterina.....	55
8– PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE DO EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÃO CLOROFÓRMICA, ISOELEUTEROL E ISOELEUTERINA.....	58
9 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO, ISOELEUTEROL E ISOELEUTERINA.....	61
VI – CONCLUSÃO.....	63
VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65

I – INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 1978) na Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde, ocorrida em Alma-Ata, enfatizou que saúde é o estado de completo bem-estar físico, mental e social e não simplesmente a ausência de doença ou enfermidade, sendo um direito fundamental do ser humano.

Neste sentido, a Declaração de Alma-Ata (antiga União das Repúblicas Socialistas Soviéticas) coloca que os cuidados primários de saúde são cuidados essenciais de saúde baseados em métodos e tecnologias práticas, cientificamente bem fundamentadas e socialmente aceitáveis, colocadas ao alcance de indivíduos, famílias e da comunidade. Fazendo o mais pleno uso possível de recursos disponíveis, locais, nacionais e outros (OMS, 1978).

Cuidados primários de saúde requerem a utilização de todos os recursos locais apropriados e disponíveis na comunidade com o objetivo de manter e restaurar o estado de saúde, refletindo com isso suas características econômicas e sócio-culturais (OMS, 1978).

Neste contexto, faz sentido incorporar a utilização de plantas medicinais, como prática tradicional, no planejamento e implementação dos sistemas formais de saúde, buscando fundamentar seu uso em bases científicas.

A OMS, mediante as resoluções das Assembléias Mundiais de Saúde 31.33 (1978) e 40.33 (1987), incentivou a utilização de plantas medicinais, reafirmando a importância destas nos cuidados primários de saúde, recomendando enfaticamente aos seus Estados Membros as seguintes ações:

- iniciar programas amplos para identificação, validação, preparação, cultivo e conservação das plantas medicinais utilizadas na medicina tradicional;
- assegurar o controle de qualidade dos medicamentos derivados de drogas vegetais e aplicar tecnologias adequadas e boas práticas de fabricação. (MIGUEL; MIGUEL, 1999).

Segundo a OMS, 80% da população dos países em desenvolvimento utilizam de práticas tradicionais na atenção primária a saúde, e desse total 85% usam plantas medicinais ou preparações destas (BRASIL, 2001).

Para organizar essa utilização, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) vem implementando políticas com o objetivo de normatizar e regulamentar o uso de plantas medicinais e seus derivados.

A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48 atualizou a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos, estabelecendo a necessidade de realização de estudos físico-químicos, químicos, clínicos, toxicológicos e Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle das indústrias que os produzem (BRASIL, 2004).

A RDC 48 também define os fitoterápicos como medicamentos cujos componentes terapêuticos ativos são exclusivamente vegetais ou seus derivados vegetais (extratos, sucos, óleos, ceras, etc...), não podendo conter em sua composição substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem associações destas com extratos vegetais. Também coloca a necessidade do conhecimento de componentes marcadores, os quais podem ser um componente ou classes de compostos químicos, que presentes na matéria-prima vegetal, podendo ser o princípio ativo, ou que pelo menos tenha correlação com ele, possa ser utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos (BRASIL, 2004).

A fitoterapia, portanto, pode ser reconhecida como “uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias isoladas, ainda que de origem vegetal” (BRASIL, 2006).

Com a aprovação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), o Ministério da Saúde está buscando incorporar e implementar este recurso terapêutico na perspectiva de prevenir agravos e promover a recuperação da saúde, dando ênfase a atenção básica, voltada para o cuidado continuado, humanizado e integral em saúde. Assim como, contribuir para o acesso e o uso seguro, eficiente, eficaz e com qualidade dessa prática integrativa e complementar (BRASIL, 2006).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, visa principalmente, garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso adequado de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade. Assim como, ampliar as opções terapêuticas aos usuários, com garantia de acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde, considerando o conhecimento tradicional sobre plantas medicinais (BRASIL, 2006).

Esta política de governo representa um marco no reconhecimento dos fitoterápicos como recurso terapêutico pois, incentiva e fomenta não somente a pesquisa de plantas medicinais e fitoterápicos, mas, também, estudos abordando educação em saúde, os incluindo nas ações da atenção farmacêutica, onde o usuário é foco central do tratamento.

Dentro deste contexto proposto e normatizado pelo Ministério da Saúde, a região Amazônica com sua imensa biodiversidade e a rica tradição de seus povos na utilização de plantas medicinais na medicina popular, desponta como um celeiro ávido a contribuir para o surgimento de novos medicamentos fitoterápicos.

Nesse sentido, o presente trabalho contribuirá de maneira vertical no controle de qualidade do material vegetal em estudo, etapa fundamental, para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico, bem como, na investigação das atividades microbiológicas e antioxidantes da espécie no intuito de estabelecer critérios que garantam a qualidade, segurança e eficácia do medicamento fitoterápico, de acordo com as premissas adotadas pela legislação de desenvolvimento de fitoterápicos vigente no País.

II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 – ASPECTOS BOTÂNICOS

1.1 – Família Iridaceae

Iridaceae é uma família relativamente extensa de monocotiledôneas petalóides, apresentando mais de 1.630 espécies e 77 gêneros. Embora distribuída pelo mundo inteiro, esta família tem marcada concentração nos continentes do sul e o maior centro de radiação encontra-se no sul da África. No Brasil esta família encontra-se representada com 110 espécies e 14 gêneros (REEVES et al., 2001).

As Iridaceae são facilmente conhecidas entre as monocotiledôneas por apresentarem folhas isobilaterais equivalentes, flores com três estames e, com exceção da monotípica *Tasmanian isophysis*, um ovário inferior.

Num estudo de classificação Goldblatt (1990) dividiu as Iridaceae em três sub-famílias Isophysidoideae, Nivenioideae, Iridoideae e Ixioideae.

Alguns gêneros desta família apresentam como constituintes químicos comuns flavonóis O-glicosilados e a flavonas C-glicosiladas, sendo que algumas espécies do gênero *Pillansia* apresentam um flavonol sulfatado, o qual é único nas Iridaceae (GOLDBLATT, 1990).

Certas espécies da sub-família Nivenioideae apresentam uma predominância de flavonóis O-glicosilados, incluindo derivados de myricetina e alguns traços de flavonas C-glicosiladas. As espécies das tribos Sisyrinchieae, Mariaceae e Tigrideae não apresentam estes flavonóis. As sub-famílias Iridoideae e Ixioideae apresentam com frequência, mas não de modo universal, o acúmulo da xantona mangiferina C-glicosilada (GOLDBLATT, 1990).

Os aminoácidos livres carboxifenilalanina e carboxifenilglicina têm uma distribuição distinta nas Iridaceae, ocorrendo regularmente na maioria das espécies de Iridoideae, mas estes componentes são notadamente ausentes no gênero *Sisyrinchium*, mas já encontrado nos gêneros *Libertia*, *Bobartia*, e *Orthrosanthus*, também Sisyrinchieae (GOLDBLATT, 1990).

1.2 – Gênero *Eleutherine*

E. plicata Herb. (Figura 01) é uma planta herbácea pertencente a família Iridaceae, conhecida popularmente como marupazinho, marupari, palmerinha, marupá-pirranga, marupari, apresentando-se sob a forma de uma touceira, com bulbos vermelhos semelhantes a uma cebola. Suas folhas são inteiras, plissadas e simples, com flores brancas ou rosadas (LORENZI;MATOS, 2002).



Figura 1 – *Eleutherine plicata* Herb. (marupazinho).

Estudo fitoquímico realizado com o extrato aquoso preparado a partir dos bulbos, mostraram a presença de heterosídeos, taninos e açúcares redutores (PINTO, 1961).

Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb. também é cultivada no Brasil, com características muito semelhantes a *E. plicata* Herb., possuindo as mesmas propriedades, sendo considerada por muitos autores como a mesma espécie (LORENZI;MATOS, 2002).

Eleutherine bulbosa (Mill.) Urb. é uma herbácea bulbosa e rizomatosa, acaule, entouceirada, de 20 a 30 cm de altura, nativa da América tropical, incluindo os campos secos da Amazônia brasileira. Os bulbos possuem escamas semelhantes à cebola, cor de vinho externamente, exsudando látex branco quando cortados. Suas folhas são simples, inteiras, plissadas longitudinalmente, de cerca de 25 cm de comprimento. As flores são brancas ou rosadas, dispostas

numa panícula ampla no ápice de um longo escapo rígido da folhagem, que se abrem ao por do sol (LORENZI;MATOS, 2002).

Esta planta é muito utilizada na medicina caseira em quase todo o país, principalmente na Amazônia, hábito este iniciado pelas populações indígenas, porém, não há comprovação científica de sua eficácia nem da segurança de suas preparações (LORENZI ;MATOS, 2002).

2 – ASPECTOS BIOLÓGICOS

O levantamento etnofarmacêutico realizado por Barbosa e colaboradores (2001) na cidade de Igarapé-Miri e etnobotânico realizado por Jardim e colaboradores (2006) no município de Santa Bárbara, ambos no estado do Pará, mostraram a utilização de *Eleutherine plicata* Herb. no tratamento da diarreia possivelmente causada por ameba. Verificou-se nestes levantamentos que o bulbo é a parte do vegetal utilizada pela população na preparação de um chá, para o tratamento desta patologia.

Eleutherine americana MERR. et HEYNE é uma espécie de Iridaceae cultivada na ilha de Hainan no sul da China e o chá preparado com os bulbos desta planta é muito utilizado na medicina popular local no tratamento de ferimentos, vasodilatação coronarina, diminuição da protombina e infertilidade. Estudo fitoquímico do extrato metanólico desta espécie de Iridaceae levou ao isolamento dos constituintes químicos eleutherol, eleuterina e isoeleuterina (Komura et al, 1986)

A triagem de atividade microbiológica e citotóxica, realizada sobre plantas utilizadas na medicina tradicional da cidade de Governador Valadares-MG, mostrou que o extrato etanólico de *E. bulbosa* (Mill.) Urb., preparado a partir das partes superiores desta planta, inibiu o crescimento de cepas de *Staphylococcus aureus* e apresentou toxicidade sobre larvas de *Artemia salina* (BRASILEIRO et al., 2006).

E. bulbosa (Mill.) Urb. é utilizada no Haiti como abortivo, sendo também, detectado a presença de naftoquinonas em seu extrato aquoso (WENINGER et al., 1982), e em Trinidad Tobago é usada para o tratamento de problemas na reprodução humana (LANS, 2007). Na avaliação de algumas plantas medicinais

usadas por curandeiros da etnia Zulu, foi atribuída a ação anti-diarrêica ao seu extrato aquoso (LIN et al, 2002), e na medicina popular do Peru suas preparações são muito utilizadas na cicatrização de ferimentos superficiais e úlceras gástricas (VILLEGAS et al., 1997).

Ensaio de bioautografia realizado por Alves e colaboradores (2003) com extrato de diclorometano, obtido dos bulbos de *E. bulbosa* (Mill.) Urb. apresentou atividade antifúngica, inibindo o crescimento de *Cladosporium sphaerospermum*, o qual é patogênico para algumas plantas. Este ensaio foi usado para guiar o fracionamento deste extrato, possibilitando o isolamento de uma nova naftoquinona, a qual denominada de eleuterinona (Figura 02.1), e três compostos já conhecidos o eleuterol, eleuterina e isoeleuterina, já isolados anteriormente de *Eleutherine americana* MERR. et HEYNE, mostrados na figura 02. Os três componentes quinônicos apresentaram forte atividade antifúngica, enquanto o eleuterol foi inativo.

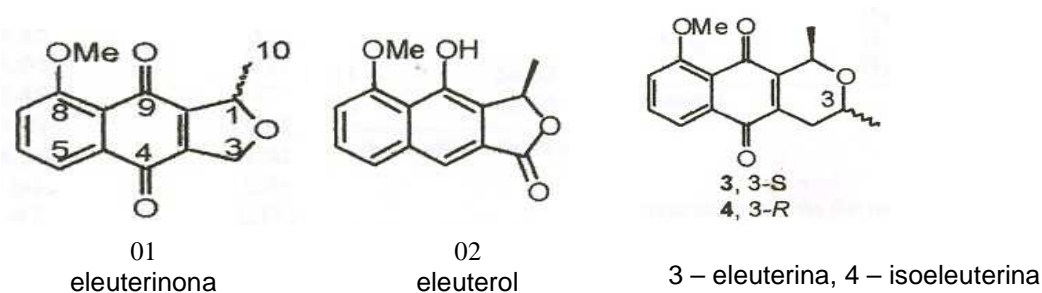


Figura 02 – Constituintes químicos isolados de *E. bulbosa* (Mill.) Urb.

Em diversos ensaios as quinonas têm mostrado várias atividades farmacológicas, destacando-se, dentre muitas, as atividades antimicrobianas (bactericida, fungicida e antiprotozoário), antitumorais e inibidoras de sistemas celulares reparadores, processos nos quais atuam de diferentes formas, destacando-se o estresse oxidativo que provocam ao induzirem a formação endógena de espécies bioativas derivadas do oxigênio (SILVA et al., 2003).

As naftoquinonas, que é um tipo de quinona, induziriam a apoptose celular por inibirem as topoisomerasas I e II, as quais são enzimas nucleares críticas para o funcionamento normal e reparação de danos causados nas células.

A apoptose celular é um processo ativo de colapso celular que difere morfológicamente da morte por necrose. É um tipo de morte celular que ocorre

durante várias situações fisiológicas patológicas, constituindo um mecanismo de remoção de células lesadas e de renovação celular e tecidual. O fenômeno de morte celular por apoptose ocorre individualmente, sendo que a morte de uma célula não leva à morte de outras células (AZANETTI;MELO, 2007).

Em sua ação natural as topoisomerases I e II assentam-se na estrutura do DNA por uma supertorção topológica, fazendo cortes, permitindo que as funções de transcrição, reparação, replicação e estruturação do cromossomo ocorram normalmente.

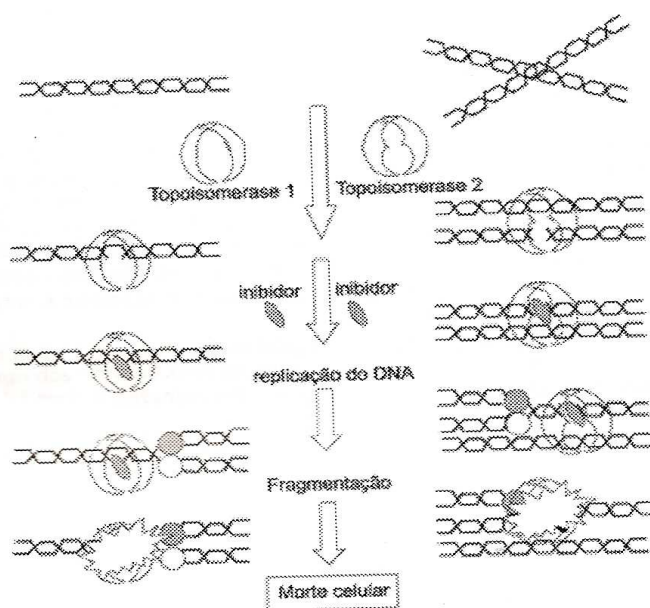


Figura 03: Inibição das enzimas topoisomerases I e II pelas naftoquinonas.

