

# **AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS, FLORES E FRUTOS DA *Aristolochia ssp.* ATRAVÉS DE RMN $^1\text{H}$ E DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS FRENTE A MICROORGANISMOS GRAM POSITIVOS E NEGATIVOS**

**Renata Santos RABELO (1); Juliana SERIO (2); Aristeu TININIS (3); Claudia Regina Cançado Sgorlon TININIS (4)**

(1) IFGoiano – Campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana Km 01, e-mail: renata\_santos\_rabelo@hotmail.com

(2) IFGoiano – Campus Rio Verde, Rodovia Sul Goiana Km 01, e-mail: juserio@hotmail.com

(3) IFSP – Campus Sertãozinho, Rua Américo Ambrósio 269, e-mail: aristeuif@yahoo.com.br

(4) IFSP – Campus Sertãozinho, Rua Américo Ambrósio 269, e-mail: sgorlonc@hotmail.com.br

## **RESUMO**

A *Aristolochia ssp.* é uma planta pertencente a família Aristolochiaceae, com vasto uso na medicina popular da qual foram obtidos extratos etanólicos de suas folhas, flores e frutos objetivando avaliação química dos constituintes majoritários de cada extrato por meio de RMN  $^1\text{H}$  e determinação de suas atividades antimicrobianas por meio da realização de testes de resistência a microorganismos Gram positivos e negativos. Os experimentos foram conduzidos conforme metodologias descritas na literatura, os resultados não evidenciaram atividade antimicrobiana dos extratos sendo este o motivo da não realização de mais ensaios para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CMI) e os sinais de RMN  $^1\text{H}$  sinalizaram compostos que indicam ramificações insaturadas, saturadas e oxigenadas e não evidenciam hidrogênios aromáticos.

**Palavras-chave:** RMN  $^1\text{H}$ , determinação antimicrobiana, metabólitos secundários.

## **1 INTRODUÇÃO**

As plantas medicinais, cujo uso tem sido propagado de geração a geração há milhares de anos vêm sendo utilizadas com finalidades terapêuticas graças ao desenvolvimento da química orgânica que possibilita a obtenção de substâncias puras através de técnicas de isolamento, o que viabiliza o estudo dos efeitos exercidos pelas plantas através do conhecimento sucinto da constituição de seus princípios ativos, que por sua vez são componentes químicos presentes em todos os órgãos das plantas, ou em partes específicas, que conferem às mesmas propriedades medicinais.

Os princípios ativos dos vegetais são moléculas de baixo peso molecular oriundas do metabolismo secundário dos vegetais que são produzidos como mecanismos de defesa da planta contra fatores externos, fatores ambientais e proteção contra predadores e patógenos, sendo este um dos motivos das variações na composição dos constituintes metabólicos de uma planta segundo origens e condições climáticas a que ela esta exposta.

A possibilidade de isolamento desses compostos promove o interesse pelo estudo de extratos vegetais oriundos de espécies com significativa utilização popular como as oriundas da família Aristolochiaceae pertence a sub-ordem Magnolianae, morfologicamente considerada uma das mais primitivas das angiospermas, distribuídas em todo o mundo, em diferentes zonas climáticas.

A família Aristolochiaceae é constituída por apenas sete gêneros (*Apama*, *Aristolochia*, *Asarum*, *Euglypha*, *Holostylis*, *Thottea* e *Saruma*) e cerca de 600 espécies, representadas em todas as regiões do globo terrestre, exceto no Ártico e Antártica. A distribuição não é uniforme e privilegia as zonas tropicais (HOENE, 1942; CORREA, 1984).

A literatura relata que o gênero *Aristolochia* apresenta entre seus constituintes 275 terpenóides, 57 lignóides, 167 alcalóides e alcalamidas e 99 derivados fenólicos (LOPES et al., 2001). Esta diversidade química contribui para diversas atividades farmacológicas.

Neste trabalho objetiva-se a avaliação química por meio por RMN  $^1\text{H}$  dos compostos oriundos da *Aristolochia ssp.* e a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos frente a microorganismos Gram positivos e negativos. A espécie que é fonte deste estudo se caracteriza como uma planta trepadeira, com folhas alternadas flor zigomorfa com perianto formando um grande papo, totalmente pintalgada em tons castanho-avermelhados mesclados com outras cores mais claras. A flor exala um odor característico que atrai insetos, possui frutos capsulares de aproximadamente 8 cm e é conhecida popularmente por papo-de-peru, cachimbo-de turco, mil-homens e jarrinha (FERRI, 1969).

