

MARIA TEREZA ROJO DE ALMEIDA

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS ATIVAS DE *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-graduação em FARMÁCIA, Área de Concentração Fármacos e Medicamentos, Linha de Pesquisa Investigação de produtos naturais com potencial atividade biológica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marení Rocha Farias

Florianópolis

2003

Almeida, Maria Tereza Rojo de

Isolamento e identificação de substâncias ativas de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze com potencial atividade antiviral / Maria Tereza Rojo de Almeida. Florianópolis, 2003.

Dissertação (Mestrado - Farmácia).
Universidade Federal de Santa Catarina

1. *Araucaria angustifolia*. 2 biodiversidade. 3 antiviral. 4 biflavonóides. 5 Floresta Tropical Atlântica

Às minhas MÃES...

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Prof^a. Dr^a. Mareni Rocha Farias, pelo privilégio de tê-la como orientadora e amiga,
por acreditar em mim e contribuir para meu crescimento profissional.

Minha imensa admiração!

AGRADECIMENTOS

Às professoras da disciplina de Farmacognosia, Cláudia M. O. Simões, Rosana I. dos Santos e Marení R. Farias, por terem despertado em mim, com sua competência, o interesse pelo estudo das plantas medicinais.

À Cláudia M. O. Simões, à Adriane M. de Freitas e à Carla R. A. Fröhner, pela cooperação na realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Eloir P. Schenkel, por ter contribuído, e muito, com suas excelentes aulas e sugestões, além do apoio para a continuação dos estudos.

Ao Prof. Dr. Ralf Mayer do Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn, Alemanha, pela realização das análises espectroscópicas de RMN e Massas.

À Daniela De Marco, Ilana Seifriz e à Prof^a. Dr^a Tânia Creczynski-Pasa, pelos ensaios de atividade antioxidante.

Aos técnicos de laboratório Solange e Aurélio, pela atenção e cooperação.

Aos colegas e amigos do laboratório: Daniela, Giana, Patrícia, Gil, Luciano, Micheli, Bianca, Silvânia, Mariliz, Mariana, Daiane, Silvana, Melissa, Rodrigo, e tantos outros...

Aos meus pais, Aparecida Muliterno de Almeida e Pedro João A. V. de Almeida, e aos meus irmãos, pelo amor e carinho, e por me acompanharem em meu caminho.

Aos meus queridos amigos *...mil e setecentos...* por existirem.

A Deus, por conceder o Ser, e me permitir a Vida, a mais bela das escolas!

*"Verdade, mentira, certeza, incerteza...
Aquele cego ali na estrada também conhece essas palavras.
Estou sentado num degrau alto e tenho as mãos apertadas
Sobre o mais alto dos joelhos cruzados.
Bem: verdade, mentira, certeza, incerteza são as mesmas?
Qualquer cousa mudou numa parte da realidade – os meus joelhos e as minhas mãos.
Qual é a ciência que tem conhecimento para isto?
O cego continua seu caminho e eu não faço mais gestos.
Já não é a mesma hora, nem a mesma gente, nem nada igual.
Ser real é isto."*

FERNANDO PESSOA (1888 a 1935)

" Há muitas formas de se entender a Vida e o Universo. Embora cada abordagem tenha seus próprios especialistas - cientistas, sacerdotes, filósofos, doutores, poetas -, todos são apenas homens cegos que recebem impressões diferentes ao tocarem o mesmo elefante. Segundo uma perspectiva própria, a conclusão de cada especialista é inteligente e faz sentido. Mas suas teorias são meramente parte do retrato integral. Eu também sou um dos cegos... "

RESUMO

Araucaria angustifolia é uma árvore de grande porte que ocorre na floresta ombrófila mista, um ecossistema único dentro do domínio da Mata Atlântica. É a única espécie da família Araucariaceae natural da região sul do Brasil. Atualmente está incluída na lista das espécies ameaçadas de extinção, devido a intensa exploração de sua madeira pelas indústrias madeireiras e de papel e celulose. O objetivo deste trabalho foi o isolamento e a identificação em *Araucaria angustifolia* substâncias potencialmente ativas, biomonitorado por ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral para o vírus herpético tipo-1 (HSV-1), expressa pelo Índice de Seletividade (IS). Assim, partindo-se de um extrato hidroalcoólico das folhas (acículas) do material vegetal, seguido de partição com solventes de polaridade crescente, foi possível estabelecer a atividade antiviral para as frações acetato de etila (FAE, IS=9) e n-butaol (FBU, IS=11). Da FAE seguiu-se a subfração mais ativa SFAE-II (IS=7,13), e desta as subfrações SFAE-II-B, SFAE-II-C e SFAE-II-D (IS=2,96). Após purificação das subfrações, foi possível isolar as substâncias II-B **[1]** (bilobetina), II-C e II-D **[2]** (cupressuflavona), sendo que a substância II-C trata-se, provavelmente, de uma biflavona do tipo robustaflavona. Esta substância foi posteriormente acetilada, e os espectros de RMN estão sendo aguardados para a confirmação estrutural. Da FBU foram isolados esses mesmos biflavonóides, além de duas outras substâncias caracterizadas como taninos condensados (proantocianidinas), os quais parecem ter grande importância para a atividade antiviral das frações. A subfração mais ativa derivada da FBU foi a SFBU-I (IS=13,96), a qual deu origem a SFBU-I-4 (IS=51,71) e SFBU-I-5 (IS=57,56). Da SFBU-I-4 obteve-se a substância T4, e da SFBU-I-5 foi obtida a FR-1 (IS=38,16), a qual foi acetilada e purificada. Dessa forma, a *Araucaria angustifolia* mostra-se como uma fonte viável de obtenção de metabólitos secundários potencialmente ativos, devendo ser mais aprofundados os estudos de elucidação estrutural, assim como a pesquisa de outras atividades relacionadas a esses compostos. Assim, atribuindo-se à espécie outra importância, no caso a obtenção de substâncias ativas, que não a exploração de sua madeira, contribui-se para a sua preservação, uma vez que foram pesquisadas as partes aéreas da planta.

ABSTRACT

Araucaria angustifolia is a big tree from the Floresta Ombrófila Mista, an ecosystem inside the Floresta Tropical Atlântica. It is the only species of the Araucariaceae family natural from south Brazil. Now it is included in the list of extinction threatened species, due to intense exploration of its wood. The objective of this work was the isolation and identification of potentially active substances in *Araucaria angustifolia*, bioguided by cytotoxicity and antiviral activity to the herpetic simplex virus type-1 (HSV-1), expressed by the Selectivity Index (SI). Thus, from a hidroalcoholic extract of the leaves from the vegetable material, followed by partition with solvents of increasing polarity, it was possible to establish the antiviral activity for the ethyl acetate (FAE, SI=9) and n-butanolic (FBU, SI=11) fractions. From the FAE, the most active subfraction obtained was SFAE-II (SI=7.13). From it were obtained the SFAE-II-B, SFAE-II-C and SFAE-II-D (SI=2.96) subfractions. After the subfractions purification, it was possible to isolate the substances II-B [1] (bilobetin), II-C and II-D [2] (cupressuflavone). The substance II-C was probably a biflavone from the robustaflavone-type. This substance was acetylated later, and the RMN spectra are being waited for structural confirmation. From FBU were isolated those same biflavonoids, besides two other substances characterized as condensed tannins (proanthocyanidins), which has probable great importance for the antiviral activity. The most active derived subfraction from FBU was the SFBU-I (SI=13.96), which gave origin to the SFBU-I-4 (SI=51.71) and the SFBU-I-5 (SI=57.56) subfractions. From the SFBU-I-4, it was obtained the substance T4, and from the SFBU-I-5, the FR-1 fraction (SI=38.16), which was acetylated and purified. In that way, the *Araucaria angustifolia* is shown as a viable source of potentially active secondary metabolites. Thus, being attributed to the species other importance, the obtainment of active substances, contributed to its preservation, once the aerial parts of the plant were the object of this study.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Esquema representando a localização sistemática do gênero <i>Araucaria</i>	18
FIGURA 2 – <i>Araucaria angustifolia</i> . árvore adulta; acículas e inflorescências; pinha e pinhões.....	20
FIGURA 3 – Mapas de distribuição da <i>A. angustifolia</i>	21
FIGURA 4 - Tipos de biflavonas descritas para a família Araucariaceae.....	27
FIGURA 5 - Unidade básica dos taninos condensados.....	33
FIGURA 6 – Representação esquemática do processo de isolamento e purificação das substâncias ativas a partir das frações FAE e FBU.....	43
FIGURA 7- CCD em placa de fase reversa C-18 utilizando-se MeOH:H ₂ O (85%) como eluente.....	44
FIGURA 8 – Espectros no UV para a solução metanólica da substância II-B [1], empregando-se os reativos de deslocamento.....	49
FIGURA 9 - Espectro ¹³ C-RMN e DEPT-135 em acetona-d ₆ da substância II-B...	54
FIGURA 10 - Espectro ¹ H-RMN em acetona-d ₆ da substância II-B.....	55
FIGURA 11 – Espectro HMQC em acetona -d ₆ da substância II-B.....	56
FIGURA 12 – Espectro HMBC em acetona -d ₆ da substância II-B.....	57
FIGURA 13 – Espectro COSY em acetona -d ₆ da substância II-B.....	58
FIGURA 14 – Espectro de Massas FAB da substância II-B.....	59
FIGURA 15 – Espectro no UV da solução metanólica da substância II-D [2].....	60
FIGURA 16 - Espectro ¹ H-RMN em DMSO-d ₆ da substância II-D.....	64
FIGURA 17 - Espectro ¹ H-RMN em DMSO-d ₆ /D ₂ O da substância II-D.....	65
FIGURA 18 - Espectro ¹³ C-RMN e DEPT-135 em DMSO-d ₆ da substância II-D...	66
FIGURA 19 – Espectro HMQC em DMSO-d ₆ da substância II-D.....	67
FIGURA 20 – Espectro COSY em DMSO-d ₆ da substância II-D.....	68
FIGURA 21 – Espectro no UV para a solução metanólica da substância II-C, empregando-se os reativos de deslocamento.....	70
FIGURA 22 – Espectro no UV para as frações FR-1, SBU-I-4 e substância T5act, em EtOH/HCl 1%.....	74
FIGURA 23 - Representação esquemática do procedimento de partição do EBHA de <i>Araucaria angustifolia</i> (Bert) Kuntze.....	80

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tipos de biflavonóides descritos para a família Araucariaceae.....	27
Quadro 2 - Subgrupos de proantocianidinas, segundo o padrão de hidroxilação dos monômeros básicos.....	34
Quadro 3 - Resultados da análise fitoquímica preliminar do EBHA e das frações da partição.....	41
Quadro 4 - $\lambda_{\text{máx}}$. apresentados nos espectros no UV, para a substância II-B, empregando-se os reativos de deslocamento.....	48
Quadro 5 - Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C, em acetona-d ₆ , para a substância II-B [1] (4'-O-Metil-amentoflavona), comparativamente à bilobetina.....	52
Quadro 6 - $\lambda_{\text{máx}}$.- apresentados nos espectros no UV, para a substância II-D, empregando-se os reativos de deslocamento.....	60

Quadro 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , em DMSO- d_6 , para a substância II-D [2] (=cupressuflavona), em DMSO- d_6 , comparativamente à literatura.....	63
Quadro 8 - $\lambda_{\text{máx}}$. apresentados nos espectros no UV, para a substância II-C empregando-se os reativos de deslocamento.....	69
Quadro 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância II-C.....	73
Quadro 10 - Resultados dos testes de caracterização para taninos, aplicados à FR-1.....	74
Quadro 11 - Sistema de eluentes utilizados na coluna cromatográfica de sílica para a FAE.....	85
Quadro 12 - Sistema de eluente utilizado na coluna cromatográfica de sílica da SFAE-II.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dados da análise granulométrica do material vegetal.....	37
Tabela 2 - Dados do ensaio de perda por dessecação do material vegetal.....	38
Tabela 3 - Dados do ensaio de cinzas totais realizado com o material vegetal....	39
Tabela 4 - Teor de flavonóides expresso como hiperosídeo em relação à quantidade da droga pesada.....	40
Tabela 5 - Rendimentos das frações da partição.....	40
Tabela 6 - Resultados dos experimentos de citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral das frações da partição e do EBHA.....	45
Tabela 7 - Resultados dos experimentos de citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral das subfrações da FAE nos ensaios de inibição do efeito citopático (ECP) viral e do ensaio colorimétrico do MTT.....	46
Tabela 8 - Resultados dos experimentos de citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral das subfrações da FBU, sobre o vírus herpético tipo 1, através do ensaio colorimétrico do MTT.....	47
Tabela 9 - Dados de pesagem do material vegetal submetido ao ensaio de perda por dessecação.....	76
Tabela 10 - Subfrações resultantes da reunião das frações da coluna cromatográfica de sílica da FAE.....	86
Tabela 11 - Subfrações de SFAE-II resultantes reunião das frações da coluna de sílica da subfração SFAE-II, quantidade e rendimento das subfrações.....	87
Tabela 12 - Reunião das frações da coluna II-Cact, quantidades obtidas e rendimentos em relação à amostra aplicada.....	88
Tabela 13 - Reunião das frações da coluna FBU, quantidades e R (%) = rendimento em relação à amostra aplicada.....	88
Tabela 14 - Subfrações da coluna SFBU-I e seus rendimentos em relação à amostra aplicada	89
Tabela 15 - Reunião das frações da coluna SFBU-I-4 e rendimentos em relação à amostra aplicada.....	90
Tabela 16 - Reunião das frações das colunas de fase reversa C-18 (FR-18), valores de R _f das substâncias, quantidades e rendimentos em relação ao total de amostra aplicada.....	92
Tabela 17 - Frações obtidas na coluna T, quantidades obtidas e rendimentos em relação à amostra aplicada (FR-1act).....	92
Tabela 18 - Reunião das frações da coluna G, quantidades obtidas e rendimentos em relação à amostra aplicada.....	94

SUMÁRIO

RESUMO.....	7
ABSTRACT.....	8
LISTA DE FIGURAS.....	9
LISTA DE QUADROS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
APRESENTAÇÃO.....	13
1 INTRODUÇÃO.....	14
1.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS.....	14
1.2 ASPECTOS DA INVESTIGAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 O GÊNERO ARAUCARIA.....	18
2.1.1 Classificação Botânica.....	18
2.1.2 Morfologia.....	19
2.1.3 Distribuição geográfica.....	19
2.1.4 Emprego.....	22
2.1.5 Constituintes químicos.....	23
2.1.5.1 Constituintes isolados do gênero Araucaria.....	23
2.1.5.2 Dados farmacológicos para os constituintes isolados do gênero Araucaria.....	24
2.2 COMPOSTOS POLIFENÓLICOS.....	25
2.2.1 Biflavonóides.....	26
2.2.1.1 Distribuição.....	28
2.2.1.2 Atividade biológica.....	28
2.2.1.3 Elucidação estrutural.....	29
2.2.2 Proantocianidinas.....	32
2.2.2.2 Importância biológica.....	34
2.2.2.3 Elucidação estrutural.....	35
3 OBJETIVO.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL ESTUDADO.....	37
4.1.1 Análise granulométrica.....	37
4.1.2 Determinação da Perda por Dessecação.....	38
4.1.3 Determinação do teor de Cinzas Totais (F.B. IV).....	38
4.1.4 Determinação do teor de flavonóides totais.....	39
4.2 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO.....	40
4.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO EBHA E DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO.....	41
4.5 OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS.....	42
4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	45
4.7 CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.....	48
4.7.1 Elucidação estrutural da substância II-B [1] (4'-O-Metil- amentoflavona).....	48
4.7.2 Elucidação estrutural da substância II-D [2] (cupressuflavona).....	60
4.7.3 Elucidação estrutural da substância II-C.....	69

4.7.4	Caracterização de taninos presentes em SFBU-I-4 e SFBU-I-5	74
5	PARTE EXPERIMENTAL	75
5.1	MATERIAL VEGETAL.....	75
5.1.1	Coleta e identificação	75
5.1.2	Secagem e moagem do material vegetal	75
5.1.3	Análise preliminar de caracterização do material vegetal	75
5.1.3.1	Determinação da granulometria (F.B. IV).....	76
5.1.3.2	Determinação da Perda por Dessecação (F.B. IV).....	76
5.1.3.3	Determinação de Cinzas Totais (F.B. IV).....	77
5.1.3.4	Determinação do teor de flavonóides Totais (FRANZ, 1992).....	77
5.2	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES	78
5.2.1	Determinação do rendimento da extração e do fracionamento	79
5.3	ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR	80
5.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	82
5.4.1	Avaliação da citotoxicidade	82
5.4.1.1	Avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares	83
5.4.2	Avaliação da atividade antiviral in vitro	83
5.5	ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES ATIVOS	84
5.5.1	Separação Cromatográfica dos Constituintes da fração Acetato de Etila (FAE)	85
5.5.1.1	Cromatografia em Coluna de Gel de Sílica da FAE.....	85
5.5.1.2	Cromatografia em Coluna de Gel de Sílica da SFAE-II	86
5.5.2	Separação Cromatográfica dos Constituintes da Fração n-butanol (FBU)	87
5.5.2.1	Cromatografia em coluna de gel de sílica da FBU.....	87
5.5.2.2	Cromatografia em coluna de exclusão molecular da SFBU-I	88
5.5.2.3	Cromatografia em coluna de gel de sílica da SFBU-I-4	89
5.5.2.4	Cromatografias em colunas com sílica de fase-reversa C-18 da SFBU-I-5	89
5.5.2.4.1	Purificação da subfração FR-1	91
5.5.2.4.2	Purificação da subfração FR-4	92
5.6	IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	94
5.6.1	Caracterização de taninos	94
5.6.2	Espectroscopia no Ultravioleta (UV)	95
5.6.3	Espectroscopia de Ressonância Magnético-Nuclear (RMN ¹³C e ¹H) . 96	
5.6.4	Espectrometria de Massas (EM)	96
6	PERSPECTIVAS	97
7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação refere-se ao trabalho desenvolvido durante o Mestrado em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos e Medicamentos, linha de pesquisa Investigação de produtos naturais com potencial atividade biológica.

O estudo da espécie *Araucaria angustifolia* iniciou-se no âmbito do projeto denominado "Estratégias de Conservação, Valoração e Aproveitamento da Biodiversidade da Floresta Tropical Atlântica", o qual objetivou estabelecer um modelo baseado na aplicação de estratégias biotecnológicas de caracterização, conservação, uso, manejo e aproveitamento sócio-econômico dos recursos da biodiversidade da Floresta Tropical Atlântica em Santa Catarina. Participaram desse projeto, grupos de pesquisa dos Departamentos de Fitotecnia (Centro de Ciências Agrárias – CCA), do Departamento de Biotecnologia (Centro de Ciências Biológicas – CCB) e do Departamento de Ciências Farmacêuticas (Centro de Ciências da Saúde – CCS), todos da Universidade Federal de Santa Catarina.

O trabalho descreve o estudo fitoquímico de isolamento das substâncias ativas da *Araucaria angustifolia*, desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do CCS, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Mareni Rocha Farias, sendo biomonitorado pelos ensaios biológicos de avaliação da citotoxicidade e da atividade antiherpética, realizados pelas mestrandas Adriane Martins de Freitas e Carla Regina Andrighetti Fröhner, no Laboratório de Virologia Aplicada do CCB, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões.

Foram realizados também ensaios de avaliação da atividade antioxidante do extrato e de frações da planta, pela mestranda Daniela De Marco e pela doutoranda Ilana Seifriz, sob orientação da Prof^a. Dr^a. Tânia B. Creczynski-Pasa, no Laboratório de Biofísica do Centro de Ciências Biológicas – CCB, da Universidade Federal de Santa Catarina. No entanto, não foi objetivo deste trabalho o biomonitoramento através desses ensaios.

1 INTRODUÇÃO

Os avanços científicos e tecnológicos alcançados com o desenvolvimento recente das biotecnologias estabeleceram as bases para uma discussão internacional, cujo objetivo principal refere-se ao uso sustentável e à soberania das nações sobre estes recursos, o que é particularmente importante para o Brasil, detentor da maior biodiversidade do planeta.

A família Araucariaceae existe na Terra há mais de 200 milhões de anos. Já ocorreu em ambos os hemisférios, porém hoje suas espécies encontram-se restritas ao hemisfério sul, sendo a *Araucaria angustifolia* a única nativa do Brasil. Trata-se de uma árvore de grande porte que caracteriza a fitofisionomia da *Floresta Ombrófila Mista*, uma das formações florestais do *Domínio da Mata Atlântica* (CARVALHO, 1994; GUERRA et al, 2000; HANSON, 2001).

Diversos estudos envolvendo um conhecimento mais aprofundado sobre o desenvolvimento da *Araucaria angustifolia* foram realizados objetivando sua preservação. Esses estudos tratam desde aspectos ambientais, como solo e clima, até alternativas biotecnológicas para propagação da espécie (LEDRU et al, 1996; BEHLING, 1997; GUERRA et al, 2000; SANTOS et al, 2002).

1.1 ASPECTOS ECOLÓGICOS

A *Araucaria angustifolia* foi uma das espécies madeiráveis mais importantes para o país a partir da década de 30, atingindo-se o ápice de sua exploração durante as décadas de 50, 60 e 70. Juntamente com a destruição do patrimônio florestal brasileiro, no sul do Brasil ocorreu a destruição das florestas de araucária. Até a década de 1980, cerca de 80% da extensão original da floresta de *Araucaria* foram destruídas (PÁGINA..., 2002).

Como o esgotamento das reservas naturais de *Araucaria* prejudicou o abastecimento de matéria-prima para as indústrias madeireiras, essas áreas foram reflorestadas com espécies norte-americanas, como *Pinus sp*, ocupando 90% das áreas de reflorestamento em Santa Catarina. No entanto, essas espécies exóticas acabaram gerando um desequilíbrio ecológico, pois não permitem o desenvolvimento da flora e da fauna características da região, e proliferaram-se no

lugar da vegetação nativa, uma vez que não possuem predadores naturais no Brasil (GUERRA et al, 2000; BECKER, 2002; RODRIGUES, 2002).

Espécie dominante de um habitat raro, no qual há outras plantas de interesse medicinal, a *Araucaria angustifolia* é de grande importância econômica para as populações locais, sendo coletadas cerca de 3.400 toneladas de sementes (pinhões) por ano no Brasil para consumo humano. Esta espécie está incluída na lista oficial de plantas ameaçadas de extinção no Brasil compilada pelo IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis), porém ainda está sujeita à legislação pertinente às espécies madeireiras (GUERRA et al, 2000; PÁGINA..., 2002).

Nas últimas duas décadas houve uma revalorização do uso de plantas medicinais, porém quando a exploração comercial dessas plantas faz-se de forma predatória, há o risco de destruição do nicho ecológico de várias espécies, podendo levar à erosão genética de muitas plantas nativas (MONTANARI, 2000).

Quando se fala de exploração de plantas medicinais da Mata Atlântica, geralmente busca-se conciliar um objetivo social, como alternativa econômica para seus habitantes, um objetivo ecológico, que ajude na preservação do ecossistema, e um objetivo medicinal, que resulte em uma alternativa terapêutica ou fonte de substâncias ativas (MONTANARI, 2000).

Segundo Montanari (2000), a legislação pertinente à utilização de plantas medicinais da Mata Atlântica diz que:

”[...] a exploração seletiva de determinadas espécies nativas nas áreas cobertas por vegetação primária ou nos estágios avançado e médio de regeneração desse ecossistema poderá ser efetuada desde que não promova a supressão de outras espécies, sejam elaborados projetos fundamentados em estudos técnico-científicos de garantia da capacidade de manutenção da espécie, sejam estabelecidas as áreas e as retiradas máximas anuais, e haja a previa autorização de órgão estadual competente.”

As estratégias preservacionistas para as espécies medicinais da Mata Atlântica devem ser adotadas caso a caso, para que se possam adequar as diferentes características biológicas como, parte utilizada da planta, estágio fenológico, tipo de reprodução e hábitat de ocorrência, ao significado econômico da espécie explorada em determinado momento, pois este significado pode variar à medida que o conhecimento científico sobre a espécie vai sendo aprofundado (MONTANARI, 2000).

Assim, o emprego que se fará das plantas exploradas da Mata Atlântica, pelo fato de possuir uma legislação específica e ser regulamentado pelas autoridades sanitárias, deve ser considerado como um fator importante na sua preservação. Dessa forma, uma espécie que antes era explorada quanto à utilização de sua madeira, pode passar a ser considerada como uma espécie medicinal, se a ela for atribuída tal ação.

1.2 ASPECTOS DA INVESTIGAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS COM POTENCIAL ATIVIDADE ANTIVIRAL

A busca de novos agentes farmacologicamente ativos através da triagem de fontes naturais, como extratos de plantas, tem levado à descoberta de muitos fármacos úteis clinicamente, os quais desempenham importante função no tratamento de doenças humanas. As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem-se modelos para síntese de um grande número de fármacos, com uma enorme diversidade de estruturas e de propriedades físico-químicas e biológicas, no entanto, apenas 15% a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal, em todo o mundo. No Brasil, onde há a maior biodiversidade vegetal do mundo (são estimadas de 350.000 a 550.000 espécies), "apenas 8% da flora nacional foi estudada na busca de compostos bioativos e 1.100 espécies vegetais foram avaliadas em suas propriedades medicinais", sendo que 84% dos fármacos são importados e 78% da produção brasileira é feita por empresas multinacionais. Assim, faz-se necessária a busca por alternativas para superar a dependência externa na área dos medicamentos (NODARI & GUERRA, 2002).

Espécies de *Araucaria* apresentam vários compostos de interesse terapêutico, dentre eles foram relatados biflavonóides, de grande ocorrência em gymnospermae, para os quais foram relatadas atividades antivirais contra diversos tipos de vírus (LIN et al, 1999). Uma triagem antiviral preliminar realizada com extratos de *A. angustifolia* revelou resultados promissores (MOREIRA & SIMÕES, 1998).

O desenvolvimento de um novo medicamento antiviral é uma difícil questão, levando-se em conta a baixa seletividade toxicológica e a rápida seleção de variantes virais resistentes associadas aos fármacos existentes. No entanto, as

plantas representam uma ampla e potencial fonte de agentes antivirais. Cerca de 20-30% de plantas de origem tropical ou temperada têm demonstrado possuir tal atividade (ABOU-KARAM & SHIER, 1992).

As infecções virais são uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, e representam um importante problema de saúde tanto em países desenvolvidos como subdesenvolvidos. Isso se torna particularmente sério quando se tem apenas uma alternativa terapêutica, ou quando há casos de resistência viral ao fármaco de escolha (KOTT et al, 1999). Especificamente no que diz respeito às infecções causadas por vírus herpéticos, estas podem levar a doenças como lesões mucocutâneas e a problemas oftálmicos e neonatais. No entanto, os fármacos usuais não eliminam os vírus latentes, além de ocasionar o desenvolvimento de cepas mutantes resistentes, após terapias prolongadas (ESQUENAZI, 2002).

Uma revisão realizada por NG e colaboradores (1997) mostra uma grande diversidade de compostos químicos de origem natural que apresentam atividade antiviral, compreendendo proteínas, terpenóides, cumarinas, xantonas, saponinas, lignanas alcalóides, polifenóis e polissacarídeos, os quais são produzidos por espécies vegetais filogeneticamente distantes como algas, gimnospermas e angiospermas. Entre esses produtos naturais, os flavonóides destacam-se por apresentarem relativa abundância no reino vegetal.

Quanto à terapia anti-herpética disponível, atualmente, compõem-se basicamente de análogos de nucleosídeos, tais como o aciclovir, valaciclovir e famciclovir. Entretanto, a eficácia destes fármacos é limitada pelo recente aumento na resistência dos vírus, particularmente em pacientes imunocomprometidos, e a recorrência de vírus latentes (PILLAY & ZAMBON, 1998). Desta forma, se faz necessária a pesquisa de novos medicamentos antivirais, eficazes, com um mínimo de efeitos adversos e, preferivelmente, com mecanismos de ação diferentes daqueles dos fármacos já existentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *Araucaria*

2.1.1 Classificação Botânica

A espécie *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, cuja localização sistemática é representada na Figura 1, apresenta as seguintes sinónimas botânicas: *Araucaria brasiliensis* A. Rich, *Araucaria brasiliensis* Lamb. Ex. Loudon, *Columbea angustifolia* Bertol (MISSOURI, 2002; EARLE, 2002; TEILLIER, 2002).

É conhecida pelos nomes populares: pinheiro, pinheiro-brasileiro, curi, curiúva, pinheiro-do-paraná, pinho, cori, pinho-brasileiro, pinheiro-são-josé, pinheiro-macaco, pinheiro-caiová, pinheiro-das-missões ou araucária. Também descrita em inglês como parana-pine (CARVALHO, 1994).

Na família Araucariaceae há três gêneros com aproximadamente 40 espécies, sendo que o gênero *Wollemia* foi descoberto recentemente (em 1994) na Austrália. Para o gênero *Araucaria* foram descritas 19 espécies (CARVALHO, 1994; OFFORD et al, 1999; HANSON, 2001; EARLE, 2002).

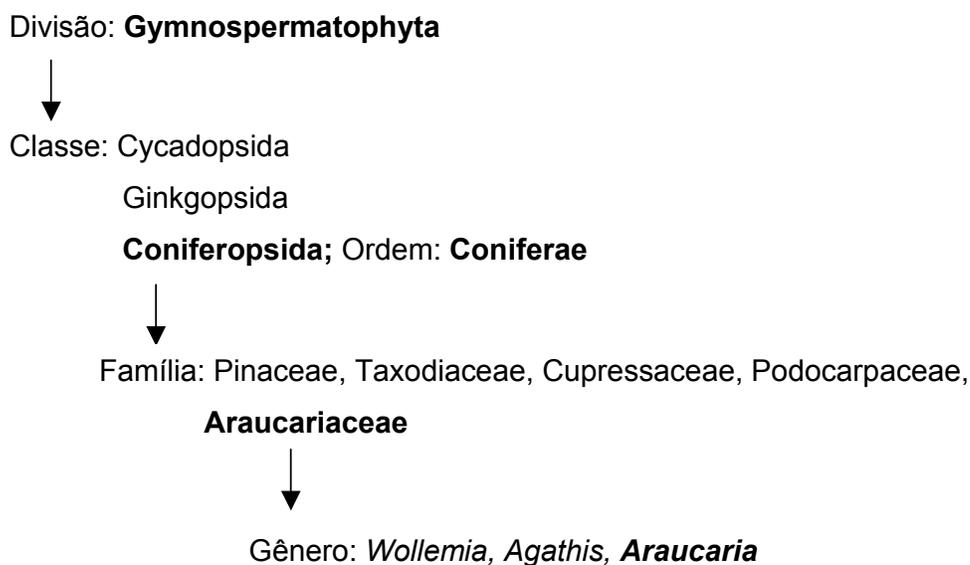


FIGURA 1 – Esquema representando a localização sistemática do gênero *Araucaria*

2.1.2 Morfologia

As coníferas geralmente são caracterizadas como árvores lenhosas, perenes, cuja madeira apresenta canais resiníferos. As folhas apresentam características xeromórficas de adaptação a condições de seca fisiológica: epiderme cutinizada, hipoderme esclerificada e estômatos pequenos. Fazem fotossíntese em baixas temperaturas (TELLIER, 2002).