Fonte: SILVA et al, 2003.

A figura 03 apresenta o esquema de inibição do complexo de topoisomerases pelas naftoquinonas, ação que provoca o desencadeamento da apoptose celular, descoberta recentemente, constituindo hoje na grande fronteira da química medicinal, existindo grande expectativa quanto a delineação de estratégias racionais visando o combate a neoplasias, principalmente as relacionadas ao câncer (SILVA et al., 2003).

3 – ASPECTOS QUÍMICOS

As quinonas representam uma ampla classe de metabólitos secundários de distribuição natural, sendo que nos últimos anos o interesse por esta classe de compostos tem aumentado devido a sua interferência nos processos bioquímicos vitais, estando envolvidas em etapas importantes do ciclo de vida dos seres vivos, principalmente na cadeia respiratória e fotossíntese.

As quinonas são compostos oxigenados que correspondem a oxidação de derivados aromáticos que se caracterizam por um grupamento 1,4-dicetociclohexa-2,5-diênico (para-quinonas), ou ocasionalmente, por um grupamento 1,2-dicetociclohexa-3,5-diênico (orto-quinonas).

Os compostos quinônicos naturais podem apresentar-se conjugadas com um núcleo benzênico (benzoquinonas), com sistemas aromáticos policíclicos condensados (Figura 04): naftoquinonas (naftaleno), antraquinonas (antraceno), antracilinas (1,2-benzantraceno) e naftodiantronas (naftodiantreno). (BRUNETON, 2001).

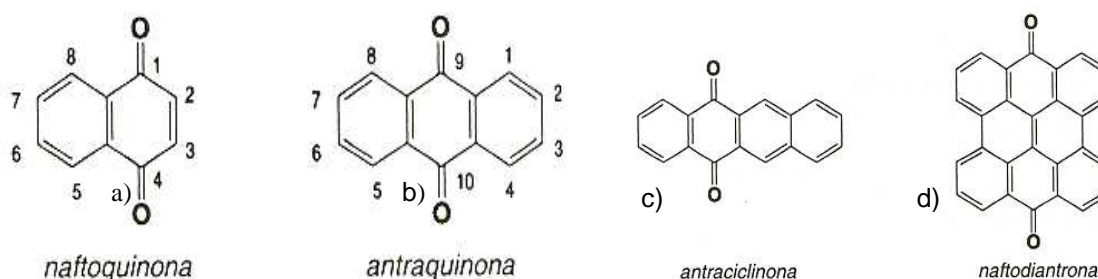
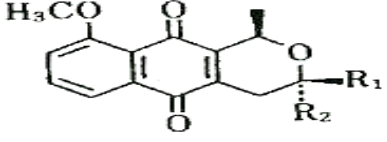
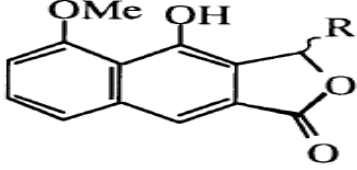
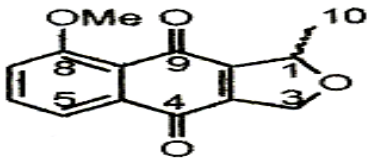
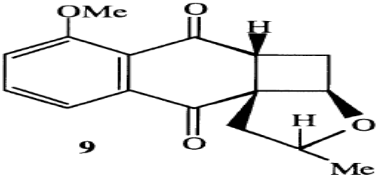
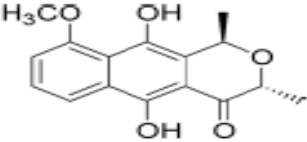
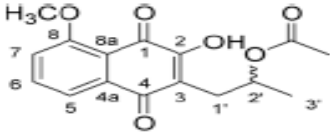


Figura 04 – Estrutura química básica dos compostos quinônicos.

Fonte: Bruneton, 2001.

O quadro 01 mostra a estrutura química de alguns constituintes químicos isolados de várias espécies do gênero *Eleutherine*, no qual observa-se uma predominância de compostos derivados de naftoquinonas.

Quadro 01 – Estrutura química e atividades biológicas dos principais constituintes químicos isolados de algumas espécies do gênero *Eleutherine*.

ESTRUTURA QUÍMICA	ESPÉCIE VEGETAL	ATIVIDADE BIOLÓGICA
 <p>Eleuterina/Isoeleuterina</p>	<p>Eleuterina (R1=βME) <i>E. bulbosa</i>, Bianchi; Ceriotti (1975) <i>E. americana</i>, Komura et al. (1983)</p> <p>Isoeleuterina (R1= αME) <i>E. americana</i>, Komura et al. (1983)</p>	<p>Fraca atividade contra <i>B.subtilis</i>, inibição de TOPO II (HARA et al,1997), atividade contra <i>C. sphaerospermum</i>, Alves et al (2003). Inibição da atividade de replicação do HIV em linfócitos (HARA et al,1997)</p>
 <p>Eleuterol/Isoeleuterol</p>	<p>Eleuterol (R1=βME) <i>E. bulbosa</i>, Bianchi; Ceriotti (1975) <i>E. americana</i>, Komura et al. (1983)</p> <p>Isoeleuterol (R= αME) <i>E. americana</i>, Hara et al. (1997)</p>	<p>Inibição da atividade de replicação do HIV em linfócitos, HARA et al.(1997)</p>
 <p>Eleuterinona</p>	<p><i>E. bulbosa</i>, ALVES et al. (2000)</p>	<p>Atividade contra <i>C. sphaerospermum</i>, ALVES et al. (2003)</p>
 <p>Elecanacin</p>	<p><i>E. americana</i>, Hara et al. (1997)</p>	
 <p>Hongconin</p>	<p><i>E. americana</i>, Zhengxiong et al. (1986)</p>	<p>Inibição da atividade da NOs, Han et al (2008).</p>
 <p>(-)-3-[2-(acetil) oxi propil]-2-hidroxi-8-metoxi-1,4 naftoquinona</p>	<p><i>E. americana</i>, Han et al. (2008)</p>	

Alguns desses compostos, como mostrado no Quadro 01, têm apresentado diversas atividades biológicas como vasodilatação coronariana, inibição da enzima topoisomerasas II, do vírus da imunodeficiência humana (HIV) e atividade antifúngica.

Recentemente Han e colaboradores (2008) num estudo para verificar a atividade de inibição da enzima óxido nítrico sintetase (NOs), observou que a isoeleuterina, eleuterina e o hongconin mostraram atividade de inibição desta enzima, apresentando IC₅₀ nos valores de 7.7, 11.4 e 19.8 µM, em comparação com o padrão monometil L-arginina (L-NMMA) com IC₅₀=19.7 µM.

Este estudo mostrou que a isoeleuterina e a eleuterina tiveram resultado bem melhor que o padrão utilizado e não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas. Estes resultados são importantes porque o óxido nítrico (NO), que tem a sua produção induzida pela NOs, está envolvido na reação inflamatória sendo encontrado no epitélio brônquico de indivíduos asmáticos, na mucosa do cólon de pacientes com colite ulcerativa e nos sinoviócitos da doença articular inflamatória. Com isso mostrando a potencialidade da isoeleuterina e da eleuterina como agentes terapêuticos.

Dentre os compostos quinônicos, as naftoquinonas destacam-se por apresentarem atividades antibacterianas, fungicidas, antivirais e antiprotozoárias.

Entre as naftoquinonas, o lapachol (Figura 05) possui grande interesse devido a sua capacidade de induzir o estresse oxidativo através da formação intracelular de espécies reativas com o oxigênio, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), o ânion radical superóxido (O₂⁻) e o radical hidroxila (HO[·]). Estas espécies podem danificar alguns componentes celulares importantes tanto de células normais como de células malignas (SILVA et al., 2003).

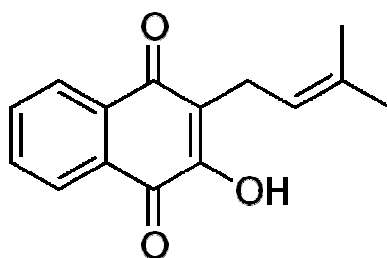


Figura 05 – Estrutura química do lapachol.

Fonte: Bruneton, 2001.

O estresse oxidativo pode resultar da ação de muitos agentes ambientais tóxicos sobre os seres vivos, como radiações gama e ultravioleta, ozônio, poluentes químicos assim como certas substâncias da cadeia alimentar. Além destes fatores estima-se que 1 a 2% do oxigênio consumido pelos mamíferos sejam convertidos a $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , devido a falhas fisiológicas na mitocôndria permitindo que elétrons escapem e sejam transferidos pelo oxigênio (SILVA et al., 2003).

O desequilíbrio entre a formação e a remoção dos radicais livres no organismo, decorrente da diminuição dos anti-oxidantes endógenos ou do aumento da geração de espécies oxidantes, leva a um estado pró-oxidativo que favorece ocorrência de lesões oxidativas em macromoléculas e estruturas celulares que podem provocar a morte celular.

As naftoquinonas agem sob ação enzimática, quando um substrato quinonoídico reduz-se com um elétron para formar o ânion semiquinona ($Q^{\cdot-}$), catalisada pelas enzimas flavinas NADPH citocromo P-450 redutase, NADPH citocromo b5 redutase ou NADPH ubiquinona oxido-redutase (SILVA et al, 2003).

Uma vez formada a espécie semiquinona $Q^{\cdot-}$, esta reduz o oxigênio molecular ao ânion-radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) que na presença da enzima superóxido dismutase é transformado em H_2O_2 . O ânion-radical super-óxido ($O_2^{\cdot-}$) por catálise com metais de transição (reação de Fenton), ou por reação com H_2O_2 (reação de Haber-Weiss), gera HO^{\cdot} no interior da célula. Embora o H_2O_2 não seja um radical livre, é uma substância bastante reativa, podendo promover também a oxidação de algumas biomoléculas (SILVA et al, 2003).

Na tentativa de eliminar estas espécies oxidantes, as células desencadeiam mecanismos de desintoxicação, através dos agentes antioxidantes intracelulares. Uma perfeita eliminação ou conseqüente controle do estresse oxidativo vai depender, em muito, dos níveis dos agentes intracelulares anti-oxidantes, alfa-tocoferol, ácido ascórbico, enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione redutase (GSH) e glutathione peroxidase (GPX).

Nos sistemas em que ocorre uma persistência do ciclo redox, ou então, faltam mecanismos de proteção, há aumento dos oxidantes $O_2^{\cdot-}$ e H_2O_2 , promovendo dano em componentes celulares vitais como as membranas celulares, através da peroxidação dos lipídios e a diminuição da capacidade anti-

oxidante celular. Desta forma, a espécie radicalar HO·, gerada por uma reação tipo Fenton em que o H₂O₂ é reduzido por Fe⁺² e Cu⁺², pode danificar o genoma. Sua atuação leva a conseqüências diversas, por alteração do sinal da transcrição na expressão de genes, mutagenicidades e ou ativação de fatores responsáveis pela indução da apoptose celular (SILVA et al.,2003).

A Figura 06 mostra simplificada o ciclo redox das quinonas.

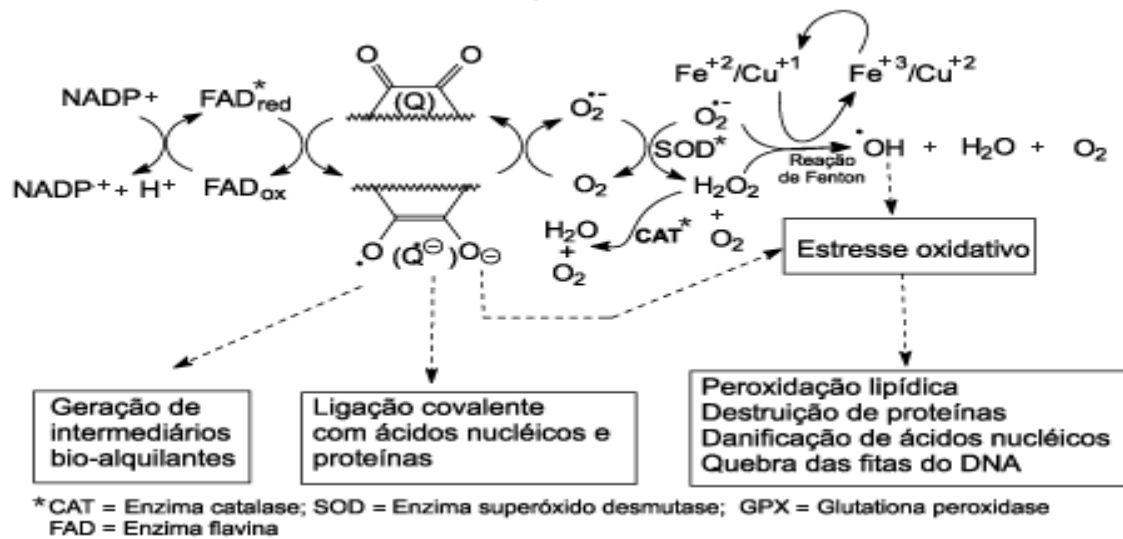


Figura 06 – Ciclo redox induzido por quinonas.

Fonte: SILVA et al., 2003

Esta interferência xenobiótica altera os processos de divisão celular, podendo induzir apoptose, caso não se consiga eliminar por completo o estresse oxidativo. Esse mecanismo de ação é importante pois, alguns microorganismos patogênicos são muito mais sensíveis ao estresse oxidativo que os hospedeiros humanos.

4 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Staphylococcus aureus e *Candida albicans* são importantes patógenos para os seres humanos e quase a maioria dos indivíduos apresentam algum tipo de infecção causada por estes microorganismos durante a vida, cuja gravidade pode variar desde uma intoxicação alimentar ou infecção cutânea de pouca importância, até infecções graves e potencialmente fatais.

O modelo de lesão causada pelo *S. aureus* é o furúnculo ou outros abscessos localizados. O *S. aureus* quando localizado num folículo piloso provoca lesão tecidual e a coagulase produzida por ele, coagula a fibrina ao redor da lesão e no interior dos vasos linfáticos, resultando na formação de uma parede que limita o processo e é reforçado pelo acúmulo de células inflamatórias e, posteriormente, de tecido fibroso (BROOKS et al. 2000).

A formação do abscesso é típico da infecção estafilocócica e a partir de qualquer foco, os microorganismos podem propagar-se através dos vasos linfáticos e da corrente sanguínea para outras partes do corpo, sendo que a supuração em veias, que está associada a trombose, constitui uma característica dessa disseminação. O *S. aureus* pode causar pneumonia, meningite, endocardite ou sepse, com supuração em qualquer órgão (BROOKS et al. 2000).

Várias espécies de *Candida*, em especial *C. albicans*, podem causar candidíase. As espécies de *Candida* colonizam as mucosas de todos os seres humanos no decorrer ou pouco depois do nascimento, havendo sempre o risco de infecção enógena, sendo a candidíase a micose sistêmica mais comum.

A candidíase superficial (cutânea ou mucosa) ocorre em decorrência de um aumento no número de *Candida*, de lesão do epitélio, permitindo a invasão local por leveduras e pseudo-hifas. A candidíase sistêmica ocorre quando o microorganismo penetra na corrente sanguínea e as defesas do hospedeiro são inadequadas para impedir o crescimento e a disseminação das leveduras (BROOKS et al. 2000).

