

# Isolamento de compostos com atividade antibacteriana em *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae)\*

## Isolation of compounds with antibacterial activity from *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae)

Luiz Mário da Silva Silveira<sup>1</sup> & Roberto Sigfrido Gallegos Olea<sup>2</sup>

**RESUMO** – O presente trabalho descreve o isolamento e a caracterização estrutural de dois compostos isolados de fração polar de partes aéreas de *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae), coletada em São Luís-MA. O fracionamento biomonitorado permitiu verificar atividade antibacteriana em frações polares, frente cepas padrão de bactérias. A caracterização fitoquímica das frações ativas revelou uma como sendo uma mistura de esteróides hidroperóxidos e a outra como a 3-metoxissacarose. Os resultados obtidos dos ensaios biológicos reforçam o emprego popular dessa planta, utilizada com frequência pela população.

**PALAVRAS-CHAVE** – *Alternanthera tenella*, atividade antibacteriana, hidroperóxidos, 3-metoxissacarose.

**SUMMARY** – This work describes the isolation of two fractions from polar extract of aerial parts of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) with antibacterial activity collected in São Luís – Ma. The guided chromatographic fractionation of polar extract allowed verifying in vitro activity against standard bacteria strains. The phytochemical characterization of the active fractions obtained revealed hydroperoxysteroids mixture and methyl sucrose. The results obtained from aerial parts of *Alternanthera tenella* Colla validate the popular employment of this plant, used frequently by population.

**KEYWORDS** – *Alternanthera tenella*, antibacterial activity, hydroperoxysteroids, methyl sucrose.

### INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais na cura e alívio de diversos estados patológicos remonta a passagem de antigas civilizações. Dados arqueológicos e históricos atestam que nestes tempos iniciais as plantas tinham um papel crucial na manutenção do bem-estar do homem. A modernização das civilizações tornou também o uso de plantas mais ordenado, visto que o tratamento baseava-se na observação dos efeitos das plantas (CHEVALIER<sup>6</sup>).

O avanço científico na área química-farmacêutica possibilitou o isolamento e síntese de um grande número de substâncias biologicamente ativas e viáveis. A industrialização, por sua vez, possibilitou a produção em larga escala dessas substâncias ativas.

Entretanto, apesar do grande número de medicamentos existentes no mercado, a população de um modo geral não aboliu o uso de produtos ditos naturais (oriundos da fauna e flora) para a cura ou alívio de seus males, quer seja na forma de chás ou aqueles produtos obtidos no comércio que passou por algum tipo de processamento. Segundo CHADWICK & MARSH<sup>7</sup>, cerca de 80% da população dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento é quase completamente dependente da medicina caseira.

Somente nas últimas décadas é que o gênero *Alternanthera* vem recebendo a atenção dos pesquisadores. A literatura registra a existência de mais de 60 espécies de *Alternanthera*, distribuídas nas zonas tropicais e temperadas. Entretanto, somente poucas espécies foram estudadas em seus aspectos químicos e biológicos.

No Maranhão, a espécie *Alternanthera tenella* Colla (família Amaranthaceae), conhecida como enxuga, perpétua do mato ou apaga-fogo, é utilizada na medicina popular, na forma de infuso, no tratamento de leucorréia vaginal. Registros populares indicam que essa planta tem também sido utilizada por via oral, na forma de chás, no tratamento de inflamações, infecções e outras afecções (BIELLA & *et al.*<sup>2</sup>; REGO<sup>16</sup>; SALVADOR & *et al.*<sup>17</sup>).

GUERRA & *et al.*<sup>10</sup> encontraram significativa atividade imunomoduladora em partes aéreas de *Alternanthera tenella* Colla. SALVADOR & *et al.*<sup>18</sup> isolaram seis flavonóides com marcada ação antioxidante. SILVEIRA<sup>20</sup> encontrou, em fração polar da planta, atividade antibacteriana.

Neste trabalho, espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de fração polar foram obtidos com o objetivo de se caracterizar as classes de substâncias presentes em fração polar de partes aéreas de *Alternanthera tenella* Colla.

Aceite em 04/6/2009

\*Trabalho realizado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

<sup>1</sup>Professor Assistente do Departamento de Farmácia da UFMA.

<sup>2</sup>Professor Titular do Departamento de Química da UFMA.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e identificação do material botânico

Partes aéreas de *Alternanthera tenella*, formada por caule e folhas, foram coletadas no Horto Comunitário Jambeiro, Município de São Luís-MA. As amostras coletadas foram identificadas no Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém – PA. Uma exsicata da planta encontra-se depositada no Herbário Ático Seabra – Universidade Federal do Maranhão, sob o n° 1.160.