A *Araucaria angustifolia* caracteriza-se morfologicamente como uma planta dióica de 20 a 50 m de altura, com tronco retilíneo de 90 a 180 cm de diâmetro, com ramificação característica umbeliforme no alto. Folhas (acículas) coreáceas, glabras, agudíssimo-pungentes, de 3 a 6 cm de comprimento, alternas, dispostas densamente (GEMTCHÚJNICOV, 1976; LORENZI, 1998). As flores são unissexuais diclinas, sendo o esporófilo reunido em forma de cone (SCHULTZ, 1990). Estróbilos masculinos alongados, cujo eixo comporta numerosos microsporófilos, cada um sustentando oito ou mais microsporângios. Microspóros (pólem) sem câmaras de ar. Os estróbilos femininos são grandes e arredondados, e são chamados de pinhas. Macrosporos numerosos, comportando cada um apenas um óvulo. Na parte superior do endosperma situam-se oito a 15 arquegônios. Semente grande (pinhão), de cor marrom, contendo grande quantidade de reservas nutritivas (GEMTCHÚJNICOV, 1976). O embrião encontra-se em posição retilínea (ortótropa), e é constituído por cotilédones, caule, raiz e suspensor, órgão que o expele para os tecidos do endosperma e onde é fixada a raiz. Durante a formação do embrião, a casca da semente endurece e se lignifica (SCHULTZ, 1990). Quando jovem, a planta possui copa cônica, e a medida em que atinge a idade adulta toma o formato de taça, devido à queda natural dos ramos inferiores (CARVALHO, 1994; BACKES & IRGANG, 2002).

2.1.3 Distribuição geográfica

As famílias mais primitivas de coníferas (cerca de 350 milhões de anos) já foram extintas. Essas plantas eram predominantes no período Jurássico-cretáceo, e

20 Revisão Bibliográfica

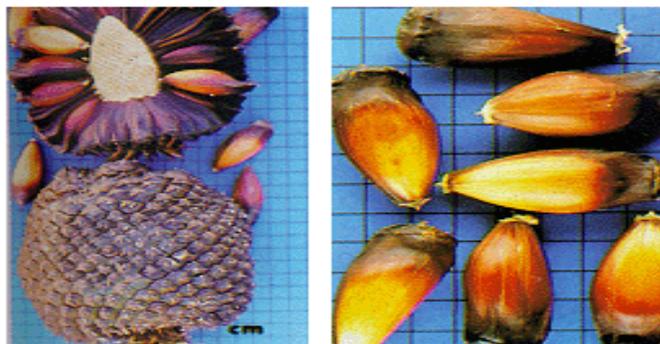
vêm sendo substituídas por angiospermas desde o final do Cretáceo (TEILLIER, 2002).

A família Araucariaceae, originária do Período Triássico, já esteve presente nos dois hemisférios durante o Mesozóico, porém sua distribuição foi restringida ao hemisfério sul, devido aos movimentos tectônicos associados a fatores climáticos. O gênero *Araucaria* ocorre na América do Sul, Sudeste Asiático, Austrália e algumas ilhas da Oceania. São nativas da América do Sul as espécies *A. araucana*, no Chile e Argentina e *A. angustifolia*, no Brasil (CARVALHO, 1994; EARLE, 2002).



A

B



C

FIGURA 2 – *Araucaria angustifolia*. A: árvore adulta; B: acículas e inflorescências, sendo o ramo da esquerda de uma planta masculina e o da direita o de uma planta feminina; C: pinha (à esquerda) e pinhões (à direita) (FONTE: LORENZI, 1998)

A espécie *A. angustifolia* faz parte de um conjunto vegetacional característico que ocorre dentro do domínio da Mata Atlântica, denominado zona de pinhais, mata de araucária, floresta de pinheiros ou, atualmente, *floresta ombrófila mista*, na qual misturam-se as floras tropical afro-brasileira e a temperada austro-brasileira (GUERRA et al, 2000).

A ocorrência natural de *A. angustifolia* situa-se numa área de 20 milhões de ha² do planalto Meridional Brasileiro, entre 19° S e 31° S de latitude e 41° W e 54° W de longitude, em altitudes de 500 m a 1.200 m em clima pluvial subtropical. Predomina nos estados do PR (40%), SC (31%) e RS (25%), aparecendo também como manchas esparsas nos estados do RJ, SP e MG, a partir de 900 m de altitude (FATMA, 1997; ESTIVALET, 1998; LORENZI, 1998; GUERRA et al, 2000).

Ainda em 1930, as florestas de araucária ocupavam cerca de 35% da cobertura vegetal dos estados do Sul do Brasil. Até a década de 70 suas reservas naturais praticamente se esgotaram, restando atualmente entre 2% a 4% da área original, como mostra a Figura 3 (GEMTCHÚJNICOV, 1976; GUERRA et al, 2000).

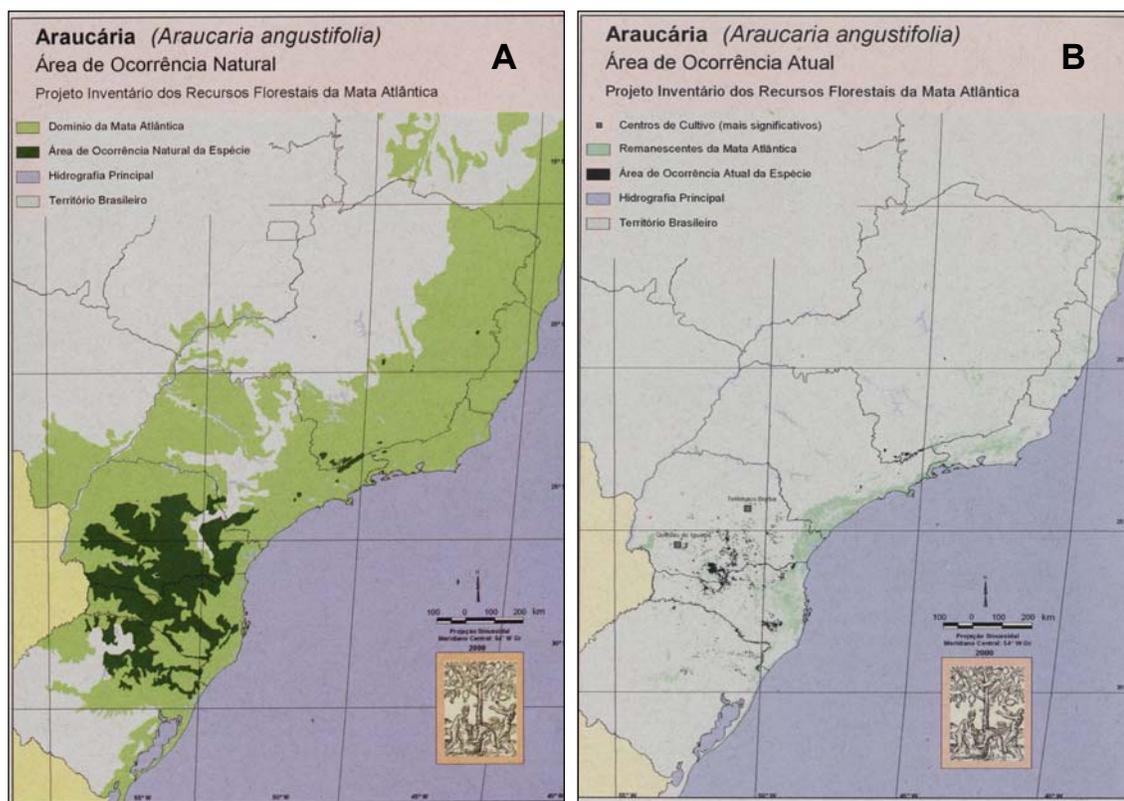


FIGURA 3 – Mapas de distribuição da *Araucaria angustifolia*. Áreas mais escuras nos mapas: A, área de ocorrência natural; B, área de ocorrência atual. A área remanescente situa-se em torno de 2% da área original (FONTE: GUERRA, 2000)

2.1.4 Emprego

A araucaria foi o produto madeireiro mais importante do Brasil até a década de 70. Após a primeira Guerra Mundial, a exportação da *Araucaria* constituiu a principal fonte econômica na região Sul do Brasil (ciclo madeireiro). Estima-se que entre 1958 e 1987 exportaram-se mais de 15 milhões de m³ de madeira, decaindo de 2.000.000 m³ em 1980 para 300.000 m³ em 1991 (CARVALHO, 1994; PÁGINA..., 2002).

A partir de 1997 foi permitida a "exploração dessa espécie por meio de Planos de Manejo Florestal Sustentável ou Requerimento de Corte Seletivo". No entanto, a legislação incidente sobre espécies madeireiras não considera aspectos característicos de cada espécie, e não é bem fundamentada em estudos prévios, funcionando apenas como uma regulamentação para o corte seletivo, diferentemente da regulamentação para o manejo de plantas medicinais, a qual contempla peculiaridades de cada espécie (GEMTCHÚJNICOV, 1976; GUERRA et al, 2000; REIS et al, 2000).

A *A. angustifolia* apresenta uso como fonte alimentar e de renda para as populações locais. Sua semente, o "pinhão", é comestível e muito apreciada no Sul do Brasil, e sua venda gera uma renda 22% maior que a exploração da madeira. Além disso, é consumido por várias espécies da fauna que são responsáveis pela disseminação da planta (LORENZI, 1998; GUERRA et al, 2000).

Suas sementes são usadas ainda para forragem e fabricação doméstica de álcool (GEMTCHÚJNICOV, 1976). A árvore é também utilizada como ornamental (LORENZI, 1998). Sua madeira contém 58,3% de celulose e 28,5% de lignina, e é utilizada, em pequena escala, por algumas indústrias do setor de papel e celulose (numa faixa de 3% a 10%) devido às fibras longas resultarem em um papel mais resistente e de cor clara (GUERRA et al, 2000). A resina exsudada da casca é utilizada pela indústria em laminados plásticos, em vernizes, como substituta de resinas fenólicas e para obtenção de terebentina, acetona e ácido pirolenhoso (SHIMIZU; OLIVEIRA, 1981; OHASHI et al, 1992; CARVALHO, 1994).

Na medicina popular os nós, as cascas do caule e os brotos da planta são utilizados por tribos indígenas (guarani, caingangue e caiuíá) do PR e SC como

emoliente, antisséptica das vias respiratórias e da garganta, no tratamento do reumatismo e de dores ciáticas, catarata, cortes e feridas, doenças estomacais e doenças sexualmente transmissíveis (MARQUESINI, 1995, apud FREITAS, 2001).

2.1.5 Constituintes químicos

2.1.5.1 Constituintes isolados do gênero *Araucaria*

Para a espécie *Araucaria angustifolia* existem poucos estudos fitoquímicos e nenhum farmacológico.

Entre os estudos químicos, foi descrita a presença de lignanas, ciclolignanas e norlignanas, tais como pinoresinol, isolariciresinol, secoisolariciresinol, criptoresinol e hinokiresinol, presentes na resina da árvore (FONSECA; NIELSEN; RUVEDA, 1979; OHASHI et al, 1992).

Brophy e colaboradores (2000) descrevem a presença de vários terpenóides, denominados araucaróides presentes no óleo volátil de folhas de *Araucariaceae*, sendo majoritários em *Araucaria angustifolia* germacreno-D e os diterpenos hibaeno e filocladeno.

Nas sementes de *Araucaria angustifolia* foram identificadas lecitinas (DATTA; FIGUEROA; LAJOLO, 1993).

Em um estudo realizado por Fonseca e colaboradores (2000) com culturas de células e tecidos de *Araucaria angustifolia* em diferentes estágios de diferenciação e desenvolvimento, foram identificados compostos flavonoídicos e derivados de fenilpropanóides, tais como: os isômeros E e Z do octadecil p-cumarato e do octadecil ferulato, ambos identificados em culturas de calos da planta; no talo da plântula foram encontradas três biflavonas do tipo amentoflavona (7,4',7"-tri-o-metilamentoflavona, 7,4',4"-tri-o-metilamentoflavona, 4',4"-di-o-metilamento-flavona); das raízes da plântula foi isolado o diterpeno do ácido trans-cumênico, já descrito para outras espécies do gênero. Do lenho da planta adulta, foram isolados os compostos p-hidróxibenzaldeído, coniferaldeído, vanilina, as isoflavonas cabreuvina e irisolidona, e os lignóides pinoresinol, eudesmina e lariciresinol.

Para outras espécies de *Araucaria*, como *Araucaria bidwillii*, *Araucaria excelsa*, *Araucaria cookii* e *Araucaria cunninghamii* foi descrita a presença de terpenóides e flavonóides, principalmente biflavonas dos tipos amentoflavona, robustaflavona, agathisflavona, hinokiflavona e cupressuflavona (KHAN et al, 1972; ILYAS et al, 1978; PARVEEN; TAUFEEQ; KHAN, 1987; GEISER & QUINN, 1988; HARADA et al, 1992; BROPHY et al, 2000).

Castro e colaboradores (1996) apresentam numa revisão os lignanóides identificados na ordem Coniferae, e em Araucariaceae foram descritos para as espécies *Araucaria angustifolia* e *Agathis australis*.

Para a espécie chilena *Araucaria araucana* (sin. *Araucaria imbricata*) foram descritos labdanos diterpênicos da resina, e outros diterpenóides do óleo volátil, (BRIGGS & WHITE, 1975; GABARINO; OYARZUN; GAMBARO, 1989). Em *Araucaria columnaris* foram caracterizados terpenos na resina exsudada da madeira (LAMBERT et al, 1999).

Hegnauer (1962, 1986) cita a presença das proantocianidinas em gymnospermae, sendo que em *Araucaria bidwillii* e *Araucaria cunninghamii* foram identificadas leucodelfinidina e leucocianidina. Nesta última espécie também foi caracterizada a presença de ácido clorogênico.

2.1.5.2 Dados farmacológicos para os constituintes isolados do gênero *Araucaria*

Para as lignanas isoladas de *A. angustifolia* foram atribuídas atividades antiviral e antineoplásica (OHASHI et al, 1992; CASTRO et al, 1996; SAARINEN et al, 2002).

Às lecitinas identificadas nos pinhões e descritas por Data e colaboradores (1993), foi atribuída atividade hemaglutinante.

Para algumas biflavonas, estudos descrevem atividade anticâncer, por meio de ação inibidora de topoisomerases, particularmente para os tipos agathisflavona e amentoflavona. Foram também descritas atividades antimicrobianas, tais como antifúngica e antiviral, contra vírus da influenza, adenovirus, vírus herpéticos,

citomegalovirus e vírus da hepatite (PARVEEN; TAUFEEQ; KHAN, 1987; LIN et al, 1999; GRYNBERG et al, 2002).

2.2 COMPOSTOS POLIFENÓLICOS

Aos polifenóis são atribuídas diversas atividades biológicas. A maioria das plantas utilizadas mundialmente para tratar ou prevenir distúrbios, que vão de diarreia ao câncer, são ricas em compostos polifenólicos. Entre os compostos polifenólicos, as duas classes mais importantes são a dos flavonóides e a dos taninos (ELISABETSKY, 2002).

Os flavonóides são compostos polifenólicos derivados dos fenilpropanóides, e que são responsáveis por muitas ações nas plantas, como proteção contra a incidência de raios UV e visível, proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, atividades antioxidante, controladora da ação hormonal em vegetais e inibição de enzimas. São utilizados pela indústria como pigmentos e flavorizantes naturais em alimentos, principalmente o grupo das cianidinas (ZUANAZZI, 2002). Para alguns flavonóides monoméricos foi relatada atividade inibidora na replicação de vários vírus, dentre eles os vírus herpéticos 1 e 2, citomegalovírus, poliovírus, rinovírus, rotavírus e vírus da imunodeficiência humana (SIMÕES et al, 1990; AMOROS; SIMÕES; GIRRE, 1992; ROCHA et al, 1996). Além disso, muitos desses compostos são de grande utilidade como marcadores quimiotaxonômicos e/ou indicadores evolutivos, como é o caso dos biflavonóides, principal classe de ocorrência em coníferas (GEISER & QUINN, 1988).

Outro grupo amplamente distribuído na ordem coniferae, o das proantocianidinas, incluído também na classe dos taninos condensados, é conhecido por sua ampla atividade antimicrobiana, entre elas a atividade antiviral. Seu mecanismo de ação antiviral provavelmente está associado à inibição da adsorção do vírus na célula, ou seja, um efeito virucida (GEISER & QUINN, 1988; ESQUENAZI, 2002; SANTOS & MELLO, 2002).

2.2.1 Biflavonóides

Biflavonóides foram definidos como "dímeros de apigenina" e assim diferenciados de outros dímeros flavonoídicos, como as proantocianidinas, as quais possuem flavan-3-ol (catequina) como unidade monomérica (GEISER & QUINN, 1975; AGRAWAL, 1989). Estas biflavonas foram inicialmente classificadas de acordo com a ligação interflavonoil, sendo os principais grupos denominados amentoflavona, robustaflavona, hinokiflavona, cupressuflavona e agathisflavona, consideradas as biflavonas clássicas (Quadro 1 e Figura 4). No entanto, outros biflavonóides foram descobertos, formados por ligações entre flavona-flavanona, flavona-flavonol, flavona-flavanonol, flavona-isoflavona, flavonol-flavonol, flavonol-flavanona, flavanona-flavanona, flavonol-isoflavona, os quais divergem das anteriores não apenas em seu padrão de hidroxilação nos anéis aromáticos, mas também quanto à substituição do heterociclo central, com ligação interflavonoil entre diferentes unidades flavonoídicas.

Sua formação pode ser explicada em termos de acoplamento oxidativo de duas unidades de chalconas e subsequente modificação das unidades centrais C₃ (GEISER & QUINN, 1975).

Quanto à numeração desses compostos, pode ser feita de duas formas:

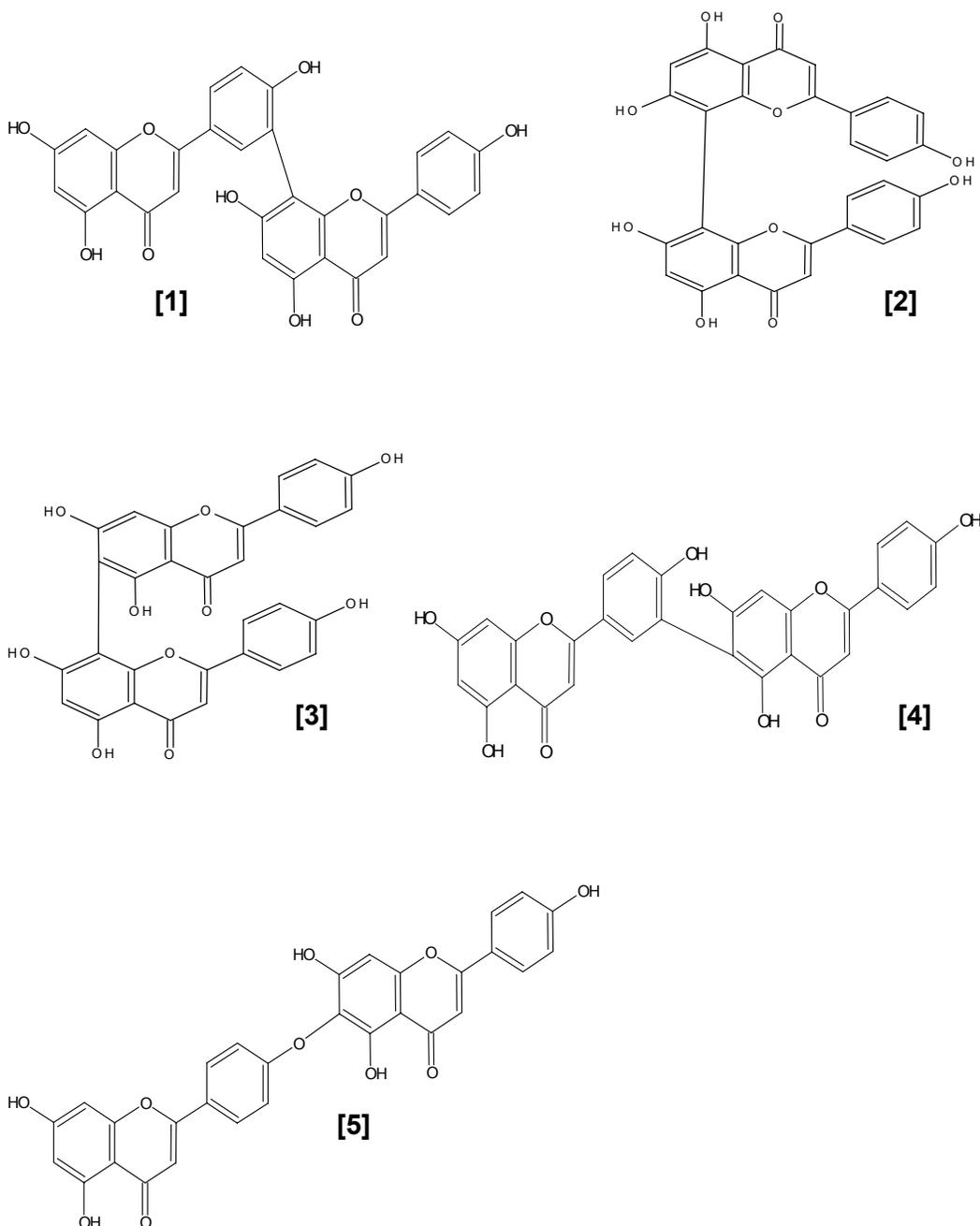
- Utiliza-se a numeração comum dos flavonóides para o primeiro monômero; e os mesmos números ordinários seguidos de duas linhas (") para os núcleos "A" e "C", e seguidos de três linhas (""") para o núcleo "B" da segunda unidade;
- Utilizam-se os números romanos "I" e "II" para cada monômero, seguido da numeração comum dos flavonóides (ZUANAZZI, 2002).

Assim, os tipos de biflavonóides são definidos conforme o local da ligação interflavonoil. Para a família Araucariaceae foram descritas biflavonas formadas por duas unidades de apigenina, conforme Quadro 1 e Figura 4 (GEISER & QUINN, 1988).

Quadro 1 - Tipos de biflavonóides descritos para a família Araucariaceae

ESTRUTURA	BIFLAVONA	LIGAÇÃO INTERFLAVONOIL
1	Amentoflavona	I-3', II-8 (ou I-5', II-8)*
2	Cupressuflavona	I-8, II-8
3	Agathisflavona	I-6, II-8
4	Robustaflavona	I-3', II-6 (ou I-5', II-6)*
5	Hinokiflavona	I-4'-O-II-6

*numeração segundo Agrawal (1989)

**FIGURA 4** - Tipos de biflavonas descritas para a família Araucariaceae

2.2.1.1 Distribuição

Os biflavonóides são característicos de gimnospermas, aparecendo também em plantas vasculares e em algumas angiospermas mais primitivas. São encontrados na maioria das coníferas, incluindo os gêneros *Araucaria* e *Agathis* da família Araucariaceae (GEISER & QUINN, 1975).

Esta família distingue-se das demais coníferas por apresentar características primitivas quanto à embriologia e anatomia da madeira, e à morfologia especializada das folhas (EARLE, 2002).

Quanto à produção de biflavonóides, amentoflavona e hinokiflavona são os grupos de maior distribuição entre as gimnospermas, sendo que o tipo amentoflavona ocorre com maior frequência. Do ponto de vista evolutivo, estes são considerados os biflavonóides mais primitivos, ou seja, que ocorreram nas primeiras plantas vasculares com órgãos diferenciados. Já o tipo agathisflavona provavelmente só foi ocorrer em Araucariaceae após sua diferenciação. O tipo cupressuflavona é ainda mais especializado e ocorre também em algumas angiospermas. Assim, entende-se que a habilidade de sintetizar biflavonóides foi perdida nas vias evolutivas na maioria das angiospermas e, portanto, muitos destes compostos teriam importância quimiotaxonômica (GEISER & QUINN, 1988).

2.2.1.2 Atividade biológica

Os biflavonóides ocorrem com ampla diversidade de acumulação nos tecidos vegetais, em folhas, raízes, pólen, frutos, lenho e sementes. Os que ocorrem nas folhas são conhecidos principalmente por possuírem ação de proteção contra radiação UV, assim como para proteger a planta de predadores como insetos e fungos (GEISER & QUINN, 1988).

Quanto à atividade farmacológica, a diversidade de alvos moleculares é tão ampla quanto as variações estruturais, apresentando ações como o bloqueio de efeitos inflamatórios de hepatotoxinas, supressão de atividade linfocitária, inibição de adesão plaquetária, inibição de ciclooxygenases, inibição da ligação de

neurotransmissores, inibição de peroxidação lipídica, ação estimulante cardíaca, vasodilatação periférica, efeito hipoglicêmico, anticarcinogênico, antiespasmogênico, hepatoprotetor, antifúngico, antiviral, entre outras (BERETZ et al, 1986; GEISER & QUINN, 1988; LEE et al, 1995; ZEMBOWER et al, 1998; KRAUZE-BARANOWSKA et al, 1999; LIN et al, 1999; 2001; BUTTERWECK 2002 et al; KWAK et al, 2002).

2.2.1.3 Elucidação estrutural

Quanto aos métodos de identificação, os biflavonóides apresentam um comportamento semelhante aos monoflavonóides correspondentes, principalmente quando são formados por duas unidades do mesmo grupo.

Podem ser visualizados sob luz UV, e quando são biflavonas com grupos OH livres em C-5, aparecem como manchas escuras em 365 nm, as quais tornam-se amarelas, verdes ou marrons quando observadas após a detecção com ácido difenilbórico, devido à formação de complexos quelados com esse reagente (GEISER & QUINN, 1975).

O espectro no UV tem valor limitado para identificação de biflavonóides quando há dois cromóforos que respondem independentemente aos reativos de deslocamento usuais (GEISER & QUINN, 1975).

Quando as duas unidades são do mesmo tipo, o espectro em metanol exibe duas bandas principais de absorção na região de 240-400 nm, semelhante aos monômeros. Essas duas bandas são denominadas Banda I (300-380 nm), e Banda II (240-280 nm). A banda I é associada com a absorção do anel B (cinamoil), e a Banda II com o anel A (benzoil). O espectro em metanol, particularmente a posição da Banda I, fornece informações sobre o tipo de flavonóide assim como seu padrão de oxigenação (MABRY, 1970).

Segundo Mabry (1970), $\lambda_{\text{máx}}$ entre 300-380 nm para banda I, e 240-280 nm para banda II indicam tratar-se de flavona ou flavonol .

Flavonas ou flavonóis que possuem grupo 4'-OH apresentam um desvio batocrômico na banda I da ordem de 40-65 nm sem variação na intensidade após a adição de NaOMe à solução metanólica (MABRY, 1970).

NaOAc é uma base mais fraca que NaOMe, sendo assim, ioniza apenas os grupos hidroxila mais ácidos, isto é, 3, 7 e 4'-OH. Como a ionização de 7-OH afeta apenas a banda II, enquanto que a ionização de 3 e/ou 4'-OH afeta a banda I, NaOAc é particularmente usado para detecção de 7-OH. Assim, após a adição de NaOAc à solução metanólica de flavonas ou flavonóis contendo 7-OH, ocorre um desvio batocrômico na banda II de 5 a 20 nm (MABRY, 1970).

Grupos ortodihidroxil, exceto em C-5,6, dos núcleos do flavonóide formam quelatos na presença de NaOAc/H₃BO₃. Esta propriedade é empregada especialmente para a caracterização de flavonas e flavonóis contendo grupos ortodihidroxil no anel B. Os espectros UV destes compostos mostram um desvio batocrômico de 12-30 nm na banda I, em relação ao espectro em metanol, após a adição de NaOAc/H₃BO₃ (MABRY, 1970).

Por outro lado, a adição de AlCl₃ forma quelatos tanto com grupamentos ortodihidroxil, quanto entre a carbonila em C-4 e hidroxila em C-5 ou C-3, sendo que os quelatos envolvendo a carbonila são estáveis na presença de HCl. Sendo assim, AlCl₃ e AlCl₃/HCl são utilizados para a identificação de grupos ortodihidroxil no anel-B, e para a caracterização de 5-OH e 3-OH. O espectro AlCl₃/HCl de 5-OH flavona tipicamente consiste em 4 bandas principais de absorção, bandas I, Ia, II e IIa, as quais apresentam desvio batocrômico em relação às suas bandas originais do espectro metanólico, I e II, respectivamente. Isso acontece tanto para os espectros de flavonóides com substituintes 3-OH como 3,5-dihidroxilados. Há uma clara distinção entre a magnitude de desvio batocrômico com AlCl₃/HCl associada com 5-OH flavona (e flavonol contendo -OH na posição C-5 e substituído em C-3) e aquela observada para flavonóides contendo 3-OH. O desvio batocrômico da banda I (em Metanol) para banda Ia (em AlCl₃/HCl) no espectro de flavona com 5-OH e flavonol substituído em C-3 é da ordem de 35-55 nm. Em contraste, o desvio é em torno de 60 nm para flavonóis contendo 3-OH (MABRY, 1970).

O espectro de RMN-¹H para biflavonóides é semelhante ao dos monoflavonóides, ocorrendo geralmente entre $\delta = 0$ e 9 ppm. Se as duas unidades flavonoídicas são compostas por flavonas, o espectro característico para flavonóide com oxigenação nas posições 5, 7 e 4' deve apresentar, para o anel C de um núcleo flavona, o sinal de um singlete entre $\delta = 6,0$ e $\delta = 8,0$ ppm, correspondente ao próton na posição C-3 (H-3).

Os sinais correspondentes aos prótons do anel-B geralmente aparecem na região de $\delta=6,7$ a $\delta=7,9$ ppm, em campo mais baixo que os do anel-A. Com a oxigenação na posição C-4', observa-se um padrão típico de sinais com dois dupletos ($J = 8$ Hz), cada um com integração para dois prótons, sendo que o duplete correspondente aos hidrogênios das posições 3' e 5' sempre aparece em campo mais alto que aquele correspondente às posições 2' e 6', e geralmente na região de $\delta=6,65$ e $\delta=7,10$ ppm. A posição do duplete relacionado aos hidrogênios em C-2' e C-6' depende da oxidação do anel-C. Para flavonas, seu sinal aparece entre $\delta=7,1$ e $\delta=7,9$ ppm (MABRY, 1970).

Os prótons do anel-A (H-6 e H-8) devem dar origem a dois dupletos, com $J = 2,5$ Hz (acoplamento de prótons meta correlacionados), entre $\delta=6,0$ e $\delta=6,5$ ppm, sendo que o sinal do H-6 aparece em campo mais baixo que o sinal para H-8 (MABRY, 1970).