A partir da circulação, *C. albicans* pode infectar os rins, fixar-se a próteses de válvulas cardíacas ou provocar infecções em determinadas regiões do corpo como artrite, meningite e outras complicações.

A *Escherichia coli* é um microorganismo da microbiota intestinal normal e constitui a causa mais comum de infecção das vias urinárias, sendo responsável por cerca de 90% das primeiras infecções urinárias em mulheres jovens. Os sintomas e sinais mais comuns incluem a freqüência urinária, disúria, hematúria e piúria, sendo que esta infecção pode evoluir provocando bacteremia com sinais clínicos de sepse (BROOKS et al. 2000).

As *Pseudomonas aeruginosa* apresentam-se na forma de bastonetes Gram-negativos, aeróbios e móveis, sendo encontrados amplamente no solo, na água, em plantas, animais e costuma, também, ser encontrada em ambientes úmidos em hospitais. Frequentemente são observadas em pequeno número na microbiota intestinal normal e pele dos seres humanos.

A *P. aeruginosa* pode colonizar os seres humanos saudáveis, nos quais atua como saprófita, podendo tornar-se patogênica nos hospedeiros com a defesa orgânica debilitada.

Esta bactéria adere às mucosas ou à pele e as coloniza, invadindo-as localmente e produzindo doença sistêmica. Estes processos são promovidos por enzimas, toxinas e pelas fímbrias (pili) que estendem-se a partir da superfície celular e promovem a fixação da bactéria às células epiteliais do hospedeiro. O lipopolissacarídeo desempenha um papel direto na febre, choque, oligúria, leucocitose e leucopenia, coagulação vascular disseminada e síndrome respiratória do adulto (BROOKS et al. 2000).

P. aeruginosa e outras espécies de *Pseudomonas* são resistentes a muitos agentes antimicrobianos e, por conseguinte, tornam-se dominantes e importantes quando bactérias mais suscetíveis da microbiota normal são suprimidas.

5 – ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O processo de oxidação é a transferência de elétrons de um átomo para outro, sendo este processo essencial para a vida aeróbia e para o nosso metabolismo já que o oxigênio é o último receptor no sistema de fluxo de elétron que produz energia na forma de ATP (DAVIES, 1995).

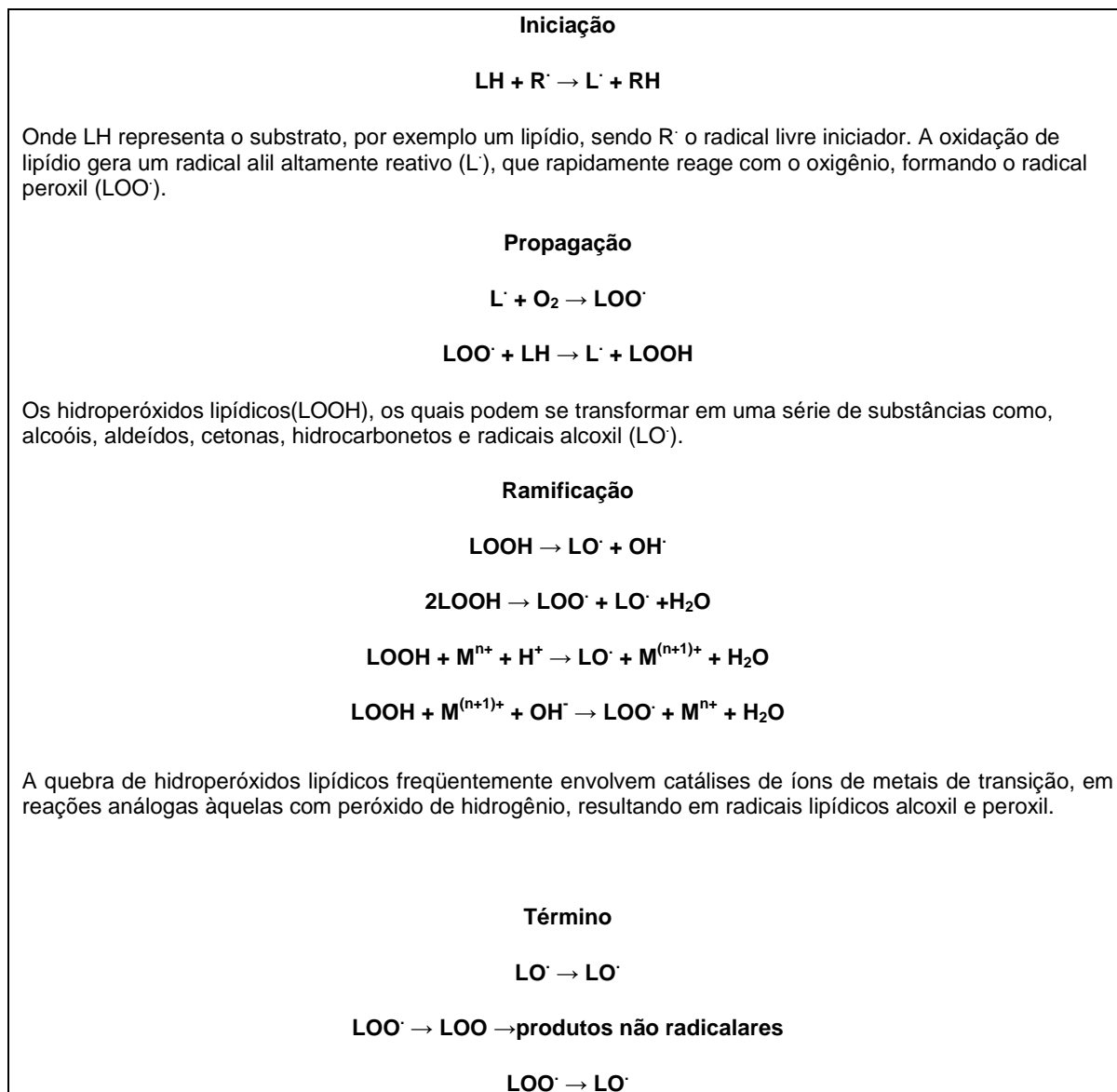
As espécies reativas de oxigênio (EROs) são encontradas em todos os sistemas biológicos, sendo que em condições fisiológicas normais do metabolismo celular aeróbio, o O_2 sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de H_2O . Nesse processo são formados intermediários reativos, como os radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxila (HO_2) e íon hidroxila (OH^{\cdot}), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A redução completa do O_2 ocorre na mitocôndria e a reatividade das EROs é neutralizada com a entrada dos quatro elétrons (ANTOLOVICH, 2002).

Quando um excesso de radicais livres é formado, ocorre uma sobrecarga nas enzimas protetoras, como a superóxido dismutase, catalase e peroxidase, causando efeitos destrutivos e letais das células. Esse efeito letal ocorre através da oxidação das membranas lipídicas, proteínas celulares, DNA e enzimas, as quais têm por conseqüência o bloqueio da respiração celular (ANTOLOVICH, 2002).

O processo de oxidação lipídica pode ser ocasionado por um grande número de fenômenos físicos e químicos, desempenhando um papel importante na deteriorização de componentes celulares, e pode ocorrer por três vias diferentes: a) reação não enzimática mediada por radicais livres, b) foto-oxidação não enzimática e b) reação enzimática.

A reação não enzimática mediada por radicais livres é a via clássica que leva a iniciação e a rápida propagação de cadeias destrutivas, apresentando as etapas de iniciação, propagação, ramificação e término como mostrado no quadro em seguida.

Quadro 02: Reação não enzimática mediada por radicais livres.
Fonte: ANTOLOVICH, 2002.



Antioxidante é qualquer substância que em baixas concentrações, comparadas com aquelas do substrato oxidável, retarda ou inibe significativamente a oxidação do substrato (ANTOLOVICH, 2002).

Os antioxidantes podem ser classificados em naturais ou sintéticos. O comportamento antioxidante os compostos fenólicos parece estar relacionado com sua capacidade de quelar metais, inibir a lipooxigenase e capturarem radicais livres, mas em certas ocasiões podem promover reações de oxigenação *in vitro*. Os compostos fenólicos atuam com antioxidante, quelando metais, que de

certa maneira, incrementando sua capacidade para formar radicais livres de peróxidos (VALVERDE, 2000).

O estado de oxidação das células é uma consequência do balanço entre os níveis de EROs, oxidantes e redutores equivalentes. A elevação nos níveis de EROs acima da capacidade de tamponamento e atividade enzimática designada para modular o níveis dessas espécies resulta em estresse oxidativo potencialmente citotóxico. Nesta condição pró-oxidante, radicais altamente reativos podem danificar o DNA, RNA, proteínas e componentes lipídicos, que podem levar a morte celular.

III – OBJETIVOS

- Geral:

Contribuir para a padronização do vegetal e de insumos obtidos a partir dele, otimizando parâmetros fitoquímicos e biológicos, que estabeleçam critérios para seu uso adequado como recurso terapêutico eficaz e seguro.

- Específicos:

- Determinar o perfil cromatográfico do extrato etanólico e frações, por Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

- Caracterizar substâncias com potencial para marcadores de qualidade;

- Avaliar a atividade microbiológica do extrato etanólico e suas frações;

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico e suas frações;

- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e dos principais constituintes químicos isolados.

IV – METODOLOGIA

1 - MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

1.1 - REAGENTES

Acetona

Acetato de etila

Acetonitrila

Ágar Müller Hinton

Clorofórmio

Clorofórmio deuterado

Etanol

Hexano

Hidróxido de potássio

Metanol

Dimetil-sulfóxido – DMSO

Sílica gel para cromatografia de camada delgada

Sílica gel para cromatografia em coluna

Sulfato de sódio anidro

1.2 – EQUIPAMENTOS

Moinho de facas de aço inoxidável Tecnal, modelo TCL-650

Evaporador rotativo BUCHI R 300

Espectrofotômetro de UV-VIS Spectrum SP 2000

Câmara de ultravioleta de 254 e 365nm

Ultra som Mac Clean 1450

Balança analítica GEHAKA BK 600

Estufa de circulação de ar forçado QUIMIS

Estufa Medicate 1.2

Cromatógrafo líquido com sistema LaChrom 7000 MERCK HITACHI^R com detector de arranjo de diodo (DAD) e coluna Agilent LiChrospher100 (250 mm x 4.6 mm).

Equipamento de RMN Variant Plus 300 MHz.

2 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal foi adquirido da Associação de Vendedores de Ervas Medicinais do Mercado do Ver-O-Peso, tendo sido coletado no mês de outubro de 2007, no bairro do Benguí.

A identificação botânica foi realizada pelo Prof^o. Dr. Mário Jardim, através de comparação da exsicata elaborada com o material vegetal (figura 07), com a depositada no Herbário João Murça Pires, do Museu Paraense Emílio Goeldi sob o número 10543.



Figura 7 - Exsicata de *E. plicata* Herb. elaborada para identificação botânica.

3 - SECAGEM E TRITURAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

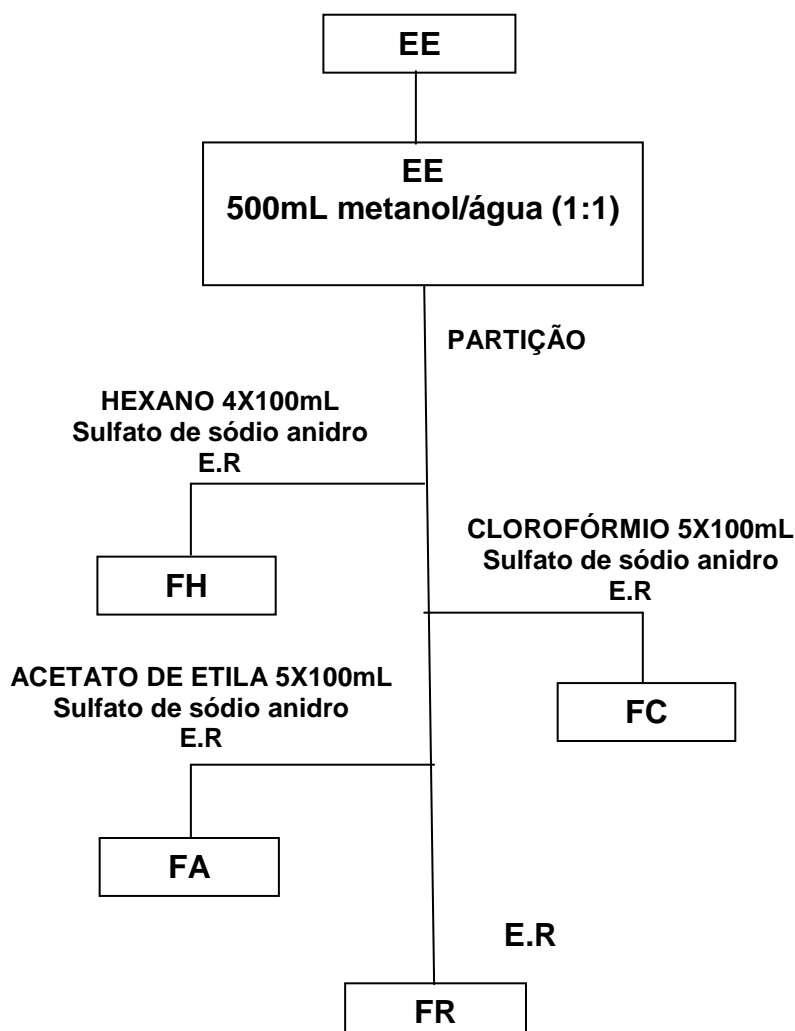
Os bulbos foram separados, lavados e, após serem selecionados, foram debulhados e colocados para secar a temperatura ambiente, por 02 dias. Em seguida, foram colocados em estufa com corrente de ar forçado a uma temperatura média de 40 °C, para estabilizar o material vegetal. Após a secagem o material vegetal foi triturado em moinho de facas, obtendo-se 1,20 Kg de droga seca e moída.

4 - OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

O extrato etanólico (EE) foi obtido por percolação, utilizando-se aproximadamente 500 g de droga seca e moída, e etanol 92° GL, como líquido extrator. Terminada a percolação o solvente foi retirado em evaporador rotativo.

5 – FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO

O fracionamento do EE ocorreu como mostrado no fluxograma abaixo.



Fluxograma 01- Fracionamento do EE, utilizando-se solventes de polaridades crescente.

Aproximadamente 30 g do EE foram suspensos num volume de 500 mL de uma mistura metanol/água (1:1) e, em seguida, submetido a uma partição líquido/líquido, utilizando-se solventes de polaridades crescentes. Nesta partição foram usados os solventes hexano, clorofórmio e acetato de etila.

A fração hexânica foi obtida utilizando-se 04 (quatro) alíquotas de 100 mL de hexano. Logo após, o solvente foi retirado em evaporador rotativo.

A fração clorofórmica foi obtida utilizando-se 05 (cinco) alíquotas de 100 mL de clorofórmio. Em seguida, o solvente foi retirado em evaporador rotativo a baixa pressão.

A solução hidroalcoólica restante foi submetida à partição com 05 (cinco) alíquotas de 100 mL de acetato de etila. Posteriormente, o solvente foi retirado em evaporador rotativo.

6 - ABORDAGEM FITOQUÍMICA.

