

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE *Buddleja brasiliensis* E  
*Artemisia verlotorum***

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Augusto Gitzel Filho**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS  
SECUNDÁRIOS DE *Buddleja brasiliensis* E *Artemisia verlotorum***

**por**

**Augusto Gitzel Filho**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Área de Concentração em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia.**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ionara Irion Dalcol**

**Santa Maria, RS, Brasil**

**2011**

**Universidade Federal de Santa Maria  
Centro de Ciências da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,  
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
DE *Buddleja brasiliensis* E *Artemisia verlotorum***

elaborada por  
**Augusto Gitzel Filho**

como requisito parcial para obtenção do grau de  
**Mestre em Farmacologia**

**Comissão Examinadora:**

**Ionara Irion Dalcol, Dr<sup>a</sup>.** (UFSM)  
(Presidente/Orientadora)

**Bernardo Baldisserotto, Dr.** (UFSM)

**Helmoz Roseniaim Appelt, Dr.** (UNIFRA)

Santa Maria 12 de janeiro de 2011.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pela força, pela perseverança, pela fé e por me conduzir sempre pelo melhor caminho.

Aos meus pais, Augusto e Emília, pela vida, por me estenderem a mão em tudo, pelo carinho, pelo amor, pela compreensão e por me ajudar a tornar-me uma pessoa sempre melhor.

A minha irmã, Fabiana, pelo companheirismo, por acreditar sempre em mim e me incentivar sempre.

A Profa. Dra Ionara Dalcol, pela confiança, pelo conhecimento transmitido, dedicação, compreensão e paciência.

Ao Prof. Ademir Morel, pela amizade, e pela prestatividade.

Aos amigos Marcelo Spenazzatto pelo incentivo, apoio, força e disponibilidade sempre; Geresa Dalmolin e Luciana Piovesan, pela amizade, torcida e carinho.

Ao Prof. Ubiratan Flores da Silva pela ajuda prestada e conhecimento repassado.

A Caroline Z. Stucker, pela disponibilidade e prestatividade.

A colega de Laboratório Nalin de Seixas Borges, pela ajuda, disponibilidade e prestatividade.

Aos demais colegas de laboratório, pela amizade, convívio e companheirismo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia pela possibilidade de realizar o curso.

## RESUMO

Dissertação de Mestrado  
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia  
Universidade Federal de Santa Maria

### ATIVIDADE BIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE *Buddleja brasiliensis* E *Artemisia verlotorum*

AUTOR: AUGUSTO GITZEL FILHO

ORIENTADORA: IONARA IRION DALCOL

Data e Local de Defesa: Santa Maria, 12 de janeiro de 2011.

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade biológica das espécies *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex. Spreng e *Artemisia verlotorum* Lamotte. De *Buddleja brasiliensis* foram isolados três compostos: verbascosídeo (**1**),  $\beta$ -sitosterol (**54**) e estigmasterol (**55**). Desta espécie, fez-se a prospecção fitoquímica, a avaliação da capacidade de inibição das enzimas prolil oligopeptidase (POP), dipeptidil peptidase (DPP IV) e acetilcolinesterase (AChE), a obtenção do óleo essencial, e avaliação da atividade antimicrobiana. Nos testes de inibição frente à enzima POP foi observada significativa atividade das frações F4 e F12. Estas frações também demonstraram atividade inibitória da enzima AChE. Nos testes com a DPP IV verificou-se baixa atividade para todas as frações testadas. O fenilpropanóide verbascosídeo (**1**) demonstrou ter uma significativa e seletiva atividade inibitória frente à POP ( $IC_{50} = 1,3 \mu M$ ), enquanto frente à DPP IV demonstrou fraca atividade inibitória ( $IC_{50} \gg 150 \mu M$ ) e frente à AChE foi inativo (pMIQ de 9,6). O óleo essencial obtido desta espécie tem como constituintes principais o monoterpeneo  $\alpha$ -tujaplicina (11,5 %) e o diterpeneo heneicosano (14,5 %). Este óleo foi inativo frente a todas as enzimas testadas. A atividade antimicrobiana de **1**, do extrato bruto e das frações de *Buddleja brasiliensis* foi testada frente a vários fungos e bactérias. O composto **1** não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana, enquanto que as frações que demonstram atividade moderada foram as frações Diclorometano e Acetato de etila para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*. O extrato bruto, as frações e o óleo essencial obtidos de *Artemisia verlotorum* também foram avaliados quanto a atividade de inibição frente à POP e a DPP IV, bem como frente a vários fungos e bactérias. A fração Diclorometano de *Artemisia verlotorum* demonstrou a melhor atividade antimicrobiana, principalmente frente ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*, com uma CIM de 125  $\mu g/mL$ . A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa do óleo essencial de *Artemisia verlotorum* indicou como constituintes principais acetato de santonilila (37,2 %) e  $\alpha$ -cadinol (9,59%).

**Palavras-chave:** *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex. Spreng, *Artemisia verlotorum* Lamotte, POP, DPP IV, AChE, atividade antimicrobiana, óleo essencial.

## ABSTRACT

Dissertation of Master's Degree  
Post-Graduate Course in Pharmacology  
Universidade Federal de Santa Maria

### **BIOLOGICAL ACTIVITY OF SECONDARY METABOLITES from *Buddleja brasiliensis* AND *Artemisia verlotorum***

AUTHOR: AUGUSTO GITZEL FILHO

ADVISOR: IONARA IRION DALCOL

Date and place of the defense: Santa Maria, january 12<sup>th</sup>, 2011.

The present work describes the phytochemical study and biological activity evaluation of the *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex. Spreng and *Artemisia verlotorum* Lamotte. Were isolated three compounds from *Buddleja brasiliensis*: verbascoside (**1**),  $\beta$ -sitosterol (**54**) and stigmasterol (**55**), and it was carried out a phytochemical screening, a study of the ability to inhibit the enzymes prolyl oligopeptidase (POP), dipeptidyl peptidase (DPP IV) and acetylcholinesterase (AChE), a study of the antimicrobial activity of the specie and the extraction of the essential oil. The fractions F4 and F12 inhibited significantly POP and AchE activity. All *Buddleja brasiliensis* fractions tested presented low activity of DPP IV inhibition. The phenylpropanoid verbascoside (**1**) demonstrated a significant and selective inhibitory activity against POP (IC<sub>50</sub> = 1.3 mM), showed weak activity against DPP-IV (IC<sub>50</sub> >> 150 mM) and was inactive against AChE (pMIQ 9.6). The essential oil obtained from this species has as major constituents the  $\alpha$ -tujaplicin monoterpene (11.5%) and the diterpenoid heneicosane (14.5%). This oil was inactive against all tested enzymes. The antimicrobial activity of **1**, the crude extract and fractions of *Buddleja brasiliensis* were tested against several fungi and bacteria. Fractions dichloromethane and ethyl acetate showed moderate activity against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*, while **1** showed no antimicrobial activity. The crude extract, fractions and essential oil obtained from *Artemisia verlotorum* were also evaluated for inhibitory activity against the POP and DPP IV, as well as against various fungi and bacteria. Dichloromethane fraction of *Artemisia verlotorum* showed the best antimicrobial activity, mainly against the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, with an MIC of 125  $\mu$ g/mL. Analysis by gas chromatography coupled with mass spectrometry of the essential oil of *Artemisia verlotorum* indicated as the main components santonilil acetate (37.2%) and  $\alpha$ -cadinol (9.59%).

**Keywords:** *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex. Spreng, *Artemisia verlotorum* Lamotte, POP, DPP IV, AChE, antimicrobial activity, essential oil.

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Tabela 1</b> – Microorganismos indicadores utilizados nos testes de atividade antimicrobiana.  | 65 |
| <b>Tabela 2</b> – Coluna cromatográfica do extrato bruto de <i>Buddleja brasiliensis</i> Jacq. ex Spreng (Método de Fracionamento I).....               | 69 |
| <b>Tabela 3</b> – Resultados da prospecção fitoquímica realizada com as principais frações e extrato bruto de <i>Buddleja brasiliensis</i> .....        | 79 |
| <b>Tabela 4</b> – Resultados da atividade inibitória das principais frações e extrato bruto de <i>Buddleja brasiliensis</i> frente à POP e DPP IV ..... | 80 |
| <b>Tabela 5</b> – Composição do óleo volátil das folhas de <i>Buddleja brasiliensis</i> .....   | 89 |
| <b>Tabela 6</b> – Atividade inibitória das frações de <i>Artemisia verlotorum</i> frente às enzimas POP e DPP IV .....                                  | 91 |
| <b>Tabela 7</b> – Composição do óleo volátil das folhas de <i>Artemisia verlotorum</i> .....  | 93 |
| <b>Tabela 8</b> – Resultados da atividade antimicrobiana de frações e composto isolado de <i>Buddleja brasiliensis</i> .....                            | 97 |
| <b>Tabela 9</b> – Resultados da atividade antimicrobiana de frações de <i>Artemisia verlotorum</i> .....  | 98 |

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> – Verbascosídeo (1) e luteolina (2) (metabólitos secundários presentes em <i>Buddleja officinalis</i> ).....   | 19 |
| <b>Figura 2</b> – Linarina (3) e 7- <i>O</i> -luteolina glicosídeo (4) (metabólitos secundários presentes em <i>Buddleja scordioides</i> e <i>Buddleja globosa</i> , respectivamente).....   | 20 |
| <b>Figura 3</b> – <i>Buddleja brasiliensis</i> Jacq. ex Spreng.....  | 22 |
| <b>Figura 4</b> – Aucubina (5), catapol (6) e catapolsídeo (7) (metabólitos secundários presentes no gênero <i>Buddleja</i> ).....   | 23 |
| <b>Figura 5</b> – Buddledina A (8), buddledina B (9), buddlejona (10), mimengosídeo C (11) e mimengosídeo E (12) (metabólitos secundários presentes em diferentes espécies de <i>Buddleja</i> ). .....                             | 25 |
| <b>Figura 6</b> – Casticina (13), centaureidina (14), quercetina 3,4-dimetiléter (15) e quercetina 3,7-dimetiléter (16) e 7- <i>O</i> -metileriodictiol (17), (metabólitos secundários presentes no gênero <i>Artemisia</i> )..... | 27 |
| <b>Figura 7</b> – Santonina (18), quercetina (19), kaempferol (20) e artemisina (21) (metabólitos secundários presentes em <i>Artemisia tridentata</i> e <i>Artemisia annua</i> ).....   | 28 |
| <b>Figura 8</b> – <i>Artemisia verlotorum</i> .....  | 29 |
| <b>Figura 9</b> – Eridioctiol (22), apigenina (23), eupafolina (24) e jaceosidina (25), (flavonóides presentes em <i>Artemisia verlotorum</i> ).....   | 30 |
| <b>Figura 10</b> – Estrutura de alguns componentes de óleos essenciais de <i>Artemisia verlotorum</i> . 31   |    |
| <b>Figura 11</b> – Alguns componentes de óleos essenciais extraídos de <i>Artemisia verlotorum</i> .....   | 33 |
| <b>Figura 12</b> – Estrutura tridimensional da enzima prolil oligopeptidase (POP). .....   | 34 |
| <b>Figura 13</b> – Inibidores naturais isolados de <i>Tamarix hispida</i> , <i>Gingko biloba</i> , <i>Scutellaria baiacalensis</i> e <i>Rhizoma coptidis</i> .....   | 36 |
| <b>Figura 14</b> – Comparação entre as estruturas da DPP IV (esquerda) e POP (direita).....  | 36 |
| <b>Figura 15</b> – Visão do sítio ativo da Acetilcolinesterase.....  | 39 |
| <b>Figura 16</b> – Tacrina (48), donepezil (49), rivastigmina (50), galantamina (51) e Huperizina A (52) (compostos sintéticos e naturais que apresentam efeito inibidor da enzima acetilcolinesterase).....                       | 41 |
| <b>Figura 17</b> – Estrutura dos metabólitos isolados pelo Método de Fracionamento I. ....   | 81 |
| <b>Figura 18</b> – Aparelho Clevenger modificado.....  | 75 |



|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 19</b> – Estrutura do verbascosídeo.....  | 81 |
| <b>Figura 20</b> – <b>a)</b> Cromatograma de CLAE em coluna C18 (gradiente linear de 0- 100 % MeCN em 8 min); <b>b)</b> Espectro de massa (CLAE-EM) do verbascosídeo ( <b>1</b> ) isolado de <i>Buddleja brasiliensis</i> .....   | 82 |
| <b>Figura 21</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H em CD <sub>3</sub> OD a 400,13 MHz do verbascosídeo ( <b>1</b> ). .....  | 83 |
| <b>Figura 22</b> – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C em CD <sub>3</sub> OD a 100,62 MHz do verbascosídeo ( <b>1</b> ). .....   | 83 |
| <b>Figura 23</b> – Espectro de RMN DEPT 135° em CD <sub>3</sub> OD do verbascosídeo ( <b>1</b> ). .....   | 84 |
| <b>Figura 24</b> – Cromatograma de CG em coluna apolar do composto β-sitosterol ( <b>54</b> ) isolado.  | 85 |
| <b>Figura 25</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto β-sitosterol ( <b>54</b> ) isolado.....  | 86 |
| <b>Figura 26</b> – Cromatograma de CG em coluna apolar do composto estigmasterol ( <b>55</b> ).....   | 86 |
| <b>Figura 27</b> – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H do composto isolado estigmasterol ( <b>55</b> ) .....  | 87 |
| <b>Figura 28</b> – Perfil cromatográfico do óleo das folhas de <i>Buddleja brasiliensis</i> . Coluna utilizada: fase estacionária apolar SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise: T <sub>injetor</sub> = 220 °C, T <sub>detector</sub> = 250 °C.....                                   | 88 |
| <b>Figura 29</b> – Perfil cromatográfico do óleo das folhas de <i>Artemisia verlotorum</i> . Coluna utilizada: fase estacionária apolar SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise: T <sub>injetor</sub> = 220 °C, T <sub>detector</sub> = 250 °C.....                                    | 92 |
| <b>Figura 30</b> – Atividade inibitória de M04 frente a acetilcolinesterase por bioautografia. (C = Controle – Fisostigmina).....   | 94 |
| <b>Figura 31</b> – Sesquiterpeno α-cadinol isolado do óleo essencial de <i>Artemisia verlotorum</i> ....  | 94 |
| <b>Figura 32</b> – Cromatograma de CG em coluna apolar do composto isolado do óleo de <i>Artemisia verlotorum</i> , α- cadinol. Coluna utilizada: fase estacionária apolar SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise: T <sub>injetor</sub> = 220 °C, T <sub>detector</sub> = 250 °C..... | 95 |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                    |   |
|--------------------|---|
| $\delta$           | Deslocamento químico  |
| $J$                | Constante de acoplamento  |
| $\mu\text{g}$      | Micrograma  |
| $\mu\text{l}$      | Microlitro  |
| $\lambda$          | Comprimento de onda   |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius  |
| ACh                | Acetilcolina  |
| AChE               | Acetilcolinesterase   |
| AcOEt              | Acetato de Etila  |
| ATCC               | American Type Culture Collection  |
| CCSF               | Coluna Capilar de Sílica Fundida  |
| CG                 | Cromatografia Gasosa  |
| CIM                | Concentração Inibitória Mínima  |
| CLAE               | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência                                    |
| CLAE-EM            | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa |
| CLM                | Concentração Letal Mínima   |
| DIC                | Detector de Ionização de Chama  |
| DMSO               | Dimetilsulfóxido  |
| DPP IV             | Dipeptidil peptidase IV   |
| EB                 | Extrato Bruto   |
| FA                 | Fração Acetato de etila   |
| FB                 | Fração <i>n</i> -Butanol  |
| FD                 | Fração Diclorometano  |
| FDA                | Food and Drug Administration  |