No espectro de RMN- ^{13}C os sinais ocorrem entre δ 0 e 200 ppm. Em flavonas, tanto C-2 como C-3 apresentam deslocamento químico do tipo olefínico, entre $\delta=157,4$ e $\delta=165,8$ para C-2, e $\delta=102,3$ ppm e $\delta=113,7$ ppm, para C-3. A presença da dupla ligação entre esses carbonos resulta em C-2 quaternário e C-3 primário. O deslocamento químico relacionado à carbonila na posição 4 aparece em campo mais alto, entre $\delta=175,2$ e $\delta=183,4$ ppm. Esses valores são usados para diferenciar os tipos de biflavonóides (AGRAWAL, 1989). Os sinais de alguns carbonos quaternários podem aparecer muito fracos, de difícil detecção ou atribuição (GEISER, 1988).

O Espectro de Massas por impacto eletrônico (EM) de flavonóides normalmente apresenta o pico do íon molecular $[M^+]$ como o maior do espectro, podendo-se obter o peso molecular e a composição elementar da molécula (MARKHAM, 1982).

Quanto à fragmentação característica, geralmente são comuns os picos $[M^+-1]$, devido à perda de um hidrogênio, $[M^+-15]$, se há metoxila nos carbonos C-6 ou C-8, $[M^+-17]$, o qual envolve a formação de um anel interno, normalmente associado à presença de hidroxila na posição 2' do anel-B, $[M^+-18]$, indicando a perda de H_2O em flavonol, flavan 3,4-diol e C-glicosídeos, $[M^+-28$ ou $29]$, indicativo de perda de CO [ou CHO] da função 4-ceto, $[M^+-31]$, associado à perda de OCH_3 da

posição 2', $[M^+-43]$, devido à perda de CH_3CO , e $[M^+-55$ ou $56]$, que pode ser indicativo da fragmentação de um substituinte isopentenil (MARKHAM, 1982).

A fragmentação ocorre geralmente por duas vias. Uma delas envolve rearranjo "retro-Diels Alder" no anel-C, produzindo dois fragmentos principais: [anel-A mais o oxigênio da posição 1 e a carbonila do anel-C]⁺ e [anel-B mais os carbonos C2 e C3]⁺. A outra via origina fragmentos derivados dos anéis A e do anel-C, e o fragmento correspondente ao [anel-B ligado ao C2 e ao oxigênio da posição 1]⁺. Entretanto, pode acontecer de nenhuma das duas vias produzirem fragmentos detectáveis (MARKHAM, 1982).

Os biflavonóides comportam-se da mesma forma que os monômeros, sendo que a ligação C-C interflavonoil, por ser estável, não é rompida. Assim, alguns fragmentos de cada monômero podem permanecer unidos. Dependendo do local de ligação entre as duas unidades, podem ser formados fragmentos como [anel-I-A mais II-monômero]⁺, [anel-I-B mais II-monômero]⁺ [anel-I-A mais anel-II-A]⁺, [anel-I-A mais anel-II-B]⁺, entre outros. O pico que apresenta maior intensidade (100%) é aquele correspondente ao fragmento mais estável, sendo denominado *pico base* (MARKHAM, 1982; MURTHY, 1984).

É necessário que o flavonóide seja suficientemente volátil nas condições de pressão e temperatura do espectrômetro, no entanto, os biflavonóides não apresentam essa característica, necessitando muitas vezes de derivatização. Com a utilização de espectro de massas do tipo FAB (*Fast Atom Bombardment*) não há a necessidade da amostra ser derivatizada (MARKHAM, 1982; AGRAWAL, 1989).

2.2.2 Proantocianidinas

Proantocianidinas, taninos condensados ou poliflavanóis são metabólitos secundários derivados do chiquimato, e, assim como os demais flavonóides, são amplamente distribuídos no reino vegetal, principalmente em plantas lenhosas, como as coníferas. Representam de 15 a 39% do total de extrativos solúveis em água de cascas de gimnospermas. São muitas vezes as substâncias responsáveis pelas atividades biológicas e farmacológicas das plantas das quais são isoladas (MATTHEWS et al, 1997; DE BRUYNE et al, 1999).

Quanto à nomenclatura, as proantocianidinas foram definidas primeiramente como sendo “todos os compostos coloridos isolados de plantas os quais quando aquecidos em meio ácido formam antocianidinas”, de coloração vermelha. O termo *leucoantocianidina* foi aplicado aos monômeros do tipo flavan-3,4-diol, e o termo *proantocianidina condensada* aos dímeros e oligômeros de unidades flavan-3-ol (=catequina ou epicatequina). Atualmente, leucoantocianidinas são definidas como “flavanóides monoméricos (flavan-3,4-diol) que formam antocianidinas pela quebra de uma ligação C-O”, e proantocianidinas (dispensando o termo *condensadas*) “flavanóides que produzem antocianidinas pela quebra de uma ligação C-C, sob aquecimento em meio ácido”. Outro tipo de nomenclatura usual é aquela na qual os nomes são formados a partir da estrutura básica dos flavan-3-óis, por exemplo, epicatequina-(4 β →8)-catequina (HASLAM, 1982; PORTER, 1988; HASLAM, 1989; BRUNETON, 1993; SANTOS & MELLO, 2002).

Esses compostos podem apresentar-se como oligômeros ou polímeros polihidroxilados, formados por acoplamento oxidativo de C-4 de uma unidade flavil eletrofílica (flavan-4-ol) ao C-6 ou C-8, principalmente, de uma outra unidade nucleofílica (flavan-3-ol). A ligação (4→8) é favorecida pela estereoquímica. A Figura 5 representa a unidade básica flavan-3-ol (quando R₂= OH) dos taninos condensados (DE BRUYNE, 1999; SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

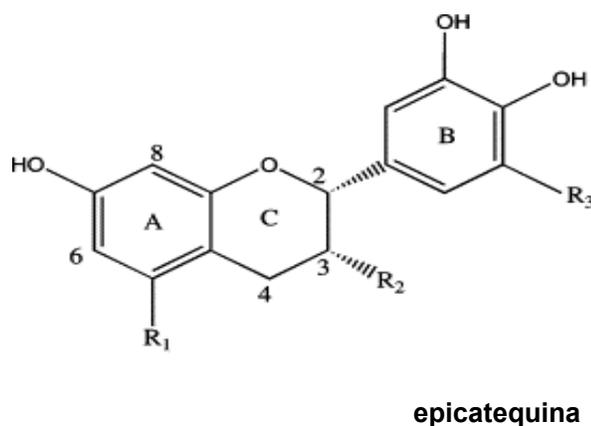


FIGURA 5 - Unidade básica (R₂=OH) dos taninos condensados (FONTE: SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001)

Quadro 2 - Subgrupos de proantocianidinas, segundo o padrão de hidroxilação dos monômeros básicos

SUBGRUPO	HIDROXILAÇÃO	SUBGRUPO	HIDROXILAÇÃO
propelargonidina	3,4',5,7-OH	prorobinetinidina	3,3',4',5',7-OH
procianidina	3,3',4',5,7-OH	proteracacidina	4',7,8-OH (simétrica)
prodelfinidina	3,3',4',5,5',7-OH	promelacacidina	3',4',7,8-OH
proguibourtinidina	3,4',7-OH	proapigeninidina	4',5,7-OH
profisetinidina	3,3',4',7-OH	proluteolinidina	3',4',5,7-OH

As procianidinas são encontradas mais freqüentemente nos troncos, enquanto as prodelfinidinas predominam nas folhas de coníferas (DE BRUYNE, 1999). Na ordem Coniferae, foram encontradas proantocianidinas nas folhas de *Agathis*, da família Araucariaceae (PORTER, 1988).

Há ainda outro tipo de classificação, a qual divide as proantocianidinas em A e B, sendo que as proantocianidinas B ($C_{30}H_{26}O_{12}$) apresentam apenas um tipo de ligação interflavanil C-C, enquanto que as proantocianidinas A ($C_{30}H_{24}O_{12}$) têm uma ligação éter ($2 \rightarrow O \rightarrow 7$) complementar (DE BRUYNE, 1999; SANTOS & MELLO, 2002).

Quanto à estereoquímica dos centros quirais do anel heterocíclico, a maioria apresenta configuração absoluta 2R, e são majoritariamente compostos 2,3-cis. Em C-4 a estereoquímica é determinada pelo padrão de hidroxilação no anel-A, sendo a configuração da ligação interflavanil indicada por α ou β . A ocorrência de isômeros 3,4-cis é rara em procianidinas e prodelfinidinas. A unidade terminal mais comum entre os flavan-3-ol é (+)-catequina (DE BRUYNE, 1999; SANTOS & MELLO, 2002).

2.2.2.2 Importância biológica

Para as proantocianidinas são atribuídas diversas atividades biológicas e farmacológicas importantes, as quais são relacionadas com sua capacidade de formar complexos com íons metálicos e macromoléculas, além de sua capacidade seqüestradora de radicais livres. Interagem de forma seletiva com diferentes alvos moleculares, como receptores β -adrenérgicos, 5-HT e opióides. São atribuídas a essas substâncias ação no sistema cardio-vascular e de inibição enzimática, incluindo enzimas digestivas, atividades antioxidante, antitumoral, antiinflamatória,

antiulcerogênica, antidiarréica, antimicrobiana e antiviral, como atividade anti-herpética, a qual aumenta com o decréscimo da condensação de unidades monoméricas (HASLAM et al, 1996; DE BRUYNE, 1999; SANTOS & MELLO, 2000).

2.2.2.3 Elucidação estrutural

Os métodos analíticos para a identificação de taninos condensados são dificultados pela complexidade estrutural desses compostos. Em CCD, após revelação com vanilina forma-se um produto de coloração vermelha (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

As proantocianidinas diferem-se das demais classes de flavonóides por apresentarem apenas um máximo de absorção na região do UV-VIS, em $\lambda \sim 280$ nm (LUNTE, 1987).

Quanto à elucidação estrutural através de técnicas de RMN-¹³C, Agrawal (1989) apresenta dados de δ referentes aos principais tipos de proantocianidinas. Assim, para uma proantocianidina dimérica, o C-4 envolvido na ligação interflavanil ocorre em aproximadamente $\delta=37$ ppm e $\delta=38$ ppm para uma unidade com estereoquímica 2,3-cis e 2,3-trans, respectivamente. Para unidade sem oxigenação na posição C-5, o valor associado ao C-4 aparece em campo mais baixo, $\delta=41$ a 44 ppm. A presença da ligação interflavanil afeta tanto os carbonos C-6 e C-8 substituídos ($\delta=108$ ppm para C-8 da ligação 4→8, e cerca de 2 ppm em campo mais baixo para C-6 da ligação 4→6) como os não-substituídos (aparecem de 0,5 a 1 ppm em campo mais baixo que o equivalente monômero). O espectro de RMN-¹³C de proantocianidinas geralmente aparece com sinais alargados em relação ao espectro dos correspondentes monômeros, principalmente aqueles sinais relacionados aos anéis A e C. Os sinais também são afetados pela composição do solvente, dificultando assim a comparação com dados da literatura. O espectro de RMN-¹H pode ser de difícil interpretação em compostos não derivatizados devido ao alargamento dos sinais. Através de RMN-¹³C pode-se ter informação sobre a estereoquímica relativa do anel-C, porém se faz necessária a aplicação de espectroscopia CD (dicroísmo circular) para a determinação da estereoquímica absoluta da ligação interflavanil (PORTER, 1988; AGRAWAL, 1989).

3 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa foi o isolamento e a identificação de substâncias ativas em *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, biomonitorado por ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL ESTUDADO

As acículas secas e moídas foram inicialmente submetidas à análise, objetivando a caracterização do material a ser trabalhado. Foram empregados os ensaios farmacopéicos de análise granulométrica, determinação de perda por dessecação, cinzas totais, e teor de flavonóides totais.

4.1.1 Análise granulométrica

A análise granulométrica do material vegetal é empregada como um parâmetro para a padronização de procedimentos extrativos, uma vez que a eficácia de uma extração é dependente do grau de cominuição do material vegetal (FARIAS, 2002).

Na determinação da granulometria, foram obtidas as percentagens de material vegetal que passou através dos tamises, tendo-se calculado a média, o desvio padrão ($\pm s$) e o coeficiente de variação (CV) para o ensaio realizado em triplicata. Os resultados são apresentados para 50 g de planta seca (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados da análise granulométrica do material vegetal

Tamanho da malha (mm)	Análise 1 (%)	Análise 2 (%)	Análise 3 (%)	Média $\pm s$ (%)	CV
> 1,00	23,08	21,26	21,95	22,1 \pm 0,92	4,16
0,84-1,00	10,52	14,52	15,84	13,6 \pm 2,77	20,32
0,59-0,84	13,05	8,52	17,07	12,9 \pm 4,28	33,21
0,40-0,59	14,34	13,43	12,94	13,6 \pm 0,71	5,24
< 0,40	35,06	36,94	39,56	37,2 \pm 2,26	6,08

4.1.2 Determinação da Perda por Dessecação

A perda por dessecação tem por objetivo determinar o percentual de substâncias voláteis a 100°C, no material vegetal. Este ensaio permite uma correlação com o teor de umidade do mesmo, o qual poderá interferir, tanto no procedimento de extração, quanto na conservação do material. O excesso de umidade em matérias primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar a degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias. As Farmacopéias preconizam teores de umidade, entre 8% e 14% para as diferentes espécies de drogas vegetais (FARIAS, 2002).

O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Dados do ensaio de perda por dessecação do material vegetal

Análise	Perda (%)
Análise 1	10,6
Análise 2	10,8
Análise 3	10,6
Média ± s	10,7 ± 0,12
CV	1,08

Portanto, a planta apresentou (10,7 ± 0,12)% de perda por dessecação.

4.1.3 Determinação do teor de Cinzas Totais (F.B. IV)

O ensaio de cinzas permite a verificação do teor de resíduos inorgânicos após a incineração do material. A maioria dos vegetais apresenta teores de cinzas totais em torno de 10%. Valores muito elevados podem caracterizar elevado teor de constituintes inorgânicos ou contaminação por terra ou metais pesados (FARIAS, 2002).

O ensaio foi realizado em triplicata e até peso constante, sendo os dados sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados do ensaio de cinzas totais realizado com o material vegetal

Análise	Cinzas (%)
Análise 1	3,7
Análise 2	3,7
Análise 3	3,7
Média \pm s	3,7 \pm 0,0
CV	0,0

Estes dados indicam um baixo teor de material inorgânico na amostra do material vegetal.

4.1.4 Determinação do teor de flavonóides totais

Considerando-se o objetivo do trabalho de isolamento e caracterização de compostos com potencial ação antiviral, e que as frações com atividade antiviral promissora (Tabela 6) apresentaram reação positiva para flavonóides (Quadro 3), realizou-se a determinação preliminar do teor de flavonóides totais no material vegetal, segundo FRANZ (1992). O ensaio foi realizado por espectroscopia na região do ultravioleta, calculando-se o percentual de flavonóides totais, expresso em hiperosídeo. O método baseia-se na hidrólise de heterosídeos com acetona/HCl em presença de metenamina. Após a hidrólise as agliconas são separadas por partição com acetato de etila. Os flavonóides formam, após a reação com cloreto de alumínio, quelatos de alumínio corados, os quais podem ser quantificados fotométricamente a 425 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, obtendo-se os valores apresentados na Tabela 4.

O teor médio de flavonóides totais expressos como hiperosídeo foi de $0,16 \pm 0,01\%$.

Tratando-se de um ensaio preliminar, não foi considerado o tipo de flavonóide predominante no vegetal, uma vez que estes ainda não eram conhecidos, e conseqüentemente a melhor metodologia de preparação da amostra, bem como o

comprimento de onda para a leitura no UV. Para a quantificação de biflavonóides de *Ginkgo biloba*, o teor de bilobetina foi determinado por CLAE empregando detecção no UV em 330 nm (BEEK, 2002).

Tabela 4 - Teor de flavonóides totais expresso como hiperosídeo em relação à quantidade da droga pesada (e) = 0,6032

Análise	Absorção a 425 nm	Teor de flavonóides (%)
1	0,076	0,16
2	0,071	0,15
3	0,077	0,16
Média ± s	0,16 ± 0,01	
CV	3,69	

4.2 DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA EXTRAÇÃO E FRACIONAMENTO

Para determinar o rendimento do extrato e das frações foi realizada uma maceração empregando-se 100 g do material vegetal, o que originou 1,0 L de EBHA. Com uma alíquota de 100 mL do extrato bruto foi determinada a quantidade de extrato seco, resultando 1,1027 g, e realizada uma partição para a determinação dos rendimentos das frações (Tabela 5). O rendimento da extração foi de 11% de extrato seco em relação à quantidade de material vegetal empregado.

Tabela 5 - Rendimentos das frações da partição. R-I = rendimento em relação ao resíduo seco do EBHA (1,1027 g); R-II = rendimento em relação à quantidade de planta seca (10 g na alíquota de 100 mL)

Fração	Fração (g)	R-I (%)	R-II (%)
FEP	0,0201	1,8	0,2
FDM	0,0721	6,7	0,7
FAE	0,0836	7,8	0,8
FBU	0,1165	10,9	1,1
FAQ	0,6276	58,5	6,2

Os dados mostram rendimentos maiores para as frações FAQ e FBU, indicando a predominância de constituintes polares no extrato bruto.

4.4 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR DO EBHA E DAS FRAÇÕES OBTIDAS POR PARTIÇÃO

A análise fitoquímica preliminar trata-se de reações químicas clássicas de caracterização dos principais grupos de constituintes químicos vegetais.

Essa análise foi realizada com o objetivo de se verificar as classes de constituintes químicos predominantes no EBHA e em cada uma das frações da partição. Este ensaio indicou a presença de polifenóis em todas as frações, e flavonóides nas frações FAE, FBU e FAQ. O aparecimento de coloração amarela na solução alcalina (pH 11) da FAE e da FBU, no teste para antocianidinas, antocianinas e flavonóides, indicou a presença de núcleo flavona, flavonol ou xantona nessas frações (MATOS, 1988), como mostra o Quadro 3.

Apesar do teste para taninos com gelatina apresentar resultado negativo, numa análise posterior realizada com as frações FAE e FBU, a FBU indicou reação de Stiasny positiva, com a formação de precipitado vermelho (flobafeno) característico de taninos condensados.

Quadro 3 - Resultados da análise fitoquímica preliminar do EBHA e das frações da partição

Reações	EBHA	FEP	FDM	FAE	FBu	FAQ
Polifenóis	+	+	+	+	+	+
Cianidina	+	-	-	+	+	+
Taninos	-	X	X	-	-	-
Taninos condensados	X	X	X	(±)	+	X
Taninos hidrolisáveis	X	X	X	-	-	X
Triterpênos	-	-	-	X	X	X
Esteróides	-	-	-	X	X	X
Saponinas	-	X	X	X	X	X
Flavona, flavonol ou xantona	X	X	X	+	+	X

+ resultado positivo; - resultado negativo; X ensaio não realizado; (±) resultado duvidoso

4.5 OBTENÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ATIVAS

Em estudo anterior foi possível estabelecer uma atividade antiviral promissora, caracterizada pelo IS (índice de seletividade = concentração citotóxica 50% / concentração efetiva 50%), para as frações do EBHA das acículas de *Araucaria angustifolia*. Em experimentos iniciais de avaliação da atividade antiviral para o vírus herpético tipo 1, realizados por Freitas (2001) com as frações da partição, a fração acetato de etila (FAE) mostrou valores de IS mais promissores, no entanto, em análises posteriores, a fração n-butanol (FBU) mostrou-se levemente mais ativa (IS=11,0) que a FAE (IS=9,0). Assim, tornou-se interessante uma investigação mais aprofundada sobre as substâncias potencialmente antivirais presentes nessas frações.

Como a FAE e a FBU foram as frações que apresentaram resultados promissores nos ensaios de atividade antiviral, estas foram submetidas aos procedimentos de fracionamento em sucessivas colunas cromatográficas até a purificação das substâncias ativas. Os fracionamentos foram realizados sempre a partir da subfração com maior IS (Índice de Seletividade). A Figura 6 apresenta de forma resumida o processo de isolamento e purificação das substâncias, biomonitorado pelos ensaios biológicos de atividade antiviral. O detalhamento de todas as etapas encontra-se descrito na parte experimental (seção 5.5). Na Figura 7 é apresentada a cromatografia em camada delgada das frações ativas e das substâncias isoladas. Os valores dos IS estão apresentados nas Tabelas 6, 7 e 8.

Os compostos flavonoídicos II-B, II-C e II-D encontram-se tanto na fração FAE quanto na FBU. Comparando-se os procedimentos empregados nos fracionamentos a partir da FAE e da FBU, pode-se concluir que os sistemas aplicados à FAE possibilitaram a melhor separação dos flavonóides. Contudo, as colunas de sílica retiveram irreversivelmente muitas substâncias polares, havendo a possibilidades destas se tratarem de compostos ativos, justificando-se assim a diminuição dos valores de IS a partir da FAE.

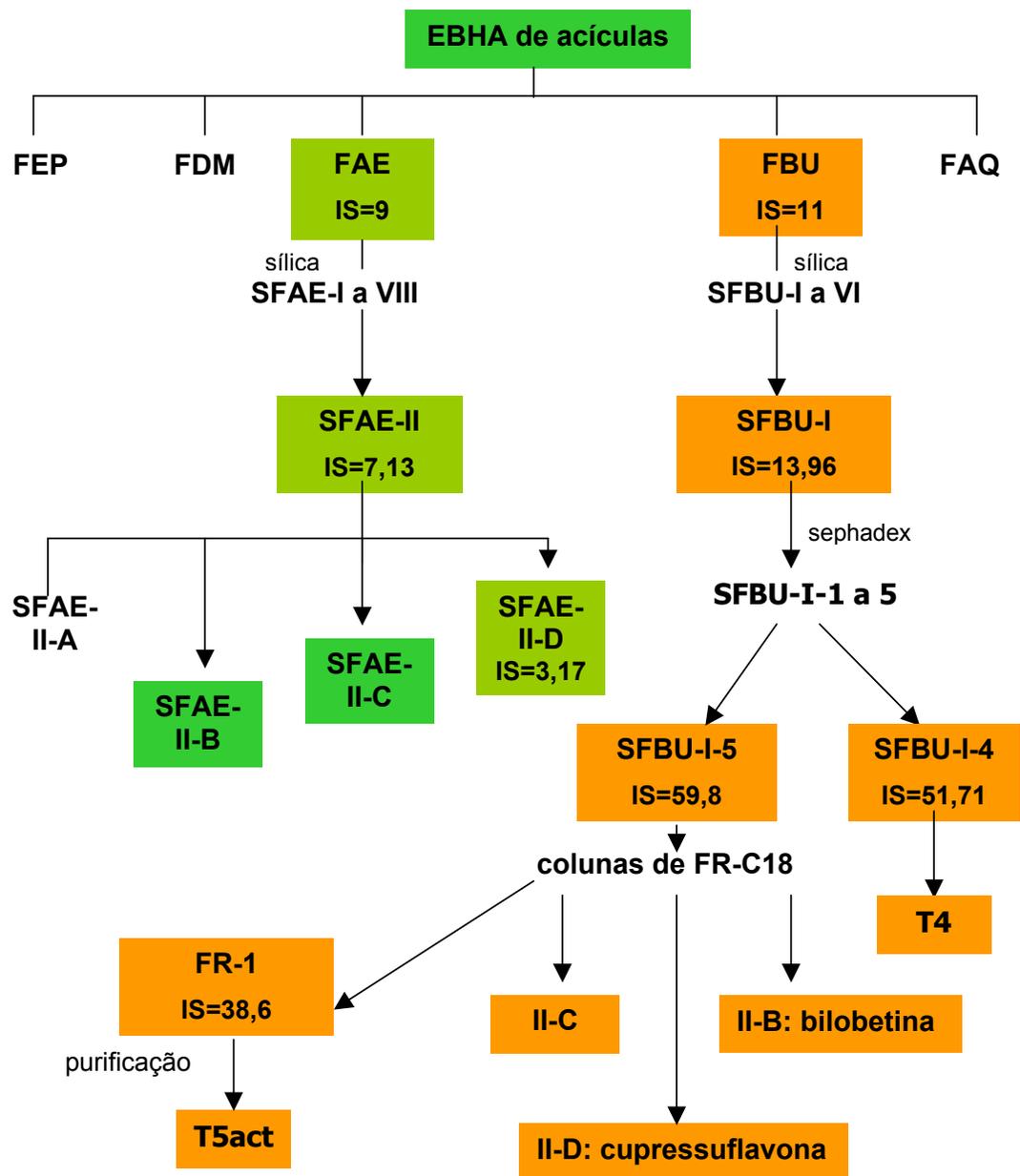


FIGURA 6 – Representação esquemática do processo de isolamento e purificação das substâncias ativas a partir das frações FAE e FBU

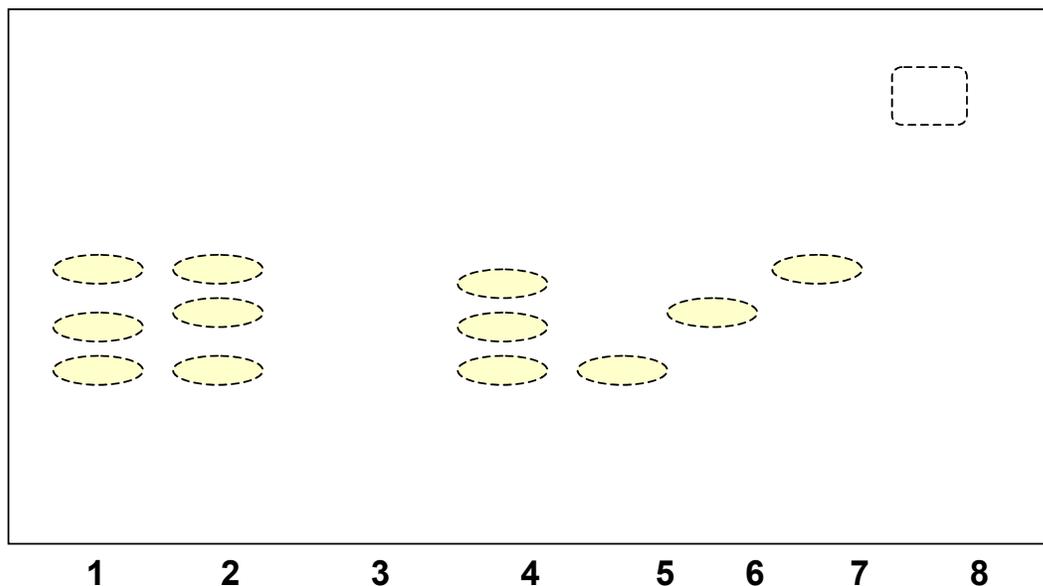


FIGURA 7- CCD em placa de fase reversa C-18 utilizando-se MeOH/H₂O (85%) como eluente. FRAÇÕES: 1, FAE; 2, FBU; 3 FAQ; 4, SFBU-I-5. PADRÕES: 5, II-B; 6, II-C; 7, II-D; 8, FR-1

Já nos procedimentos empregados na purificação da FBU foram utilizados, na maioria das vezes, sistemas cromatográficos capazes de recuperar substâncias de maior polaridade. Assim, os taninos foram isolados a partir da FBU, e os biflavonóides foram obtidos tanto desta fração quanto da FAE. Conseguiu-se maior quantidade dos biflavonóides da FAE, devido ao menor número de colunas empregadas para chegar aos compostos purificados.

Considerando-se a composição química das frações FAE e FBU, sua atividade biológica e o rendimento das mesmas, uma alternativa a ser testada seria eliminar a etapa de partição com acetato de etila, empregando-se diretamente n-butanol.

4.6 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Com o objetivo de realizar o fracionamento biomonitorado pelos ensaios da atividade citotóxica e antiviral, o extrato e as frações foram encaminhados ao Laboratório de Virologia Aplicada da UFSC. Os ensaios a partir das frações FAE e FBU foram realizados pelas mestrandas Adriane Martins de Freitas, a qual executou os ensaios com o EBHA, com as frações da partição e com as subfrações da FAE e Carla Regina Andrighetti Fröhner, que trabalhou com as subfrações da FBU. Ambos os trabalhos foram desenvolvidos sob orientação da Prof^a. Dr^a. Cláudia Maria Oliveira Simões.

Os experimentos com as frações da partição indicam resultados promissores para as frações acetato de etila (FAE) e n-butanol (FBU) (Tabela 6). Quanto ao EBHA, este não apresentou atividade inibitória do ECP (Efeito Citopático) viral (FREITAS et al, 2000, 2001).

A partir desses resultados, ambas as frações FAE e FBU foram empregadas nos procedimentos de fracionamento em coluna cromatográfica, objetivando o isolamento dos constituintes ativos.

Tabela 6 - Resultados dos experimentos de citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral das frações da partição e do EBHA

Frações	CC ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	IS
FEP	111,3	SI	-
FDM	139,6	SI	-
FAE	314,9	35,1	9,00
FBU	139,6	12,7	11,00
FAQ	>500,0	SI	-
EBHA	157,5	SI	-

CC₅₀ = estimativa da concentração citotóxica para 50% das culturas celulares; CE₅₀ = estimativa de concentração efetiva para 50 % das culturas celulares; IS= índice de seletividade;SI= sem inibição do efeito citopático viral (ECP)

Tabela 7 - Resultados dos experimentos de citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral das subfrações da FAE nos ensaios de inibição do efeito citopático (ECP) viral e do ensaio colorimétrico do MTT

Subfrações	INIBIÇÃO DO ECP VIRAL			ENSAIO DO MTT		
	CC ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	IS	CC ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	IS
SFAE-I	>1000	SI	-	NT	NT	NT
SFAE-II	445,40	62,50	7,13	1722,8	417,80	4,24
SFAE-III	445,40	62,50	7,13	1321,10	570,23	2,31
SFAE-IV	680,37	140,31	5,00	NT	NT	NT
SFAE-V	222,70	85,05	2,26	NT	NT	NT
SFAE-VI	561,23	62,50	4,75	NT	NT	NT
SFAE-VII	680,37	140,31	4,85	NT	NT	NT
SFAE-VIII	403,96	70,15	5,76	500,00	185,50	2,66
Aciclovir	>200,00	<1,25	>160	>244,34	> 1,25	>195

Subfrações	INIBIÇÃO DO ECP VIRAL			ENSAIO DO MTT		
	CC ₅₀ (µg/mL)*	CE ₅₀ (µg/mL)*	IS	CC ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	IS
SFAE-II-A	135,0	NT	-	220,0	NT	-
SFAE-II-B	403,9	NT	-	530,0	NT	-
SFAE-II-C	500,0	NT	-	700,0	NT	-
SFAE-II-D	500,0	157,47	3,17	740,0	250,0	2,96
Aciclovir	>200,00	<1,25	>160	>244,34	> 1,25	>195

CC₅₀ = concentração citotóxica a 50% em relação ao controle celular; CE₅₀ = concentração efetiva que inibiu em 50% a replicação do HSV-1 em relação ao controle viral; IS= índice de seletividade; SI= sem inibição do efeito citopático viral; NT= não testado por não apresentar atividade inibitória do ECP viral nos experimentos

Tabela 8 - Resultados dos experimentos de citotoxicidade e avaliação da atividade antiviral das subfrações da FBU, sobre o vírus herpético tipo 1, através do ensaio colorimétrico do MTT

Subfrações	CC ₅₀ µg/mL	CE ₅₀ µg/mL	IS
Subfrações de FBU			
SFBu-I	652,15	46,69	13,96
SFBu-II	587,98	55,19	10,65
SFBu-III	598,44	68,11	8,79
SFBu-IV	707,53	141,85	4,99
SFBu-V	895,56	SI	-
SFBu-VI	646,98	SI	-
Subfrações de SFBU-I			
SFBu I - 1	NT	NT	-
SFBu I - 2	380,26	SI	-
SFBu I - 3	658,01	57,87	11,37
SFBu I - 4	538,87	10,42	51,71
SFBu I - 5	615,33	10,69	57,56
Subfração de SFBU-I-5			
FR-1	729,68	19,12	38,16
Aciclovir	>244,34	> 1,25	>195

CC₅₀ = concentração citotóxica a 50% em relação ao controle celular; CE₅₀ = concentração efetiva que inibiu em 50% a replicação do HSV-1 em relação ao controle viral; IS= índice de seletividade; SI = sem inibição

As frações obtidas da partição do extrato bruto também foram avaliadas quanto à atividade antioxidante nos testes de inibição da xantina oxidase e DPPH. Esses experimentos foram realizados pela doutoranda Ilana Seifriz, sob orientação da Prof^a. Dr^a Tânia B. Creczynski-Pasa.