Foram realizados testes fitoquímicos com a finalidade de detectar a presença de 18 classes de metabólitos secundários, no EE e suas frações, utilizando-se como referência para este procedimento o Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais (BARBOSA; PINTO, 2001).

7 - CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

O EE e a suas frações foram submetidos a análises por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), com o objetivo de se obter o perfil cromatográfico.

Para este procedimento foram utilizadas placas cromatográficas manufaturadas de sílica gel em suporte de vidro.

Nas análises de CCDs foram utilizados os seguintes sistemas de eluente: hexano/acetona (80:20), clorofórmio/metanol (90:10), clorofórmio/metanol/água (70:25:05), clorofórmio/acetona (99:03) e clorofórmio/acetona (99:01).

As CCDs foram observada sob luz visível e luz ultra-violeta (UV) nos comprimentos de onda de 254nm e 365 nm e, em seguida, borrifadas com solução uma metanólica de KOH a 10% para observar a presença de quinonas.

O perfil cromatográfico foi obtido através da determinação do Fator de Retenção (Rf) de cada constituinte químico presente nas amostras.

8 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Para avaliação da atividade antimicrobiana foi empregada a técnica de difusão de disco em meio sólido, com os discos impregnados com as amostras, previamente dissolvidas em dimetil-sulfóxido (DMSO).

Nesta avaliação foram utilizadas cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (ATCC 10231).

Uma alíquota de 500 mg do EE e de cada amostra foi dissolvida com 1 mL de DMSO, obtendo-se soluções de 500 mg/mL, as quais foram diluídas sucessivamente, para se obter soluções nas concentrações 250 mg/mL, 125 mg/mL e 62,5 mg/mL.

Os discos de papel de filtro Whatman tipo nº 03 com 6 mm, esterilizados previamente em autoclave, foram impregnados com 10 µL de cada solução e colocados em estufa à uma temperatura de 30 °C, para evaporar o solvente.

As suspensões contendo as cepas dos microorganismos foram preparadas com caldo Müeller Hinton, sendo a turbidez comparada com tudo nº 05 da escala de Mcfarland.

Os microorganismos foram semeados com a ajuda de um swab, em toda a superfície das placas contendo o meio ágar Müller Hinton, deixando-as para secar a temperatura ambiente durante 05 minutos.

Com uma pinça esterilizada os discos de difusão, secos, foram colocados na superfície dos meios de cultura, fazendo uma leve pressão para que os disco ficassem bem aderidos, deixando uma distância de 02 cm das bordas.

As placas foram incubadas em estufa a temperatura de 35°C por 24 h. Em seguida, realizando-se a medição, com uma régua, do halo de inibição formado ao redor do disco.

Considerou-se com atividade antimicrobiana as amostras que apresentaram halo de inibição de tamanho igual o superior a 8 mm e sem

atividade os que não apresentaram formação de halo ao redor do disco ou halo de inibição menor que 8 mm.

9 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

O extrato etanólico e fração clorofórmica, por apresentarem as melhores atividades antimicrobiana, foram submetidas a determinação da CIM, testando-se as diluições de 125, 62.5, 31.25 e 15.62 mg/mL pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando placas de ELISA (BERTINI et al 2006).

Foram preparadas suspensões de cada cepa em caldo Muller Hinton, ajustadas a turbidez com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland.

Os poços das placas foram preenchidos com 10 microlitros da suspensão do microorganismo e com 10 μ L das soluções de cada concentração da fração dissolvido em DMSO e com 180 μ L de caldo Muller Hinton.

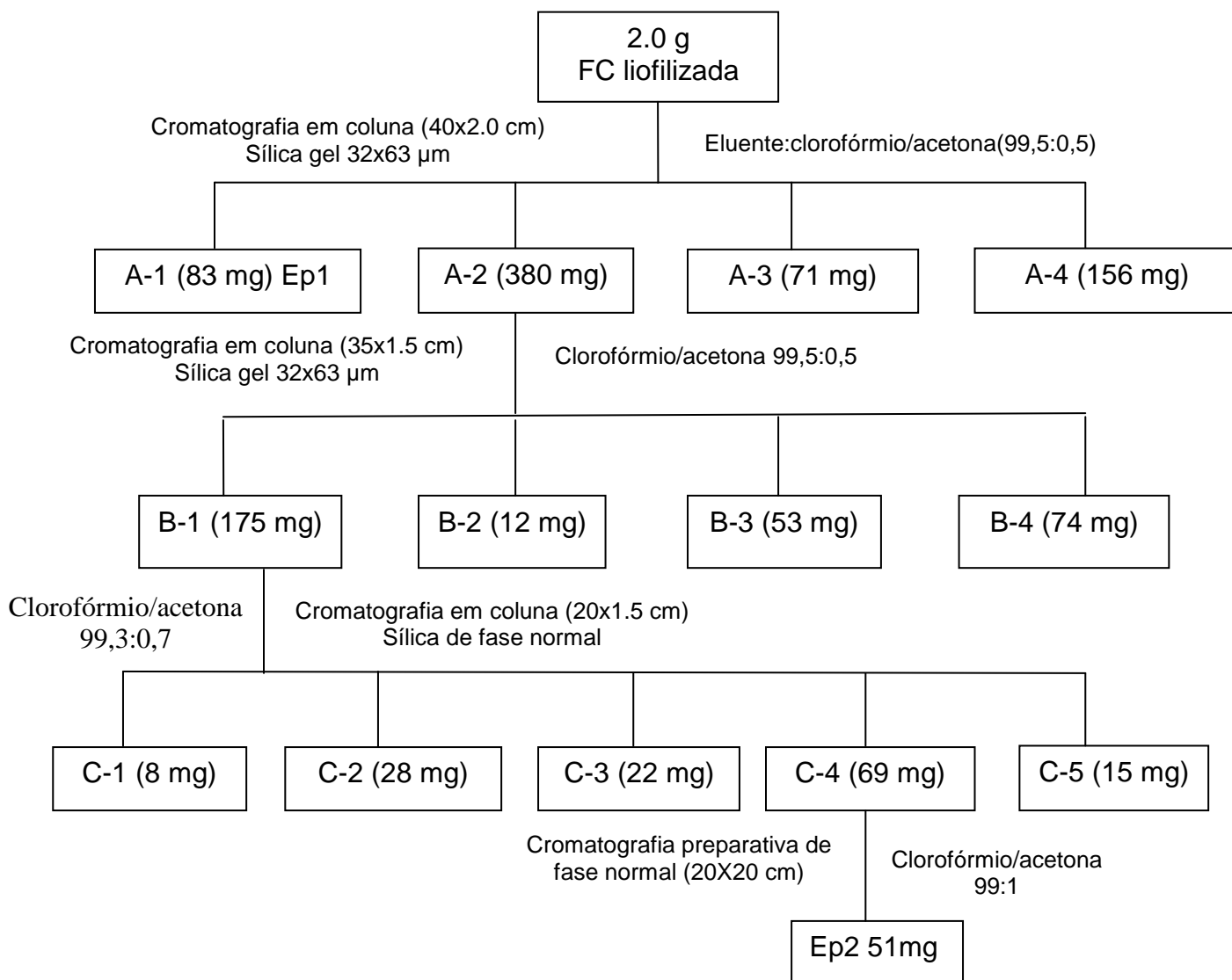
Utilizou-se como controle de crescimento, um poço contendo 10 microlitros da suspensão do microorganismo e 190 μ L de caldo Müller Hinton. As placas foram cobertas com parafilme e incubadas em estufa a temperatura de 35 °C por 24 h.

A leitura foi realizada em leitor de ELISA, em absorvância, no comprimento de onda de 600 nm, comparando-se as leituras dos poços contendo o EE a fração clorofórmica nas diferentes concentrações com o controle.

Foi considerada como Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor concentração do extrato etanólico e da fração clorofórmica capaz de inibir o crescimento microbiano, ou seja, a leitura menor que a do poço controle contendo caldo e a suspensão microbiana.

10 – ISOLAMENTO DOS PRINCIPAIS CONSTITUINTES QUÍMICOS

Os constituintes químicos foram obtidos conforme descrito no fluxograma abaixo.



Fluxograma 02- Isolamento das substâncias Ep1 e Ep2 a partir da fração clorofórmica.

Cerca de 2,5 g da fração clorofórmica foram suspensas em água destilada e, em seguida, colocada para liofilizar.

Com 2,0 g da fração clorofórmica liofilizada foi realizada separação cromatográfica em coluna (40 x 2.0 cm) utilizando-se sílica gel de 32-63 µm como fase estacionária e clorofórmio/acetona (99,5:0,5) como fase móvel.

O monitoramento da coluna foi feito por CCD, observando-se a separação dos constituintes químicos, sendo as cromatoplacas borrifadas com uma solução alcoólica de KOH 10% para se verificar a possível presença de naftoquinonas.

As frações foram reunidas observando-se a semelhança dos perfis de CCD, obtendo-se as seguintes amostras: A1= 83 mg, A2= 380 mg , A3= 71 mg e A4= 156 mg.

A amostra A2 foi submetida a nova separação cromatográfica em coluna (35 x 1.5 cm) utilizando-se sílica gel de 32-63 μm como fase estacionária e clorofórmio/acetona (99,5:0,5) como fase móvel, sendo monitorada por CCD, obtendo-se as seguintes amostras: B1= 175 mg, B2= 12 mg, B3= 53 mg e B4= 74 mg.

A amostra B1 foi submetida a outra separação por cromatografia em coluna (20 x 1.5 cm), utilizando-se como fase estacionária sílica de fase normal e clorofórmio/acetona (99,3:0,7) como fase móvel, também monitorada através de CCD, obtendo-se as seguintes amostras: C1= 8 mg, C2= 28 mg, C3= 22 mg, C4= 69 mg, C5= 15 mg.

O cromatograma da amostra C4 mostrou a melhor separação das naftoquinonas, esta fração foi submetida a cromatografia de camada delgada preparativa para o isolamento destes constituintes químicos.

Com 65 mg da amostra C4 foi realizada a separação cromatográfica preparativa, utilizando-se cromatoplacas padronizadas (20x20 cm) de sílica gel de fase normal como fase estacionária e como eluente clorofórmio/acetona (99:1).

As manchas características de naftoquinonas foram raspadas da placa cromatográfica e, em seguida, solubilizadas numa mistura de clorofórmio/acetona (99:1) e a solução filtrada em papel de filtro para retirada da sílica.

11 – CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Cerca de 20 mg de Ep1 e Ep2 foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e analisados em equipamento de RMN da marca Variant Plus, na frequência de 300 MHz.

A caracterização dos constituintes químicos isolados foi realizada através de comparação dos espectros de RMN de ^1H e RMN de ^{13}C , com os espectros de substâncias já isoladas de outras espécies do gênero *Eleutherine*, existentes na literatura científica.

12 – OBTENÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE DO EXTRATO ETANÓLICO E FRAÇÃO CLOROFÓRMICA

O perfil cromatográfico por CLAE foi determinado em sistema LaChrom 7000 MERCK HITACHI^R com detector de arranjo de diodo (DAD) e coluna Agilent LiChrospher100 (250 mm x 4.6 mm).

A fase móvel constituída por água ultra pura e acetonitrila (ACN), utilizando-se a programação descrita na Tabela 01.

Tabela 01 – Condições cromatográficas de obtenção do perfil por CLAE do EE, FC Isoeleuterol e Isoeleuterina

Tempo (minutos)	H ₂ O (%)	ACN (%)
00	85	15
10	70	30
10	50	50
10	20	80

O fluxo utilizado foi de 1 mL/mm, forno com temperatura de 26 °C obtendo-se espectros no comprimento de onda variando de 200 a 500 nm, adaptado de Paramapojn et al (2008).

As amostras foram aplicadas em alíquotas de 50 μL , nas seguintes concentrações: substância Ep1 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, substância Ep2 1 mg/mL , FC 2500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e EE 1 mL .

13 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO ETANÓLICO, ISOELEUTEROL E ISOELEUTERINA

A capacidade antioxidante foi avaliada através da reação do EE, Ep1 e Ep2 com o radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil ($\text{DPPH}^{\cdot+}$), utilizando-se como padrão o butil-hidroxi-tolueno (BHT). A reação foi acompanhada pela mudança de cor e a atividade é avaliada pelo decréscimo da absorbância em 517 nm em relação ao correspondente solvente branco (BLOIS, 1958).

V – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 – IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material vegetal foi identificado como um exemplar da espécie *Eleutherine plicata* Herb., a qual é de ocorrência muito comum na região Amazônica, não sendo mencionado pelo identificador possíveis sinonímias.

2 – OBTENÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO

Após a percolação de cerca de 500 g de droga seca e moída, o solvente foi retirado em evaporador rotativo, a baixa pressão e temperatura de 40 °C, obtendo-se 63 g de extrato etanólico (EE).

O solvente das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e residual foram retirados em evaporador rotativo, obtendo-se como rendimento 2,103 g de fração hexânica (FH=7%), 3,224 g de fração clorofórmica (FC=11%), 5,551 g de fração acetato de etila (FA=18%) e 12,494 g de fração residual (FR=41%).

3 – ABORDAGEM FITOQUÍMICA

O EE e suas frações foram avaliados quanto à presença de 18 classes de metabólitos secundários, sendo positivo para os seguintes metabólitos:

QUADRO 03 – Classes de metabólitos secundários detectadas na abordagem fitoquímica.

CLASSE METABÓLITO	AMOSTRAS				
	EE	FH	FC	FA	FR
ESTERÓIDES E TRITERPENÓIDES	+	+	+	-	-
AZULENOS	+	+	+	+	+
AÇÚCARES REDUTORES	+	-	-	-	-
ANTRAQUINONAS	+	+	+	-	-
NAFTOQUINONAS	+	+	+	-	-
SAPONINAS	-	-	-	+	+
FENÓIS E TANINOS	-	-	-	+	+
DERIVADOS DA CUMARINA	-	-	-	+	+

No EE, FH e FC foi detectada a presença de esteróides, triterpenóides, azulenos, antraquinonas e naftoquinonas (Quadro 03). Na FA e FR foi detectada a presença de azulenos, fenóis e taninos e de derivados da cumarina, sendo a presença de açúcares redutores detectada apenas no EE.

4 - ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

As análises de CCD foram realizadas com o objetivo de estabelecer o perfil cromatográfico do EE e frações FH e FC, deste modo, contribuir para o controle de qualidade da droga e seus derivados.

Diversos sistemas de eluentes foram testados para se estabelecer o perfil cromatográfico, sendo que, o sistema de fase normal de sílica gel e o sistema eluente clorofórmio:acetona (99:1), foi o que produziu o cromatograma de melhor resolução.

Na Figura 8.a, pode-se observar na região de luz visível três zonas de coloração amarela com Rfs 0,25, 0,31 e 0,44 tanto no EE, quanto nas frações.

Outra zona de cor rósea foi observada na região do visível com Rf 0,62 e 0,5 apenas na fração hexânica.

Quando o cromatograma foi observado sob luz ultravioleta de comprimento de onda de 254 nm (Figura 8b), pode-se observar três zonas de absorção no EE e nas frações, apresentando Rfs 0,25, 0,31 e 0,44, respectivamente. Sendo que, em FH observou-se, ainda, uma mancha de absorção com Rf 0,62.