### Obtenção dos extratos

As partes aéreas do espécime em estudo (6,5kg) foram colocadas para secar em local fresco e arejado, à temperatura ambiente, por duas semanas. Após esse período, foram colocadas em estufa a 40°C por 24h, sendo posteriormente trituradas em moinho elétrico.

O pó obtido (735,0 g) foi macerado a frio com metanol, efetuando-se 5 extrações, a cada 24h. As soluções foram concentradas sob pressão reduzida, resultando em material de cor verde escuro.

### Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana do extrato e frações de *Alternanthera tenella* Colla foi realizada pelo método de difusão em ágar para acompanhamento cromatográfico (ALVES & *et al.*<sup>1</sup>). Poços de 10mm de diâmetro foram realizados e diferentes concentrações das frações foram aplicadas nos poços do meio de Ágar Mueller Hinton (Difco) previamente semeado com uma suspensão padronizada de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 0598099 e *Aeromonas hydrophyla* ATCC 7966. As placas de Petri semeadas foram então incubadas em estufa a 37°C durante 24h. A presença de um halo de inibição de crescimento na superfície da placa ao redor do poço era indicativa de atividade antibacteriana. A leitura do halo foi feita descontando-se o diâmetro do poço. Como controle foi utilizado cloranfenicol (Farmitália Carlo Erba, 30µg/mL). O procedimento de atividade antibacteriana foi efetuado para orientar o fracionamento cromatográfico do extrato.

### Fracionamento cromatográfico

Os fracionamentos cromatográficos em coluna (CC) foram realizados empregando-se como adsorventes sílica gel 60 (0,063-0,200mm) Merck e Sephadex LH-20 Sigma. As frações resultantes dos fracionamentos foram acompanhadas por biomonitoramento para atividade antibacteriana.

As cromatografias em camada delgada comparativa (CCDC) e preparativa (CCDP) foram realizadas utilizando-se sílica gel G 60 e sílica gel PF254, respectivamente, ambas da Merck e alumina (aluminium oxide 150 PF254 Type T) da Merck. A espessura da camada da fase estacionária foi de 0,25mm (comparativa) e 1,00mm (preparativa), sendo que todas as placas cromatográficas utilizadas foram preparadas no próprio laboratório, exceto as placas de alumina, obtidas prontas.

A revelação das substâncias em CCDC foi feita com vapores de iodo ou solução de benzidina 0,2%, marca Merck. Os cromatogramas borrifados com a solução de benzidina foram aquecidos em estufa à 100°C entre 15-20min. As manchas correspondentes aos carboidratos revelaram-se alaranjadas nestas condições.

Na CCDP utilizaram-se irradiações na região do ultravioleta em 254 e 365nm. A recuperação das substâncias após separação por CCDP foi feita por extração com metanol, que eram colocadas em dessecador até eliminação do solvente.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de prótio (RMN de 1H) e de carbono 13 (RMN de 13C) foram registrados em espectrômetros Bruker modelo Avance DPX-300 e modelo Avance DRX-500, pertencentes ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAURIM), da Universidade Federal do Ceará, operando na frequência do prótio a 300MHz e 500MHz e frequência do carbono 13 a 125 MHz. O clorofórmio e metanol deuterados foram utilizados como solventes.

### Obtenção da fração polar

O extrato metanólico de partes aéreas de *Alternanthera tenella* foi concentrado, obtendo-se massa de 56,5g, e particionado em clorofórmio-água, na proporção 2:1, obtendo-se frações clorofórmica e aquosa correspondentes.

Após a obtenção do extrato metanólico bruto e das frações oriundas da partição, realizou-se estudo biomonitorado do extrato e das frações obtidas. O biomonitoramento, através dos ensaios microbiológicos, foi empregado a fim de se caracterizar a fração ou frações responsáveis pela atividade biológica.

A solução aquosa resultante da partição do extrato metanólico bruto foi concentrada em rotaevaporador, até o volume de 100,0mL. A este volume foi adicionado 200,0mL de n-butanol. Após a concentração obteve-se uma fase butanólica e um sólido separado após filtração, formando assim o Resíduo 1. O biomonitoramento das duas frações mostrou resultado positivo para atividade antibacteriana.

Após sucessivas cromatografias em camada delgada preparativa da fração butanólica, obteve-se uma fração bioativa denominada FP-4.

O Resíduo 1 foi ressuspenso em metanol, concentrado e novamente filtrado, fornecendo novo resíduo e o filtrado metanólico, chamado filtrado metanólico 1 (FM-1). Este, por sua vez, foi mais uma vez concentrado e filtrado, gerando um terceiro resíduo e filtrado metanólico 2 (FM-2).