Nesses ensaios, todas as frações apresentaram resultados promissores, no entanto, aquelas que apresentaram melhores valores para ação antioxidante foram FBU e FAE, no ensaio da xantina oxidase, e FAQ, FBU e FAE, no ensaio com DPPH, respectivamente. Esses dados indicam a importância dos compostos mais polares da planta para a atividade antioxidante (CRECZYNSKI-PASA et al, 2002; MARTINS et al, 2002).

4.7 CARACTERIZAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS.

4.7.1 Elucidação estrutural da substância II-B [1] (4'-O-Metil-amentoflavona)

A substância II-B apresenta-se como uma mancha violeta-escuro ($R_f \sim 0,85$) em CCD ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{IsoprOH } 20/2$) quando visualizada sob luz UV 360 nm, e após revelação com NP/PEG, torna-se amarela no visível (Figura 7). Quando revelada com vapor de amônia e observada sob luz UV 360 nm, praticamente não se observa mudança de cor, o que indica tratar-se de uma flavona ou flavonol com hidroxila na posição C-5 (MABRY, 1970).

Nos experimentos de espectroscopia de UV, a substância II-B apresentou máximos de absorções em $\lambda_{\text{max}} = 329$ e 270 nm (MeOH). Os dados obtidos com os reativos de deslocamento estão apresentados na Quadro 4.

Quadro 4 - λ_{max} apresentados nos espectros no UV, para a substância II-B, empregando-se os reativos de deslocamento, segundo MABRY (1970)

Solução metanólica+reativos	Banda II (nm)	Banda Ila (nm)	Banda I (nm)	Banda Ia (nm)
Metanol	270		329	
NaOMe	274		382	
AlCl_3	280	300	344	386
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	281	300	343	385
NaOAc	273		368	
NaOAc/ H_3BO_3	270		329	

O desvio batocrômico de 53 nm na banda I, após a adição de NaOMe, indica a presença de oxigenação na posição C-4' (MABRY, 1970).

Com a adição de NaOAc, foi observado um desvio batocrômico na banda II de 3 nm com um aumento na intensidade, sugerindo a presença de hidroxila livre na posição C-7.

Na presença de NaOAc/ H_3BO_3 não foi observado um desvio em relação à solução metanólica, indicando a ausência de grupo orto-dihidroxil no anel-B.

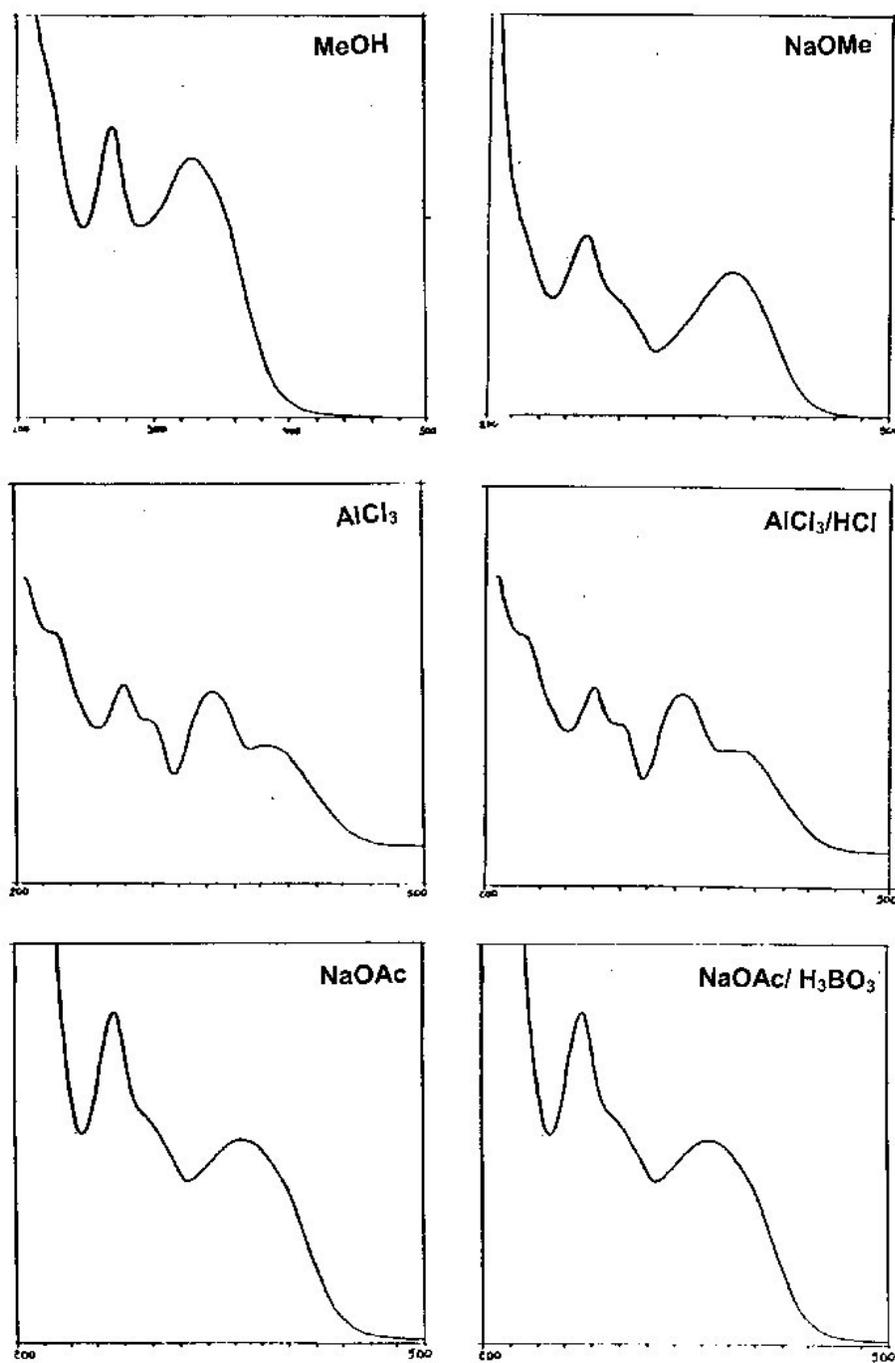


FIGURA 8 – Espectros no UV para a solução metanólica da substância II-B [1], empregando-se os reativos de deslocamento

O desvio batocrômico da ordem de 42 nm da banda I (em Metanol) para banda Ia, após a adição de AlCl_3 sem decomposição após a adição de HCl indica a ausência de grupos ortodihidroxil, e a presença de 5-OH livre.

Esses dados sugerem tratar-se de uma flavona ou flavonol com hidroxilas nas posições 5, 7 e 4' (Figura 8).

Nos espectros de RMN- ^{13}C , em acetona- d_6 , pode-se constatar a presença de 28 sinais de carbonos característicos de compostos flavonoídicos, sugerindo tratar-se de uma biflavona (Figura 9). São observados sinais entre $\delta=94,8$ e $\delta=131,5$ ppm, relacionados a todos os carbonos primários dos anéis A, B e C do flavonóide, além dos carbonos quaternários não oxigenados. Através do experimento DEPT-135 pode-se constatar oito sinais para carbonos quaternários oxigenados entre $\delta=158,5$ e $\delta=165,0$ ppm, além de dois sinais relacionados a carbonilas de flavonas em C-4 (nas unidades I e II), os quais se apresentam em campo mais baixo no espectro em $\delta=182,9$ e $\delta=183,3$ ppm, o que está de acordo com a proposta de um biflavonóide. A hipótese de biflavona pode ser confirmada pelos experimentos de correlação HMQC, HMBC e COSY, apresentados nas Figuras 11, 12 e 13 (AGRAWAL, 1989).

Os sinais de carbonos primários que indicam tratar-se de núcleo flavona aparecem tipicamente em $\delta=103,0$ e $\delta=104,1$ ppm, correlacionando-se com os prótons no espectro de RMN- ^1H (Figura 10) em $\delta=6,66$ ppm e $\delta=6,76$ ppm atribuídos aos prótons I-H-3 e II-H-3, respectivamente (AGRAWAL, 1989; MABRY, 1970).

Quanto aos anéis-A, tem-se para um deles a presença de dois dupletos acoplado-se com $J = 2,5\text{Hz}$, em $\delta=6,24$ ppm e $\delta=6,47$ ppm, os quais relacionam-se com os carbonos em $\delta=99,6$ ppm (I-C-6) e $\delta=94,8$ ppm (I-C-8), respectivamente. Isso mostra um anel-A (anel-A-I) 5,7-disubstituído, com hidrogênios nas posições C-6 e C-8. Para o outro anel-A (anel-A-II), aparece apenas um singlete em $\delta=6,45$ ppm, correlacionando-se com o carbono em $\delta=99,3$ ppm (II-C-6). Além disso, aparece um sinal de carbono quaternário em $\delta=104,7$ ppm, correspondente ao II-C-8 de uma ligação interflavonoil (AGRAWAL, 1989).

Para um anel-B (anel-II-B, já que a ligação interflavonoil da unidade II se faz no anel-A-II) aparecem sinais característicos de oxigenação na posição II-C-4', com dois pares de dupletos ($J = 9\text{Hz}$) em $\delta=6,83$ ppm e $\delta=7,59$ ppm, acoplado-se com

os carbonos em $\delta=116,5$ ppm e $\delta=128,7$ ppm, respectivamente nas posições II-C-3'/5' e II-C-2'/6' (AGRAWAL, 1989).

Para o anel-B-I, aparece um duplete de duplete ($J = 2,5$ e 9Hz) que acopla com os dupletos em $\delta=8,10$ ppm ($J = 2,5$ Hz) e $\delta=7,37$ ppm ($J = 9$ Hz), sendo que estes acoplam com os carbonos em $\delta=128,9$ ppm, $\delta=131,5$ ppm e $\delta=112,3$ ppm, respectivamente nas posições I-C-2', I-C-6' e I-C-3'. Isso mostra que não há próton na posição I-C-5', e, juntamente com o fato de haver um sinal para carbono quaternário em $\delta=123,5$ ppm, em campo mais baixo que um I-C-5' primário, atribui-se que a ligação interflavonoil na unidade I está na posição C-5', o que sugere a estrutura de biflavonóide do tipo amentoflavona, ou seja, ligação I-5'-II-8 (AGRAWAL, 1989).

Através do experimento de HMQC (C-H), Figura 11, pode-se correlacionar diretamente o sinal de carbono terciário que aparece em campo mais alto no espectro, em $\delta=56,2$ ppm, com o sinal de próton característico para hidrogênios de metoxila, um singleto em $\delta=3,85$ ppm. No experimento de HMBC, por sua vez, o sinal em $\delta=56,2$ ppm correlaciona-se, a longa distância, com o carbono em $\delta=162,5$ ppm, o qual está relacionado ao I-C-4'. No experimento de COSY, os prótons da metoxila correlacionam-se fracamente apenas com o sinal correspondente ao hidrogênio na posição I-C-3'. Isso sugere que a metila está ligada ao oxigênio na posição I-C-4', e que não há hidrogênio vizinho, ou seja, na posição I-C-5'.

Os acoplamentos entre carbono e hidrogênios foram obtidos através dos experimentos HMQC (H-C) HMBC (H-C de longa distância) e COSY (H-H), Figuras 11, 12 e 13. Outras atribuições dos dados de RMN-¹³C foram finalmente confirmadas por comparação com a literatura (MARKHAM, 1987) e são apresentadas no Quadro 5.

Portanto, para a substância II-B foi atribuída a estrutura da 4'-O-Metil-amentoflavona = bilobetina **[1]**, uma biflavona com ligação interflavonoil entre os carbonos I-C-5' e II-C-8 (MARKHAM, 1987)

Quadro 5 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , em acetona- d_6 , para a substância II-B [1] (4'-O-Metil-amentoflavona), comparativamente à bilobetina (MARKHAM, 1987)

RMN- ^{13}C (acetona- d_6 , 125 MHz)			MARKHAM, 1987*	RMN- ^1H (acetona- d_6 , 500 MHz)				
C	δ [ppm]	DEPT	δ [ppm] DMSO- d_6	H	δ (ppm)	I	M	J (Hz)
I-2	161,6	C	163,3	-	-	-	-	-
I-3	104,1	CH	103,6	I-H-3	6,76	1	S	-
I-4	182,9	C=O	181,7	-	-	-	-	-
I-5	164,8	C	161,4	OH	-	-	-	-
I-6	99,6	CH	98,6	I-H-6	6,24	1	D	2,5
I-7	164,9	C	163,5	OH	-	-	-	-
I-8	94,8	CH	94,1	I-H-8	6,47	1	D	2,5
I-9	158,5	C	157,4	-	-	-	-	-
I-10	N.O.	C	103,8	-	-	-	-	-
I-1'	122,3	C	122,5	-	-	-	-	-
I-2'	128,9	CH	128,0	I-H-2'	8,17		DD	2,5 / 9
I-3'	112,3	CH	111,7	I-H-3'	7,37	1	D	9
I-4'	162,5	C	160,6	OMe-4'	3,85	1	S	-
I-5'	123,5	C-C	121,6					
I-6'	131,5	CH	130,9	I-H-6'	8,08	1	D	2,5
II-2	N.O.	C	164,2	-	-	-	-	-
II-3	103,0	CH	102,5	II-H-3	6,66	1	S	
II-4	183,3	C=O	182,0	-	-	-	-	-
II-5	161,8	C	160,4	OH	-	-	-	-
II-6	99,3	CH	98,9	II-H-6	6,45	1	S	-
II-7	165,0	C	161,6	OH	-	-	-	-
II-8	104,7	C-C	103,7	-	-	-	-	-
II-9	N.O.	C	154,3	-	-	-	-	-
II-10	N.O.	C	103,6	-	-	-	-	-
II-1'	122,6	C	121,2	-	-	-	-	-
II-2'	128,7	CH	128,0	II-H-2'	7,59	1	D	9
II-3'	116,5	CH	115,8	II-H-3'	6,83	1	D	9
II-4'	162,5	C	161,0	OH	-	-	-	-
II-5'	116,5	CH	115,8	II-H-5'	6,83	1	D	9
II-6'	128,7	CH	128	II-H-6'	7,59	1	D	9
CH3	56,2	CH ₃	-	CH ₃	3,85	3	S	-

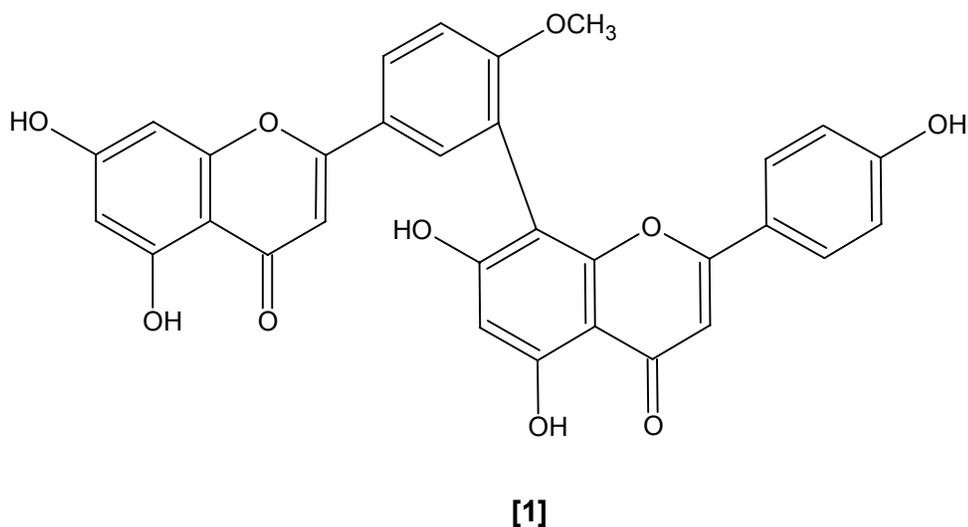
* Dados de RMN- ^{13}C para bilobetina (MARKHAM, 1987)

N.O. = sinal não observado

D (= duplete), S (= singlete), DD (= duplete de duplete)

C = carbono correspondente; δ = valor do deslocamento químico; **H** = hidrogênio correspondente; **M** = Multiplicidade; **I** = Integração; **J** = constante de acoplamento

Para confirmação estrutural da substância II-B, foi realizado o espectro de massas (EM) do tipo FAB, no qual pode-se observar o pico em $m/z= 553,1$ correspondente ao pico do íon molecular $[M+1]^+$. O pico em $m/z= 460,1$ é formado com a perda de 93 u.m.a. da molécula (correspondente ao anel-II-B. O pico em $m/z= 307,1$ (pico base) corresponde à perda de 153 u.m.a. (correspondente ao anel-I-A mais oxigênio da posição 1 e carbonila do anel-I-C) a partir do fragmento em $m/z= 460,1$, envolvendo um rearranjo “retro Diels Alders”. O pico base representa o fragmento mais estável da molécula e confirma a proposta de ligação interflavonoil entre os anéis I-B e II-A, assim como a presença da metoxila. O pico em $m/z= 289$ representa a perda de uma molécula de H_2O a partir do fragmento em $m/z= 307,1$ (Figura 14).



Bilobetina ($C_{31}H_{20}O_{10}$) foi identificada em Pteridophytae (SILVA et al, 1995), Gymnospermae (Cycadaceae, Zamiaceae, Ginkgoales, Taxodiaceae, Cupressaceae, Podocarpaceae, e Araucariaceae) e Angiospermae (Meliaceae) (GEIGER & QUINN, 1988; HE et al, 1996). As biflavonas do tipo amentoflavona são isômeros daquelas do tipo robustaflavona (ver Figura 4).

Na família Araucariaceae, foi identificada na espécie *Araucaria bidwillii* (KHAN et al, 1972; ILYAS et al, 1978).

À bilobetina foi atribuída atividade inibidora linfocitária (LEE et al, 1995).