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 Ressonância magnética nuclear

A espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica que se fundamenta no registro da interação da rádio frequência de um campo magnético (RAHMAN & CHOUDHARY, 1995). A ressonância magnética nuclear permite a observação de núcleos atômicos que possuam momentos magnéticos nuclear ou spin  $\neq 0$  (GIL & GERALDES, 1987).

Os parâmetros espectrais da RMN como os deslocamentos químicos, a constante de acoplamento spin-spin, os tempos de relaxação e de troca iônica, fazem com que a RMN seja uma técnica com aplicações bastante variadas. A RMN é usada na determinação estrutural de compostos orgânicos e inorgânicos, na qualificação e medida de difusividade da água em sistemas heterogêneos como alimentos e outros sistemas biológicos, a geração de imagens tomográficas de maneira não destrutiva, entre outras aplicações (LEYDEN & COX, 1997; SOLOMONS & FRYHKE, 2001; GUNASEKAREN, 2001).

Em outras palavras a espectroscopia de ressonância magnética nuclear é basicamente uma forma de espectrometria de absorção, semelhante à espectrometria de infravermelho ou de ultravioleta. Sob condições apropriadas em um campo magnético, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência governada pelas características estruturais de amostra.

O aparecimento em 1953 do primeiro espectrômetro comercial de RMN tornou possível utilizar RMN como técnica analítica. Os primeiros instrumentos usavam irmãos permanentes ou eletroímãs, com campos de 1.41, 1.87, 2.20 ou 2.35 correspondendo a 60, 80, 90 e 100 MHz, respectivamente, para a ressonância de hidrogênio (esta é a forma usual de descrição de um instrumento de RMN).

A necessidade de maior resolução e sensibilidade levou ao desenvolvimento de instrumentos de 200 a 500 MHz, hoje muito disseminados, e à produção de aparelhos de 600 a 1000 MHz de uso mais restrito. Todos os instrumentos acima de 100 MHz baseiam-se em magnetos supercondutores (solenóides) resfriados com hélio e operam no modo pulsado com Transformada de Fourier. Os outros requisitos básicos, a par dos valores de campo altos, são a estabilidade e a homogeneidade do campo de radiofrequência.

Na amostra diluída com solvente, neste trabalho utilizou-se clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) contido num tubo de vidro de 5 mm é colocada num compartimento de amostra ("probre"), neste compartimento estão as bobinas transmissora e receptora e um orifício de onde sai ar comprimido sobre o tubo, causando rotação em torno de seu eixo vertical, de modo a compensar heterogeneidades do campo magnético. O transmissor e o receptor estão interligados através dos núcleos da amostra os  $^1\text{H}$ , o espectro obtido por modo pulsado com transformada de Fourier (FT), é registrado com uma série de sinais cujas áreas são proporcionais ao número de hidrogênios que eles representam. As áreas dos picos são medidas por integrador eletrônico que traça uma linha em degraus cujas alturas são proporcionais as áreas dos picos. Em condições favoráveis é possível obter um espectro com qualidades da ordem de 1 $\mu\text{l}$  de um composto de fórmula molecular simples com emprego de um microtubo em um instrumento pulsado de 500 MHz (GIL & GERALDES, 1987).

O solvente ideal não deve conter hidrogênio e deve ser inerte, apolar, de baixo ponto de ebulição e de baixo custo. O clorofórmio deuterado satisfaz esses requisitos, é como os instrumentos pulsados dependem de deutério para efetuar e manter a calibração da frequência do campo ("lock"), usa-se o clorofórmio deuterado na maioria dos casos.