A FM-2 foi submetida à coluna Sephadex LH-20, por se tratar de fração bastante polar, fornecendo 7 frações, sendo porém, somente a primeira fração (SF-1) significativa em termos de massa. Desta, após sucessivas cromatografias em camada delgada preparativa, foi obtida uma nova fração bioativa, denominada FP-5.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas medicinais apresentam propriedades as mais diversas segundo as substâncias que as mesmas apresentam. A flora medicinal brasileira é rica neste aspecto, visto apresentar biodiversidade admirável, com inúmeras plantas com comprovadas propriedades medicinais.

Dessa forma, a pesquisa de atividade antibacteriana em *Alternanthera tenella* não foi feita ao acaso, mas sim em vista de sua larga utilização na medicina popular como planta com propriedade antileucorréica e ainda tendo sido atribuída propriedade antiinflamatória.

Neste estudo, utilizou-se o método de difusão em ágar, através da técnica de poço, para a determinação das subfrações ativas.

Em referências bibliográficas sobre atividade antimicrobiana de extratos de plantas ou suas frações (BRANDÃO<sup>3</sup>; DAVINO<sup>7</sup>; GIESBRECHT<sup>9</sup>; NASCIMENTO & *et al.*<sup>15</sup>; VALGAS & *et al.*<sup>21</sup>), observa-se uma seleção ampla de microrganismos empregados, sejam eles patogênicos ou não. Em estudo de atividade antibacteriana, via de regra dá-se preferência para no mínimo uma bactéria Gram-positiva e uma Gram-negativa, geralmente *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente. Além dessas duas cepas bacterianas, utilizou-se também *Aeromonas hydrophilla* e *Pseudomonas aeruginosa*.

As concentrações de extratos e/ou frações de plantas empregadas para os ensaios de atividade *in vitro* contra microrganismos variam na ordem de µg/mL a mg/mL. As concentrações adotadas neste estudo, para a determinação da atividade antibacteriana da FP-4 foram as seguintes: 1,0; 5,0; 10; 20; 40; 60mg/mL. O estabelecimento das concentrações empregadas foi decorrente de ensaios preliminares (Tabela I).

**TABELA I**  
Determinação de atividade antibacteriana da FP-4 de *Alternanthera tenella* frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelo método de difusão em ágar

Microrganismos	Concentração (mg/mL)						Antibiótico <sup>a</sup>	Solvente <sup>b</sup>
	1,0	5,0	10,0	20,0	40,0	60,0		
	Diâmetro da zona de inibição (mm)							
<i>S. aureus</i>	-	-	-	6,0	9,0	11,0	14,0	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	4,0	7,0	9,0	12,0	-
<i>A. hydrophilla</i>	-	-	-	8,0	12,0	13,0	10,0	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	6,0	11,0	17,0	19,0	26,0	13,0	-

Os resultados são dados pela média dos diâmetros ( $n^3 5$ ) dos halos de inibição em milímetros. Desvio padrão pouco significativo.

<sup>a</sup>=cloranfenicol (30,0 mg/mL)

<sup>b</sup>=água deionizada estéril

-=não houve inibição

De acordo com os resultados expressos na Tabela I, pode-se observar intensa atividade *in vitro* da FP-4, com os menores valores de atividade antibacteriana variando de 5 a 20mg/mL, contra os vários microrganismos testados.

A menor concentração obtida para a FP-4 contra *P. aeruginosa* foi significativamente menor em relação às outras bactérias testadas, encontrando-se halo de inibição de 6,0mm. A maior capacidade inibitória sobre *P. aeruginosa* reveste-se de importância singular, visto que poucos são os fármacos ativos contra essa espécie bacteriana.

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H da fração polar (FP-4) apresentou uma feição que pode ser caracterizada como correspondente ao de saponinas. Mostrando sinais em campo alto, entre aproximadamente 0,8 e 2,5ppm, característico de porções terpenoidais; sinais também entre aproximadamente 3,1 e 3,8ppm, faixa própria de hidrogênios carbinólicos, portanto de unidades glicosídicas; e finalmente alguns sinais em campo mais baixo, característicos de hidrogênios em carbonos insaturados e de hidrogênios anoméricos.

A análise dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C e DEPT-135 dessa fração revelaram 90 sinais de deslocamentos químicos de carbonos ( $\delta^{13}C$ ), mostrando tratar-se de mistura de

compostos de natureza esteroidal/triterpenoidal. Esses deslocamentos químicos, com variação de  $\pm 1$ ppm, concordaram com aqueles observados em derivados 4 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dimetilcolesta-8-en-3 $\beta$ -ol.

