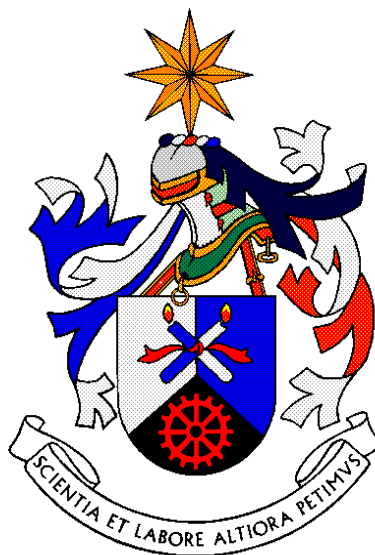


# UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Faculdade de Ciências  
Departamento de Química



## Avaliação bioguiada de extractos de *Eragrostis viscosa*

Trabalho de investigação com vista à obtenção do Grau de Mestre  
em Bioquímica

**Liliana Isabel de Oliveira Vieira**

Covilhã e UBI, Junho de 2010



**UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR**

Faculdade de Ciências  
Departamento de Química

**Avaliação bioguiada de extractos de *Eragrostis  
viscosa***

Trabalho de investigação com vista à obtenção do Grau de Mestre  
em Bioquímica

**Por: Liliana Isabel de Oliveira Vieira**

Orientação:

Prof. Doutora Fernanda da Conceição Domingues  
Prof. Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro  
Prof. Doutora Dina Isabel Dinis Medeiros de Mendonça

Covilhã e UBI, Junho de 2010



Este trabalho de investigação foi realizado no Centro de Investigação em Ciências da Saúde (CICS), no Departamento de Química, da Universidade da Beira Interior e no Departamento de Genética da Universidade Nova de Lisboa, no âmbito do projecto FCOMP-01-0124-FEDER-007430 da Fundação para a Ciência e Tecnologia com participação FEDER.

Foi orientado pelas Prof.<sup>a</sup> Doutora Fernanda da Conceição Domingues, Prof.<sup>a</sup>Doutora Luiza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro e Prof.<sup>a</sup> Doutora Dina Isabel Malheiros Dinis de Mendonça.



À memória do meu pai,



# Agradecimentos

A execução deste trabalho só foi possível devido ao empenho, colaboração e disponibilidade de algumas pessoas.

Às minhas orientadoras, Prof. Doutora Dina Isabel Dinis Medeiros de Mendonça, Prof. Doutora Fernanda da Conceição Domingues e Prof. Doutora Luíza Augusta Tereza Gil Breitenfeld Granadeiro, que me propuseram o tema de investigação. A todas ficam os meus agradecimentos, pelo apoio, tempo, orientação indispensável e esclarecimento de todas as dúvidas.

Ao Departamento de Genética da FCM da Universidade Nova de Lisboa, em especial ao Prof. Doutor José Rueff, Prof. Doutor Jorge Gaspar e Dra. Célia Martins, e a todos os colegas de laboratório, pelo acolhimento com que me receberam, orientação disponibilidade, simpatia e apoio nos momentos difíceis que passei.

À Susana e à Luísa por toda a ajuda e orientação prestada na actividade antimicrobiana e inúmeros esclarecimentos que foram muito úteis à realização deste trabalho.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, nomeadamente ao Ângelo, à Daniela à Marlene, à Rita e ao Nelson, pela amizade, companheirismo, e ajuda indispensável em determinadas etapas.

Aos meus amigos, Priscila, Sofia, Ana, Bento, Luís, Bruno e João pela paciência e companhia que me fizeram durante a elaboração deste trabalho.

Ao Dr. Luís Matias pela realização dos espectros de RMN.

À FCT, instituição que financiou o meu projecto de investigação: **“Plantas Medicinais Angolanas: Actividade Biológica”**, FCOMP-01-0124-FEDER-007430.

À minha mãe, ao meu irmão e a toda a família, a minha profunda gratidão por todo o apoio e compreensão com que sempre pude contar.



# Resumo

A Medicina Tradicional Angolana faz uso de diferentes plantas que nunca foram sujeitas a estudos de actividade biológica. Este trabalho consistiu no estudo dos extractos da planta *Eragrostis viscosa*. Avaliou-se a sua actividade antimicrobiana e citotóxica, seguida de um posterior fraccionamento do extracto com maior actividade biológica de modo a isolar os compostos activos da planta. Com os compostos isolados realizou-se um teste de genotoxicidade.

Para determinar a actividade antimicrobiana foram realizados os ensaios de difusão em disco e microdiluição de modo a determinar a MIC e a MLC dos extractos. Para o *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* efectuaram-se ainda as curvas de morte para determinar qual o possível modo de acção desses extractos sobre essas estirpes.

Realizou-se o teste do MTT, em fibroblastos humanos saudáveis, de modo a verificar se os extractos eram citotóxicos ou estimulavam a proliferação celular.

Os primeiros resultados mostraram que o extracto de hexano tem a maior actividade biológica, sendo assim, o extracto foi fraccionado para seleccionar as fracções responsáveis por essa actividade. Quatro compostos foram isolados, nas fracções activas: o ácido 8,15-epoxilabdan-16-óico (**5**); 16-acetoxi-8,15-epoxilabdano (**3**); 8,15-epoxi-16-norlabdan-13-ona (**4**) e 8,15-epoxilabdan-16-ol (**6**), sendo o composto **5** o maioritário presente no extracto. Os compostos **3**, **4** e **6** foram estudados quanto à sua genotoxicidade através do teste do micronúcleo com a citocinese bloqueada em células V79. Os resultados mostraram que nenhum dos compostos apresentaram genotoxicidade para células V79 com e sem activação metabólica.

No que respeita aos extractos, eles não apresentaram actividade antifúngica, nem actividade antibacteriana para as bactérias gram-negativas. No entanto, demonstraram o seu potencial para inibir as bactérias gram-positivas. Além disso, as curvas de morte demonstraram que os extractos brutos de hexano e diclorometano apresentaram actividade bacteriostática para as estirpes de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. A citotoxicidade dos extractos brutos avaliada pelo teste MTT mostrou alguns resultados positivos na maior concentração utilizada nos ensaios, no entanto, são necessários estudos adicionais para dar mais detalhes sobre este tema.

Em conclusão, os extractos estudados de *Eragrotis viscosa* não tem actividade antifúngica, inibem as bactérias gram-positivas e apresentam actividade bacteriostática para o *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*. No entanto, para obter conclusões mais relevantes neste trabalho, são necessários mais estudos antimicrobianos e de citotoxicidade com os compostos isolados da planta.

# Abstract

Angolan traditional medicine makes use of several plants that have never been tested for its biological activity. The present work intended the study of extracts of the grass *Eragrostis viscosa*. Antimicrobial and cytotoxic activity of *Eragrostis viscosa* was evaluated, followed by a subsequent fractionation of the extract with the highest biological activity, in order to isolate the active compounds of the grass. Moreover, the isolated compounds were tested for genotoxicity.

To determine the antibiotic activity, assays of disk diffusion and microdilution were performed to resolve the MIC and MLC in the extracts. Additionally, the time-kill curves for *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus* were carried out to examine the behaviour of the extract in the presence of these strains.

The MTT test was also performed with the grass extracts using healthy human fibroblasts to ascertain whether the extracts were cytotoxic or encouraged cell proliferation.

The first results revealed that the hexane extract has the highest biological activity, thus this extract was fractionated to select the fractions responsible for that activity. Four compounds were isolated, namely 8,15-epoxy-labdan-16-oic acid (**5**), 16-acetoxy-8,15-epoxylabdane (**3**), 8,15-epoxy-16-norlabdan-13-one (**4**) and 8,15-epoxy-labdan-16-ol (**6**). Compound 5 was the major compound in the extract. The compounds 3, 4 and 6 were studied for their genotoxicity by micronucleus assay with V79 cells blocked at cytokinesis. The results showed that none of the compounds had genotoxicity towards V79 cells with and without metabolic activation.

In concern to the crude extracts, they showed no antibacterial or antifungal activity with gram-negative strains. However, they demonstrate their potential to inhibit gram-positive strains, and in less extent to strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin (MRSA). Furthermore, the time kill curves demonstrated that the crude extracts of hexane and dichloromethane had a bacteriostatic activity against the strains of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. The cytotoxicity of the crude extracts evaluated by the MTT test and showed some positive results in higher concentrations, however, further analysis are needed to give more details about this topic.

In conclusion, the extracts studied of *Eragrostis viscosa* has no antifungic activity, inhibit gram–positive bacteria and presents bacteriostatic activity against *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. However, to obtain more relevant conclusion in this work, further investigation is needed, such as more antimicrobial and cytotoxicity assays with compounds isolated from the grass.

# Palavras-chave

Plantas medicinais

*Eragrostis viscosa*

Actividade biológica

Actividade antifúngica

Actividade antibacteriana

Citotoxicidade

Fraccionamento

Genotoxicidade

# Keywords

Medicinal plants

*Eragrostis viscosa*

Biological activity

Antifungal activity

Antibacterial activity

Cytotoxicity

Fractioning

Genotoxicity

# Glossário de Símbolos e Abreviaturas

° - graus

°C – graus célsius

$\delta$  – desvio químico

$\lambda$  – comprimento de onda

$\Delta$  - aquecimento à temperatura de ebulição (esquemas)

AcOET – acetato de etilo

ADN – ácido desoxiribonucleico

ATCC – American Type Culture Collection

Amp – Ampicilina

BN – células binucleadas

Carb - Carbenicilina

CBPI – índice de proliferação de células com a citocinese bloqueada

CC cromatografia em coluna

c.c.f – cromatografia em camada fina

CFU – unidades formadoras de colónias

DMSO – dimetilsulfóxido

DEPT – Distortionless Enhancement by Polimerization Transfer

FBS – soro fetal bovino

G-6-P – glucose -6-fosfato

GC – cromatografia gasosa

HCl – ácido clorídrico

HPLC – cromatografia líquida de alta eficiência

HREIMS – espectrometria de massa de alta resolução

Ham's F-10 – meio de cultura para células V79

H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> – água deslitada destilada e desionizada

Hx - hexano

IV – espectroscopia de infravermelho

M+ - ião quase molecular

M1- célula com um núcleo

M2- célula com dois núcleos

M3- célula com três núcleos  
M4- célula com quatro núcleos  
MBC – concentração mínima bactericida  
MHA - Mueller-Hinton Agar  
MHB – Mueller-Hinton Broth  
MIC – concentração mínima inibitória  
min - minuto  
Mix – mistura  
MLC – concentração mínima letal  
MMC – mitomicina C  
Mn – micronúcleo  
Mn1 – célula binucleada com um micronúcleo  
Mn2 – célula binucleada com dois micronúcleos  
Mn3 – célula binucleada com três micronúcleos  
MnTotal – micronúcleos totais  
MonoN – célula mononucleada  
MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina  
MS – espectrometria de massa  
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil-2H-tetrazólio  
 $m/z$  – massa/carga  
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase  
NAD<sup>+</sup> - Nicotinamida adenina dinucleotídeo  
NB – Nutrient Broth  
NDI – índice de divisão nuclear  
PCA – Plate Count Agar  
PoliN – células polinucleadas  
ppm – partes por milhão  
RMN 1H - Ressonância Magnética Nuclear de próton  
RMN 13C - Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13  
S9 – fracção microsomal de fígado de rato  
S9-mix –mistura de activação exógena contendo a fracção microsomal de fígado de rato  
SDA - Sabouraud Dextrose Agar

TN – célula trinucleada

Tetra -Tetraciclina

UV –espectroscopia de ultravioleta

V79 - linha comercial selvagem de fibroblastos de pulmão de hamster chinês

(*Cricetulus griseus*)

# Índice de Ilustrações

ILUSTRAÇÃO 1 - <i>ERAGROSTIS VISCOSA</i> A) NO SEU AMBIENTE NATURAL E B) DE HERVANÁRIA. ....	8
ILUSTRAÇÃO 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS NOVOS DA <i>ERAGROSTIS VISCOSA</i> . ....	11
ILUSTRAÇÃO 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA AMBREINOLIDA (8).....	11
ILUSTRAÇÃO 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DOS COMPOSTOS 9 E 10 ISOLADOS DA <i>ERAGROSTIS VISCOSA</i> . ..	12
ILUSTRAÇÃO 5 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR EXTERNA DAS BACTÉRIAS GRAM-POSITIVAS (ADAPTADO DE MAILLARD, 2002). ....	19
ILUSTRAÇÃO 6 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR EXTERNA DAS BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS (ADAPTADO DE MAILLARD, 2002). ....	21
ILUSTRAÇÃO 7 - ESTRUTURA QUÍMICA DO MTT E DO SEU PRODUTO DE REACÇÃO, FORMAZAN. ....	28
ILUSTRAÇÃO 8 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCEDIMENTO DO 1º ENSAIO DO MTT. ....	51
ILUSTRAÇÃO 9 - ESQUEMA REPRESENTATIVO DO PROCEDIMENTO DO 2º ENSAIO DO MTT. ....	52
ILUSTRAÇÃO 10 - ESQUEMA DA CULTURA DE CÉLULAS V79 SEM ACTIVAÇÃO METABÓLICA. ....	58
ILUSTRAÇÃO 11 - ESQUEMA DA CULTURA DE CÉLULAS V79 COM ACTIVAÇÃO METABÓLICA. ....	60
ILUSTRAÇÃO 12 - COMPARAÇÃO DOS DIÂMETROS DOS HALOS DE INIBIÇÃO DOS EXTRACTOS E DOS ANTIBIÓTICOS COMERCIAIS PARA TODAS AS ESTRIPES BACTERIANAS ESTUDADAS.....	70
ILUSTRAÇÃO 13 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO PARA O <i>B. CEREUS</i> COM O EXTRACTO DE HEX 1.....	75
ILUSTRAÇÃO 14 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO PARA O <i>B. CEREUS</i> COM O EXTRACTO DE HEX 2.....	76
ILUSTRAÇÃO 15 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO PARA O <i>B. CEREUS</i> COM O EXTRACTO DE CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub> . ....	76
ILUSTRAÇÃO 16 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO PARA O <i>S. AUREUS</i> COM O EXTRACTO DE HEX 1.....	78
ILUSTRAÇÃO 17 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO PARA O <i>S. AUREUS</i> COM O EXTRACTO DE HEX 2.....	78
ILUSTRAÇÃO 18 - REPRESENTAÇÃO DA CURVA DE CRESCIMENTO/INIBIÇÃO PARA O <i>S. AUREUS</i> COM O EXTRACTO DE CH <sub>2</sub> CL <sub>2</sub> . ....	79
ILUSTRAÇÃO 19 - BIOACTIVIDADE DOS EXTRACTOS BRUTOS NO PRIMEIRO ENSAIO DO MTT.....	80
ILUSTRAÇÃO 20 - BIOACTIVIDADE DOS EXTRACTOS BRUTOS NO SEGUNDO ENSAIO DO MTT. ....	81
ILUSTRAÇÃO 21 - DIFUSÃO EM DISCO DAS FRACÇÕES DO EXTRACTO HEXANO 1 OBTIDAS NA CROMATOGRAFIA 1. ....	83
ILUSTRAÇÃO 22 - BIOACTIVIDADE DAS FRACÇÕES DO EXTRACTO DE HEXANO OBTIDAS NA CROMATOGRAFIA 1 NO ENSAIO DO MTT. ....	84
ILUSTRAÇÃO 23 - DIFUSÃO EM DISCO DAS FRACÇÕES DE HEXANO 1 OBTIDAS NAS CROMATOGRAFIAS 2 E 3. ....	86
ILUSTRAÇÃO 24 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 16-ACETOXI-8,15-EPOXILABDANO. ....	97
ILUSTRAÇÃO 25 - ESTRUTURA QUÍMICA DA 8,15-EPOXI-16-NORLABDAN-13-ONA.....	99
ILUSTRAÇÃO 26 - ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO 8,15- EPOXILABDAN-16-ÓICO.....	101
ILUSTRAÇÃO 27 - ESTRUTURA QUÍMICA DO 8,15-EPOXILABDAN-16-OL. ....	103
ILUSTRAÇÃO 28 - ESPECTRO DE IV DO COMPOSTO 3. ....	120
ILUSTRAÇÃO 29 - ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 3. ....	122
ILUSTRAÇÃO 30 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 3. ....	123
ILUSTRAÇÃO 31 - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 3. ....	123
ILUSTRAÇÃO 32 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 4.....	124
ILUSTRAÇÃO 33 - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 4. ....	124
ILUSTRAÇÃO 34 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 5.....	125
ILUSTRAÇÃO 35 - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 5. ....	125
ILUSTRAÇÃO 36 - ESPECTRO DE IV DO COMPOSTO 6. ....	126
ILUSTRAÇÃO 37 - ESPECTROS DE MASSA DO COMPOSTO 6. ....	128
ILUSTRAÇÃO 38 - ESPECTRO DE RMN <sup>1</sup> H DO COMPOSTO 6.....	129
ILUSTRAÇÃO 39 - ESPECTRO DE RMN <sup>13</sup> C DO COMPOSTO 6.....	129

# Índice de Tabelas

TABELA 1 - ESTIRPES USADAS NO ESTUDO. ....	35
TABELA 2 - INTERVALO DOS MIC PADRÃO ( $\mu\text{G}/\text{ML}$ ) SEGUNDO A NORMA NCCLS M100-S15. ....	36
TABELA 3 - PREPARAÇÃO DA S9-MIX.....	60
TABELA 4 - VALORES OBTIDOS PARA OS TESTES DE DIFUSÃO EM DISCO PARA AS ESTIRPES DE LEVEDURAS EM ESTUDO.....	65
TABELA 5 - VALORES OBTIDOS PARA OS TESTES DE DIFUSÃO EM DISCO PARA AS ESTIRPES BACTERIANAS EM ESTUDO.....	68
TABELA 6 - CONCENTRAÇÕES PADRÃO E RESPECTIVOS HALOS DE INIBIÇÃO PADRÃO PARA O TESTE DE DIFUSÃO EM DISCO (MM).....	69
TABELA 7 - CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS INIBITÓRIAS DOS EXTRACTOS PARA AS ESTIRPES GRAM-POSITIVAS OBTIDAS NO TESTE DE MICRODILUIÇÃO.....	71
TABELA 8 - CONCENTRAÇÕES MÍNIMAS LETAIS DOS EXTRACTOS OBTIDAS PARA AS ESTIRPES GRAM-POSITIVAS NO ENSAIO DE MICRODILUIÇÃO. ....	72
TABELA 9 - CROMATOGRAFIA 1. ....	82
TABELA 10 - CROMATOGRAFIA 2. ....	85
TABELA 11 - CROMATOGRAFIA 3. ....	85
TABELA 12 - CROMATOGRAFIA 4. ....	87
TABELA 13 - CROMATOGRAFIA 5. ....	87
TABELA 14 - CROMATOGRAFIA 6. ....	88
TABELA 15 - CROMATOGRAFIA 7. ....	89
TABELA 16 - CROMATOGRAFIA 8. ....	89
TABELA 17 - CROMATOGRAFIA 9. ....	90
TABELA 18 - CROMATOGRAFIA 10. ....	90
TABELA 19 - CROMATOGRAFIA 11. ....	91
TABELA 20 - CROMATOGRAFIA 12. ....	91
TABELA 21 - CROMATOGRAFIA 13. ....	92
TABELA 22 - CROMATOGRAFIA 14. ....	93
TABELA 23 - CROMATOGRAFIA 15. ....	94
TABELA 24 - CROMATOGRAFIA 16. ....	95
TABELA 25 - CROMATOGRAFIA 17. ....	95
TABELA 26 – DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ E DEPT DO COMPOSTO 3 EM $\text{CDCl}_3$ .....	97
TABELA 27 - DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ E DEPT DO COMPOSTO 4 EM $\text{CDCl}_3$ .....	99
TABELA 28 - DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ E DEPT DO COMPOSTO 5 EM $\text{CDCl}_3$ .....	101
TABELA 29 - DADOS ESPECTROSCÓPICOS DE RMN DE $^1\text{H}$ , $^{13}\text{C}$ E DEPT DO COMPOSTO 5 EM $\text{CDCl}_3$ .....	103
TABELA 30 - INDICADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS V79 APÓS INCUBAÇÃO COM O QUÍMICO SEM ATIVAÇÃO METABÓLICA.....	105
TABELA 31 - INDICADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CÉLULAS V79 APÓS INCUBAÇÃO COM O QUÍMICO COM ATIVAÇÃO METABÓLICA.....	106
TABELA 32 - ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS V79. DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS BINUCLEADAS DE ACORDO COM O NÚMERO DE MICRONÚCLEOS (MN) PRESENTES, NÚMERO DE MICRONÚCLEOS POR CÉLULA BINUCLEADA (MN/BN) E FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MICRONÚCLEADAS (%MNB) SEM ATIVAÇÃO METABÓLICA. ....	107
TABELA 33 - ENSAIO DO MICRONÚCLEO EM CÉLULAS V79. DISTRIBUIÇÃO DAS CÉLULAS BINUCLEADAS DE ACORDO COM O NÚMERO DE MICRONÚCLEOS (MN) PRESENTES, NÚMERO DE MICRONÚCLEOS POR CÉLULA BINUCLEADA (MN/BN) E FREQUÊNCIA DE CÉLULAS MICRONUCLEADAS (%MNB) COM ATIVAÇÃO METABÓLICA. ....	108

# Índice Geral

<b>Agradecimentos</b> .....	<b>vii</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>ix</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>xi</b>
<b>Palavras-chave</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Keywords</b> .....	<b>xiii</b>
<b>Glossário de Símbolos e Abreviaturas</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Índice de Ilustrações</b> .....	<b>xvii</b>
<b>Índice Geral</b> .....	<b>xix</b>
<b>Capítulo I - Revisão bibliográfica</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Medicina Tradicional</b> .....	<b>2</b>
<b>1.2. Constituintes activos das plantas</b> .....	<b>4</b>
1.2.1. Metabolitos primários e secundários .....	4
1.2.2. Isolamento dos compostos existentes nos extractos brutos de plantas e determinação da sua estrutura química .....	5
<b>1.3. Caracterização da Eragrostis viscosa</b> .....	<b>7</b>
<b>1.4. Estudos biológicos anteriores com a Eragrostis viscosa</b> .....	<b>12</b>
<b>1.5. Actividade antimicrobiana</b> .....	<b>14</b>
1.5.1. Importância do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos .....	15
1.5.2. Resistência bacteriana .....	16
1.5.3. Microrganismos .....	17
Bactérias .....	17
Leveduras .....	22
1.5.4. Determinação da actividade antimicrobiana .....	24
Difusão em disco .....	24
Microdiluição .....	25
Curvas de morte .....	26
<b>1.6. Citotoxicidade vs Genotoxicidade</b> .....	<b>27</b>
<b>1.7. Objectivo do trabalho</b> .....	<b>31</b>
<b>Capítulo II - Material e Métodos</b> .....	<b>32</b>
<b>2.1. Actividade antimicrobiana</b> .....	<b>33</b>
2.1.1. Reagentes .....	33
2.1.2. Equipamento .....	33
2.1.3. Estirpes .....	34
2.1.4. Controlos positivos .....	35
2.1.5. Actividade antimicrobiana .....	36
2.1.5.1. Assepsia .....	36
2.1.5.2. Difusão em disco .....	36
Actividade antifúngica .....	36
2.1.5.3. Testes de microdiluição em meio líquido .....	40
2.1.5.4. Curvas de crescimento .....	41
<b>2.2. Fraccionamento dos extractos</b> .....	<b>44</b>
2.2.1. Reagentes .....	44

2.2.2.	Equipamento .....	44
2.2.3.	Técnicas cromatográficas .....	45
2.2.4.	Reacções químicas utilizadas.....	45
<b>2.3.</b>	<b>Actividade citotóxica .....</b>	<b>47</b>
2.3.1.	Reagentes .....	47
2.3.2.	Assepsia .....	47
2.3.3.	Material biológico.....	48
	Meio de cultura para os fibroblastos.....	48
	Manuseamento dos fibroblastos e preparação para a técnica do MTT.....	48
	Protocolo do ensaio do MTT em fibroblastos .....	49
<b>2.4.</b>	<b>Actividade genotóxica .....</b>	<b>53</b>
2.4.1.	Reagentes .....	53
2.4.2.	Assepsia .....	53
2.4.3.	Material biológico.....	53
2.4.4.	Meio de cultura para as células V79.....	54
2.4.5.	Manuseamento de células V79 para preparação do teste do micronúcleo.....	54
	Protocolo do ensaio do micronúcleo em células V79 sem activação metabólica.....	57
	Protocolo do ensaio do micronúcleo em células V79 com activação metabólica .....	59
	Preparação do S9 mix:.....	60
2.4.6.	Identificação e contagem dos micronúcleos em células binucleadas .....	61
2.4.7.	Índices MN/BN e %MNBN .....	62
2.4.8.	Avaliação da proliferação celular .....	63
<b>Capítulo III - Resultados e Discussão .....</b>		<b>64</b>
<b>3.1.</b>	<b>Actividade antifúngica .....</b>	<b>65</b>
<b>3.2.</b>	<b>Actividade antibacteriana .....</b>	<b>66</b>
3.2.1.	Ensaio de susceptibilidade por difusão em disco .....	66
3.2.2.	Microdiluição.....	70
<b>3.2.3.</b>	<b>Curvas de morte .....</b>	<b>74</b>
<b>3.3.</b>	<b>Citotoxicidade dos extractos brutos .....</b>	<b>80</b>
<b>3.4.</b>	<b>Fraccionamento do extracto de hexano 1 .....</b>	<b>82</b>
<b>3.5.</b>	<b>Caracterização dos compostos isolados .....</b>	<b>96</b>
	3- 16-acetoxi-8,15-epoxilabdano .....	96
	4- 8,15-epoxi-16-norlabdan-13-ona .....	98
	5- ácido 8,15- epoxilabdano-16-óico.....	100
	6- 8,15-epoxilabdano-16-ol .....	102
<b>3.6.</b>	<b>Genotoxicidade dos compostos puros .....</b>	<b>104</b>
<b>Capítulo IV - Conclusões e perspectivas futuras .....</b>		<b>110</b>
<b>4.1.</b>	<b>Conclusões gerais .....</b>	<b>111</b>
<b>4.2.</b>	<b>Perspectivas Futuras.....</b>	<b>113</b>
<b>Capítulo V - Bibliografia.....</b>		<b>114</b>
<b>Capítulo VI - Anexos .....</b>		<b>119</b>

**“ A ciência não é, e nunca será, um livro terminado.  
Todo o progresso importante levanta novas questões.  
Dificuldades novas e mais profundas são reveladas  
posteriormente a cada desenvolvimento.”**  
**Albert Einstein**

---

## Capítulo I - Revisão bibliográfica

## 1.1. Medicina Tradicional

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a medicina tradicional refere-se ao conjunto de conhecimentos técnicos e práticos fundamentadas em teorias, crenças e experiências próprias de diferentes culturas, com a finalidade de prevenir, diagnosticar e tratar doenças físicas e mentais ou manter o bem estar (WHO, 2003).

A medicina vegetal é a mais lucrativa de entre os vários tipos de medicina tradicional, usando ervas aromáticas, preparações ou produtos cujos ingredientes activos são parte de plantas ou outras matérias vegetais (WHO, 2003).

Desde os primórdios da civilização que o ser humano distinguiu plantas comestíveis de outras que apresentam efeitos tóxicos ou ainda daquelas com potencial curativo. Estes conhecimentos foram sendo transmitidos entre gerações, por via oral até ao aparecimento da escrita, começando então a ser compilados e difundidos como tesouros preciosos (Cunha *et al*, 2007).

As plantas são consideradas uma das fontes de inspiração de novas drogas, dando assim o seu contributo para a saúde humana e seu bem-estar. Têm um papel muito importante no desenvolvimento de novos medicamentos, podendo usar-se tanto como fitoterápicos no tratamento de doenças, como um modelo natural para o desenvolvimento de novos medicamentos (Iwu *et al*, 1999).

A sequência para o desenvolvimento de fármacos geralmente começa com a identificação de moléculas responsáveis pelas propriedades activas da planta, ensaios biológicos detalhados (tanto ao nível das suas propriedades biológicas, como de toxicidade), e formulação de formas farmacêuticas, seguindo-se várias fases de estudos clínicos para confirmar a sua segurança, eficácia e o perfil farmacocinético do novo medicamento (Cunha *et al*, 2007).

As possíveis interações com alimentos ou com outros medicamentos podem ser discernidos a partir dos ensaios clínicos (Iwu *et al*, 1999).

Actualmente a OMS estima que 80% da população de alguns países asiáticos e a maior parte dos africanos depende da medicina tradicional para cuidados primários de

saúde. O panorama nos países desenvolvidos é completamente diferente, a esmagadora maioria dos cuidados de saúde são facultados pela medicina convencional, no entanto, segundo a OMS, cerca de 70 a 80% da população destes países recorreu pelo menos uma vez a alguma forma de medicina alternativa ou complementar (WHO, 2003).

Com o crescimento da população africana, a procura por plantas medicinais também tem crescido o que ameaça a sobrevivência de algumas espécies. Este facto, coloca um enfoque no estudo das plantas medicinais utilizadas, que permita garantir a sua eficácia e segurança, bem como desenvolver e aperfeiçoar fórmulas terapêuticas estáveis e padronizadas com a finalidade de uma utilização na terapêutica (WHO, 2003).

O objectivo do uso de fitoterápicos na medicina humana não é substituir medicamentos registados e já comercializados, mas sim aumentar a opção terapêutica que está disponível aos profissionais de saúde com medicamentos equivalentes, por vezes mais baratos e com o espectro de acção mais adequado, como indicação terapêutica ou complementar, às medicações já existentes, ou ainda como fonte de fornecimento de substratos para a indústria farmacêutica (Marconatto, 2006).

## 1.2. Constituintes activos das plantas

As plantas, assim como os outros organismos vivos, possuem diversos constituintes químicos, uns característicos de todas as plantas, outros, sobretudo do metabolismo secundário, que caracterizam determinadas espécies ou géneros. Quando esses constituintes, normalmente presentes em pequenas quantidades, conferem uma possibilidade directa ou não da planta ser usada na terapêutica com benefícios para o tratamento e a prevenção de uma dada patologia a planta adquire o estatuto de medicinal (Cunha *et al.*, 2007).

Para além dos constituintes activos, por vezes algumas plantas possuem ainda outros compostos que podem influenciar o modo de acção desses princípios activos, tanto ao nível de conferir protecção contra alterações como hidrólises, oxidações; inibições de sistemas enzimáticos ou de melhorar a absorção do composto activo, por exemplo, facilitando a sua passagem através das membranas celulares. Isto explica o facto de por vezes os extractos brutos apresentarem mais actividade que os compostos activos isolados (Cunha *et al.*, 2007).

### 1.2.1. Metabolitos primários e secundários

É normal distinguir entre metabolismo primário e secundário. O metabolismo primário refere-se aos processos chamados de essenciais à vida, tais como os processos relacionados com a fotossíntese, produção de moléculas simples de baixo peso molecular do ciclo de Krebs, aminoácidos, hidratos de carbono, lípidos, proteínas e ácidos nucleicos. Estes compostos são normalmente precursores dos metabolitos secundários e são produzidos em grandes quantidades, e distribuídos uniformemente. Os metabolitos secundários são, em princípio, não essenciais à vida, no entanto contribuem para a sobrevivência das espécies. Normalmente são produzidos como defesas a determinados agentes físicos ou químicos, relacionados com a evolução das

espécies. São característicos de um grupo biológico, como a família ou o género da espécie (Torssell, 1997; Demetzos e Dimas, 2001).

O estudo químico anteriormente realizado (Sebastião, 2007) revelou que a planta *Eragrostis viscosa* possuía, na sua maioria diterpenos com um esqueleto 8,15-epoxilabdano. Foram isolados sete diterpenos novos; um diterpeno já conhecido, a ambreinolida; um triterpeno pentacíclico (esqueleto lupano) e um esteróide (esqueleto estigmano). A composição da planta, mostrou estar de acordo com os poucos estudos efectuados em plantas do mesmo género (Sebastião, 2007; Sebastião *et al*, 2010).

### 1.2.2. Isolamento dos compostos existentes nos extractos brutos de plantas e determinação da sua estrutura química.

Quando os químicos do século XVIII deram o salto do mundo dos mitos para a ciência moderna, as propriedades dos extractos obtidos na natureza despertaram muito o seu interesse, começando a separar, purificar e a analisar os compostos produzidos por células vivas. Foram desenvolvidos métodos de separação e, sem dúvida, a Química dos Produtos Naturais tem trazido grandes estímulos para o desenvolvimento de técnicas refinadas que temos hoje, como os diversos métodos de cromatografia analítica e preparativa: cromatografia em coluna (CC), cromatografia gasosa (GC), cromatografia de camada fina (c.c.f ou TLC), cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia em papel, electroforese, troca iónica, etc. Através destes métodos é possível isolar compostos presentes em quantidades extremamente reduzidas (Torssell, 1997).

A elucidação estrutural era normalmente realizada por degradação de fragmentos menores com estruturas conhecidas, combinada com investigações sobre o padrão de reactividade e análise elementar dos compostos. Estes trabalhos levaram a descobertas muito valiosas de reacções e rearranjos, porém sem a espectroscopia, a Química dos Produtos Naturais nunca teria atingido o seu estatuto actual. As espectroscopias de ultra-violeta (UV), infravermelhos (IV), ressonância magnética nuclear (RMN), e espectroscopia de massa (MS), mudaram os métodos de trabalho e os hábitos ao longo dos anos. Recolheu-se uma grande quantidade de propriedades espectrais co-

relacionadas com a estrutura dos compostos que, nos permite, actualmente, resolver estruturas de um modo muito mais rápido e simples. Quando a quantidade de amostra é muito pequena e a sua estrutura é complicada, o último recurso é a cristalografia de raios-X. Actualmente estão disponíveis programas que tornam a elucidação estrutural quase um trabalho de rotina para o especialista (Torssell, 1997).