## 2.2. Núcleos de $^{13}\text{C}$ e $^1\text{H}$

Quanto aos núcleos, o de  $^{12}\text{C}$  não é magneticamente ativo (o número de spin,  $I$  é igual a zero), porém, o núcleo  $^{13}\text{C}$  da mesma forma que o núcleo  $^1\text{H}$ , tem número de spin  $1/2$ . Contudo com a absorbância isotópica de  $^{13}\text{C}$  é de somente 1,1% da de  $^{12}\text{C}$  e sua sensibilidade é de apenas 1,6% da de  $^1\text{H}$ , a sensibilidade total de  $^{13}\text{C}$  comparada à de  $^1\text{H}$  é de cerca de 1/5.700, apenas. Todos os núcleos possuem carga, em alguns casos a carga gira em torno do eixo nuclear gerando um dipolo magnético ao longo do eixo. O momento angular da carga em movimento pode ser descrito em termos do “número de spin”  $I$ , que pode assumir os valores de 0,  $1/2$ , 1,  $3/2$  etc. ( $I=0$  corresponde a um núcleo que não gira em torno de seu eixo). A magnitude do dipolo gerado é expressa em termos do momento magnético nuclear (GIL & GERALDES, 1987). Vários núcleos possuem um número de spin,  $I$ , de  $1/2$  ( $^1\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{19}\text{F}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) e, portanto, uma distribuição de carga esférica e uniforme. Entre estes, os mais amplamente utilizados na espectrometria de RMN são  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Os núcleos com número de spin,  $I$ , 1 ou maior do que 1, possuem número de distribuição de carga não esférica. Essa assimetria é descrita por um momento elétrico de quadrupolo, o qual afeta o tempo de relaxação, e conseqüentemente, o acoplamento com os núcleos vizinhos. Em termos quanto mecânicos, o número de spin,  $I$  é  $1/2$  com duas orientações possíveis em relação a um campo magnético externo uniforme e um pequeno excesso de população na orientação de menor energia.

## 2.3 Atividade antimicrobiana: relevância

O dramático aumento do índice de resistência aos agentes antimicrobianos disponíveis no mercado é um crescente problema de saúde pública (CHOPRA et al., 1996; BAQUERO, 1997). Tal fato compõe um cenário em que os constantes avanços dos conhecimentos científicos, médicos e tecnológicos ainda não impedem de forma eficaz a progressão das doenças infecciosas como causa mundial de morbidade e mortalidade de pessoas.

A constante demanda por novos agentes antimicrobianos tem estimulado a pesquisa de substâncias capazes de tratar as infecções resistentes aos agentes antimicrobianos disponibilizados atualmente no mercado, muitas vezes associada ao uso incorreto de antibióticos (MACHADO et al., 2003).

Microrganismos são conhecidos principalmente por sua capacidade genética intrínseca de adquirir resistência aos mais diversos agentes antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções, particularmente destacando-se as bactérias Gram-negativas. A membrana mais externa desses microrganismos constitui uma barreira de permeabilidade que dificulta a penetração de substâncias antimicrobianas polares e permite a passagem de produtos com caráter mais lipofílico (TEGOS, STERMITZ & LOMOVSKAYA, 2002).

As infecções bacterianas constituem atualmente um grande problema médico-social o que aumenta consideravelmente o interesse pela bacteriologia médica. O aumento significativo de pacientes portadores de imunodeficiências adquiridas (HIV-positivo) e induzidas (terapias imunossupressoras) contribui consideravelmente para a consolidação desse quadro (BURIK & MAGEE, 2001).

Com o aumento da prevalência de bactérias resistentes a muitas drogas, a busca por produtos naturais originados de plantas com potencial terapêutico oferece uma alternativa viável no combate às infecções de difícil tratamento (COWAN, 1999). Além disso, pesquisadores em diversos campos da ciência estão desenvolvendo estudos que visem a elucidação do potencial terapêutico presente nas plantas. O aspecto interdisciplinar dos grupos de estudo possibilita obtenção de produtos farmacológicos com maior rapidez e segurança por agilizar o desenvolvimento de cada etapa do estudo (AHMAD, AQIL & OWAIS, 2007).

## 3 METODOLOGIA

Para a preparação do extrato etanólico, o material vegetal foi coletado de quatro plantas no município de Cachoeira Alta – GO, Brasil, nas coordenadas  $18^\circ 45' 48''$  de latitude e  $50^\circ 56' 30''$  de longitude, em fevereiro de 2008.

Após a coleta, foi realizada a separação de flores, folhas e frutos, e posteriormente foi feita a limpeza das amostras em água corrente e trituração do material vegetal em moinho de facas Manesco & Ranieri tipo Willey. De cada órgão triturado obteve-se uma amostra de extrato etanólico do vegetal triturado.

As amostras foram mantidas em aparelho de ultra-som por quatro horas para facilitar a extração, após este processo o material foi filtrado e o etanol evaporado em capela. Cada amostra foi armazenada em um tubo de

ensaio em refrigerador a 5°C até a realização da análise em aparelho de RMN  $^1\text{H}$ , onde 30mg de cada amostra foi diluída em 0,7mL de clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ).

O aparelho de RMN utilizado foi um espectrômetro Varian Inova 500, operando a 500 MHz na frequência de  $^1\text{H}$ .