|                  |  |
|------------------|--|
| FH               | Fração Hexano                                      |
| GIP              | Polipeptídeo Insulinotrópico dependente de Glicose |
| GLP-1            | Glucagon-like Peptide-1                            |
| HIV              | Vírus da Imunodeficiência Humana                   |
| Hz               | Hertz  |
| IC <sub>50</sub> | Concentração Inibitória Média                      |
| IK               | Índice de Kovatz                                   |
| MBC              | Concentração Bactericida Mínima                    |
| MeCN             | Acetonitrila                                       |
| MHz              | Mega Hertz   |
| mL               | mililitro  |
| mM               | Milimolar  |
| nM               | Nanomolar  |
| NA               | Não Ativo  |
| nm               | Nanometro  |
| OMS              | Organização Mundial da Saúde                       |
| PEP              | Protil endopeptidase                               |
| PF               | Ponto de Fusão                                     |
| POP              | Protil oligopeptidase                              |
| R <sub>f</sub>   | Fator de Retenção                                  |
| RMN              | Ressonância Magnética Nuclear                      |
| SNC              | Sistema Nervoso Central                            |
| TMS              | Trimetilsilano                                     |
| UFC              | Unidade Formadora de Colônia                       |
| USA              | Estados Unidos da América                          |

# SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 13 |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 16 |
| <b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....  | 17 |
| <b>3.1 O gênero <i>Buddleja</i></b> .....   | 17 |
| <b>3.2 O gênero <i>Artemisia</i></b> .....  | 26 |
| <b>3.3 Atividades biológicas</b> .....  | 33 |
| 3.3.1 Atividade inibitória enzimática.....  | 33 |
| 3.3.1.1 Prolil oligopeptidase (POP).....  | 33 |
| 3.3.1.2 Dipeptidil peptidase IV (DPP IV) .....  | 36 |
| 3.3.1.3 Acetilcolinesterase (AChE).....   | 37 |
| 3.3.2 Atividade antimicrobiana.....   | 41 |
| 3.2.1 Microrganismos patogênicos .....  | 41 |
| <b>4 ARTIGO CIENTÍFICO</b> .....  | 44 |
| <b>Verbascosídeo: um inibidor da prolil oligopeptidase oriundo de <i>Buddleja brasiliensis</i> Jacq. ex. Spreng</b> ..... | 44 |
| <b>5 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....   | 62 |
| <b>5.1 Procedimentos Experimentais Gerais</b> .....   | 62 |
| 5.1.1 Materiais e Métodos Cromatográficos.....  | 62 |
| 5.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.....                            | 62 |
| 5.1.3 Materiais e Métodos Analíticos.....   | 62 |
| 5.1.4 Ensaio de inibição da enzima POP .....  | 63 |
| 5.1.5 Ensaio de inibição da enzima DPP IV .....   | 64 |
| 5.1.6 Ensaio de inibição da AChE pelo Método da Bioautografia.....  | 64 |
| 5.1.7 Atividade antimicrobiana in vitro.....  | 65 |
| 5.1.8 Ensaio de prospecção fitoquímica.....   | 66 |
| <b>5.2 <i>Buddleja brasiliensis</i> Jacq. ex Spreng</b> .....   | 68 |
| 5.2.1 Material Vegetal .....  | 68 |
| 5.2.2 Extração e Fracionamento.....   | 68 |

|  |            |
|--|------------|
| 5.2.2.1 Método de Fracionamento I .....  | 68         |
| 5.2.2.2 Método de Fracionamento II .....   | 71         |
| 5.2.3 Compostos isolados de <i>Buddleja brasiliensis</i> Jacq. ex Spreng.....  | 73         |
| 5.2.4 Obtenção do óleo essencial .....   | 74         |
| 5.2.5 Determinação do Índice de Kovats (IK) para os constituintes dos óleos voláteis.....                              | 75         |
| <b>5.3 <i>Artemisia verlotorum</i>.....</b>  | <b>76</b>  |
| 5.3.1 Material Vegetal .....   | 76         |
| 5.3.2 Fracionamento.....   | 76         |
| 5.3.3 Obtenção do óleo essencial .....   | 77         |
| <br>   |            |
| <b>6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....</b>  | <b>78</b>  |
| <b>6.1 <i>Buddleja brasiliensis</i> .....</b>  | <b>78</b>  |
| 6.1.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Buddleja brasiliensis</i> .....   | 88         |
| <b>6.2 <i>Artemisia verlotorum</i>.....</b>  | <b>91</b>  |
| 6.2.1 Obtenção do óleo essencial de <i>Artemisia verlotorum</i> .....  | 92         |
| <b>6.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana de <i>Buddleja brasiliensis</i> e <i>Artemisia verlotorum</i>.....</b> | <b>95</b>  |
| <br>   |            |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>  | <b>99</b>  |
| <br>   |            |
| <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>  | <b>101</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. Durante o processo de evolução, o homem utilizou de diversas maneiras os recursos oferecidos pela natureza, com a finalidade de buscar melhor adaptação no meio em que vive e condições para sua sobrevivência. No processo histórico das plantas medicinais, a utilização de ervas e outros vegetais como forma de medicamentos é descrita nos seus registros e manuscritos. O primeiro estudo sistemático de plantas medicinais data de aproximadamente 2700 a.C.. Em toda história, há registros que os medicamentos surgiram da simples observação. Os médicos gregos conheciam muito pouco sobre os efeitos e mecanismos de ação das plantas medicinais, mas acompanhavam com muita atenção as reações de seus pacientes e a maneira como o organismo restabelecia-se. No século XIX, a humanidade deparou-se com um inesgotável e diverso arsenal terapêutico presente nos vegetais. Os trabalhos pioneiros na busca da utilização de drogas naturais datam de 1803, com a descrição do ópio isolado de *Papaver somniferum* por Derosone (Maciel et al., 2002; Devienne et al., 2004; Silva et al., 2006).

Até meados do século XX, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese de fármacos, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso. Mas apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e dos processos biotecnológicos, cerca de 25 % dos medicamentos prescritos na terapia moderna em países industrializados são originários de aproximadamente 90 espécies de plantas, o que justifica a busca por novos protótipos (Foglio et al., 2006).

Em maio de 1978, durante a 31<sup>a</sup> Assembléia da Organização Mundial de Saúde, o termo “planta medicinal” foi oficialmente reconhecido, sendo proposto que “planta medicinal é aquela que, administrada ao homem ou animais, por qualquer via ou sob qualquer forma, exerce algum tipo de ação farmacológica” (Silva et al.; 2006).

Existem aproximadamente entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas, mas grande parte delas ainda não tem estudos químicos analíticos e farmacológicos. Em todo mundo apenas 17% das plantas foram estudadas de alguma maneira quanto ao seu emprego medicinal. Esses dados demonstram o enorme potencial das plantas para a descoberta de novos fitoterápicos e medicamentos.

Devido ao grande número de doenças que acometem o homem, e sua importância, é de extrema relevância a descoberta de produtos naturais provindos de plantas, agindo como inibidores enzimáticos naturais ou agentes antimicrobianos, por exemplo. Nos últimos anos, tem-se ampliado o conhecimento de espécies vegetais com propriedades antimicrobianas, devido à necessidade da descoberta de novos antibióticos, e também como agentes naturais para tratamento de diversos transtornos que acometem o SNC, como transtorno afetivo bipolar, esquizofrenia, amnésia e ansiedade (Maes et al.; 1995; 1998; Breen et al.; 2004; Roehrl et al.; 2004; Venalainen et al.; 2004).

As interações proteína-proteína que ocorrem quando proteases (enzimas proteolíticas que catalisam a quebra das ligações peptídicas em proteínas) unem-se a um substrato, tem sido muito estudadas, dando lugar ao surgimento de inibidores enzimáticos com capacidade de modulação de atividades biológicas como a síntese de neuropeptídeos no SNC (Tarragó et al.; 2006; Declerck et al., 2004).

A enzima Prolil oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26), é uma serina protease altamente presente no cérebro, que cliva ligações peptídicas na porção carboxílica de resíduos de prolina (Okado et al.; 2002). Esta enzima tem grande relevância do ponto de vista terapêutico, uma vez que está relacionada a transtornos mentais como ansiedade, esquizofrenia e diferentes estágios de depressão. Esta relevância está relacionada ao fato que, em pacientes que apresentam os transtornos citados, o nível desta enzima no soro é superior aos níveis em pacientes não afetados (Deacon et al.; 2004).

A enzima Dipeptidil peptidase (DPP IV EC 3.4.14.5) também pertence à família das serinas proteases. Terapeuticamente, ela está ligada ao tratamento de diabetes mellitus do tipo II (McIntosh et al., 2006). A DPP IV apresenta um sítio ativo espacialmente muito similar à POP no que diz respeito ao reconhecimento enzima-ligantes. Frequentemente, inibidores ativos da enzima POP também o são para a enzima DPP IV, o que do ponto de vista farmacológico não é muito desejável, uma vez que elas têm mecanismos de ação muito distintos e estão envolvidas em diferentes patologias (Deacon et al.; 2004).

Outra enzima de grande relevância para o nosso organismo é a acetilcolinesterase (AChE). Ela é uma enzima substrato-específica que degrada a acetilcolina (ACh) na fenda sináptica, regenerando-a em colina, seu precursor. Quando os níveis desse neurotransmissor sofrem alterações, isso acomete ao comprometimento cognitivo e os distúrbios comportamentais característicos da doença de Alzheimer. (Borloz et al., 2006; Viegas et al., 2004). Aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro, utilizando inibidores da

acetilcolinesterase é uma das abordagens mais promissoras no que diz respeito ao tratamento da doença de Alzheimer (Barbosa Filho et al.; 2006).

Dentro deste contexto, o presente trabalho aborda o estudo fitoquímico e a avaliação biológica de duas plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul: *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng e *Artemisia verlotorum* Lamotte.



## 2 OBJETIVOS

Realizar um estudo com as espécies *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng e *Artemisia verlotorum* Lamotte apresentando como objetivos principais:

- a) Obtenção e fracionamento dos extratos brutos de *Buddleja brasiliensis* e *Artemisia verlotorum*. Prospecção fitoquímica do extrato bruto e principais frações obtidas das espécies trabalhadas.
- b) O isolamento e purificação de metabólitos secundários presentes em *Buddleja brasiliensis*. A identificação estrutural de compostos isolados, utilizando técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (CLAE-EM) e técnicas espectroscópicas como ressonância magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .
- c) Análise da atividade antimicrobiana do extrato bruto, frações e metabólitos isolados de *Buddleja brasiliensis* e do extrato bruto e frações de *Artemisia verlotorum*.
- d) Análise da capacidade de inibição enzimática do extrato bruto, principais frações e metabólitos isolados de *Buddleja brasiliensis* frente às enzimas prolil oligopeptidase (POP), dipeptidil peptidase (DPP IV) e acetilcolinesterase (AChE).
- e) Obtenção e identificação dos principais constituintes dos óleos essenciais das espécies *Buddleja brasiliensis* e *Artemisia verlotorum*.
- f) Análise da capacidade de inibição enzimática dos óleos essenciais de *Buddleja brasiliensis* e *Artemisia verlotorum* frente às enzimas prolil oligopeptidase (POP), dipeptidil peptidase (DPP IV).

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade é a utilização de plantas com fins medicinais para o tratamento, prevenção e cura de doenças. A Organização Mundial da Saúde (OMS) divulgou no início da década de 90 que 65-80 % da população dos países em desenvolvimento dependiam de plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (Veiga Junior et al., 2005).

Os produtos naturais tem sido a fonte dos compostos mais ativos em fármacos: mais de 80 % das drogas são de produtos naturais ou provém de algum composto natural. De 1981 a 2007, dados de fontes de novas drogas indicam que quase metade das drogas aprovadas desde 1994 são baseadas em produtos naturais.

As famílias Loganiaceae e Asteraceae possuem representantes muito empregados na medicina popular do Brasil. Loganiaceae é uma família que compreende dezoito gêneros, distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais. São plantas herbáceas, arbustivas ou arbóreas. Nesta família encontram-se plantas dos gêneros *Strychnos*, *Spigelia* e *Buddleja*. A família Asteraceae (Compositae) pertence à ordem *Campanulales* (*Synandrae*) e é bastante ampla, com cerca de 920 gêneros e 19.000 espécies, sendo considerada a maior família das angiospermas. A maioria das plantas desta família é de pequeno porte. Na família Asteraceae são conhecidas espécies medicinais dos gêneros *Baccharis*, *Artemisia*, *Stevia*, *Solidago*, *Mikania*, *Senecio* e *Matricaria*, dentre outros (Joly, 1977).