A espectroscopia de RMN, é a ferramenta mais eficiente que a Química possui, para a determinação estrutural de moléculas orgânicas. A técnica determina a intensidade, deslocamento e multiplicidade de picos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Torssell, 1997).

A fragmentação dos extractos efectuada neste trabalho, com vista a isolar os compostos responsáveis por uma possível actividade biológica, foi realizada por cromatografia em coluna, que consiste na separação dos compostos de uma mistura, consoante a sua solubilização em solventes mais ou menos polares, controlando-se simultaneamente a separação das fracções por cromatografia em camada fina.

Para ter uma elucidação da estrutura química dos compostos, efectuaram-se sucessivos espectros de ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ . Uma vez que já tinha sido determinada anteriormente a estrutura química dos compostos da *Eragrostis viscosa*, foi possível comparar os dados espectralométricos, e determinar quais os compostos isolados.

O composto maioritário que se isolou da planta, foi o ácido 8,15-epoxilabdan-16-óico. Durante o isolamento foi possível sintetizar outros compostos, com o mesmo esqueleto, que tinham sido obtidos anteriormente, a partir de reacções de acetilação e de redução.

Uma vez os compostos isolados e a sua estrutura química determinada, efectuam-se ensaios biológicos, de modo a verificar se estes possuem alguma actividade biológica.

### 1.3. Caracterização da *Eragrostis viscosa*

A *Eragrostis viscosa* é uma planta da família Poaceae, subfamília Chloridoideae e género *Eragrostis*, que se encontra sobretudo em regiões quentes tropicais e subtropicais, tendo preferência por locais abertos, terras secas e pobres cheias de ervas daninhas. As espécies deste género encontram-se normalmente em África, com maior incidência na zona leste e sul (Sebastião, 2007).

A *Eragrostis viscosa* (Retz.) Trin é uma erva anual com cerca de 30cm de altura (Ilustração 1). Existe principalmente na África do Sul, tendo sido registada também no Norte dos Camarões e em Angola. Fora de África há indicações da existência de variantes na Malásia (Sebastião, 2007).

Em Angola, esta espécie é conhecida com o nome de vernáculo de Eipaa-nhoca, e desenvolve-se em zonas de clima semi-árido, na região sudoeste do país (Sebastião, 2007).

O género *Eragrostis* é muito usado como forragem na alimentação do gado, no entanto, os animais recusam-se a comer esta espécie, talvez por ser aromática e viscosa (aderente), não ter sabor, ou por outra razão desconhecida. A população local usa a planta como repelente de cobras (Sebastião, 2007; Sebastião *et al*, 2010).



**Ilustração 1** - *Eragrostis viscosa* a) no seu ambiente natural e b) de herbanária. a) <http://plants.jstor.org/taxon/Eragrostis.viscosa?cookieSet=1>(visualizada 25/06/2010) e b) <http://plants.jstor.org/specimen/img/k000643367> (visualizada 25/06/2010)).

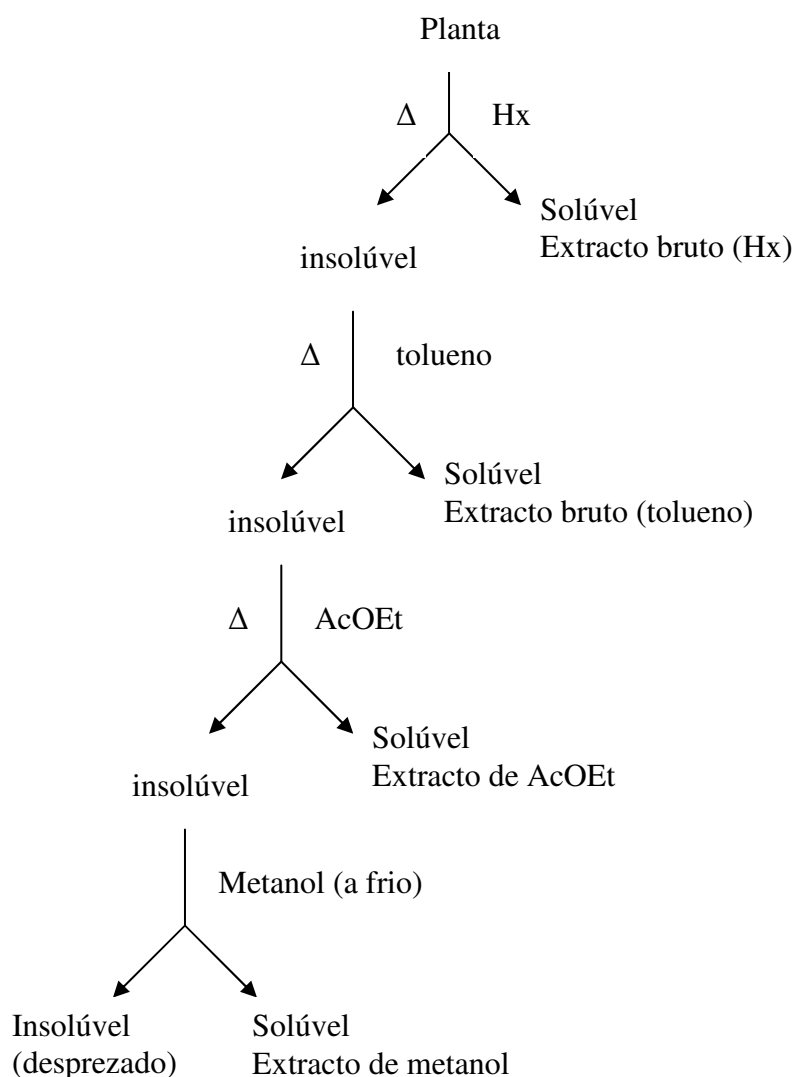
O género *Eragrostis* está muito pouco estudado quimicamente. A maior parte da informação científica actualmente publicada sobre espécies pertencentes ao género refere-se mais aos aspectos botânico (*Eragrostis patens*) e ambiental (*Eragrostis curvula*) (Sebastião *et al*, 2010).

Os poucos estudos químicos feitos até aqui em plantas do género *Eragrostis* estão principalmente virados para a avaliação do seu relativo valor nutritivo; isto é, tem sido dada maior relevância à determinação dos componentes do metabolismo primário – aminoácidos (proteínas) ácidos gordos, hidratos de carbono – e ao teor em sais minerais, fibras, entre outros. Isto é obviamente devido ao facto de grande numero desta espécies ser usado pelos respectivos povos indígenas principalmente na alimentação do gado (*Eragrostis nigra*, *Eragrostis tef*, *Eragrostis curvula*, entre outras) (Sebastião, 2007; Sebastião *et al*, 2010).

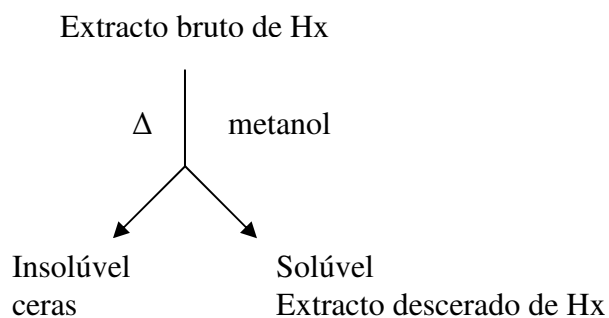
Quanto à composição em metabolitos secundários, da pesquisa bibliográfica resultou um único estudo prévio sobre o género *Eragrostis*, a *Eragrostis ferrugínea*, planta cujas raízes são usadas em certas regiões da Coreia no tratamento da diabetes. Das raízes desta planta foram isolados três diterpenos do tipo cassano (Nishiya *et al.*, 1991)

A avaliação química dos constituintes da *Eragrostis viscosa*, foi efectuada em 2007 (Sebastião, 2007; Sebastião *et al.*, 2010), usando a parte aérea da planta que foi recolhida nos arredores da cidade de Lubango (Huila/Angola).

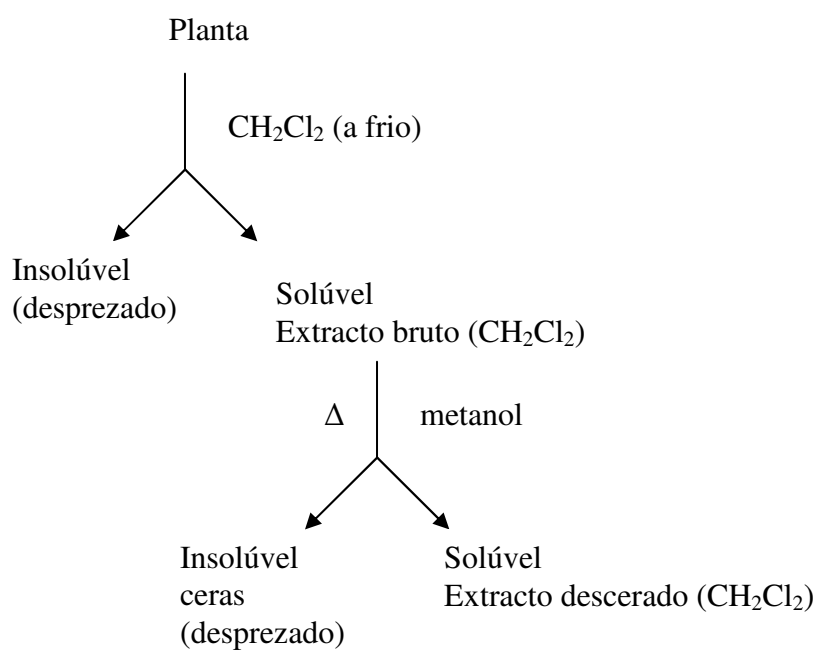
A parte aérea da planta foi seca, depois do qual uma parte foi extraída a quente (soxhlet) com hexano, tolueno, acetato de etilo e a frio com metanol, como mostra o esquema seguinte: (Sebastião, 2007)



O extracto bruto de hexano foi ainda tratado da seguinte forma: (Sebastião, 2007)



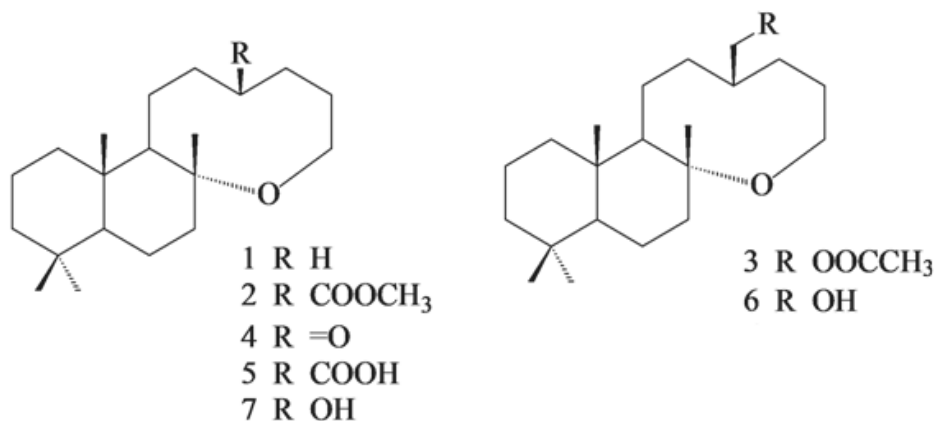
A outra amostra de *E. viscosa* foi extraída a frio (maceração) com diclorometano, como mostra o esquema seguinte:



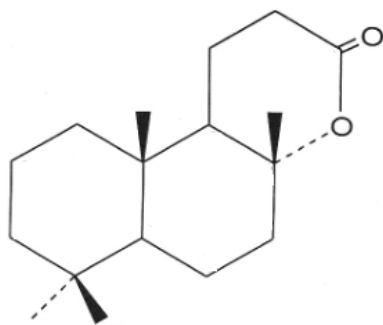
Os extractos de hexano, tolueno e diclorometano foram fraccionados, tendo-se isolado dez compostos. Sete desses compostos são diterpenos com esqueleto labdano (8,15-epoxilabdano) (Ilustração 2): 8-15-epoxi-16-norlabdano (**1**); 8,15-epoxilabdan-

16-oato de metilo (**2**); 16-acetoxi-8,15-epoxilabdano (**3**); 8,15-epoxi-16-norlabdan-13-ona (**4**); ácido 8,15-epoxilabdano-16-óico (**5**); 8,15-epoxilabdano-16-ol (**6**); 8,15-epoxi-16-norlabdan-16-ol (**7**) (Sebastião, 2007).

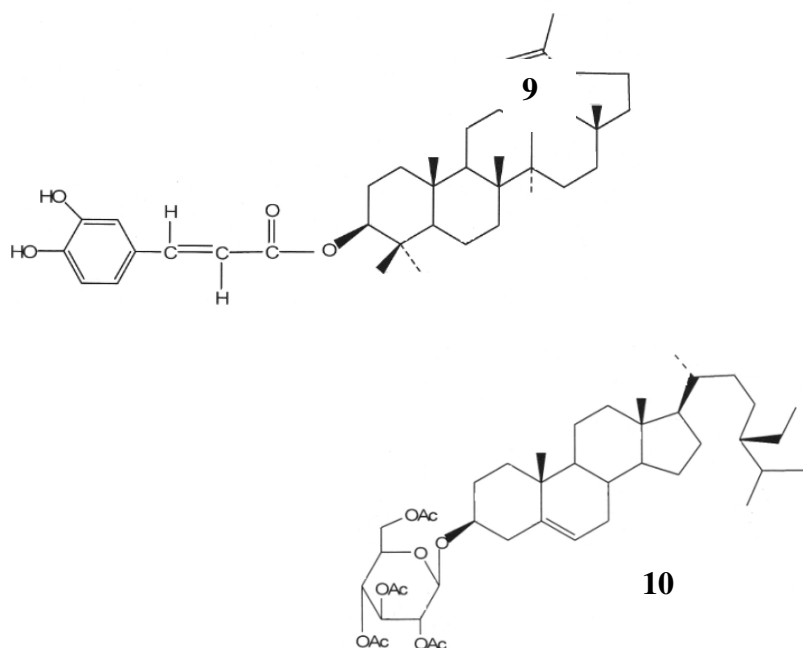
Foi igualmente isolado um diterpenóide já conhecido: (+)-14,15,16-trinorlabdan-13,8-olida (ambreinolida) (**8**). Isolaram-se ainda um triterpeno pentacíclico de esqueleto lupano  $3\beta$ -(3'',4''-di-hidroxi)-(E)-ciamoiloxilup-20(29)-eno (**9**) e um esteróide de esqueleto estigmastano 3-(2',3',4',6'-tetracetil- $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)- $\beta$ -sitosterol (**10**) (Sebastião, 2007).



**Ilustração 2** - Estrutura química dos compostos novos da *Eragrostis viscosa*.



**Ilustração 3** - Estrutura química da ambreinolida (**8**).



**Ilustração 4** - Estrutura química dos compostos **9** e **10** isolados da *Eragrostis viscosa*.

#### 1.4. Estudos biológicos anteriores com a *Eragrostis viscosa*

O extracto de hexano da *Eragrostis viscosa* apresentou alguma actividade moluscicida frente à desova da *Biomphalaria glabrata*, 51,6% de mortalidade a uma concentração de 100 ppm (Sebastião, 2007; Sebastião *et al*, 2010).

A amostra em análise, mesmo a alta concentração, apresentou menos de 50% de mortalidade sobre as larvas de *Artemia salina*, o que leva a concluir que o extracto de hexano não é tóxico para esta espécie (Sebastião, 2007; Sebastião *et al*, 2010).

O composto maioritário do extracto de hexano da *Eragrostis viscosa*, composto **5**, foi o único composto testado pelo teste de Ames. Este composto não apresentou genotoxicidade relevante nas condições testadas (Sebastião, 2007; Sebastião *et al*, 2010).

O teste das aberrações cromossômicas foi realizado a duas concentrações diferentes 10µg/µL e 100µg/µL do composto **5**. A concentração mais elevada teve resultados semelhantes ao branco, no entanto apresentou uma redução superior a 50% em relação à outra concentração mais baixa, o que revela alguma citotoxicidade. No entanto recomendam-se mais testes complementares, nomeadamente com adição de S9 (Sebastião, 2007; Sebastião *et al*, 2010).

## 1.5. Actividade antimicrobiana

Os compostos com acção antimicrobiana podem ter duas origens, quando são produzidas por microrganismos (*Penicillium spp.*, *Streptomyces spp.*, entre outros) são designados por antibióticos, quando provêm de síntese química com propriedades idênticas são quimioterápicos. Actualmente considera-se que todo o fármaco com acção antimicrobiana é um antibiótico (Ferreira e Sousa, 1998; Overbye, 2005).

A ambioterapia teve início com a descoberta da penicilina por Fleming em 1945, tratando-se de um antibiótico inibidor do peptidoglicano, o que não apresenta efeitos deletérios para o Homem visto tratar-se de uma molécula tipicamente procariota. Mais tarde descobre-se a estreptomicina que é o primeiro antibiótico que inibe a síntese proteica (Ferreira e Sousa, 1998).

A introdução dos antibióticos sulfonamidas, por volta de 1930, e a penicilina na década 40 do século passado revolucionou a prática medicinal ao diminuir drasticamente as taxas de mortalidade associadas a infecções bacterianas. A idade do ouro dos antibióticos ocorreu com sucesso considerável aquando da descoberta e desenvolvimento das sulfonamidas, penicilina e estreptomicina. Este sucesso foi seguido pela introdução das tetraciclínas, macrolídeos, glicopeptídeos, cefalosporinas e ácido nalidíxico, sendo a maioria destes compostos derivados de produtos naturais ou produzidos pela modificação de produtos naturais através de síntese (Overbye, 2005). Estas descobertas registaram-se sobretudo nos 30 anos seguintes ao início da ambioterapia e resultaram na descoberta da maioria das classes de medicamentos antibacterianos conhecidos actualmente, muitos dos quais obtidos a partir de produtos naturais (Butler, 2006).

No final dos anos 60 do século passado, a necessidade médica para novos antibióticos começou a ser questionada e a indústria farmacêutica alterou a prioridade da pesquisa de novos antibacterianos, diminuindo o seu apoio industrial, embora as doenças infecciosas, especialmente as infecções bacterianas, constituam uma das principais causas de mortalidade do mundo (Overbye, 2005).

### 1.5.1. Importância do desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos

Após a descoberta da penicilina, os agentes antibacterianos tiveram um grande sucesso, a taxa de mortalidade causada por infecções bacterianas caiu vertiginosamente. Tal facto não se deveu somente ao desenvolvimento de agentes antibacterianos, mas também a uma melhor higiene, ao desenvolvimento de vacinas, e a uma consciência de que várias doenças eram causadas por bactérias. Este impacto observou-se essencialmente nos países industrializados, onde o acesso aos fármacos era mais facilitado (Overbye, 2005).

Os produtos naturais têm desempenhado um papel fundamental na descoberta de novas drogas antibacterianas (Butler, 2006). Estima-se que actualmente, os materiais vegetais estejam presentes, ou sejam fornecidos como modelo em cerca de metade dos medicamentos ocidentais. Muitas das drogas usadas actualmente na medicina moderna foram em tempos utilizadas na forma bruta, em práticas de cura tradicional, ou para outros fins, que sugeriram possíveis actividades biológicas. O principal benefício do uso de derivados de plantas é que são relativamente mais seguras que as formas sintéticas, oferecendo acima de tudo, tratamentos mais acessíveis (Iwu *et al*, 1999).

Nos últimos 20 anos, registou-se um declínio de 56% no número de antibióticos aprovados anualmente pela Food and Drug Administration, tendo sido lançadas apenas 22 novas drogas antibacterianas na última década (Butler, 2006).

Para além da importância de encontrar novos antibióticos, para o uso como medicamentos, há também uma grande pesquisa centrada no desenvolvimento de novos conservantes para a indústria alimentar. Têm sido desenvolvidos alguns produtos sintéticos para controlar o crescimento bacteriano e reduzir a incidência de intoxicações alimentares e deterioração dos alimentos. Apesar da eficácia dos conservantes sintéticos, os consumidores preocupam-se cada vez mais com a sua saúde, crescendo o interesse em novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, como plantas, extractos brutos de especiarias, ervas e plantas ricas em compostos fenólicos para reduzir os casos de doenças transmitidas por alimentos (Shan *et al*, 2007).

A prevalência de derivados de produtos naturais em drogas antibacterianas pode ser devido à evolução dos metabolitos secundários como químicos biologicamente activos que conferem vantagens selectivas aos organismos produtores. Os produtos naturais também são susceptíveis de terem sofrido evolução, penetrando as membranas celulares e interagindo com os alvos específicos das proteínas. Além disso muitos produtos naturais apresentam uma complexidade estrutural que é necessária para a inibição de muitas proteínas antibacterianas (Butler, 2006).

### 1.5.2. Resistência bacteriana

A resistência bacteriana foi inicialmente descrita por Abraham e Chain 1940, com o aparecimento de estirpes de *S. aureus* produtoras de penicilinases, que são enzimas que inactivam por hidrólise as penicilinas. Na década seguinte surgem estirpes de *Shigella* resistentes às sulfonamidas e estirpes co-resistentes às sulfonamidas, estreptomicina e tetraciclina (Ferreira e Sousa, 1998).

A evolução da resistência antimicrobiana em microrganismos resulta da interacção entre a exposição aos antibióticos e a transmissão de resistência dentro e entre os indivíduos, dependendo dos hábitos sociais dos indivíduos. Esta evolução deve ser avaliada como uma perspectiva de risco analisando a sua probabilidade de ocorrência na população humana (Guillemot, 1999).

O início rápido da resistência a medicamentos antibacterianos diminuiu a sua eficácia, e conseqüentemente a busca de novos agentes antibacterianos, o que deve ser alterado, para resolver a necessidade de novas drogas antibacterianas com novos mecanismos de acção (Butler, 2006).

Na comunidade há indícios que a exposição das populações aos antibióticos promove a resistência adquirida aos antimicrobianos patogénicos, tais como o *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae* e estafilococos cutâneos. No ambiente hospitalar, uma maior utilização de antibióticos é muitas vezes associado a um aumento na resistência aos antibióticos, enquanto que uma redução no consumo de antibióticos pode dar origem a uma redução da resistência a medicamentos específicos, em especial nas diversas espécies de enterobactérias (Guillemot, 1999).

A associação entre o uso de cefalosporinas de terceira geração e a vancomicina demonstrou ser um factor de risco para *Enterococcus* resistente à vancomicina em infecções em pacientes cirúrgicos (Guillemot, 1999).

O controlo do *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (MRSA) ainda não se encontra resolvida na maioria das instituições de saúde. As estratégias para o seu controlo centram-se sobretudo em medidas de controlo da transmissão e na prevenção da colonização, mas raramente mencionam o uso específico de antimicrobianos. Não se encontrou nenhuma relação entre a MRSA e o uso de antibióticos pela comunidade (Guillemot, 1999; MacKenzie, 2007).

Como a resistência microbiana a diversos grupos anti-microbianos tem aumentado ao longo dos anos, sobretudo nos ambientes hospitalares com o acréscimo de morbidade e mortalidade nas infecções, surge um elevado interesse no desenvolvimento de novos compostos de origem vegetal ou mineral com propriedades anti-microbianas, que possam ser usados como alternativa aos antibióticos comuns (Ferreira e Sousa, 1998).

### 1.5.3. Microrganismos

#### Bactérias

As bactérias são seres microscópicos dotados de uma estrutura unicelular (procariotas) que possuem uma organização celular muito simples, variando bastante no seu tamanho (*Mycoplasma* 100-200 nm, *E. coli* 1,2-1,5  $\mu\text{m}$ ). Classificam-se morfológicamente, de acordo com a forma da célula e com o grau de agregação. Visto isto, podem ser organizados em cocos (esféricos), bacilos (bastonetes), vibrião (vírgula) e espirilo (forma ondulada). Apenas os bacilos e os cocos têm tendência a agrupar-se, podendo ser aos pares (diplococos), em cadeia (estreptococos), em cachos (estafilococos) ou em tétraedas. Podem ainda possuir apêndices como flagelos, estruturas que lhes permite a locomoção (Maillard, 2002).

A estrutura da célula bacteriana é a de uma célula procariota, sem organelos no interior celular, sem núcleo envolvido por uma membrana nuclear e sem ADN organizado em verdadeiros cromossomas como acontece nas células eucarióticas. O ADN dos procariontes, geralmente composto por um único cromossoma circular, encontra-se numa zona chamada nucleóide no citoplasma. Estas células não possuem nenhum tipo de compartimentação interna por membranas. A sua estrutura elementar consiste apenas numa parede celular, uma membrana citoplasmática e citoplasma (Maillard, 2002).

As bactérias (excepto *Mycoplasma* e halófilos) possuem parede celular rígida, que recobre a membrana citoplasmática e lhe confere forma. Quimicamente é constituída por peptidoglicano, que protege a célula de uma possível lise da membrana citoplasmática, uma vez que as células normalmente se desenvolvem em meios hipotónicos. A parede celular para além de conferir protecção à célula contra a lise osmótica e ser responsável pela morfologia celular, é ainda responsável pelo comportamento das bactérias relativamente à coloração de Gram, que permite dividir as células em dois grupos taxonómicos distintos, gram-positivas e gram-negativas. É essencialmente da responsabilidade da estrutura e composição química da parede celular e membranas envolventes, que surgem variações da sensibilidade das bactérias para determinados tipos de agentes antibacterianos, bem como as respostas geradas por elas (Ferreira e Sousa, 1998; Maillard, 2002; Prescott et al, 2005).

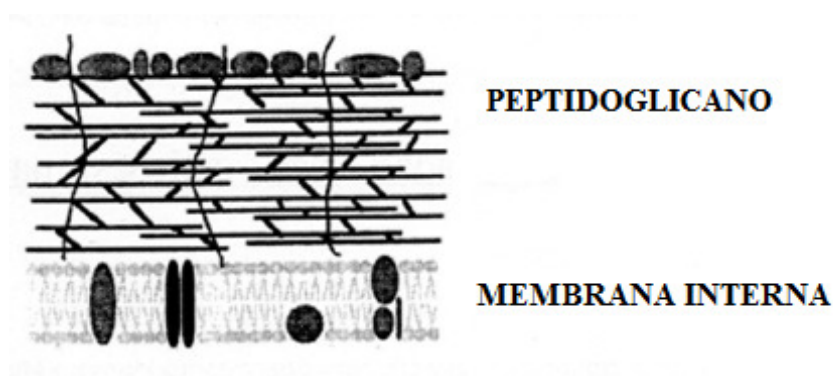
A membrana citoplasmática é considerada como o principal alvo dos agentes antimicrobianos, pois esta desempenha na célula procariota muitas das funções vitais à sua sobrevivência, que na célula eucariótica são efectuadas pelos organelos celulares ausentes nas procarióticas. Para além disso, realiza também funções ligadas à biossíntese de componentes da parede celular e funções bioenergéticas, e funciona como barreira selectiva de permeabilidade (Maillard, 2002; Prescott et al, 2005).

A coloração de Gram é uma técnica usada há mais de um século pelos microbiologistas, que permite distinguir os dois principais grupos bacterianos. De acordo com a coloração apresentada face ao método de Gram (método de coloração diferencial), as bactérias dividem-se gram-positivas e gram-negativas (Prescott et al, 2005).

## Bactérias Gram positivas

A parede celular das bactérias gram-positivas, quando observadas em microscopia electrónica, apresenta-se como uma estrutura rígida, homogénea e espessa. É predominantemente constituída por peptidoglicano, no entanto podem coexistir outros polímeros, como ácidos teicócos e teilurónicos, como se pode observar na figura 5 (Maillard, 2002).

As bactérias gram-positivas apresentam uma parede espessa, que retém o precipitado insolúvel formado pelo corante primário (violeta de cristal) e pela solução fixadora (lugol), deste modo as células não são descoradas permanecendo com a coloração conferida pelo corante primário (roxo) (Ferreira e Sousa, 1998 e <http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm>).



**Ilustração 5** - Estrutura da parede celular externa das bactérias gram-positivas (adaptado de Maillard, 2002).

### *Staphylococcus aureus*

Os *Staphylococcus* são cocos Gram positivos que se dispõem “em cacho”, são imóveis, capsulados, esporulados e anaeróbios facultativos.

Os estafilococos são bactérias que estabelecem uma relação de comensalismo ou mutualismo com o Homem, muitas espécies fazem parte da flora microbiana da pele e mucosas, havendo no entanto, espécies patogénicas para o homem como o

*Staphylococcus aureus*. A versatilidade de infecções causadas por este microrganismo deve-se ao elevado número de toxinas e enzimas que produz. As infecções por ele causadas devem-se às invasões e lesões dos tecidos pelo microrganismo e também à acção das suas toxinas (Ferreira e Sousa, 2000).

### ***Enterococcus faecalis***

Os *Enterococcus* são cocos gram-positivos que se apresentam isolados, aos pares ou em cadeias curtas e, ocasionalmente como coco-bacilos. São aeróbios facultativos, algumas espécies são móveis. Estes microrganismos estabelecem relações de comensalismo com o Homem, com presença constante no tracto gastrointestinal e urinário, no entanto quando é agente de infecção a sua resistência natural aos agentes infecciosos torna muito difícil o tratamento (Ferreira e Sousa, 2000).

### ***Bacillus cereus***

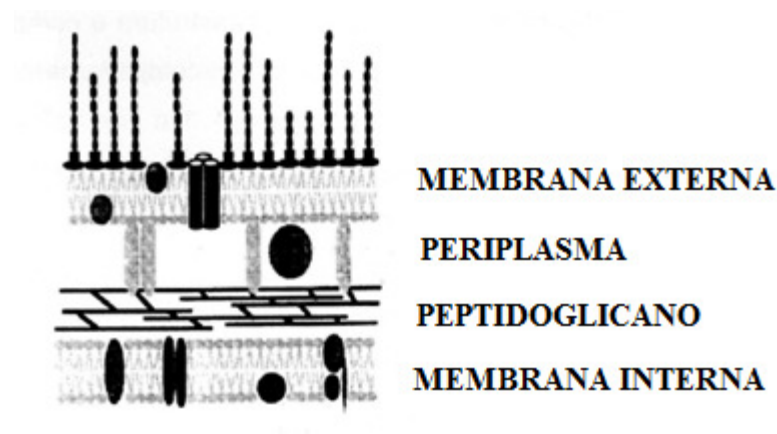
O *Bacillus cereus* tem uma distribuição ubiquitária na natureza. Estes microrganismos tem forma de bastonetes, móveis, Gram positivos de largas dimensões (1 x 3-5µm), anaeróbios facultativos e produtores de esporos quando cultivados em aerobiose. O *Bacillus cereus* devido à produção de exotoxinas é responsável por toxinfecções de origem alimentar (Ferreira e Sousa, 2000).

## **Bactérias Gram negativas**

Sob o ponto de vista estrutural, a parede das bactérias gram-negativas exhibe uma maior diferenciação e complexidade que as bactérias gram-positivas. Apresenta-se como uma estrutura não homogénea, mas estratificada. A camada mais interna é mais rígida e essencialmente constituída por peptidoglicano. Possui uma camada mais externa, ausente na parede das bactérias gram-positivas, designada por membrana externa, como apresentado na figura 6. Esta membrana é constituída por

lipopolisacarídeos, fosfolípidos e proteínas. As bactérias gram-negativas são, geralmente menos sensíveis a bactericidas que as bactérias gram-positivas devido à presença desta membrana externa que é responsável pela resistência intrínseca destes microrganismos para compostos anti-microbianos. (Maillard, 2002)

As bactérias gram-negativas coram de vermelho, com a safranina, porque a sua parede celular apresenta, além de uma pequena camada de peptidoglicano, uma membrana externa com uma elevada quantidade de lipídeos (Ferreira e Sousa, 1998). Quando as estruturas celulares são cobertas pelo corante violeta de cristal, toda coram de roxo. Com a adição de lugol ocorre a formação de um precipitado insolúvel. Como a camada interna de peptidoglicano das bactérias gram-negativas é mais fina que nas gram-positivas, o precipitado é removido com a solução descolorante, pelo que as células vão corar de vermelho, devido à adição do corante secundário, a safranina (Ferreira e Sousa, 1998 e <http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm>).



**Ilustração 6** - Estrutura da parede celular externa das bactérias gram-negativas (adaptado de Maillard, 2002).

### ***Klebsiella pneumoniae***

São bactérias gram-negativas em forma de bastonete, produtora de colónias mucóides, imóveis e produtoras de urease. É a espécie mais frequente nas infecções humanas (tracto urinário e tracto respiratório) (Ferreira e Sousa, 2000).

### ***Escherichia coli***

É um bacilo pertencente à família das *Enterobacteriaceae*, aeróbias ou anaeróbias facultativas. O seu habitat é no lúmen intestinal dos seres humanos ou de outros seres vivos de sangue quente. É a espécie de maior importância clínica, causando frequentemente infecções urinárias, gastroenterites, pneumonias, abscessos, etc. (Ferreira e Sousa, 2000).

### ***Salmonella typhimurium***

São bactérias gram-negativas em forma de bacilo, móveis. Na sua maioria é adquirida pela ingestão de alimentos e de água contaminada por contacto fecal-oral. O reservatório de *S. typhi* é o Homem, que é também o principal disseminador de febre tifóide, na fase aguda da doença ou no estado de portador assintomático (Ferreira e Sousa, 2000).

### ***Pseudomonas aeruginosa***

A *Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa, aeróbia, com a forma de bastonetes direitos ou ligeiramente curvos. Produzem pigmentos fluorescentes sob radiação ultravioleta. É uma estirpe praticamente ubíqua, podendo ser isolada de águas, solos, plantas, esgotos, amostras clínicas.

A *P. aeruginosa* é uma espécie oportunista, muito virulenta, devido às toxinas, proteases e hemolisinas que excreta para o meio exterior, capazes de danificar os tecidos e destruir as defesas dos hospedeiros (Ferreira e Sousa, 2000).

### **Leveduras**

Os fungos são células eucariotas, desprovidas de clorofila e que se reproduzem por esporos. Em geral os organismos unicelulares são pequenos, consomem

relativamente poucos nutrientes dividem-se rapidamente e possuem capacidade de adaptação aos mais diversos meios ambientes (Ferreira e Sousa, 1998).