Para a realização do ensaio de resistência que visa determinar a atividade antimicrobiana dos extratos foi utilizado o método de difusão em disco (Método de Kirby-Bauer) aceito como método padrão para a realização de antibiogramas (VERMELHO et al., 2006)

Suspensões de *S. aureus* e *E. coli* foram preparadas em solução salina estéril e padronizada utilizando a escala de Mc Farland 0.5 (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1993), correspondendo à concentração de  $10^8$  Unidades Formadoras de Colônias, por mililitro (UFC/mL). Utilizando swab estéril, alíquotas dessa suspensão foram colocadas em placas de Petri, contendo ágar Müller-Hinton, previamente preparado.

Em cada placa foi colocado quatro discos de papel filtro estéril com 6,5 mm de diâmetro, previamente imergido por 24h em frascos âmbar, contendo os extratos etanólicos.

Todas as placas semeadas foram incubadas a 30°C por até 72 horas com observação diária para verificar a presença de halos de inibição em torno do disco de papel e confirmar ou não a resistência dos microrganismos frente aos extratos testados. O tamanho do halo de inibição serviu como parâmetro para indicar a maior ou menor suscetibilidade dos microrganismos aos extratos vegetais.

#### **4 DISCUSSÃO E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

As avaliações da atividade antimicrobiana demonstraram que os extratos das folhas, flores e frutos da *Aristolochia ssp.* não apresentaram atividade frente as cepas frente de *S. aureus* e *E. coli*, utilizadas neste experimento. Devido ao resultado negativo obtido não se realizou ensaios para cálculo da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Os sinais de RMN de  $^1\text{H}$  que por sua vez foram obtidos de acordo com as condições descritas no item de número 3 deste trabalho e encontram-se na Figura 01, e apresentam sinais relativos a compostos com ramificações insaturadas (0 a 2 ppm), saturadas (4 a 6 ppm) e oxigenadas (2,6 a 4.5 ppm).

Pode-se observar também a ausência de sinais representativos de hidrogênios aromáticos. A maior complexidade de sinais, que indicam uma maior e diferenciada quantidade de componentes foi observada no espectro obtido a partir das folhas.