O cromatograma após ser borrifado com solução metanólica de KOH a 10% (Figura 8c), o qual é um reagente característico para quinonas, observou-se a presença de manchas de cor marrom com Rfs 0,25, 0,31 e 0,44, indicativo da presença de naftoquinonas (WAGNER; BLAT,2001), no EE e nas frações. Em FH observou-se a presença de 03 manchas com Rfs 0,5, 0,62 e 0,87 de cor róseo.

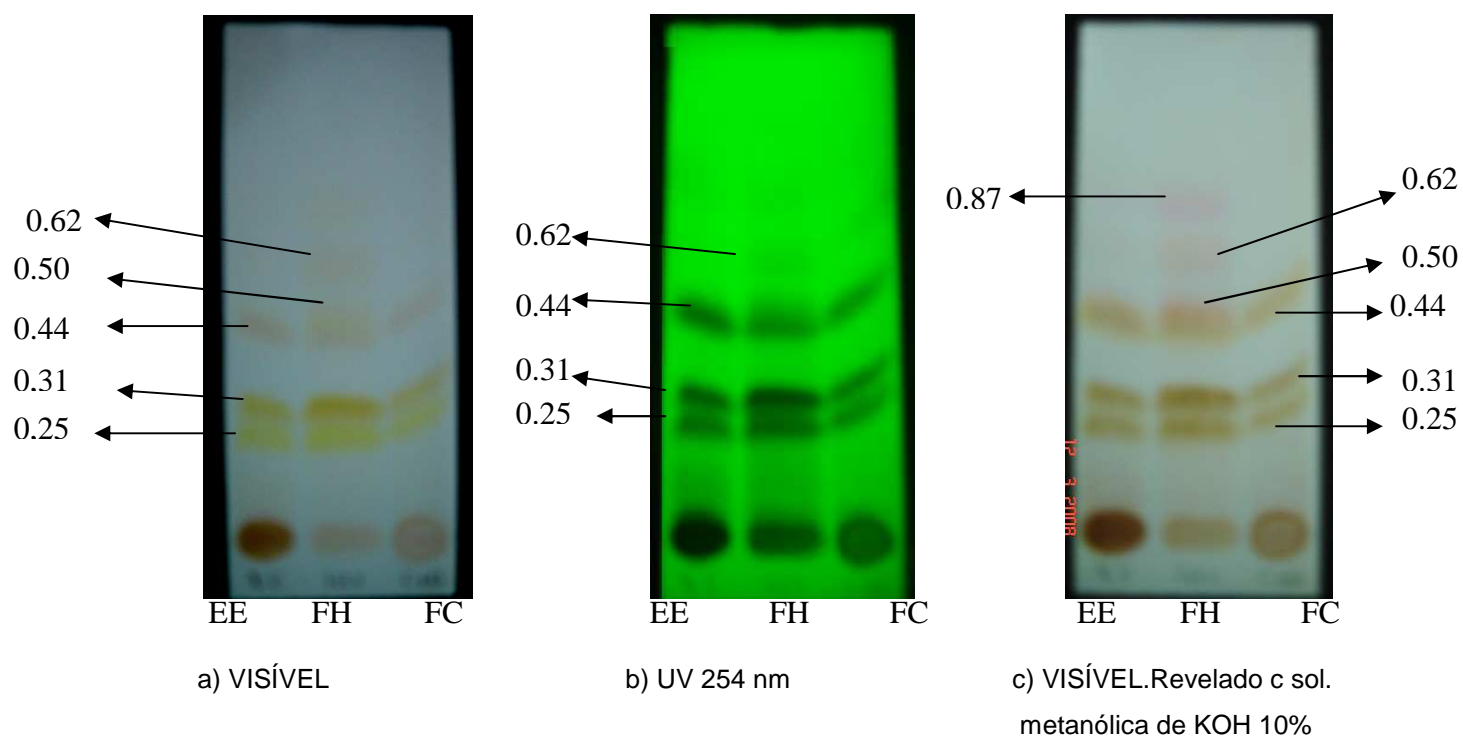


Figura 08 – Cromatograma obtido sobre gel de sílica normal com eluente clorofórmio/acetona 99:1.

5 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM).

5.1 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

O EE e as frações FC, FH, FA e FR foram submetidos a avaliação de atividade antimicrobiana, obtendo-se os resultados segundo a Tabela 02.

Tabela 02 - Avaliação da atividade antimicrobiana do EE, FC, FH, FA e FR.

EE e frações (concentrações mg/ml)	MICROORGANISMOS (Tamanho do halo de inibição mm)			
	<i>C. albicans</i>	<i>S.aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosas</i>
EE	(Halo de inibição/mm)			
500	14	15	-	-
250	12	14	-	-
125	10	11	-	-
62,5	-	8	-	-
FC				-
500	17	19	-	-
250	14	18	-	-
125	12	15	-	-
62,5	10	12	-	-
FH				-
500	14	12	-	-
250	9	10	-	-
125	-	-	-	-
62,5	-	-	-	-
FA				
500	-	-	-	-
250	-	-	-	-
125	-	-	-	-
62,5	-	-	-	-
FR				
500	-	-	-	-
250	-	-	-	-
125	-	-	-	-
62,5	-	-	-	-

(-) Resistente.

Como observado na Tabela 02, as frações FA e FR foram inativas frente as cepas dos microorganismos testados, pois, não houve a formação de halos de inibição de crescimento em todas as suas concentrações testadas.

Na avaliação da atividade antimicrobiana para *C. albicans* o EE apresentou atividade nas concentrações de 500 mg/mL, 250 mg/mL e 125 mg/mL. A amostra na concentração de 62,5 mg/mL apresentou halo de inibição menor que 8 mm, sendo considerado não ativa.

A fração clorofórmica (FC) apresentou atividade nas concentrações de 500mg/mL, 250mg/mL, 125mg/mL e 62,5mg/mL, com halos de inibição de crescimento maiores que os observados para EE (Tabela 02).

A fração hexânica (FH) apresentou atividade contra *C. albicans* somente nas concentrações 500 mg/mL e 250 mg/mL. A concentração 125mg/mL o halo de inibição foi menor do que o desejado (8 mm), sendo considerado não ativa. A concentração 62,5mg/mL não inibiu o crescimento do microorganismo, portanto, foi considerada inativa.

A FC, frente as cepas de *C. albicans* inibiu o crescimento *C. albicans* em todas as suas concentrações, com halos de inibição de crescimento bem superiores que ao EE e FH. Portanto, na Tabela 02 e Figura 09 observamos que FC é a fração mais ativa na inibição do crescimento de *C. albicans*.

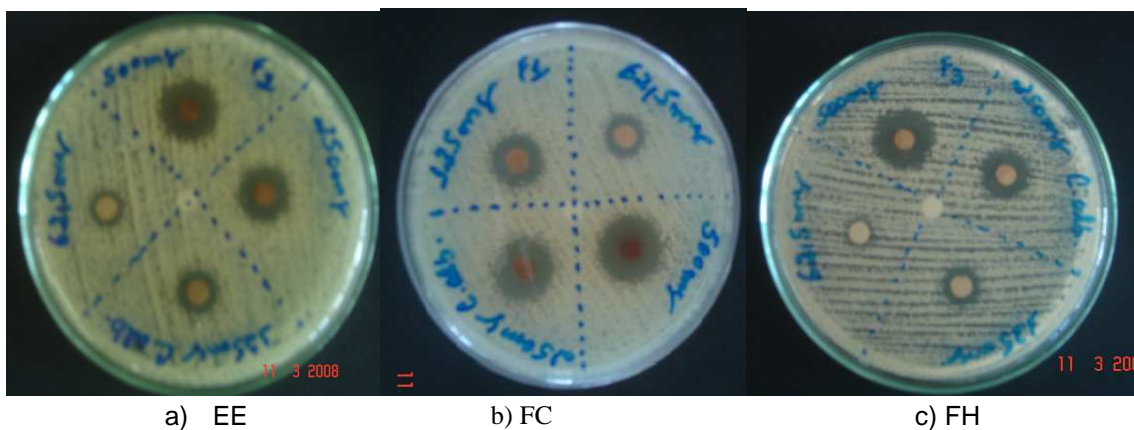


Figura 09 – Antibiograma realizado com *C. albicans*.

Na avaliação da atividade contra *S. aureus* o EE e FC apresentaram halos de inibição de satisfatórios em todas as contrações testada, conforme Tabela 02 e Figura 10. A FH apresentou atividade apenas nas concentrações 500 mg/mL e 250 mg/mL. Nas concentrações 125 mg/mL e 62,5 mg/mL os halos de inibição formados foram menores que o desejado, sendo consideradas inativas.

Ainda com base nos resultados mostrados na Tabela 02 e Figura 10, FC pode ser considerada a mais ativa, pois, apresentou os maiores halos de inibição.

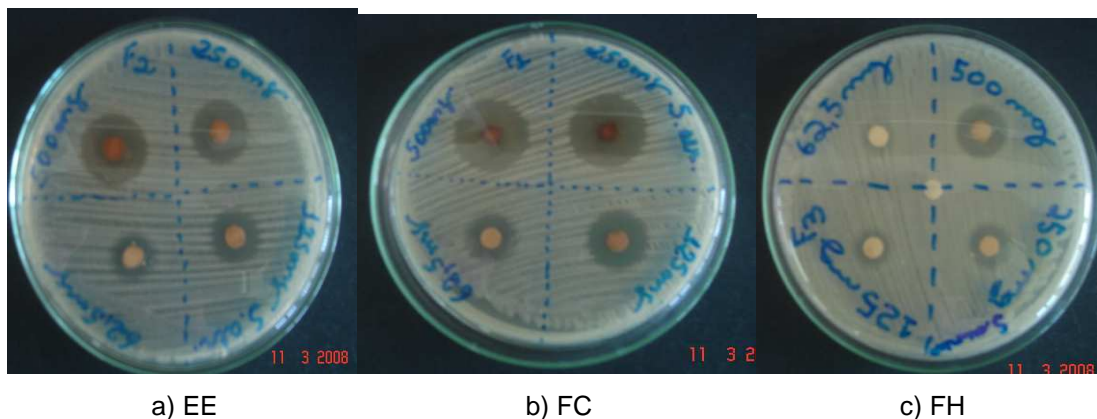


Figura 10 – Antibiograma realizado com *S. aureus*.

Na avaliação da atividade antimicrobiana realizada com cepas de *E. coli* e *P.aeruginosa*, não houve a formação de halos de inibição de crescimento. Com isso evidenciou-se que o EE, FC e as demais frações são inativas frente a estes microorganismos.

4.2 – DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

O EE e FC por apresentarem os melhores resultados na avaliação da atividade antimicrobiana foram submetidos a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), obtendo-se como resultado os dados que constam na Tabela 03.

Tabela 03 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do EE e FC

Amostras (Concentrações mg/mL)	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>
EE		
125	+	+
62,5	+	+
31,25	-	-
15,62	-	-
FC		
125	+	+
62,5	+	+
31,25	+	+
15,62	-	-

- + Inibição de crescimento
- Não houve inibição de crescimento

Como observado na Tabela 03, o EE apresentou como CIM a concentração de 62,5 mg/mL, e FC a concentração de 31,25 mg/mL. Estes resultados mostram que FC apresenta a melhor atividade contra *C. albicans* e *S. aureus*, por apresentar a menor concentração inibitória, indicando elevada concentração de ativos.

A abordagem fitoquímica do EE e FC detectou a presença de naftoquinonas, os quais são metabólitos secundários que apresentam ação antifúngica, antibacteriana e antiparasitária conhecida. Este fato, sugere que a inibição do crescimento das cepas destes microorganismos pode ser devida a presença destes constituintes químicos.

Estes patógenos desenvolvem rapidamente resistência a numerosos agentes antimicrobianos e, portanto, constituem problemas terapêuticos de difícil resolução. Com os resultados obtidos na avaliação da atividade antimicrobiana e CIM podemos observar o potencial terapêutico que este vegetal possui, e por conseqüência a possibilidade de aplicação dele, ou de produtos oriundos, na prevenção e tratamento de doenças causadas por *S. aureus* e *C. albicans*.

6 – ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

O monitoramento por CCD mostrou que a amostra A-1 (83 mg), tratava-se de um constituinte químico isolado, o qual foi denominado Ep1.

A amostra C4 (69 mg) após ser submetida à cromatografia de camada delgada preparativa e ter as manchas características de naftoquinonas raspadas, apresentou como rendimento 51 mg deste possível metabólito secundário, o qual foi denominado de Ep2.

7 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS ISOLADOS

7.1 – CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA Ep1- ISOELEUTEROL

O espectro de RMN¹H (Figura 11), da substância 01 mostra a presença de 04 hidrogênios aromáticos H-4, H-6, H-7 e H-8. O hidrogênio aromático H-4 aparece como um singleto (δ 7,86ppm), o hidrogênio H-6 (δ 7,545ppm) aparece acoplado com o hidrogênio H-7 (δ 7,399ppm) na forma de duplete.

O hidrogênio H-7 (δ 7,399ppm) acopla com os hidrogênios H-6 (δ 7,545ppm) e H-8(δ 6,940ppm), aparecendo na forma de duplo duplete superposto ou falso tripleto. O hidrogênio H-8 (δ 6,940ppm) aparece acoplado com o hidrogênio H-7(δ 7,399) na forma de duplete.

A figura 13 mostra um singleto (δ 4,108ppm) referente aos hidrogênios do grupo metóxi, ligado ao anel aromático. Verifica-se também a presença dos hidrogênios do grupo metila (δ 1,736ppm) ligado ao carbono 01 na posição do anel furânico, acoplado com o H -1(δ 5,718ppm), aparecendo como um duplete.

O hidrogênio ligado na posição 1(δ 5,718ppm) acopla com os hidrogênios do grupo metila, mostrando-se com um quarteto. Por último verificamos o hidrogênio fenólico (δ 9,644) como um singleto.

A Tabela 04 mostra a comparação dos dados do espectro de RMN ¹H da substância 01 com os dados da literatura científica, onde verifica-se que o composto Ep1 apresenta as mesmas características do constituinte Isoeleuterol.