Os fungos leveduriformes, ou leveduras são fungos unicelulares. As infecções provocadas por leveduras encontram-se entre as infecções fúngicas humanas mais frequentes. As leveduras pertencem a uma categoria de fungos cosmopolitas, muito difundidos na natureza e considerados como saprófitas inofensivos. Nas últimas décadas têm apresentado uma notória evolução na patologia fúngica, sendo cada vez mais frequentes as leveduroses por qualquer estirpe de *Candida*, sobretudo em indivíduos imunodeprimidos (Ferreira e Sousa, 2000).

### ***Candida albicans***

É uma espécie de fungo que, em condições normais pode ser encontrada em 80% da população humana sem causar efeitos prejudiciais à saúde, no entanto o seu excesso resulta em candidoses. Estas infecções são bastante complicadas em pacientes cuja saúde já se encontra enfraquecida. É a levedura com maior número de infecções humanas, desde mucocutâneas ou de localização profunda, tais como endocardites, peritonites e meningites.

Os factores que tornam a *C. albicans* mais virulenta são a formação de hifas, a estrutura da sua superfície celular (durante o contacto com as células do hospedeiro, adapta-se, tornando a adesão e a penetração muito mais eficaz), as alterações fenotípicas (altera entra a forma típica de levedura, branca e circular, e uma forma opaca, em forma de pequenos bastões) e a produção de enzimas extracelulares hidrolíticas (Ferreira e Sousa, 2000).

### ***Candida tropicallis***

A *C. tropicallis* é uma espécie pertencente ao género *Candida*, oportunista, como as outras estirpes deste género. Causa candidiase, e é por vezes usada como modelo em pesquisas genéticas e medicinais (Ferreira e Sousa, 2000).

#### 1.5.4. Determinação da actividade antimicrobiana

A determinação exacta da susceptibilidade que as bactérias apresentam face aos antibióticos é essencial para o êxito no combate à infecção e na escolha do agente antimicrobiano mas adequado.

Existem inúmeras técnicas, que são efectuadas tanto em meio sólido (difusão em disco ou diluição em agar) como em meio líquido (microdiluição, curvas de morte), mas a sua essência é a mesma, baseando-se na determinação da capacidade que um microrganismo possui em multiplicar-se *in vitro*, na presença de diferentes fármacos (Bonev *et al*, 2008).

##### Difusão em disco

O teste de difusão em disco é mais utilizado, para uma análise qualitativa, ou seja, funciona como uma pré-selecção aos extractos que inibem determinadas estirpes, sendo o primeiro teste que se efectua.

O princípio do teste de susceptibilidade por difusão em disco baseia-se na utilização de um gradiente de concentração de um antibiótico relativamente instável, gerado a partir de uma fonte de difusão pontual central, o disco (Schwalbe *et al*, 2007).

São inóculadas placas de agar da estirpe em estudo, em que se colocam discos de papel impregnados com a solução antimicrobiana em análise. O agente antimicrobiano impregnado nos discos entra em contacto com o agar, difundindo-se pela placa. A placa é colocada em incubação respeitando as normas estipuladas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Durante a incubação o agente antimicrobiano difunde no agar e inibe o crescimento das bactérias, produzindo uma zona de inibição em redor do disco. Após a incubação regista-se o diâmetro do halo de inibição e interpretam-se os resultados de acordo com as normas estabelecidas. (por exemplo a norma CLSI M100. (WHO 2010).

Após selecção dos extractos e das estirpes que apresentavam alguma inibição pretende-se determinar qual a mínima concentração de agente antimicrobiano necessário para impedir o crescimento bacteriano (MIC). Existem dois métodos para a sua determinação: o método de microdiluição e diluição em agar (Bonev *et al*, 2008; WHO 2010).

### Microdiluição

A concentração mínima inibitória (MIC) foi determinada por microdiluição. O teste é efectuado em microplacas contendo, normalmente 96 poços. A vantagem deste método é que utiliza pequenos volumes de reagentes e permite testar um grande número de bactérias de forma relativamente rápida. (Schwalbe *et al*, 2007)

Este método consiste em testar diferentes concentrações de extracto incorporadas no meio líquido. Em cada poço da microplaca está uma concentração diferente, sendo adicionado uma quantidade de inoculo igual em todos os poços. A MIC corresponde à menor concentração de agente antimicrobiano que inibe o crescimento bacteriano, após incubação de acordo com a norma estabelecida (M7 - A7 do “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI)). (Schwalbe *et al*, 2007)

A concentração mínima letal (MLC), ou para as bactérias, a concentração bactericida mínima (MBC) é definida como a menor concentração de agente antimicrobiano necessário para matar 99,9% do inoculo. Esta concentração é determinada através do ensaio de microdiluição. Depois da incubação e de se verificar os poços em que não existe crescimento bacteriano, retira-se uma pequena quantidade desses poços (sem crescimento) e faz-se o espalhamento em placas de agar que vão a incubar. No dia seguinte contam-se as colónias que cresceram, caso se verifique uma redução de 99,9% em relação ao inoculo inicial, a concentração mais baixa corresponde ao MBC (Schwalbe *et al*, 2007).

Comparando as MIC e MLC, pode-se extrapolar acerca do tipo de acção antibacteriana dos compostos, se a MLC for menor que 4 vezes a MIC poderá pressupor a existência de um efeito bactericida por parte dos extractos sobre as bactérias. No caso da MLC ser superior a 4 vezes a MIC o extracto deverá apresentar actividade

bacteriostática (Pankey e Sabath, 2003). No entanto efectuam-se curvas de morte para ter a certeza do tipo de acção dos compostos sobre os microrganismos.

### Curvas de morte

Para as estirpes que se conseguiu determinar a MLC, são traçadas curvas de morte, com diferentes concentrações de agente antimicrobiano, geralmente múltiplas da MLC. Controla-se o crescimento bacteriano a diferentes tempos de incubação, retirando uma pequena quantidade de suspensão (meio líquido com o agente antimicrobiano e a estirpe), espalhando-se em placas de agar. As placas são incubadas, efectuando-se a contagem das colónias que cresceram (Lorian, 2005).

Esta técnica permite verificar se o agente antimicrobiano é considerado bactericida - que mata 99,9% das bactérias, ou bacteriostático – impede o crescimento bacteriano mantendo-as em fase estacionária (Pankey e Sabath, 2003).

Um composto bactericida é aquele que mata os organismos, no entanto, alguns dados indicam que uma rápida acção lítica por parte dos agentes antibacterianos pode resultar em potenciais reacções clínicas adversas. Na meningite causada por *S. pneumoniae*, a morte rápida dos microrganismos resulta na produção de fragmentos celulares e na libertação de prostaglandina que pode dar origem a um edema cerebral aumentado, resultando num aumento da taxa de mortalidade por meningite pneumocócica (Pankey e Sabath, 2003).

O mecanismo de acção dos agentes bacteriostáticos envolvem o bloqueio de uma via metabólica específica, inibindo o crescimento bacteriano, sem matar os microrganismos. As culturas bacterianas incubadas na presença de altas concentrações de agentes bacteriostáticos param totalmente de se dividir quando expostas, mas quando as bactérias são semeadas ou transferidas para um meio de crescimento sem antimicrobianos, elas podem retomar o crescimento (Finberg et al, 2004).

## 1.6. Citotoxicidade vs Genotoxicidade

O termo citotoxicidade foi definido por Nardone em 1977, como o conjunto de alterações da homeostase celular, que promoveu uma série de modificações que interferem na capacidade adaptativa das células, assim como na sua sobrevivência, multiplicação e realização das funções metabólicas (Coura, 2004).

Os testes de citotoxicidade, *in vitro*, são bastante úteis para determinar a capacidade que diversos compostos, tais como fitoterápicos, radiações, químicos, biomateriais, entre outros, têm para causar dano nas funções celulares básicas (Coura, 2004).

Os testes para avaliar a toxicidade, usados mais frequentemente, baseiam-se nas alterações da permeabilidade celular (i.e. uso de corantes vitais, como o azul de Trypan, preto de Naftaleno, eosina, etc.), nas funções mitocondriais (i.e. ensaio do MTT, etc.) e nas alterações da morfologia e da proliferação celular (Coura, 2004).

A alteração mais fácil de ser observada é a avaliação da morfologia celular, nomeadamente em células com crescimento aderente em monocamada, tais como os fibroblastos, que se traduz por uma desorganização do tapete celular, pelo aspecto granuloso, arredondado e/ou vacuolizado das células. Estas alterações podem ser observadas em microscopia de inversão, contudo são subjectivas (Coura, 2004).

A integridade das membranas celulares é normalmente avaliada através do método do azul Trypan. Este corante permite avaliar a viabilidade celular uma vez que apenas penetra nas células mortas cuja membrana está lesada (Coura, 2004).

Em relação às funções mitocondriais destaca-se o teste do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difenil-2H-tetrazólio], que se baseia na capacidade que a célula viável possui em reduzir o sal de tetrazólio MTT de cor amarela num cristal de formazan (azul-púrpura), por acção de desidrogenases, que se encontram em toda a célula, mas tendencialmente na mitocôndria, ocorrendo em simultâneo a oxidação do NADH a NAD<sup>+</sup> (Figura 7). O cristal formado é solúvel em DMSO e quantificado espectrofotometricamente (Oliveira, 2003).



**Ilustração 7** - Estrutura química do MTT e do seu produto de reacção, formazan.

O teste do MTT permite-nos avaliar a bioactividade dos compostos nas células, nomeadamente se existe um aumento ou diminuição da viabilidade. Quando os resultados nos indicam que a sua bioactividade diminuiu, pode não significar que ocorreu morte celular, o seu metabolismo pode ter sido reduzido. Neste caso podemos dizer que o composto em estudo é citotóxico para as células. Quando existe uma aumento da bioactividade, é necessário ter atenção se o aumento é muito acentuado, o que pode indicar que o composto provoca uma proliferação descontrolada das células.

A genotoxicidade está associada à capacidade de alteração da replicação do ADN e da transmissão genética, nomeadamente, devido a lesões no ADN e mutações estruturais e numéricas (Coura, 2004).

Os ensaios de genotoxicidade, *in vitro*, são ferramentas sensíveis para avaliar o efeito genotóxico de agentes químicos e físicos. Os ensaios mais comuns são o teste de Ames, o teste do micronúcleo e o teste do cometa (Coura, 2004).

Cada vez se dispões de uma maior variedade de testes, uns mais rápidos que outros, válidos em experiências com animais, microrganismos, células humanas ou de animais em suspensão (e.g. linfócitos) ou aderentes (fibroblastos) (Tereso, 1995; Fenech, 2000).

As alterações cromossómicas podem ser divididas em alterações numéricas e estruturais. As alterações numéricas ocorrem com perda ou ganho de cromossomas – aneuploidias e reflectem anomalias presentes no centrómero dos cromossomas, no próprio fuso mitótico, ou noutros componentes-chave da anafase. Existem alguns

genotóxicos chamados aneugéneos, que actuam sem que haja quebras nos cromossomas. O poder clastogénico refere-se à faculdade que um composto possui para quebrar os cromossomas, dando origem a alterações estruturais (Oliveira, 2003).

O teste do micronúcleo com a citocinese bloqueada é muito usado em estudos de toxicologia citogenética para avaliar a ocorrência de fenómenos clastogénicos e de aneuploidia, causado quer por agentes químicos como por agentes físicos, sobretudo por radiações (Tereso, 1995; Oliveira, 2003).

O bloqueio da citocinese deve-se à presença de citocalasina B, um inibidor da polimerização da actina, essencial para a formação do anel de microfilamentos que contrai o citoplasma entre os núcleos-filhos durante a citocinese (Caria, 1997; Fenech, 2000).

Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos intracitoplasmáticos que podem ser observados em interfase e com uma forma e coloração muito semelhante ao núcleo principal, mas com menores dimensões. Podem ter várias origens, desde fragmentos de cromossoma, que por não terem cinetocoro, não foram incorporados nos núcleos filhos da divisão celular; cromossomas inteiros que, por terem o cinetocoro lesado ou por haver lesão do fuso mitótico se perderam durante a anafase ou rearranjos cromossómicos complexos que sofreram problemas mecânicos graves durante a anafase (Oliveira, 2003).

O processo que origina os MN inicia-se na anafase pela perda de fragmentos cromossómicos cêntricos ou acêntricos quando ocorre a ascensão dos cromossomas aos pólos do fuso mitótico. Após a telofase, cada núcleo origina dois núcleos-filhos iguais. Os elementos perdidos também são incluídos nas células filhas, mas uma proporção considerável é incluída num ou em vários núcleos secundários em regra mais pequenos do que o núcleo principal (Tereso, 1995).

A utilização de citocalasina B permite avaliar a genotoxicidade nas células que se dividiram na presença do agente deletério (nas células binucleadas), o que é uma das grandes vantagens deste ensaio (Oliveira, 2003).

Quando um cromossoma se perde pode formar um MN, alternativamente pode ser reincorporado num dos núcleos das células filhas de modo a que uma das células

filhas seja trissómica e outra monossómicas ou ambas as células filhas sejam normais tornando-se o fenómeno aneugénico indetectável (Tereso, 1995).

Ao contrário dos genotóxicos directamente mutagénicos, certos compostos requerem activação metabólica para se tornarem mutagenicamente activos. Estes compostos são convertidos pela actividade de sistemas celulares enzimáticos eucariotas localizados sobretudo na superfície de membranas citoplasmáticas do retículo endoplasmático e ribossomas, sendo designadas por fracção S9 (Tereso, 1995).

A fracção S9-mix, que contém enzimas solúveis e cofactores, adicionam um átomo de oxigénio a uma molécula do substrato, convertendo os compostos mais apolares e lipossolúveis em compostos mais polares e hidrossolúveis que são mais facilmente excretados. No entanto essa actividade benigna pode converter uma molécula quimicamente inerte e geneticamente inactiva num metabolito final capaz de reagir com o ADN (mutagénico) (Tereso, 1995).

## 1.7. Objectivo do trabalho

O trabalho tem como objectivo a determinação da actividade biológica da *Eragrostis viscosa*, uma planta angolana, com o objectivo de determinar um possível uso desta como recurso à medicina tradicional, sobretudo pela população local.

- Avaliação da actividade biológica dos extractos brutos da planta, nomeadamente actividade antifúngica, antibacteriana e citotóxica.
- Fraccionamento dos extractos que apresentaram actividade biológica com vista ao isolamento de compostos puros.
- Reavaliação da actividade biológica dos extractos fraccionados

---

## Capítulo II - Material e Métodos

## 2.1. Actividade antimicrobiana

### 2.1.1 Reagentes

Os meios de cultura Nutrient Broth (NB), Mueller-Hinton Agar (MHA) e Mueller-Hinton Broth (MHB) foram adquiridos na Liofilchem; o meio Sabourand Dextrose Agar (SDA) foi comprado na Oxoid, o azul de metileno e a Caseína na Himedia. A glucose, a ampicilina a tetraciclina, a anfotericina B, a carbenicilina, o dimetilsulfóxido (DMSO), na Sigma (Germany); o cloreto de sódio foi adquirido na Panreac, o extracto de levedura na Fulka (Germany) e o agar na Pronadisa (Madrid).

### 2.1.2. Equipamento

Ao longo do trabalho experimental, para além do material corrente de laboratório, foram utilizados os seguintes equipamentos:

**Autoclave Uniclave 88:** proporciona o calor húmido a temperaturas superiores a 100°C, geralmente, as autoclaves de laboratório operam normalmente sob uma pressão de 1,02 Bar a uma temperatura de 121°C. A autoclave esteriliza a maioria dos materiais em 15-30 minutos, sendo a variação do tempo de esterilização dependente da relação superfície/volume dos materiais a serem esterilizados.

**Balança:** efectuaram-se todas as pesagens de reagentes necessários numa balança Sartorius.

**Densitómetro:** foi utilizado um Densimat da Biomérieux para acertar a densidade óptica das suspensões de microrganismos a 0,5 MacFarland.

**Estufa P Selecta:** a incubação de placas para crescimento bacteriano e fúngico foi efectuada numa estufa a 37° C.

**Espectofotómetro:** as medições espectrofotométricas (em UV e Visível) foram realizadas num espectofotómetro Ultrospec, modelo U/V 3000 da Pharmacia Biotech e também num espectofotómetro Shimadzu, modelo UV-1700 da Pharmaspec.

**Potenciómetro:** o pH das soluções foi medido num potenciómetro pH-Meter da Metrohm.

**Vortex:** as soluções foram agitadas num vortex Mixer da Labnet Internacional, Inc.

**Leitor de microplacas:** as absorvências das microplacas foram lidas no leitor de microplacas da Bio-rad.

### 2.1.3. Estirpes

O *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (*MRSA 10/08*) é uma bactéria gram-positiva meticilina-resistente isolada do excusado nasal no Centro Hospitalar Cova da Beira em 14/10/2008.

O *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (*MRSA 12/08*) é uma bactéria gram-positiva meticilina-resistente isolada do excusado nasal no Centro Hospitalar Cova da Beira em 11/12/2008.

As restantes estirpes são estirpes de referência obtidas na American Type Culture Collection (ATCC). Os microrganismos testados são listados na tabela 2.

**Tabela 1** - Estirpes usadas no estudo.

	tipo	Estirpe de referência
Estirpes de referência	Bactérias gram-positivas	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
		<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771
	Bactérias gram-negativas	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
		<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
		<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311
		<i>Klebsiella Pneumoniae</i> ATCC 13833
	leveduras	<i>Candida albicans</i> ATCC24433
		<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
		<i>Candida tropicallis</i> ATCC 750
Estirpes clínicas	Bactérias gram-positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA 10/08)
		<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (MRSA 12/08)

#### 2.1.4. Controlos positivos

A Anfotericina B foi usada como controlo positivo para as leveduras no ensaio de difusão em disco. Para as bactérias foram utilizados três agentes antimicrobianos de acordo com a estirpe, para as bactérias gram-positivas utilizaram-se a Ampicilina e a Tetraciclina; para a *Pseudomonas aeruginosa* foram usadas a Carbenicilina e a Tetraciclina; para as restantes estirpes gram-negativas usamos os três agentes como controlos positivos (Ampicilina, Tetraciclina e Carbenicilina).

**Tabela 2** - Intervalo dos MIC padrão ( $\mu\text{g/mL}$ ) segundo a norma NCCLS M100-S15.

Agente Antimicrobiano	<i>E. coli</i> ATCC® 25922	<i>S. aureus</i> ATCC® 29213	<i>E. faecalis</i> ATCC® 29212	<i>P. aeruginosa</i> ATCC® 27853
Ampicilina	2-8	0,5-2	0,5-2	---
Carbencilina	4-16	2-8	16-64	16-64
Tetraciclina	0,5-2	0,12-1	8-32	8-32

## 2.1.5. Actividade antimicrobiana

### 2.1.5.1. Assepsia

Todo o material de vidro necessário para a realização das experiências da actividade biológica foi esterilizado numa autoclave, e todas as manipulações dos extractos (inoculação ou tiragem de amostras) foram realizadas à chama, de modo a manter a esterilidade do meio.

### 2.1.5.2. Difusão em disco

#### **Actividade antifúngica**

O protocolo foi realizado segundo a norma CLSI M44A.

#### Tratamento dos extractos

Todos os extractos em estudo, no teste de difusão em disco, foram usados com uma concentração de 1g/mL.

Os extractos, foram diluídos, no momento da utilização, em DMSO filtrado previamente com uma membrana 0,22 µm.

### Preparação do Inóculo

As leveduras foram repicadas em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) a pH 5,6 ±0,2 e cresceram 24 horas a 37 °C (culturas puras).

Foram suspensas em NaCl estéril e acertada a densidade óptica da suspensão a 0,5 Unidades de MacFarland.

### Inoculação das Placas de Teste

Mergulhou-se uma zagaratoa estéril na suspensão previamente ajustada relativamente à densidade óptica. A zagaratoa foi girada várias vezes e apertada firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido. Isto ajudou a retirar o excesso de inóculo da zagaratoa.

A superfície seca da placa de agar Mueller-Hinton com 2% de glucose e 0,5µg/mL de azul de metileno foi inoculada passando a zagaratoa em toda a superfície estéril do agar. Repetiu-se o procedimento passando outras duas vezes a zagaratoa e girando a placa aproximadamente 60° de cada vez, de modo a se assegurar uma distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se a zagaratoa na margem da placa de agar.

Antes da colocação dos discos esperou-se aproximadamente 5 minutos, para que não ocorresse absorção de humidade.

Os discos foram previamente impregnados com os respectivos extractos a analisar (20µg/disco), o antifúngico usado comercialmente, a Anfotericina B (25µg/disco) e o controlo negativo com DMSO (20µL/disco).

Os discos foram colocados na superfície da placa de agar semeada. Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar um contacto completo com

a superfície de agar. Os discos foram distribuídos de maneira a que a distância de centro para centro não exceda 24 mm.

As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 37° C, até 15 minutos após a aplicação dos discos.

### Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados

A leitura das placas foi feita após 20-24 horas de incubação.

Os halos foram medidos em milímetros usando uma régua, esta foi encostada na parte de trás da placa de petri invertida.

O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu.

### **Actividade antibacteriana**

O protocolo utilizado foi seguido segundo a norma NCCLS M2-A8.

### Tratamento dos extractos

Todos os extractos em estudo no teste de difusão em disco foram usados com uma concentração de 1g/mL.

Os extractos, foram diluídos, no momento da utilização, em DMSO que foi previamente filtrado com uma membrana com tamanho de poro de 0,22µM, de modo a esterilizar o solvente.

### Preparação do Inóculo

As bactérias foram repicadas em meio Nutrient Agar (NA) a pH 7,2 a 7,4, e cresceram 24 horas a 37 °C (culturas puras e viáveis).

As bactérias foram suspensas em NaCl estéril e acertada a densidade óptica a 0,5 Unidades de MacFarland.

### Inoculação das Placas de Teste

Mergulhou-se uma zagaratoa estéril na suspensão previamente ajustada relativamente à densidade óptica. A zagaratoa foi girada várias vezes e apertada firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, de modo a retirar o excesso de inóculo da zagaratoa.

A superfície seca da placa de agar Mueller-Hinton foi inoculada passando a zagaratoa em toda a superfície estéril do agar. Repetiu-se o procedimento passando outras duas vezes a zagaratoa e girando a placa aproximadamente um ângulo de 60° de cada vez, de modo a se assegurar uma distribuição uniforme do inóculo. Como passo final, passou-se a zagaratoa na margem da placa de agar.

Antes da colocação dos discos esperou-se aproximadamente 5 minutos, para que não ocorresse absorção de humidade.

Os discos foram previamente impregnados com os respectivos extractos a analisar (20µg/disco), os antibióticos usados comercialmente, Ampicilina (10µg/disco) e Carbenicilina (100µg/disco) e o controlo negativo com DMSO (20µL/disco).

Colocaram-se os discos na superfície de uma placa de agar semeada. Cada disco foi pressionado de encontro à placa, de maneira a assegurar um contacto completo com a superfície de agar. A distribuição dos discos foi efectuada, de maneira a que a distância de centro para centro não exceda 24mm.

As placas foram invertidas e colocadas numa estufa, a 37° C, até 15 minutos após a aplicação dos discos.

### Leitura das Placas e Interpretação dos Resultados

A leitura das placas foi feita após 16-18 horas de incubação.

Os halos foram medidos em milímetros usando uma régua, esta foi encostada na parte de trás da placa de petri invertida.

O halo de inibição foi considerado a área sem crescimento detectável a olho nu.

### **2.1.5.3. Testes de microdiluição em meio líquido**

No teste de diluição em meio líquido os extractos tinham uma concentração inicial de 1,25 mg/mL em 2% de DMSO.

#### Preparação do inóculo

A preparação do inóculo foi feita do mesmo modo que para o caso dos testes em disco, ajustando a respectiva densidade óptica a 0,5 na escala de MacFarland.

Regista-se também a absorvância no espectrofotómetro, de modo a que, nos ensaios seguintes, a absorvância seja sempre igual para cada estirpe, para que os resultados sejam mais concordantes entre si.

O inóculo foi usado até 15 minutos após a sua preparação, e diluiu-se em meio líquido para que no final cada poço tivesse  $5 \times 10^5$  CFU/mL.

#### Preparação do teste

No teste de Microdiluição em placas de 96 poços, foram adicionados 50 µL de meio mais 50 µL extracto (com uma concentração de 2,5 mg/mL, ou seja, o extracto tem o dobro da concentração inicial, para se poder começar a testar com 1,25 mg/mL). Fazem-se diluições sucessivas. Por fim adicionaram-se 50 µL de inóculo bem homogeneizado. Realizaram-se duplicados por placa.

As leituras efectuem-se contra um branco apenas com as diluições do extracto em meio, sem a adição de estirpe. Todas as placas têm triplicados do controlo negativo

do meio e do controlo positivo dos inóculos. Todos os poços têm um volume final de 100 µL.

Retiram-se 10 µL de um dos controlos do controlo positivo de cada estirpe e efectua-se um espalhamento em placas de PCA, que cresceram 24 horas. O número de colónias foi contado, para fazer um controlo das CFU/mL do controlo inicial da estirpe.

As placas foram incubadas a 37°C durante 24 horas. No final deste tempo leram-se os resultados.

#### Leitura das Placas

A leitura foi feita opticamente, através da formação de turvação nos poços em que houve crescimento. Dos poços em que não se verificou crescimento, retiraram-se 20 µL e espalhou-se em placas de PCA. Estas foram incubadas durante 24 horas e após este tempo contaram-se as colónias, de modo a determinar a concentração mínima letal (MLC).

A MLC corresponde a uma redução das CFU/mL de mil vezes em relação ao inóculo inicial da estirpe.

Realizam-se triplicados concordantes para cada estirpe em dias diferentes

#### **2.1.5.4. Curvas de crescimento**

##### Preparação do inóculo

A preparação do inóculo foi feita do mesmo modo que para o caso dos testes em micodiluição, ajustando a respectiva densidade óptica a 0,5 na escala de MacFarland ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL), e acertando o inóculo com a absorvância que foi usada nos ensaios de susceptibilidade em meio líquido. Deste modo, assegura-se que dentro de cada

estirpe a sua concentração ao longo dos diferentes ensaios efectuados era sempre a mesma.

O inóculo foi usado até 15 minutos após a sua preparação, e efectuou-se uma diluição de 1:100 da suspensão em meio MHB, obtendo-se  $1,5 \times 10^6$  CFU/mL. Homogeneiza-se bem a suspensão antes de adicionar aos tubos.

### Preparação do teste

Após a determinação da MIC, prepararam-se várias concentrações múltiplas da MIC, (a MIC, 2x MIC, 3x MIC e 4x MIC) cem vezes mais concentrados que a concentração de trabalho.

Para tubos de Falcon de 50 mL adiciona-se 50  $\mu$ L das respectivas concentrações de extracto a analisar, 50  $\mu$ L de DMSO e 2,4 mL de meio MHB.

Efectua-se um branco, apenas com o meio MHB e a estirpe e outro com meio e 2% de DMSO.

Prepararam-se também concentrações com o antibiótico usado comercialmente, nomeadamente a ampicilina e a tetraciclina. Adicionado-se 50  $\mu$ L das respectivas concentrações de antibiótico, para as estirpes em estudo e 2,45 mL de meio MHB.

No ensaio com o *S. aureus*, a concentração de Ampicilina final testada, foi de 2  $\mu$ g/mL que corresponde à MIC segundo a norma M100, enquanto que com a Tetraciclina foram testadas 1  $\mu$ g/mL e 2  $\mu$ g/mL ( MIC e 2x MIC, respectivamente).

Com o *B.cereus*, a MIC com a ampicilina foi de 32  $\mu$ g/mL, usando-se esta concentração final. A MIC para a Tetraciclina é de 0,03  $\mu$ g/mL, logo as concentrações testadas foram 0,03  $\mu$ g/mL e 0,06  $\mu$ g/mL (MIC e 2x MIC).

A todos os tubos foram adicionados 2,5 mL da suspensão de estirpe diluída em MHB, de modo a perfazer 50 mL por tubo, com uma concentração de DMSO de 2% nos extractos e no controlo do DMSO. Homogeneizam-se muito bem todos os tubos.

Remove-se 180 $\mu$ L, de cada tubo para o eppendorf 0 e colocam-se os tubos a incubar a 37°C.

Efectuam-se uma série de diluições sucessivas  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  a partir da alíquota anterior segundo o esquema:

- Numerar eppendorfs de 0 a 6;
- Adicionar 900  $\mu$ L de solução salina (NaCl 0,85%) de 1 a 6;
- Remover uma alíquota de 100  $\mu$ L e adicionar ao tubo 1;
- Pipetar 100  $\mu$ L e adicionar ao tubo 2;
- Repetir os passos c e d;
- No final remover 100  $\mu$ L do tubo 6;
- Colocar 20  $\mu$ L de cada uma das soluções  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  em triplicado em placas de agar;
- Incubam-se as placas a 37°C durante 24 horas e repetem-se os passos a) a g) às 2, 4, 6, 8 e 24 horas.

No ensaio das 0 horas, retira-se do eppendorf 0 de cada tubo, que corresponde à suspensão directa do tubo, tiram-se 20  $\mu$ L e efectua-se o espalhamento numa placa de PCA, com a ajuda de uma vareta em L, coloca-se a incubar a 37°C durante 24 horas e efectua-se a contagem das colónias.

### Leitura das Placas

Após 24 horas de incubação tiram-se as placas da estufa e contam-se as colónias na diluição em que o seu número varia entre 5 e 50. por fim, traça-se um gráfico com o log (CFU/mL) em função do tempo em horas.

## 2.2. Fraccionamento dos extractos

### 2.2.1. Reagentes

O hexano comercial foi obtido em JMGS Lda (Odivelas); o acetato de Etilo A. R. na Fisher Scientific (UK); o metanol P.A.R. na Pancreac (Barcelona); o clorofórmio A.R. da Lab-Scan (Dublin); o clorofórmio deuterado ( $H_2O < 0,01\%$ ) na SDS (France); o etanol P.A.R. foi obtido na Riedel-de-Haën (Germany), o ácido fosfomolibdico A.C.S.R., e a sílica gel foram obtidos na Sigma (Germany); a piridina, o anidrido acético e as placas de sílica gel foram obtidas na Merck (Germany); o hidróxido de sódio e o ácido clorídrico P.A.R. na Pronalab (Lisboa) e o hidreto de lítio e alumínio foi obtido na Merck, Schuchardt.

O hexano comercial, foi destilado antes de ser usado.

### 2.2.2. Equipamento

#### **Espectros de RMN**

Os espectros de RMN foram realizados em espectrómetros Bruker AC 250 P (250MHz  $^1H$ ; 62,9MHz  $^{13}C$ ) e Bruker ARX400, (400MHz  $^1H$  e 100.6 MHz  $^{13}C$ ). Os desvios químicos ( $\delta$ ) são expressos em ppm, utilizando como referência o  $CHCl_3$  residual (7,26 ppm para o  $^1H$  e 77,0 ppm para o  $^{13}C$ ); as constantes de acoplamento (J) são expressas em Hz. Como solvente utilizou-se o  $CDCl_3$ .

#### **Espectroscopia de massa de alta resolução**

Os espectros de massa de alta resolução (HREIMS) foram realizados num VG Autospec M a 70eV.

### 2.2.3. Técnicas cromatográficas

#### **Cromatografia em camada fina (c.c.f.)**

Foi efectuada em placas de sílica gel Merck G-60 F254 pré-preparadas em suporte de alumínio (ref.015554.). As placas foram primeiro visualizadas por irradiação com luz ultravioleta de  $\lambda=366$  nm após o que foram reveladas. A revelação consistiu na pulverização das placas com uma solução de ácido fosfomolibdico em etanol a 5%, seguida de aquecimento na estufa a 120°C durante alguns minutos.

#### **Cromatografia em coluna húmida**

Foi realizada em sílica gel Merck G-60, 70-230 mesh (ref. 1.07734.). A razão entre a substância a cromatografar e o adsorvente foi normalmente de 1:100. As cromatografias foram realizadas em colunas de vidro enchidas com a papa adsorvente no eluente inicial (normalmente o hexano). As colunas foram eluídas com misturas de solventes de polaridade crescente, controlando-se regularmente, por c.c.f., a composição das fracções eluídas.

### 2.2.4. Reacções químicas utilizadas

#### **Redução com $\text{LiAlH}_4$**

Cerca de 150mg do composto maioritário foi dissolvido em 10 mL de éter seco e frio. Foi adicionado lentamente a uma suspensão de  $\text{LiAlH}_4$  (51 mg) em éter seco a 0°C. A mistura foi agitada à temperatura ambiente e refluxada durante 3 horas. A mistura reaccional foi hidrolisada por adição de uma solução de 15% de NaOH (1,5mL) e água fria (1,5mL). A fase orgânica foi separada, lavada com água até à neutralidade, seca em sulfato de sódio anidro durante duas horas e concentrada a vácuo.

## **Acetilação**

Aproximadamente 36 mg do álcool sintetizado na cromatografia 16, foi dissolvido em 1 mL de piridina e a esta solução adicionaram-se 1 mL de anidrido acético. A reacção decorreu à temperatura ambiente, durante duas horas. Uma vez completa a reacção, adicionaram-se à mistura reaccional água e gelo moído para parar a reacção e deixou-se repousar cerca de uma hora. Extraiu-se com éter (3x). O extracto etéreo foi lavado sucessivamente com soluções de HCl 2M (3x), NaOH a 10% (3x) e com água destilada, até pH neutro. Finalmente, foi seco em sulfato de sódio anidro durante duas horas, filtrado e concentrado em vácuo.

## **2.3. Actividade citotóxica**

### **2.3.1. Reagentes**

O meio RPMI-1640 foi obtido na Sigma (UK). O Soro fetal bovino (FBS) foi adquirido na Biochrom A.G., a tripsina, a mistura de antibióticos e antimetabólico, o MTT, o DMSO, o piruvato de sódio, a L-glutamina, o tampão hepes,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  e o  $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  foram obtidos na Sigma (Germany).