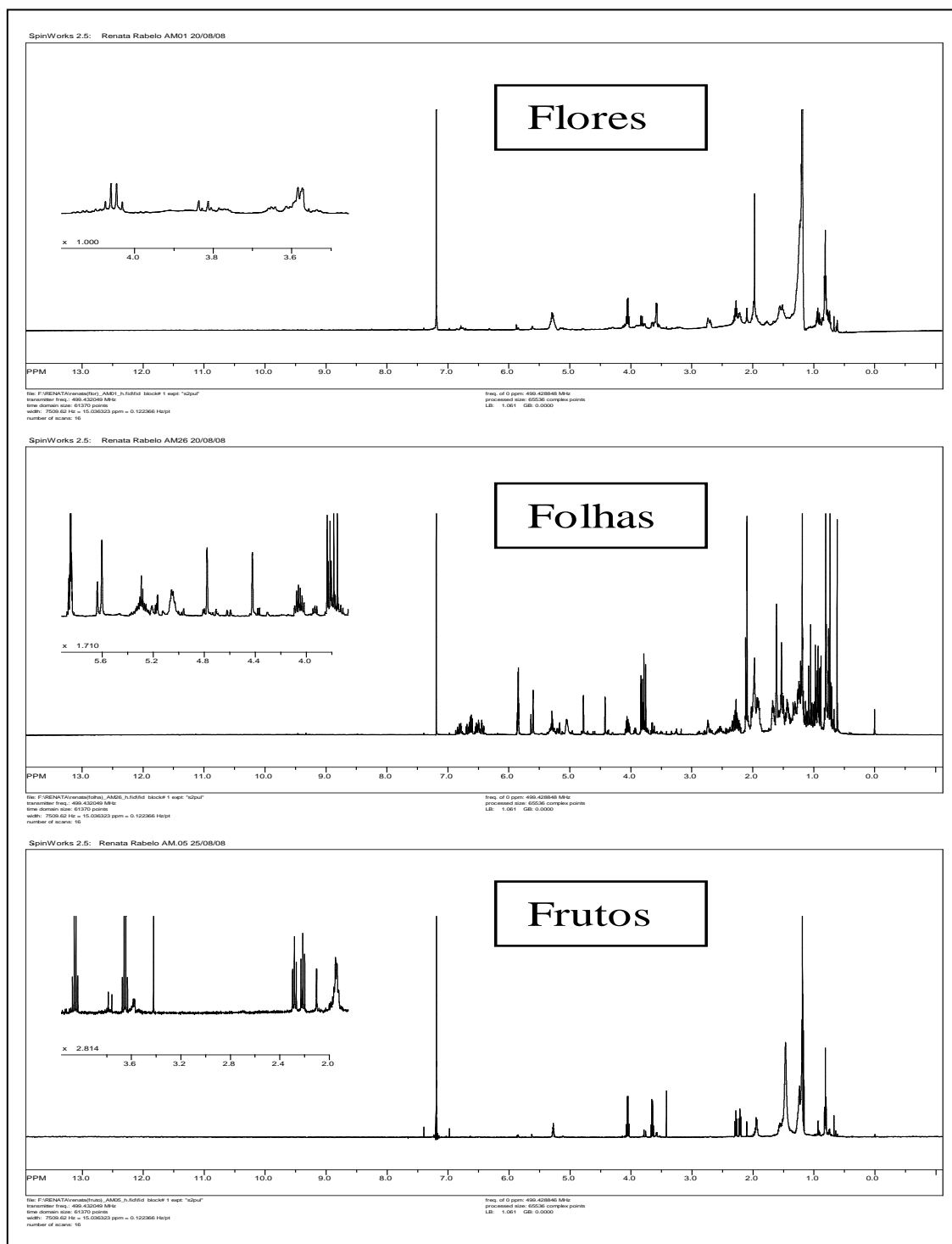


Figura 01 - Espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , obtidos a partir do espectrômetro INOVA 500, trabalhando a 500 MHz; solvente utilizado:  $\text{CDCl}_3$ , de flores, folhas e frutos da espécie vegetal selecionada.

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, I.; AQIL, F. & OWAIS, M. **Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs**. Germany: WILEY-VCH, 2007.

BAQUERO, F. **Gram-positive resistance: Challenges for the development of new antibiotics**. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 1997.

- BURIK, J. A. & MAGEE, P. **Aspects of fungal pathogenesis in humans.** Ann Review Microbiology, 2001. 743-772p.
- CHOPRA, I.; HODGSON, J.; METCALF, B. & POSTE, G. New approaches to the control of infections caused by antibiotic resistant bacteria. An Industry perspective. Journal of the American Medical Association. 1996.
- CORREA, MP. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas.** 1 ed. Rio de Janeiro: IBDF, 1984. Volumes: I, IV e V.
- COWAN, M. M. **Plants products as antimicrobials agents.** Clinical Microbiology Review. 1999. 564-582p.
- FERRI, M.G. **Plantas do Brasil - Espécies do cerrado.** 1 ed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda e Editora da Universidade de São Paulo, 1969.
- GIL, V. M.S. , GERALDES, C. F. G. C. **Ressonância magnética nuclear: Fundamentos métodos e aplicações.** Lisboa: Fundação Calouste, 1987.
- GUNASEKAREN, S. **Non destrutive food evalution: Techníques to analyse properties and quality.** New York: M. Dekker, 2001.
- HOENE, F.C. **Flora Brasílica.** 1 ed. São Paulo: Graphicars, 1942.
- LEYDEN, D. E.; COX, R. H. **Analytical applications of NMR.** NewYork: Interscience Publication, 1997. Volume 48, 256-271p.
- LOPES, L. M. X., NASCIMENTO, I. R., SILVA, T. 2001. Phytochemistry of the Aristolochiaceae family. *In: RESEARCH ADVANCES IN PHYTOCHEMISTRY.* Kerala: Global Research Network, 2001. Volume 2, 19-108p.
- MACHADO, T. B.; PINTO, A. V.; PINTO, M. C. F. R; LEAL, I. C. R.; SILVA, M. G.; AMARAL, A. C. F.; KUSTER, R. M. & NETO-dos-SANTOS, K. R. In vitro activity of Brazilian medicinal plants, naturally occurring naphtoquinones and their analogues, against methicillin-resistant Staphylococcus aureus. International Journal of Antimicrobial Agents. 2003.
- RAHMAN, A. U.; CHOUDHARY, M. **Solving problems with NMR spectroscopy.** California: Academic Press, 1995.
- SOLOMONS, T. W. G., FRYHKE, C. B. **Química Orgânica 1.7** ed. Rio de Janeiro: LTC, 2001.
- TEGOS, G.; STERMITZ, F. R. & LOMOVSKAYA, O. **Multidrug pump inhibitor uncover remarkable activity of plant antimicrobials.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2002. 3133-3141p.
- VERMELHO, A.B.; PEREIRA, A.F.; COELHO, R.R.R.; SOUTO-PADRÓN, T. **Praticas de Microbiologia.** 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006. 204p.