#### 3.1 O gênero *Buddleja*

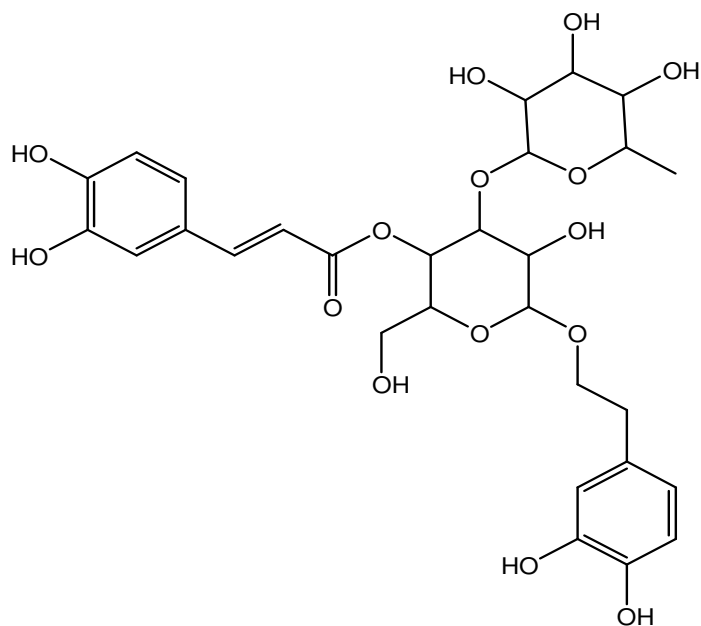
O gênero *Buddleja* tem sido objeto de várias investigações nos últimos anos, e abrange aproximadamente 100 espécies. É encontrado nas regiões mais secas e subtropicais da Ásia, África Oriental e Sul, em alguns países da América do Sul, incluindo o Brasil, Sudoeste dos EUA, Europa, Austrália, Madagascar e Ásia. Algumas espécies são introduzidas como plantas ornamentais em diversos países da Europa, pela grande capacidade de suas flores atraírem borboletas (Houghton et al., 2003).

Considerações etnofarmacológicas têm levado a diversas investigações nos últimos anos, sendo que a maioria de seus usos na medicina popular concentra-se principalmente nas

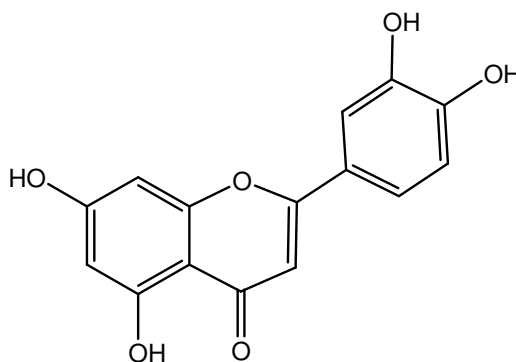
folhas e flores (Houghton et al., 2003; Mensah et al., 2001). Dentre os usos populares mais comuns de espécies deste gênero podemos citar: cicatrização de úlceras gástricas, anti-hepatotóxica, anti-reumática, antisséptica, antifúngica, antiinflamatória, contra asma, bronquite e tosse, em transtornos urinários e assepsia de feridas. (Houghton et al., 1989; Mensah et al., 2000; Houghton et al., 2003; Sheng et al., 2002; Emam et al., 1997; Lorenzo et al., 2006).

A maioria das espécies de *Buddleja* é de crescimento rápido, permanecendo em média ou alta estatura, e sobrevivem a grandes diferenças de temperatura. São tolerantes ao sol e crescem em diversos tipos de solos (Houghton et al., 1984). Em geral, têm folhagem abundante, com folhas grandes, estreitas, em forma de lança, muitas vezes texturizadas e pálidas. Normalmente nos espigões, as flores também ocorrem na cabeça esférica, soltas ou aglomeradas, muito coloridas, em tons de rosa, avermelhada roxo, laranja e amarelo. Dentre as espécies mais estudadas, podemos citar: *Buddleja officinalis*, *Buddleja scordioides*, *Buddleja davidii*, *Buddleja globosa*, *Buddleja perfoliata*, *Buddleja cordata*, *Buddleja parviflora*, *Buddleja madagascariensis* e *Buddleja tucumaniensis*.

A *Buddleja officinalis*, nativa da China, e vulgarmente chamada de Mimenghua, é popularmente conhecida por apresentar atividades antiinflamatórias e antimicrobianas. Estudos demonstraram ainda o uso terapêutico para o tratamento de stress oxidativo induzido em doenças neurodegenerativas como o mal de Parkinson (Sheng et al., 2002). As flores da mesma espécie são utilizadas popularmente para tratamento de aplopaxia, dores de cabeça e desordens neuronais; e o extrato bruto da planta apresenta atividade antiinflamatória, contribuindo para o efeito neuroprotetor em isquemia cerebral atribuído a atividade inibitória em células micróglia (Lee et al., 2006). A potente atividade antioxidante apresentada pela espécie foi atribuída à presença de dois compostos, o flavonóide luteolina (**2**) e o fenilpropanóide glicosilado verbascosídeo (**1**), obtidos na fração acetato de etila do fracionamento do extrato de flores da espécie (Piao et al., 2003).



(1)



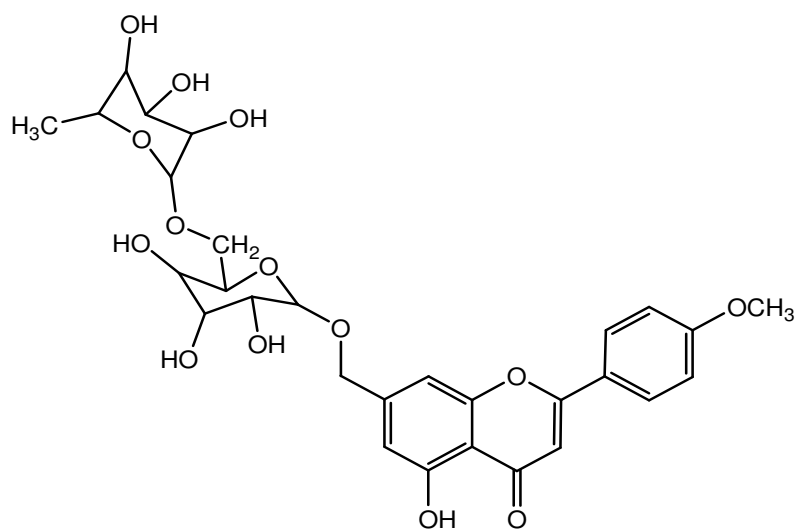
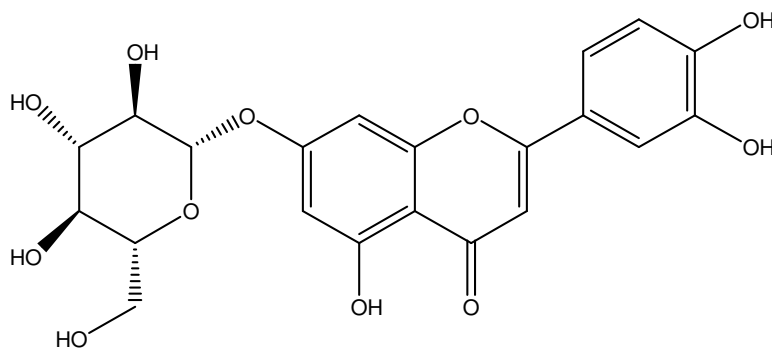
(2)

**Figura 1** – Verbascosídeo (1) e luteolina (2) (metabólitos secundários presentes em *Buddleja officinalis*)

*Buddleja perfoliata* e *Buddleja scordioides*, utilizadas popularmente no tratamento de tuberculose, dores de cabeça e cólicas estomacais e desordens intestinais, demonstraram atividade antiespasmódica em tecidos intestinais de coelhos e porcos (Cortès et al., 2006). O extrato metanólico da espécie *Buddleja scordioides* apresenta ainda atividade fotoprotetora contra raios UV-B, devido principalmente a presença de (1) e do flavonóide linarina (3) (Avila Acevedo et al., 2005).

*Buddleja globosa*, conhecida no Chile como matico, que tem suas folhas popularmente utilizadas na diminuição dos efeitos inflamatórios em úlceras gástricas,

demonstrou atividade analgésica, antiinflamatória e antioxidante devido à presença de **(1)** e 7-*O*-luteolina glicosídeo **(4)**, obtidos através do extrato metanólico (Backhouse et al., 2008; Mensah et al., 2001). A atividade antinociceptiva foi demonstrada pelo estudo com extratos metanólicos e etanólicos da espécie em questão, e mostrou diferenças nos efeitos analgésicos frente à época de coleta da planta, seja no outono ou verão, quando referentes ao extrato etanólico (Backhouse et al., 2008). Esta atividade não é descrita na medicina popular.

**(3)****(4)**

**Figura 2** – Linarina **(3)** e 7-*O*-luteolina glicosídeo **(4)** (metabólitos secundários presentes em *Buddleja scordioides* e *Buddleja globosa*, respectivamente).

*Buddleja cordata*, conhecida no México como “tepozan”, teve identificada atividade inibitória contra a bactéria *Staphylococcus aureus*. Esta atividade biológica foi atribuída a presença do verbascosídeo (**1**) que atua na síntese protéica do microorganismo, utilizando como mecanismo de ação a morte da bactéria por inibição da leucina (Avila et al., 1999).

Do extrato metanólico obtido das folhas de *Buddleja davidii*, o flavonóide isolado (**3**) demonstrou ter atividade inibitória frente à enzima acetilcolinesterase (Fan et al., 2008),

*Buddleja parviflora*, conhecida vulgarmente como “Santa Maria”, é nativa do México, onde é utilizada popularmente no tratamento de feridas, e a decocção de suas raízes é ingerida para o tratamento de hepatite. *Buddleja madagascariensis* é nativa do Madagascar, e suas folhas são utilizadas popularmente no tratamento da asma, tosse e bronquite (Emam et al., 1996).

*Buddleja tucumaniensis* é nativa da Bolívia, onde é conhecida como Yuraq-wasa. As folhas e flores desta espécie são utilizadas na medicina popular para a assepsia de feridas, no tratamento de úlceras e também em transtornos urinários. Seus óleos essenciais têm sido estudados pela sua atividade inseticida contra larvas de *Aedes aegypti* (Lorenzo et al., 2006).

No Brasil, as espécies encontradas são a *Buddleja thyrsoiodes* e a *Buddleja brasiliensis*, ambas nativas do Rio Grande do Sul. A *Buddleja thyrsoiodes*, conhecida vulgarmente como “cambará”, é utilizada na medicina popular para o tratamento de bronquite e tosse, sob a forma de chá de suas folhas ou flores (Mahlke et al., 2009).

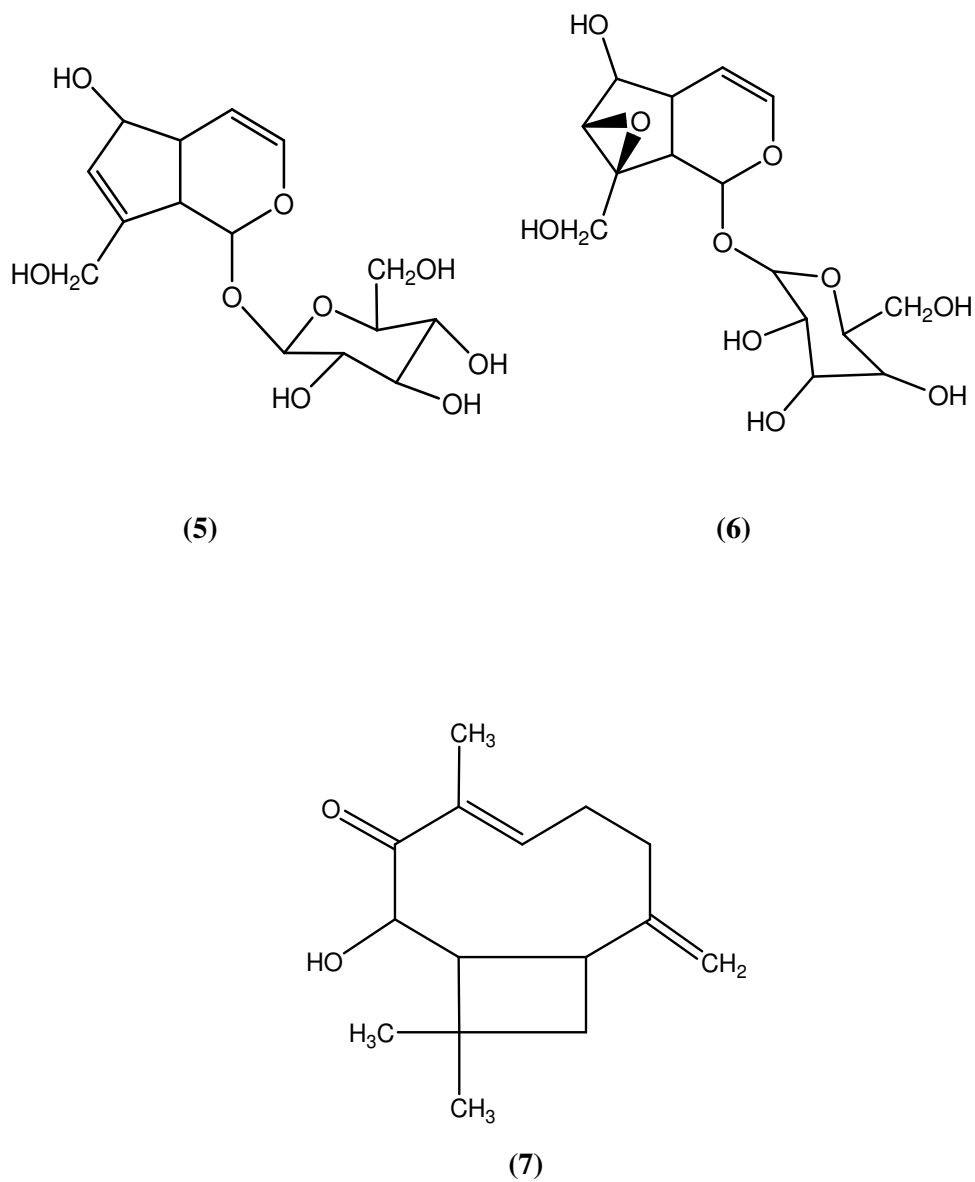
*Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng (Figura 3), é vulgarmente conhecida como verbasco, barbasco, calção de velho, carrosanto, e apresenta um vasto uso na medicina popular, principalmente como antiartrítica, analgésica, antiasmática, antihemorroidal, antireumática, diurética, hemostática, como sedativo e para gripe (Lorenzi H., Matos F.J., 2002). O extrato metanólico desta espécie mostrou atividade inibitória “in vitro” contra a bactéria *Aeromonas hydrophila*, apresentando também atividade em ensaios de microdiluição para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) (Oliveira et al., 2007).



**Figura 3** – *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng (Lorenzi, H., Matos F.J., 2002)

A literatura registra vários metabólitos secundários isolados do gênero *Buddleja*. Dentre as classes de compostos mais usuais no gênero podemos citar monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, iridóides, feniletanóis, flavonóides, óleos essenciais e saponinas (Arciniegas et al., 1997; Houghton et al., 1984; Yoshida et al., 1978; Emam et al., 1997; Guo et al., 2004).