### **2.3.2. Assepsia**

Todos os procedimentos relacionados com a preparação de meios de cultura e outras soluções utilizadas na manutenção das culturas celulares foram efectuadas em assepsia, nomeadamente em câmaras de fluxo laminar, de forma a prevenir a contaminação bacteriana e/ou micológica. As câmaras utilizadas possuem um fluxo de ar laminado vertical, que para além de assepsia confere uma maior protecção para o utilizador. A câmara foi sistematicamente desinfectada antes e depois de cada utilização com solução de etanol a 70% e com fungicida, para além da luz ultravioleta entre de cada utilização.

O material de laboratório utilizado nas culturas celulares foi adquirido comercialmente estéril, ou então esterilizado no próprio laboratório por calor seco (estufa) ou calor húmido (autoclave). Quanto aos reagentes utilizados, uns foram autoclavados dentro dos seus próprios frascos (água desionizada estéril,) outros foram adquiridos estéreis, preparando-se na sua maioria aliquotas mais pequenas em material estéril, de modo a usar só a quantidade necessária de cada vez (tripsina, controlos positivos). Por fim, usou-se uma mistura de antibiótico e antifúngico de largo espectro (penicilina e antimicina) que conferiram uma importante protecção contra possíveis contaminações.

### 2.3.3. Material biológico

Foram utilizadas neste trabalho culturas primárias de fibroblastos da pele humana de indivíduos voluntários saudáveis. Os fibroblastos foram recolhidos através de biopsias efectuadas no Centro Hospitalar Cova da Beira. Efectuaram-se culturas primárias e conservaram-se em criopreservação em azoto líquido, após a 3ª passagem.

#### **Meio de cultura para os fibroblastos**

O meio de cultura usado para os fibroblastos foi o RPMI suplementado com soro fetal bovino, tampão hepes, glutamina, piruvato e antibiótico. O meio foi filtrado e armazenado a 4°C num frasco devidamente identificado. Este procedimento foi efectuado na câmara de fluxo laminar.

#### **Manuseamento dos fibroblastos e preparação para a técnica do MTT**

##### **Utilização da cultura celular**

Para iniciar a cultura celular, procedeu-se ao rápido descongelamento de um criotubo que estava armazenado em azoto líquido contendo uma suspensão de fibroblastos em meio RPMI e DMSO, foi descongelado rapidamente, transferindo-se o seu conteúdo para frascos de cultura. Os frascos foram incubados a 37°C numa estufa com 5% CO<sub>2</sub>.

Controlou-se o seu crescimento através da observação num microscópio de inversão, trocando-se o meio de 48 em 48 horas, de modo a manter o meio com os nutrientes necessários ao crescimento celular.

Quando se verificou que as células estavam em confluência, foram tripsinizadas.

## **Tripsinização de culturas primárias de fibroblastos**

Os fibroblastos crescem em monocamadas aderentes a um suporte sólido (superfície do frasco de cultura). Deve-se garantir que todas as células tenham um espaço ideal para aderirem ao suporte sólido, assim como que todas as células têm acesso ao meio envolvente para que tenham o máximo acesso aos nutrientes e co-factores existentes no meio envolvente, evitando a inibição do crescimento celular e a formação de aglomerados que levam ao estabelecimento de uma situação de anóxia para as células mais internas, e para tal, as células foram tripsinizadas e colocadas num novo frasco em menor número.

Este procedimento foi efectuado sempre que se verificou em microscopia de inversão que as células se encontravam confluentes, retirando-se o meio de cultura com os frascos invertidos, de modo a evitar o contacto da pipeta com as células. Adicionou-se tripsina, controlando-se a desagregação das células ao suporte sólido no microscópio de inversão. Não se deve deixar actuar a tripsina durante muito tempo, de modo a evitar o dano irreversível das células. A acção da tripsina foi bloqueada adicionando-se meio de cultura ao frasco e homogeneizou-se. A suspensão celular foi transferida para um tubo e centrifugada, desprezando-se o sobrenadante. O pellet foi transferido para novos frascos de cultura com meio e incubados a 37°C na estufa com 5% CO<sub>2</sub>.

Sempre que necessário as células em excesso foram congeladas em azoto líquido em criotubos com meio RPMI e DMSO. Efectuou-se o congelamento lento e o descongelamento rápido para evitar que ocorra lise celular pelos cristais de gelo.

### **Protocolo do ensaio do MTT em fibroblastos**

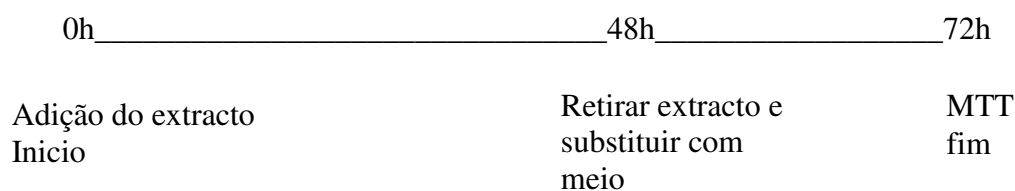
Efectuaram-se dois ensaios do MTT, variando alguns aspectos tais como o número de células, os tamanhos dos poços em quem se efectuaram as experiências e os tempos de incubação.

Na primeira experiência após tripsinização, contaram-se as células pelo método do azul tripan numa câmara de Neubauer, colocando  $1 \times 10^4$  células por poço, em placas

com 48 poços. As células foram incubadas a 37°C na estufa com 5% CO<sub>2</sub>, até atingirem a fase de crescimento exponencial (Takadhima, 1998).

Quando as células estão no crescimento exponencial, dá-se início ao seguinte procedimento que também está esquematizado na figura 8:

- adicionou-se o composto na concentração a estudar por poço, efectuando-se triplicados por placa. Em cada placa efectuou-se um controlo negativo, apenas com células e meio e um controlo com DMSO (solvente usado nos químicos, no volume máximo correspondente aos químicos adicionados);
- incubaram-se durante 48 horas em estufa com 5% CO<sub>2</sub>;
- após 48 horas retirou-se o meio com o extracto em estudo e adicionou-se 500µL de meio novo por poço;
- incubaram-se as placas 24 horas em estufa com 5% CO<sub>2</sub>;
- após 24 horas retiraram-se 200 µL de meio de cada poço (ficaram 300 µL de meio/poço);
- adicionaram-se 50 µL de MTT dissolvido em meio (5 µg/mL) a cada poço;
- incubaram-se as placas na estufa protegidas da luz com papel de alumínio, durante 3 horas;
- após a incubação, retirou-se o MTT, e adicionaram-se 200 µL de DMSO a cada poço;
- juntou-se 25 µL de glicina por poço;
- retirou-se 200 µL de suspensão de cada poço para microplacas de 96 poços e efectuaram-se as leituras das absorvâncias a 570nm num leitor de microplacas;
- quando as absorvâncias registadas foram superiores a 2, efectuaram-se diluições com DMSO.



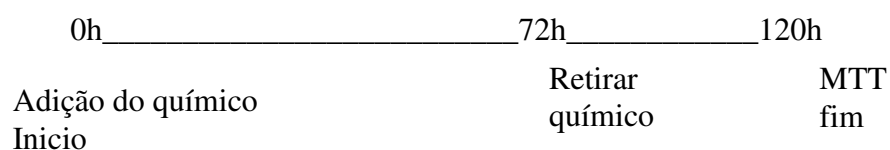
**Ilustração 8** - Esquema representativo do procedimento do 1º ensaio do MTT.

Na segunda experiência aumentou-se o número de células após tripsinização, de modo a aumentar a sensibilidade. Contaram-se as células pelo método do azul tripan numa câmara de Neubauer, colocando  $5,3 \times 10^4$  células por poço, em placas com 24 poços. As células foram incubadas a 37°C na estufa com 5% CO<sub>2</sub>, até atingirem a fase de crescimento exponencial (Caria, 1997; Oliveira, 2003).

Quando as células estão no crescimento exponencial, dá-se início ao seguinte procedimento:

- adicionou-se o extracto na concentração a estudar por poço, efectuando-se triplicados por placa. Em cada placa efectuou-se um controlo negativo, apenas com células e meio e um controlo com DMSO (solvente usado nos químicos, no volume máximo correspondente aos químicos adicionados);
- incubaram-se 72 horas em estufa com 5% CO<sub>2</sub>;
- após 72 horas retirou-se o meio com o extracto em estudo e adicionou-se 500µL de meio novo por poço;
- incubaram-se as placas 48 horas em estufa com 5% CO<sub>2</sub>;
- de seguida efectuou-se o método do MTT anteriormente descrito.

Para além do número de células, aumentou-se também o tempo de incubação, uma vez que o “turnover” dos fibroblastos é de cerca de 36 horas para ter a certeza que as células se dividiram na presença dos compostos, aumentou-se ainda o tempo de recuperação das células, tal como indica a figura 9.



**Ilustração 9** - Esquema representativo do procedimento do 2º ensaio do MTT.

## 2.4. Actividade genotóxica

### 2.4.1. Reagentes

O meio Ham's F10 e o meio RPMI-1640 foram obtidos na Sigma (UK). O Soro fetal bovino, o soro "new born", a tripsina, a ciclofosfamida (CP), a citocalasina B, a Glucose-6-Fosfato, a mitomicina C (MMC), o cloreto de potássio (KCl) e a mistura de antibióticos (estreptomicina e ampicilina) foram obtidos na Sigma (Germany). As ampolas de bicarbonato de sódio na Braun (Queluz de Baixo). O Entellan, o Giemsa, o  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , o  $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , o cloreto de magnésio ( $\text{MgCl}_2$ ), o vermelho de fenol e o Metanol foram obtidos na Merck (Germany). O S9 em [www.moltox.com](http://www.moltox.com); o NADP+ na Sigma (Seinheim).

### 2.4.2. Assepsia

As condições de assepsia foram as iguais às que estão indicadas no ponto 2.3.2.

### 2.4.3. Material biológico

Foram utilizadas neste trabalho uma linha comercial selvagem de ("wild type") de hamster chinês (*Cricetulus griseus*) correspondente a fibroblastos de pulmão, designada por linha celular V79.

Estas células possuem algumas características importantes, tais como o facto de possuírem um cariótipo com um pequeno número de cromossomas (o mais frequente são 22, podendo variar) e um ciclo celular relativamente curto com cerca de 12-16 horas. Não necessitam de estimulação mitogénica o que também é vantajoso para estudos citogenéticos.

#### 2.4.4. Meio de cultura para as células V79

O meio de cultura usado para células V79 foi o Ham's F-10 (Sigma) suplementado com 10% de soro new born e 1% de mistura de antibióticos (estreptomicina e penicilina), foi dividido em frascos de vidro previamente autoclavados. Este procedimento foi efectuado na câmara de fluxo laminar e os frascos foram identificados e armazenados a -18°C.

#### 2.4.5. Manuseamento de células V79 para preparação do teste do micronúcleo

##### **Soluções usadas na manutenção celular**

##### Solução de verseno

Utilizou-se para manutenção das culturas celulares, sendo utilizada para lavagem das células e diluição da tripsina.

A solução foi preparada em H<sub>2</sub>O e a sua constituição por litro é a seguinte: NaCl (8g), KCl (0,4g), EDTA (verseno, 0,2g) e vermelho de fenol (0,02g). a solução foi autoclavada, distribuída em tubos de 9 mL e armazenada a -18°C.

Antes da sua utilização nas culturas celulares, o verseno foi alcalinizado, com solução de hidrogenocarbonato de sódio 8,4% (v/v), até viragem do indicador vermelho de fenol, a qual ocorre a valores de pH da ordem dos 8,2.

##### **Início da manutenção da cultura**

Para iniciar a cultura celular, procedeu-se ao rápido descongelamento de um criotubo que estava armazenado a -80°C contendo uma suspensão de células V79 em meio Ham's F-10 suplementado com 20% soro fetal bovino e 10% DMSO do seguinte modo:

- Colocou-se o criotubo num gobelé com água em banho-maria a 37°C;

- Adicionou-se o conteúdo do criotubo a um tubo de cultura contendo 8mL de meio de cultura Ham's F-10;
- Centrifugou-se a 1500rpm durante 5 minutos;
- Desprezou-se o sobrenadante, mantendo o suficiente para resuspender o pellet;
- Distribuiu-se o pellet por frascos de cultura contendo meio Ham's F-10;
- Borbulhou-se com CO<sub>2</sub>, os frascos para manter o pH constante;
- Incubaram-se os frascos na estufa a 37°C;
- Para evitar o efeito nocivo do DMSO (solvente orgânico utilizado no congelamento das células) mudou-se o meio dos frascos passadas 24 horas da incubação;
- Manteve-se a cultura na estufa durante o tempo necessário para as células atingirem a confluência numa monocamada aderentes à superfície do frasco de cultura, sendo então tripsinizadas.

### **Tripsinização das células V79**

Assim como os fibroblastos ou outras linhas celulares epiteliais em cultura, as células V79 crescem numa monocamada aderentes a um suporte sólido (superfície do frasco de cultura). Deve-se garantir que todas as células tenham um espaço ideal para aderirem ao suporte sólido, assim como que todas as células têm acesso ao meio envolvente para que tenham o máximo acesso aos nutrientes e co-factores existentes no meio envolvente, evitando a inibição do crescimento celular e a formação de aglomerados que levam ao estabelecimento de uma situação de anóxia para as células mais internas, tripsinizando-se e colocando-se as células em frascos novos, mas em menor número.

Este procedimento foi efectuado sempre que se verificou em microscopia de inversão que as células se encontravam confluentes. A tripsinização foi realizada do seguinte modo:

- Retirou-se o meio de cultura com o frasco invertido, para evitar o contacto da pipeta com as células;
- Procedeu-se à lavagem das células com verseno (2mL para frascos pequenos, 4mL para frascos médios e 8 mL para frascos grandes) previamente alcalinizado com bicarbonato de sódio (1 ou 2 gotas);
- Agitou-se o frasco e retirou-se a solução de verseno, novamente com o frasco invertido para evitar o contacto da pipeta com as células;
- Adicionou-se uma solução de tripsina diluída 1:10 em verseno com umas gotas de bicarbonato de sódio (2mL para frascos pequenos, 2,5 mL para frascos médios e 4 mL para frascos grandes);
- Deixou-se actuar a tripsina até se observar a desagregação das células (no microscópio de inversão ou a olho nu). Evitar o contacto excessivo da tripsina com as células, de modo a que não danifique irremediavelmente as células;
- Adicionou-se o triplo do volume de meio de cultura e homogeneizou-se para parar a reacção;
- Transferiu-se a suspensão para tubos estéreis e centrifugou-se durante 5 minutos a 1500 rpm;
- Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se ao pellet meio de cultura fresco;
- Resuspendeu-se o pellet e distribuiu-se a suspensão por frascos de cultura com meio fresco;
- Borbulhou-se com CO<sub>2</sub> e incubou-se na estufa a 37°C.

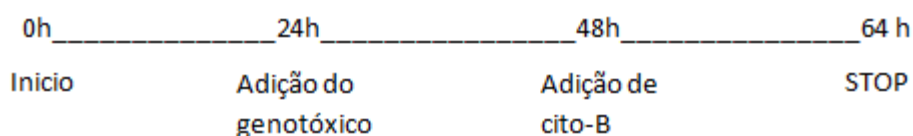
Sempre que necessário as células em excesso, foram congeladas a -80°C em criotubos com meio Ham's F-10 suplementado com 10%DMSO e 20% de soro fetal bovino, perfazendo um volume total de 1mL. O criotubo foi colocado cerca de uma hora a -20°C e só depois a -80°C. Efectua-se o congelamento lento e o descongelamento rápido para evitar que ocorra lise celular pelos cristais de gelo.

## **Protocolo do ensaio do micronúcleo em células V79 sem activação metabólica**

Após a tripsinização, seguiu-se o seguinte protocolo, que está esquematizado na figura 10:

1. colocaram-se 60  $\mu\text{L}$  de suspensão celular (aproximadamente  $7,65 \times 10^5$  células) em frascos pequenos com 5 mL de meio de cultura completo;
2. borbulhou-se com  $\text{CO}_2$  e incubou-se 24 horas numa estufa a  $37^\circ\text{C}$ ;
3. após 24 horas adicionou-se o químico na concentração a estudar ao frasco. Por cada experiência efectuou-se um controlo negativo com DMSO (solvente usado nos químicos, no volume máximo correspondente aos químicos adicionados) e um controlo positivo Mitomicina C a uma concentração  $12,5 \mu\text{L}/\text{frasco}$ ;
4. homogeneizaram-se com cuidado os frascos;
5. borbulharam-se com  $\text{CO}_2$  e incubaram-se 24 horas;
6. após 24 horas retirou-se o meio dos frascos;
7. adicionaram-se 5 mL de Meio Ham's F-10 suplementado com 1% de mistura de antibióticos (estreptomicina e penicilina) e homogeneizou-se muito bem o frasco, de modo a lavar as células;
8. retirou-se o meio;
9. colocaram-se 5 mL de meio completo em cada frasco e adicionou-se citocalasina B numa concentração de  $4,5 \mu\text{L}/\text{mL}$ ;
10. Borbulhou-se  $\text{CO}_2$  nos frascos e incubou-se 16 horas numa estufa a  $37^\circ\text{C}$ ;
11. Após as 16 horas de incubação, lavaram-se as células com verseno, tripsinizaram-se e centrifugaram-se as suspensões celulares durante 5 min a 1500 rpm;
12. Rejeitou-se o sobrenadante, homogeneizou-se o pellet com a ajuda do vortex;

13. Adicionar 5 mL de meio RPMI diluído 4:1 em H<sub>2</sub>Odd e suplementado com 2% soro fetal bovino e centrifugar os tubos novamente a 1500 rpm 5 minutos;
14. Rejeitou-se o sobrenadante e adicionaram-se novamente 5 mL do meio usado no passo anterior com vórtex, aguardaram-se 7 minutos e centrifugou-se (5 min a 1500 rpm);
15. Rejeitou-se o sobrenadante e adicionou-se 5 mL de meio RPMI diluído 1:4 em H<sub>2</sub>Odd e suplementado com 2% soro fetal bovino com vórtex para provocar o choque osmótico, aguardar 5 minutos e centrifugar 5 minutos a 1500rpm;
16. Retirar o sobrenadante deixando o suficiente para resuspender o pellet;
17. Aplicar a suspensão celular em lâminas secas e fazer o esfregaço com a ajuda de outra lâmina;
18. Deixar secar as lâminas;
19. Quando as lâminas estiverem secas colocam-se em tinas com metanol frio (colocado previamente a -20°C) durante 30 minutos;
20. Retirar as lâminas do frio e deixa-las a secar para o dia seguinte. Proteger para não apanhar pó;
21. Corar as lâminas com giemsa 4% em tampão fosfato pH6,8 durante 8 min;
22. Deixar as lâminas durante 8 min em água e deixar secar para o dia seguinte (proteger do pó);
23. Colar as lamelas nas lâminas identificadas, com cola entellan.
24. Efectuou-se a contagem de MN em microscópio óptico de fundo claro (Nikon).



**Ilustração 10** - Esquema da cultura de células V79 sem activação metabólica.

## **Protocolo do ensaio do micronúcleo em células V79 com activação metabólica**

Após a tripsinização, seguiu-se o seguinte protocolo esquematizado na figura 11:

1. colocaram-se 60  $\mu\text{L}$  de suspensão celular (aproximadamente  $7,65 \times 10^5$  células) em frascos pequenos com 5 mL de meio de cultura completo;
2. borbulhou-se o  $\text{CO}_2$  nos frascos e incubou-se 24 horas numa estufa a  $37^\circ\text{C}$ ;
3. após 24 horas retirou-se o meio e colocou-se 4,5 mL de meio fresco;
4. adicionou-se 500  $\mu\text{L}$  de S9 mix em cada frasco;
5. adicionou-se o composto na concentração a estudar ao frasco. Por cada experiência efectuou-se um controlo negativo com DMSO (solvente usado nos químicos, no volume máximo correspondente aos químicos adicionados) e um controlo positivo ciclofosfamida a uma concentração 10  $\mu\text{L}$ /frasco;
6. homogeneizaram-se com cuidado os frascos e incubaram-se 3 horas;
7. após 3 horas retirou-se o meio dos frascos;
8. lavaram-se os frascos com 2 mL de meio e retirou-se;
9. adicionaram-se 5 mL de Meio Ham's F-10 suplementado com 1% de mistura de antibióticos (estreptomicina e penicilina)
10. borbulhou-se o  $\text{CO}_2$  nos frascos e incubou-se até fazer 24 horas após a adição do químico;
11. após 24 horas adicionou-se citocalasina B numa concentração de 4,5  $\mu\text{L}/\text{mL}$ ;
12. borbulhou-se com  $\text{CO}_2$  e incubou-se 16 horas numa estufa a  $37^\circ\text{C}$ ;
13. procedeu-se à técnica como descrito anteriormente dos passos 11 ao 24.



#### 2.4.6. Identificação e contagem dos micronúcleos em células binucleadas

Para cada protocolo experimental contaram-se 1000 células em microscópio óptico, registando simultaneamente o número de células mononucleadas (MonoN), binucleadas (BN), trinucleadas (TN) e polinucleadas (PoliN). São analisadas ainda 1000 células binucleadas, registando as células que possuem um micronúcleo (Mn1), dois micronúcleos (Mn2), e três ou mais micronúcleos (Mn3).

Os requisitos para a selecção de células binucleadas foram estabelecidos de acordo com os critérios descritos por Fenech (Fenech, 2000):

##### Quanto à definição das características das células binucleadas:

- As células deverão ter dois núcleos de dimensões, tipo e coloração aproximadamente iguais;
- Os núcleos apresentam membranas nucleares intactas, e devem estar presentes dentro da mesma membrana citoplasmática, encontrando-se esta também intacta;
- Os dois núcleos podem estar ligados por uma estreita ponte citoplasmática;
- Os dois núcleos podem sobrepor-se ligeiramente ou tocarem-se nos extremos.

##### Quanto à definição das características dos micronúcleos:

- Deverão apresentar diâmetro entre 1/16 e 1/3 do diâmetro do núcleo principal e possuir uma morfologia semelhante ao núcleo principal;
- Não deverão ser refrácteis, distinguindo-se perfeitamente de quaisquer artefactos, como por exemplos provenientes do processo de coloração;

- Não devem estar ligados ao núcleo principal por pontes nucleoplasmáticas;
- Por vezes podem encontrar-se a sobrepor os limites do núcleo principal;
- Podem existir vários micronúcleos e de diferentes tamanhos na mesma célula BN.

#### 2.4.7. Índices MN/BN e %MNBN

Após a identificação e contagem dos MN, os resultados foram expressos de acordo com os índices MN/BN e %MNBN. O índice **MN/BN** representa o número médio de micronúcleos por célula binucleada e resulta do quociente entre o número total de micronúcleos contados com o número total de células binucleadas contadas, que para todos os ensaios foi de 1000.

$$\mathbf{MN/BN=(Mn1+2Mn2+3Mn3)/BN}$$

Índice **%MNBN** representa a frequência em percentagem de células binucleadas contendo micronúcleo, independentemente do número de micronúcleos que a célula possua.

$$\mathbf{\%MN/BN=(MnTotal/BN)*100}$$

Mn1-Mn3 representa as células binucleadas com 1-3 ou mais micronúcleos, MnTotal é o total de células com micronúcleos independentemente da quantidade destes e BN representa o número total de células binucleadas viáveis contadas, ou seja 1000.

#### 2.4.8. Avaliação da proliferação celular

Foram calculados três índices diferentes para avaliar a proliferação celular decorrente da exposição das células V79 aos compostos isolados:

**%BN** - índice correspondente à % de células que se dividiram apenas uma vez - binucleadas. Índice de proliferação clássico associado ao ensaio do micronúcleo (Fenech, 2000):

$$\%BN = M2/N * 100$$

**NDI** - índice de divisão nuclear (“Nuclear Division Index”). Proposto por Eastmond e Tucker em 1989:

$$NDI = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4) / N$$

**CBPI** - índice de proliferação de células com a citocinese bloqueada (“Cytokinesis-Blocked Proliferating Index”). Proposto por Surrallés et al. 1995:

$$CBPI = [M1 + 2M2 + 3(M3 + M4)] / N$$

M1-M4 representam as células com 1-4 núcleos respectivamente e N é o número total de células viáveis contadas, 1000.

---

## Capítulo III - Resultados e Discussão

### 3.1. Actividade antifúngica

A actividade antifúngica foi avaliada qualitativamente por difusão em disco, para três estirpes de referência de leveduras, usando discos impregnados com 20 mg/disco dos extractos de hexano 1 (Hx1), hexano 2 (Hx 2), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e acetato de etilo (AcOEt). Como controlo negativo usou-se o solvente utilizado para resuspende os extractos, o dimetilsulfóxido (DMSO) sendo o disco impregnado com 20 µL. O controlo positivo foi efectuado com o antifúngico comercial, Anfotericina B, com uma concentração de 25 µg/disco. Os halos de inibição foram medidos e registados na tabela 4. Os resultados correspondem à média dos 3 ensaios.

**Tabela 4** - Valores obtidos para os testes de difusão em disco para as estirpes de leveduras em estudo.

Estirpes	Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm) a)				
	20 mg/disco (solução 1 g/mL)				<b>Anfotericina B</b> (25 µg/disco)
	Hx 1	Hx 2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt	
<b>Leveduras</b>					
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	NI	NI	NI	NI	24,5±0,71
<i>Candida albicans</i> ATCC 24433	NI	NI	NI	NI	24,5±0,71
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	NI	NI	NI	NI	24±0

NI – Não se registou inibição

Dos extractos estudados, nenhum apresentou inibição perante as diferentes estirpes de leveduras testadas, sendo assim não se prosseguiu o estudo antifúngico para estes extractos.

## 3.2. Actividade antibacteriana

Para avaliar qualitativamente a actividade antibacteriana dos extractos de *Eragrostis viscosa*, efectuou-se os testes de difusão em disco. Para as estirpes que se verificou inibição, efectuaram-se os ensaios de microdiluição para determinação da concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima letal (MLC). Para as estirpes em que foi possível determinar a MIC, foram realizadas curvas de crescimento, com o objectivo de se determinar o mecanismo de acção provável dos extractos, se possuem actividade bactericida (matam as bactérias) ou bacteriostática (inibem o crescimento bacteriano, voltando a haver crescimento, após remoção do composto).

### 3.2.1. Ensaio de susceptibilidade por difusão em disco

O ensaio de difusão em disco é um método para quantificar a capacidade dos antibióticos para inibir o crescimento bacteriano, cuja interpretação dos resultados é baseada na hipótese que os antibióticos apresentam uma difusão livre em meio nutritivo sólido. A reprodutibilidade e a precisão deste método é influenciada por muitos factores, como a espessura do gel, a uniformidade do agar, o espalhamento do inóculo. Quando estes factores são controlados ao longo do ensaio, a análise dos resultados depende de modelos teóricos, como o pressuposto que o agente antimicrobiano se difunde livremente e o factor limitante é o seu arrastamento viscoso (Bonev *et al.*, 2008).

Em muitos casos, esta suposição está incorrecta, o que leva a desvios significativos do comportamento previsível a partir da experiência e da avaliação da susceptibilidade bacteriana aos antibióticos. A difusão do antibiótico nos discos de agar leva à inibição do crescimento bacteriano na proximidade do disco e à formação de halos sem crescimento bacteriano, sendo ao diâmetro dos halos proporcional à concentração e ao tempo de difusão do antibiótico. Outro factor que pode ainda influenciar a difusão do antibiótico é a sua natureza mais hidrofóbica ou alifática, o que deveria acontecer com os extractos testados, principalmente os de hexano e de

diclorometano, que nos ensaios de difusão em disco apresentavam formação de duas fases (Bonev *et al.*, 2008).

Na realização dos testes de difusão em disco foram usados discos com 6mm de diâmetro impregnados com 20mg/disco dos extractos em estudo. O controlo negativo é o solvente usado, DMSO sendo o disco impregnado com 20 µL. Como controlos positivos usaram-se os antibióticos comerciais, a Ampicilina e a Carbenicilina, com concentrações de 10 µg/disco e 100 µg/disco respectivamente. De seguida, mediu-se o diâmetro de inibição, considerando-se inibição halos superiores a 6mm (que corresponde ao diâmetro do disco). Verificou-se que o DMSO (controlo negativo) não inibiu nenhuma estirpe. Os resultados relativos ao ensaio de susceptibilidade por difusão em disco para as estirpes bacterianas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*) estão apresentados na tabela 5. Os resultados correspondem à média dos 3 ensaios.

**Tabela 5** - Valores obtidos para os testes de difusão em disco para as estirpes bacterianas em estudo.

Estirpes	Diâmetro da zona de inibição de crescimento (mm) a)					
	20 mg/disco ( solução 1 g/mL)				Ampicilina (10 µg/disco)	Carbenicilina (100 µg/disco)
	Hx 1	Hx 2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt		
	<b>Bactérias gram-positivas</b>					
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771	13,33±2,516	11,33±0,33	10,33±0,33	9±0	13±1	14±0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	18,5±2,23	11,67±1,155	10±1	8±1	31,5±0,577	36,3±1,15
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	18±0	14,67±1,15	10±1	9±0	25,75±2,08	25,33±0
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 10/08	10,67±3,79	8,67±1,15	7,67±0,58	7,67±0,58	NI	10,67±0,58
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 12/08	11,67±2,08	8,33±0,58	8,67±2,08	9,33±2,08	NI	10,67±1,15
<b>Bactérias gram-negativas</b>						
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	NI	NI	NI	NI	13,67±0,577	23±0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	NI	NI	NI	7,67±0,58	NI	14±0
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	NI	NI	NI	NI	22,67±0,577	26±0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13833	7±0	7±0	7±0	7±0	7±0	NI

NI – Não se registou inibição.

Após a análise dos resultados verificou-se que os extractos inibem as bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina.), não apresentando actividade para as gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*).

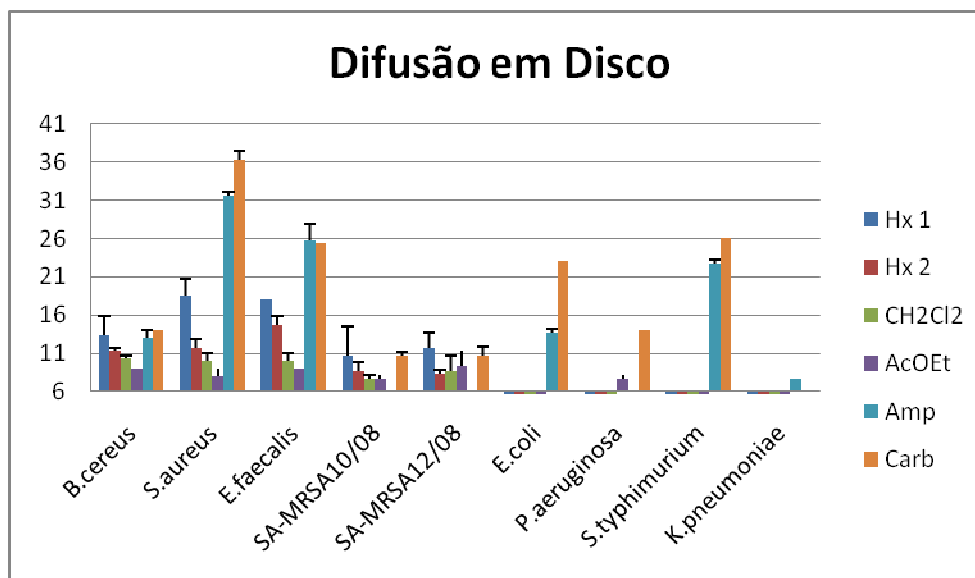
Como se verifica inibição apenas na bactérias gram-positivas, que apresentam uma elevada percentagem de peptidoglicano na constituição da sua parede, pode-se colocar a hipótese do extracto não conseguir penetrar dentro das bactérias gram-negativas, já que estas possuem uma membrana externa e uma parede celular com uma maior complexidade que as bactérias gram-positivas. Outra hipótese é o facto do extracto poder actuar ao nível da parede celular, interferindo na síntese de peptidoglicano.

**Tabela 6** - Concentrações padrão e respectivos halos de inibição padrão para o teste de difusão em disco (mm).

Agente Antimicrobiano	Conteúdo do Disco	<i>E. coli</i> ATCC® 25922a	<i>S.aureus</i> ATCC® 25923	<i>P.aeruginosa</i> ATCC® 27853
Ampicilina	10 µg	16-22	27-35	---
Carbenicilina	100 µg	23-29	---	18-24
Tetraciclina	30 µg	18-25	24-30	---

O valor do halo de inibição no controlo positivo obtido para a *Pseudomonas aeruginosa* está um pouco abaixo do intervalo de referência indicado na norma NCCLS M2-A8 (Tabela 6). Para as restantes estirpes, pelo menos um dos controlos está dentro do intervalo de referência.

Comparando o diâmetro dos halos de inibição dos vários extractos com os antibióticos comerciais, pode-se observar que para o *Bacillus cereus* e para as estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (*MRSA 12/08* e *MRSA 10/08*) o extracto de hexano 1 apresenta um halo de inibição superior aos controlos positivos, verificando-se o contrário para as restantes estirpes. O extracto de hexano 1 é o que apresenta uma maior inibição para todas as estirpes em análise excepto a *Pseudomonas aeruginosa* que apenas é inibida com o extracto de acetato de etilo, como se pode observar através da ilustração 12.



**Ilustração 12** - Comparação dos diâmetros dos halos de inibição dos extractos e dos antibióticos comerciais para todas as estirpes bacterianas estudadas.

### 3.2.2. Microdiluição

#### Solubilidade dos extractos

Um dos principais problemas nos ensaios de susceptibilidade aos antibióticos em meio líquido foi a solubilização dos extractos em estudo.

Para tentar encontrar o intervalo de concentrações a testar no ensaio de microdiluição, efectuaram-se diferentes tentativas de solubilização dos extractos em água, variando, desde a percentagem de DMSO e concentrações de extracto, às temperaturas e modos de agitação.