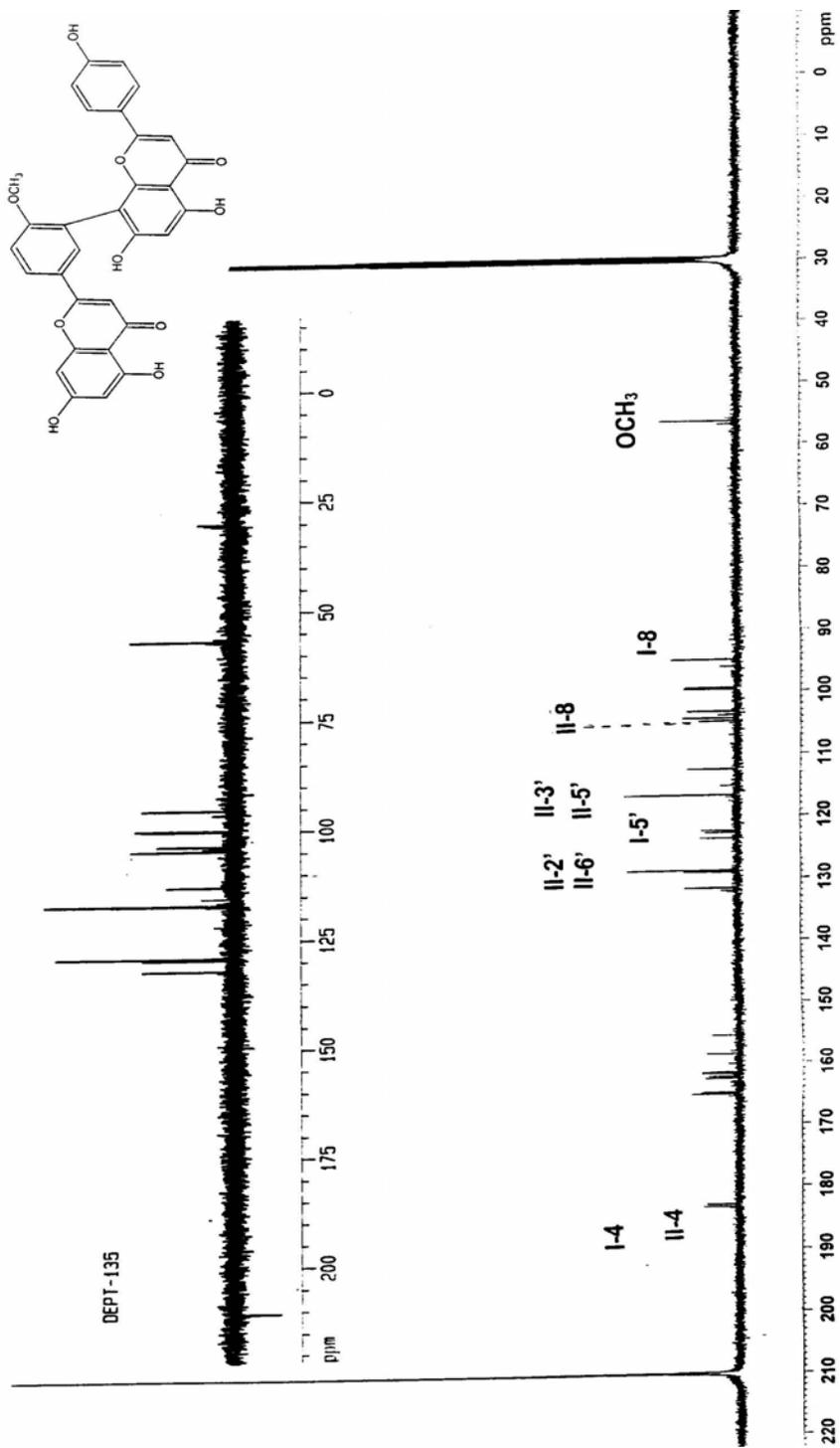


FIGURA 9 - Espectro ^{13}C -RMN e DEPT-135 em acetona- d_6 da substância II-B

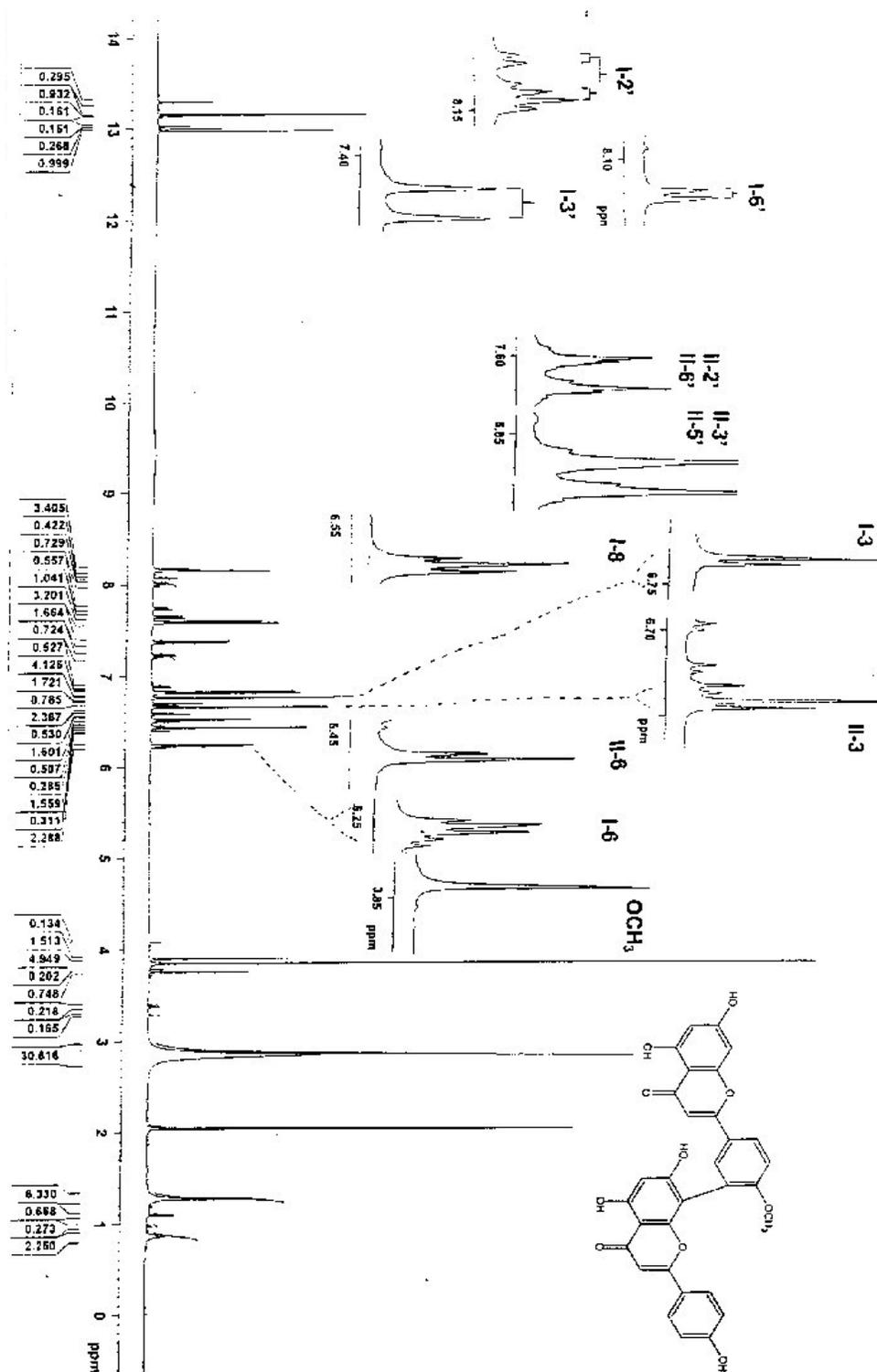


FIGURA 10 - Espectro ¹H-RMN em acetona-d₆ da substância II-B

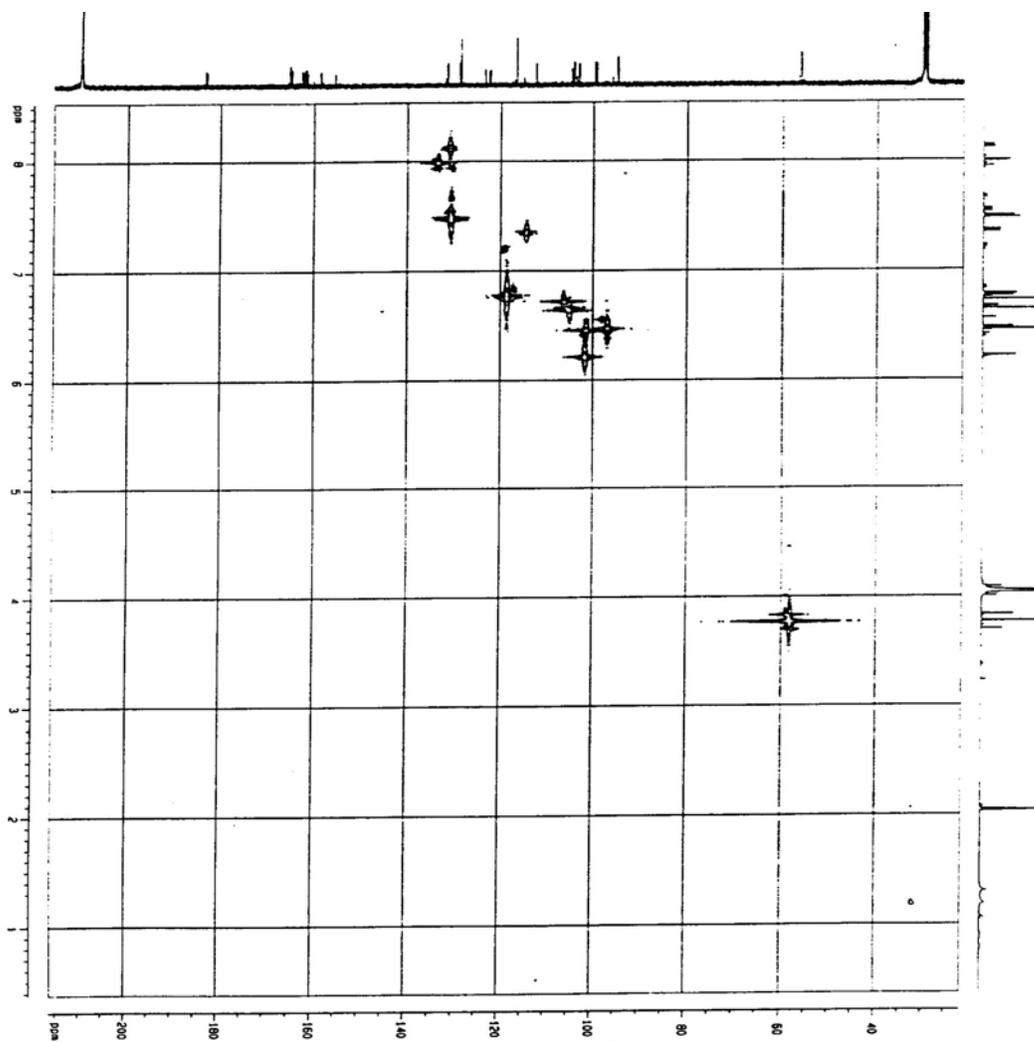


FIGURA 11 – Espectro HMQC em acetona -d₆ da substância II-B

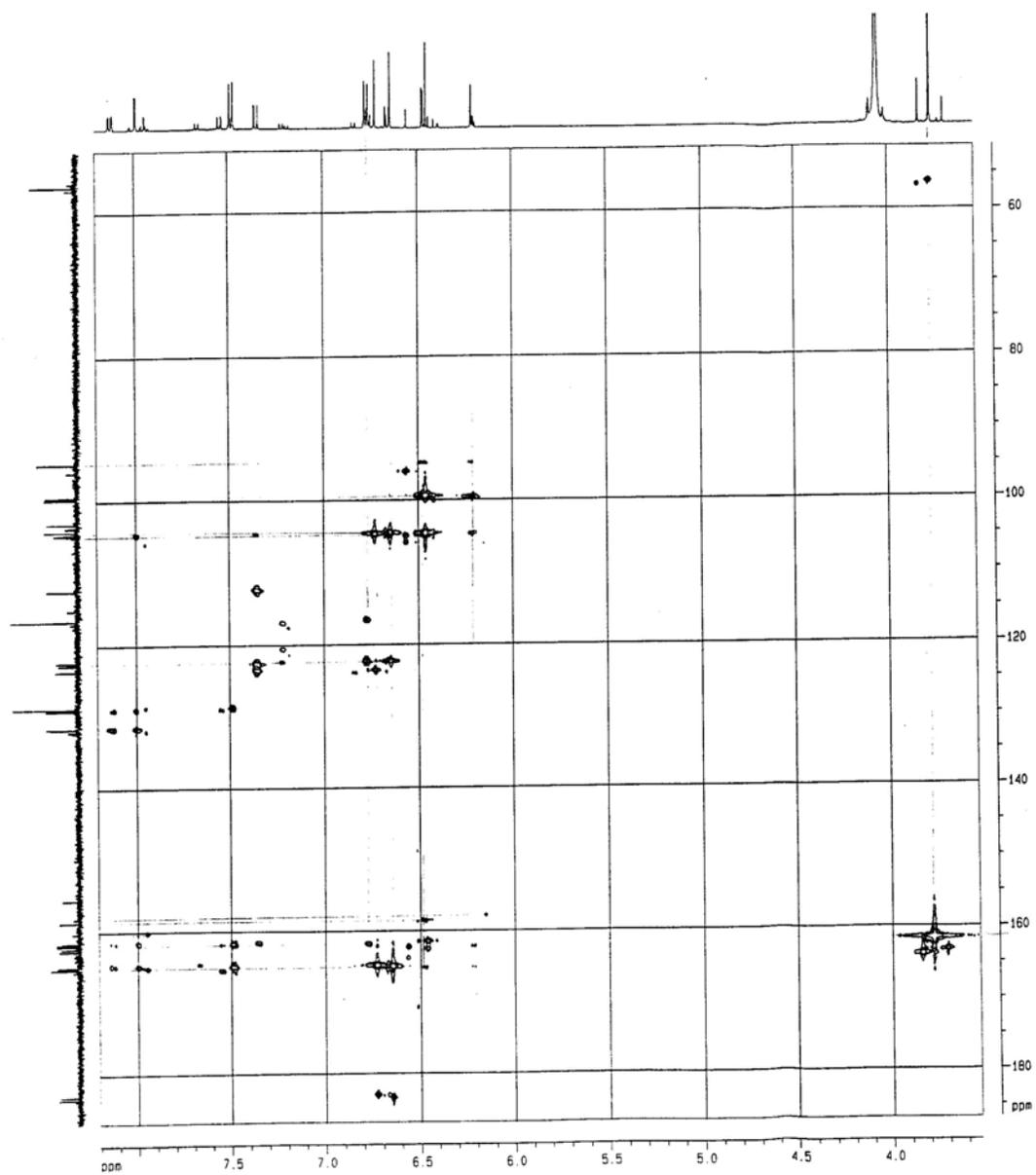


FIGURA 12 – Espectro HMBC em acetona -d₆ da substância II-B

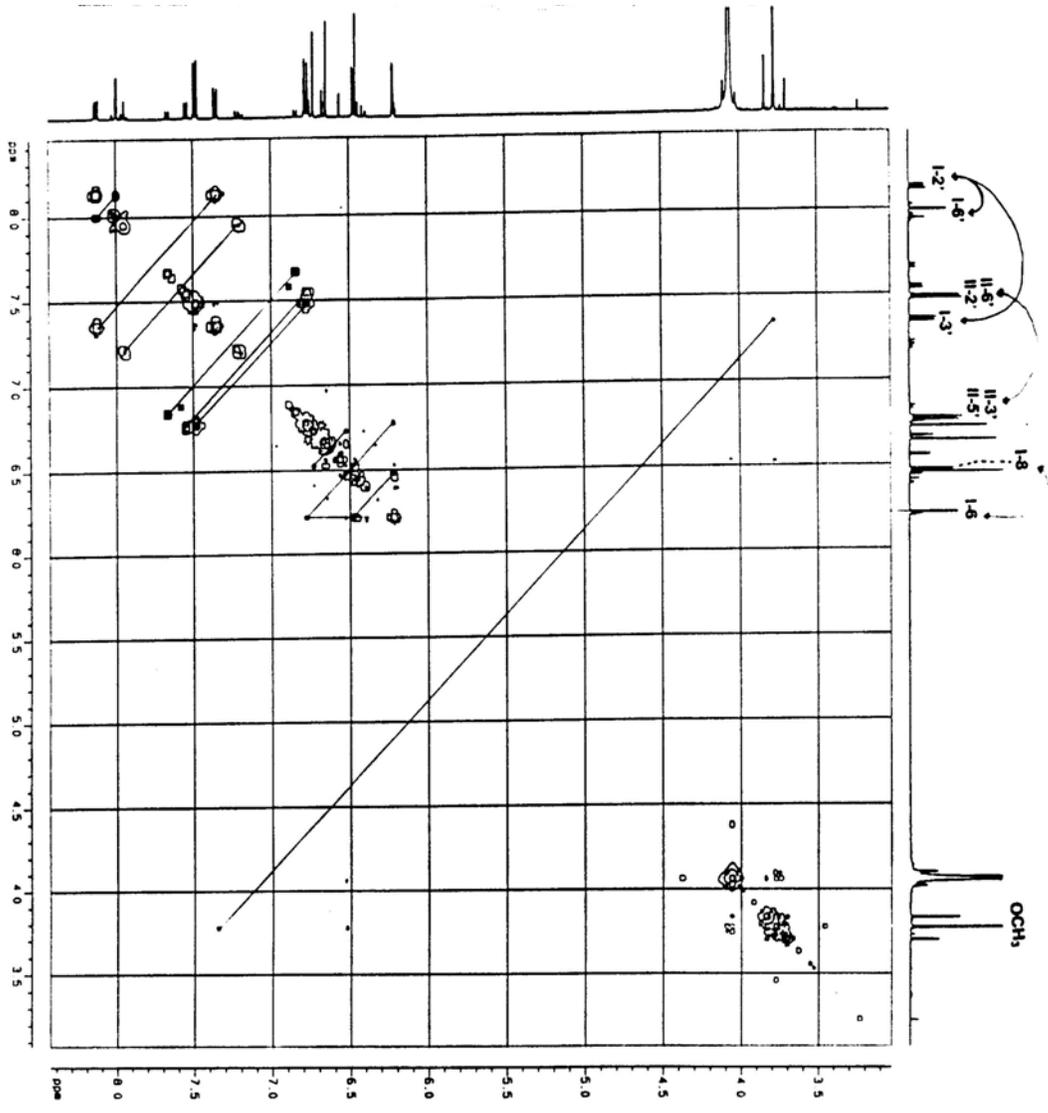


FIGURA 13 – Espectro COSY em acetona -d₆ da substância II-B

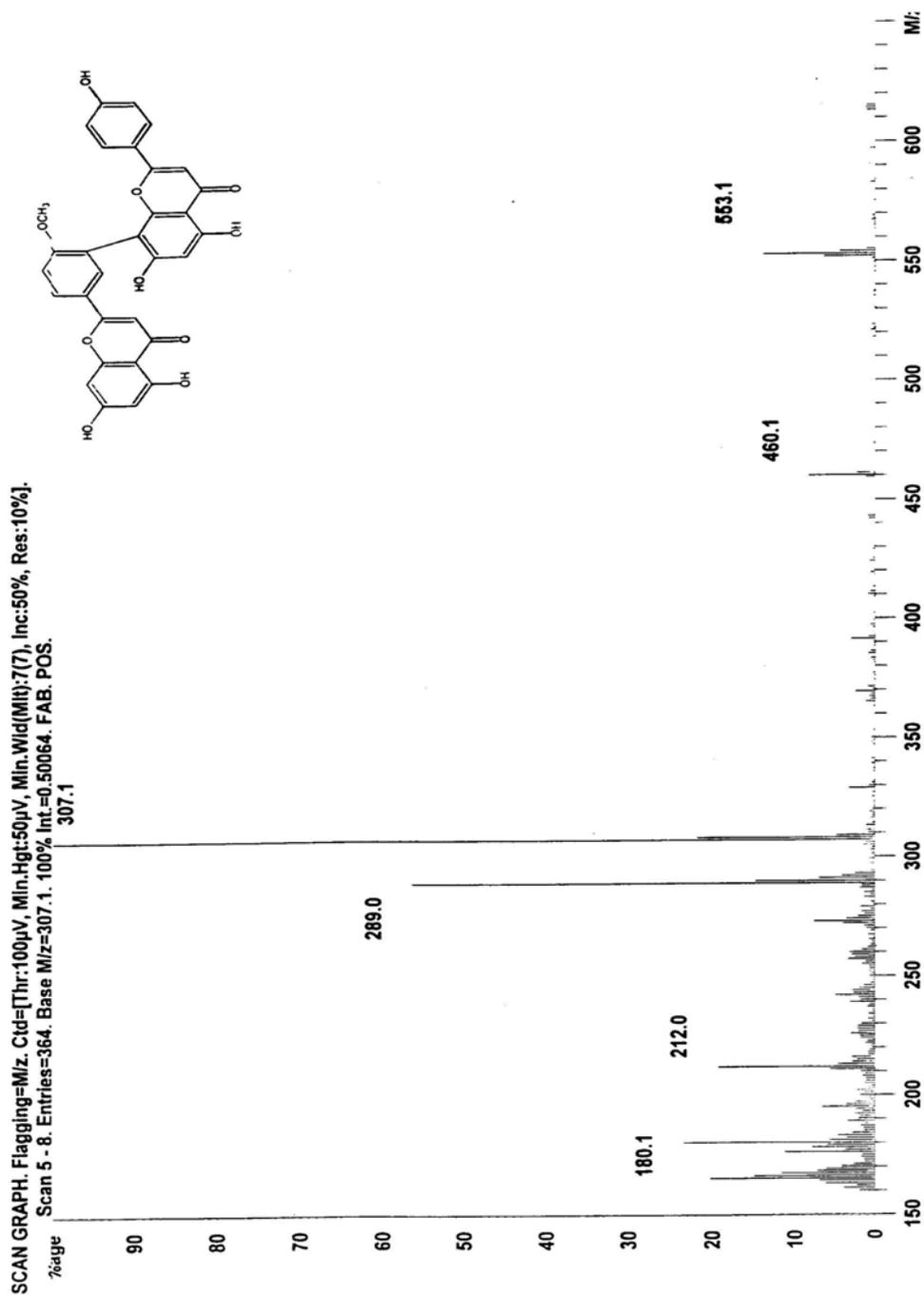


FIGURA 14 – Espectro de Massas FAB da substância II-B

4.7.2 Elucidação estrutural da substância II-D [2] (cupressuflavona)

A substância II-D apresenta-se como uma mancha violeta-escuro ($R_f \sim 0,5$) em CCD ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{IsoprOH } 20/2$) quando visualizada sob luz UV 360 nm, e após revelação com NP/PEG, torna-se amarela no visível (Figura 7). Quando revelada com vapor de amônia e observada sob luz UV 360nm, praticamente não se observa mudança de cor, o que indica tratar-se de uma flavona ou flavonol com hidroxila na posição C-5 (MABRY, 1970).

Nos experimentos de espectroscopia de UV, a solução metanólica apresentou absorções em $\lambda_{\text{máx}} = 332$ e 270 nm (Figura 15), o que é característico de flavonas. Os dados obtidos com os reativos de deslocamento são apresentados no Quadro 6.

Quadro 6 - $\lambda_{\text{máx}}$ - apresentados nos espectros no U.V., para a substância II-D [2], empregando-se os reativos de deslocamento, segundo MABRY (1970)

Solução metanólica+reativos	Banda II* (nm)	Banda Ila (nm)	Banda I* (nm)	Banda Ia (nm)
Metanol	270		332	
NaOMe	273		392	
AlCl_3	279	299	345	382
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	279	299	345	382
NaOAc	271		340	
NaOAc/ H_3BO_3	269		333	

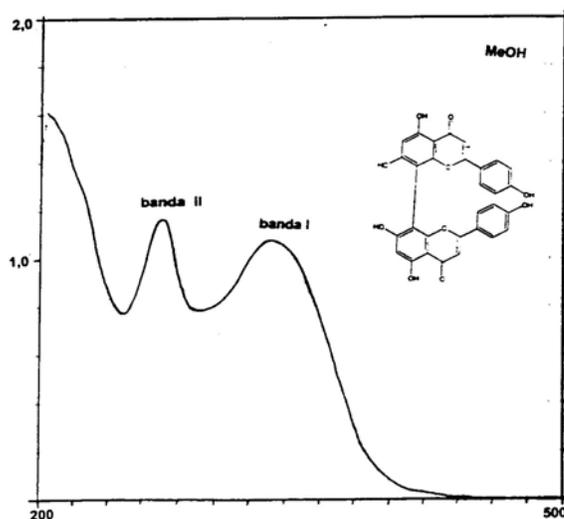


FIGURA 15 - Espectro no UV da solução metanólica da substância II-D [2]

A adição de MeONa na solução metanólica levou a um desvio batocrômico de 60 nm na absorção da banda I, indicando a presença de hidroxila na posição C-4'. A adição de NaOAc causou um desvio batocrômico muito pequeno da banda II (1 nm), não sendo significativo para sugerir-se a presença de grupo hidroxil livre na posição C-7. Os dados de deslocamentos com os reativos AlCl_3/HCl e $\text{NaOAc}/\text{H}_3\text{BO}_3$ indicam a presença de 5-OH e a ausência de sistema 3', 4'-ortodihidroxil (MABRY, 1970). A partir dos dados de espectroscopia no UV propõe-se para a substância II-D a estrutura de uma flavona com hidroxilas nas posições 5, 7 e 4', devendo ser confirmada por outros experimentos (MABRY, 1970).

O espectro de RMN- ^1H mostra-se característico para flavonóide com oxigenação nas posições 5, 7 e 4'. O singlete em $\delta=6,79$ ppm, referente ao próton da posição C-3, confirma tratar-se de núcleo flavona, isto é, a presença de ligação dupla entre os carbonos 2 e 3 do anel C (MABRY, 1970, AGRAWAL, 1989).

Nos espectros de RMN- ^1H , em DMSO-d_6 e $\text{DMSO-d}_6/\text{D}_2\text{O}$ (Quadro 7, Figuras 16 e 17), são observados três sinais característicos para hidroxilas, sendo aquele que aparece em campo mais baixo característico de hidroxila ligada ao C-5. Isso pode ser observado quando utiliza-se DMSO-d_6 como solvente e, após a adição de pequena quantidade de D_2O , ocorre uma rápida troca de próton por deutério nas hidroxilas fenólicas, deixando-se de detectar seus sinais de prótons (MABRY, 1970).

Os pares de dupletos que são observados em $\delta=7,5$ ppm e $\delta=6,75$ ppm, com integração de dois prótons cada, e $J = 8$ Hz, são característicos para hidrogênios correlacionados em posição orto, sendo atribuídos aos hidrogênios H-2'/6' e H-3'/5', respectivamente, caracterizando o anel-B oxigenado na posição 4'.

O padrão de substituição do anel-A, sendo definido pelo singlete em $\delta=6,45$ ppm, correspondente ao próton H-6 sem acoplamentos, indica a ausência de hidrogênio na posição C-8.

Nos espectros de RMN- ^{13}C , em DMSO-d_6 , pode-se constatar a presença de 15 sinais de carbonos característicos de flavonóides (Figura 18).

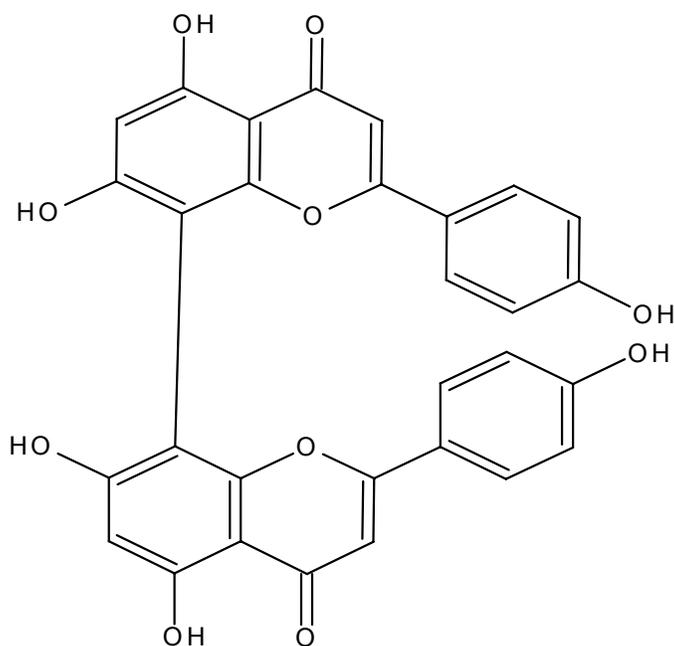
Os deslocamentos químicos em $\delta=182,0$ ppm, $\delta=163,7$ ppm e $\delta=102,8$ ppm caracterizam o núcleo flavona, correspondendo aos carbonos C-4, C-2 e C-3 do anel-C, respectivamente. Juntamente com os demais sinais de carbonos, tem-se uma flavona do tipo apigenina, no entanto, através do experimento DEPT-135, pode-se observar que o C-8 aparece como um carbono quaternário, além de

apresentar o deslocamento químico em $\delta=98,7$ ppm, cerca de 5 ppm em campo mais baixo em relação ao C-8 da apigenina ($\delta=94,0$ ppm). Isso é indicativo de ligação interflavonoil do tipo cupressuflavona (I-8, II-8), uma biflavona simétrica (AGRAWAL,1989).

Os acoplamentos entre carbono e hidrogênios foram obtidos através dos experimentos HMQC (H-C) e COSY (H-H), e podem ser observados nas Figuras 19, 20.

Outras atribuições dos dados de RMN- ^{13}C foram finalmente confirmadas por comparação com a literatura (AGRAWAL, 1989), e são apresentadas no Quadro 7.

Portanto, para a substância II-D sugere-se a estrutura da cupressuflavona **[2]** ($\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$), uma biflavona formada por duas unidades de apigenina ligadas pelos respectivos carbonos I-C-8 e II-C8.



[2]

Quadro 7 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C , em DMSO- d_6 , para a substância II-D [2] (=cupressuflavona), em DMSO- d_6 , comparativamente à literatura (AGRAWAL, 1989)

RMN- ^{13}C (DMSO- d_6 , 125 MHz)			AGRAWAL 1989*	RMN- ^1H (acetona- d_6 , 500 MHz)				
C	δ [ppm]	DEPT	δ [ppm] DMSO- d_6	H	δ (ppm)	I	M	J (Hz)
I-2, II-2	163,7	C	163,7	-	-	-	-	-
I-3, II-3	102,8	CH	102,8	I-H-3	6,79	1	S	-
I-4, II-4	182,2	C	182,1	-	-	-	-	-
I-5, II-5	161,2	C	161,3	I-OH-5	13,16	1	S	-
I-6, II-6	98,8	CH	99,0	I-H-6	6,45	1	S	-
I-7, II-7	163,0	C	162,7	I-OH-7	10,90	1	S	-
I-8, II-8	98,7	C-C	98,7	-	-	-	-	-
I-9, II-9	155,0	C	155,3	-	-	-	-	-
I-10, II-10	103,9	C	104,3	-	-	-	-	-
I-1', II-1'	121,4	C	121,7	-	-	-	-	-
I-2', II-2'	128,1	CH	129,9	I-H-2'	7,50	1	D	8
I-3', II-3'	116,0	CH	116,1	I-H-3'	6,75	1	D	8
I-4', II-4'	161,0	C	161,1	I-OH-4'	10,30	1	S	-
I-5', II-5'	116,0	CH	116,1	I-H-5'	6,75	1	D	8
I-6', II-6'	128,1	CH	127,9	I-H-6'	7,50	1	D	8

* Dados de RMN- ^{13}C para cupressuflavona (AGRAWAL, 1989)

D (= duplete), S (= singleto), DD (= duplete de duplete)

C = carbono correspondente; δ = valor do deslocamento químico; H = hidrogênio correspondente; M = Multiplicidade; I = Integração; J = constante de acoplamento

Cupressuflavona ($\text{C}_{30}\text{H}_{18}\text{O}_{10}$), foi identificada em alguns gêneros de Pteridophytae, Gymnospermae (Cycadaceae, Zamiaceae, Ginkgoales, Taxales, Cupressaceae, Taxodiaceae, Podocarpaceae, Cephalotaxaceae e Araucariaceae) e Angiospermae (Nandinaceae, Euphorbiaceae, Clusiaceae, Calophyllioidae, Anacardiaceae, Caprifoliaceae e Iridaceae, Salicaceae) (ANSARI, 1985; GEIGER & QUINN, 1988; KHAN et al 1972).

Na família Araucariaceae, aparece nos gêneros *Agathis* e *Araucaria* (*Araucaria cunninghamii*, *Araucaria cookii*, *Araucaria excelsa*, *Araucaria bidwillii*) (ILYAS et al, 1978; OFMAN, 1995).

A cupressuflavona foram atribuídas atividades antifúngica (KRAUZE-BARANOWSKA, 1999) e ação antagonista de bradicinina (RAMASWAMY & BASU, 1972)