A cadeia lateral foi determinada com base nas informações de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C. Sinais de hidrogênio de metila (H<sub>3</sub>-27) em  $\delta^1H$  1,72 e sinais para hidrogênios na faixa de 5,04 (H<sub>3</sub>-26) revelaram presença de carbono vinílico (C-26,  $\delta^{13}C$  114,5). O deslocamento químico do carbono C-24, em  $\delta^{13}C$  89,0, sugeriu a presença de um grupamento hidroperóxido, como observado na Figura 1, 1a.

O espectro de RMN de <sup>13</sup>C revelou ainda a presença de um sinal em  $\delta^{13}C$  110,7, relacionado a C-26, também de natureza vinílico, sustentando a possibilidade de presença de um derivado estruturalmente relacionado à Figura 1, 1a. Todavia, o deslocamento químico em  $\delta^{13}C$  76,7, relacionado ao carbono C-24, indicaria a presença de um substituinte hidroxila, como observado na Figura 1, 1b.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C observou-se ainda sinais de deslocamentos químicos que se mostraram compatíveis com um composto isômero ao apresentado na Figura 1, 1a. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H desse composto (Figura 2, 2a) apresentou dois grupos metílicos equivalentes (6H) em  $\delta^1H$  1,34, indicando H<sub>3</sub> em C-26 e C-27.

A partir do espectro de RMN de <sup>13</sup>C percebeu-se ainda deslocamento químico de  $\delta^{13}C$  139,9, referente a C-24. Este sinal, juntamente com C-23 ( $\delta^{13}C$  125,1) formaria a dupla olefínica correspondente a outro composto (Figura 2, 2b).

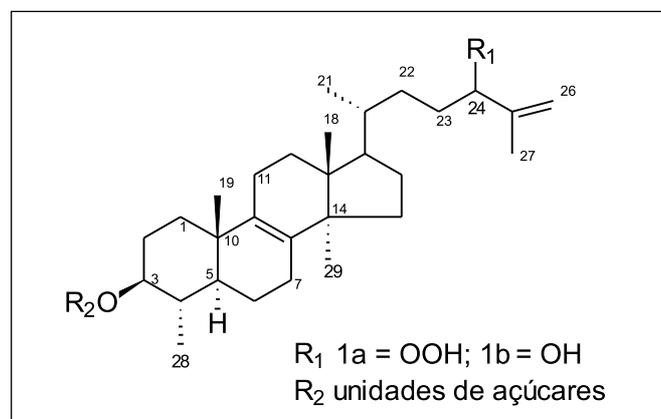


FIG. 1 - Estruturas de derivados 24-hidroperoxi- e 24-hidroxi-4 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dimetilcolesta-8,25-dien-3 $\beta$ -ol.

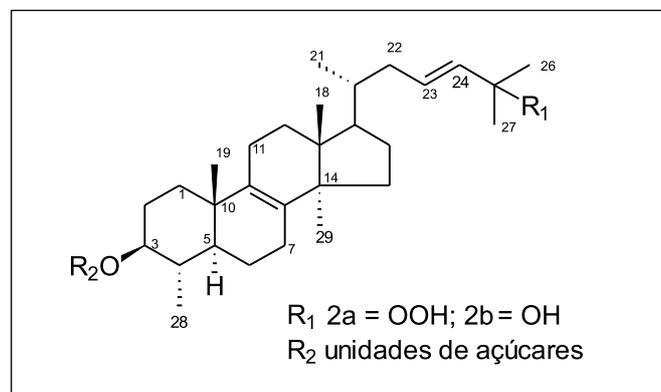


FIG. 2 - Estruturas de derivados 25-hidroxi-peroxi- e 25-hidroxi-4 $\alpha$ ,14 $\alpha$ -dimetilcolesta-8,24-dien-3 $\beta$ -ol.

Na Tabela II encontram-se relacionados os valores de deslocamentos químicos do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  referentes aos compostos 1a, 1b, 2a e 2b.