Como a solução que apresentou melhor solubilização foi a de 2,5 mg/mL de extracto com 4% DMSO, esta foi a seleccionada, no entanto, quando preparada com meio MHB, e passado 24 horas, tanto à temperatura ambiente como na estufa a 37°C, as soluções dos diferentes extractos precipitaram.

Controlou-se o pH, a temperatura, a agitação, e vários meios e tampões com diferentes pH, de modo a seleccionar o que apresenta melhor solubilidade. O extracto de Acetato de Etilo foi o que apresentou menor solubilidade. Com água, nenhum dos extractos precipitou, o que pode indicar que algum componente presente nos extractos deve reagir com os sais dos meios ou dos tampões, sendo assim, usou-se o meio que menos precipita, o MHB.

O intervalo de concentrações de extracto estudado foi de 1,25 mg/mL a 9,76 µg/mL, com 2% de DMSO na concentração mais elevada. Esta foi a concentração escolhida, uma vez que é a concentração mais elevada que se consegue dissolver com uma percentagem máxima de 2% de DMSO. Esta percentagem foi testada, não apresentando inibição, em relação ao controlo positivo, para confirmar efectuaram-se as leituras das absorvências das microplacas e compararam-se os resultados obtidos no controlo positivo e no controlo do DMSO, para cada estirpe.

Para as estirpes gram-positivas que apresentaram susceptibilidade para os extractos estudados, efectuou-se o teste de microdiluição em caldo, para se tentar determinar a concentração mínima inibitória (MIC). As concentrações mínimas inibitórias obtidas para os extractos em estudo são apresentadas na tabela 7.

**Tabela 7** - Concentrações mínimas inibitórias dos extractos para as estirpes gram-positivas obtidas no teste de microdiluição.

Concentração mínima inibitória (MIC)						
Estirpes	Hx 1 (mg/mL)	Hx 2 (mg/mL)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> (mg/mL)	AcOEt (mg/mL)	Amp (µg/mL)	Tetra (µg/mL)
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771	0,079±0	0,105±0,04	0,079±0	a)	1,8±0,4	8±0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0,03125±0	0,469±0,167	0,391±0,145	a)	0,4±0,1	0,6±0,3
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	a)	a)	a)	a)	1,5±0,5	8±0

- a) não se conseguiu fazer uma identificação visual do MIC, devido ao precipitado, de qualquer modo repicou-se o 1º poço com a concentração de 1,25mg/mL.

O extracto de hexano 1 (Hx 1) foi o que apresentou uma MIC mais baixa para todas as estirpes analisadas. O extracto de AcOEt, precipitou o que impossibilitou a determinação da MIC, no entanto repicou-se para placas de PCA, para determinar se ocorreu ou não inibição de crescimento. O mesmo se efectuou para todos os extractos testados na estirpe *Enterococcus faecalis*, pois esta estirpe quando cresce apresenta uma turvação muito ténue e com o precipitado dos extractos era impossível verificar se ocorreu inibição ou crescimento na presença de extracto.

As MIC registadas para o *S. aureus* com os controlos positivos estão dentro dos intervalos de referência indicados na norma NCCLS M100-S15, 0,5-2 µg/mL para a Ampicilina (Amp) e 0,2-1 µg/mL para a Tetraciclina (Tetra).

Após as leituras das microplacas, os poços onde não se verificou crescimento foram repicados para placas de PCA, de modo a verificar se existiam concentrações mínimas letais (MLC).

Após incubação de 24 horas, procedeu-se à contagem das colónias, considerando-se uma concentração mínima letal quando o número de colónias corresponde a uma redução de mil vezes comparando à contagem do inóculo inicial. Na tabela 8 estão apresentados os resultados.

**Tabela 8** - Concentrações mínimas letais dos extractos obtidas para as estirpes gram-positivas no ensaio de microdiluição.

Concentração mínima letal (MLC) (mg/mL)				
Estirpes	Hx 1	Hx 2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	AcOEt
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11771	0,105±0,04	0,208±0,081	0,156±0,085	NI
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	b)	b)	b)	NI
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	NI	NI	NI	NI

NI- não se observou inibição.

- b) nos poços com a concentração de 1,25 mg/mL não há inibição total, observando-se uma pequena quantidade de colónias de tamanho muito reduzido, que impediu a sua contagem.

Com os resultados obtidos em microdiluição, observou-se que no extracto de Acetato de Etilo, as concentrações testadas não inibiam o crescimento bacteriano em nenhuma estirpe, assim como a estirpe *Enterococcus faecalis* não foi inibida por nenhum extracto analisado, como se pode observar na tabela 8.

No mesmo ensaio, o *S. aureus* desenvolveu um pequeno número de colónias de tamanho muito reduzido, que impossibilitou a sua contagem, de modo a contabilizar se ocorreu uma redução de pelo menos 99,9% em relação ao inóculo inicial. Como não se conseguiu ter a certeza se a concentração mais elevada testada nesta estirpe era ou não a MLC, efectuaram-se também as curvas de crescimento/morte para esta estirpe, assumiu-se que a concentração máxima testada em microdiluição (1,25 mg/mL) correspondia à MLC.

As MIC e MLC mais baixas foram registadas para o *B. cereus*, apesar de no ensaio da difusão em disco os halos obtidos serem inferiores aos halos do *E. faecalis* e do *S. aureus*.

Para o *Bacillus cereus*, a MIC e a MLC são muito próximas, apresentando os valores mais baixos determinados para todas as estirpes, apesar de no ensaio de difusão em disco, ser a estirpe de bactérias gram-positivas em que se verificou menor inibição, por parte dos extractos.

O *S. aureus* registou uma pequena quantidade de colónias de tamanho muito reduzido, que nos impossibilitou de efectuar a sua contagem, de modo a contabilizar se ocorreu uma redução de pelo menos 99,9% em relação ao inóculo inicial. Como não conseguimos ter a certeza se a concentração mais elevada testada nesta estirpe era ou não a MLC, efectuaram-se também as curvas de crescimento/morte para esta estirpe, estipulando-se que a concentração máxima testada em microdiluição (1,25 mg/mL) correspondia à MLC.

Segundo Pankey comparando as MIC e MLC, pode-se extrapolar os possíveis mecanismos de acção dos extractos, ou seja se possuem actividade bactericida, caso a MLC seja inferior 4xMIC ou bacteriostática, quando a MLC é superior a 4xMIC (Pankey e Sabath, 2003).

Analisando os resultados obtidos para o *B. cereus* leva a crer que o extracto tem actividade bactericida, uma vez que os valores da MIC e MLC são muito próximos e cumprem a relação  $MLC < 4x MIC$ . Já para o *S. aureus* o extracto parece apresentar actividade bacteriostática, uma vez que apesar de não se ter determinado a MLC, a concentração mais alta testada (1,25mg/mL) inibia parcialmente o crescimento, pois as colónias eram muito pequenas, mas não se conseguiu confirmar se a sua redução era de 99,9% em relação ao inóculo inicial.

Nas curvas de morte foram testadas concentrações múltiplas da MIC (MIC; 2MIC; 3MIC e 4MIC), para confirmar se com concentrações superiores, estes extractos poderiam ter actividade bactericida.

Não foram realizados ensaios de curvas de morte, para o *E. faecalis*, uma vez que não se conseguiu determinar nem a MIC nem a MLC, já que esta estirpe apresenta um crescimento muito ténue, tanto em meio líquido como em meio sólido, o que dificulta muito a leitura de resultados.

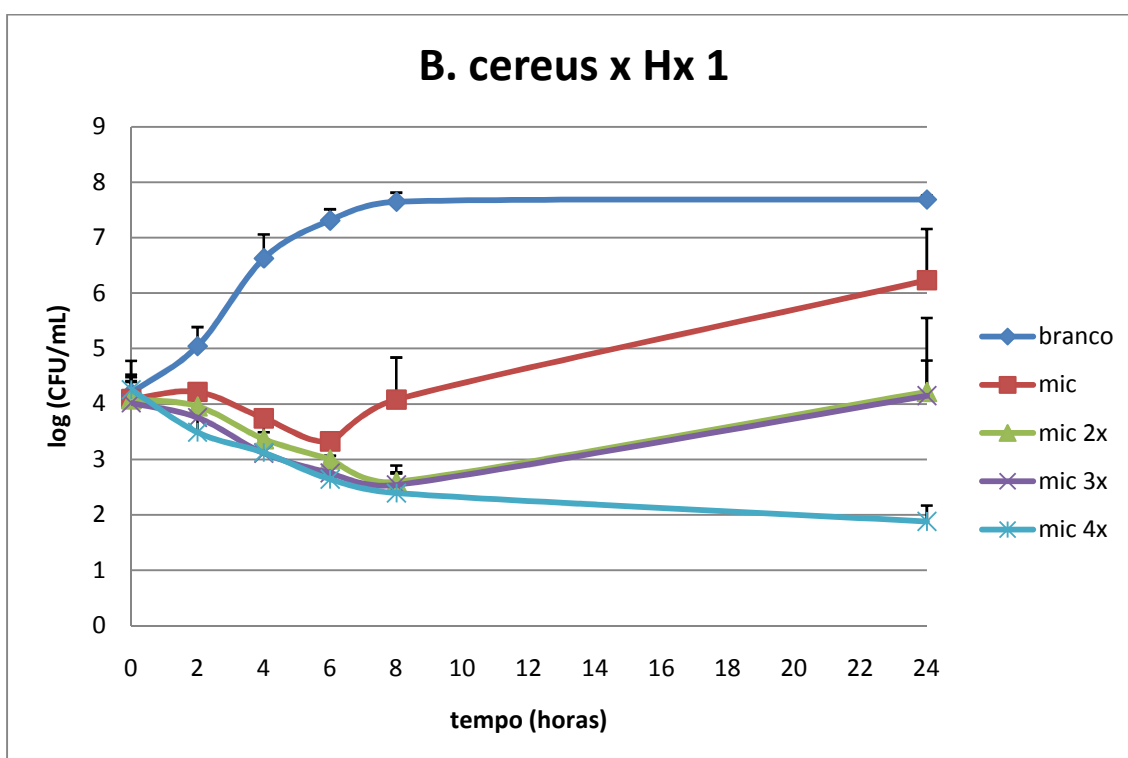
### 3.2.3. Curvas de morte

O traçado das curvas de morte, foi usado com o objectivo de determinar se os extractos tinham actividade bactericida ou bacteriostática sobre as estirpes de *B. cereus* e de *S. aureus*. Esta técnica consiste na contagem das colónias de bactérias que sobrevivem ao longo do tempo, fazendo o espalhamento em meio sólido, de uma quantidade constante de suspensão bacteriana, diluída em meio líquido a tempos exactos, com vista a traçar uma curva de crescimento/inibição da estirpe face às diferentes situações em estudo.

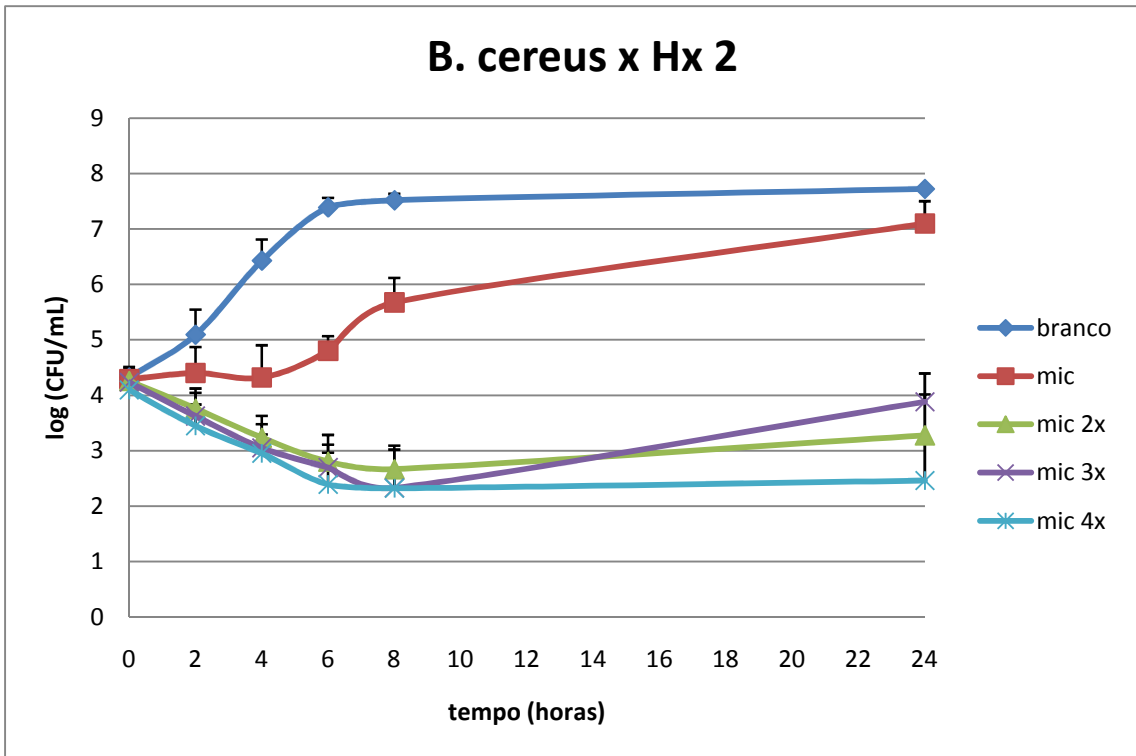
Os extractos testados foram os de hexano e o de diclorometano, excluindo o extracto de acetato de etilo desta técnica, uma vez que não foi possível determinar a MIC com este extracto para nenhuma estirpe em estudo. A selecção das estirpes a estudar obedeceu ao mesmo critério, visto apenas ser possível determinar a MIC e a MLC para o *B. cereus*, já com o *S. aureus*, apesar de não se ter determinado o valor da MLC,

efectuou-se a técnica, pois ao testar concentrações superiores às conseguidas em microplaca, talvez alguma delas pudesse apresentar efeito bactericida.

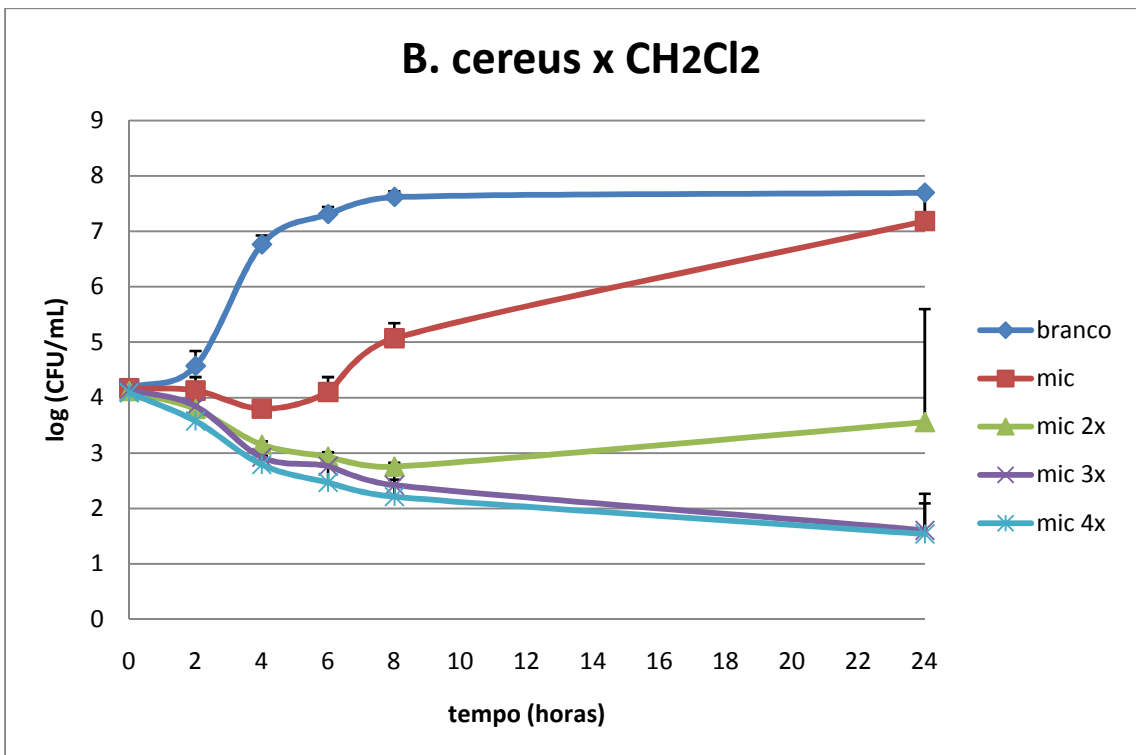
Os resultados das curvas de morte para o *B. cereus* estão representados nos gráficos das Figuras 13, 14 e 15 no qual se observa a curva de inibição do *B. cereus* face aos extractos de hexano 1 (Hx1), hexano 2 (Hx 2) e diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ), obtida pelo número de colónias contadas, log (CFU/mL) em função do tempo em horas.



**Ilustração 13** - Representação da curva de crescimento/inibição para o *B. cereus* com o extracto de Hx 1.



**Ilustração 14** - Representação da curva de crescimento/inibição para o *B. cereus* com o extracto de Hx 2.



**Ilustração 15** - Representação da curva de crescimento/inibição para o *B. cereus* com o extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

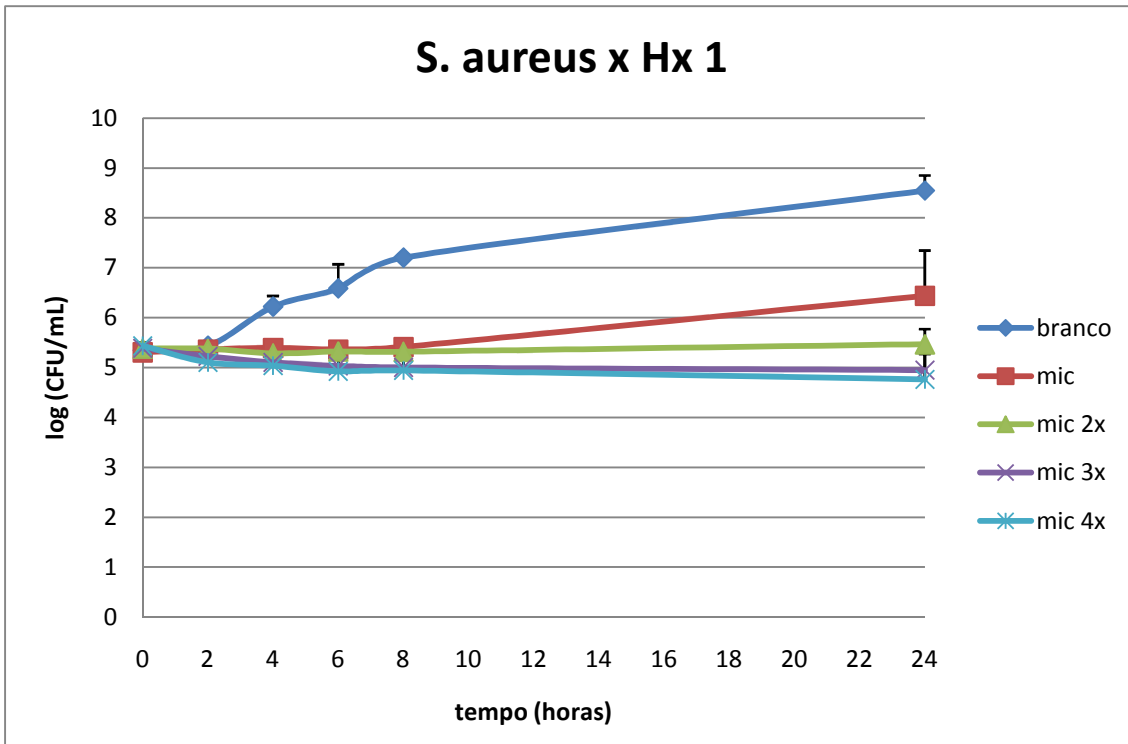
Para o extracto de Hx 1, a redução máxima, observou-se com a concentração de 4MIC, ao fim de 24 horas de contacto entre o extracto e a estirpe bacteriana. A estirpe sem inibição ao fim de 24 horas tem um crescimento de 7,686 log CFU/mL, enquanto que com a concentração de 4MIC o crescimento é de 1,881 log CFU/mL. O inóculo inicial às 0 horas é de 4,199 log CFU/mL, a redução da concentração 4x MIC em relação ao inóculo inicial é de 2,318 log CFU/mL, como esta redução não é de 4 log, não se pode considerar um efeito bactericida.

O inóculo inicial às 0 horas para o branco do extracto de Hx 2, é de 4,323 log CFU/mL, e às 24 horas o seu crescimento atinge 7,722 log CFU/mL. Ao fim de 24 horas de incubação, a concentração que apresenta maior inibição foi 4MIC, cujo valor é 2,462 log CFU/mL, que apresenta uma redução de 1,861 log.

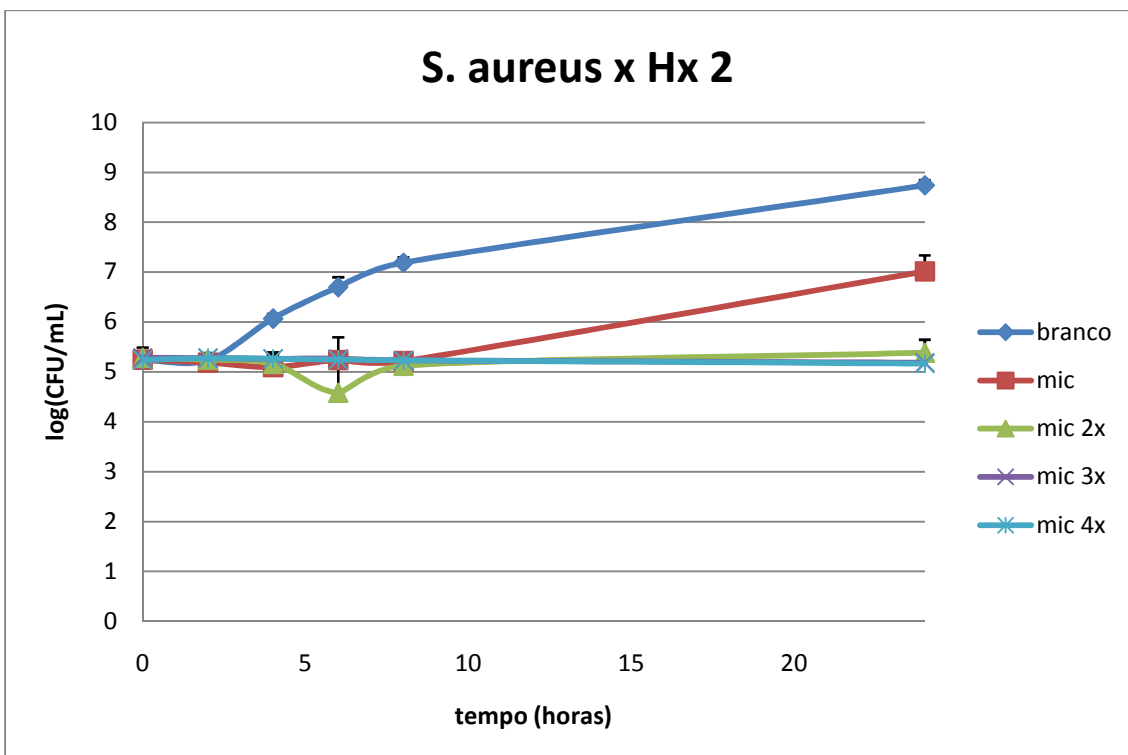
O extracto de diclorometano ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ) apresentou uma inibição de 1,540 log CFU/mL com a concentração de 4MIC às 24 horas de incubação, enquanto que o seu branco às 0 horas tinha 4,173 log CFU/mL e após 24 horas de incubação apresentaram um crescimento de 7,695 log CFU/mL, verificando-se uma inibição do extracto de 2,633 log.

Nenhum dos extractos apresentou uma inibição superior a 4 log para o *B. cereus*, apesar de todos eles estarem na ordem dos 2 log, o que indica que os três extractos estudados (hexano 1, hexano 2 e diclorometano) têm uma acção bacteriostática sobre o *B. cereus*, ou seja não matam as células, apenas inibem o seu crescimento, quando estão em contacto com as bactérias, uma vez removido o extracto, as bactérias voltam a crescer.

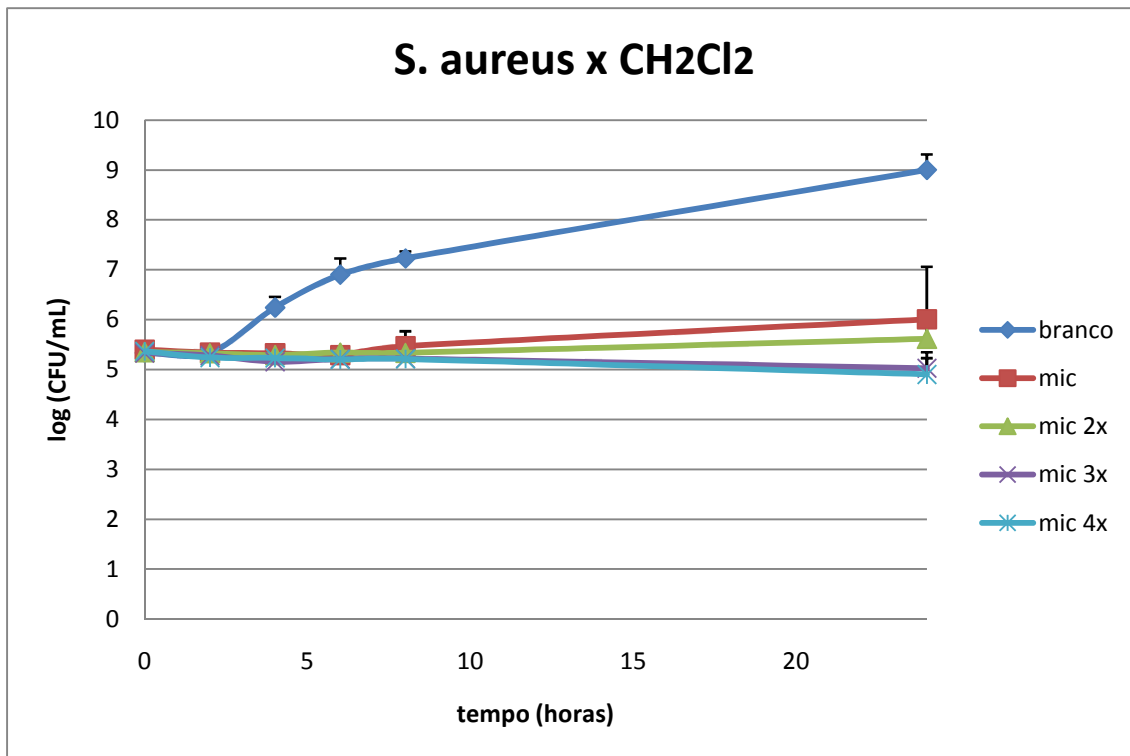
Para os estudos efectuados nos ensaios em microplacas para o *S. aureus*, não se conseguiu determinar uma concentração letal, de qualquer modo, como nesta técnica, as concentrações testadas são mais elevadas, sem haver problema quanto à turbidez do meio, esta estirpe foi também usada para estudar o efeito dos extractos. Os resultados obtidos estão apresentados nos gráficos das figuras 16,17 e 18.



**Ilustração 16** - Representação da curva de crescimento/inibição para o *S. aureus* com o extracto de Hx 1.



**Ilustração 17** - Representação da curva de crescimento/inibição para o *S. aureus* com o extracto de Hx 2.



**Ilustração 18** - Representação da curva de crescimento/inibição para o *S. aureus* com o extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>.

Através da análise dos gráficos para o *S. aureus*, verifica-se que os extractos apresentam sempre actividade bacteriostática, pois para todos os extractos a inibição observada encontra-se no intervalo entre 0 e 4 log.

Os inóculos iniciais apresentam cerca de 5,3 log CFU/mL, permanecendo sempre com uma concentração muito constante ao longo das 24 horas de incubação, não se verificando inibição na observação dos gráficos, mas sim, uma estabilização das CFU/mL em relação ao inóculo inicial, enquanto que os brancos apresentaram um crescimento normal atingido a ordem dos 8,5- 9 log CFU/mL.

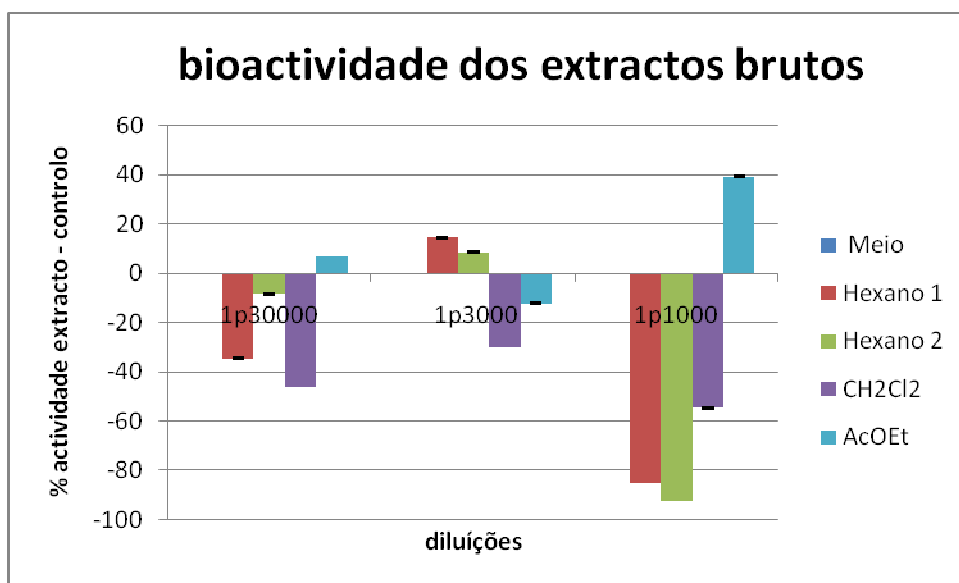
Estes resultados são típicos de uma actividade bacteriostática dos extractos sobre a estirpe em estudo.

### 3.3. Citotoxicidade dos extractos brutos

A citotoxicidade foi avaliada em culturas de fibroblastos usando o método do MTT. Foram estudadas três diluições diferentes (1:1000; 1:3000 e 1:30000) da concentração-mãe (500mg/mL) de cada extracto (Hx 1; Hx 2; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e AcOEt). Os resultados apresentados referem-se à variação das absorvências registadas em relação ao controlo negativo (efectuado apenas com células em meio) em percentagem.

No primeiro ensaio efectuado as células foram incubadas com o extracto durante 48 horas, depois retirou-se o meio e deixaram-se as células em recuperação durante 24 horas, antes da adição do MTT.

Os resultados do primeiro ensaio estão apresentados nas figuras 19 e referem-se à diferença da capacidade que as células incubadas com o extracto possuem para reduzir o MTT a formazan em relação às células sem adição de extracto.



**Ilustração 19** - Bioactividade dos extractos brutos no primeiro ensaio do MTT.

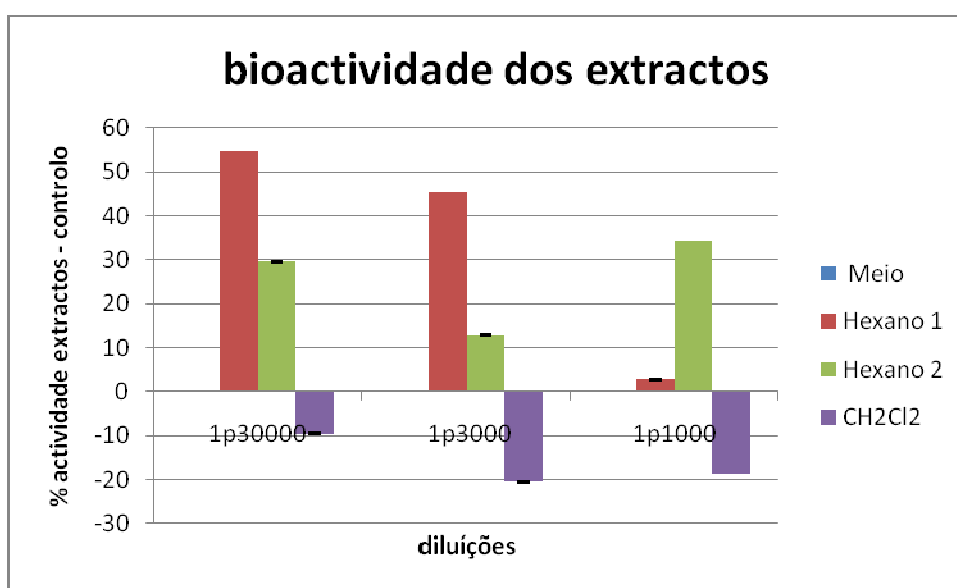
Nos extractos brutos, as alterações significativas ocorreram para as concentrações mais altas, em que verificamos uma diminuição da viabilidade das células para os extractos de hexano 1, hexano 2 e diclorometano. As excepções

observadas a este facto verificaram-se com o extracto de AcOEt, em que se verificou, para concentrações mais elevadas um aumento da viabilidade e para o extracto de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> que apresentaram sempre toxicidade independente da concentração.

Tendo em conta que os resultados obtidos apresentaram uma dispersão de resultados muito elevada, aumentou-se o número de células para confirmar os resultados obtidos anteriormente.

Uma vez que o extracto de AcOEt não demonstrou acção antibacteriana não se efectuaram mais testes de citotoxicidade com este extracto.

Tal como se pode observar na ilustração 20, os resultados obtidos confirmamos anteriormente descritos pelo CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, contudo a fracção de Hx 2 diminuiu a viabilidade celular.