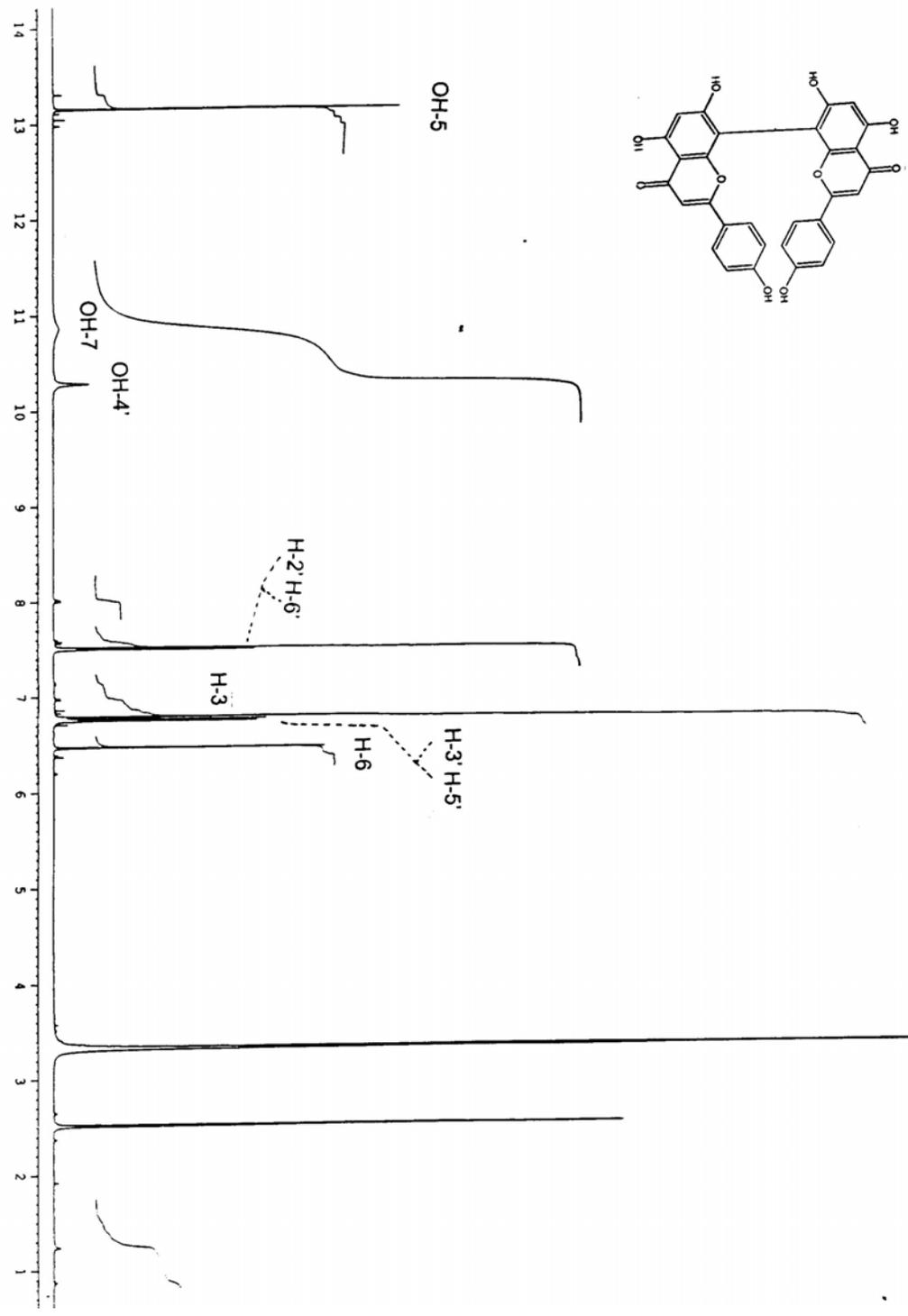


FIGURA 16 - Espectro ^1H -RMN em DMSO-d_6 da substância II-D

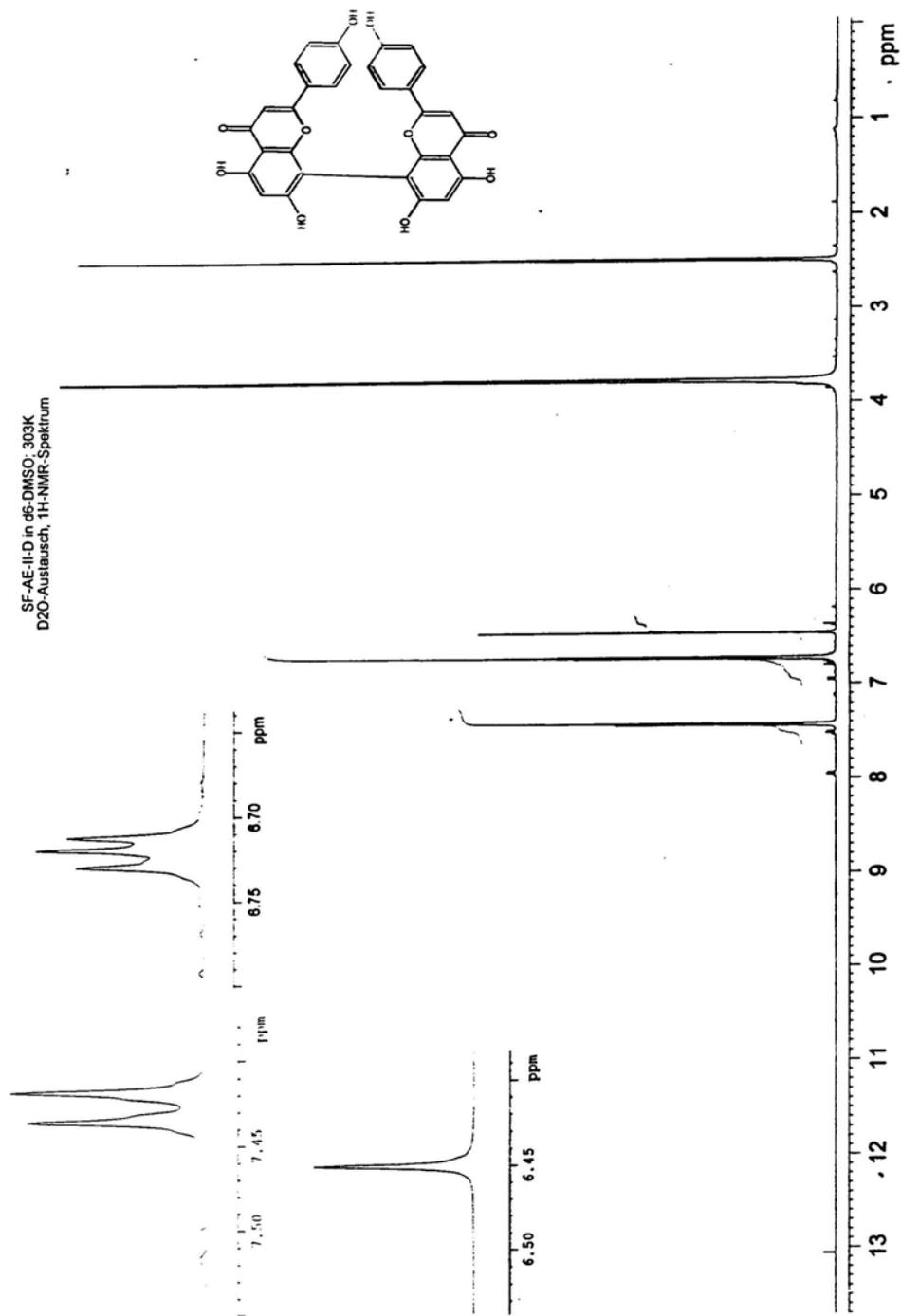


FIGURA 17 - Espectro ¹H-RMN em DMSO-d₆/D₂O da substância II-D

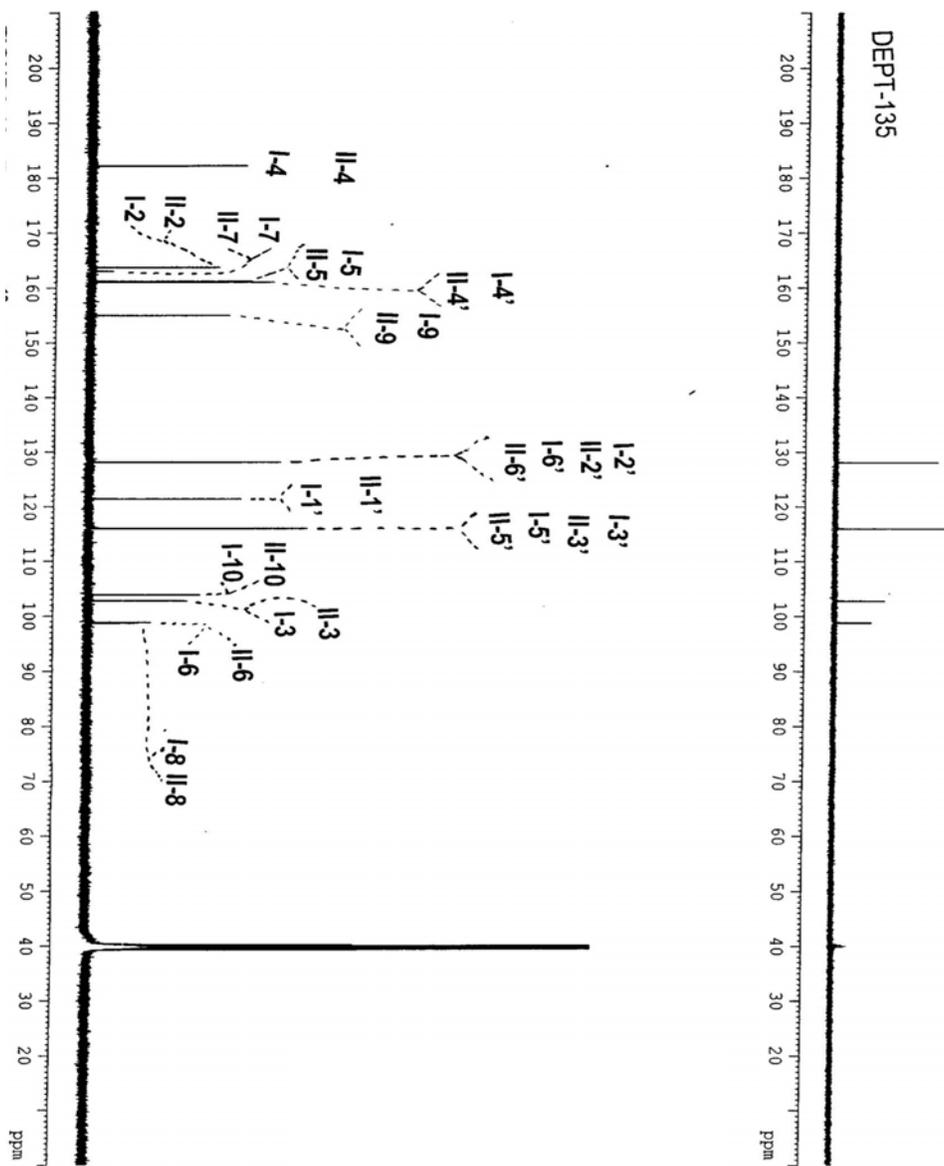


FIGURA 18 - Espectro ^{13}C -RMN e DEPT-135 em DMSO- d_6 da substância II-D

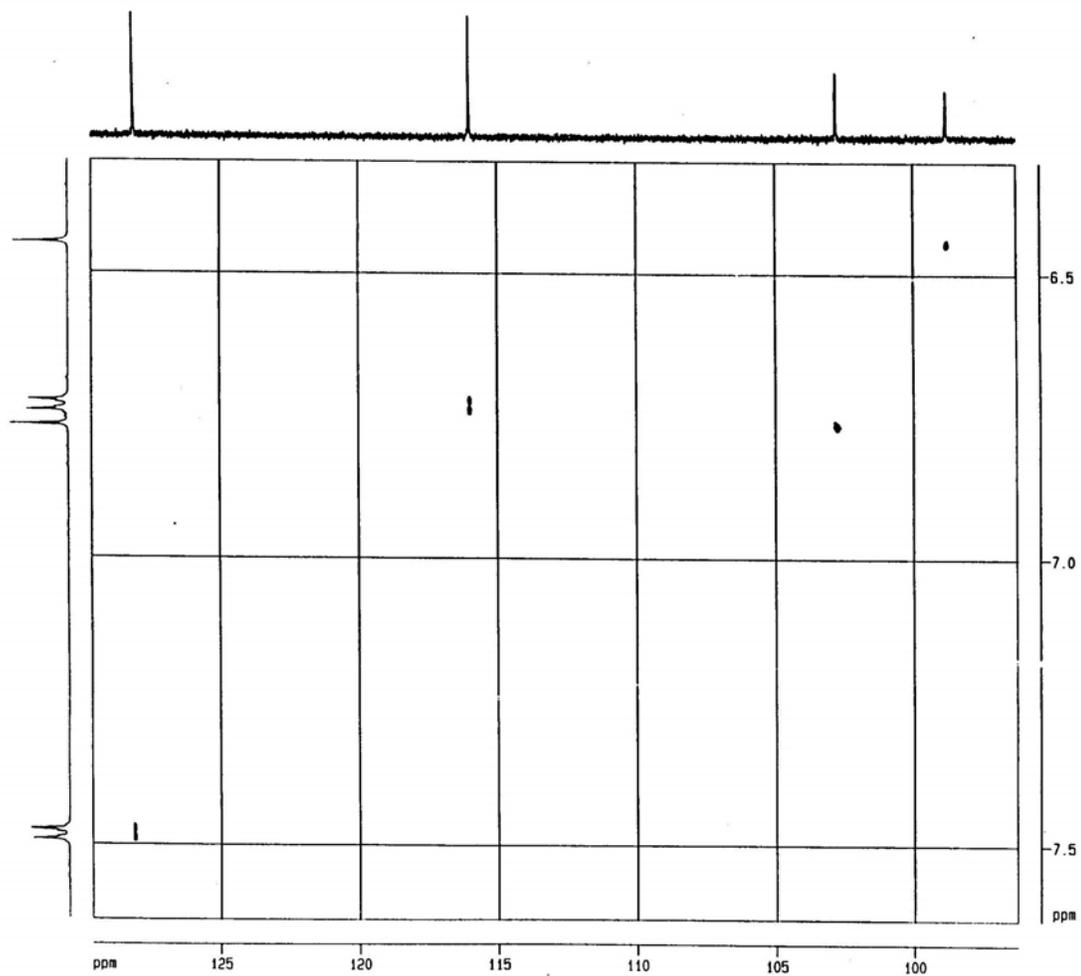


FIGURA 19 – Espectro HMQC em DMSO-d_6 da substância II-D

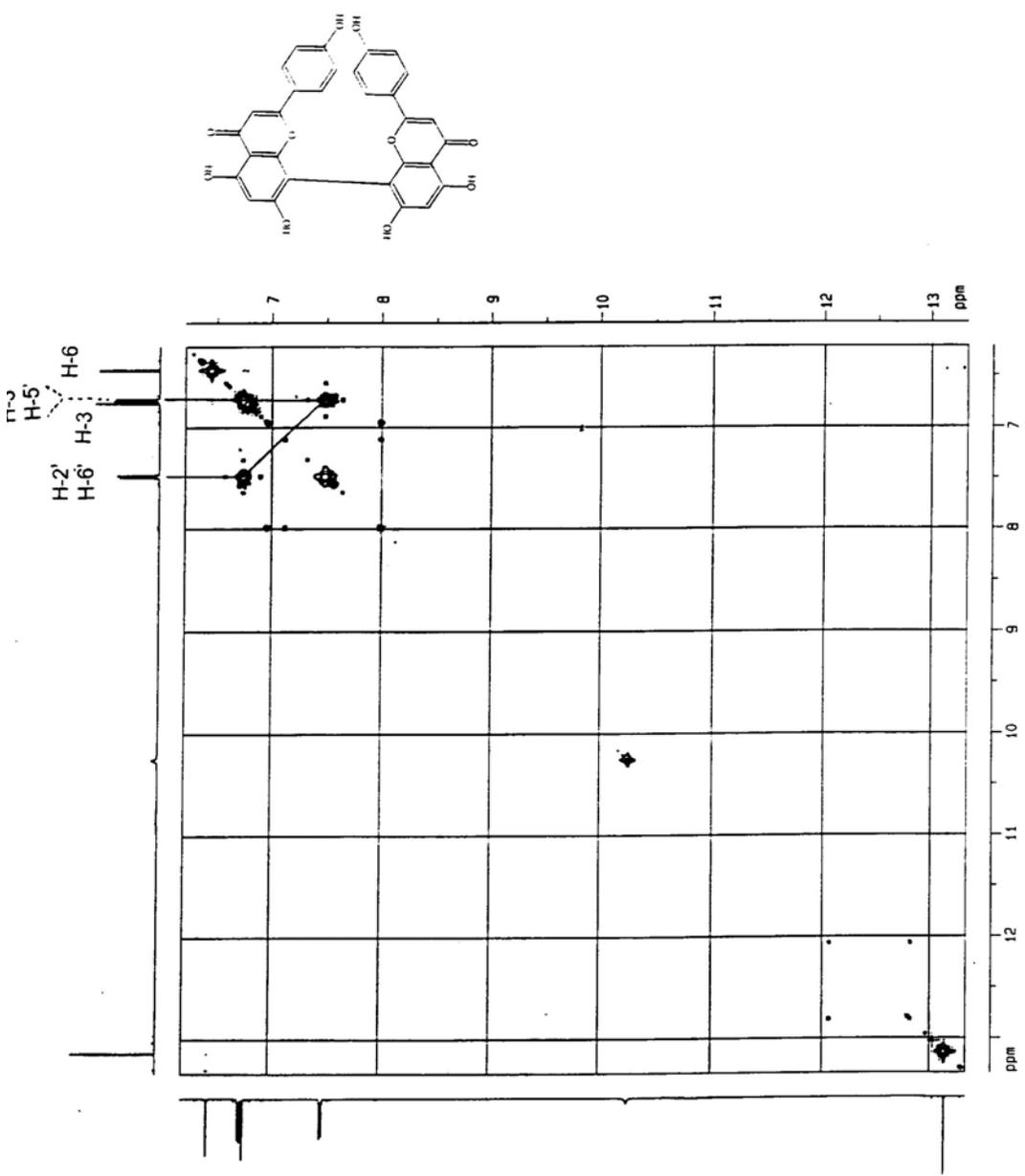


FIGURA 20 – Espectro COSY em DMSO-d₆ da substância II-D

4.7.3 Elucidação estrutural da substância II-C

A substância II-C apresenta-se como uma mancha violeta-escuro ($R_f \sim 0,80$) em CCD ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{IsoprOH } 20/2$) quando visualizada sob luz UV 360 nm, e após revelação com NP/PEG, torna-se amarela no visível (Figura 7).

Nos experimentos de espectroscopia de UV apresentou absorções em $\lambda_{\text{max}} = 331$ e 270 nm (MeOH), o que é característico de flavonas. Os dados obtidos com os reativos de deslocamento estão apresentados no Quadro 8 e na Figura 21.

Quadro 8 - $\lambda_{\text{máx}}$. apresentados nos espectros no UV, para a substância II-C, empregando-se os reativos de deslocamento, segundo MABRY (1970)

Solução metanólica + reativos	Banda II (nm)	Banda Ila (nm)	Banda I (nm)	Banda Ia (nm)
Metanol	270		331	
NaOMe	276		389	
AlCl_3	279	300	346	384
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	281	300	343	384
NaOAc	275		373	
NaOAc/ H_3BO_3	271		335	

Os espectros no UV, para a solução metanólica da substância II-C, indicaram absorção de 331 nm e 270 nm para as bandas I e II, respectivamente, indicando tratar-se de flavona ou flavonol segundo Mabry (1970).

Após a adição de NaOMe à solução metanólica, ocorreu um desvio batocrômico de 58 nm sem diminuição na intensidade indicando a presença de grupo 4'-OH. Como não houve modificação do espectro após 5 min, não deve haver um sistema 3, 4'-dihidroxil.

Na presença de NaOAc foi observado um desvio batocrômico de 5 nm na banda II, sugerindo a presença de hidroxilia na posição C-7 (MABRY, 1970).

A ausência de modificação considerável para a banda I após a adição de NaOAc/ H_3BO_3 , sugere a ausência de grupos ortodihidroxil.

A análise dos espectros após a adição de AlCl_3 e AlCl_3/HCl indica a presença de 5-OH livre e ausência de 3'-OH.

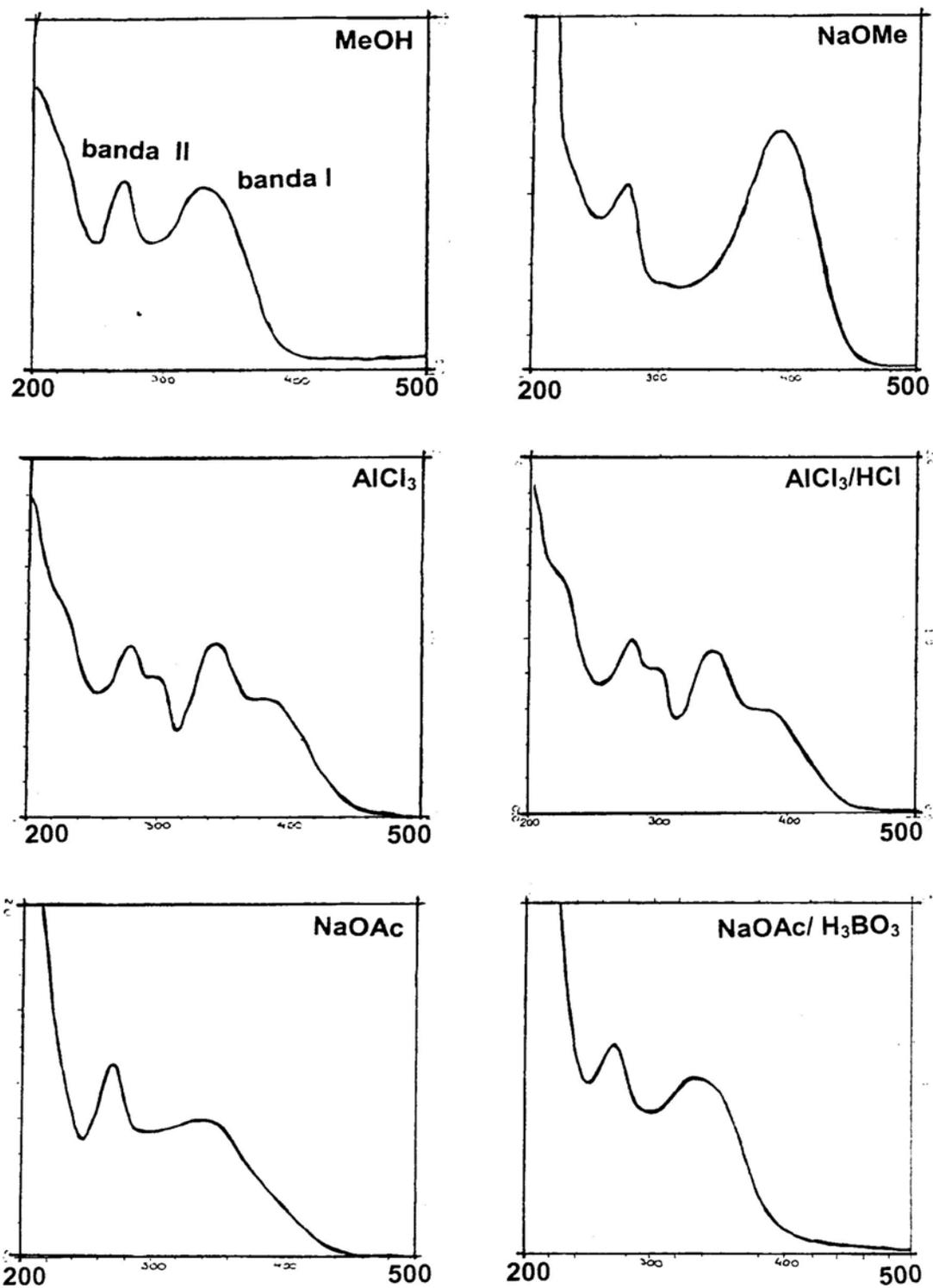


FIGURA 21 – Espectro no UV para a solução metanólica da substância II-C, empregando-se os reativos de deslocamento

Sendo assim, a amostra analisada indica tratar-se de uma flavona com substituições nas posições 5, 7, 4'.

Nos espectros de RMN-¹³C, em acetona-d₆+ MeOD, pode-se constatar a presença de 21 sinais de carbonos característicos de compostos flavonoídicos (Quadro 9). São observados sinais entre $\delta=94,9$ e $\delta=132,2$ ppm, relacionados a todos os carbonos primários dos anéis A, B e C do flavonóide, além dos carbonos quaternários não oxigenados. Através do experimento DEPT-135 podem-se constatar sinais para carbonos quaternários oxigenados, entre $\delta=155,4$ e $\delta=165,8$ ppm, além de um sinal relacionado à carbonila em C-4, o qual apresenta-se em campo mais baixo no espectro, em 183,9 ppm (AGRAWAL, 1989).

O sinal de carbono primário que indica tratar-se de núcleo flavona aparece em $\delta=103,1$ ppm, correlacionando-se com o próton em $\delta=6,60$ ppm (II-H-3) (MABRY, 1970; AGRAWAL, 1989).

Quanto ao anel-A, tem-se para um deles a presença de dois dubletos acoplando-se com $J = 2,5$ Hz, em $\delta=6,13$ ppm e $\delta=6,38$ ppm, os quais relacionam-se com os carbonos em $\delta=99,8$ ppm (I-C-6) e $\delta=94,9$ ppm (I-C-8), respectivamente. Isso mostra um anel-A (anel-A-I) 5,7-disubstituído, com hidrogênios nas posições I-C-6 e I-C-8. Para o outro anel-A (anel-A-II), aparece apenas um singleto em $\delta=6,55$ ppm, correlacionando-se com o carbono em $\delta=96,1$ ppm (II-C-8), em campo mais baixo talvez devido a uma metoxila em II-C-7, pois pode-se observar o acoplamento dos hidrogênios da metila em $\delta=3,83$ ppm com o sinal em $\delta=6,55$ ppm (II-H-8) (COSY). Pelo fato desse sinal de hidrogênio aparecer como um singleto, e ainda aparecer um sinal de carbono quaternário em $\delta=105,6$ ppm, em campo mais baixo em relação ao I-C-6, pode esse sinal estar relacionado ao II-C-6 fazendo parte da ligação interflavonoil (AGRAWAL, 1989).

Para um anel-B (anel-II-B, já que a ligação interflavonoil da unidade II se faz no anel-A-II) aparecem sinais característicos de oxigenação na posição II-C-4', com dois pares de dubletos ($J = 9$ Hz) em $\delta=6,71$ ppm e $\delta=7,41$ ppm, acoplando-se com os carbonos em $\delta=116,7$ ppm e $\delta=128,8$ ppm, respectivamente nas posições II-C-3'/5'eII-C-2'/6' (AGRAWAL, 1989).

Para o anel -B-I, tem-se a presença de um duplete de duplete em $\delta=8,7$ ppm ($J = 2,5$ e 9Hz) que acopla com os dupletos em $\delta=7,97$ ppm ($J = 2,5$ Hz) e

$\delta=7,10$ ppm ($J = 9\text{Hz}$). Esses sinais podem estar relacionados aos prótons I-H-2', I-H-6' e I-H-3', respectivamente. Devido à presença de sinais de impurezas na mesma região do espectro em que aparecem os sinais que corresponderiam àqueles do anel-B-I, não foi possível definir com certeza o tipo de substituição deste anel, porém, com as características do duplete de duplete, sugere-se a ocorrência da ligação interflavonoil na posição C-5' da unidade I, o que significa um biflavonóide do tipo robustaflavona, ou seja, ligação I-5'-II-6 (AGRAWAL, 1989).

Através do experimento de HMQC (C-H) pode-se correlacionar diretamente os sinais de carbono terciário que aparecem em campo mais alto no espectro, em $\delta=56,7$ ppm e $\delta=56,8$ ppm, com os sinais de prótons característicos para hidrogênios de metoxila, um singleto em $\delta=3,78$ ppm e outro em $\delta=3,83$ ppm. No experimento de HMBC, por sua vez, o sinal em $\delta=56,7$ ppm correlaciona-se, a longa distância, com o carbono em $\delta=165,7$ ppm, o qual estaria relacionado ao I-C-4'. O outro sinal de metoxila correlaciona-se com o sinal em $\delta=164,7$ ppm (II-C-7). No experimento de COSY, os prótons da metoxila em $\delta=3,78$ ppm correlacionam-se fracamente com o sinal correspondente ao hidrogênio na posição I-C-3'. Isso sugere que a metila esteja ligada ao oxigênio na posição I-C-4', no anel-B-I. O sinal para a metoxila em $\delta=3,83$ ppm correlaciona-se com o singleto em $\delta=6,55$ ppm, correspondente ao II-H-8, sugerindo a ligação da metoxila em II-C-7.

A presença de duas metoxilas na molécula da substância II-C, nas posições I-C-4' e II-C-7, é pouco provável, pois esta substância apresenta-se com característica mais polar que a substância II-B. Comparando-se com os sinais atribuídos à substância II-B, o sinal em $\delta=3,78$ ppm pode tratar-se do sinal atribuído à metoxila em I-C-4' da substância II-B.

O espectro de massas do tipo FAB realizado com a substância II-C apresentou picos de contaminante, porém o valor do pico íon molecular em $m/z= 553,1$ confirma tratar-se de um biflavonóide.

Quadro 9 - Dados de RMN de ^1H e ^{13}C em acetona- d_6 + MeOD, para a substância II-C

RMN- ^{13}C (acetona- d_6 , 125 MHz)			RMN- ^1H (acetona- d_6 , 500 MHz)				
C	δ [ppm]	DEPT	H	δ [ppm]	I	M	J (Hz)
I-2	163,0	C	-	-	-	-	-
I-3	103,1	CH	I-H-3	6,60	1	S	-
I-4	183,9	C=O	-	-	-	-	-
I-5	162,3	C	OH	-	-	-	-
I-6	99,8	CH	I-H-6	6,13	1	D	2,5
I-7	164,7	C	?	-	-	-	-
I-8	94,9	CH	I-H-8	6,38	1	D	2,5
I-9	155,4	C	-	-	-	-	-
I-10	105,3	C	-	-	-	-	-
I-1'	122,3	C	-	-	-	-	-
I-2'	N.O	CH	I-H-2'	8,70	1	DD	2,5/9,0
I-3'	117,0	CH	I-H-3'	7,10	1	D	9,0
I-4'	165,7	C	?	-	-	-	-
I-5'	N.O	C	-	-	-	-	-
I-6'	N.O	CH	I-H-6'	7,97	1	D	2,5
II-2	N.O	C	-	-	-	-	-
II-3	N.O	CH					
II-4	N.O	C=O	-	-	-	-	-
II-5	N.O	C	OH	-	-	-	-
II-6	100,5	C-C	-	-	-	-	-
II-7	164,7	C	?				
II-8	96,1	CH	II-H-8	6,55		S	-
II-9	N.O.	C	-	-	-	-	-
II-1'	N.O.	C	-	-	-	-	-
II-1'	122,7	C	-	-	-	-	-
II-2'	128,8	CH	II-H-2'	7,41	1	D	9
II-3'	116,7	CH	II-H-3'	6,71	1	D	9
II-4'	165,8	C	OH	-	-	-	-
II-5'	116,7	CH	II-H-5'	6,71	1	D	9
II-6'	128,8	CH	II-H-6'	7,41	1	D	9
CH ₃	56,7	CH ₃	OCH ₃	3,78	3	S	-
CH ₃	56,8	CH ₃	OCH ₃	3,83	3	S	-

C = carbono correspondente; δ = valor do deslocamento químico; **H** = hidrogênio correspondente; **M** = Multiplicidade; **I** = Integral; **J** = constante de acoplamento; N.O. = sinais não observados; ? = substituinte indefinido (pode ser OH ou MeO)

Portanto, para a substância II-C sugere-se uma biflavona do tipo robustaflavona, com ligação interflavonoil entre os carbonos I-C-5' e II-C-6, no entanto, estão sendo aguardados os espectros correspondentes à substância acetilada (II-Cact 35-45) para a confirmação estrutural.

4.7.4 Caracterização de taninos presentes em SFBU-I-4 e SFBU-I-5

A FR-1, derivada da SFBU-I-5, apresenta elevada polaridade, pois fica retida no ponto de aplicação em diversos sistemas de eluentes para CCD em sílica, incluindo MeOH 100%. Quando cromatografada em placas de celulose utilizando-se como eluente HOAc 30%, aparece uma mancha em $R_f \sim 0,5$ (com uma cauda) que se cora de vermelho quando revelada com vanilina sulfúrica. Os resultados dos testes de caracterização para taninos (seção 5.6.1) são apresentados no Quadro 10.

Quadro 10 - Resultados dos testes de caracterização para taninos, aplicados à FR-1

Teste	Resultado
Reação com acetato de chumbo	-
Reação de Griessmayer-Reichel	-
Teste de Procter-Paessler	-
Reação com cloreto férrico	+ para Taninos condensados
Reação de Stiasny	+

Tanto as frações FR-1 e SFBU-I-4, como a substância T5act apresentaram apenas uma banda de absorção em aproximadamente 280 nm (Figura 22), característica de proantocianidina (LUNTE, 1987). Essas frações foram encaminhadas aos experimentos de RMN e EM. Aguardam-se os espectros para a elucidação estrutural.

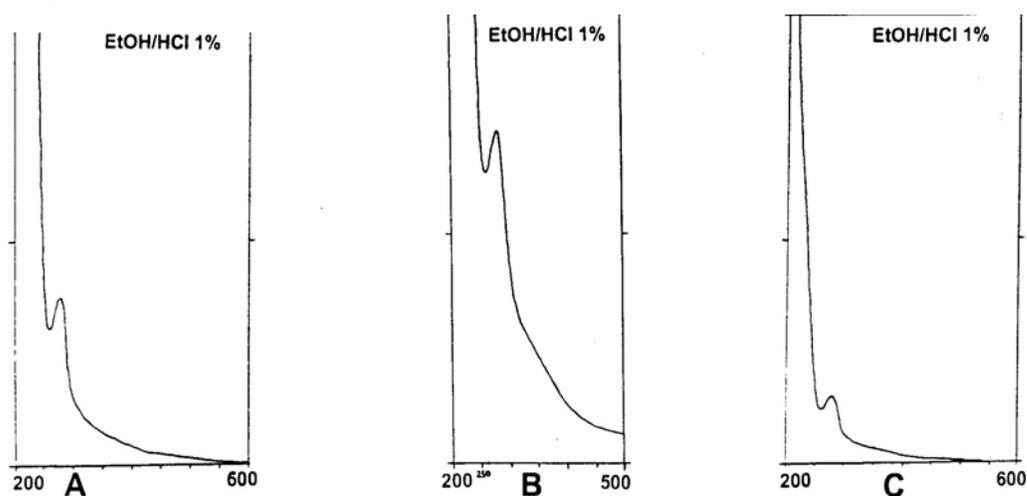


FIGURA 22 – Espectros no UV para as frações (A) FR-1, (B) SFBU-I-4 e substância (C) T5act, em EtOH/HCl 0,1%

5 PARTE EXPERIMENTAL

5.1 MATERIAL VEGETAL

5.1.1 Coleta e identificação

As acículas de *Araucaria angustifolia* (Bert) Kuntze foram coletadas no município de Urubici-SC, em maio de 1999, sob orientação do Prof. Dr. Maurício Sedrez dos Reis, do Departamento de Fitotecnia do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina. A identificação botânica foi realizada pelos agrônomos do curso de Pós-Graduação em Recursos Genéticos da UFSC, e a exsicata da planta está depositada no Herbário da UFSC (Reitz & Klein 15444 FLOR 26).

5.1.2 Secagem e moagem do material vegetal

As acículas foram separadas manualmente dos caules e submetidas ao procedimento de secagem em estufa de ar circundante, a temperatura de 30–35⁰C por cinco dias. Após a secagem, o material foi rasurado em moinho de facas, totalizando 1.200 g de material vegetal.

5.1.3 Análise preliminar de caracterização do material vegetal

Em todas as análises foram utilizadas as fórmulas para o cálculo do desvio padrão (s) e do coeficiente de variação (CV) apresentadas nas equações (1) e (2), onde x = valores individuais, m = média dos valores individuais e N = número amostras (OHLWEILER, 1976).

$$S = \sqrt{\sum (x-m)^2 / N-1} \quad (1)$$

$$CV = 100s / m \quad (2)$$

5.1.3.1 Determinação da granulometria (F.B. IV)

A determinação da granulometria foi realizada através da tamisação empregando-se um conjunto de quatro tamises de malhas 1,00 mm, 0,84 mm, 0,59 mm e 0,40 mm. O material vegetal foi pesado, colocado nos tamises e submetido à agitação manual por cerca de 20 min. Após, os tamises foram separados, pesando-se o material retido em cada uma das malhas. O ensaio foi realizado em triplicata, com alíquotas de 50 g de planta rasurada.

5.1.3.2 Determinação da Perda por Dessecação (F.B. IV)

Inicialmente, pesou-se 1 g do material vegetal rasurado, em pesa-filtro tarado previamente dessecado em estufa por 30 min, a 100-105°C.

Os pesa-filtros com as respectivas amostras foram colocados em estufa a 100-105°C por duas horas e, após resfriados em dessecador por cerca de 10 min, foram novamente pesados (1^a. pesagem). Na seqüência, foram colocados por mais 30 min em estufa a 100-105°C, novamente resfriados em dessecador e pesados. Este procedimento foi repetido até peso constante, ou seja, até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não excedesse 5 mg. O ensaio foi realizado em triplicata (Tabela 9).

Tabela 9 – Quantidade de amostra do material vegetal submetido ao ensaio de perda por dessecação

Análise	Amostra (g)
1	0,9897
2	1,0319
3	1,0853

5.1.3.3 Determinação de Cinzas Totais (F.B. IV)

Pesou-se cerca de 1 g do material vegetal rasurado, em cadinho de porcelana previamente calcinado por 30 min a 600°C. Em seguida, o material foi aquecido em manta elétrica, até o desprendimento total de vapores. Após, os cadinhos foram colocados na mufla, a 700°C por 4 horas. Foram retirados da mufla e, após resfriamento em dessecador, pesados (1ª. pesagem). Na seqüência, foram colocados na mufla, a 700°C por 30 min, e, após resfriamento em dessecador, pesados (2ª. pesagem). Este procedimento foi repetido até peso constante, ou seja, até que a diferença entre duas pesagens sucessivas não excedesse 5 mg. O ensaio foi realizado em triplicata (Tabela 3).

5.1.3.4 Determinação do teor de flavonóides Totais (FRANZ, 1992)

A determinação fotométrica de flavonóides foi realizada empregando-se as soluções de partida, de análise e de compensação, como descrito abaixo:

- a) *Solução de Partida*: Em um balão de fundo redondo (250 mL) foi adicionado 0,600 g do material vegetal pulverizado, 1,0 mL da solução de metenamina (0,5/100 mL H₂O), 20,0 mL de acetona e 2,0 mL de HCl 25%, deixando-se em ebulição sob refluxo por 30 min. O extrato foi filtrado através de pequena quantidade de algodão para um balão volumétrico de 100,0 mL. O algodão e a material vegetal foram colocados novamente no balão de 250,0 mL, e extraídos sob refluxo com 20,0 mL de acetona durante 10 min, por mais duas vezes. Novamente filtrado sob algodão para o balão de 100,0 mL e completado o volume para 100,0 mL com acetona. 20,0 mL deste extrato foi retirado para o funil de separação e adicionado 20,0 mL de água. A solução foi extraída uma vez com 15,0 mL e duas vezes com 10,0 mL de acetato de etila. As fases acetato de etila foram reunidas e lavadas duas vezes com 50,0 mL de água. A fase acetato de etila foi transferida para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume completado com acetato de etila;

- b) *Solução de Análise*: 10,0 mL da solução de partida foi retirado para um balão volumétrico de 25,0 mL e adicionado 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio, completando-se o volume com solução metanólica de ácido acético;
- c) *Solução de compensação*: 10,0 mL da solução de partida foi retirado para um balão volumétrico de 25,0 mL, completando-se o volume a 25,0 mL com a solução metanólica de ácido acético.