Dos iridóides encontrados no gênero a aucubina (**5**), presente em diversas espécies de *Buddleja*, mostrou atividade na diminuição de edema de orelha induzido; o catapol (**6**) demonstrou um efeito hepatoprotetor ao diminuir a quantidade de glutamato-piruvato transaminase no fígado, e o catapolsídeo (**7**) mostrou inibir a síntese de óxido nítrico induzido em macrófagos, tendo, portanto atividade antiinflamatória; estes metabólitos encontram-se presentes principalmente em *Buddleja globosa*.



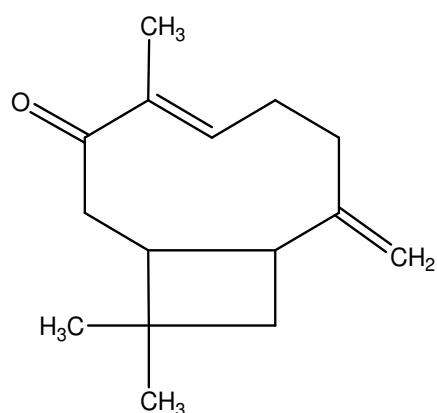
**Figura 4** – Aucubina (5), catapol (6) e catapolsídeo (7) (metabólitos secundários presentes no gênero *Buddleja*)

Sesquiterpenos são encontrados em raízes de algumas espécies de *Buddleja*. Buddledina A (8) e buddledina B (9) são encontradas em *Buddleja globosa* e *Buddleja madagascariensis*, sendo ambas seletivamente ativas contra diversas espécies de fungos, como *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton interdigitale*. O diterpeno buddlejona (10), obtido das raízes de *Buddleja globosa*, também demonstrou

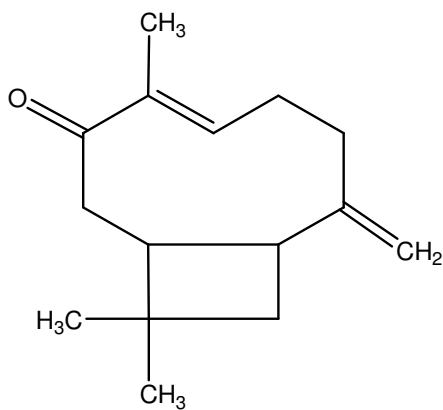


atividade antifúngica contra os exemplares citados acima (Houghton et al, 2003). Saponinas como mimengosídeo C (**11**) e mimengosídeo E (**12**) foram isoladas das flores de *Buddleja officinalis* e demonstraram ter fraca atividade inibitória frente a células leucêmicas HL-60 (Guo et al., 2004). O fenilpropanóide glicosídico verbascosídeo (**1**) apresenta grande atividade antiinflamatória, inibindo a produção de óxido nítrico em macrófagos (Lee et al., 2005).

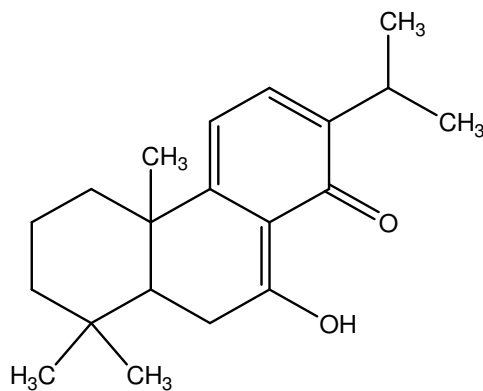
Na figura 5, encontram-se alguns dos metabólitos isolados de diferentes espécies do gênero *Buddleja*.



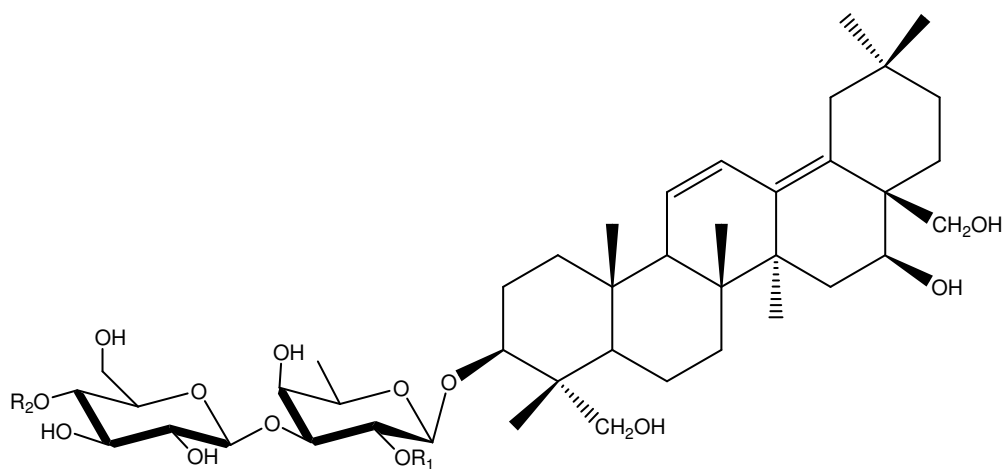
(8)



(9)



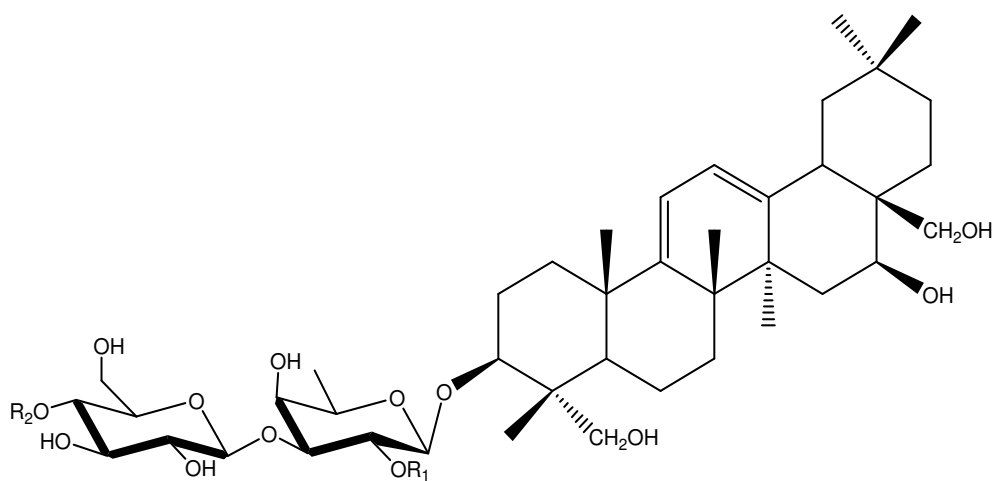
(10)



$R_1 = \text{gli}$

$R_2 = \text{ramn}$

(11)



$R_1 = \text{gli}$

$R_2 = \text{ramn}$

(12)

**Figura 5** – Buddledina A (8), buddledina B (9), buddlejona (10), mimengosídeo C (11) e mimengosídeo E (12) (metabólitos secundários presentes em diferentes espécies de *Buddleja*).

### 3.2 O gênero *Artemisia*

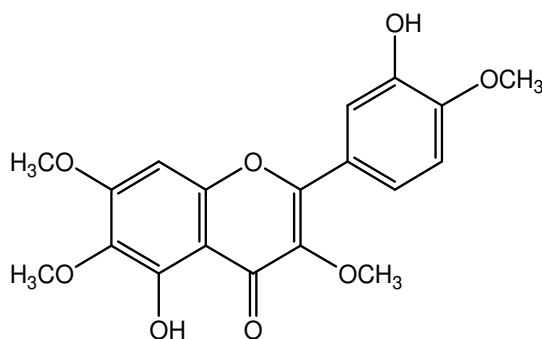
*Artemisia* é um dos maiores gêneros da família Asteraceae, abrangendo em torno de 800 espécies distribuídas ao redor do mundo. Encontram-se algumas das espécies na América do Norte e Central, Europa, Ásia e Norte da África (Judzentiene, A; Buzelyte, J., 2006).

Dentre as atividades popularmente conhecidas, podemos destacar: antimalárica, analgésica, anticonvulsivante, astenia, dispepsia, antipirética, antibacteriana, vermífugo, em dores reumáticas e para anemia (Blagojevic et al., 2006; Bevilaqua et al., 2007; Lorenzi, H., 2002).

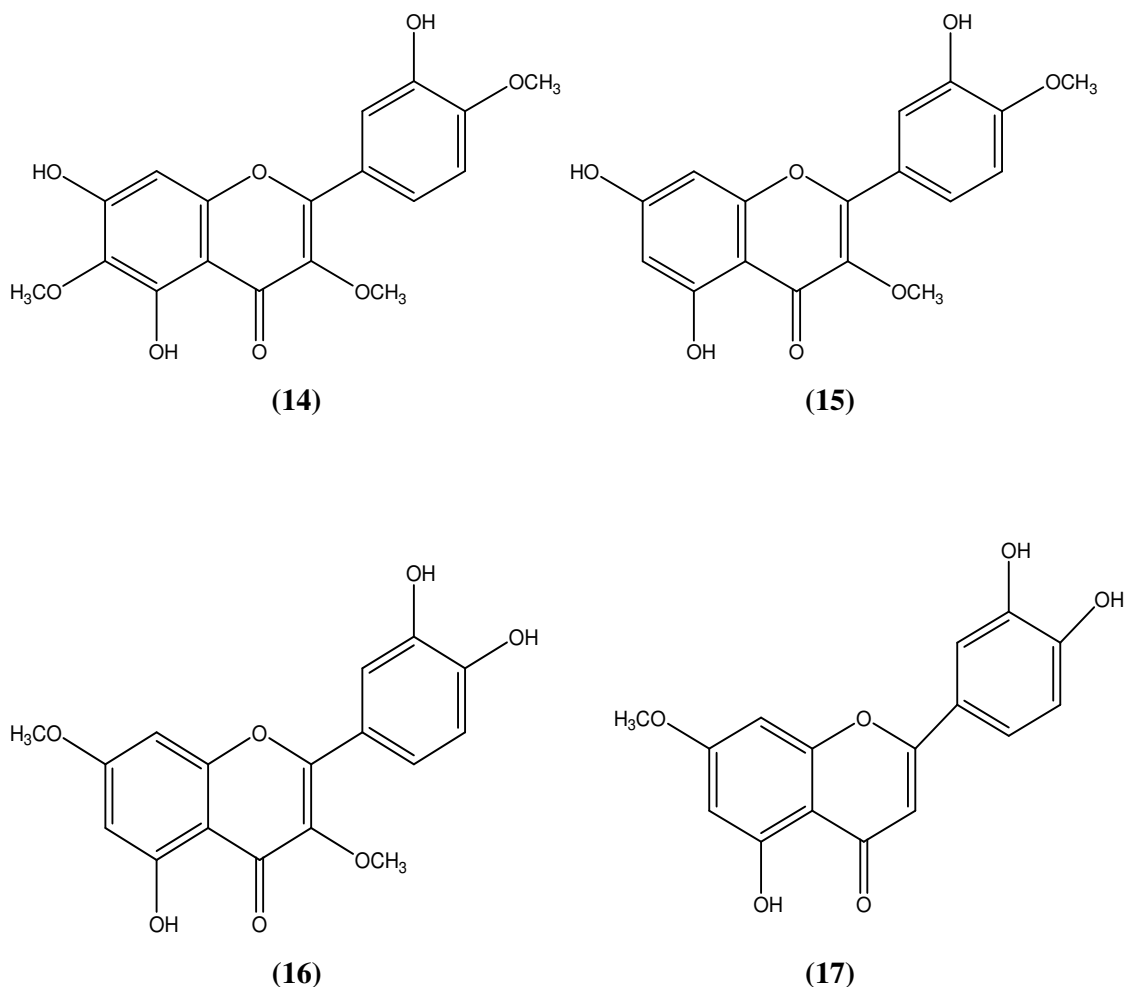
As espécies de maior destaque são: *Artemisia verlotorum* (sinonímia: *Artemisia vulgaris* ou *Artemisia verlotiorum*), *Artemisia annua*, *Artemisia absinthium*, *Artemisia drunculoides*, *Artemisia monosperma*, *Artemisia abrotanum* e *Artemisia tridentata*.

Os compostos ativos do gênero incluem os metabólitos secundários mais usuais na família Asteraceae: sesquiterpenos lactônicos, flavonóides, monoterpenos, diterpenos, triterpenos e cumarinas.

A espécie *Artemisia abrotanum* apresenta atividade antiespasmódica, atribuídas à presença de quatro flavonóides: casticina (**13**), centaureidina (**14**), quercetina 3,4-dimetiléter (**15**) e quercetina 3,7-dimetiléter (**16**). As partes aéreas da espécie *Artemisia monosperma* contém uma flavona, a 7-*O*-metileriodictiol (**17**), com atividade relaxante muscular frente à contração induzida por acetilcolina e oxitocina sendo, portanto, muito utilizada para distúrbios gastrointestinais (Heinrich et al., 1998).