**TABELA II**  
Deslocamentos químicos observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  atribuídos aos compostos 1a, 1b, 2a e 2b, obtidos da fração FP-4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 125 MHz)

Multiplicidade	$\delta^{13}\text{C}$	(1a)	(1b)	(2a)	(2b)
CH	139,9				C-24
C	134,7	C-8	C-8	C-8	C-8
CH	134,5			C-24	
CH	130,2			C-23	
CH	125,1				C-23
$\text{CH}_2$	114,5	C-26			
$\text{CH}_2$	110,7		C-26		
CH	88,9	C-24			
CH	76,7		C-24		
CH	76,6	C-3	C-3	C-3	C-3
CH	51,1	C-17	C-17	C-17	C-17
CH	47,1	C-5	C-5	C-5	C-5
C	44,8	C-13	C-13	C-13	C-13
C	41,3	C-4	C-4	C-4	C-4
$\text{CH}_2$	38,6			C-22	C-22
C	36,5	C-10	C-10	C-10	C-10
C	31,7	C-23	C-22		
CH	31,3		C-23		
$\text{CH}_2$	28,7	C-16	C-16	C-16	C-16
$\text{CH}_2$	28,6	C-7	C-7	C-7	C-7
$\text{CH}_2$	27,3	C-22			
$\text{CH}_2$	25,9	C-12	C-12	C-12	C-12
$\text{CH}_3$	24,5	C-29	C-29 C-29	C-26	C-29
$\text{CH}_3$	24,3			C-27	
$\text{CH}_2$	21,8	C-11	C-11	C-11	C-11
$\text{CH}_2$	21,1	C-6	C-6	C-6	C-6
$\text{CH}_3$	17,1	C-27	C-27		
$\text{CH}_3$	15,6	C-18	C-18	C-18	C-18
$\text{CH}_3$	15,1	C-28	C-28	C-28	C-28

$\text{CD}_3\text{OD}$  – metanol deuterado

Esteróides hidroperóxidos já foram descritos na literatura. SHEU & *et al.*<sup>19</sup>, estudando *Turbinaria ornata*, uma espécie de alga encontrada na China, registraram a ocorrência de compostos esteroidais do tipo hidroperóxidos, que mostraram significativo efeito citotóxico contra vários tipos de células cancerosas. Resultados igualmente importantes foram descritos por KATO & *et al.*<sup>13</sup>, que relataram a existência de hidroperoxiesteróides em partes aéreas de

*Xanthosoma robustum*, destacando esses autores potente atividade antibacteriana dos compostos isolados. Os resultados espectroscópicos encontrados para a FP-4, que estreitamente relacionaram-se aos compostos descritos por KATO & *et al.*<sup>13</sup>, corroboraram os efeitos biológicos encontrados em partes aéreas de *Alternanthera tenella*, visto que se detectou atividade antibacteriana significativa na fração FP-4.

A FP-5 apresentou comportamento de inibição frente às bactérias padrões utilizadas muito semelhantes ao observado para a FP-4, diferindo, no entanto, nas concentrações necessárias para obter maior efetividade antibacteriana.

Neste trabalho, as concentrações utilizadas para a atividade antibacteriana de FP-5 foram 10,0; 20,0; 40,0; 80,0; 120,0 e 150,0mg/mL (Tabela III). Igualmente como explicado para a FP-4, o estabelecimento das concentrações empregadas baseou-se em ensaios realizados anteriormente.

**TABELA III**  
Determinação de atividade antibacteriana da FP-5 de *Alternanthera tenella* frente as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pelo método de difusão em ágar

Microrganismos	Concentração (mg/mL)						Antibiótico <sup>a</sup>	Solvente <sup>b</sup>
	10,0	20,0	40,0	80,0	120,0	150,0		
	Diâmetro da zona de inibição (mm)							
<i>S. aureus</i>	-	-	-	6,0	8,0	12,0	14,0	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	4,0	5,0	12,0	-
<i>A. hydrophilla</i>	-	-	-	9,0	11,0	14,0	10,0	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	10,0	16,0	19,0	21,0	25,0	13,0	-

Os resultados são dados pela média dos diâmetros ( $n^{\circ} 5$ ) dos halos de inibição em milímetros. Desvio padrão pouco significativo.

<sup>a</sup> = cloranfenicol (30,0 mg/mL)

<sup>b</sup> = água deionizada estéril

- = não houve inibição

Como se pode observar, a FP-5 também produziu significativa atividade *in vitro* sobre as bactérias testadas, com valores de atividade variando de 20 a 120mg/mL. As concentrações inibitórias encontradas nesta fração foram superiores às obtidas para a FP-4. Mais uma vez, como já descrito para a FP-4, a FP-5 revelou maior potencial inibitório sobre a espécie *P. aeruginosa*.

Assim, os resultados de atividade antibacteriana encontradas para as frações FP-4 e FP-5 mostraram-se promissores, pois, embora se observasse diferença nas concentrações de bioatividade.