A absorção da solução de análise foi determinada após 30 min, a 425 nm, contra a solução de compensação, e o teor de flavonóides expresso como hiperosídeo foi calculado através da fórmula apresentada na equação (3), onde e = quantidade pesada da droga, A = absorção a 422 nm.

$$\% = A \times 1,25 / e \quad (3)$$

5.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES

O extrato bruto foi obtido por processo de maceração, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, com a mistura de etanol/água, na proporção de 70/30 (V/V), por cinco dias, na primeira maceração. A proporção planta/líquido extrator foi de 1/7 (m/v). O extrato foi filtrado e colocado novamente em maceração por sete dias (remaceração). Os filtrados resultantes foram reunidos e originaram o Extrato Bruto Hidroalcoólico (EBHA).

Foram empregados 1.200 g do material vegetal dividido em quatro frasco, cada um com capacidade de 3,0 L. Em cada frasco foram adicionados 300 g de planta, sendo os volumes do líquido extrator de 2,1 L e 1,0 L, na maceração e na remaceração, respectivamente.

Foram obtidos cerca de 790 mL (na maceração) e 1.000 mL (na remaceração) do filtrado (EBHA) em cada frasco utilizado, totalizando aproximadamente 7.160 mL de EBHA.

O EBHA foi concentrado em evaporador rotatório, resultando em 500mL de Extrato Bruto Hidroalcoólico Concentrado (EBHAC), o qual foi submetido à partição.

O EBHAC (500,0 mL) foi submetido à partição em funil de separação com solventes de polaridade crescente: Éter de petróleo (EP), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-BuOH), conforme o esquema apresentado na Figura 23. Foi utilizado 1,0 L de cada solvente, sendo realizadas três extrações sucessivas com cerca de 330 mL cada. Todas as frações obtidas foram levadas à secura e uma amostra de cerca de 20 mg de cada uma das frações foi encaminhada para os teste biológicos de avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral.

5.2.1 Determinação do rendimento da extração e do fracionamento

Com o objetivo de calcular o rendimento do extrato e das frações obtidas por partição, foi realizada uma maceração com 100,0 g de material vegetal e 700 mL de líquido extrator etanol/ H_2O 70/30 (V/V), nas mesmas condições da maceração para o isolamento das substâncias ativas (seção 5.2).

Uma alíquota de 100 mL do extrato foi concentrada até a secura, e pesada para se determinar o rendimento do extrato. Em seguida, esse extrato seco foi ressuspenso em 100 mL de H_2O e submetido à partição com 30 mL de cada solvente, em triplicata, seguindo a mesma metodologia empregada na primeira partição. Todas as frações foram concentradas até secura, em evaporador rotatório ou banho-maria, para serem pesadas (Tabela 5).

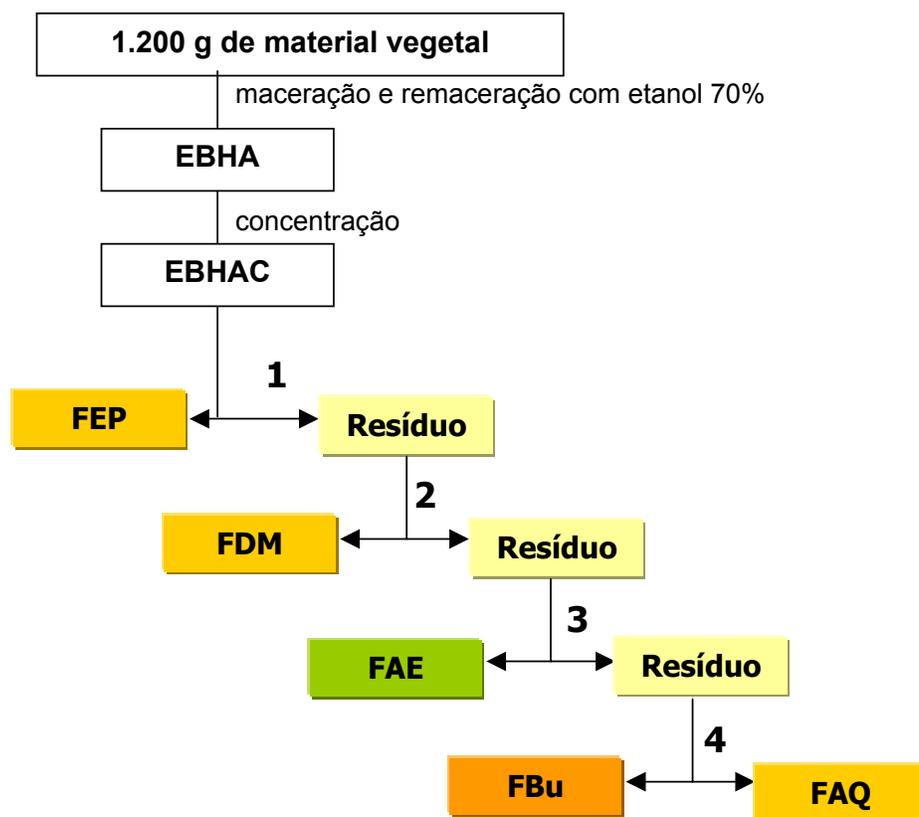


FIGURA 23 - Representação esquemática do procedimento de partição do EBHA de *Araucaria angustifolia*. 1, partição com Éter de Petróleo; 2, partição com CH_2Cl_2 ; 3, partição com AcOEt; 4, partição com n-BuOH

5.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Os ensaios de caracterização dos grupos de constituintes vegetais foram realizados segundo Marini-Bettolo (1980), Dominguez (1973), Farmacopéia Brasileira (1988), Matos (1988) e Costa (1986):

a) Reação com cloreto férrico – caracterização de compostos polifenólicos:

1 mL do EBHA filtrado e de cada uma das frações foram transferidos para tubos de ensaio, sendo adicionadas 1 a 2 gotas de solução de cloreto férrico 2,5%, verificando-se o desenvolvimento de coloração;

- b) **Reação da cianidina ou de Shimoda – caracterização de flavonóides:** 5 mL do EBHA filtrado e das frações foram transferidos para cápsula de porcelana, respectivamente, aquecendo-se até secura, cuidando para que não houvesse carbonização do resíduo. O resíduo foi retomado em 1,5 mL de metanol e vertido para um tubo de ensaio. Adicionou-se cuidadosamente 1-2 fragmentos de magnésio e 0,5 mL de HCl concentrado, observando-se a coloração;
- c) **Reação da Gelatina – caracterização de taninos:** 1 mL do EBHA e de cada fração, respectivamente, foi dissolvido ou suspenso em água, e adicionado de uma solução de gelatina a 2,5%, gota a gota, observando-se a formação de precipitado;
- d) **Reação de Liebermann-Burchard – caracterização de núcleos triterpênicos e esteroidais:** Ao extrato e às frações foi adicionado pelas paredes do tubo de ensaio o reativo de Liebermann-Burchard (= 1,0 mL de anidrido acético e gotas de ácido sulfúrico concentrado), observando-se o aparecimento de coloração após 10 a 15 min de repouso;
- e) **Reação de Salkowsky – detecção de esteróides:** Ao extrato e às frações foi adicionado pelas paredes do tubo de ensaio 1 mL do reativo de Salkowsky (= H₂SO₄ conc.), observando-se o aparecimento de coloração castanho-escuro avermelhado para núcleo esteroidal;
- f) **Teste de formação de espuma- detecção de saponinas:** 2 mL do extrato e das frações concentrado (após a eliminação do solvente) foram adicionados de água e colocados em tubo de ensaio grande, agitando-se vertical e fortemente o tubo durante 1min. Observou-se se houve aparecimento de espuma, o que indica a presença de saponinas;
- g) **Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides:** Tomaram-se 3 tubos de ensaio, 1, 2 e 3, com solução hidroetanólica das frações FAE e FBU. O tubo 1 foi acidificado a pH 3, com HCl, e os tubos 2 e 3 foram basificados a pH 8,5 e 11, respectivamente, com NaOH. Soluções de flavonas, flavonóis e xantonas coram-se de laranja em meio alcalino.
- h) **Reação de Stiasny – diferenciação de taninos condensados e hidrolisáveis:** 5 mL de cada amostra (FAE, FBU) foram submetidos a refluxo por 30 min com 40 mL de água e 5 mL do reativo de Stiasny (5 mL de HCl concentrado + 10 mL de formol, preparado no momento do uso). Os

taninos condensados originam um precipitado vermelho (flobafeno). Fez-se a filtração do precipitado e ao filtrado adicionou-se acetato de sódio em excesso e 2 gotas de solução de cloreto férrico a 2,5%, observando-se o desenvolvimento de coloração.

5.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Nos ensaios de biomonitoramento, os extratos e as frações foram avaliados em relação a sua citotoxicidade e sua potencial atividade antiherpética. Estes ensaios foram realizados pelas mestrandas Adriane M. de Freitas e Carla R. A. Fröhner, orientadas pela Prof^a. Dr^a. Cláudia M. O. Simões.

O vírus herpético humano tipo 1 foi selecionado para este trabalho por ser um importante patógeno humano, distribuído em todo o mundo, e para o qual ainda não foi desenvolvida uma vacina totalmente eficaz e economicamente viável. Além disso, algumas cepas isoladas de pacientes se mostraram resistentes ao aciclovir, o principal fármaco utilizado no tratamento de várias infecções herpéticas (WHITE.; FENNER, 1994; FIELD, 2001)

As frações da partição do extrato bruto das acículas de *Araucaria angustifolia* (frações FEP, FDM, FAE, FBU e FAQ) foram solubilizadas em 1% de dimetilsulfóxido (DMSO) e meio de cultura celular 199 (Sigma), sem adição de soro fetal bovino (SFB). A concentração final das soluções-mãe foi de 1mg/mL, e essas foram mantidas sob refrigeração a -20°C até o seu uso.

5.4.1 Avaliação da citotoxicidade

Na pesquisa de novos fármacos antivirais deve-se considerar seus efeitos tóxicos sobre as células hospedeiras. O composto antiviral ideal é aquele que inibe somente a(s) etapa(s) do ciclo de replicação viral, sem interferir na célula

hospedeira, possibilitando que essa se recupere da infecção e mantenha suas atividades metabólicas (VANDEN BERGHE; VLIETINCK; VAN HOOFF, 1986).

5.4.1.1 Avaliação microscópica das alterações morfológicas celulares

As alterações morfológicas provocadas pelas diferentes frações foram comparadas com os controles celulares, diariamente, por 72h, através de microscópio invertido. Esta técnica permitiu estimar a concentração que causou citotoxicidade a 50% das células (CC_{50}) e também a concentração máxima não tóxica (CMNT). As alterações morfológicas do tapete celular foram classificadas em cinco categorias, de acordo com a porcentagem de alteração celular. A CC_{50} de cada fração foi estimada a partir dos valores das categorias (1 a 5), por análise de regressão.

5.4.2 Avaliação da atividade antiviral in vitro

Vários métodos são utilizados para a rápida avaliação da atividade antiviral de compostos, em cultura de células, os quais incluem a quantificação visual da atividade antiviral baseada na inibição do efeito citopático induzido pelo vírus, ou por medidas menos subjetivas, tais como o ensaio colorimétrico do MTT ou avaliações fluorimétricas (SMEE et al., 2002).

O efeito citopático viral (ECP) é definido como o conjunto de alterações provocadas por um vírus nas células onde ele se multiplica. Tal efeito pode ser manifestado como alterações na forma e no tamanho da célula, na destruição total da célula, ou no descolamento da monocamada (SIDWELL, 1986).

O ensaio do MTT vem sendo rotineiramente utilizado para a detecção de citotoxicidade e atividade antiviral de compostos sintéticos e de origem natural (SUDO et al., 1994; TAKAHASHI, et al., 2001). Vírus que causam infecções líticas, tais como HSV-1, causam destruição das células, as quais se descolam da placa de cultura. Assim, o ensaio colorimétrico do MTT pode ser potencialmente utilizado para a quantificação desta destruição celular ou a ausência da mesma, devido à presença do agente antiviral (SMEE et al., 2002).

A avaliação da atividade antiviral das frações FEP, FDM, FAE, FBU e FAQ foi realizada através da avaliação do efeito citopático viral através de microscopia. Durante 72h, as leituras foram realizadas ao microscópio invertido e a inibição do

efeito citopático viral (ECP) foi comparada com os controles. O ECP foi estimado de acordo com uma escala de 1 a 5, conforme o grau de destruição do tapete celular. A concentração que inibiu o efeito citopático viral em aproximadamente 50% das células (CE_{50}) foi estimada a partir dos valores de cada categoria, por análise de regressão. De posse dos valores estimados de CC_{50} e CE_{50} , calculou-se o índice de seletividade ($IS = CC_{50} / CE_{50}$). Quanto maior for o valor de IS, mais ativa será a fração contra o vírus e ao mesmo tempo, menos tóxico para as células. Nos experimentos iniciais de avaliação da atividade antiviral, as frações acetato de etila – (FAE) e n-butanólica (FBU) apresentaram promissores valores de IS.

As sub-frações obtidas pelo fracionamento das frações FAE e FBU foram, posteriormente, avaliadas pelas metodologias acima citadas e também através do ensaio colorimétrico com sal de tetrazolium (MTT), conforme proposto por Takeuchi, Baba e Shigeta (1991), com algumas modificações propostas por Sieuwerts et al. (1995). O sal de tetrazolium é ativamente absorvido pelas células e reduzido, através de uma reação mitocôndria-dependente, em um produto corado (formazan). O ensaio colorimétrico do MTT mede a quantidade de formazan formado através de espectrofotometria tipo ELISA, sendo sensível e quantitativo, já que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis. Esse ensaio permitiu avaliar, simultaneamente, a citotoxicidade (CC_{50}) e a atividade antiviral (CE_{50}) das sub-frações testadas, assim como o cálculo dos seus valores de IS.

5.5 ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES ATIVOS

Foram testados diversos sistemas de eluentes em Cromatografias em Camada Delgada (CCD) para separar os constituintes das frações, utilizando-se placas cromatográfica de Sílica Gel F_{254} e realizando-se a detecção sob luz UV 254 nm e 366 nm, ou com reveladores tais como: NP/PEG, vanilina/ H_3PO_4 , cloreto férrico, amônia e anisaldeído/ H_2SO_4 .

5.5.1 Separação Cromatográfica dos Constituintes da fração Acetato de Etila (FAE)

Como a FAE apresentou atividade antiviral promissora (expressa pelo IS), foi realizado o fracionamento a partir desta fração. Conseguiu-se obter quantidades dos flavonóides suficientes para a realização das análises espectroscópicas de RMN.

5.5.1.1 Cromatografia em Coluna de Gel de Sílica da FAE

A FAE foi pesada (3,8 g) e solubilizada na menor quantidade do eluente (AcOEt). O empacotamento da coluna foi realizado com 300 g de sílica (0,05-0,20 mm) em coluna de vidro (6 cm x 31 cm) resultando numa coluna de 22 cm de altura preenchida com sílica. O eluente foi acrescentado à coluna através de um funil de separação. Foram coletadas 56 frações de 60 mL, com fluxo de escoamento de 1 mL/min.

O acompanhamento da separação foi realizado por CCD. A polaridade do eluente foi aumentada progressivamente, segundo a Quadro 11.

Quadro 11 - Sistema de eluentes utilizados na coluna cromatográfica de sílica para a FAE

Eluente utilizado	Frações coletadas
AcOEt	1-16
AcOEt/MeOH (98/2)	17-19
AcOEt/MeOH (95/5)	20-21
AcOEt/MeOH (9/1)	22-23
MeOH	23-40
MeOH/H ₂ O (9/1)	41-56

Após a reunião das frações, oito subfrações da fração FAE foram caracterizadas (Tabela 10).

Tabela 10 - Subfrações resultantes da reunião das frações da coluna cromatográfica de sílica da FAE

Subfração	Frações reunidas	Fração (g)	R (%)*
SFAE-I	1 e 2	0,1294	4,03
SFAE-II	3 a 8	1,3205	35,40
SFAE-III	9 e 10	0,1076	3,38
SFAE-IV	11 a 16	0,1428	4,30
SFAE-V	17 a 20	0,0199	0,52
SFAE-VI	21 a 24	0,0309	1,35
SFAE-VII	25 a 29	0,4448	12,45
SFAE-VIII	29 a 56	1,1539	31,08

*Rendimento calculado em relação à quantidade de amostra aplicada na coluna

Todas as subfrações foram encaminhadas aos testes de avaliação da citotoxicidade e atividade antiviral (ver resultados na Tabela 7).

5.5.1.2 Cromatografia em Coluna de Gel de Sílica da SFAE-II

A cromatografia em coluna de gel de sílica da SFAE-II foi realizada com 1,3 g da amostra aplicada numa coluna de vidro (2,5 cm x 50 cm), preenchida com 120 g de gel de sílica com tamanho de partículas de 0,063-0,200 mm. Foram coletadas 87 frações utilizando gradiente de polaridade, segundo a Quadro 12. O fluxo da coluna foi ajustado para 4,5 mL/min.

Quadro 12 - Sistema de eluente utilizado na coluna cromatográfica de sílica da SFAE-II

Frações reunidas	Eluente	Proporção de solventes
1 a 68	CH ₂ Cl ₂ /IsoprOH	20/1
69 a 63	CH ₂ Cl ₂ /IsoprOH	20/2
74 a 76	CH ₂ Cl ₂ /IsoprOH	20/3
77 a 86	CH ₂ Cl ₂ /IsoprOH	20/5
86 a L	AcOEt/IsoprOH	20/10

Após a análise por CCD, foram obtidas quatro subfrações, segundo Tabela 11.

Tabela 11 – Subfrações resultantes reunião das frações da coluna de sílica da subfração SFAE-II, quantidades e rendimentos

Subfrações	Frações reunidas	Subfração (g)	Rendimento (%)*
SFAE-II-A	1 a 4	0,26	20
SFAE-II-B	5 a 18	0,35	27
SFAE-II-C	19 a 72	0,22	17
SFAE-II-D	73 a L	0,35	27

*Rendimento em relação a SFAE-II

As quatro subfrações foram encaminhadas aos testes biológicos (Tabela 7).

A SFAE- II-B foi purificada por precipitação em MeOH e centrifugação, obtendo-se 7 mg da substância II-B para as análises espectroscópicas.

A SFAE-II-D foi purificada por precipitação em CH₂Cl₂ seguida de centrifugação e lavagem nesse mesmo solvente, obtendo-se 5 mg da substância II-D para as análises espectroscópicas.

A SFAE-II-C também foi precipitada em metanol, porém, apresentou-se ainda impura, contendo como principal contaminante a substância II-B.

As substâncias purificadas foram encaminhadas aos testes de atividade antiviral, porém, apresentaram problemas de solubilidade.

5.5.2 Separação Cromatográfica dos Constituintes da Fração n-butanol (FBU)

5.5.2.1 Cromatografia em coluna de gel de sílica da FBU

Foi realizada uma coluna cromatográfica com 8,0 g da FBU (dissolvida no próprio eluente), aplicados em uma coluna 31 cm x 6 cm preenchida com 300 g de gel de sílica (0,063-0,200 mm), totalizando 22 cm de coluna empacotada.

O sistema de eluente utilizado foi AcOEt/MeOH/IsoprOH/H₂O (25/5/10/30), do qual utilizou-se a fase orgânica separada em funil de separação. O fluxo de eluição foi ajustado para 1,5 mL/min. Foram coletadas 50 frações (até a fração 18 em frascos de 250 mL, após esta, em frascos de 100 mL), sendo que a partir da fração

39 a polaridade do eluente foi alterada, utilizando-se MeOH para lavagem da coluna. As frações foram reunidas após verificação por CCD, conforme a Tabela 12.

Tabela 12 - Reunião das frações da coluna FBU, quantidades e R (%) = rendimento em relação à amostra aplicada

Subfração	Frações reunidas	Subfração (g)	R (%)
SFBU-I	1-3	3,0831	38,5
SFBU-II	4-6	1,0912	13,6
SFBU-III	7-17	1,9904	24,9
SFBU-IV	18-30	0,1645	2,0
SFBU-V	31-40	0,8127	10,2
SFBU-VI	41-50	0,3666	4,6

5.5.2.2 Cromatografia em coluna de exclusão molecular da SFBU-I

Como a SFBU-I apresentou maiores valores de IS e rendimento, iniciou-se o fracionamento desta subfração.

Foi preparada uma coluna cromatográfica de 2,5 cm x 44 cm com cerca de 110 g de gel de Sephadex LH-20[®], aplicando-se 2,9 g da SFBU-I dissolvidos em MeOH. Utilizou-se como eluente MeOH (100%), até a fração 35, e MeOH/H₂O (95/5) após esta. O fluxo de eluição da coluna foi de 1,5 mL/min.

Foram coletadas 35 frações de 10 mL mais 23 frações de 100 mL. A coluna foi monitorada por CCD em placas de sílica F₂₅₄ utilizando-se como fase móvel BuOH/éter etílico/H₂O/ácido acético (20/5/1,1/0,1). Foram obtidas cinco subfrações, das quais as mais ativas foram a SFBU-I-5 e a SFBU-I-4 (Tabelas 8 e 13).

Tabela 13 - Subfrações da coluna SFBU-I e seus rendimentos em relação à amostra aplicada

Subfração	Frações reunidas	Subfração (g)	R (%)
SFBU-I-1	0-5	0,0958	3,3
SFBU-I-2	6-10	1,5042	51,9
SFBU-I-3	11-14	0,2316	8,0
SFBU-I-4	15-23	0,3224	11,1
SFBU-I-5	24-58	1,3698	47,2

5.5.2.3 Cromatografia em coluna de gel de sílica da SFBU-I-4

Foi realizada uma coluna cromatográfica 0,3 g da SFBU-I-4 (dissolvida no próprio eluente), aplicados em uma coluna 2,5 cm x 33 cm preenchida com 60 g de gel de sílica (0,063-0,200 mm), totalizando 30 cm de coluna empacotada.

O sistema de eluente utilizado foi AcOEt/CH₂Cl₂ (10/1). O fluxo de eluição foi ajustado para 1,5 mL/min. Foram coletadas 200 frações (em frascos de 3 mL), sendo que a partir da fração 181 a polaridade do eluente foi alterada, utilizando-se MeOH para lavagem da coluna. As frações foram reunidas após verificação por CCD, conforme Tabela 14.

As frações 50 a 80 foram reunidas, pois apresentaram uma única mancha em Rf~0,4, a qual foi denominada T4. Foram encaminhados 9 mg dessa substância para as análises espectroscópicas de RMN. As primeiras frações (1 a 49) apresentaram-se muito impuras, e as últimas (81 a 200) apresentaram substâncias retidas no ponto de aplicação. A SFBU-I-4 foi submetida à espectroscopia no UV (Figura 22).

Tabela 14 - Reunião das frações da coluna SFBU-I-4 e rendimentos em relação à amostra aplicada

Subfração	Frações reunidas	Subfração (g)	R (%)
SBU-I-4a	1-49	0,0105	3,5
SBU-I-4b (T4)	50-80	0,009	3
SBU-I-4c	81-180	0,0045	1,5
SBU-I-4d	181-200	0,2000	66,7

5.5.2.4 Cromatografias em colunas com sílica de fase-reversa C-18 da SFBU-I-5

A fração SFBU-I-5 foi purificada em sucessivas colunas de fase reversa C-18. Em função da pequena quantidade de sílica disponível, a coluna foi repetida cinco vezes. O eluente utilizado foi MeOH/H₂O (85%).

Utilizou-se uma coluna com dimensões de 2 cm x 11 cm preenchida com 13 g de sílica de fase-reversa C-18 (40-63 μm) Lichroprep[®], na qual aplicou-se 0,1 g da amostra, sendo que o procedimento foi repetido quatro vezes. O processo

cromatográfico deu-se sob pressão, e todas as amostras foram previamente dissolvidas no eluente. Também foi utilizada uma coluna com dimensões de 2 cm x 36 cm, preenchida com 39 g de sílica, aplicando-se 0,3 g da amostra.

No total, aplicou-se 0,7 g da SFBU-I-5, obtendo-se frações que foram reunidas segundo a seqüência em que as manchas se apresentaram em CCD de fase reversa C-18 (MeOH 85%), conforme Tabela 15.

Tabela 15 - Reunião das frações das colunas de fase reversa C-18 (FR-18), valores de Rf das substâncias, quantidades e rendimentos em relação ao total de amostra

Subfração	Frações reunidas conforme o valor de Rf em CCD FR-18 (MeOH 85%)	Fração (g)	R (%)
FR-1	Substância(s) T (Rf~0,9) ?	0,2674	38,2
FR-2	Mistura de T com outra mancha em Rf~0,8	0,1771	25,3
FR-3	Predominância da substância II-D (Rf~0,5)	0,0597	8,5
FR-4	Predominância da substância II-C (Rf~0,36)	0,0238	3,4
FR-5	Predominância da substância II-B (Rf~0,2)	0,0103	1,8

Apesar da separação das substâncias em CCD apresentar-se com boa eficiência, isso não foi reproduzido na cromatografia em coluna.

Assim, foi possível separar os flavonóides de outra substância(s) correspondente à mancha marrom em Rf~0,9 (denominada substância T), caracterizada como tanino condensado na reação de Stiasny.

Foi possível obter pequena quantidade das substâncias II-B e II-D purificadas, as quais foram submetidos aos experimentos de espectroscopia no UV com reagentes de deslocamento (seção 5.6.2).

As demais frações reunidas apresentaram-se impuras, com predominância de algumas substâncias, como mostra a Tabela 15.

Quanto à FR-1, não foi possível confirmar sua pureza em nenhum dos sistemas cromatográficos testados (HASLAM, 1966, apud MOURA, 1989). Então, uma parte dessa fração foi acetilada e purificada para a realização dos experimentos espectroscópicos.

5.5.2.4.1 Purificação da subfração FR-1

A fração FR-1 obtida a partir da coluna de fase reversa apresentou uma atividade antiviral interessante (IS=38,16). Assim, objetivando identificar o componente majoritário dessa fração, esta foi acetilada e posteriormente purificada por coluna cromatográfica.

Acetilação da FR-1

0,069 g da amostra foi dissolvida em 0,6 mL de piridina. Em seguida, adicionou-se 1,2 mL de anidrido acético, deixando reagir durante a noite.

Após completada a reação, foi adicionada água gelada e, havendo formação de precipitado, este foi lavado com água gelada e ácido clorídrico diluído em filtro de vidro sinterizado sob vácuo. Esse precipitado acetilado, denominado FR-1act, foi solubilizado em diclorometano, seco e purificado através de cromatografia em coluna (coluna T). O rendimento da acetilação foi de 58,7%, obtendo-se 0,0405 g de FR-1act.

5.5.1.4.1.1 Coluna T

Foi realizada com 0,040 g FR-1act uma coluna cromatográfica de 1 cm x 15 cm empacotada com 6 g de gel de sílica (0,04-0,063 mm). O sistema de eluente utilizado foi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9/1). Foram coletadas 44 frações de 1 mL.

As frações 13-41 foram reunidas, por apresentarem uma mancha isolada em $R_f \sim 0,5$, resultando em 0,0062 g da substância T5act (Tabela 16). As demais frações apresentaram-se impuras.

Com as frações FR-1 e a T5act foram realizados os espectros no UV apresentados na Figura 22.

Tabela 16 - Frações obtidas na coluna T, quantidades obtidas e rendimentos em relação à amostra aplicada (FR-1act)

Fração	Quantidade (g)	Rendimento (%)
1-12	0,0229	57,2
13-41(= T5act)	0,0062	15,5
42-44	0,0005	1,2

5.5.2.4.2 Purificação da subfração FR-4

As frações das colunas de fase reversa que continham uma mistura dos flavonóides foram reunidas e aplicadas numa coluna cromatográfica com CH₂Cl₂/IsoprOH (20/2) (Coluna G).

4.5.2.4.2.1 Coluna G

As frações das colunas de fase reversa que continham a substâncias II-C foram reunidas, resultando em 0,034 g. Esta amostra foi aplicada numa coluna de 1 cm x 15 cm empacotada com 6 g de sílica (0,04-0,063 mm), utilizando-se CH₂Cl₂/IsoprOH (20/2) como eluente. Foram coletadas 120 frações de 1 mL. As frações foram reunidas após analisadas por CCD, segundo a Tabela 17.

Tabela 17 - Reunião das frações da coluna G, quantidades obtidas e rendimentos em relação à amostra aplicada

Fração	Reunião das frações*	Fração (g)	Rendimento (%)
G-1	1-13	0,0024	7,0
G-2	14-20	0,0007	2,0
G-3	21-25 (II-B)	0,0017	5,0
G-4	26-39 (II-B)	0,005	14,7
G-5	40-70 (II-C)	0,003	8,8
G-6	71-97 (II-D)	0,0028	8,2
G-7	98-120 (II-D)	0,0033	9,7

*(entre parênteses) = substância majoritária observada em CCD

Da coluna G foi possível obter a substância II-D nas frações 71-97, porém, em pequena quantidade. Quanto às demais substâncias, apresentaram-se como uma mistura de II-B e II-C, com valores de Rf muito próximos.

5.5.2.4.2 Purificação da substância II-C

O precipitado da SFAE-II-C (seção 4.5.1.2) foi reunido às frações FR-4 (seção 5.5.2.4) e G-5 (seção 5.5.2.4.2.1), as quais apresentavam majoritariamente a substância II-C, totalizando 0,0463 g de II-C impura, que foi acetilada para posterior purificação.

Acetilação de II-C impura

0,0463 g da amostra foi dissolvida em 0,5 mL de piridina. Em seguida, adicionou-se 1 mL de anidrido acético, deixando reagir durante a noite.

Após completada a reação, foi adicionada água gelada e, havendo formação de precipitado, este foi lavado com água gelada e ácido clorídrico diluído em filtro de vidro esmerilhado sob vácuo. Esse precipitado impuro acetilado, denominado II-Cact, foi solubilizado em diclorometano e seco para ser purificado em coluna cromatográfica (coluna II-Cact). O rendimento da acetilação foi de 87,3%, obtendo-se 0,0404 g de II-Cact.