**Ilustração 20** - Bioactividade dos extractos brutos no segundo ensaio do MTT.

O extracto de Hexano 1 foi o que apresentou melhor actividade antibacteriana, nomeadamente os maiores halos de inibição, como também as MIC e MLC mais baixas, como também apresentou um aumento da bioactividade frente aos fibroblastos, seleccionou-se este extracto para efectuar o fraccionamento, de modo a tentar isolar o(s) composto(s) químico(s) responsável pela actividade biológica.

### 3.4. Fraccionamento do extracto de hexano 1

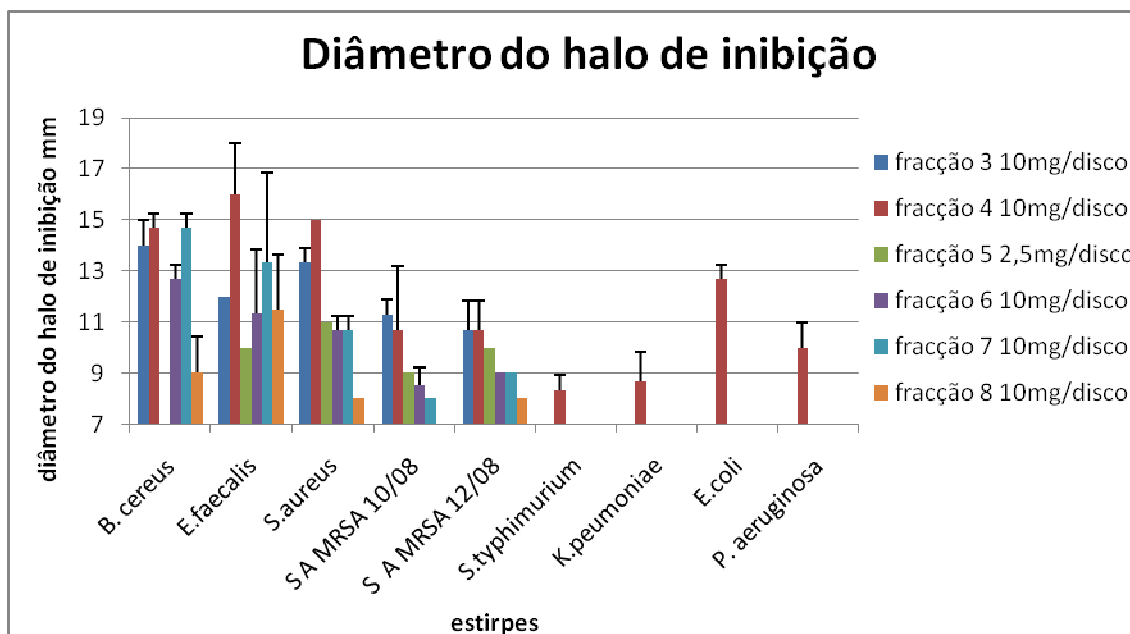
#### Cromatografia 1

Aproximadamente 10 g de extracto bruto de hexano 1 de *Eragrostis viscosa* foram cromatografados em coluna sobre sílica gel, sendo sucessivamente eluídos com os seguintes solventes: hexano, hexano/acetato de etilo (95:5, 8:2 e 1:1), acetato de etilo, acetato de etilo/metanol (95:5, 8:2) e metanol. Na tabela 9 apresentam-se as oito fracções obtidas.

**Tabela 9** - Cromatografia 1.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)
1	Hx	23
2	Hx: AcOEt (95:5)	155
3	Hx: AcOEt (8:2)	7033
4	Hx: AcOEt (1:1)	986
5	AcOEt	201
6	AcOEt: MeOH (95:5)	364
7	AcOEt: MeOH (8:2)	660
8	MeOH	547

Como nas fracções 1 e 2 não se obteve uma quantidade suficiente para ser estudada, prosseguiu-se o estudo apenas com as fracções 3 a 8. Estas fracções foram testadas quanto à sua actividade antibacteriana pelo ensaio de difusão em disco (para confirmar se o/os compostos responsáveis pela actividade ainda se encontravam presentes nas fracções).

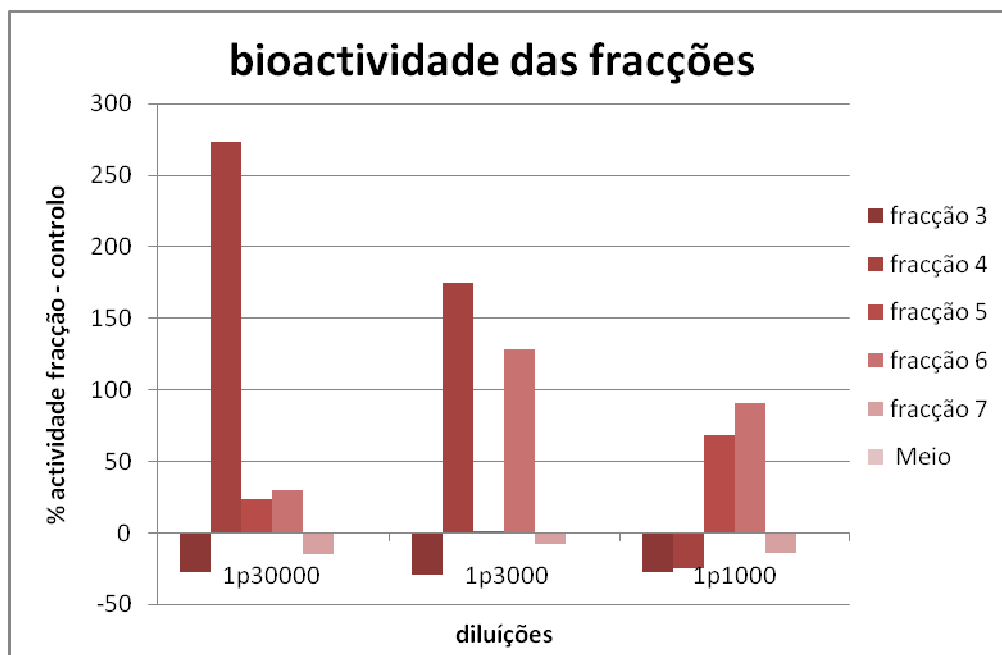


**Ilustração 21** - Difusão em disco das fracções do extracto hexano 1 obtidas na cromatografia 1.

Verifica-se através da figura 21 que as fracções 3 e 4 foram as que apresentaram maior actividade antibacteriana para as estirpes estudadas.

Apenas a fracção 4 apresentou actividade contra as estirpes gram-negativas. É de salientar ainda, que a fracção 5 foi testada com uma concentração quatro vezes inferior às restantes fracções devido à pequena quantidade de composto obtida no fraccionamento (Tabela 9).

Realizaram-se também ensaios de citotoxicidade com as mesmas fracções 3 a 7. A fracção 8 não foi estudada, pois não tinha quantidade suficiente.



**Ilustração 22** - Bioactividade das fracções do extracto de hexano obtidas na cromatografia 1 no ensaio do MTT.

No ensaio do MTT efectuado com as fracções obtidas na cromatografia 1 pode-se observar que a fracção 4 parece ser a responsável pelo comportamento do extracto bruto de hexano 1, sendo a responsável pela bioactividade celular, no entanto parece promover um descontrolo do ciclo celular. A fracção 6 também promove a viabilidade celular nas concentrações mais elevadas. As restantes fracções não apresentam alterações significativas, em relação ao comportamento dos fibroblastos em meio, como demonstra a ilustração 22.

De seguida prosseguiu-se ao fraccionamento das fracções, de modo a isolar os compostos presentes nas fracções estudadas.

## Cromatografia 2

A fracção 3 (6,774g) da cromatografia 1 foi recromatografada (tabela 10), usando sílica gel e eluída com hexano, misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 10** - Cromatografia 2.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)
1-5	Hx	17
6-10	Hx: AcOEt (95:5)	12
11-16	Hx: AcOEt (9:1)	790
17-26	Hx: AcOEt (8:2)	4307
27-35	Hxx: AcOEt (7:3)	803
36-41	AcOEt	288

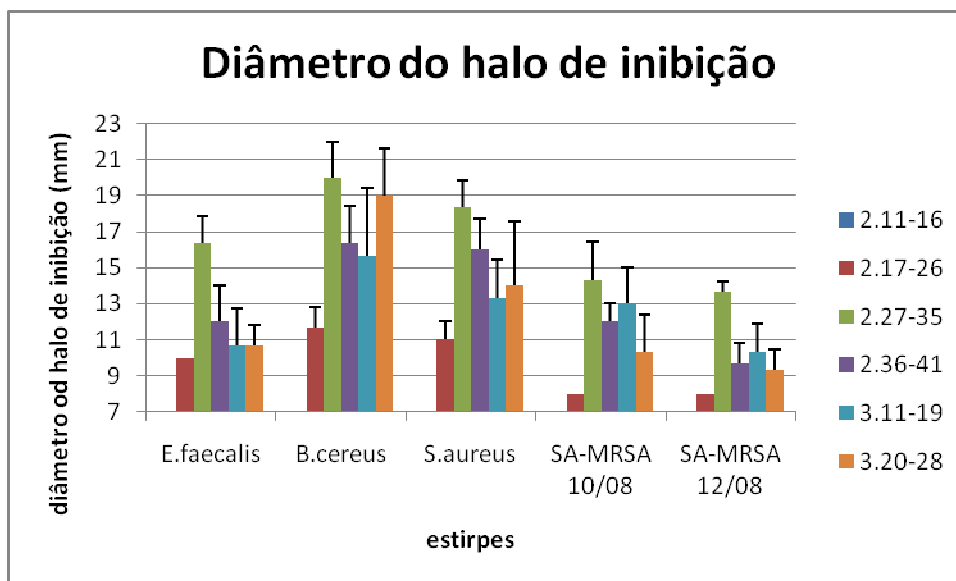
### **Cromatografia 3**

A fracção 4 (740mg) da cromatografia 1 foi recromatografada (tabela 11), usando sílica gel e eluída com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 11** - Cromatografia 3.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)
1-5	Hx: AcOEt (95:5)	0
6-10	Hx: AcOEt (8:2)	0
11-19	Hx: AcOEt (6:4)	235
20-28	Hx: AcOEt (1:1)	236
29-32	AcOEt	18

Foram seleccionadas as fracções 11-16; 17-26; 27-35 e 36-41 da cromatografia 2 e as fracções 11-19 e 20-28 da cromatografia 3 para prosseguir o estudo já que eram as que apresentavam uma quantidade suficiente para serem testadas. Com estas fracções apenas se efectuaram testes de difusão em disco de modo a seleccionar as fracções onde ainda se apresentava actividade antibacteriana. Os discos foram impregnados com 2,5 mg de composto.



**Ilustração 23** - Difusão em disco das fracções de hexano 1 obtidas nas cromatografias 2 e 3.

A fracção 11-16 da cromatografia 2 não apresentou qualquer actividade antibacteriana (figura 23). Todas as outras fracções registaram actividade antibacteriana salientando-se principalmente a fracção 27-35 da cromatografia 2. Prosseguiu-se o fraccionamento de modo a identificar e purificar os compostos que constituíam as fracções com actividade. Todas as fracções foram testadas também para as estirpes gram-negativas não se registando qualquer inibição.

Apesar da fracção 11-16 da cromatografia 2 não ter registado actividade antibacteriana, a fracção foi recromatografada pois poderia conter algum dos compostos em quantidades razoáveis para efectuar os estudos biológicos.

#### **Cromatografia 4**

A fracção 27-35 (613mg) da cromatografia 2 foi recromatografada (tabela 12), usando sílica gel e eluída com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 12** - Cromatografia 4.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-17	Hx: AcOEt (9:1)	104	-
18-24	Hx: AcOEt (8:2)	17	-
25-26	Hx: AcOEt (8:2)	98	<b>5</b>
27-31	Hx: AcOEt (8:2)	86	<b>5</b>
32-42	Hx: AcOEt (8:2; 7:3)	119	<b>5+6+</b> mix
43-44	Hx: AcOEt (7:3)	34	<b>5+</b> mix
45-48	Hx: AcOEt (1:1)	73	-

**Cromatografia 5**

A fracção 11-16 (630mg) da cromatografia 2 foi recromatografada (tabela 13), usando sílica gel e eluída com hexano, misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 13** - Cromatografia 5.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-5	Hx; Hx: AcOEt (95:5)	17	-
6-8	Hx: AcOEt (95:5)	9	-
9-11	“	0	-
12-15	Hx: AcOEt (95:5) ;(8:2)	0	-
19	Hx: AcOEt (9:1)	37	-
20	“	16	-
21-23	“	162	-

## Cromatografia 6

A fracção 17-26 (4,100g) da cromatografia 2 foi recromatografada (tabela 14), usando sílica gel e eluída com hexano, misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 14** - Cromatografia 6.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-10	Hx	1	-
11-17	Hx: AcOEt (95:5)	13	-
18-21	Hx: AcOEt (9:1)	15	-
22	“	123,6	<b>3</b>
23-24	“	220,2	<b>4</b>
25	“	308,8	mix
26-30	“	362	mix
31-33	“	275,4	mix
34-35	Hx: AcOEt (8:2)	53,5	mix
36-37	“	400,5	<b>5</b>
38-41	“	96,3	<b>5</b>
42-45	Hx: AcOEt (7:3)	46	<b>5</b>
42-63	Hx: AcOEt (1:1); AcOEt	59	-

## Cromatografia 7

A fracção 36-41 (79mg) da cromatografia 2 foi recromatografada (tabela 15), usando sílica gel e eluindo com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente, acetato de etilo, misturas de acetato de etilo/metanol de polaridade crescente e metanol.

**Tabela 15** - Cromatografia 7.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-2	Hx: AcOEt (9:1)	69	-
3-5	“	64	<b>5</b>
6-22	Hx: AcOEt (9:1; 3:7; 1:9)	6	-
23-25	Hx: AcOEt (1:9)	21	-
26-48	AcOEt; AcOEt:MeOH(95:5; 9:1; 1:1); MeOH	14	-

**Cromatografia 8**

A fracção 11-19 (114mg) da cromatografia 3 foi recromatografada (tabela 16), usando sílica gel e eluída com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente, acetato de etilo, misturas de acetato de etilo/metanol de polaridade crescente e metanol.

**Tabela 16** - Cromatografia 8.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-2	Hx: AcOEt (8:2)	8,9	-
3-4	“	14,9	-
5-6	“	14,1	-
7-11	Hx: AcOEt (8:2; 7:3)	29,5	mix
12-14	Hx: AcOEt (7:3)	15,2	mix
15-22	Hx: AcOEt (6:4)	5,8	-
23-51	Hx: AcOEt (1:1); AcOEt; AcOEt: MeOH (95:5; 9:1); MeOH	9,6	-

**Cromatografia 9**

A fracção 20-28 (109mg) da cromatografia 3 foi recromatografada (tabela 17), usando sílica gel e eluído com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade

crecente, acetato de etilo e misturas de acetato de etilo/metanol de polaridade crescente.

**Tabela 17** - Cromatografia 9.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1	Hx: AcOEt (7:3)	15	-
2-3	“	77	<b>5+</b> mix
4-6	“	27	mix
6-45	Hx: AcOEt (7:3; 6:4; 1:1); AcOEt; AcOEt: MeOH (95:5; 9:1)	29	-

### **Cromatografia 10**

A fracção 23-24 da cromatografia 6 (62mg) foi recromatografada (tabela 18), usando sílica gel e eluída com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 18** - Cromatografia 10.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-9	Hx: AcOEt (98:2)	11	-
10	Hx: AcOEt (95:5)	17,4	<b>4</b>
11	“	22,1	<b>4</b>
12-13	“	5,9	<b>4</b>
14-38	Hx: AcOEt (95:5; 9:1; 8:2) AcOEt	51,6	-

## Cromatografia 11

A fracção 22 da cromatografia 6 (123,6mg) foi recromatografada (tabela 19), usando sílica gel e eluída com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 19** - Cromatografia 11.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-2	Hx: AcOEt (95:5)	1	-
3	“	68,9	mix
4-7	“	36,0	-
8-36	Hx: AcOEt (95:5;9:1; 8:2); AcOEt	8,1	-

## Cromatografia 12

A fracção 23 da cromatografia 6 (220,3mg) foi recromatografada (tabela 20), usando sílica gel e eluída com hexano, misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 20** - Cromatografia 12.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-16	Hx; Hx: AcOEt (98:2)	5,7	-
17-18	Hx: AcOEt (95:5)	9,0	-
19-20	“	76,6	mix
21	“	28,2	mix
22	“	19,2	-
23-42	“	13,1	-
43-44	Hx: AcOEt (7:3); AcOEt	16,6	-
45-50	AcOEt	21,2	-

### Cromatografia 13

A fração 34-35 da cromatografia 6 (1,1473g) foi recromatografada (tabela 21), usando sílica gel e eluindo com hexano, misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 21** - Cromatografia 13.

Nº fração	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-16	Hx; Hx: AcOEt (95:5); (9:1)	44	-
17-18	Hx: AcOEt (9:1)	15	-
18-24	“	27	-
25-26	“	83	-
27	“	93	mix
28-29	“	201	mix
30-32	“	136	mix
33-35	“	78	-
36-39	“	73	-
40-41	“	28	-
42-46	Hx: AcOEt (8:2)	124	mix
47-48	“	71	-
49-51	“	51	-
52-54	Hx: AcOEt (7:3)	67	-
55-58	Hx: AcOEt (7:3; 1:1)	59	-
59-65	Hx: AcOEt (1:1); AcOEt	99	-

### Cromatografia 14

Com a fração 22 da cromatografia 6 (101,7 mg) foi recromatografado (tabela 22), usando sílica gel e eluída com hexano e misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente.

**Tabela 22** - Cromatografia 14.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-3	Hx	4,1	-
4-16	Hx; Hx: AcOEt (98:2)	2,6	-
17-24	Hx: AcOEt (98:2)	1,3	-
25-26	“	1,1	-
27-28	“	4,5	-
29-30	“	3,4	-
31-32	Hx: AcOEt (97:3)	3,9	-
33-38	“	29,1	mix
39-64	Hx: AcOEt (97:3; 95:5; 1:1)	85	mix

Devido à pequena quantidade de compostos puros que se obteve, fraccionou-se ainda, uma fracção de uma extracção anterior (Sebastião, 2007) que continha uma elevada quantidade de composto maioritário (5), para se sintetizarem outros compostos já detectados, de modo a aumentar a sua quantidade para se poderem efectuar ensaios biológicos com eles.

### **Cromatografia 15**

Uma fracção de uma extracção anterior (Sebastião, 2007; Sebastião, 2010) contendo uma elevada quantidade do composto maioritário do extracto de *Eragrostis viscosa* (3270 mg), foi cromatografada (tabela 23), usando sílica gel e eluída com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 23** - Cromatografia 15.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-10	Hx: AcOEt (95:5)	60	<b>3+mix</b>
11-12	Hx: AcOEt (9:1)	17	-
13-14	“	29,9	-
15-16	“	36,9	-
17	“	20,3	-
18	“	27,6	-
19-20	“	55,3	-
21-22	Hx: AcOEt (8:2)	8,6	<b>5</b>
23	“	86,7	<b>5</b>
24-33	“	895	<b>5</b>
34-35	“	22	<b>5</b>
36-41	“	175,1	<b>5</b>
42-45	“	24,9	<b>5+ mix</b>
46-49	Hx: AcOEt (7:3)	69,7	-
50-52	“	45,9	-
53-73	Hx: AcOEt (1:1); AcOEt	129,4	-

**Redução do composto maioritário (ácido) com LiAlH<sub>4</sub>**

Efectuou-se a redução de 180 mg do composto maioritário (ácido) com LiAlH<sub>4</sub> a um álcool de acordo com o procedimento descrito anteriormente, ponto 2.4.1. Obteve-se 99 mg de produto.

**Cromatografia 16**

O produto da reacção de redução com LiAlH<sub>4</sub> (130mg) foi cromatografado (tabela 24), usando sílica gel e eluído com misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente.

**Tabela 24** - Cromatografia 16.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1	HEX: AcOEt (9:1)	0,7	-
2	HEX: AcOEt (9:1)	1,1	-
3-4	HEX: AcOEt (9:1)	3,9	-
5-12	HEX: AcOEt (9:1; 8:2)	2,4	-
13-14	HEX: AcOEt (8:2)	46,4	<b>6</b>
15-16	HEX: AcOEt (8:2)	52,6	<b>6</b>
17	HEX: AcOEt (8:2)	4,5	-
18-31	HEX: AcOEt (8:2)	3	-

### Acetilação

Realizou-se a acetilação de uma fracção de 50 mg álcool sintetizado anteriormente, de acordo com o procedimento descrito no ponto 2.4.2. Obteve-se 39,5 mg de produto.

### Cromatografia 17

O produto da reacção de acetilação (39,5mg) foi cromatografado (tabela 25), usando sílica gel e eluído com hexano, misturas de hexano/acetato de etilo de polaridade crescente e acetato de etilo.

**Tabela 25** - Cromatografia 17.

Nº fracção	Eluente	Peso (mg)	Composição
1-13	Hx; Hx: AcOEt (95:5)	12,2	-
14	Hx: AcOEt (95:5)	9,7	<b>3</b>
15-16	“	9,3	<b>3</b>
17-40	HEX: AcOEt (95:5)	3,2	-
41-70	HEX: AcOEt (95:5)	4,5	-

### 3.5. Caracterização dos compostos isolados

#### 3- 16-acetoxi-8,15-epoxilabdano

Este composto foi obtido na fracção 22 da cromatografia 6 e nas fracções 14-16 da cromatografia 17, sob a forma de um óleo incolor, com uma actividade óptica de  $[\alpha]_D^{18} = +15,0^\circ$  ( $c$  0,225,  $\text{CHCl}_3$ ) e que apresenta a seguinte fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_3$  obtida a partir do espectro de massa de alta resolução (Figura 29) HR-micOTOF-MS pelo ião quase molecular  $m/z$  373.27132  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{NaO}_3$  373,27).

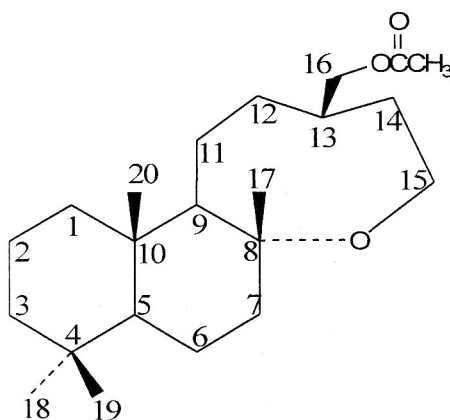
No seu espectro de IV (Figura 28) destacam-se as seguintes absorções características: ligações  $\text{C}=\text{O}$  em ésteres ( $1741\text{ cm}^{-1}$ ), ligação  $\text{C}-\text{H}$  no grupo  $\text{CH}_3$  ( $1463$ ,  $1383\text{ cm}^{-1}$ ), sistema  $\text{C}-(\text{CO})-\text{O}$  em acetatos ( $1241\text{ cm}^{-1}$ ), sistema  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$  ( $1078\text{ cm}^{-1}$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 30) apresenta sinais de quatro metilos singuleto a  $\delta$  1,14, 0,86, 0,80 e 0,78 ppm e um metilo singuleto a 2,03 ppm característico de um metilo de um grupo acetato. Verifica-se ainda a presença na molécula de dois metilenos bastante desblindados, um a  $\delta$  3,61, dt (13,2 e 3,6) e 3,69, dt (13,2 e 2,0) e outro a  $\delta$  3,77, dt (10,8 e 7,6) e 3,88, dt (10,8 e 5,6) característicos de metilenos ligados a oxigénio.

O seu espectro de carbono (Figura 31) apresenta sinais de 22 átomos de carbono que pela técnica DEPT se pode atribuir a cinco metilos (um de um acetato), dez metilenos (dois ligados a oxigénio), três metinos e quatro carbonos quaternários (um de um acetato). Os desvios químicos dos quatro metilos ( $\delta$  33,5, 23,9, 21,6 e 15,5 ppm), dos dois metilenos ( $\delta$  70,1 e 60,4 ppm) e os três metinos ( $\delta$  56,4, 52,8 e 36,7 ppm) são característicos de um esqueleto 8,15-epoxilabdano (Tabela 26) (Sebastião et al, 2010). Assim podemos afirmar, tendo em conta a presença de um grupo acetato na molécula que o composto isolado é o 16-acetoxi-8,15-epoxilabdano obtido por acetilação do composto 6. (Ilustração 24).

**Tabela 26** – Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT do composto **3** em  $\text{CDCl}_3$ .

Nº	$\delta\text{ C}$	DEPT	$\delta\text{ H}$
1	40,7	$\text{CH}_2$	
2	18,8	$\text{CH}_2$	
3	41,9	$\text{CH}_2$	
4	33,3	qC	
5	56,4	CH	
6	20,2	$\text{CH}_2$	
7	38,1	$\text{CH}_2$	
8	78,5	qC	
9	52,8	CH	
10	38,5	qC	
11	22,8	$\text{CH}_2$	
12	29,9	$\text{CH}_2$	
13	36,7	CH	
14	33,5	$\text{CH}_2$	
15	60,4	$\text{CH}_2$	3,61;dt (13,2; 3,6) e 3,69;td (13,2; 2,0)
16	70,1	$\text{CH}_2$	3,77;dd (10,8; 7,6) e 3,69;dd (10,8; 5,6)
17	23,9	$\text{CH}_3$	1,14; s
18	33,5	$\text{CH}_3$	0,86; s
19	21,6	$\text{CH}_3$	0,78; s
20	15,5	$\text{CH}_3$	0,80; s
21	171,2	qC	-
22	21,0	$\text{CH}_3$	2,03; s



**Ilustração 24** - Estrutura química do 16-acetoxi-8,15-epoxilabdano.

#### 4- 8,15-epoxi-16-norlabdan-13-ona

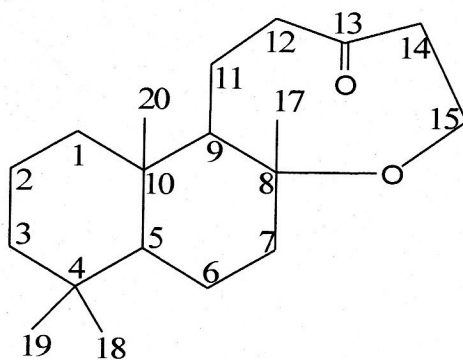
Este composto foi isolado nas fracções 10-13 da cromatografia 10, como um sólido amorfo branco.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 32) apresenta sinais de quatro metilos singuleto a  $\delta$  1,17, 0,84, 0,82 e 0,77 ppm e um metileno a  $\delta$  3,74 ppm característico de um metileno ligado a um átomo de oxigénio. Verifica-se ainda a presença na molécula de dois metilenos bastante desblindados, um a  $\delta$  2,28 e 2,81 ppm e outro a  $\delta$  2,23 e 2,88 ppm que indicam a presença na molécula de um grupo funcional desblindante ao qual estes metilenos são adjacentes.

O seu espectro de carbono (Figura 33) apresenta sinais de 19 átomos de carbono que pela técnica DEPT podemos atribuir a quatro metilos (um sendo geminal a uma função oxigenada), nove metilenos (um deles ligado a um oxigénio), dois metinos e quatro carbonos quaternários (um de um carbonilo de uma cetona). Os desvios químicos dos quatro metilos ( $\delta$  33,4, 23,4, 21,5 e 15,5 ppm), e os dois metinos ( $\delta$  55,8 e 52,7 ppm) são característicos de um esqueleto 8,15-epoxilabdano (Tabela 27) (Sebastião et al, 2010). A presença de um carbono quaternário a 215,5 ppm leva a concluir que o composto isolado é a 8,15-epoxi-16-norlabdan-13-ona (Ilustração 25).

**Tabela 27** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT do composto **4** em  $\text{CDCl}_3$ .

Nº	$\delta\text{ C}$	DEPT	$\delta\text{ H}$
1	40,3	$\text{CH}_2$	
2	18,5	$\text{CH}_2$	
3	41,6	$\text{CH}_2$	
4	33,2	qC	
5	55,8	CH	
6	20,1	$\text{CH}_2$	
7	37,3	$\text{CH}_2$	
8	79,0	qC	
9	52,7	CH	
10	38,8	qC	
11	19,8	$\text{CH}_2$	
12	43,8	$\text{CH}_2$	2,28; 2,81; m cd
13	215,5	qC	
14	46,9	$\text{CH}_2$	2,23; 2,88; m cd
15	57,6	$\text{CH}_2$	3,74; m
16	-	-	-
17	23,4	$\text{CH}_3$	1,17; s
18	33,4	$\text{CH}_3$	0,84; s
19	21,5	$\text{CH}_3$	0,77; s
20	15,5	$\text{CH}_3$	0,82; s



**Ilustração 25** - Estrutura química da 8,15-epoxi-16-norlabdan-13-ona.

## 5- ácido 8,15- epoxilabdan-16-óico

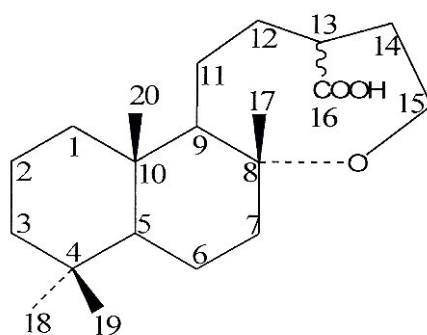
Este composto foi eluído nas fracções 25-31 da cromatografia 4; 36-45 da cromatografia 6; 3-5 da cromatografia 7 e 21-41 da cromatografia 15, e apresenta-se como um óleo incolor.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 34) apresenta sinais de quatro metilos singuletos a  $\delta$  1,15; 0,86; 0,82 e 0,78 ppm e um metileno  $\delta$  a 3,68 ppm característico de um  $\text{CH}_2$  geminal a um átomo de oxigénio.

O seu espectro de carbono (Figura 35) apresenta sinais de 20 átomos de carbono que, pela técnica de DEPT, podemos atribuir a quatro metilos (um sendo geminal a uma função oxigenada), nove metilenos (um deles ligado a um oxigénio), três metinos e quatro carbonos quaternários (um de um grupo carboxilo). Os desvios químicos dos quatro metilos ( $\delta$  33,4; 23,4; 21,5 e 15,5 ppm), o metileno a  $\delta$  59,9 ppm e os três metinos ( $\delta$  56,3; 50,0 e 43,0 ppm) são característicos de um esqueleto 8,15-epoxylabdano (Sebastião e tal, 2010) (Tabela 28). A presença na molécula de um carbono quaternário de um grupo carboxilo confirma que o composto isolado é o ácido 8,15-epoxilabdan-16-óico (Ilustração 26).

**Tabela 28** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT do composto **5** em  $\text{CDCl}_3$ .

Nº	$\delta\text{ C}$	DEPT	$\delta\text{ H}$
1	40,5	$\text{CH}_2$	
2	18,6	$\text{CH}_2$	
3	41,7	$\text{CH}_2$	
4	33,2	qC	
5	56,3	CH	
6	20,1	$\text{CH}_2$	
7	38,0	$\text{CH}_2$	
8	78,7	qC	
9	50,0	CH	
10	38,4	qC	
11	22,7	$\text{CH}_2$	
12	28,9	$\text{CH}_2$	
13	43,0	CH	
14	33,0	$\text{CH}_2$	
15	59,9	$\text{CH}_2$	3,68; m
16	182,7	qC	
17	23,4	$\text{CH}_3$	1,15; s
18	33,4	$\text{CH}_3$	0,86; s
19	21,5	$\text{CH}_3$	0,78; s
20	15,5	$\text{CH}_3$	0,82; s



**Ilustração 26** - Estrutura química do ácido 8,15- epoxilabdan-16-óico.

### 6- 8,15-epoxilabdan-16-ol

Este composto foi obtido nas fracções 13-16 da cromatografia 16, é um óleo incolor com uma actividade óptica de  $[\alpha]_D^{18} = +17,8^\circ$  ( $c$  0,391,  $\text{CHCl}_3$ ) de fórmula molecular  $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_3$  obtida a partir do espectro de massa de alta resolução (Figura 37) HR-micOTOF-MS pelo ião quase molecular  $m/z$  331.26075  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  (calculado para  $\text{C}_{20}\text{H}_{36}\text{NaO}_2$  331,26).

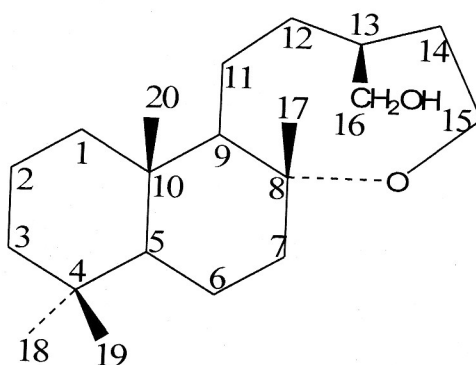
No seu espectro de IV (Figura 36) destacam-se as absorções características da ligação O-H em álcoois a ( $3422\text{ cm}^{-1}$ ), da ligação C-H no grupo  $\text{CH}_3$  a ( $1461, 1388\text{ cm}^{-1}$ ), do sistema C-O-C a ( $1078\text{ cm}^{-1}$ ), da ligação C-O nos álcoois a ( $1026\text{ cm}^{-1}$ ) e do grupo  $\text{CH}_2$  a ( $757\text{ cm}^{-1}$ ).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 38) apresenta sinais de quatro metilos singuletos a  $\delta$  1,15; 0,87; 0,83 e 0,79 ppm e dois metilenos a  $\delta$  3,68 e 3,38 ppm à presença de uma função oxigenada na molécula.

O seu espectro de carbono (Figura 39) apresenta sinais de 20 átomos de carbono que, pela técnica de DEPT, podemos atribuir a quatro metilos (um sendo geminal a oxigénio), dez metilenos (um ligado a um grupo hidroxilo e outro ligado a outra função oxigenada), três metinos e três átomos carbono quaternários (um ligado a oxigénio). Os desvios químicos dos quatro metilos ( $\delta$  33,5; 23,7; 21,5 e 15,5 ppm), dos dois metilenos ( $\delta$  69,2 e 60,7 ppm) e os três metinos ( $\delta$  56,4; 49,6 e 40,2 ppm) são característicos que um esqueleto 8,15-epoxylabdano (Tabela 29). A presença de um segundo metileno geminal a oxigénio e de um novo metino a  $\delta$  40,2 ppm apontam para a presença de um novo hidroxilo na molécula o qual se encontra ligado ao metileno. A presença deste novo metoxílo leva a concluir que o composto isolado é o 8,15-epoxilabdan-16-ol, obtido por redução do composto 5 (Ilustração 27).