A caracterização do componente mais abundante da fração FP-5 foi inicialmente deduzida a partir da sua alta polaridade, a qual foi solúvel unicamente em metanol. A presença de açúcares é um fato de ocorrência comum nas frações mais polares das plantas. Posteriormente, a análise dos espectros de RMN registrados permitiu caracterizar a estrutura do componente mais abundante na fração FP-5. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observou-se um acúmulo principal de sinais na faixa entre 3,25 e 4,10ppm, região característica de hidrogênios carbinólicos, o que sugeriu fortemente a presença de açúcar, e o sinal em  $\delta^1\text{H}$  5,37 pode ser correspondente a um hidrogênio anomérico, caracteristicamente mais desprotegido. Os outros sinais em campo alto são notoriamente impurezas, provavelmente correspondentes a substâncias graxas dada a feição espectral exibida.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  totalmente desacoplado se diferenciou claramente 13 sinais mais intensos os quais corresponderiam ao componente mais abundante da fração. Através do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  – DEPT 135 pode-se definir as multiplicidades dos átomos de carbono que geram esses sinais, correspondendo a:  $\delta$   $^{13}\text{C}$  53,98 ( $\text{CH}_3$ ); 62,28 ( $\text{CH}_2$ ); 63,58 ( $\text{CH}_2$ ); 64,11 ( $\text{CH}_2$ ); 71,35 ( $\text{CH}$ ); 73,05 ( $\text{CH}$ ); 74,49 ( $\text{CH}$ ); 74,71 ( $\text{CH}$ ); 75,84 ( $\text{CH}$ ), 79,42 ( $\text{CH}$ ); 83,82 ( $\text{CH}$ ), 93,74 ( $\text{CH}$ ) e 105,40 ( $\text{C}$ ). A técnica DEPT 135 é particularmente útil porque permite diferenciar carbonos metílicos ( $\text{CH}_3$ ), metilênicos ( $\text{CH}_2$ ) e metínicos ( $\text{CH}$ ).

O valor de  $\delta^{13}\text{C}$  53,98 é característico de grupamento metoxila ( $-\text{OCH}_3$ ), indicando a presença desta unidade na substância em estudo. A presença dos restantes 12 sinais, portanto 12 átomos de carbono, a existência de um carbono quaternário em  $\delta^{13}\text{C}$  105,40 ( $\text{C}$ ) e a presença de apenas um carbono anomérico em  $\delta^{13}\text{C}$  93,74 ( $\text{CH}$ ) levou à indicação da presença de um açúcar dimérico (um dissacarídeo) com um grupamento metoxila substituindo um dos grupamentos hidroxila.

Por ser a sacarose um dos dissacarídeos de ocorrência mais comum em plantas, foi realizada uma cromatografia em camada delgada comparativa com a sacarose como padrão e a fração FP-5, sendo o comportamento cromatográfico em camada delgada da fração FP-5 similar ao obtido por uma solução padrão de sacarose, com Rf de 0,77.

Os resultados espectroscópicos encontrados para essa fração concordaram com o descrito por LEVI & et al.<sup>14</sup>, que relataram que em RMN de  $^{13}\text{C}$  todos os átomos de carbono de açúcares ressonam entre duas faixas relativamente estreitas, entre  $\delta^{13}\text{C}$  60-80 e 90-105ppm, esta última para os carbonos anoméricos.

A análise dos espectros e a posterior comparação dos dados de RMN de  $^{13}\text{C}$  com dados existentes na literatura para a sacarose (Tabela IV) permitiu caracterizar a FP-5 como sendo uma metoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo (metoxisacarose).

**TABELA IV**  
Atribuições de RMN de  $^{13}\text{C}$  de metoxisacarose (FP-5, 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) e sacarose (75 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ ; HAYAMIZU & et al., 1999)

C	Multiplicidade	FP-5	Sacarose	(FP-5 – Sacarose)
C-1	$\text{CH}_2$	63,58	62,46	1,12
C-2	C	105,40	104,71	0,69
C-3	CH	79,42	77,51	1,91
C-4	CH	75,84	75,09	0,75
C-5	CH	83,82	82,42	1,40
C-6	$\text{CH}_2$	64,11	63,44	0,67
C-1'	CH	93,74	93,20	0,54
C-2'	CH	74,49	73,44	1,05
C-3'	CH	74,71	73,68	1,03
C-4'	CH	71,35	70,31	1,04
C-5'	CH	73,05	72,14	0,91
C-6'	$\text{CH}_2$	62,28	61,24	1,04
	$\text{OCH}_3$	53,98		

$\text{CD}_3\text{OD}$  – Metanol deuterado;  $\text{D}_2\text{O}$  – água deuterada

BREITMAIER & VOELTER<sup>4</sup> relatam que a metilação de uma hidroxila em carboidratos produz uma modificação do deslocamento químico desse carbono ( $\text{C}-\alpha$ ) para campo baixo, na ordem de 4,5ppm. O sinal dos carbonos vizinhos ( $\text{C}-\beta$ ) deslocam-se na mesma direção, cerca de 0,9ppm. Alterações nos carbonos  $\text{C}-\gamma$  também acontecem, todavia estes se deslocam para campo alto, em intensidade bastante baixa, entre 0,3 a 0,5ppm.

Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  da FP-5 foram obtidos em  $\text{CD}_3\text{OD}$ . No entanto, os dados obtidos da literatura registram (HAYAMIZU & et al.<sup>11</sup>) deslocamentos químicos em  $\text{D}_2\text{O}$ , observando-se, por conta da utilização de solventes distintos, variação em aproximadamente 1ppm nos valores obtidos, sendo que os sinais de  $^{13}\text{C}$  da FP-5 foram deslocados para campo mais baixo do espectro.

A determinação exata da posição da função metoxila na molécula isolada não foi possível, visto que os valores de deslocamento químico não se comportaram como previsto por BREITMAIER & VOELTER<sup>4</sup>. Tal fenômeno aconteceu possivelmente pelo emprego de solvente diferente do utilizado por esses autores. O efeito da metilação da sacarose em  $\text{CD}_3\text{OD}$  mostrou variação de deslocamento químico do carbono C-a em proporção bem menor, aproximadamente 1,0 ppm, não percebendo-se alteração significativa para os carbonos C- $\beta$  e C- $\gamma$ .

HORNAK<sup>12</sup> registrou que a posição das linhas de absorção espectral pode ser dependente do solvente empregado. Isto acontece em grande parte devido às variações na polaridade e constante dielétrica dos solventes, produzindo a metilação efeitos diversos ao esperado segundo BREITMAIER & VOELTER<sup>4</sup>.

Contudo, os demais carbonos na molécula da sacarose não são afetados pelo efeito da metilação e, através dessa observação pode-se fazer proposta de localização da metoxila na molécula isolada da FP-5.

De acordo com o observado anteriormente, a metoxisacarose, em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , mostrou sinais de deslocamento químico aproximadamente 1ppm a mais ao registrado para a sacarose em  $\text{D}_2\text{O}$ . Comparando-se os dados registrados na literatura (HAYAMIZU & et al.<sup>11</sup>) e o encontrado na FP-5, pôde-se observar tendência constante na variação de deslocamento químico nos carbonos da FP-5, exceto no carbono C-3.

A maior diferença de deslocamento químico observado em carbono C- $\alpha$  é explicado pelo fato de carbonos ligados a grupos metoxilas ressonarem em campo mais baixo do que átomos ligados a grupos hidroxila livres. Neste caso, percebe-se que o deslocamento para campo baixo foi notoriamente maior no carbono C-3, podendo-se propor, dessa forma, a metoxilação no carbono C-3 da molécula da sacarose.

A Figura 3 mostra a estrutura da 3-metoxi- $\alpha$ -D-glicopiranosil- $\beta$ -D-frutofuranosídeo (3-metoxisacarose).

A sacarose é carboidrato não redutor. A reação de Fehling realizada na FP-5 forneceu resultado positivo, o que poderia ser explicado pela presença de resíduo de açúcares redutores na fração, evidenciado por sinais menos intensos no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ .

Atividade antibacteriana para sacarose já tem sido extensivamente relatado na literatura (FLORENCE & ATTWOOD<sup>8</sup>). Estes autores enfatizam que quando a solução aquosa no ambiente de um microrganismo é concentrada pela adição de sacarose, as consequências para o cresci-

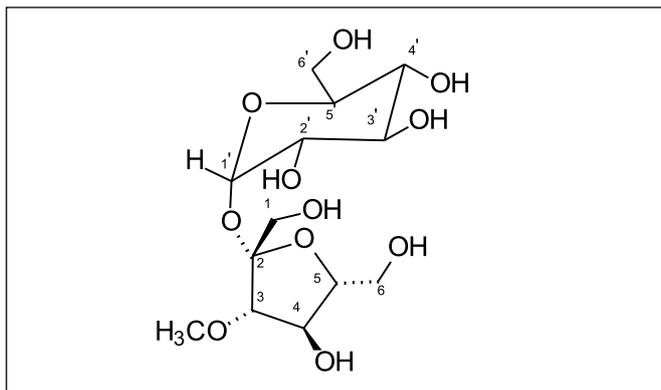


FIG. 3 - Estrutura da 3-metoxissacarose.

mento microbiano devem-se principalmente à mudança de atividade da água, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas tais como *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia coli*, *Corynebacterium*, *Clostridium perfringens* e *Pseudomonas*.