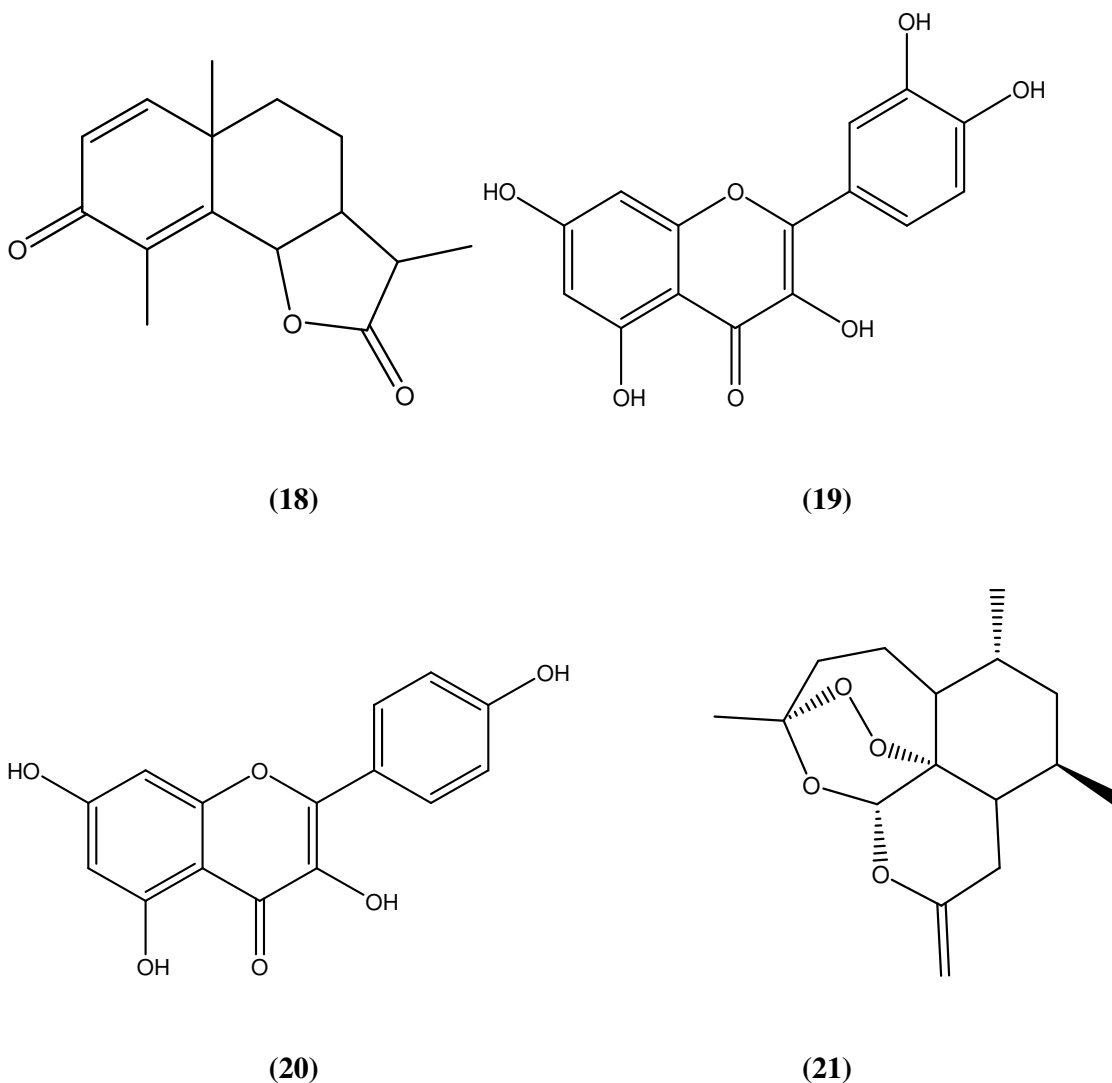
(13)



**Figura 6** – Casticina (13), centaureidina (14), quercetina 3,4-dimetiléter (15) e quercetina 3,7-dimetiléter (16) e 7-*O*-metileriodictiol (17), (metabólitos secundários presentes no gênero *Artemisia*)

A *Artemisia tridentata* é frequentemente utilizada como antihelmíntica, antiséptica e analgésica. Esta espécie é nativa do México sendo vulgarmente denominada “chamiso hediondo”. Muitos dos compostos identificados nesta espécie são farmacologicamente ativos, como por exemplo, a santonina (18), um sesquiterpeno lactônico que apresenta atividade em ascaridíase ou oxiurose, e os flavonoides luteolina (2), quercetina (19) e kaempferol (20), responsáveis pela atividade antiinflamatória (Heinrich et al., 1998).

A espécie *Artemisia annua* nativa da China é vulgarmente chamada de “qinghao” e popularmente é utilizada como antimalárica, principalmente pela presença da artemisina (21), um sesquiterpeno lactônico (ElSohly et al., 1987).



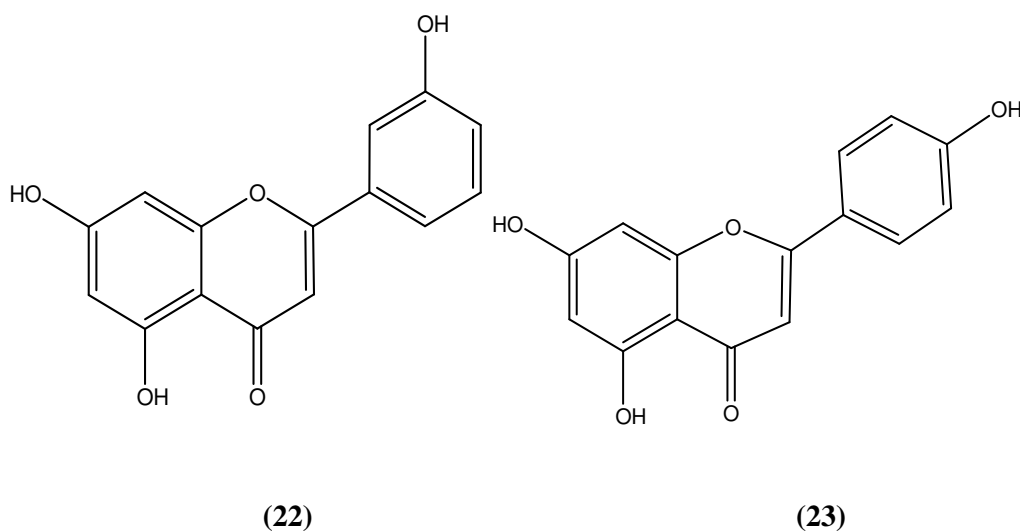
**Figura 7** – Santonina (18), quercetina (19), kaempferol (20) e artemisina (21) (metabólitos secundários presentes em *Artemisia tridentata* e *Artemisia annua*)

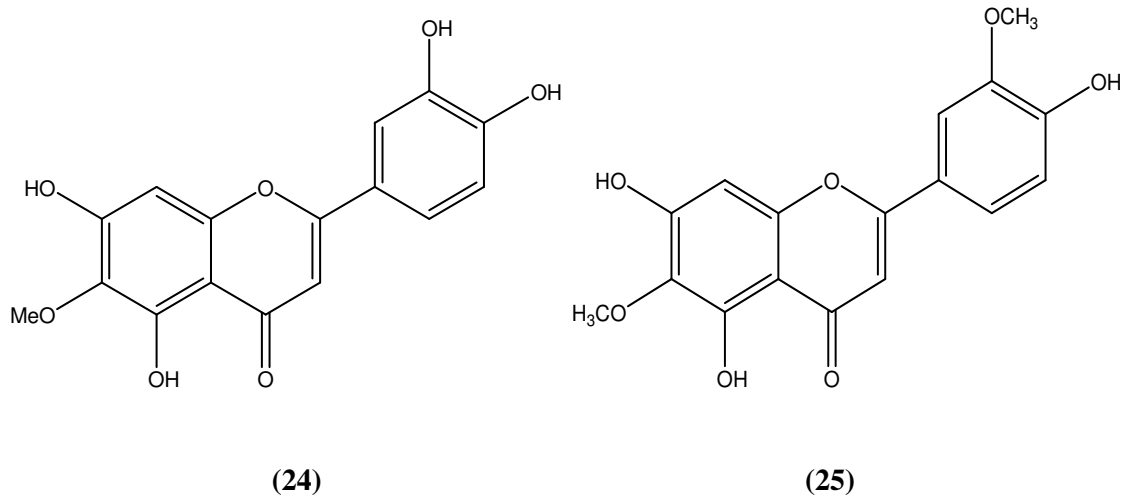
A *Artemisia verlotorum* é uma espécie aromática, perene, herbácea e rizomatosa, originária da Europa ou Ásia e naturalizada em quase todo mundo, onde é conhecida como mugwoth; no Brasil é conhecida como “artemísia”, “losna-brava” ou “absinto-selvagem”, sendo no Rio Grande do Sul também chamada de “infalivina” ou “camomila-romana”. É reconhecida popularmente por seus efeitos analgésicos, antiespasmódicos e anticonvulsivos, além de ser utilizada também para dispepsias, astenias, febre, dores reumáticas, anemia e epilepsia.



**Figura 8** – *Artemisia verlotorum*

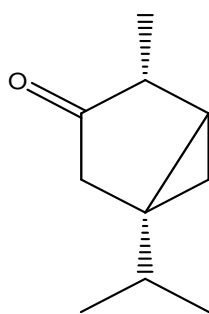
Na sua composição química destacam-se flavonóides, óleos essenciais, e artemisina (**21**) (Lorenzi H., Matos F.J., 2002). Dentre os flavonóides encontrados em maior quantidade estão o eridiol (**22**) e a luteolina (**2**), com quantidades até dez vezes maiores do que qualquer outro flavonóide (Lee et al., 1998). Do extrato aquoso obtido desta espécie, isolaram-se os flavonóides apigenina (**23**), quercetina (**19**), luteolina (**2**), eupafolina (**24**) e jaceosidina (**25**), que mostraram ter ótima atividade inibitória frente à monoamino oxidase (MAO), sendo importante, portanto, para o tratamento da depressão (Lee et al., 2000).



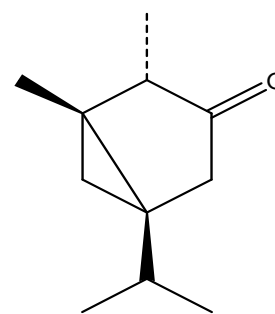


**Figura 9** – Eridioctiol (**22**), apigenina (**23**), eupafolina (**24**) e jaceosidina (**25**), (flavonóides presentes em *Artemisia verlotorum*)

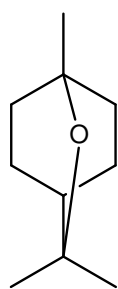
Existe uma relativa diversidade no que diz respeito à composição dos óleos essenciais obtidos de *Artemisia verlotorum*, sendo que a composição mostra uma significativa variação segundo principalmente o país de origem e época da coleta. Alguns estudos mostram que dentre os óleos essenciais obtidos de folhas secas de *Artemisia verlotorum*, coletadas na França, obtiveram-se como compostos majoritários a  $\alpha$ -tujona (**26**) e  $\beta$ -tujona (**27**) (com média de 40 a 57 %) e o 1,8 cineol (**28**) (Vernim et al., 2000). Em plantas colhidas na Itália, os compostos majoritários foram óxido cariofileno (**29**), borneol (**30**), cânfora (**31**) e 1,8 cineol (**28**) (Gurib-Fakim, 1996).



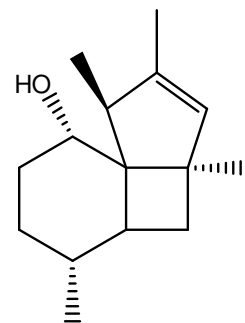
(26)



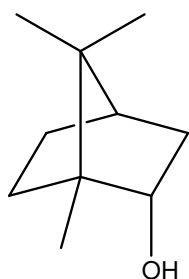
(27)



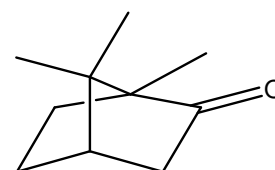
(28)



(29)



(30)

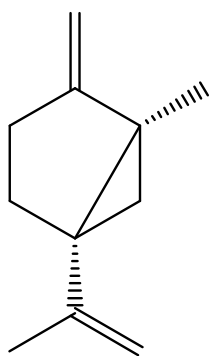


(31)

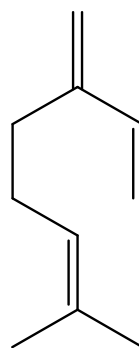
**Figura 10** – Estrutura de alguns componentes de óleos essenciais de *Artemisia verlotorum*

Na Alemanha, o sabineno (32), mirceno (33) e 1,8 cineol (28) foram os compostos majoritários, enquanto que os exemplares obtidos da Índia apresentaram a  $\alpha$ - (26) e  $\beta$ -tujona (27) e a cânfora (31) como majoritários. No norte da Lituânia, os principais componentes foram o sabineno (32),  $\beta$ -pineno (34), 1,8 cineol (28), artemisia cetona (35), cis (36) e trans tujona (37), acetato de crisantenil (38), germacreno D (39) e cariofileno (40), sendo que quanto ao germacreno D (39) e acetato de crisantenil (38), ainda não havia dados na literatura da presença em *Artemisia verlotorum* (Judzentiene et al., 2006).

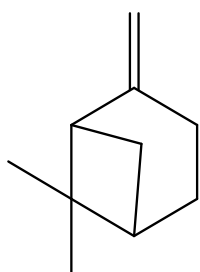




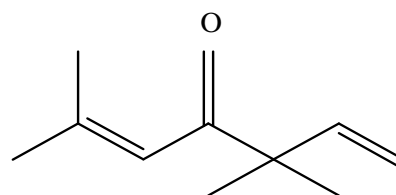
(32)



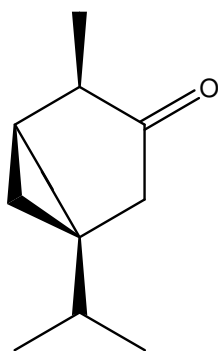
(33)



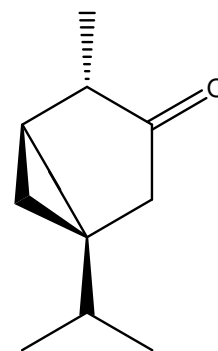
(34)



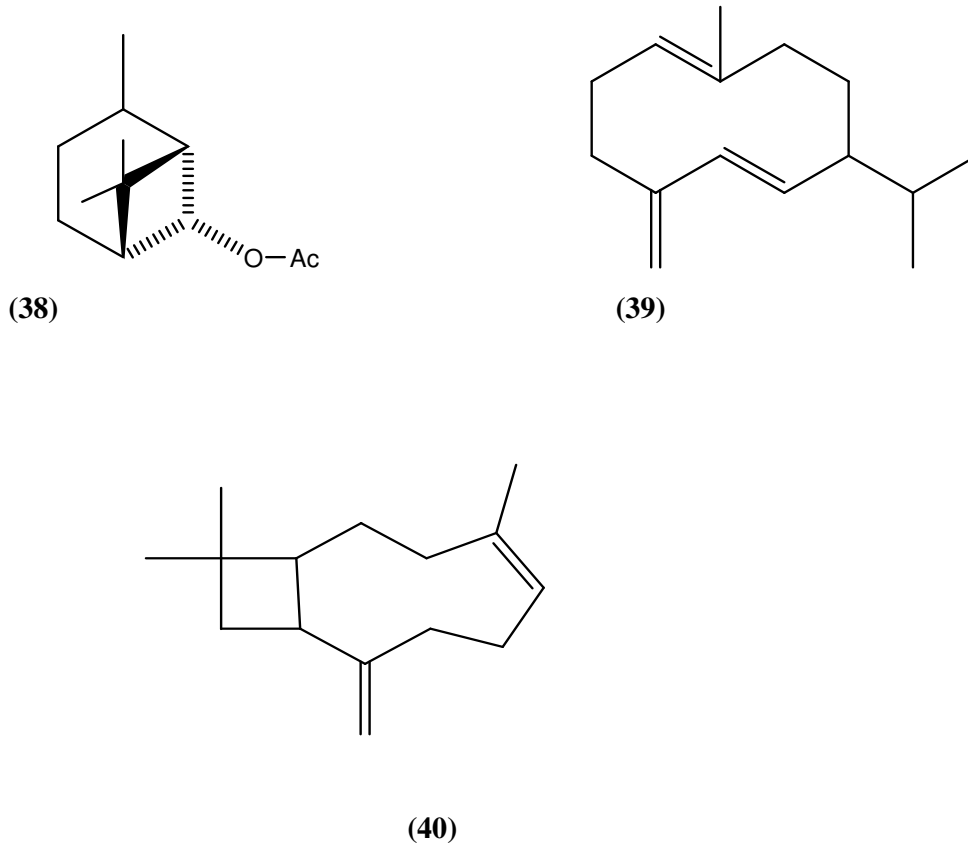
(35)