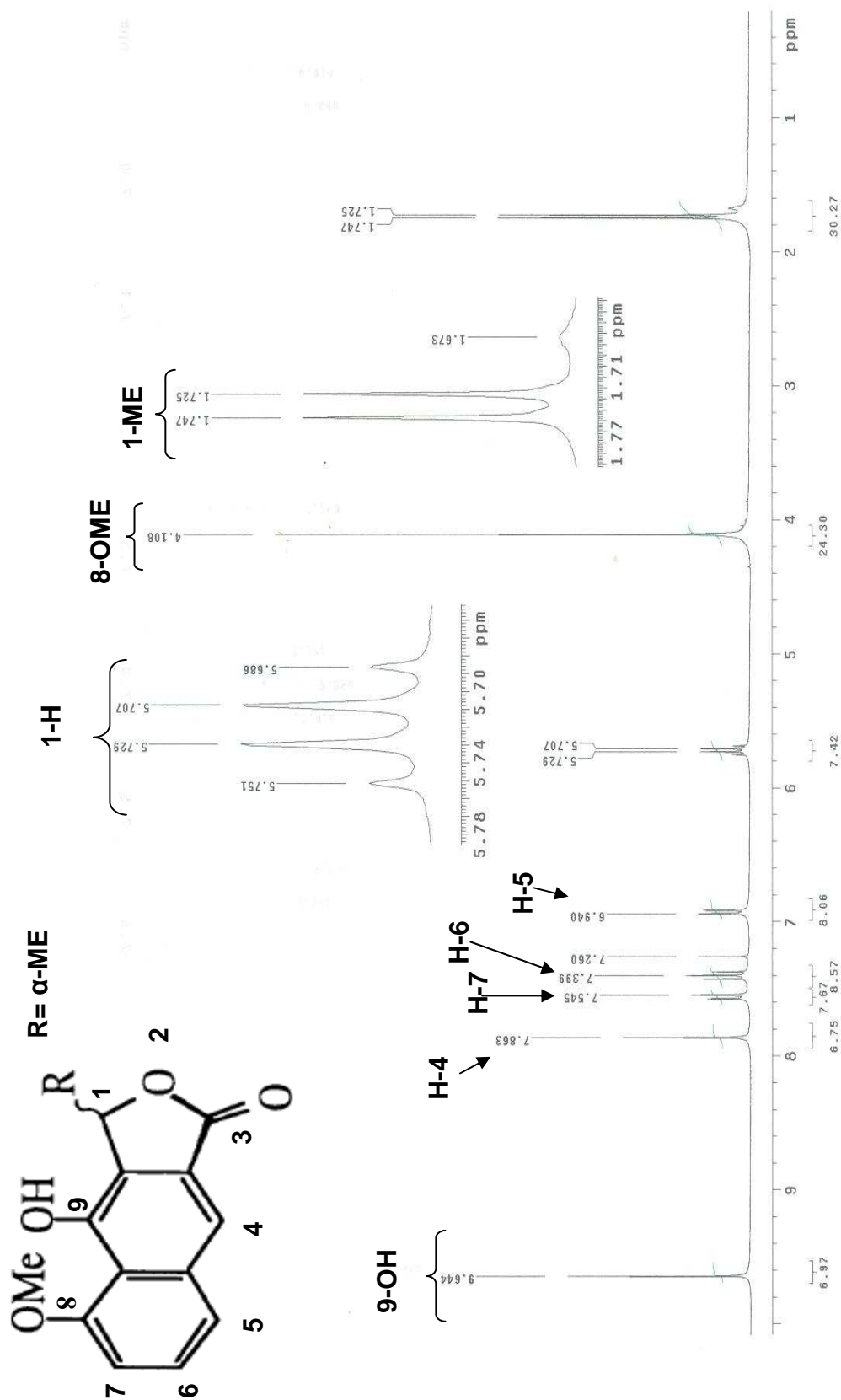


Figura 11: Espectro de RMN¹H do Isoeuleterol (300MHz; CDCl₃)

Tabela 04 – Dados de RMN¹H da substância Ep1, em comparação com o Isoeuleterol.

HIDROGÊNIO	SUBSTÂNCIA Ep1 δ(ppm)	* ISOEULETEROL δ(ppm)	MULTIPLICIDADE	J (Hz)
1-ME	1,736	1,73	d	6.5
8-OME	4,108	4,11	s	
H-1	5,718	5,70	dd	6.5
H-5	6,927	6,93	d	7.7
H-6	7,399	7,39	t	7.7
H-7	7,545	7,54	t	7.7
H-4	7,863	7,84	s	
9-OH	9,644	9,63	s	

*Fonte: HARA et al, 1997.

Os dados do espectro de RMN ¹³C da substância Ep1, constantes nas Figuras 12a e 12b mostrou a presença de 14 átomos carbonos.

Pode-se verificar na Figura 12b dois sinais com deslocamentos δ 19,34 e δ 56,77, característico dos carbonos metílicos C-11 e C-10, respectivamente, e um pico com deslocamento δ 76,80 é característicos do carbono secundários C-1.

A Figura 12a mostra picos com deslocamentos δ 126,79, δ 123,82, δ 116,67 e δ 106,44 correspondem aos carbonos C-4, C-5, C-6 e C-7, respectivamente.

O carbono C-3 do anel pirânico, que está ligado a dois átomos de oxigênio, apresenta um pico com deslocamento δ 170,69, enquanto os carbonos aromáticos C-4a e C-8a apresentam deslocamentos com picos δ 137,37 e δ 117,66.

O pico com deslocamento δ 156,42 refere-se ao carbono C-8 ligado ao grupo metoxi, enquanto que o pico δ 149,20 ao carbono C-9 ligado a hidroxila.

Notamos, ainda, que os carbonos C-3a e C-9a do anel furânico apresenta picos com deslocamentos δ 126,04 e δ 128,07, respectivamente.

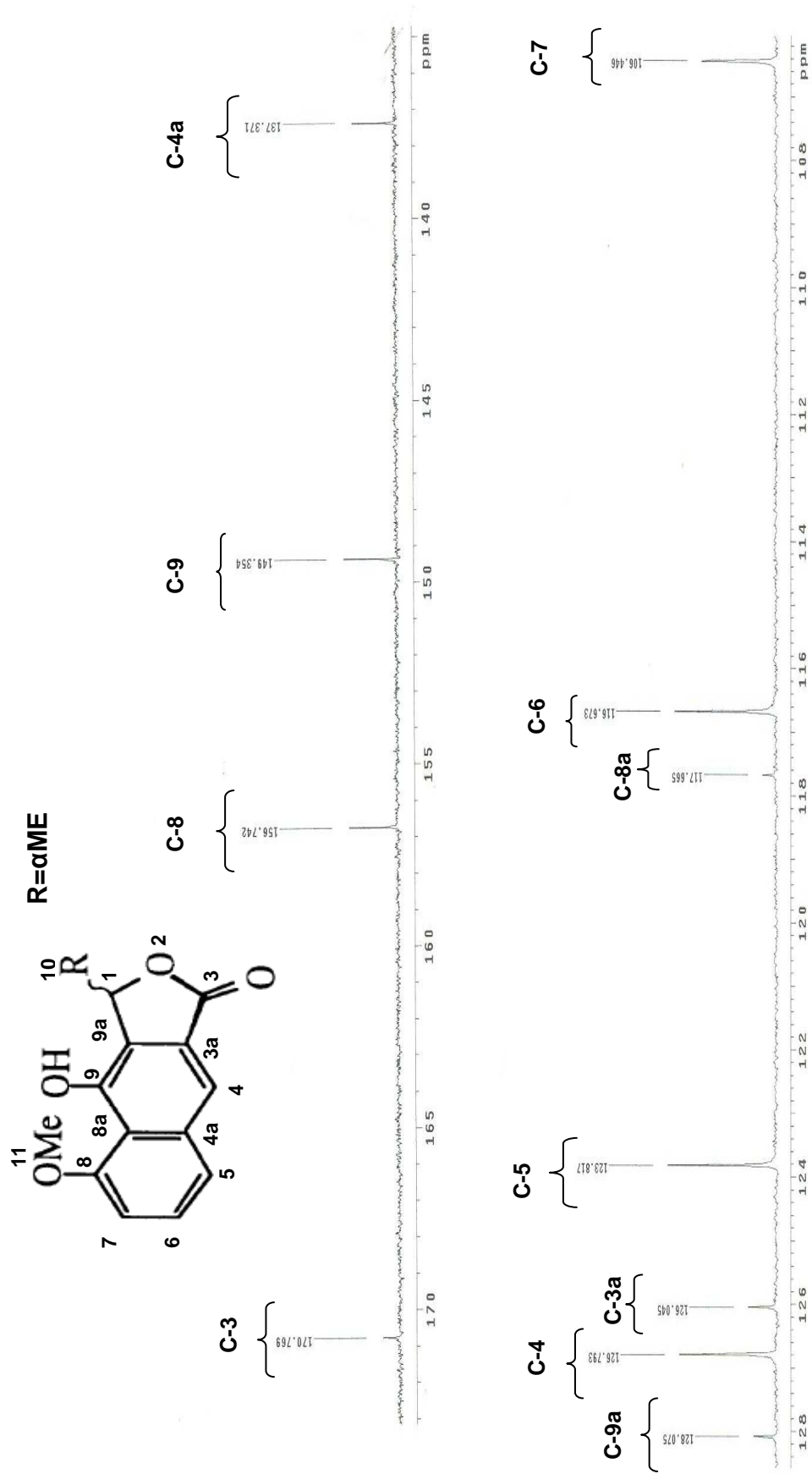


Figura 12a: Espectro de RMN ¹³C do Isoeuleterol (300MHZ; CDCl₃)

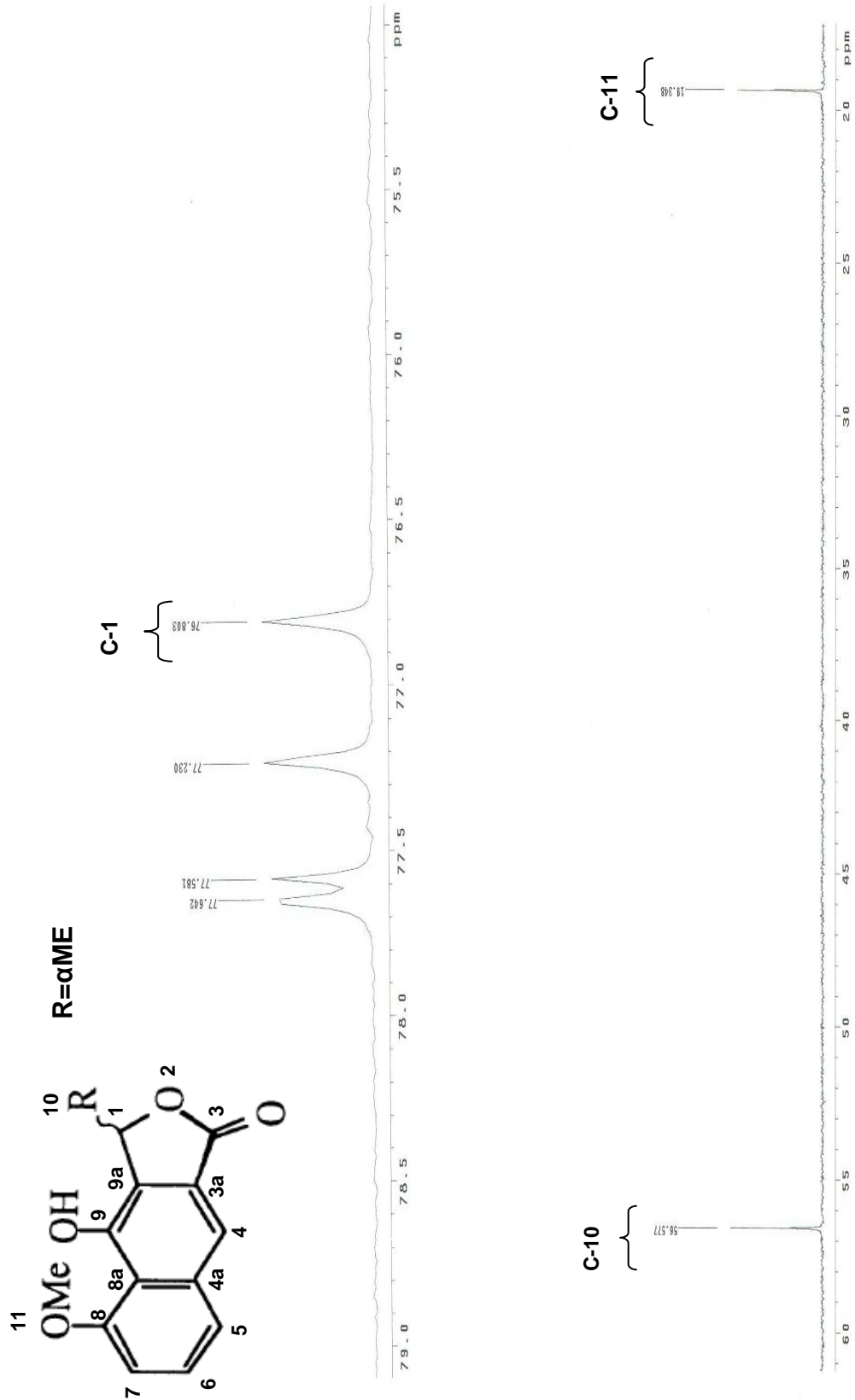


Figura 12b: Espectro de RMN ¹³C do Isoeuleterol (300MHZ; CDCl₃)

Tabela 05 – Dados de RMN ¹³C da substância Ep1, em comparação com o Isoeleuterol.

CARBONO	SUBSTÂNCIA Ep1 δ(ppm)	* ISOELEUTEROL δ(ppm)
C-11	19,35	19,18
C-10	56,57	56,43
C-1	76,80	76,64
C-7	106,44	106,33
C-6	116,67	116,50
C-8a	117,66	117,54
C-5	123,82	123,67
C-3a	126,04	125,92
C-4	126,79	126,61
C-9a	128,07	127,94
C-4a	137,37	137,24
C-9	149,35	149,20
C-8	156,42	156,61
C-3	170,69	170,55

*Fonte: HARA et al, 1997.

Os dados dos espectros de RMN ¹H e ¹³C da substância Ep1 em comparação com os da literatura científica (Tabelas 04 e 05), nos mostram que este constituinte químico trata-se do Isoeleuterol, o qual já foi isolado de *Eleutherine americana* MERR. et HEYNE, por HARA et al (1997), sendo pela primeira vez isolado em *E.plicata* Herb.

Estudo realizado por HARA et al (1997) verificaram que o isoeleuterol não inibiu a enzima topoisomerase II-DNA dependente, mas mostrou significativa atividade inibitória da replicação do HIV em linfócitos H9, apresentando TI=13,4 (TI≥5.0 considerado significativo).

O fato de o Isoeleuterol parecer mais estável e ser o constituinte químico majoritário no EE, o coloca em posição privilegiada para ser usado como marcador químico de qualidade do EE e de produtos obtidos a partir dele.

7.2 – CARACTERIZAÇÃO DA SUBSTÂNCIA Ep2-ISOELEUTERINA

A substância Ep2 foi analisada por RMN¹H, e a caracterização foi feita por comparação dos dados do espectro obtido, com os dados da literatura científica (Tabela 06).

Observamos nas Figuras 13a e 13b, que os hidrogênios 6H, 7H e 8-H, do anel aromático, aparecem em δ 7,73, δ 7,64 e δ 7,27, respectivamente com constante de acoplamento idêntica e igual a $J_{6H-8H}=6.7$. O hidrogênio 6-H aparece em forma de duplete acoplando com 7-H, que por sua vez aparece em forma de triplete acoplando com 6-H e 8H.

Os hidrogênios 1-ME e 1-H aparecem como duplete com δ 1.33 e δ 1.54, respectivamente e os hidrogênios 3-ME mostram-se como duplete com δ 1,34.

Tabela 06 – Dados de RMN¹H da substância Ep2, em comparação com a Isoeleuterina.

HIDROGÊNIO	SUBSTÂNCIA Ep2 δ (ppm)	* ISOELEUTERINA δ (ppm)	MULTIP.	J (Hz)
3-ME	1,33	1,34	d	6.1
1-ME	1,53	1,53	d	6.7
4- β H	2,23	2,23	dd	11.0-19.0
4- α H	2,69	2,68	dd	3.5-19.0
3-H	3,95	3,96	m	
9-OME	4,0	4,0	s	
1-H	5,0	5,01	q	6.7
8-H	7,27	7,27	d	6.7
7-H	7,64	7,64	t	6.7
6-H	7,73	7,74	d	6.7

*Fonte: HARA et al, 1997.