A metoxissacarose, composto principal da FP-5, como apresentado anteriormente, manifestou importante atividade inibitória nos ensaios de biomonitoramento.

Os resultados acima apresentados estão de acordo com a utilização popular da planta, podendo-se destacar significativa atividade antibacteriana *in vitro* encontrada contra várias cepas bacterianas de interesse em medicina humana. Assim, a base terapêutica de extratos dessa planta repousaria no princípio de eliminação e/ou limitação de bactérias patogênicas à mucosa vaginal, favorecendo a multiplicação de lactobacilos e, conseqüentemente, o restabelecimento do padrão normal da microbiota vaginal.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a valiosa colaboração dos pesquisadores do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUIM), da Universidade Federal do Ceará, pelo apoio na obtenção dos espectros de RMN.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, T.M.A. & *et al.* Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 367-373, 2000.
- BIELLA, C.A. & *et al.* Evaluation of immunomodulatory and anti-inflammatory effects and phytochemical screening of *Alternanthera tenella* Colla (Amaranthaceae) aqueous extracts. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(6): 569-577, 2008.

- BRANDÃO, G.C. *Isolamento biomonitorado de substâncias antimicrobianas de Polygonum spectabil Mart e determinação da CIM para uma chalcona antimicrobiana*. 2004. 194p. Tese de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas UFMG, Belo Horizonte.
- BREITMAIER, E. & VOELTER, W. *<sup>13</sup>C NMR spectroscopy: methods and applications in organic chemistry*. 2<sup>nd</sup>. New York: Werlag Chemie, 1978.
- CHADWICK, D.J. & MARSH, J. *Bioactive compounds from plants*. New York: John Wiley, 1990.
- CHEVALIER, A. *The encyclopedia of medicinal plants: a practical reference guide to more than 550 key medicinal plants and their uses*. New York: DK Publishing Book, 1996.
- DAVINO, S.C. *Estudo in vitro da atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de plantas brasileiras da família Compositae (Asteraceae) e de alguns de seus constituintes*. 1989. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- FLORENCE, A.T. & ATTWOOD, D. *Princípios físico-químicos em farmácia*. São Paulo: EDUSP, 2003.
- GIESBRECHT, A.M. *Atividade antibiótica de produtos naturais*. 1980. Tese de Livre Docência. Universidade de São Paulo. São Paulo.
- GUERRA, R.N.M. & *et al.* Immunomodulatory properties of *Alternanthera tenella* Colla aqueous extracts in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 369(9): 1215-1219, 2003.
- HAYAMIZU, O. & *et al.* [on line]. (1999). Disponível na internet <http://www.scicentral.com/P-spectr.html#articles>. [22.abr.2000].
- HORNAK, J.P. *The basics of NMR*. [on line]. (1999). Disponível na internet <http://www.scicentral.com/P-spectr.html#articles>. [22.abr.2000].
- KATO, T. & *et al.* Antibacterial hydroperoxysterols from *Xanthosoma robustum*. *Phytochemistry*, 41(4): 1191-1195, 1996.
- LEVI, G.C. & *et al.* *Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy*. 2<sup>nd</sup>. New York: John Wiley and Sons, 1980.
- NASCIMENTO, G.G.F. & *et al.* Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Journal of Brazilian Microbiology*, 31: 247-256, 2000.
- REGO, T.J.A. *Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão*, 2<sup>a</sup>. ed. São Luís: EDUFMA, 1995.
- SALVADOR, M.J. & *et al.* Antifungal susceptibility tests of crude extracts from *Alternanthera maritima*, *A. tenella* Colla and *Calycophyllum spruceanum* Benth against four *Candida* ssp. determined by agar-well diffusion and Broth macro dilution methods. *Braz. J. Pharm. Sci.*, 39: 240, 2003.
- SALVADOR, M.J. & *et al.* Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. *Z. Naturforsch.*, 61: 19-25, 2006.
- SHEU, J.H. & *et al.* Cytotoxic sterols from Formosan brown alga *Turbinaria ornata*. *Planta Medica*, 63: 6.571-6.572, 1997.
- SILVEIRA, L.M.S. *Caracterização fitoquímica, biológica e mineral de partes aéreas de Alternanthera tenella Colla (Amaranthaceae)*. 2000. Tese de Mestrado. Programa de Pós-Graduação de Química. Universidade Federal do Maranhão. São Luís.
- VALGAS, C. & *et al.* Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 369-380, 2007.

#### Endereço para correspondência

Luiz Mário da Silva Silveira  
Rua 02 Q 05 C 05 Residencial Itaguará II – Cohatrac  
65052-116 São Luís-MA  
e-mail: luizmariosilveira@yahoo.com.br