**Tabela 29** - Dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT do composto **5** em  $\text{CDCl}_3$

Nº	$\delta\text{ C}$	DEPT	$\delta\text{ H}$
1	40,6	$\text{CH}_2$	
2	18,7	$\text{CH}_2$	
3	41,9	$\text{CH}_2$	
4	33,3	qC	
5	56,4	CH	
6	20,1	$\text{CH}_2$	
7	38,1	$\text{CH}_2$	
8	78,5	qC	
9	49,6	CH	
10	38,4	qC	
11	22,8	$\text{CH}_2$	
12	28,9	$\text{CH}_2$	
13	40,2	CH	
14	33,9	$\text{CH}_2$	
15	60,7	$\text{CH}_2$	3,68; m
16	69,2	$\text{CH}_2$	3,38; m
17	23,7	$\text{CH}_3$	1,15; s
18	33,5	$\text{CH}_3$	0,87; s
19	21,5	$\text{CH}_3$	0,79; s
20	15,5	$\text{CH}_3$	0,83; s



**Ilustração 27** - Estrutura química do 8,15-epoxilabdan-16-ol.

### **3.6. Genotoxicidade dos compostos puros**

Os compostos estudados quanto à sua genotoxicidade foram o **3**, **4** e **6** cada um com duas concentrações diferentes.

A indução de micronúcleos foi realizada na linha celular V79 de forma a testar as doses de compostos puros nas induções de MN na ausência e presença de S9 mix.

O controlo positivo das experiências na ausência de activação realizou-se com 2,5 µg/mL de MMC. Na presença de S9 mix utilizou-se 2 µg/mL de CP. Ambos os genotóxicos induziram frequências significativas de MN. O controlo negativo na ausência de S9 mix realizou-se com DMSO com um volume máximo de 10 µL/frasco, ou com DMSO + S9 mix. Como este solvente orgânico é tóxico para as células, a sua concentração nas nossas culturas não ultrapassou 0,2%.

**Tabela 30** - Indicadores de proliferação celular em células V79 após incubação com o químico sem activação metabólica.

composto	[ ] ( $\mu\text{g/mL}$ )	MonoN %	%BN	TriN %	PoliN %	CBPI	NDI
<b>3</b>	10	65,050 $\pm$ 2,051	34,600 $\pm$ 1,980	0,100 $\pm$ 0,000	0,250 $\pm$ 0,071	1,353 $\pm$ 0,021	1,356 $\pm$ 0,022
	25	62,150 $\pm$ 2,616	37,700 $\pm$ 2,687	0,000 $\pm$ 0,000	0,150 $\pm$ 0,071	1,380 $\pm$ 0,025	1,382 $\pm$ 0,025
<b>4</b>	10	60,650 $\pm$ 16,617	39,250 $\pm$ 16,617	0,100 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	1,395 $\pm$ 0,166	1,395 $\pm$ 0,166
	50	53,950 $\pm$ 9,405	45,900 $\pm$ 9,617	0,050 $\pm$ 0,071	0,100 $\pm$ 0,141	1,462 $\pm$ 0,092	1,463 $\pm$ 0,091
<b>6</b>	10	64,450 $\pm$ 1,485	35,400 $\pm$ 1,414	0,100 $\pm$ 0,000	0,050 $\pm$ 0,071	1,357 $\pm$ 0,016	1,358 $\pm$ 0,016
	25	62,200 $\pm$ 7,637	37,600 $\pm$ 7,495	0,100 $\pm$ 0,141	0,100 $\pm$ 0,000	1,380 $\pm$ 0,078	1,381 $\pm$ 0,078
Branco	-	58,650 $\pm$ 14,496	40,95 $\pm$ 14,213	0,100 $\pm$ 0,141	0,300 $\pm$ 0,141	1,418 $\pm$ 0,148	1,421 $\pm$ 0,149
MMC	2,5	74,850 $\pm$ 4,172	25,000 $\pm$ 4,243	0,150 $\pm$ 0,071	0,000 $\pm$ 0,000	1,253 $\pm$ 0,041	1,253 $\pm$ 0,041

MonoN, célula mononucleada; BN, célula binucleada; TriN, célula trinucleada; PoliN, célula polinucleada; CBPI, índice de proliferação de células com a citocinese bloqueada; NDI, índice de divisão nuclear.

**Tabela 31** - Indicadores de proliferação celular em células V79 após incubação com o químico com activação metabólica.

composto	[ ] ( $\mu\text{g/mL}$ )	MonoN %	%BN	TriN %	PoliN %	CBPI	NDI
<b>3</b>	10	49,950 $\pm$ 5,586	49,950 $\pm$ 5,586	0,100 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	1,502 $\pm$ 0,056	1,502 $\pm$ 0,056
	25	50,700 $\pm$ 15,415	48,950 $\pm$ 15,344	0,250 $\pm$ 0,071	0,100 $\pm$ 0,141	1,497 $\pm$ 0,155	1,498 $\pm$ 0,156
<b>4</b>	10	64,000 $\pm$ 4,384	35,900 $\pm$ 4,243	0,050 $\pm$ 0,071	0,050 $\pm$ 0,071	1,361 $\pm$ 0,045	1,362 $\pm$ 0,046
	50	59,500 $\pm$ 7,778	40,350 $\pm$ 7,707	0,100 $\pm$ 0,000	0,050 $\pm$ 0,071	1,406 $\pm$ 0,078	1,407 $\pm$ 0,079
<b>6</b>	10	62,400 $\pm$ 2,546	37,600 $\pm$ 2,546	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	1,376 $\pm$ 0,025	1,376 $\pm$ 0,025
	25	66,200 $\pm$ 1,556	33,750 $\pm$ 1,626	0,000 $\pm$ 0,000	0,050 $\pm$ 0,071	1,338 $\pm$ 0,015	1,339 $\pm$ 0,014
Branco	-	62,400 $\pm$ 2,263	37,400 $\pm$ 2,263	0,150 $\pm$ 0,071	0,050 $\pm$ 0,071	1,378 $\pm$ 0,023	1,379 $\pm$ 0,022
CP	2	61,200 $\pm$ 0,283	38,600 $\pm$ 0,141	0,200 $\pm$ 0,141	0,000 $\pm$ 0,000	1,390 $\pm$ 0,004	1,390 $\pm$ 0,004

MonoN, célula mononucleada; BN, célula binucleada; TriN, célula trinucleada; PoliN, célula polinucleada; CBPI, índice de proliferação de células com a citocinese bloqueada; NDI, índice de divisão nuclear.

**Tabela 32** - Ensaio do micronúcleo em células V79. Distribuição das células binucleadas de acordo com o número de micronúcleos (MN) presentes, número de micronúcleos por célula binucleada (MN/BN) e frequência de células micronucleadas (%MNBN) sem activação metabólica.

composto	[ ] ( $\mu\text{g/mL}$ )	BN analisadas	Distribuição de acordo com o nº de MN				MN/BN	%MNBN
			0	1	2	3+		
<b>3</b>	10	1000	995,500 $\pm$ 0,707	4,500 $\pm$ 0,707	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,005 $\pm$ 0,001	0,450 $\pm$ 0,071
	25	1000	996,000 $\pm$ 0,000	4,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,004 $\pm$ 0,000	0,400 $\pm$ 0,000
<b>4</b>	10	1000	995,333 $\pm$ 1,155	4,333 $\pm$ 0,577	0,000 $\pm$ 0,000	0,333 $\pm$ 0,577	0,005 $\pm$ 0,002	0,467 $\pm$ 0,115
	50	1000	997,500 $\pm$ 0,707	4,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,500 $\pm$ 0,707	0,006 $\pm$ 0,002	0,450 $\pm$ 0,071
<b>6</b>	10	1000	997,500 $\pm$ 0,707	2,500 $\pm$ 0,707	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,003 $\pm$ 0,001	0,250 $\pm$ 0,071
	25	1000	997,000 $\pm$ 0,000	3,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,003 $\pm$ 0,000	0,300 $\pm$ 0,000
Branco	-	1000	997,000 $\pm$ 0,707	3,000 $\pm$ 0,707	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,003 $\pm$ 0,001	0,300 $\pm$ 0,071
MMC	2,5	1000	895,250 $\pm$ 17,896	70,250 $\pm$ 15,945	19,750 $\pm$ 1,708	14,750 $\pm$ 2,630	0,154 $\pm$ 0,022	10,475 $\pm$ 1,790

**Tabela 33** - Ensaio do micronúcleo em células V79. Distribuição das células binucleadas de acordo com o número de micronúcleos (MN) presentes, número de micronúcleos por célula binucleada (MN/BN) e frequência de células micronucleadas (%MNBN) com activação metabólica.

composto	[ ] (µg/mL)	BN analizadas	Distribuição de acordo com o nº de MN				MN/BN	%MNBN
			0	1	2	3+		
<b>3</b>	10	1000	100,00±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000
	25	1000	997,000±0,000	3,000±0,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,003±0,000	0,003±0,000
<b>4</b>	10	1000	999,000±1,414	1,000±1,414	0,000±0,000	0,000±0,000	0,001±0,001	0,100±0,141
	50	1000	998,667±1,155	1,667±0,577	0,000±0,000	0,000±0,000	0,002±0,001	0,133±0,115
<b>6</b>	10	1000	998,333±1,528	1,667±1,528	0,000±0,000	0,000±0,000	0,002±0,002	0,167±0,153
	25	1000	999,000±0,000	1,000±1,000	0,000±0,000	0,000±0,000	0,001±0,001	0,100±0,100
Branco	-	1000	998,333±0,577	1,677±0,577	0,000±0,000	0,000±0,000	0,002±0,001	0,167±0,058
CP	2	1000	979,000±2,646	18,333±3,055	2,333±0,577	4,333±6,658	0,036±0,022	2,100±0,265

Os índices de proliferação celular indicados nas tabelas 30 e 31, na ausência e presença de activação metabólica, respectivamente mostraram que a adição do químico não afectou a proliferação das células com a citocinese bloqueada. Apenas no controlo positivo na ausência de activação metabólica (MMC) se registou uma pequena diminuição no índice, o que realça o seu poder citotóxico. A CP, tal como os químicos não registou variações do índice CBPI.

No índice NDI (e divisão nuclear), tal como no CBPI, o único composto que apresentou uma diminuição da proliferação celular foi o controlo positivo MMC.

A percentagem de células que apenas se dividiram uma vez (%BN), muito associado ao ensaio do micronúcleo, não registou alteração em relação ao controlo negativo (DMSO). Tal como os índices anteriormente mencionados o único químico que registou uma diminuição acentuada foi a MMC (redução de 37,5% em relação ao DMSO).

A frequência de células binucleadas contendo micronúcleos espontâneos em células V79 foi de  $0,167 \pm 0,058$  e  $0,300 \pm 0,071$  sem e com activação metabólica respectivamente. Segundo Kalweit *et al.*, a formação de MN espontânea em células V79, segundo o método da citocinese bloqueada, é de  $1,50 \pm 0,55$ , muito superiores àqueles registados neste trabalho. A frequência de micronúcleos, nos controlos positivos teve um aumento muito elevado, sobretudo com a MMC, na ausência de activação metabólica (Kalweit *et al.*, 1998).

As células que foram incubadas com os químicos, apresentaram uma frequência de micronúcleos sem alterações significativas em relação ao branco, tanto na presença de S9 mix como na sua ausência.

Quanto ao índice do número de micronúcleos por célula binucleada também não se observaram grande alteração entre as células tratadas com o químico e o branco, tanto nos ensaios com S9 mix (tabela 33) como na sua ausência (tabela 32). A MMC e a CP registaram uma média de micronúcleos por célula binucleada bastante elevada, sobretudo no ensaio sem activação metabólica (MMC).

---

## Capítulo IV - Conclusões e perspectivas futuras

## 4.1. Conclusões gerais

Existe actualmente um elevado interesse na descoberta de novos compostos com actividade antimicrobiana que podem ser extremamente necessários no tratamento de infecções por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais, ou por outro lado na industria alimentar na protecção dos alimentos contra a deterioração provocada por diversos microrganismos, a fim de evitar o número crescente de intoxicações alimentares.

Os novos compostos bioactivos podem ser obtidos a partir de um grande número de produtos naturais, nomeadamente plantas e minerais. As plantas foram usadas ao longo dos tempos pelas populações sob a forma de infusões, decocção, cataplasmas e outras preparações para o tratamento de várias patologias. Têm surgido vários estudos científicos que pretendem determinar quais os compostos presentes nas plantas responsáveis pela actividade antimicrobiana. Além disso, diversas formas de extracção, assim como os diferentes solventes, são estudados no sentido de determinar quais as condições ideais de extracção dos compostos biologicamente activos.

A investigação da actividade antimicrobiana dos extractos da parte aérea da *Eragrostis viscosa* demonstrou que nenhum dos extractos apresenta actividade antifúngica frente às estirpes estudadas. Quanto à actividade antibacteriana, os extractos brutos apresentaram melhor actividade contra as estirpes gram-positivas de referência. O estudo revelou ainda que os compostos responsáveis pela actividade se concentravam principalmente nas fracções menos polares da planta, ou seja, nas fracções de hexano.

Foi possível determinar a MIC e a MLC dos extractos brutos de hexano e diclorometano para o *B. cereus*. Para a estirpe *S. aureus* foi possível determinar a MIC, já a MLC, não foi determinada, na concentração mais alta estudada, não se observou uma inibição total do crescimento, no entanto as colónias eram poucas e muito pequenas, o que impossibilitou a sua contagem.

Para estas estirpes realizaram-se curvas de morte com concentrações múltiplas da MIC. Ambos os extractos apresentaram uma actividade bacteriostática frente às duas estirpes.

O extracto de hexano 1 foi fraccionado, já que para além de registar bioactividade, também foi o que apresentou maior actividade antibacteriana frente às estirpes estudadas. O fraccionamento do extracto de hexano teve a finalidade de isolar e identificar compostos nas fracções responsáveis pela actividade, utilizando diferentes técnicas cromatográficas e comparado com os compostos isolados anteriormente por Sebastião (2007).

O fraccionamento foi acompanhado de estudos de bioactividade e ensaios de determinação da actividade antibacteriana, com vista a isolar sempre as fracções responsáveis por actividade, acompanhando com diferentes técnicas cromatográficas e comparado com os valores obtidos anteriormente por Sebastião (2007).

Foram isolados 4 compostos: o ácido 8,15-epoxilabdan-16-óico (**5**); 16-acetoxi-8,15-epoxilabdano (**3**); 8,15-epoxi-16-norlabdan-13-ona (**4**) e 8,15-epoxilabdan-16-ol (**6**). O composto 5 é o composto maioritário do extracto.

O ácido 8,15-epoxilabdan-16-óico, composto maioritário do extracto de hexano 1, isolado em grandes quantidades da fracção 4 parece promover um descontrolo do ciclo celular, o que está de acordo com as experiências realizadas anteriormente, que demonstraram alguma toxicidade referente a este composto. (Sebastião, 2007)

No teste do MTT, o extracto de hexano 1, que foi fraccionado parece conter alguns compostos que promovem a viabilidade celular para as concentrações mais elevadas. Já a fracção 4 parece responder ao comportamento do composto maioritário (**5**), que é responsável pela toxicidade metabólica e genotóxica determinada.

Os compostos isolados **3**, **4** e **6** foram testados quanto à sua genotoxicidade, em células V79, através do teste do micronúcleo com a citocinese bloqueada na presença e ausência de activação metabólica. Em ambas as situações nenhum dos compostos registou qualquer actividade genotóxica nas concentrações estudadas.

## 4.2. Perspectivas Futuras

Para completar o estudo da actividade biológica da *Eragrostis viscosa* é necessário efectuar os testes de citotoxicidade e antimicrobianos para cada um dos compostos isolados dos extractos, para conhecer as propriedades de cada composto, já que as actividades registadas podem ser apenas um composto, ou pode ocorrer sinergismo ou antagonismo entre os diferentes compostos da mesma fracção.

Preparar extractos com outros solventes, ou efectuar outros modos de extracção, de modo a facilitar a solubilização dos extractos/ compostos e aumentar a actividade dos mesmos.

Para evitar perdas de rendimento e o longo processo de extracção, tentar sintetizar os compostos a partir do ácido isolado (composto maioritário).

Estudar o modo como os compostos puros inibem o crescimento bacteriano.

Efectuar mais estudos para perceber qual o comportamento das diferentes linhas celulares (animais, humanas saudáveis e não saudáveis) perante a sua exposição aos compostos isolados da planta.

---

## Capítulo V - Bibliografía

Bonev B., Hooper J., Parisot J., (2008) – “Principles of assessing bacterial susceptibility to antibiotics using the agar diffusion method” *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 61, 1295–1301

Butler M., Buss A., (2006), -“Natural products — The future scaffolds for novel antibiotics?”, *biochemical pharmacology* 71, 919– 929;

Caria M., (1997), - “ Estudo da sensibilidade a agentes genotóxicos na trissomia do cromossoma 21”, Lisboa;

Coura G., (2004), Protocolo Preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA; Dissertação de Mestrado, UFSC, Florianópolis;

Cunha, A., Roque, O. (2008) – “Plantas Medicinais da Farmacopeia Portuguesa”, 1ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa;

Cunha, A., Teixeira, F., Silva, A., Roque, O. (2007) – “Plantas na Terapêutica - Farmacologia e Ensaio Clínicos”, 1ª Edição, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa;

Demetzos C., Dimas K., (2001)- “Labdane- type Diterpenes: chemistry and biological activity”, *Studies in Natural Products Chemistry* 25, Part 6, 235-292;

Eastmond D., Tucker J., (1989), - “Identification of aneuploidy – including agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochores antibody”, *Environ. Mol. Mutagen.*, 13, 34-43;

Fenech M., (2000), - “The in vitro micronucleus technique” *Mutation Research* 455, 81–95;

Ferreira, W., Sousa, J. (1998) – “Microbiologia – Volume 1”, 1ª Edição, Lidel, Lisboa;

Ferreira, W., Sousa, J. (2000) – “Microbiologia – Volume 2”, 1ª Edição, Lidel, Lisboa;

Finberg R., Moellering R., Tally F., Craig W., Pankey G., Dellinger E., West M., Joshi M., Linden P., Rolston K., Rotschafer J., and Rybak J., (2004), - “The Importance of Bactericidal Drugs: Future Directions in Infectious Disease”, *Clinical Infectious Diseases* 2004; 39:1314–20;

Guillemot D., (1999), -“ Antibiotic use in humans and bacterial resistance”, *Current Opinion in Microbiology* 2:494–498;

Iwu M., Duncan A., Okunji C. (1999) –“ New Antimicrobials of Plant Origin Perspectives on new crops and new uses”, *ASHS, Perspectives on New Crops and New Uses*, 457-462;

Kalweit S., Utesch D., Hude W., Madle S., (1998), - “Chemically induced micronucleus formation in V79 cells—comparison of three different test approaches”, *Mutation Research* 439,183–190;

Lorian V., (2005) – “antibiotics in Laboratory Medicine”, 5<sup>th</sup> Edition, Lippincott Williams & Wilkins , Philadelphia, USA;

MacKenzie F., Lopez-Lozano J., Monnet D., Stuart D., Beyaert A., Wilson R., Gould I., (2007), - “Temporal relationship between prevalence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in one hospital and prevalence of MRSA in the surrounding community: a time-series analysis”, *Journal of Hospital Infection*, 67; 225-231;

Maillard J., (2002), - “Bacterial target sites for biocide action”, *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92: 16-27;

Marconatto V., (2006) – “Controle de qualidade e caracterização química dos principais metabolitos de *Cunila microcephala* Benth (Poejinho)”, Monografia, URI;

Nishiya, K., Kimura, T., Takeya, K., Itokawa, H., Lee, S.R., 1991. Diterpenoids from *Eragrostis ferruginea*. *Phytochemistry* 30, 2410–2411.

Norma NCCLS M2 – A8,- “Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Discodifusão: Norma NCCLS M2 – A8, Norma Aprovada – Oitava Edição”, Volume 23, Nº1;

Norma NCCLS M45 - P,- “Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline Norma NCCLS M45 – P”, Volume 25, Nº26;

Norma NCCLS M100 –S15,- “ Normas de Desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: Norma NCCLS M100 – S15, Norma Aprovada – 15º Suplemento Informativo”, Volume 25, Nº1;

Oliveira N., (2003), - “Toxicologia da radiação ionizante. Reacção de Captura de neutrões pelo boro como modelo para o estudo de lesão do DNA por partículas  $\alpha$ ”;

Overbye K., Barrett J., (2005), - “Antibiotics: where did we go wrong?”, DDT, Volume 10, Number 1, 45-52;

Pankey G., Sabath L., (2003), - “Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of action in the Treatment of gram-Positive bacterial infections”, CID 2004; 38:864-70;

Prescott, Harley, Klein, (2005), - “Microbiology”, 6ª Edição, McGraw-Hill Higher Education;

Schwalbe R., Steele-Moore L., Goodwin A., (2007) - “Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols”; Taylor & Francis Group, USA;

Torssell K., (1997) – “Natural Product Chemistry- a mechanism, biosynthetic and ecological approach”, 2<sup>nd</sup> Edition, Swedish Pharmaceutical Press;

Sebastião N., (2007) – “Avaliação química da *Eragrostis viscosa*” tese de doutoramento, UBI

Sebastião N., Cordeiro I., Santos A., Gaspar J., Martins C., Rueff J., Diakanamwa C., Sant’Ana A., Mendonça D.( 2010),, “8,15-Epoxyabdane and norlabdane diterpenoids from *Eragrostis viscosa*” Phytochemistry Volume 71, Issue 7, May 2010 Pages 798-803

Shan B., Cai Y., Brooks J., Corke H., (2007), - “Antibacterial properties of Polygonum cuspidatum roots and their major bioactive constituents” Food Chemistry 109, 530–537;

Surrallés J., Natarajan A., (1997), - “Human lymphocytes micronucleus assay in Europe: An international survey”, Mutat. Res., 392, 165-74;

Takadhima A., (1998), - “Current Protocols in Cell Biology”, Jonh Wiley & Sons; 2.1.1-2.1.12;

Tereso S., (1995) – “Estudo de micronúcleos induzidos in vitro em linfócitos de dadores com trissoma 21 e de seus progenitores”, tese de doutoramento UNL;

WHO, (2003) – “traditional medicine”, Fact sheet N°134;

WHO (2010) – Laboratory Protocol: “Susceptibility testing of Enterobacteriaceae using disk diffusion”, Technical University of Denmark, Copenhagen;

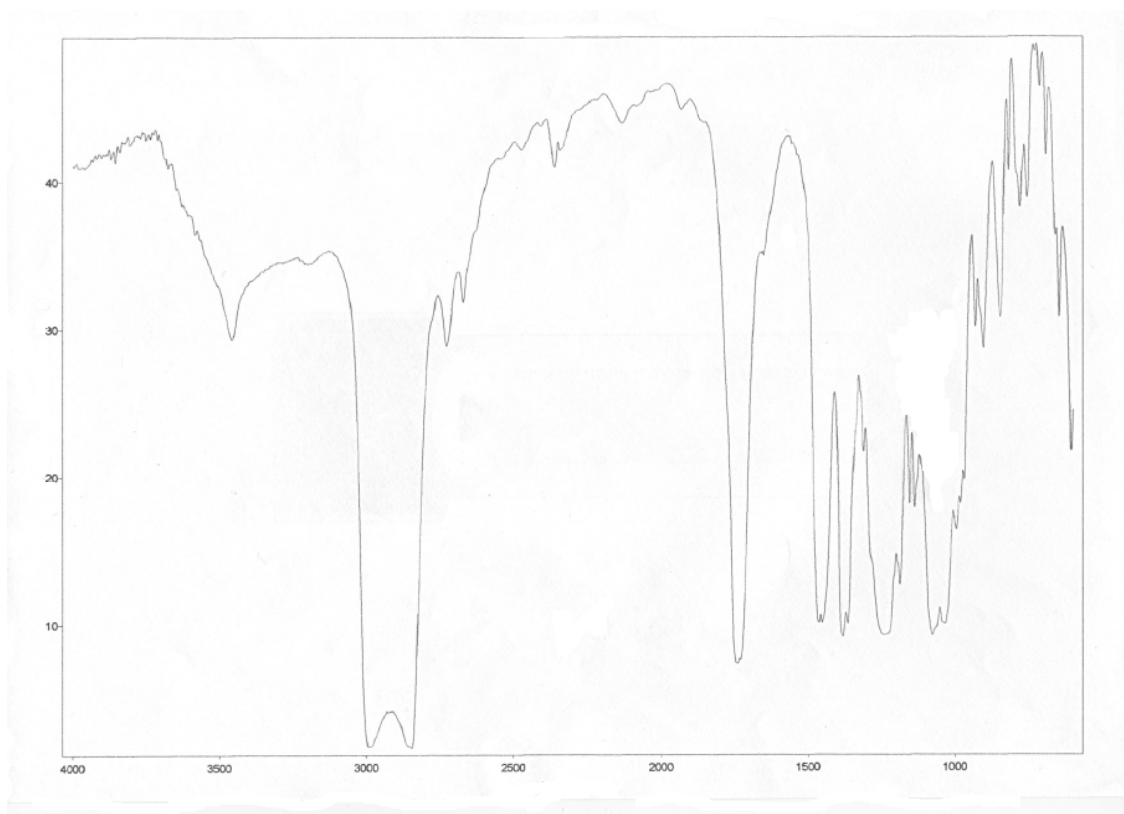
<http://plants.jstor.org/specimen/img/k000643367> (visualizada 25/06/2010);

<http://plants.jstor.org/taxon/Eragrostis.viscosa?cookieSet=1> (visualizada 25/06/2010);

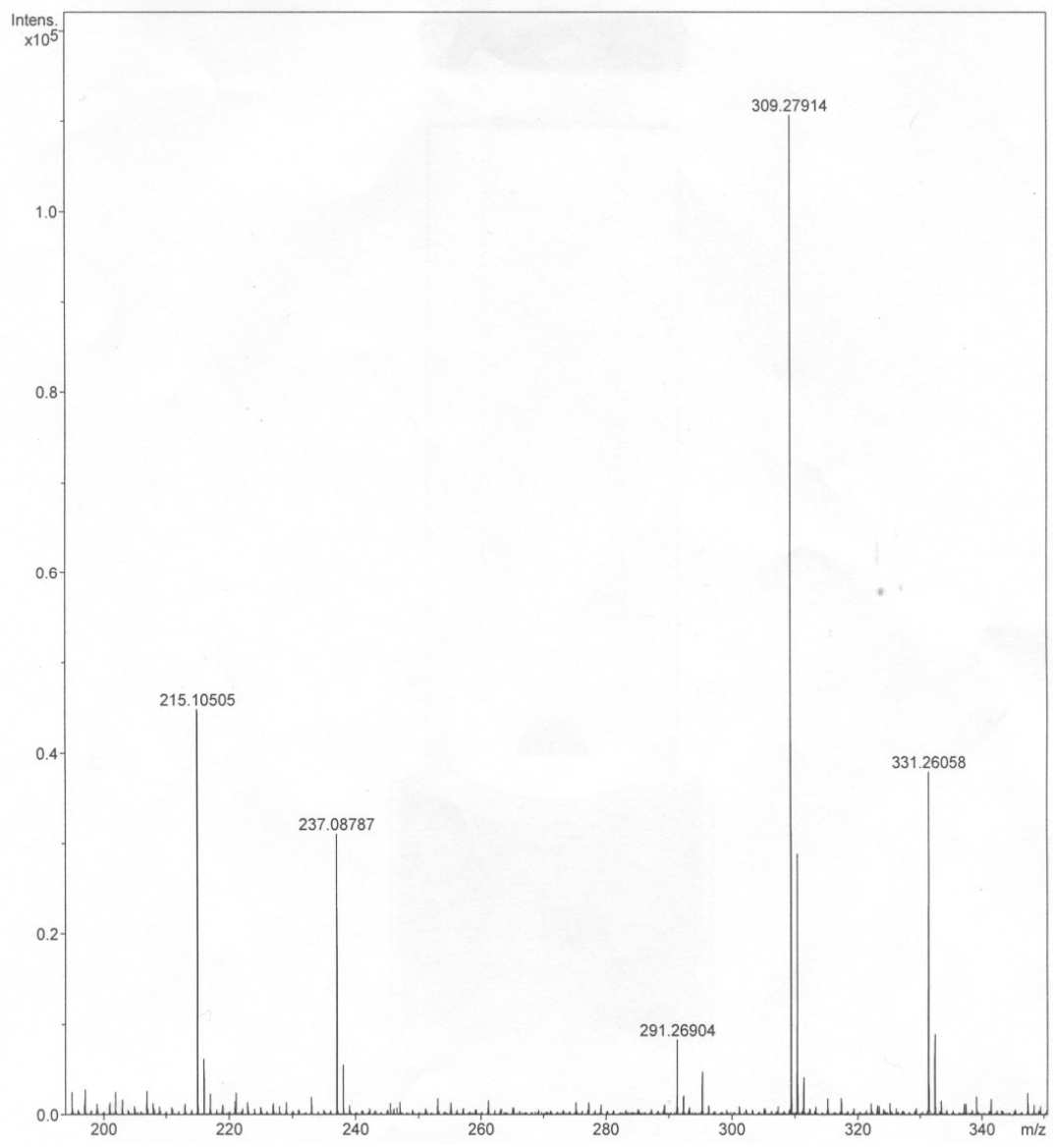
<http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm> (visualizada 21/06/2010).