Quando comparamos os dados do espectro da RMN ¹H (Figuras 13a e 13b) com os da literatura científica, observamos que a substância Ep2 trata-se do composto químico Isoeleuterina, uma naftoquinona já isolada de *Eleutherine americana* Merr. por HARA et al (1997) e *Eleutherine bulbosa* Mill (Alves et al, 2003).

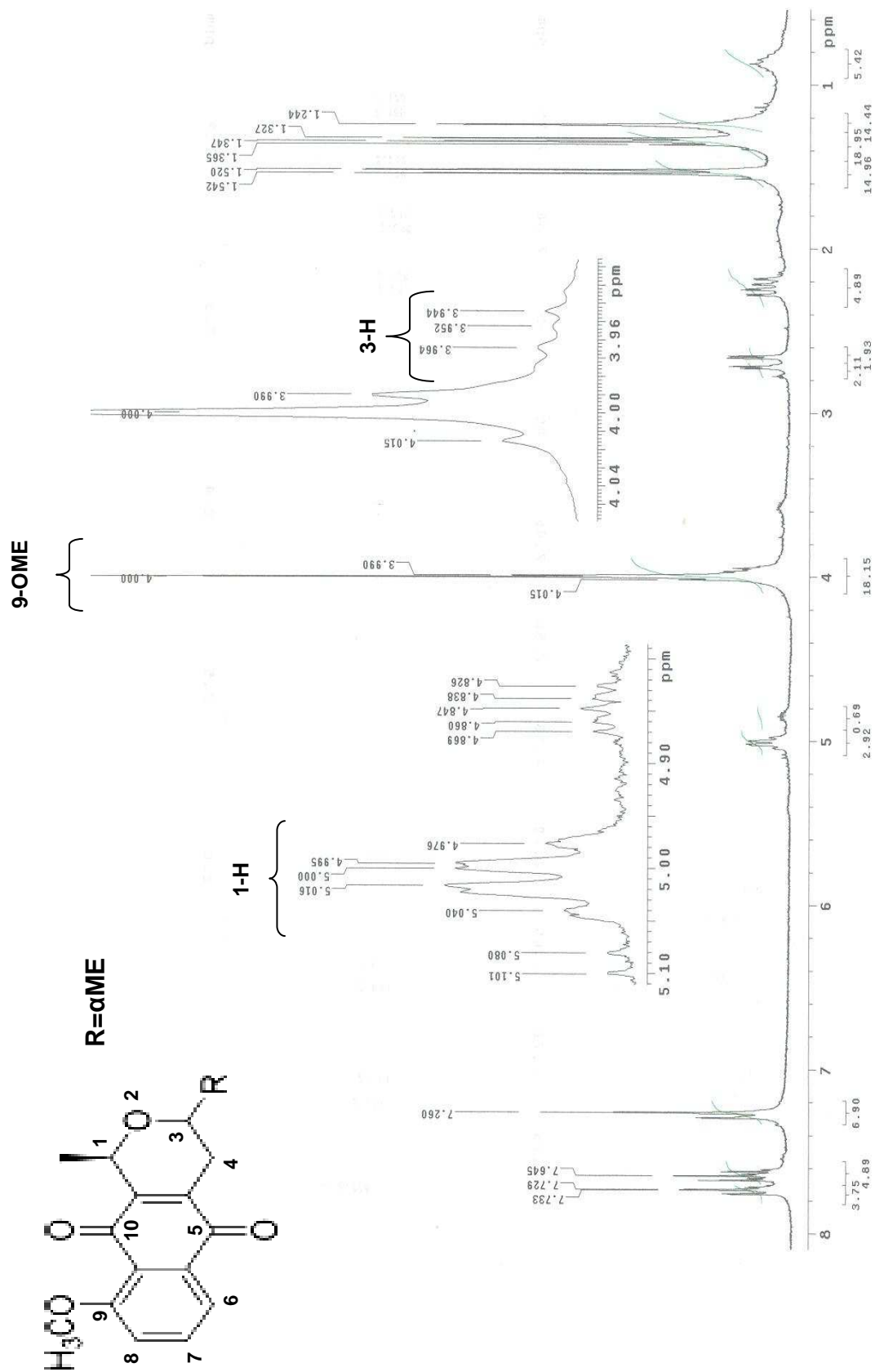


Figura 13a: Espectro de RMN¹H da Isoeuterina (300MHz; CDCl₃)

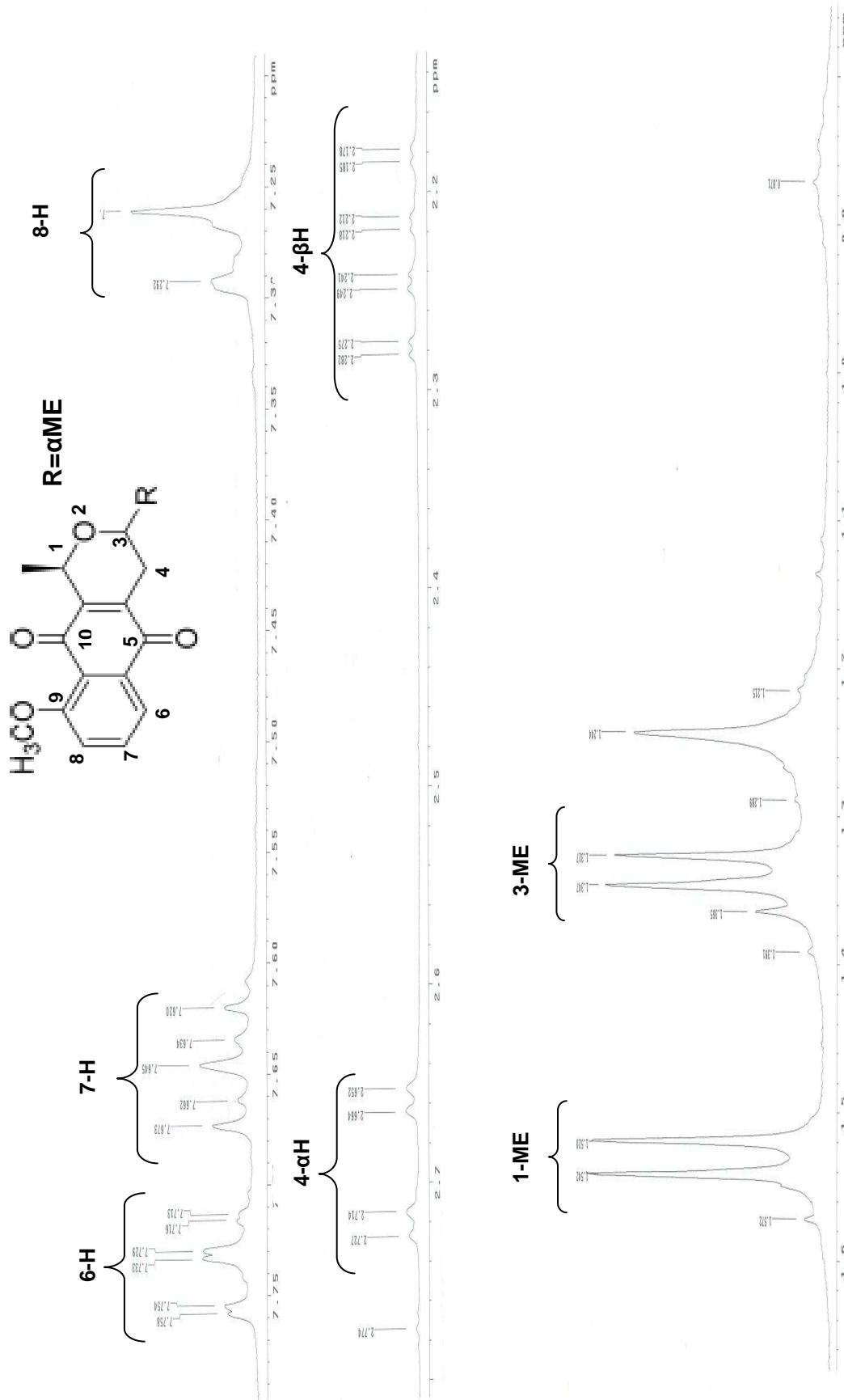


Figura 13b: Espectro de RMN¹H da Isoeuterina (300MHZ; CDCl₃)

8 - PERFIL CROMATOGRÁFICO OBTIDO POR CLAE DO EE, FC, ISOELEUTEROL E ISOELEUTERINA

O perfil cromatográfico por CLAE, foi obtido utilizando-se o método desenvolvido por Paramapojn e colaboradores (2008), com modificações. Sendo que os melhores cromatogramas foram observados no comprimento de onda de 250 nm.

O cromatograma do EE apresentou dois picos de grande intensidade com tempo de retenção (Rt) de 18,93 e 20,83 minutos, com áreas de 45854675 e 60180902 e pureza de 99,97% e 99,72% (Figura 14).

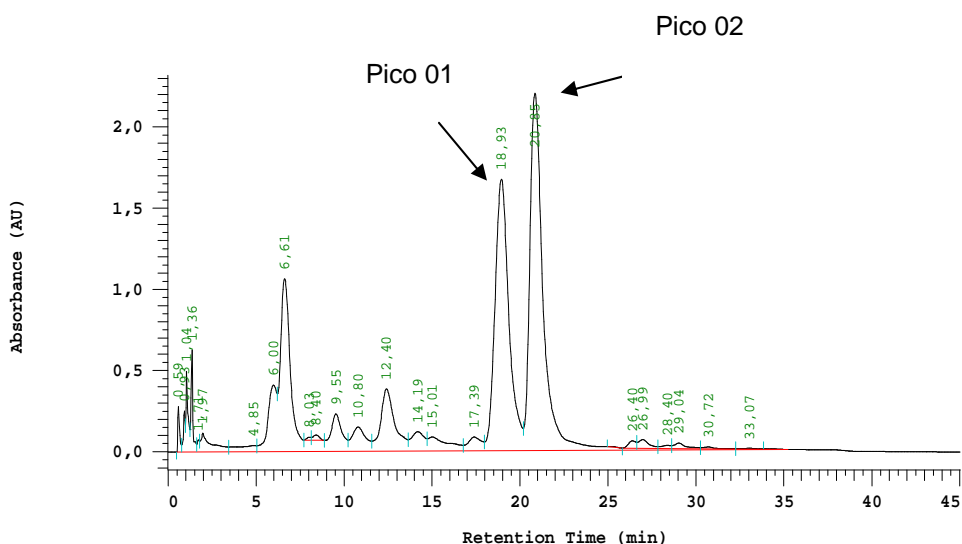


Figura 14 - Cromatograma obtido por CLAE do EE, no comprimento de onda de 250nm.

O cromatograma da fração clorofórmica apresentou como picos de maior intensidade aqueles com RT de 19,12 e 21,18 minutos, com áreas de 7813739 e 1900571 e pureza de 98,29 % e 99,75 (Figura 15).

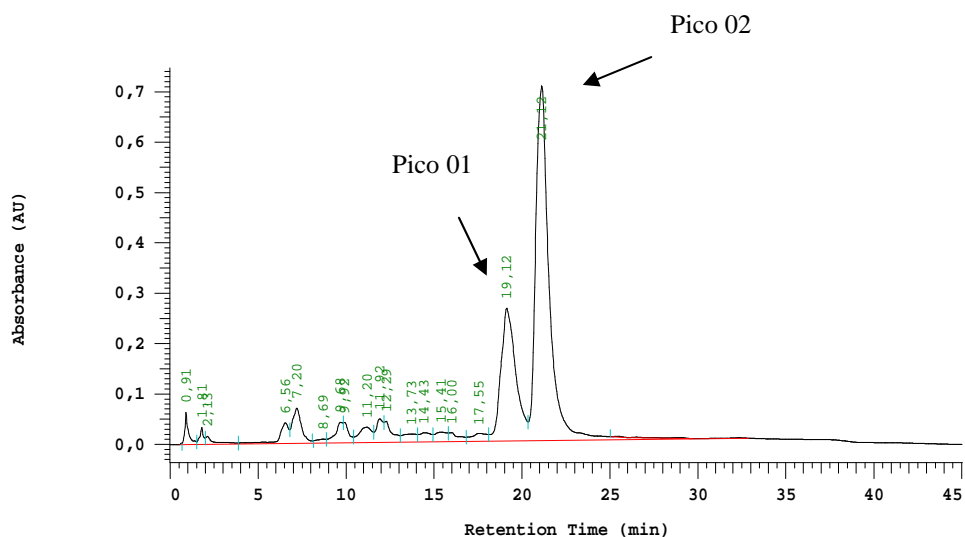


Figura 15 - Cromatograma obtido por CLAE da Fração Clorofórmica, no comprimento de onda 250nm.

O Isoeleuterol foi submetido à CLAE nas mesmas condições que o EE e FC, apresentando pico com RT 21,71, área 3641711 e pureza de 99,92% (Figura 16).

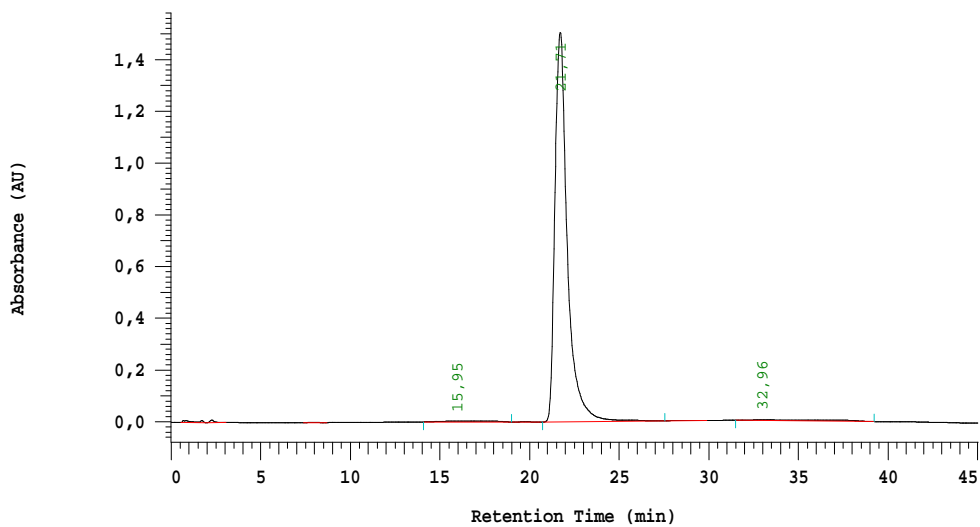


Figura 16 - Cromatograma obtido por CLAE do Isoeleuterol, no comprimento de onda 250nm.

A Isoeleuterina foi submetida à CLAE nas mesmas condições que o EE e FC, apresentando pico com RT 18,13, área 24727851 e pureza de 99,14% (Figura 17).