(36)



(37)



**Figura 11** – Alguns componentes de óleos essenciais extraídos de *Artemisia verlotorum*.

### 3.3 Atividades biológicas

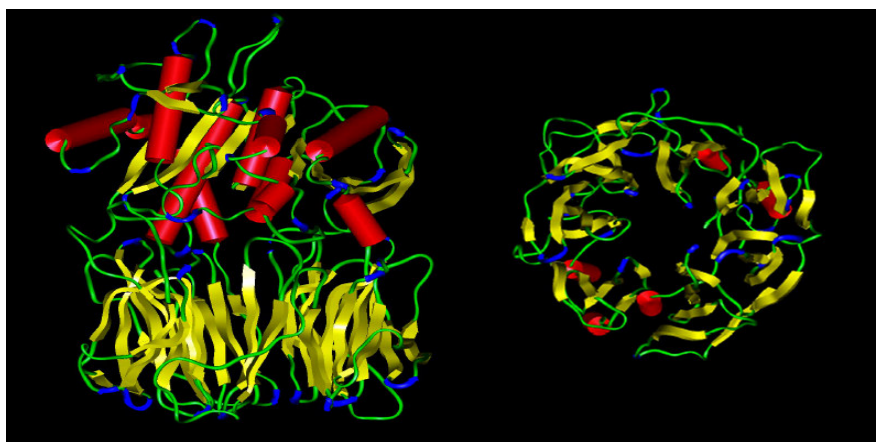
#### 3.3.1 Atividade inibitória enzimática

##### 3.3.1.1 Prolil oligopeptidase (POP)

Estudos recentes têm mostrado que as peptidases desempenham um importante papel na patofisiologia de diversos transtornos psíquicos. Doenças como depressão são diretamente associadas a uma baixa atividade sérica das peptidases, como a prolil oligopeptidase (POP, EC 3.4.21.26), também chamada prolil endopeptidase (PEP). Outros transtornos como

esquizofrenia, mania, mal de Alzheimer e desordem de estresse pós-traumático, por outro lado, apresentam um aumento na atividade sérica da POP (Maes et al., 1998).

A POP é uma enzima encontrada em uma gama de espécies e tecidos, mas principalmente no cérebro humano. Ela pertence à subfamília S9a, e foi a primeira enzima desta família a ser descoberta, purificada e caracterizada. O mecanismo de ação da enzima baseia-se na sua capacidade de clivar sequências peptídicas no carbono terminal da prolina com menos de 30 resíduos de aminoácidos (ligações Pro-Xaa), como por exemplo, vasopressina e substância P, e por este motivo é também denominada “Post-Proline Cleaving Enzyme”. O sítio ativo da enzima encontra-se na cavidade entre os domínios (Fülöp et al., 2006, Yanai et al., 2003) (Figura 12).

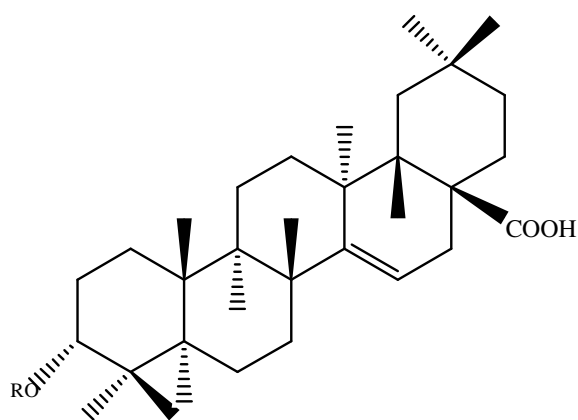


**Figura 12** – Estrutura tridimensional da enzima prolil oligopeptidase (POP). (Imagem cedida pelo grupo do Prof. Ernest Giralt – Barcelona, 2008).

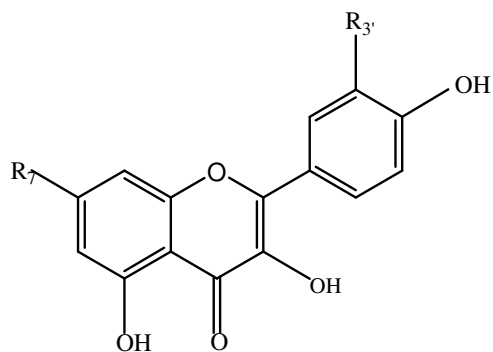
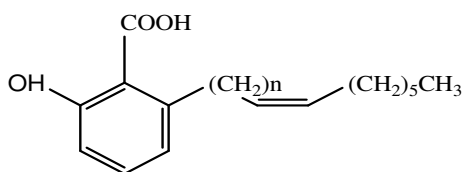
Frente à importância clínica relacionada às desordens a que está ligada, a descoberta de inibidores da POP é de extrema valia. Diversos compostos sintéticos têm sido propostos como inibidores, como Z-Pro-Prolina1 e S-17092-1, sendo potencialmente utilizados no tratamento de diversos distúrbios neurológicos (Shishido et al., 1999; Bellemère et al., 2005). Entretanto, até o presente momento há poucos estudos no que diz respeito a descoberta de inibidores naturais da POP (Lee et al., 2004, Sultanova et al., 2004, Tarragó et al., 2006, Tarragó et al., 2007).

Recentemente, foram isolados inibidores naturais extraídos de vinho, queijo, peixe, folhas de *Ginkgo biloba* e de partes aéreas de *Tamarix hispida* Wild (Lee et al., 2004, Sultanova et al., 2002). Três compostos isolados da *Tamarix hispida* demonstraram atividade

inibidora da POP. Primeiramente foi isolado um terpenóide pentacíclico denominado ácido 3 $\alpha$ -(3'',4''-diidroxitrans-cinamoiloxi)-D-friedolan-14-en-28-oico (**41**). Também foram isolados outros dois compostos, a rhamnocitrina (**42**) e a isorhamnetina (**43**) (Sultanova et al., 2002). Os compostos isolados da fração hexano das folhas de *Ginkgo biloba* foram os ácidos 6-(8'Z-pentadecenil)salicílico (**44**) e o 6-(10'Z-heptadecenil)salicílico (**45**). Também apresentaram capacidade inibidora da POP a baicaleína (**46**), flavonóide isolado das raízes da *Scutellaria baicalensis* (Tarragó et al., 2008), e a berberina (**47**), um alcalóide isolado do extrato de *Rhizoma coptidis* (Tarragó et al., 2007).

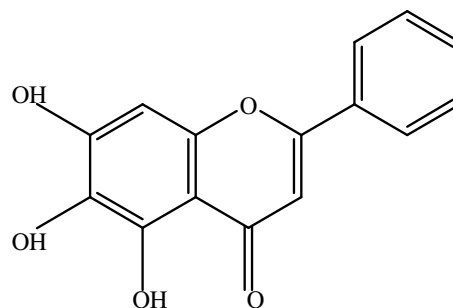


(41)

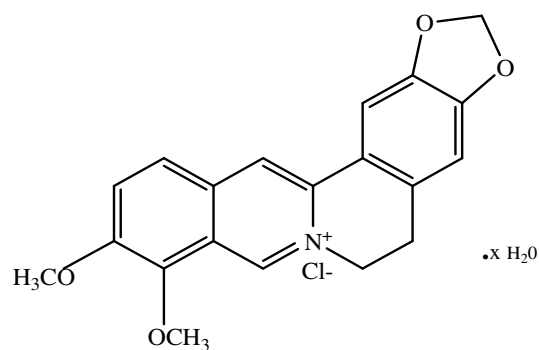
(42) R<sub>7</sub> = OCH<sub>3</sub>; R<sub>3'</sub> = H(43) R<sub>7</sub> = OH; R<sub>3</sub> = OCH<sub>3</sub>

(44) n = 7

(45) n = 9



(46)

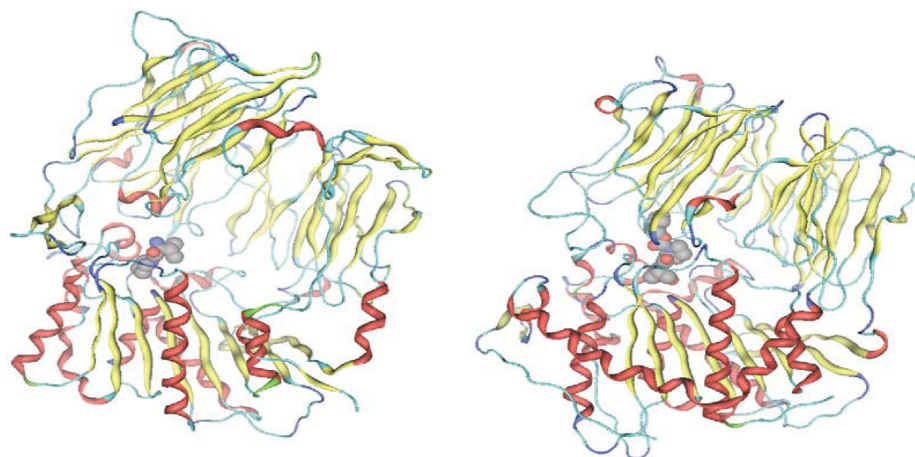


(47)

**Figura 13** – Inibidores naturais isolados de *Tamarix hispida*, *Ginkgo biloba*, *Scutellaria baiacalensis* e *Rhizoma coptidis*

### 3.3.1.2 Dipeptidil peptidase IV (DPP IV)

DPP IV (EC 3.4.14.5) é uma glicoproteína que cliva dipeptídeos N-terminais quando o penúltimo aminoácido for prolina (Pro) > alanina (Ala) (De Meester et al., 1992; Vanhoof et al., 1992). Esta enzima pertence à família Sb9 da proilil oligopeptidase (POP) (Figura 14) e localiza-se na superfície das células (Fülöp et al., 2006).



**Figura 14** – Comparação entre as estruturas da DPP IV (esquerda) e POP (direita). (Rosenblum & Kozarich, 2003).

A DPP IV possui um importante papel em diversas funções fisiológicas, como ativação ou inativação de peptídeos, no processamento de polipeptídeos e proteínas e no tratamento renal de peptídeos contendo prolina (Vanholf et al., 1992, Yaron & Naider, 1993). Também apresenta a propriedade, ainda que com menor eficiência, de clivar dipeptídeos N-terminais com glicina, valina, deidroprolina, hidroxiprolina, leucina ou treonina como penúltimo aminoácido (Lambeir et al., 2003).

Inibidores da DPP IV, por agirem como estimulantes indiretos de secreção da insulina, tem sido considerados de extrema importância para o tratamento da diabetes tipo 2 (Deacon et al., 2004). O diabetes mellitus é uma doença metabólica crônica, que tem origem na falha ou na dificuldade em secretar insulina, causada por uma desregulação em células  $\beta$  (Giorgino, 2006). Dois hormônios insulíntrópicos, o GLP-1 (glucagon insuline-like) e o GIP (polipeptídeo insulíntrópico dependente de glicose), são secretados no intestino delgado em resposta à ingestão da refeição, e agem em receptores específicos das células  $\beta$ . Ambos são metabolizados pela enzima DPP IV, que é encontrada não apenas nas membranas das bordas em escova dos rins e intestino delgado, como em outros tecidos como hepatócitos e células epiteliais do pâncreas, além em forma solúvel no plasma. DPP IV cliva GLP-1 e GIP no N-terminal, ocorrendo formação de metabólitos, e esta clivagem pode ser bloqueada por inibidores da DPP IV, resultando em um aumento da concentração plasmática dos peptídeos intactos e melhor tolerância à glicose (Deacon et al., 1994; Deacon et al., 2000; Mentlein et al., 1999; Pederson et al., 1996; Deacon et al., 1998; Deacon et al., 2001; Pospisilik et al., 2002).

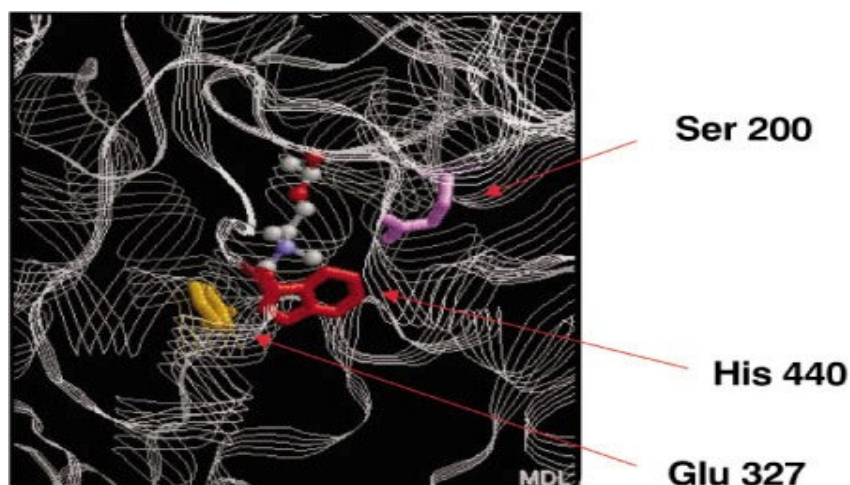
Tanto a enzima POP quanto a DPP IV, por pertencerem à mesma família das serina-proteases, apresentam sítios ativos espacialmente muito semelhantes, o que faz com que muitos dos inibidores de uma enzima atuem na inibição da outra também. Desta forma, é de extrema relevância que se encontrem inibidores específicos e seletivos para cada uma destas enzimas, e por este motivo trabalha-se com ambas concomitantemente, a fim de se descobrir a seletividade de possíveis inibidores (Deacon et al.; 2004).