Coluna II-Cact

0,0404 g da amostra II-Cact foi aplicado numa coluna de 1 x 15 cm com 6 g de sílica (0,04-0,063 mm), utilizando-se como eluente CH₂Cl₂/MeOH (45/1). Foram coletadas 54 frações de 1 mL, e as frações foram reunidas conforme Tabela 18.

Tabela 18 - Reunião das frações da coluna II-Cact, quantidades obtidas e rendimentos em relação à amostra aplicada

Reunião das frações	Frações (g)	Rendimento (%)
1-6	0,0013	3,2
7-23	0,0002	0,5
24-34	0,0164	40,6
35-45	0,0105	26,0
46-54	0,002	4,9

As frações de 35 a 45 apresentaram maior grau de pureza, e foram reunidas para serem enviada às análises espectroscópicas de RMN.

5.6 IDENTIFICAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

5.6.1 Caracterização de taninos

Foram realizados, com a FR-1, testes qualitativos de caracterização para taninos, de acordo com a metodologia preconizada por Haslam (1966) e descrita por Moura (1984):

- a) **Reação com acetato de chumbo:** A 5 mL da solução da amostra, juntaram-se 10 mL de HOAc e 5 mL de acetato de chumbo 10%. A formação de precipitado branco indica a presença de taninos hidrolisáveis;
- b) **Reação de Griessmayer-Reichel:** A 5 mL da solução da amostra, adicionaram-se cristais de nitrito de sódio e 5 gotas de ácido acético. O aparecimento de coloração rosa indica a presença de ácido elágico livre;
- c) **Teste de Procter-Paessler:** A 5 mL da solução da amostra, adicionaram-se cristais de nitrito de sódio e 5 gotas de ácido sulfúrico 0,1 N. O aparecimento de coloração rosa indica a presença de ácido elágico ligado;

- d) **Reação com cloreto férrico:** A 1 mL da solução da amostra, adicionaram-se 2 gotas de solução de cloreto férrico 1% em metanol. O aparecimento de coloração verde indica a presença de taninos condensados, e coloração azul é indicativa de taninos hidrolisáveis;
- e) **Reação de Stiasny:** 5 mL da amostra foram submetidos a refluxo por 30 min com 40 mL de água e 5 mL do reativo de Stiasny (5 mL de HCl concentrado + 10 mL de formol, preparado no momento). Os taninos condensados originam um precipitado vermelho (flobafeno). Fez-se a filtração do precipitado e ao filtrado adicionou-se acetato de sódio em excesso e 2 gotas de solução de cloreto férrico a 2,5%. O aparecimento de coloração azul-acinzentado indica a presença de taninos hidrolisáveis.

5.6.2 Espectroscopia no Ultravioleta (UV)

As análises de espectroscopia na região do ultravioleta (UV) foram realizadas num espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda 10, cujo comprimento de onda vai do ultravioleta ao visível.

As substâncias isoladas, II-B, II-C e II-D, foram submetidas à análise espectroscópica na região do UV, segundo Mabry (1970).

Preparou-se a solução original da amostra com cerca de 1 mg/10 mL de Metanol, e obteve-se o espectro original utilizando 2-3 mL da solução em metanol determinando os $\lambda_{\text{máx.}}$. Esta solução original foi dividida em três alíquotas de 2-3 mL, adicionando-se os reativos de deslocamento:

- a) À solução original foram adicionadas 3 gotas da solução de NaOMe (2,5 g de sódio metálico em 100 mL de Metanol) obtendo-se os espectros imediatamente e após 5 min, observando se houve decomposição do mesmo;
- b) Adicionaram-se 6 gotas de solução de AlCl_3 (5,0 g de AlCl_3 em 100 mL de Metanol) a 2-3 mL da solução original da amostra, obtendo-se vários espectros

até que os $\lambda_{\text{máx}}$ estivessem estáveis. Após, foram adicionadas 3 gotas de solução de HCl (HCl/H₂O, 1/2) e obtido novo espectro;

- c) Foi adicionado NaOAc sólido a 2-3 mL da solução original, formando uma camada no fundo da cubeta. Foram obtidos espectros imediatamente e após 5 min, não havendo deslocamento, adicionou-se a esta solução H₃BO₃ sólido, fazendo-se novamente a leitura;

Os espectros no UV relativos a SFBU-I-4, FR-1 e T5act foram realizados utilizando como solvente HCl 0,1% em etanol, conforme recomenda RIBÉREAU-GAYON (1968). Comparando-se com a análise realizada em metanol, o espectro em HCl 0,1% mostrou-se com um banda de melhor resolução.

5.6.3 Espectroscopia de Ressonância Magnético-Nuclear (RMN ¹³C e ¹H)

As análises espectroscópicas de RMN foram realizadas pelo Prof. Dr. Ralf Mayer, do Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn, Alemanha.

Utilizou-se um Avance spectromer (Fa. Bruker) NMR 500 MHz.

5.6.4 Espectrometria de Massas (EM)

Os espectros de massas foram obtidos num MS Kratos 50 FAB-MS (modo positivo), 50 μ V, também pelo Prof. Dr. Ralf Mayer, do Pharmazeutisches Institut, Universität Bonn, Alemanha.

6 PERSPECTIVAS

Os ensaios biológicos, com as frações de *A. angustifolia*, foram realizados *in vitro*, assim, para a validação da atividade farmacológica *in vivo*, torna-se necessária a busca por outros modelos experimentais.

Para os biflavonóides, foram realizados testes de quantificação em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), porém, com os sistemas de eluentes que se mostraram mais eficientes na separação dos compostos presentes nas frações, não foi possível solubilizar as substâncias isoladas. Talvez seja possível utilizando-se uma solução tampão básica, uma vez que essas biflavonas são solúveis em meio alcalino. Esse mesmo problema de solubilidade ocorreu nos ensaios biológicos de biomonitoramento, quando foram testadas as substâncias purificadas, as quais precipitavam nos diversos meios empregados (FRÖHNER, 2002). Isso indica a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre a solubilidade desses compostos, ou a busca por alternativas tais como a sua incorporação em vesículas lipossomais.

Também é interessante realizar uma quantificação das proantocianidinas na planta, seja através de reações químicas ou de (CLAE). Para se ter uma idéia, em *Ginkgo biloba*, as proantocianidinas aparecem numa taxa de 4-12% nas folhas e 7% no extrato padronizado, enquanto que para os biflavonóides ainda não há um bom método de quantificação validado (BEEK, 2002).

É provável que a atividade antiherpética do material testado seja atribuída, principalmente, aos taninos condensados, uma vez que os valores de IS foram aumentando conforme esses compostos foram sendo purificados. Não foi testada a substância após seu isolamento (T5act), porque este só foi possível com a amostra acetilada.

Assim, é necessário um estudo mais aprofundado sobre as estruturas das proantocianidinas, dado sua importância para as atividades biológicas. Além disso, há possibilidade de obtê-las em maior quantidade para a realização de experimentos mais sofisticados de determinação da estereoquímica. Seria ainda importante a investigação dessas substâncias na fração aquosa (FAQ) pois, apesar de não

apresentar atividade antiviral, pode-se observar em CCD uma mancha em R_f correspondente ao das proantocianidinas.

É interessante a investigação de um possível sinergismo entre os taninos e os biflavonóides presentes na SFBU-I 5 (IS=57,56), uma vez que o valor de IS diminuiu com a separação destas substâncias, onde na FR-1 obteve-se o IS = 38,16.

As substâncias isoladas das acículas de *A. angustifolia* foram também identificadas nas grimpas (ramos secos que caem naturalmente das árvores) desta espécie, indicando uma fonte viável de obtenção dos compostos ativos em um material que é usualmente de descarte (MARTINS, 2002).

A identificação de compostos potencialmente ativos, tanto nas acículas como nas grimpas de *Araucaria angustifolia*, mostra-se como uma alternativa viável de uso da espécie, contemplando os objetivos quanto à exploração de plantas medicinais da Mata Atlântica: o social, o medicinal e o ecológico, principalmente por haver a possibilidade de obtenção desses compostos a partir das grimpas. Além disso, uma vez estabelecido e fundamentado tal uso, pode-se pensar em uma reavaliação do significado econômico para a *Araucaria angustifolia*, e assim mudá-la da categoria de “espécie madeireira” para a de “espécie medicinal”.

7 CONCLUSÕES

- Foram isolados e identificados os biflavonóides bilobetina e cupressuflavona do macerado hidroalcoólico de folhas de *Araucaria angustifolia*, sendo encontrados tanto na FAE como na FBU;
- Na FBU também foram isoladas duas substâncias, as quais foram caracterizadas como taninos condensados (proantocianidinas);
- As subfrações ricas em proantocianidinas foram as que apresentaram maior atividade antiviral, expressa pelo Índice de Seletividade (IS), nos ensaios de biomonitoramento;
- A *Araucaria angustifolia* mostra-se como uma fonte viável de obtenção de metabólitos secundários potencialmente ativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABOU-KARAM, M.; SHIER, T.W. Isolation and Characterization of an antiviral flavonoid from *W. Fragarioides*. **Journal of Natural Products.**, v. 55, n. 10, p. 1525-1527, 1992.

AGRAWAL, P. K.. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York: Elsevier, 1989.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O; GIRRE, L.. Sinergistic effect of Flavones and flavonols against herpes simplex virus type 1 in cell culture. Comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products.**, v. 55, n. 12, p. 1732-40, 1992.

BACKES, P.; IRGANG, B.. **Árvores do Sul**, Guia de Identificação & Interesse Ecológico. 1. ed. Porto Alegre: Instituto Souza Cruz, 2002.

BECKER, M.. Pinus ocupa área de araucária. **Diário Catarinense**, Florianópolis, 29, set, 2002. Caderno Santa Catarina, p. 23.

BEEK, T. A.. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. **Journal of Chromatography A**. v. 967, n. 1, p. 21-55, aug 2002.

BEHLING, H.. Late Quaternary vegetation, climate and fire history of the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais, Paraná State (South Brazil), **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 97, n. 1-2, p. 109-121, 1997.

BERETZ A.; BRIANÇON-SCHEID, F.; STIERLÉ, A., CORRE, G.; ANTON, R.; CAZENAVE, J.. Inhibition of human platelet cyclic AMP phosphodiesterase and of platelet aggregation by a hemisynthetic flavonoid, amentoflavone hexaacetate, **Biochemical Pharmacology**, v. 35, n., 2, p. 257-262, 1986.

BRIGGS, L. H.; WHITE, G. W.. Constituents of the essential oil of *Araucaria Araucana*, **Tetrahedron**, v. 31, n. 10, p. 1311-1314, 1975.

BROPHY, J. J.; GOLDSACK, R. J.; WU, M. Z.; FOOKES, C. J. R.; FORSTER, P. I.. The steam volatile oil of *Wollemia nobilis* and its comparison with other members of the Araucariaceae (*Agathis* and *Araucaria*), **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 6, p. 563-578, 2000.

* Segundo NBR 6023, AGO 2002

BRUNETON, J.. **Pharmacognosie**:Phytochimie Plantes médicinales. 2. ed. Paris: Tec. Doc.- Lavoisier, 1993.

BUTTERWECK, V; ROTH, B. L.; NAHRSTEDT, A.; EVANS, J.; RAUSER, L.; SAVAGE, J.; PODAPAK, B.; ERNSBERGER, P. In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. **Psychopharmacology**, v. 162, n. 2, p. 193-202, 2002.

CARVALHO, P. E. R.. **Espécies florestais brasileiras**: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira. Colombo – PR: EMBRAPA, 1994. p. 70 – 78.

CASTRO, M. A.; GORDALIZA, M.; DEL CORRAL, J. M. M.; FELICIANO, A. S.. The distribution of lignanoids in the Order Coniferae. **Phytochemistry**, v. 41, n. 4, p. 995-1011, 1996.

COSTA, A. F..**Farmacognosia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1986.

CRECZYNSKI-PASA, T. B., SEIFRIZ, I., SILVA, A. J., MARCO, D., ALMEIDA, M. T. R., FARIAS, M. R.. Potencial Antioxidante da *Araucaria Angustifolia* (Bert) Kutze In: XVII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2002, Salvador. **Anais da XVII FESBE**. , 2002. p.64.

DATTA, P. K.; FIGUEROA, M.O.R.; LAJOLO, F. M.. Chemical Modification and Sugar Binding Properties of Two Major Lectins from Pinhão (*Araucaria brasilliensis*) Seeds. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 41, p. 1851-1855, 1993.

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H.; VLIETINCK, A.. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 4, p. 445-459, 1999.

DOMÍNGUEZ, X. A.. **Métodos de Investigación Fitoquímica**. México: Limusa, 1973.

EARLE, C. J.. **Gymnosperm Database**. Última modificação em: 17 nov 2002. Disponível em: <www.botanik.uni-bonn.de/conifers/ar>. Acesso em: 17 dez 2002.

ELISABETSKY, E.. Etnofarmacologia como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES,C.M. O. et al (Org.). **Farmacognosia**: da Planta ao Medicamento. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2002.

ESQUENAZI, D.. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract, **Research in Microbiology**, v. 153, n. 10, p. 647-652 , dec 2002.

ESTIVALET, C. (org.). **Florestas: Fortalezas e Ameaças**, 1.ed. Canela: ASSECAN, 1998.

FARIAS, M. R.. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FATMA. **Cobertura vegetal de Santa Catarina**. Florianópolis: CIASC, 1997. CD-ROM.

FIELD, H.J. Herpes simplex virus antiviral drug resistance: current trends and future prospects. **Journal of Clinical Virology**, v. 21, p. 261-269, 2001.

FONSECA, S. F.; NIELSEN, L. T.; RUVEDA, E. A.. Lignans of *Araucaria angustifolia* and ¹³C NMR Analisis of Some Phenyltetralin Lignans. **Phytochemistry**, v. 18, p.1703-1708, 1979.

FONSECA, F. N.; FERREIRA, A. J. S.; SARTORELLI, P.; LOPES, N. P.; FLOH, E. I. S.; HANDRO, W.; KATO, M. J.. Phenylpropanoid derivatives and biflavones at different stages of differentiation and development of *Araucaria angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 575–580, 2000.

FOWKE, L.; ATTREE, S.. Conifer Somatic Embryogenesis: studies of embryo development and the cell biology of conifer cells and protoplasts. **Plant Tissue Culture and Biotechnology**, v. 2, n.3, p. 124-130, 1996.

FRANZ, G.; KOEHLER, H. **Drogen und naturstoffe – Grundlagen und Praxis der Chemischen Analyse**. Berlin: Springer, 1992.

FREITAS, A M.; ALMEIDA, M. T. R.; SIMÕES, C. M.O.; BARARDI, C. R. M. Padronização da Técnica do MTT para avaliar conjuntamente a citotoxicidade e a atividade anherpética de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, (Pinheiro-do-paraná). XVI SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. **Resumos**. FM 197. UFPE, Recife, PE, 2000.

FREITAS, A M. **Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae.** 2001. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

FRÖHNER, C. R. A.; ALMEIDA, M. T. R.; FARIAS, M. R., BARARDI, C. R. M; SIMÕES, C. M. O.. Avaliação da Atividade Anti-herpética e da Citotoxicidade *Araucaria angustifolia*. **Resumos.** XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL. Centro de Eventos do Pantanal, Cuiabá, MT 19-22 nov 2002.

GARBARINO, J. A.; OYARZUN, M. L.; GAMBARO, V.. Labdane Diterpenes from *Araucaria araucana*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 5, p. 163-174, 1989.

GEISER, H.; QUINN, C.. Biflavonoids. In: HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.. **The Flavonoids**. v. 2. New York: Academic, 1975.

GEISER, H.; QUINN, C.. Biflavonoids. In: HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.. **The Flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1988.

GEMTCHÚJNICOV, I. D.. **Manual de Taxonomia Vegetal:** Plantas de Interesse Econômico. São Paulo: Agronômica Ceres, 1976.

GRYNBERG, N. F.; CARVALHO, M. G.; VELANDIA, J. R.; OLIVEIRA, M. C.; MOREIRA, I. C.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A.. DNA topoisomerase inhibitors: biflavonoids from *Ouratea* species. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n. 7, p. 819-822, 2002

GUERRA, M. P.; SILVEIRA, V.; REIS, M. S.; SCHNEIDER, L.. Exploração, manejo e conservação da araucária (*Araucaria angustifolia*). In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Org.). **Sustentável Mata Atlântica: A Exploração de Recursos Florestais**. São Paulo: SENAC, 2000.

HANSON, L. Chromosome number, karyotype and DNA C-value of the Wollemi Pine (*Wollemia nobilis*, Araucariaceae), **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 135, n. 3, p. 271-274, 2001.

HARADA, N.; ONO, H.. Atropisomerism in natural products. Absolute stereochemistry of biflavone, (-)-4',4'',7,7''-tetra-O-methylcupressuflavone, as determined by the theoretical calculation of CD spectra. **Journal of American Chemical Society**, v. 114, n. 20, p. 7687-7692, 1992.

HARBONE, J. B.. **The Flavonoids**. Londres: Chapman and Hall, 1988.

HASLAM, E.. Proanthocyanidins. In: HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.. **The Flavonoids: Advances in Research**. London: Chapman and Hall, 1982.

HASLAM, E.. **Chemistry of vegetable tannis**. New York: Academic, 1966. APUD MOURA, T. F. A. de L. **Sobre o *Limonium brasiliense* (BOISS.) Kuntze, Plunbaginaceae, o baicuru da Farm. Brasi. I**. 1984. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Do Rio Grande do SI, Porto Alegre, 1984.

HASLAM, E.. **Plant poyphenols**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

HASLAM, E.; CHARLTON, A. J.; BAXTER, N. J.; LILLEY, T. H.; MCDONALD, C. J.; WILLIAMSON, M. P.. Tannin interactions with a full-length human salivary proline-rich protein display a stronger affinity than with single proline-rich repeats. **FEBS Letters**, v. 382, n. 3, p. 289-292, 1996.

HE, K. TIMMERMANN, B. N.; ALADESANMI, A. J.; LU, Z.. A biflavonoid from *Dysoxylum lenticellare gillespie*, **Phytochemistry**, v. 42, n. 4, p. 1199-1201, 1996.

HEGNAUER, R.. **Chemotaxonomie der Pflanzen I**. Basel: Bukhairter, 1962.

HEGNAUER, R.. **Chemotaxonomie der Pflanzen VI**. Basel: Bukhairter, 1986.

ILYAS, N. ILYAS, M.; RAHMAN, W.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N.. Biflavones fro the leaves of *Araucaria excelsa*. **Phytochemistry**, v. 17, n. 5, p. 987-990, 1978.

KHAN, N. U.; ILYAS, M.; RAHMAN, W.; MASHIMA, T.; OKIGAWA, M.; KAWANO, N.. Biflavones from the leaves of *Araucaria bidwillii* Hooker and *Agathis alba* Foxworthy (Araucariaceae). **Tetrahedron**, v. 28, n. 3, p. 5689-5695, 1972.

KHAN, I. U.; ANSARI, W. H.. Biflavonoid from the Salicaceae. **Journal of Indian Chemical Society**, v. 62, n. 9, p. 713-714, 1985.

KOTT, V.; BARBINI, L.; CRUAÑES, M.; MUÑOZ, J. DE D.; VIVOT, E.; CRUAÑES, J.; MARTINO, V.; FERRARO, G.; CAVALLARO, L.; CAMPOS, R.. Antiviral activity in Argentine medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 64, n. 1, p. 79-84, 1999.

KRAUZE-BARANOWSKA, M.; CISOWSKI, W.. Antifungal biflavones from *Cupressocyparis leylandii*. **Planta Medica**, v. 65, n. 6, p. 572-573, 1999.

KWAK, W. J.; Han, C. K.; Son, K. H.; Chang, H. W.; Kang, S. S.; Park, B. K.; Kim, H. P.. Effects of ginkgetin from *Ginkgo biloba* leaves on cyclooxygenases and in vivo skin inflammation. **Planta Medica**, v. 68, n. 4, p. 316-321, 2002.

LAMBERT, J. B. ; Shawl, C. E.; Poinar , G. O.; Santiago-Blay, J. A.. Classification of Modern Resins by Solid State Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, **Bioorganic Chemistry**, v. 27, n. 6, p. 409-433, 1999.

LEDRU, M. P.; BRAGA, P. I. S.; SOUBIÈS, F.; FOURNIER, M.; MARTIN, L.; SUGUIO, K.; TURCQ, B.. The last 50,000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate, **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 123, n. 1-4, p. 239-257, 1996.

LEE, S. J.; CHOI, J. H.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S.; KIM, H. P.. Suppression of mouse lymphocyte proliferation in vitro by naturally-occurring biflavonoids, **Life Sciences**, v. 57, n. 6, p. 551-558, 1995.

LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; SCHURE, R.; CHEN, F.; SIDWELL, R.; BARNARD, D. I.; HUFFMANN, J. H.; KERN, E. R.. Antiviral activities of biflavonoids. **Planta Medica**. v. 65, n. 2, p.120-25, 1999.

LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; CASSIDY, C. S.; CHEN, A. M. F.. Biflavonoids as novel antituberculosis agents, **Bioorganic & Medical Chemistry Letters**, v. 11, n. 16, p. 2101-2104, 2001.

LORENZI, H.. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**, v. 1. Nova Odessa: Plantarum, 1998.

LUNTE, S. M.. Structural classification of flavonoids in beverages by Liquid Chromatography with Ultraviolet-Visible and eletrochemical detection. **Journal of Chromatography** , v. 384, p. 371-382, 1987.

MABRY, T. J.; MARKHAN, K. R.; THOMAS, M. B.. **The Systematic Identification of Flavonoids**. New York: Springer, 1970.

MARINI - BETTOLO, G. B. Preliminary Chemical Screening of Medicinal Plants in Field Conditions. In: **World Health Organization**. WHO, DPM/80.5, 1980.

MARKHAM, K. R.. **Techniques of Flavonoid Identification**. Academic Press: London, 1982.

MARKHAM, K. R.; SHEPPARD, C.; GEISER, H.. ^{13}C NMR studies of some naturally occurring amentoflavone and hinokiflavone biflavonoids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 12, p 3335–3337, 1987.

MARQUESINI, N. R. **Plantas usadas como medicinais pelos índios do Paraná e Santa Catarina, sul do Brasil:** guarani, kaingáng, xokleng, ava-guarani, kraô, cayuá. 1995. Dissertação (Mestrado)–Universidade Federal do Paraná, Curitiba. APUD FREITAS, A. M. **Avaliação da citotoxicidade e da atividade antiviral de extratos de Araucaria angustifolia (Bert.) O. Kuntze, Araucariaceae.** 2001. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2001.

MARTINS, M. F.; ALMEIDA, M. T. R.; FARIAS, M. R.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Análise de constituintes químicos de *Araucaria angustifolia* (BERT) O. Kuntze, com potencial atividade biológica. In: FARMAPÓLIS, 4, 2002, Florianópolis. **Resumos.** CD-ROM.

MATOS, F. J. A.. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** Fortaleza: UFC, 1998.

MATTHEWS, S.; MILA, I.; SCALBERT, A.; DONNELLY, D. M. X.. Extractable and non-extractable proanthocyanidins in barks. **Phytochemistry**, v. 45, n. 2, p. 405-410, 1997.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. **Tropicos.** Disponível em: <www.mobot.org>. Acesso em: 17 nov 2002.

MONTANARI JUNIOR, I.. Exploração econômica de plantas medicinais da Mata Atlântica. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Org.). **Sustentável Mata Atlântica: A Exploração de Recursos Florestais.** São Paulo: SENAC, 2000.

MOREIRA, L. C.; SIMÕES, C. M. O. **Avaliação da potencial atividade anti-herpética do líqüem *Cladin* sp. E de espécies vegetais das famílias Myrtaceae, Passifloraceae, Phytolaceae, Araliaceae e Araucariaceae.** Florianópolis: Relatório de Iniciação Científica-CNPq, 1998. 20 p.

MURTHY, S. S. N.. Confirmation of the structure of jeediflavone: a biflavanone from *Semecarpus anacardium*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 4, p. 925-927, 1984.

NG, T. B.; HUANG, B.; FONG, W. P.; YEUNG, H. W.. Anti-HIV Natural Products with Special Emphasis on HIV Reverse Transcriptase Inhibitors. **Life Sciences**, v. 61, n. 10, p. 933-949, 1997.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P.. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C.M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2002.

OFFORD, C. A.; PORTER, C. L.; MEAGHER, P. F.; ERRINGTON, G.. Sexual Reproduction and Early Plant Growth of the Wollemi Pine (*Wollemia nobilis*), a Rare and Threatened Australian Conifer, **Annals of Botany**, v. 84, n. 1, p.1-9, 1999.

OFMAN, D. J.. Flavonoid Profiles of New Zealand Kauri and Other Species of *Agathis*. **Phytochemistry**, v. 38, n. 5, p. 1223-1228, 1995.

OHASHI, H.; KAWAI, S.; SAKURAI, Y.; YASUE, M.. Norlignan from the knot resin of *Araucaria angustifolia*, **Phytochemistry**, v. 31, n. 4, p. 1371-1373, 1992.

OHLWEILER, O. A.. **Química Analítica Quantitativa**. v. 1, 2.ed.. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976.

PÁGINA da Araucária. Disponível em: <<http://sites.uol.com.br/mpcatell/>>. Acesso em: 12 agosto 2002.

PARVEEN, N.; TAUFEEQ, H. M.; KHAN, N. U.. Biflavones from the leaves of *Araucaria araucana*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 2, p. 332-333, 1987.

PILLAY, D. ZAMBON, M. Antiviral drug resistance. **BMJ**, v. 317, p.660-662, 1998.

PORTER, L. J.. Flavans and proanthocyanidins. In: HARBONE, J. B.. **The Flavonoids**. London: Chapman and Hall, 1988.

RAMASWAMY, A. S.; BASU, N.. Bradykinin antagonism by biflavonyls from *Ginkgo biloba* and *Cupressus torulosa*. **Advances Exp. Med. Biol.**, v. 21, p. 357-360, 1972.

REIS, M. S.. Aspectos do manejo de recursos da Mata Atlântica no contexto ecológico, fundiário e legal. In: SIMÕES, L. L.; LINO, C. F. (Org.). **Sustentável Mata Atlântica: A Exploração de Recursos Florestais**. São Paulo: SENAC, 2000.

RIBÉREAU-GAYON, P.. **Lês composés phénoliques dès végétaux**. Paris: DUNOD, 1968.

ROCHA, D. E.; CURRLIN, R.; COELHO, C.; ALCÂNTARA BELETTINI, S.A.; PAIVA, F. L.; SOBOTTKA, A.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O.. Avaliação da citotoxicidade de compostos flavonoídicos naturais e sintéticos. In: SIMPÓSIO DE

PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, Florianópolis, 1996. **Resumos**. Florianópolis: EDEME, 1996. p.142.

RODRIGUES, L.. Áreas endêmicas correm perigo. **Diário Catarinense**, Florianópolis, 29, setembro, 2002. Caderno Santa Catarina, p. 24.

SAARINEN, N. M.; SMEDS, A.; MÄKELÄ, S. I.; ÄMMÄLÄ, J.; HAKALA, K.; PIHLAVA, J.; RYHÄNEN, E.; SJÖHOLM, R.; SANTTI, R.. Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo. **Journal of Chromatography B**, v.777, n. 1-2, p. 311-319, 2002.

SANTOS, A. L. W.; SILVEIRA, V.; STEINER, N.; VIDOR, M.; GUERRA, M. P.. Somatic embryogenesis in Parana Pine (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Kuntze). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 45, n. 1, p. 97-106, 2002.

SANTOS, S. C.; MELLO, J. C. P.. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2002.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N.. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.

SCHULTZ, A. **Introdução à Botânica Sistemática**. 6. ed, v. 2. Porto Alegre: Sagra, 1990.

SHIMIZU, J. Y.; OLIVEIRA, Y. M. M. **Distribuição, variação e usos dos recursos genéticos da araucária no Sul do Brasil**. EMBRAPA–URPFCS. Documentos, 04. Curitiba–PR. p. 9, 1981.

SIDWELL, R.W. Determination of antiviral activity. **Drugs Pharmaceutical Science**, v. 27, p. 433-80, 1986.

SIEUWERTS, A.; KLIJN, J.G.M.; PETERS, H.A.; FOEKENS, J.A. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ – values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SILVA, G. L.; HEEBYUNG, C.; FARNSWORTH, N. R.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M.; BEECHER, C. W. W.; KINGHORNMAHABIR, A. D.; GUPTA, P.. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella willdenowii*, **Phytochemistry**, v. 40, n. 1, p. 129-134, 1995.

SIMÕES, C. M. O.; AMOROS, M.; GIRRE, L.; GLEYE, J.; FAUVEL, M. T. H. Antiviral activity of ternatin and meliternatin, 3-metoxylavones from species of *rutaceae*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 4, p. 989-92, 1990.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (ORG.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2002.

SMEE, D. F.; SIDWELL, R. W.; MORRISON, A. C.; BAILEY, K. W.; BAUM, E. Z.; LY, L.; WAGAMAN, P. C. Characterization of an influenza A (H3N2) virus resistant to the cyclopentane neuraminidase inhibitor RWJ-270201. **Antiviral Research**, v. 52, p. 251-259, 2001.

SUDO, K ; KONNO, K.; YOKOTA, T.; SHIGETA, S. A sensitive assay system for screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and type 2. **Journal of Virological Methods**, v. 49, p. 169-178, 1994.

TAKAHASHI, K.; MATSUDA, M.; OHASHI, K.; TANIGUCHI, K.; NAKAGOMI, O.; ABE, Y.; MORI, S.; SATO, N.; OKUTANI, K. SHIGETA, S. Analysis of anti-rotavirus activity of extract from *Stevia rebaudiana*. **Antiviral Research**, v. 49, p. 15-24, 2001.

TAKEUCHI, H.; BABA M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex virus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, p. 61-71, 1991.

TEILLIER, S.. **Curso de Botânica Sistemática**. Disponível em:
< www.geocities.com/calahualacl2/guias.htm >. Acesso em: 08 jan 2003.

VANDEN BERGHE, D. A.; VLIETINICK, A. J.; VAN HOOFF, L. Plant products as potential antiviral agents. **Bulletin de L'Institut Pasteur**, v. 84, p. 101-105. 1986.

WHITE, D. O.; FENNER, F. J. **Medical Virology**. 4. ed. San Diego: Academic, 1994.

ZEMBOWER, D. E.; LIN, Y.; FLAVIN, M. T.; CHEN, F; KORBA, B.E.. Robustaflavone, a potential non-nucleoside anti-hepatitis B agent, **Antiviral Research**, v. 39, n. 2, p. 81-88, 1998.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O. et al (Org.). **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRS/UFSC, 2002.

Neste trabalho não foram seguidas as indicações da ABNT que constam na NBR 14724, AGO, 2002, as quais tratam da impressão do trabalho apenas no anverso da folha (seção 5.1) e do espaçamento duplo (seção 5.3), por considerar essas normas contraditórias com o tema de preservação ambiental.