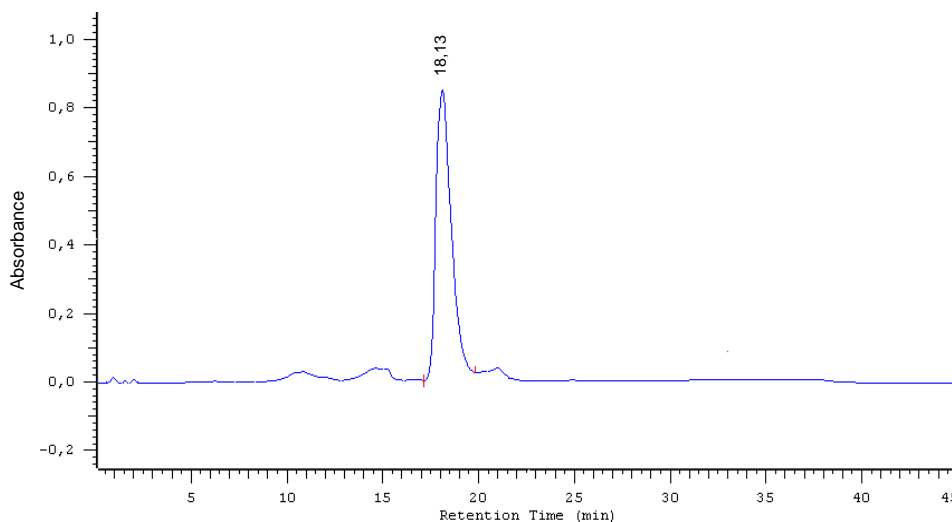


Figura 17 - Cromatograma obtido por CLAE da substância Ep2, no comprimento de onda 250nm.

Utilizando-se o recurso de pesquisa reversa na biblioteca do equipamento de CLAE, verificou-se que o pico 01 do EE (Figura 14) e FC (Figura 15), apresentaram uma correlação de 97,40% e 99,89%, respectivamente com a substância Isoeleuterina. O pico 02 do EE (Figura 14) e FC (Figura 15) apresentaram uma correlação de 99,84% e 99,98%, respectivamente, com a substância isolada Isoeleuterol.

E. plicata é vastamente utilizada pela população devido as atividades farmacológicas que lhes são atribuídas, e a obtenção do perfil cromatográfico do EE e FC torna-se importante para caracterizar os produtos feitos a partir deste vegetal.

9 - AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EE, ISOELEUTEROL E ISOELEUTERINA

A Figura 18 e o Quadro 04 mostram a avaliação da atividade antioxidante do EE, Isoeleuterol e Isoeleuterina frente ao DPPH, comparando-se os resultados com o padrão BHT.

O Isoeleuterol apresentou atividade a partir da concentração 4 μ g/mL, o EE a partir da concentração 5 μ g/mL e a Isoeleuterina a partir de 6 μ g/mL, enquanto o padrão BHT apresentou atividade a partir da concentração de 1 μ g/mL (Figura 18).

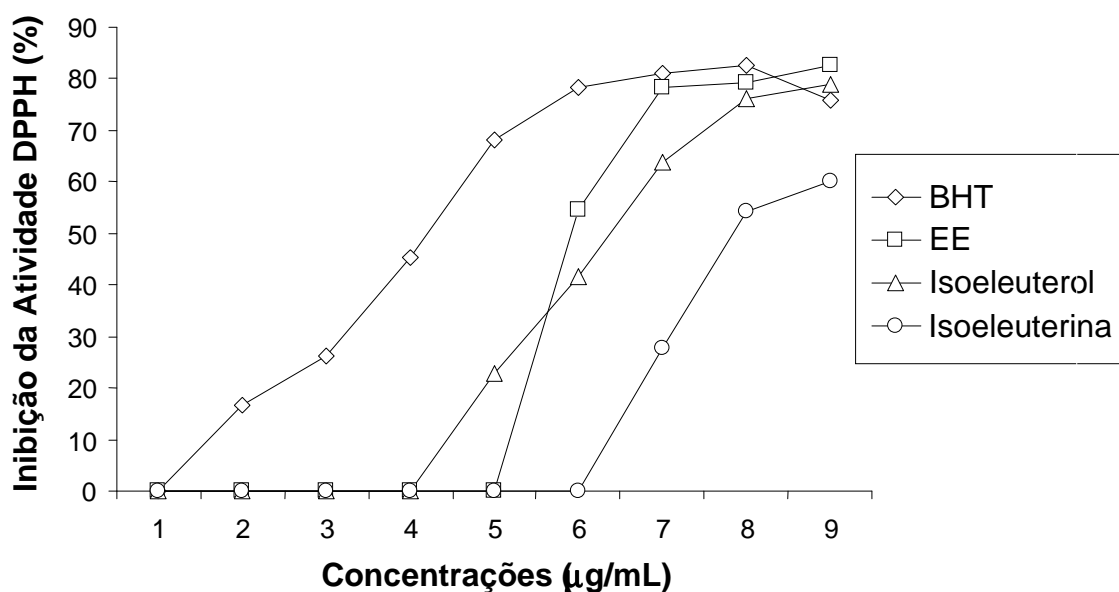


Figura 18 – Avaliação da atividade antioxidante do EE, Isoeleuterol e Isoeleuterina, frente ao DPPH.

Observou-se através da determinação da IC₅₀ das amostras (Quadro 04) que o Isoeleuterol apresentou melhor atividade antioxidante que o EE e a Isoeleuterina. Mas comparando-se a IC₅₀ do Isoeleuterol com a do BHT, verificou-se que o Isoeleuterol apresentou baixíssima atividade antioxidante.

Quadro 04- Determinação das IC₅₀ do EE, Isoeleuterol, Isoeleuterina e BHT.

AMOSTRA	IC₅₀
BHT	17,83
EE	94,72
ISOELEUTEROL	84,63
ISOELEUTERINA	281,04

A melhor atividade antioxidante do Isoeleuterol em relação ao EE e a Isoeluterina, pode ser devido a presença de uma hidroxila no C-9 de sua estrutura, já que substâncias fenólicas funcionam como seqüestradores de radicais livres e algumas vezes como quelantes de metais, sendo eficazes, principalmente para prevenir a oxidação lipídica por agirem tanto na etapa de iniciação como de propagação do processo oxidativo.

O Quadro 04 mostra que o EE apresentou uma IC₅₀ maior que o Isoeleuterol, portanto menor atividade antioxidante que o Isoeleuterol.

Esperava-se que o EE apresentasse melhor atividade antioxidante devido a presença taninos, os quais são substâncias polifenólicas que possuem uma estrutura química ideal para a atividade de seqüestro de radicais livres e tem demonstrado serem eficientes antioxidantes. Mas a presença de naftoquinonas no EE, as quais são metabólitos secundários conhecidos por induzirem o estresse oxidativo, ou seja pró-oxidantes, pode ter neutralizado a atividade dos taninos fazendo com que o EE apresentasse uma baixíssima atividade antioxidante.

Como esperado e observado na Figura 18 e Quadro 04 a Isoeleuterina apresentou insignificante atividade antioxidante.

VI – CONCLUSÃO

A avaliação da atividade antimicrobiana do EE, FH, FC, FA e FR, mostrou que o EE e a FC são mais ativas frente às cepas de *S. aureus* e *C. albicans*, porém não apresentando atividade frente às cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa*.

Através da determinação da CIM verificou-se que a FC é mais ativa que o EE.

A partir da fração clorofórmica foi possível isolar dois constituintes químicos, os quais foram caracterizados através de análises de RMN de ^1H e ^{13}C como sendo o Isoeleuterol e Isoeleuterina, já isolados de outras espécies do gênero *Eleutherine*.

A análise por CLAE permitiu estabelecer o perfil cromatográfico do EE, FC, Isoeleuterol e Isoeleuterina. O perfil cromatográfico demonstrou a presença do Isoeleuterol e Isoeleuterina no EE, podendo ser um parâmetro para o controle de qualidade do EE e de produtos obtidos a partir dele.

O Isoeleuterol isolado é o constituinte químico majoritário no EE podendo ser o marcador químico de referência para o controle de qualidade do EE e seus derivados.

Na avaliação da atividade antioxidante frente ao DPPH· o EE, Isoeleuterol e Isoeleuterina apresentaram baixíssima atividade antioxidante, quando comparado com o padrão BHT. Dentre estas amostras o Isoeleuterol apresentou uma melhor atividade por apresentar uma hidroxila capaz de seqüestrar radicais livres.

O isolamento do Isoeleuterol e da Isoeleuterina, as quais são substâncias com conhecidas atividades farmacológicas, sugerem o potencial da *E. plicata* Herb. para a obtenção de um novo fitoterápico.

VII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, T. M. A.; KLOOS, H.; ZANI, C.L. Eleutherinone, a novel fungitox naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, nº 5, 2003.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php> Acesso em: 13 out. 2007.

ANAZETTI, M.C; MELO, P. Morte Celular por Apoptose: uma visão bioquímica. **Metrocamp Pesquisa**, v. 1, n. 1, p. 37-57, jan.2007.

Disponível em: www.metrocamp.com.br/pesquisa Acesso em: 23 mai. 2008.

ANTOLOVICH, M.; PRENZER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, v. 127, p.183-198, 2002.

Disponível: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11827390 Acesso em 25 ago. 2008.

BARBOSA, W. L. R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. Belém:UFPA, 2001.

Disponível: http://www.propesp.ufpa.br/revistas/textos_científicos.htm

Acesso em: 18 de nov. 2007.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N. Levantamento etnofarmacêutico da fitoterapia tradicional de Igarapé-Miri. In: **VII Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**. Manaus-AM, 2001. CD-ROOM VII SBPC. Manaus:AM, 2001.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F. e OLIVEIRA, C. L. L. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.86, nº 3/4, p.80-83, 2005.

BLOIS, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, 181, 1199–1200, 1958

Disponível em: www.nature.com/nature/journal/v181/n4617/abs/1811199a0.htm

Acesso em: 20 ago. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais. Brasília-DF, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada 48 (RDC) de 16 de maio de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Brasília, DF.

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 26 de jan. de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos Brasília, DF, 2006.

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/e-legis/> Acesso em: 26 de jan. de 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde Brasília, DF, 2006.

Disponível em: <http://www.saude.gov.br/>. Acesso em: 26 de jan. de 2008.

BRASILEIRO, B.G.; PIZZIOLLO, V.R.; RASLAN, D.S.; JAMAL, C.M.; SILVEIRA, D. Triagem das atividades antimicrobianas e citotóxica de algumas plantas medicinais brasileiras usadas na cidade de Governador Valadares. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, nº 2, 2006.

Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php> Acesso em: 13 out. 2007.

BROOKS, G.F; BUTEL, J.S; MORSE, S.A. Microbiologia Médica. 21ª Edição. Rio de Janeiro: GUANABARA KOOGAN, 2000.

BRUNETON, J. Farmacognosia. Fitoquímica e plantas medicinales. 2ª Edição. Zaragoza: ACRIBIA S.A. 2001, p. 405-420.

DAVIES, K.J. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical Society Symposium**, v. 61, p. 1-31, 1995.

GOLDBLATT, P. Phylogeny and classification of Iridaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 77, n. 4, 1990.

Disponível em: www.botanicus.org/item/bibliography Acesso: 12 set. 2008.

HAN, A.; MIN, H.; NAM, J.; LEE, N.; WIRYAWAN, A.; LEE, S.K.; LEE, K.R.; SEO, E. Identificación of a new naphthalene and its derivatives from bulb of *Eleutherine americana* with inhibitor activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 56, nº. 09, p. 1314-1316, 2008.

Disponível em: www.journalarchive.jst.go.jp Acesso em 20 out. 2008.

HARA, H.; MARUYAMA, N.; YAMASHITA, S.; HAYASHI, Y.; LEE, K.; BASTOW, K.F.; MARUMOTO, R.; IMAKURA, M. Elecanacin, a novel new naphthoquinone from the bulb of *Eleutherine americana* Merr. Et Heyne. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 45, nº. 10, p. 1774-1776, 1997.

Disponível em: www.journalarchive.jst.go.jp Acesso em 12 set. 2008.

JARDIM, M.A.G.; FERREIRA, M.R.; LEÃO, R.B.A. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**. São Paulo. V. 88 (1). p. 21-25, 2007.

KOMURA, H.; MIZUKAWA, K.; MINAKATA, H.; HUANG, H.; QIN, G.; XU, R. New anthraquinones from *Eleutherine americana*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n^o. 11, p. 4206-4298, 1983.

Disponível em: www.journalarchive.jst.go.jp Acesso em 12 set. 2008.

LANS, C. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for reproductive problems. **Journal of ethnobiology and ethnomedicine**. N^o 03, p. 13, 2007.

LIN, J.; PUCKREE, T.; MVELASE, T.P. Anti-diarroreal evaluation of some medicinal plants used by Zulu tradicional healer. **Journal of ethnofarmacology**. N^o 79 (1). p. 53, 2002.

Disponível em: www.elsevier.com/locate/jethpharm Acesso em 20 mar. 2008

LORENZI, H; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais do Brasil – Nativas e Exóticas. São Paulo: Instituto Plantarium de Estudo da Flora LTDA. 2002.p. 233-234.

MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: ROBE, 1999.p. 11-20.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Conferência Internacional sobre Cuidados Primários de Saúde. Declaração de Alma-Ata, 1978.

PARAMAPONJ, S.; GANZERA, M.; GRITSANAPAN, W.; STUPPNER, H. Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant *Eleutherine americana* by RP-HPLC and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 990-993, 2008.

Disponível em: www.elsevier.com/locate/jpba Acesso em: 15 ago. 2008.

REEVES, G.; CHASE, M.W.; GOLDBLATT, P.; RUDALL, P.; FAY, M.F.; COX, A.V.; LEJEUNE, B.; CHIES, T.S. Molecular systemics of Iridaceae: Evidence from four plastid DNA regions. **American Journal of Botany**, v.88(11), nov. 2001, p. 2074-2087.

Disponível em:< www.botanicus.org/item/31753999990077> Acesso em: 12 set. 2008.

SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Revista Química Nova**. vol. 26 (3). São Paulo. Maio/Junho, 2003.

VALVERDE, M.I.; PERIAGO, M.J.; ROS, GASPA.; Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de nutrición**. Sociedad Latinoamericana de nutrición. v. 50, n^o 01, p. 5-18, 2000.

Disponível em: www.scielo.org/ve/scielo.php Acesso em: 26 ago. 2008.

VILLEGAS, L.F.; FERNANDEZ I.D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALETA, A.; VAISBERG, A.J.; HAMMOND, G.B. Evaluation of wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of ethnofarmacology**. n^o 55(3). p. 193-200, 1997.

Disponível em: www.elsevier.com/locate/jethpharm Acesso em 20 mar. 2008

WAGNER, H; BLADT, S. Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas. 2^a ed. Springer, p.275-279, 2001.

WENIGER, B.; BERRURIER, H.M.; ANTON, R. Plants of Haiti used as antifertility agents. **Journal of ethnofarmacology**. nº 6. p. 67-84, 1982.
Disponível em: www.elsevier.com/locate/jethpharm Acesso em 20 mar. 2008.

ZHENGXIONG, C.; HUIZHU, H.; CHENGRUI, W.; YUHU, L.; JIANMI, D.; SANKAWA, U.; NOGUCHI, H.; ITAKA, Y. Hongconin, a new naphthalene derivate from Hong-Cong, the rizome of *Eleutherine Americana* MERR. et HEYNE (Iridaceae). **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, nº. 07, p. 2743-2746, 1986.

Disponível em: www.journalarchive.jst.go.jp Acesso em 12 set. 2008.