### 3.3.1.3 Acetilcolinesterase (AChE)

A Acetilcolina (ACh) é um neurotransmissor conhecido por ser essencial para os processos envolvidos na memória. Uma anormalidade nos níveis deste neurotransmissor

mostra contribuir para o comprometimento cognitivo e os distúrbios comportamentais característicos da doença de Alzheimer. (Borloz et al., 2006). Dados epidemiológicos indicam um aumento potencial considerável da doença nas próximas duas décadas. Ela afeta em torno de 5% das pessoas acima dos 65 anos, subindo para 20% para pessoas acima dos 80 anos. Diversas estratégias de tratamento têm sido pesquisadas, e todas se baseiam no fato que o comprometimento da memória desses pacientes deve-se a uma queda das funções colinérgicas no cérebro, uma vez que a neurotransmissão colinérgica é especialmente afetada em pacientes com esta enfermidade. Uma das abordagens mais promissoras no que diz respeito ao tratamento da doença é aumentar os níveis de acetilcolina no cérebro, utilizando inibidores da acetilcolinesterase (Barbosa Filho et al.; 2006).

A acetilcolinesterase é uma enzima substrato-específica que degrada a acetilcolina na fenda sináptica, regenerando-a em colina, seu precursor (Borloz et al., 2006; Viegas et al., 2004). Os inibidores da acetilcolinesterase agem fosforilando um resíduo do sítio ativo da enzima, uma vez que o sítio ativo da AChE (Figura 15) é composto por uma tríade catalítica composta por resíduos de aminoácidos serina (Ser-200), histidina (His-440) e glutamato (Glu-327), tendo como resultado colina livre e serina acetilada (Viegas et al., 2004).



**Figura 15** – Visão do sítio ativo da Acetilcolinesterase

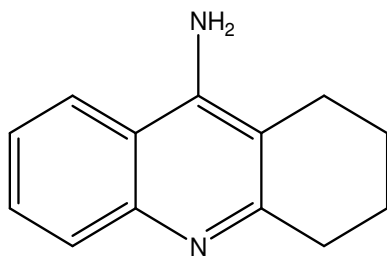
Os inibidores da acetilcolinesterase são, portanto, uma das fontes mais recentes para o desenvolvimento de fármacos voltados ao tratamento da doença de Alzheimer (Fan et al., 2008).

Vários inibidores da acetilcolinesterase têm sido investigados para o tratamento da doença de Alzheimer. Entretanto, até o momento, somente tacrina (48), donepezil (49), rivastigmina (50) e galantamina (51) foram aprovados pela FDA (Food and Drug Administration) nos Estados Unidos. Uma desvantagem destas drogas é que apresentam muitos efeitos colaterais, sendo, portanto, de extrema importância que se encontrem mais fontes naturais de inibidores para que se tornem candidatas a drogas (Barbosa Filho et al.; 2006).

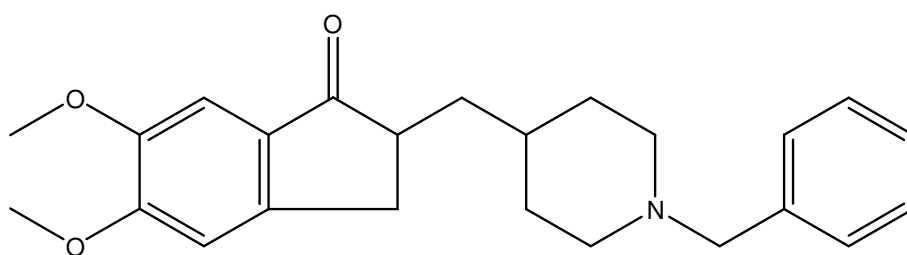
A Huperizina A (52) foi o primeiro inibidor natural da AChE isolado de uma espécie utilizada na medicina chinesa, a *Huperzia serrata*, em 1986. Ela é um inibidor seletivo da acetilcolinesterase, potente e reversível, com rápida absorção e penetração no cérebro dos animais testados. Em comparação com a tacrina, a galantamina e o donepezil, ela apresenta maior índice terapêutico e duração da ação. Na China, Huperezina A (52) já foi aprovada como uma droga paliativa no tratamento da doença de Alzheimer.

Um recente estudo desenvolvido por Trevisan e colaboradores (2003) com plantas nativas do Brasil, mostrou excelentes resultados na busca de inibidores naturais da AChE com as espécies *Amburana cearensis*, *Lippia sidoides*, *Paullinia cupana*, *Plathymiscium floribundum* e *Solanum asperum*. Em um trabalho publicado em 2006 por Barbosa Filho, a literatura das plantas e dos metabólitos secundários isolados de plantas foi revisada em relação à identificação de inibidores da acetilcolinesterase. Foram analisadas 309 plantas e 260 substâncias isoladas de plantas, sendo estas classificadas em grupos químicos adequados e modelos testados e quanto à atividade. Neste trabalho observou-se que a maior parte dos extratos de plantas testados mostravam atividade inibitória da AChE. Destacaram-se neste estudo plantas Amaryllidaceae, Apiaceae, Asteraceae, Fabaceae e Fumariaceae como as famílias mais estudadas quanto à atividade anticolinesterásica. Considerando-se que a maioria dos inibidores da acetilcolinesterase contém nitrogênio em sua estrutura, a atividade de muitos extratos estudados foi atribuída ao seu alto conteúdo de alcalóides, pois este é o maior grupo de metabólitos secundários isolado das espécies estudadas e mostram importante atividade inibitória da enzima. Além dos alcalóides, outros compostos naturais encontrados na literatura que foram avaliados por exercer inibição da enzima em questão pertencem às classes dos monoterpenos, cumarinas, triterpenos e flavonóides (Barbosa Filho, 2006).

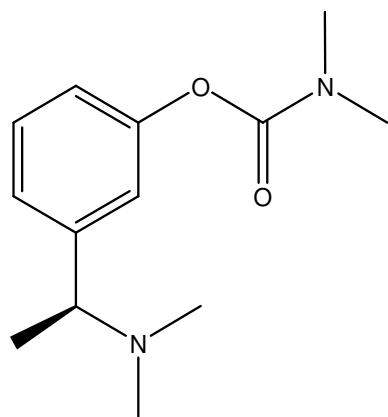




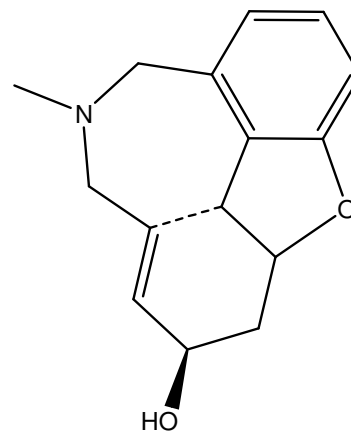
(48)



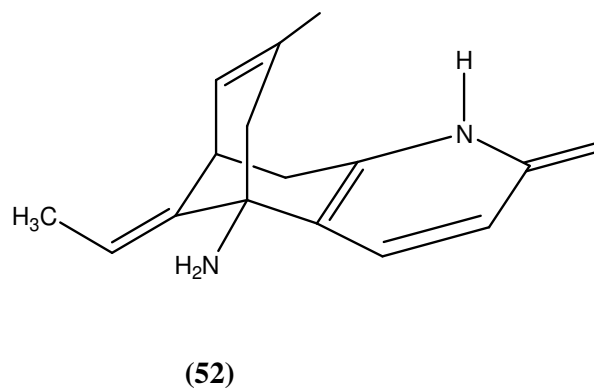
(49)



(50)



(51)



**Figura 16** – Tacrina (48), donepezil (49), rivastigmina (50), galantamina (51) e Huperizina A (52) (compostos sintéticos e naturais que apresentam efeito inibidor da enzima acetilcolinesterase) (Barbosa Filho, 2006).

### 3.3.2 Atividade antimicrobiana

#### 3.3.2.1 Microrganismos patogênicos

Nos últimos anos, as pesquisas com o propósito de obter novos medicamentos a partir de plantas, ou o aprimoramento em fitoterápicos já existentes vem reassumindo papel importante. A presença de substâncias antimicrobianas em compostos naturais não é um fator recente, embora somente com a descoberta da penicilina esta busca ganhou um novo impulso. Atualmente, diversos trabalhos têm sido realizados na busca de plantas com atividade antimicrobiana (Silveira et al., 2009; Michelin et al., 2005).

Neste trabalho, foram utilizadas duas metodologias para a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato bruto e das frações das espécies estudadas: Concentração Inibitória Mínima por microdiluição (CIM) e Concentração Letal Mínima (CLM).

O método de Concentração Inibitória Mínima é a menor concentração do composto que inibe o crescimento de microorganismos (bacteriostático). É um ensaio quantitativo que é utilizado tanto para avaliação da potência da atividade antimicrobiana de substâncias puras ou misturas.

O método de Concentração Letal Mínima é a menor concentração da substância que alcança uma redução maior que 99,9 % do número de unidades formadoras de colônia (UFC).

Dentre os microorganismos mais testados em ensaios de atividade antimicrobiana destaca-se a *Candida albicans*, um fungo que pode tanto ser um comensal como um patógeno oportunista com habilidade para causar uma variedade de infecções, desde mais superficiais até outras mais ameaçadoras. A candidíase atinge desde pacientes com diabetes, com imunodeficiência adquirida quanto a pacientes que fazem uso de antibióticos de amplo espectro (Ramage et al., 2002). *Cryptococcus neoformans* é o fungo causador da criptococose, infecção considerada esporádica, mas distribuída mundialmente, e que é onipresente no solo, o que fornece um reservatório de leveduras inaláveis. As condições mais favoráveis a um indivíduo apresentar a infecção é a presença do vírus da imunodeficiência humana (HIV), tratamento extensivo com corticóides e leucemia mielóide crônica (Mitchell et al., 1995).

*Saccharomyces cerevisiae* é uma levedura unicelular, de brotamento, com característica esférica e oval, encontrada amplamente na natureza como um pó branco cobrindo folhas e frutos (Tortora et al., 2005). Utilizado comumente na fermentação alcoólica, além de ser utilizado também na produção de diversos tipos de proteínas como a vacina contra a hepatite B.

*Staphylococcus aureus* é uma bactéria encontrada normalmente na pele e mucosas de seres humanos e animais (Morris et al., 2006). É responsável por infecções cutâneas como furúnculos, impetigo, infecções mediadas por toxinas como intoxicações alimentares, além de artrite séptica, pneumonia e endocardite (Murray et al., 2004).

*Staphylococcus epidermidis* é uma bactéria gram positiva, considerada por muito tempo como relativamente inócua, mas hoje é claramente aceita como patógeno e oportunista, presente na pele e que normalmente infectam pacientes comprometidos, como imunodeficientes (pacientes com HIV e recém nascidos prematuros). A porta de entrada para as infecções é causada por cateteres endovenosos e dispositivos ortopédicos (Cuong Vuong et al., 2002).

*Bacillus subtilis* é uma bactéria presente no solo como esporos ou células vegetativas, e que se proliferam para alimentos, plantas e animais sempre que houver condições favoráveis. É a espécie do gênero *Bacillus* mais conhecida e mais patogênica aos humanos (Stein et al., 2005; Trabulsi et al., 2004). *Streptococcus pyogenes* é uma bactéria gram-positiva cuja faringite causada por ela é uma das doenças do trato respiratório que mais acometem crianças, e normalmente são bem tratadas com penicilina (Bingen et al., 2004).

*Escherichia coli* é uma bactéria anaeróbia facultativa na forma de bacilos gram negativos. Considerada como um habitante comum do trato intestinal, ela torna-se patogênica

quando frente à violação do aparelho gastrointestinal, podendo causar gastroenterite, infecções das vias urinárias, sepse e meningite neonatal (Nataro&Kaper, 1998; Tortora et al., 2005). A *Klebsiella pneumoniae* é uma bactéria gram negativa conhecida por ser frequentemente a causa de infecções hospitalares, chegando a ser responsável por até 29 % dos casos (Pereira et al., 2003). Pode causar um tipo grave de pneumonia lobar, sendo mais freqüente em pessoas com funções pulmonares comprometidas e alcoolistas (Tortora et al., 2005).

#### **4 ARTIGO CIENTÍFICO**

**Verbascosídeo: um inibidor da prolil oligopeptidase oriundo de *Buddleja brasiliensis*  
Jacq. ex. Spreng**

Artigo 1

**Verbascoside: a prolyl oligopeptidase inhibitor from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex  
Spreng.**

Augusto Gitzel Filho, Ademir F. Morel, Luciana Adolpho, Vinícius Ilha, Ernest Giralt,  
Teresa Tarragó, Ionara I. Dalcol

(Submetido à Planta Medica)

**Verbascoside: a prolyl oligopeptidase inhibitor from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng.**

Augusto Gitzel Filho<sup>1</sup>, Ademir F. Morel<sup>1</sup>, Luciana Adolpho<sup>1</sup>, Vinícius Ilha<sup>1</sup>, Ernest Giralt<sup>2</sup>,  
Teresa Tarragó<sup>2</sup>, Ionara I. Dalcol<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais- NPPN, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria- RS, Brazil

<sup>2</sup> Institute for Research in Biomedicine. Barcelona Science Park. Barcelona, Spain

---

**\* Address for correspondence**

Profa. Ionara Irion Dalcol

Universidade Federal de Santa Maria

Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais. Departamento de Química. Campus - Camobi

CEP: 97105-900. Santa Maria, Brazil

Tel.: + 55-220-8869; fax + 55-220-8031

*E-mail address: iidalcol@gmail.com*

**Abstract**

The phenylpropanoid glycoside verbascoside [2-(3,4-dihydroxyphenylethyl)-1-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-(4- *O*-caffeyl)-glucopyranoside] (**1**) has been isolated as main constituent of the crude extract of *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng and evaluated for inhibition of the enzymes acetylcholinesterase (AChE), dipeptidil peptidase-IV (DPP-IV) and prolyl oligopeptidase (POP). Compound **1** showed weak activity against DPP-IV with  $IC_{50} >> 150 \mu\text{M}$  and was inactive against AChE, with a pMIQ determined by bioautography of 9.6. In contrast, **1** displayed significant inhibition of POP in a dose-dependent manner with  $IC_{50}$  value of  $1.3 \pm 0.2 \mu\text{M}$ , similar to the positive control baicalin with POP  $IC_{50}$  of  $12 \pm 3 \mu\text{M}$ .

**Keywords:** *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng, prolyl oligopeptidase, dipeptidyl peptidase IV, acetylcholinesterase, POP inhibitors.

## Introduction

Several studies have addressed the chemistry of the genus *Buddleja*, known for its pharmacological activity and use in traditional folk medicine [1-2]. *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng., commonly known as “verbasco, calção-de-velho”, is autochthonous to Rio Grande do Sul, Southern Brazil, and is widely used in folk medicine as an antidepressant, sedative, antiarthritic, antiasthmatic, antihemorrhoidal, and hemostatic agent [3].