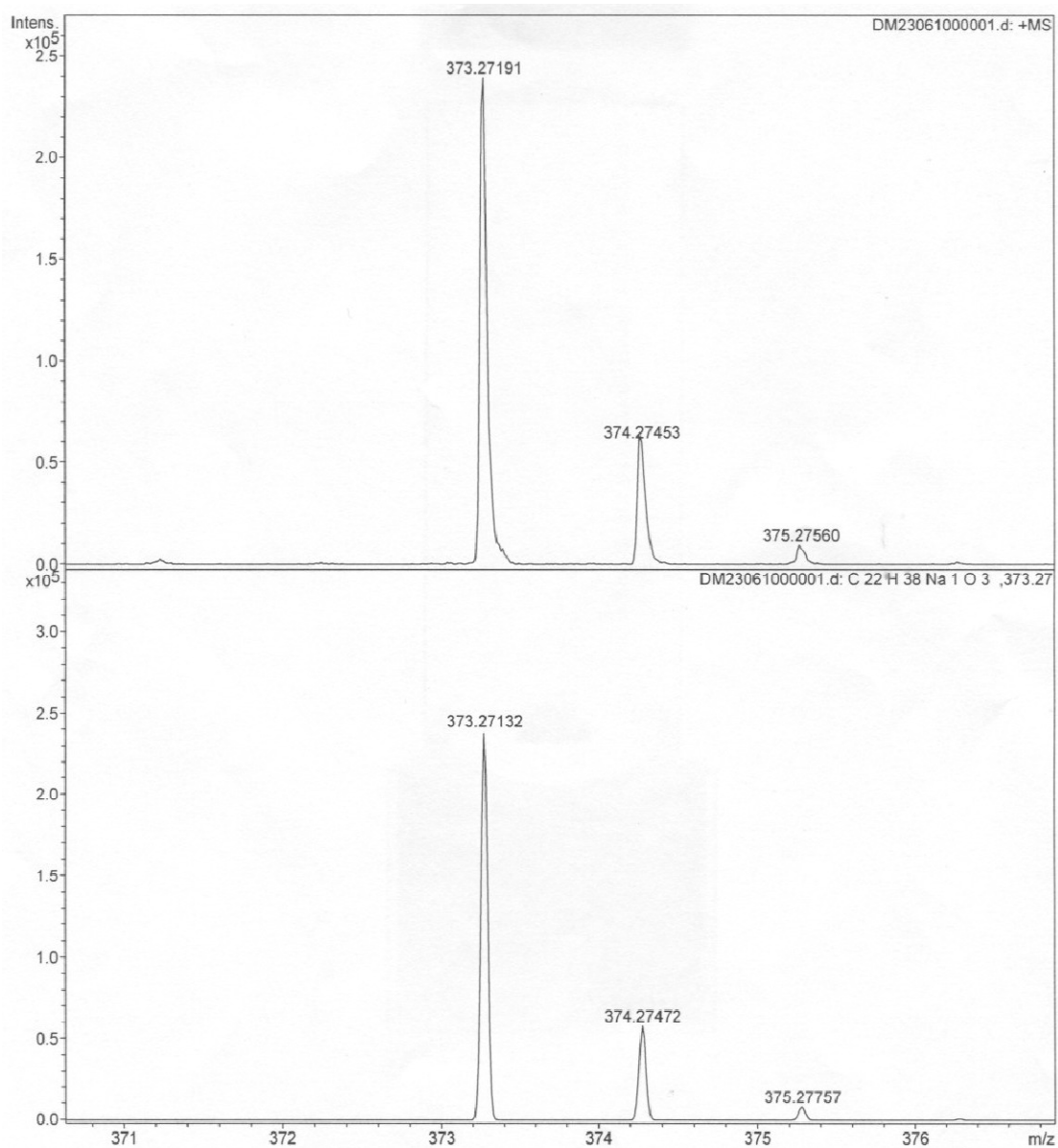
---

## Capítulo VI - Anexos

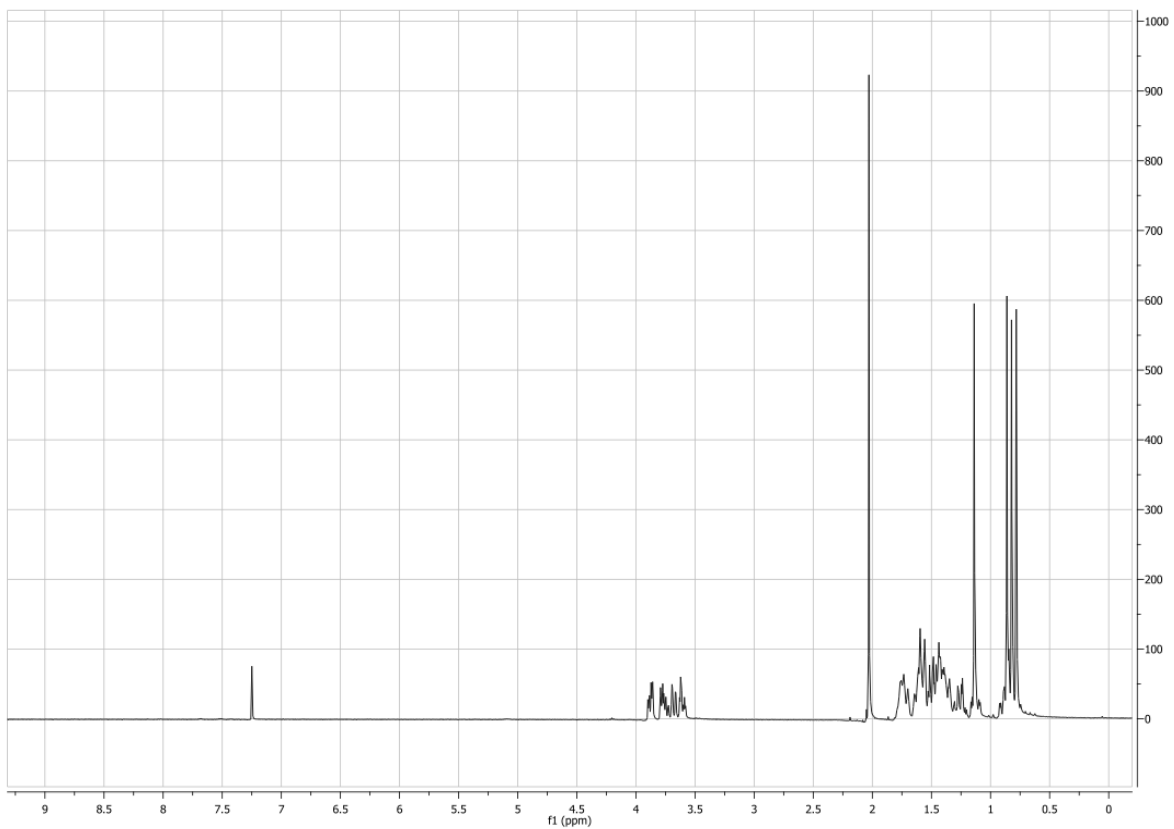


**Ilustração 28** - Espectro de IV do composto **3**.

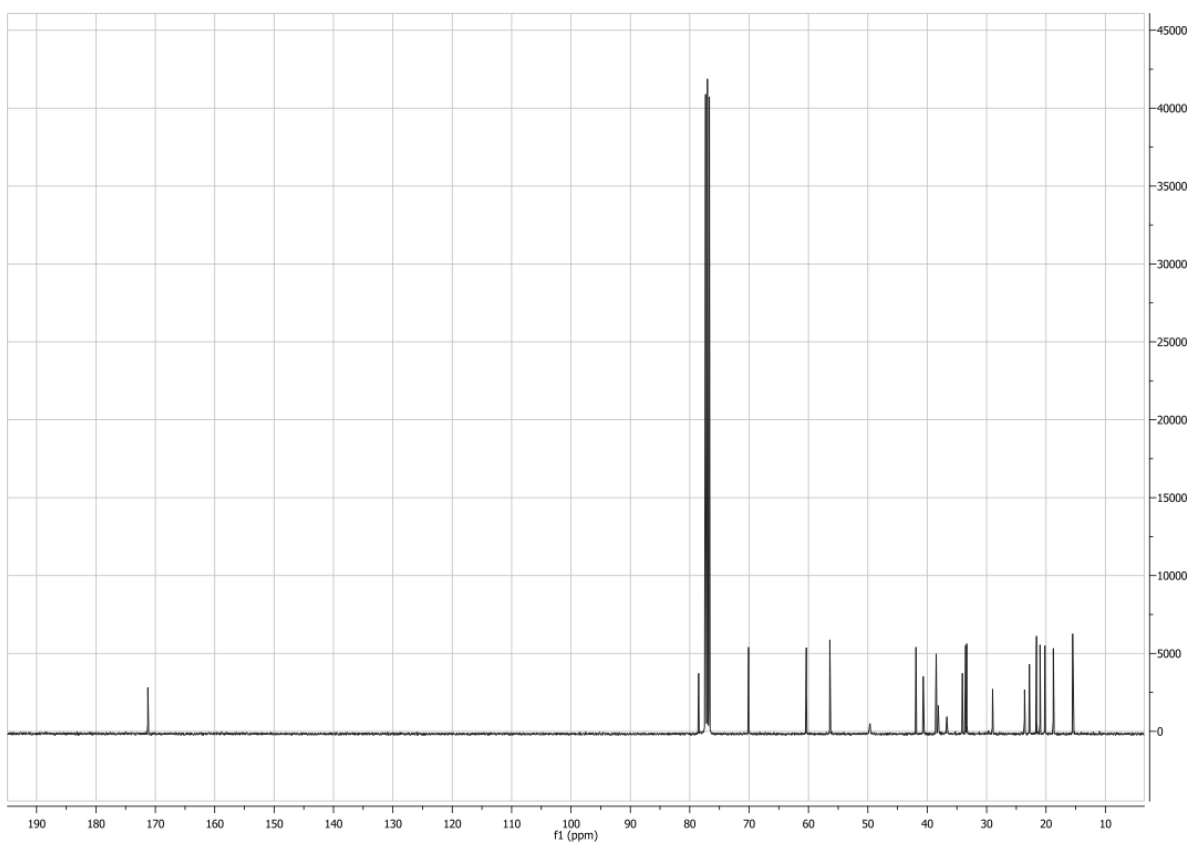




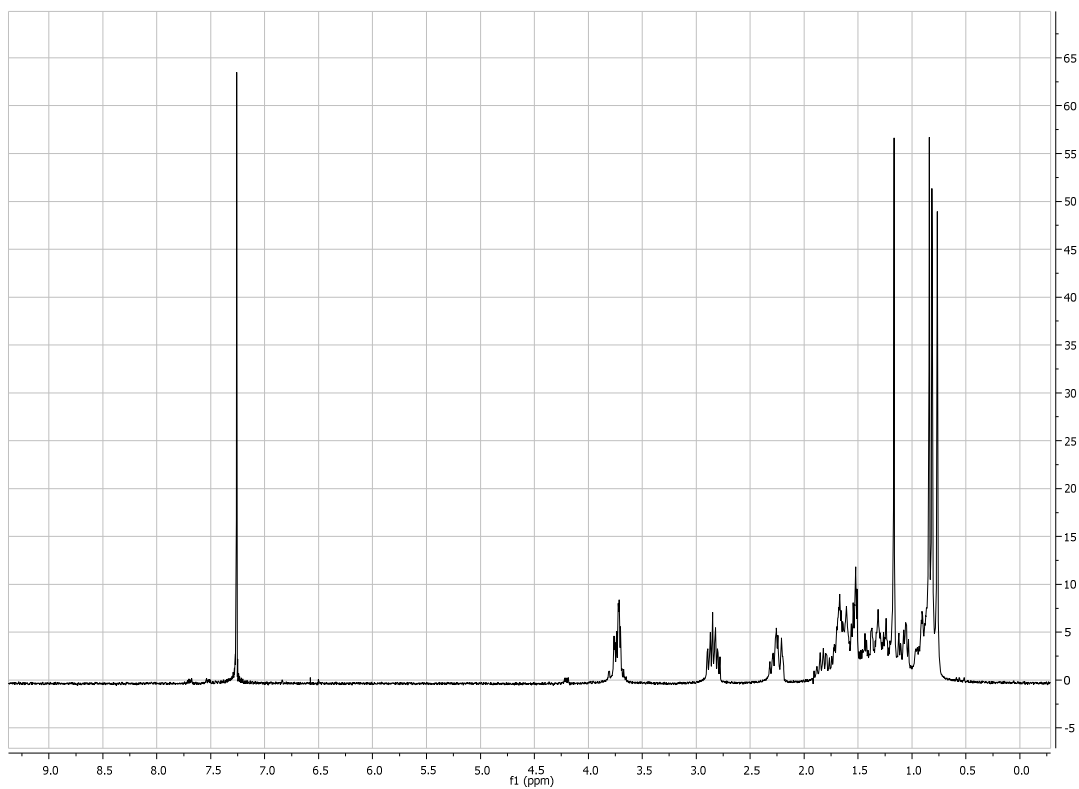
**Ilustração 29** - Espectros de massa do composto **3**.



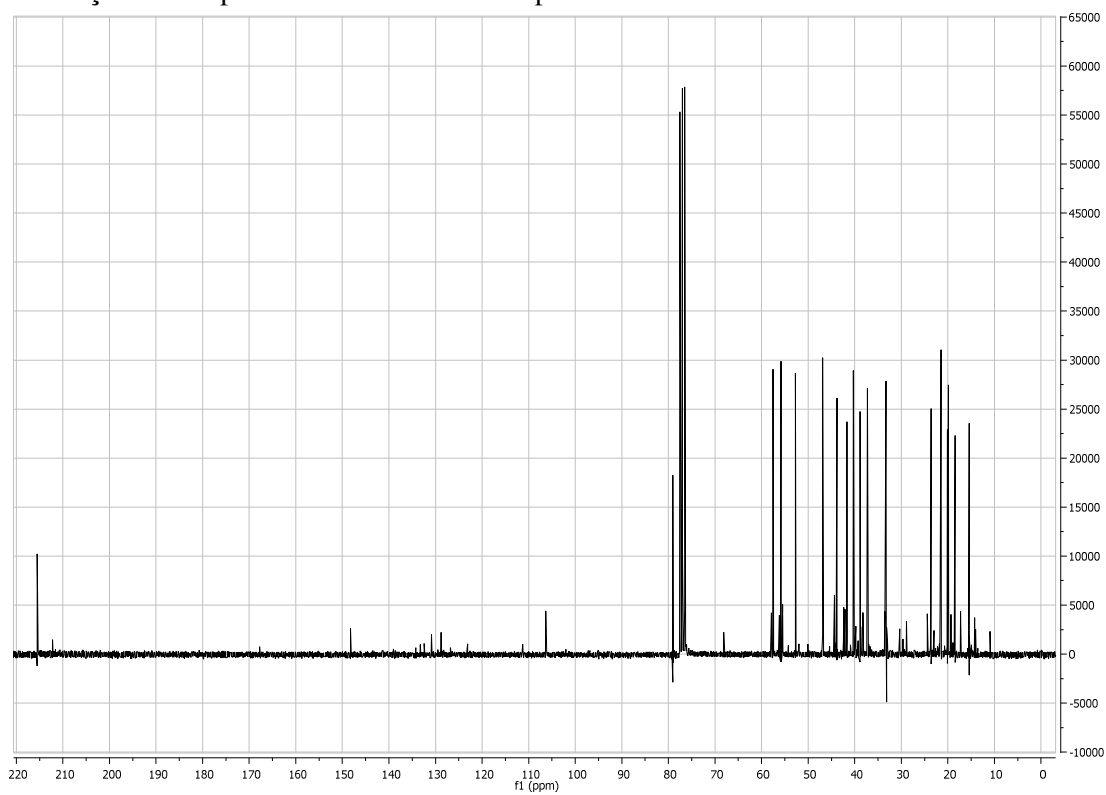
**Ilustração 30** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **3**.



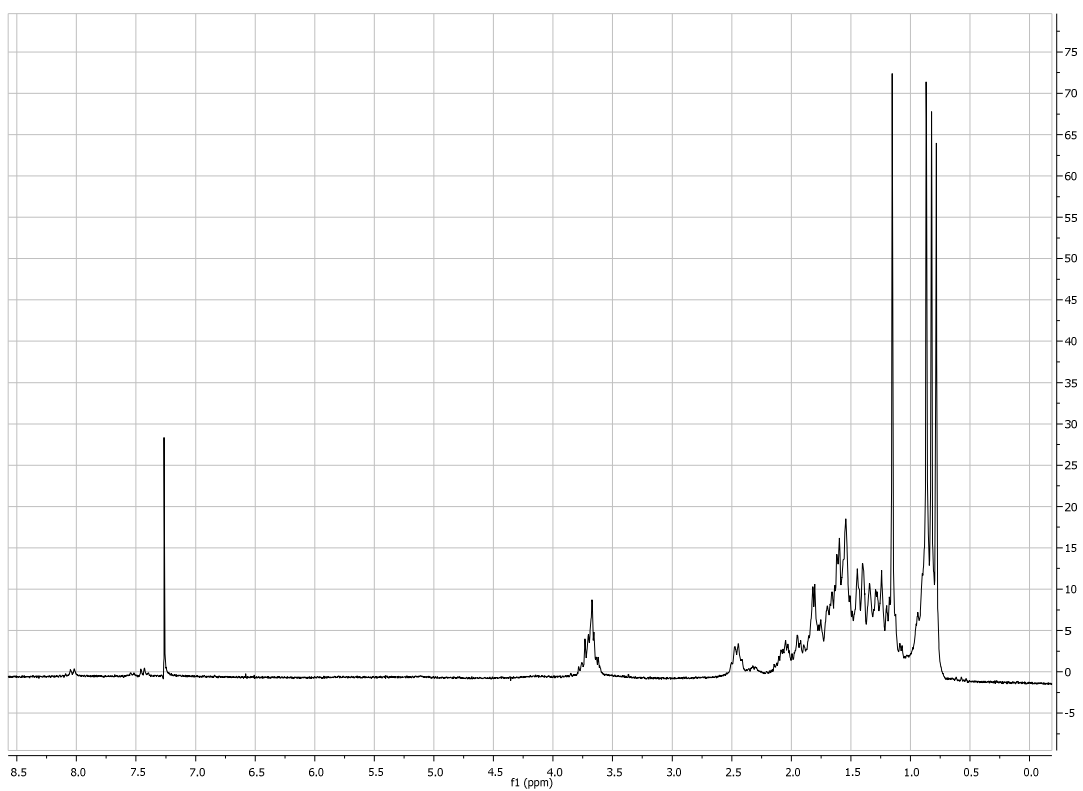
**Ilustração 31** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **3**.



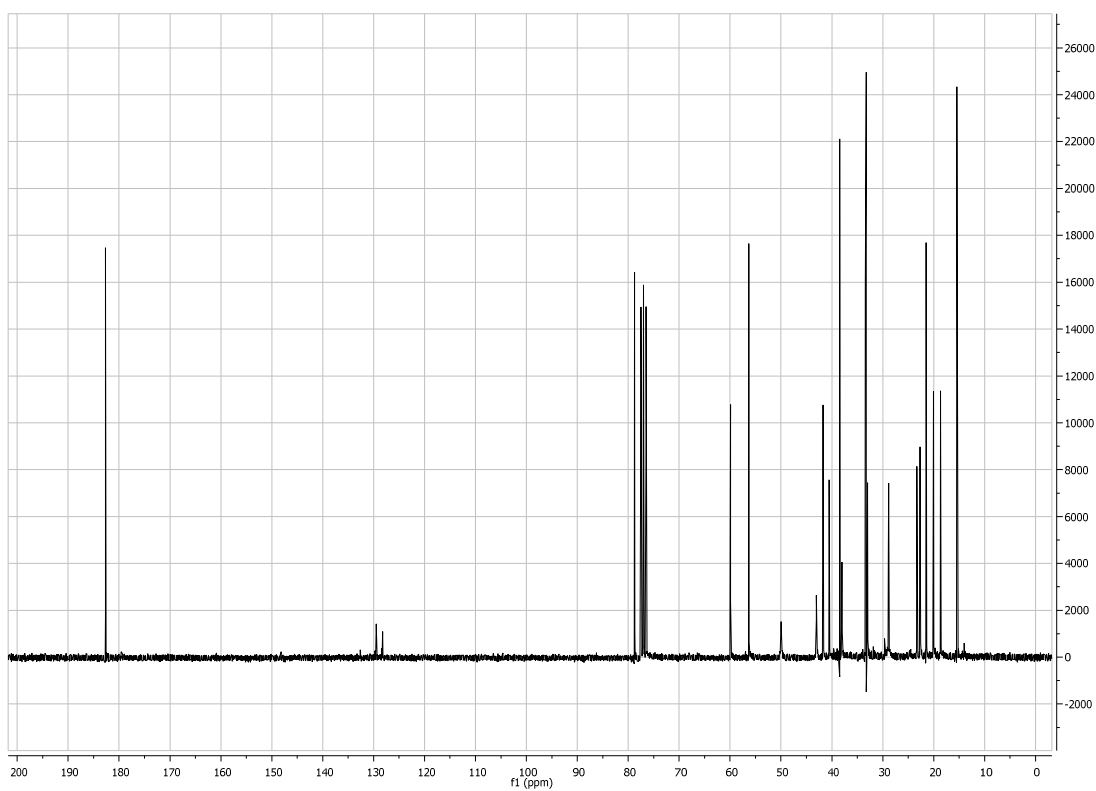
**Ilustração 32** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **4**.



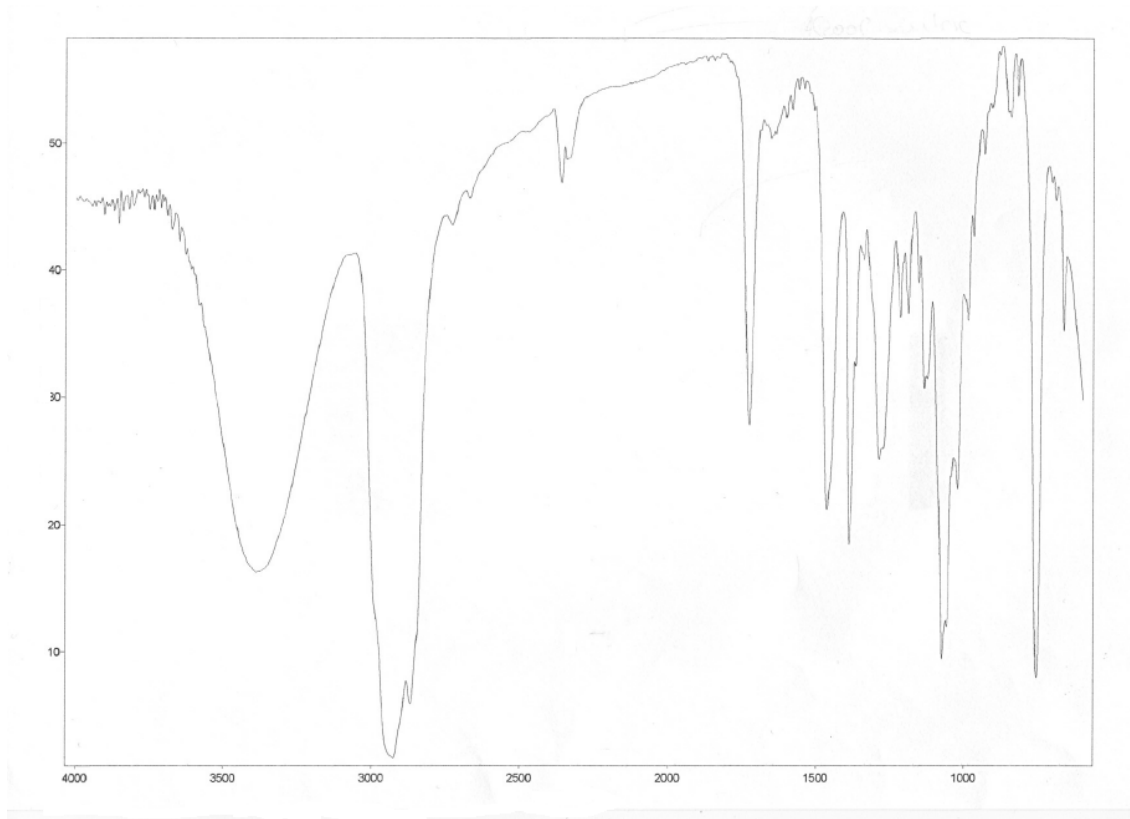
**Ilustração 33** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **4**.



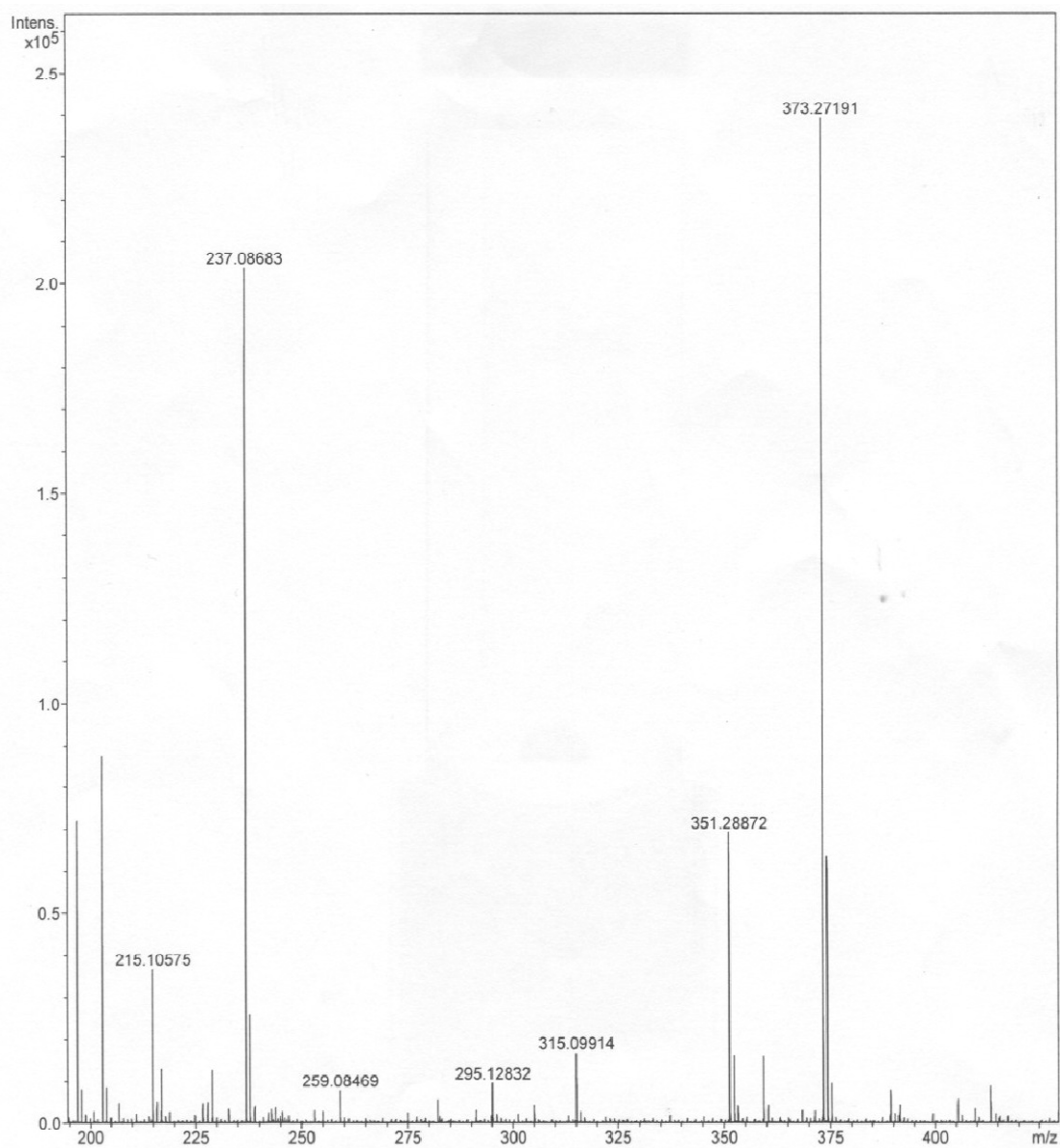
**Ilustração 34** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto **5**.

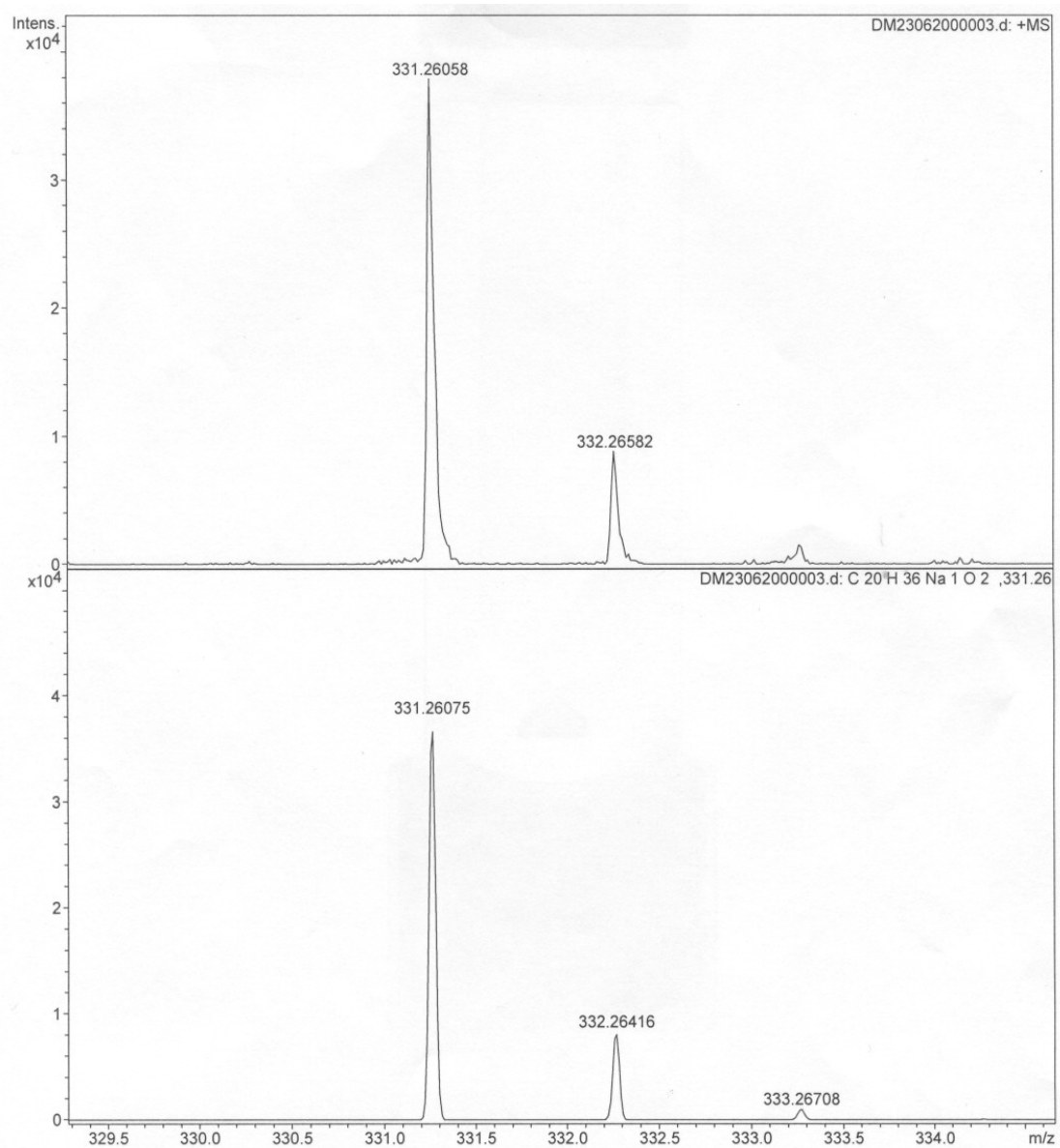


**Ilustração 35** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto **5**.

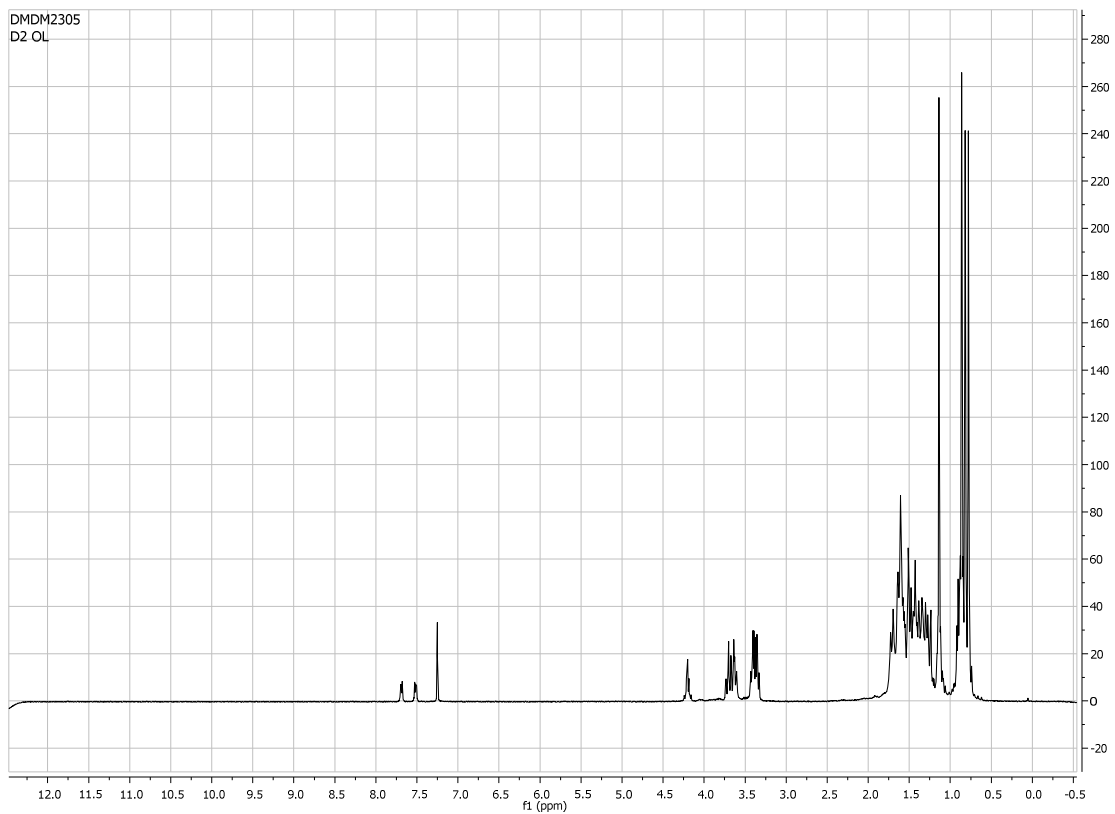


**Ilustração 36** - Espectro de IV do composto **6**.

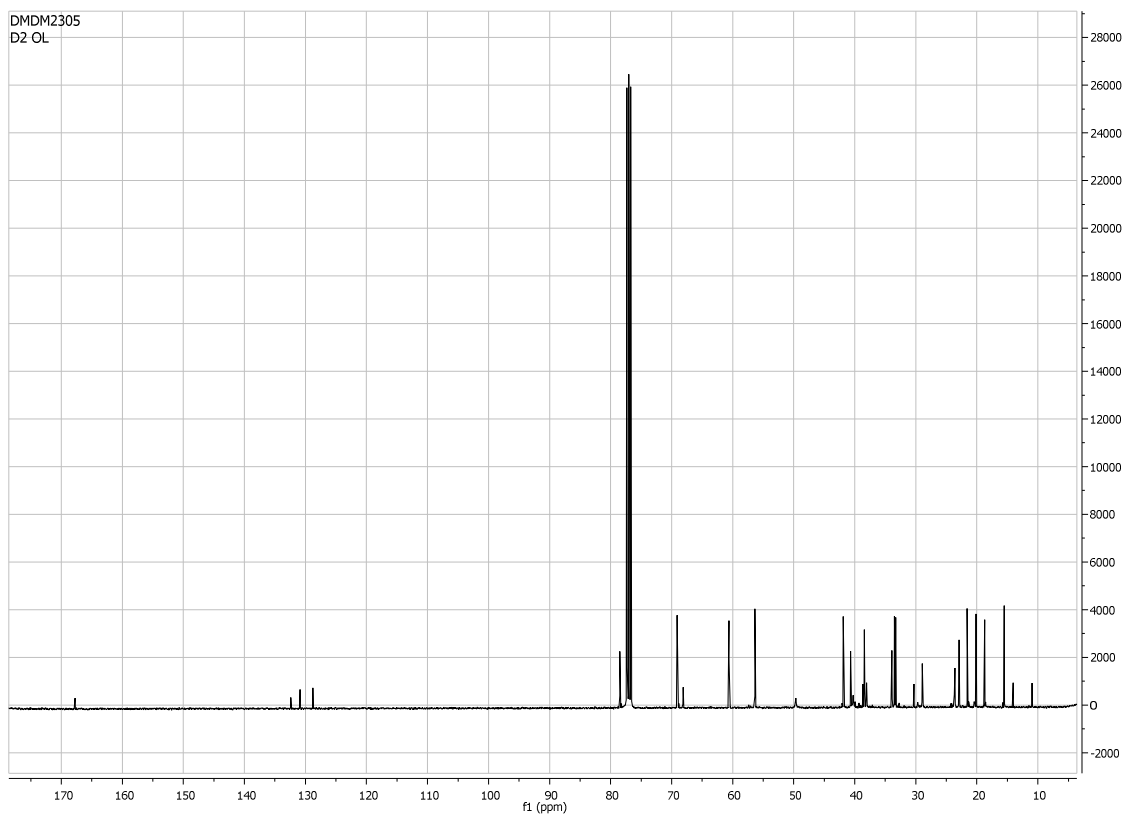




**Ilustração 37** - Espectros de massa do composto **6**.



**Ilustração 38** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do composto 6.



**Ilustração 39** - Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  do composto 6.