The search for new active compounds derived from medicinal plants has led to the discovery of several structurally different enzymatic inhibitors, such as galanthamine [4] and baicalin [5], strong inhibitors of acetylcholinesterase (AChE; EC 3.1.1.7) and prolyl oligopeptidase (POP; EC 3.4.21.26), respectively. AChE is a membrane-bound enzyme involved in cholinergic synapses in the central and peripheral nervous system. It is responsible for the hydrolysis of acetylcholine, thereby decreasing the levels of the latter and causing Alzheimer’s disease, glaucoma and the myasthenia gravis [6]. POP is a cytosolic serine endoprotease that hydrolyses small proline-containing peptides [7]. Given the neuroprotective and cognition-enhancing effects of POP inhibitors, it was proposed that these compounds are of value for the treatment of clinical conditions such as the cognitive disturbances present in neuropsychiatric and neurodegenerative diseases [8-9]. However, to date few studies have addressed the discovery of natural inhibitors of POP [5,10-11]. Another important serine protease, dipeptidyl peptidase IV (DPP IV; EC 3.4.14.5), target in the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM), also cleave bioactive substrates after proline residues [12]. Despite the low amino acid sequence homology of POP and DPP IV, they share similar three-dimensional structures, and for this reason same compounds might be able to inhibit both enzymes. Thus, the specificity of an inhibitor against POP can be studied using DPP IV [5].



Here we describe the fractionation and the enzymatic analysis of the hydroalcoholic extract from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng. The fractionation of the crude extract resulted in the isolation of the phenylpropanoid glycoside **1**. We evaluated the inhibitory capacity of this compound against AChE, POP and DPP IV.

The hydroalcoholic extract of *B. brasiliensis* and the main fractions obtained using solvents with increasing polarity were submitted to inhibition assays. A TLC bioautographic assay was applied to screen for AChE inhibition [13], while fluorimetric assays were used to estimate POP and DPP IV inhibition [14-15]. We evaluated in a first screening the enzymatic activity of each main fraction at 100 µg/mL, and identified those containing active compounds. Fractions F4 and F13 showed the highest POP inhibitory capacity (Table 1). The DPP IV assay showed low inhibitory activity of fractions, in the range of 38-14%. Given that several natural compounds are inhibitors of AChE [16], we also analyzed the capacity of the crude extract and main fractions of *B. brasiliensis* to inhibit AChE. The results indicated that only the fractions F4 and F13 at 25 µg showed areas of enzyme inhibition in the TCL.

The active F4 was fractionated by CC on silica gel, obtaining a compound characterized by HPLC-MS, <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR as the phenylpropanoid **1**. This compound has been isolated before in some species of *Buddleja*, such as *B. cordata* [17] and *B. scordioides* [18]. Several studies have shown that **1** has various biological activities, such as analgesic [19], anti-inflammatory [20], photoprotective [18], antimicrobial [17], and cytotoxicity against various tumor cells [21]. The enzymatic assays performed in this work indicated that **1** is a potent POP inhibitor, but it does not inhibit the DPP-IV and AChE.

In the assay performed with DPP IV, **1** showed weak activity against this enzyme (IC<sub>50</sub>>> 150 µM). Evaluation of **1** against AChE was performed using a bioautographic method

validated by Mroczek [13, 22], where the bioactivity is estimated from the calculated pMIQ (the negative logarithm of the minimal inhibitory quantity in mole that produced a spot with the least observable whiteness). The limit estimated for AChE inhibitory in TLC assay was set at a pMIQ of 10.5, and compounds presenting a pMIQ above this cut-off value were considered active [23]. The positive controls galanthamine and physostigmine gave pMIQ values of 11.38 and 11.66 respectively, while verbascoside **1** (pMIQ of 9.6) is inactive against AChE. In contrast, **1** showed a significant POP inhibitory activity, with an  $IC_{50}$  = 1.3  $\mu$ M (95% confidence interval was from 0.7 to 2.4  $\mu$ M), similar to that observed for the natural inhibitor baicalin, which  $IC_{50}$  obtained in the same experimental conditions was  $12 \pm 3$   $\mu$ M. The POP inhibitory activity of **1** is comparable also to 6-(8'Z-pentadecenyl)salicylic acid ( $IC_{50}$  = 0.87  $\mu$ M) and to 6-(10'Z-heptadecenyl)-salicylic acid ( $IC_{50}$  = 0.80  $\mu$ M), compounds isolated from *Ginkgo biloba* leaves [24]. However, these compounds were evaluated using bacterial POP from *Flavobacterium meningosepticum* and therefore the values may differ from those obtained for human POP.

In summary, here we isolated the phenylpropanoid verbascoside **1** as main constituent of the medicinal plant *B. brasiliensis* and provide for the first time evidence of its strong and selective inhibition of POP in a dose-dependent manner. Given the potent pharmacological action of **1**, we propose that this compound presents potential therapeutic value for the treatment of cognition deficits present in neurological disorders.

## Materials and Methods

*B. brasiliensis* Jacq. ex Spreng was collected in Santa Maria - Rio Grande do Sul, Brazil, in September 2008. The plant was identified by Prof. Dr. Thais Scotti Canto Dorow and a voucher specimen (n° 11461) was deposited in the herbarium at the *Universidade Federal de Santa Maria*.

Dried roots and aerial parts of *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng (1415 g) were subjected to exhaustive extraction at ambient temperature with methanol:water (8:2) to afford 172.6 g of crude extract (12.2 % yield). 17 g of the crude extract was subjected to CC on silica gel, eluting with *n*-hexane, dichloromethane, dichloromethane:ethyl acetate (1:1), ethyl acetate, ethyl acetate:methanol (1:1), methanol, methanol:H<sub>2</sub>O (9:1), methanol:H<sub>2</sub>O (4:1), to afford 12 fractions: F1 (0.02 g), F2 (0.24 g), F3 (0.64 g), F4 (3.87 g), F5 (2.48 g), F6 (1.03 g), F7 (1.49 g), F8 (0.99 g), F9 (1.70 g), F10 (2.84 g), F11 (0.13 g), F12 (0.64 g), and F13 (0.06 g). Fraction F4 (1.69 g; obtained from AcOEt: MeOH 1:1) was subjected to CC using Sephadex LH20 as stationary phase and MeOH as mobile phase, resulting in 7 fractions. Fraction 5-10 (1.5 g) was chromatographed over silica gel column (column B) with a CHCl<sub>3</sub>-MeOH solvent system to give 14 fractions, among these B30-40 (270 mg) and B41-49 (332 mg). Fraction B30-40 (260 mg) was further purified on a silica gel column eluting with AcOEt- MeOH to afford 49 mg of the compound **1**. Fraction B41-49 (210 mg) was chromatographed on CC using as stationary phase silica gel with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-AcOEt-MeOH to yield 54 mg of impure **1**, which was recrystallized from methanol:chloroform. The HPLC-MS spectra of the **1** indicated a MW of 624.24 u. Further characterization by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR allowed us to identify **1** as verbascoside [2-(3,4-dihydroxyphenylethyl)-1-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-(4-*O*-caffeyl)-glucopyranoside]. Copies of the original spectra are obtainable from the author of correspondence.

The POP and DPP IV activity assays were performed in 96-well microplates following the methods described by Toide et al. [14] and Checkler et al. [15], respectively. AChE bioautographic assay was adapted from Marston and Hostettmann [13].

### **Acknowledgment**

The study was supported by CAPES-Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Ministério da Educação do Brasil), MECD (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte de España), MCI-FEDER (BIO2008-00799), Fundació la Marató de TV3 and the Generalitat de Catalunya (CeRBa and 2005SGR-00663).

### **Supporting Information**

Detailed analytical data relative to identification of **1** and the protocols for the enzymatic assays are available as Supporting Information.

## References

- <sup>1</sup> *Matsuda H, Cai H, Kubo M, Tosa H, Iinuma M.* Study on anticataract drugs from natural sources. 2. Effects of *Buddlejae flos* on in-vitro aldose reductase-activity. *Biol Pharm Bull* 1995; 18: 463-466.
- <sup>2</sup> *Houghton PJ, Mensah AY, Iessa N, Hong LY.* Terpenoids in *Buddleja*: relevance to chemosystematics, chemical ecology and biological activity. *Phytochemistry* 2003; 64: 385-393.
- <sup>3</sup> *Lorenzi H, Matos FJ.* Plantas Mediciniais do Brasil. Inst Plantarum Ltda. São Paulo; 2002: 354-355.
- <sup>4</sup> *Bickel U, Thomsen T, Fischer J, Weber W, Kewitz, H.* Galanthamine: pharmacokinetics, tissue distribution and cholinesterase inhibition in brain of mice. *Neuropharmacology* 1991; 5: 447-454.
- <sup>5</sup> *Tarragó T, Frutos S, Rodriguez-Mias RA, Giralt E.* Identification by F-19 NMR of traditional chinese medicinal plants possessing prolyl oligopeptidase inhibitory activity. *ChemBioChem* 2006; 7: 827- 833.
- <sup>6</sup> *Houghton PJ, Howes MJ.* Natural products and derivatives affecting neurotransmission relevant to Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosignals* 2005; 14: 6-22.
- <sup>7</sup> *Polgar L.* The prolyl oligopeptidase family. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 349-362.
- <sup>8</sup> *Cheng L, Lumb M, Polgár L, Mudge AW.* How can the mood stabilizer VPA limit both mania and depression? *Mol Cell Neurosci* 2005; 29: 155-61.
- <sup>9</sup> *Garcia-Horsman JA, Mannisto PT, Venalainen JJ.* On the role of prolyl oligopeptidase in health and disease. *Neuropeptides* 2007; 41: 1-24.
- <sup>10</sup> *Tarragó T, Kichik N, Segui J, Giralt E.* The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. *ChemMedChem* 2007; 2: 354-359.

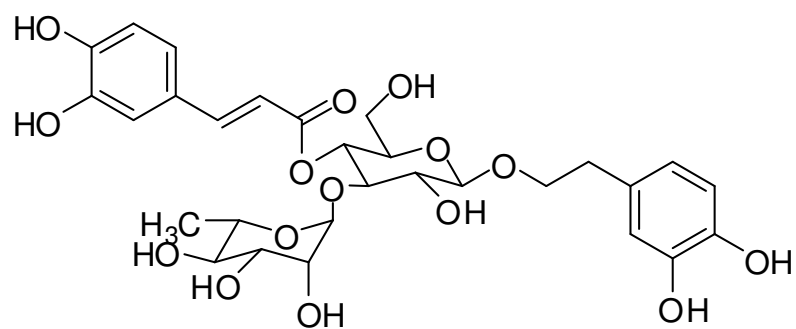
- <sup>11</sup> Marques MR, Stuker C, Kichik N, Tarragó T, Giralt E, Morel AF, Dalcol II. Flavonoids with prolyl oligopeptidase inhibitory activity isolated from *Scutellaria racemosa* Pers. *Fitoterapia* 2010; 81: 552-556.
- <sup>12</sup> McIntosh C H, Demuth H, Kim S, Pospisilik J, Pederson RA. Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. *Int J Biochem Cell Biol* 2006; 38: 860-872.
- <sup>13</sup> Marston A, Kissiling J, Hostettmann KA. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. *Phytochem Anal* 2002; 13: 51-54.
- <sup>14</sup> Toide K, Iwamoto Y, Fujiwara H, Abe H. JTP-4819 – A novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 1370-1378.
- <sup>15</sup> Checler F, Vincent JP, Kitabgi P. Inactivation of neurotensins by rat;brainsynaptic;membranes partly occurs through cleavage at the Arg8-Arg9 peptide-bond by a metalloendopeptidase. *J Neurochem* 1985; 45: 1509-1513.
- <sup>16</sup> Barbosa Filho JM, Medeiros KC, Diniz MF, Batista LM, Athayde-Filho PF, Silva MS, da-Cunha EV, Almeida JR, Quintans-Júnior J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. *Rev Bras Farmacogn* 2006; 16: 258-285.
- <sup>17</sup> Avila JG, de Liverant JG, Martínez A, Martínez G, Muñoz JL, Arciniegas A, Romo de Vivar A. Mode of action of *Buddleja cordata* verbascoside against *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol* 1999; 66: 75–78.
- <sup>18</sup> Acevedo JG, Castañeda CMC, Benítez FJ, Durán DA, Barroso VR, Martínez CG, Muñoz LJ, Martínez CA, Romo de Vivar A. Photoprotective activity from *Buddleja scordioides*. *Fitoterapia* 2005; 76: 301-309.
- <sup>19</sup> Backhouse N, Rosales L, Apablaza C, Goity L, Erazo S, Negrete R, Theodoluz C, Rodríguez J, Delporte C. Analgesic, antiinflammatory and antioxidant proprieties of *Buddleja globosa*, Buddlejaceae. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 263-269.

- <sup>20</sup> Hausmann M, Obermeier F, Paper DH, Balan K, Dunger N, Menzel K, Falk W, Schoelmerich J, Herfarth H, Rogler G. In vivo treatment with the herbal phenylethanoid acteoside ameliorates intestinal inflammation in dextran sulphate sodium-induced colitis. [Clin Exp Immunol](#) 2007; 148: 373–381.
- <sup>21</sup> Ohno T, Inoue M, Ogihara Y, Saracoglu I. Antimetastatic activity of acteoside, a phenylethanoid glycoside. *Biol Pharm Bull* 2002; 25: 666–668.
- <sup>22</sup> Mroczek T. Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origin by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation-octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography-based bioautography. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 2519–2528.
- <sup>23</sup> Di Giovanni S, Borloz A, Urbain A, Marston A, Hostettmann K, Carrupt P, Reist M. In vitro screening assays to identify natural or synthetic acetylcholinesterase inhibitors: Thin layer chromatography versus microplate methods. *Eur J Pharm Sci* 2008; 33: 109–119.
- <sup>24</sup> Lee J, Lee S, Lee K, Jang H, Lee K, Hahn T, Paik Y. Prolyl Endopeptidase Inhibitors from the Leaves of *Gingko biloba*. *Planta Med* 2004; 70: 1228-1230.

## Figure Legends

Table 1: Screening for POP and DPP IV inhibition of fractions from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng.





**Figure 1**

**Table 1.**

| <b>Sample<br/>(100 µg/mL)</b> | <b>POP Inhibition<br/>(%)</b> | <b>DPP IV Inhibition<br/>(%)</b> |
|-------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| Crude extract                 | 79,7                          | 22,9                             |
| F 4                           | 83,3                          | 31,3                             |
| F 6                           | 75,8                          | 27,8                             |
| F 8                           | 65,0                          | 38,1                             |
| F 9                           | 72,0                          | 22,8                             |
| F 11                          | 60,7                          | 14,2                             |
| F 13                          | 84,9                          | 33,1                             |

## Supporting Information

### **Verbascoside: a prolyl oligopeptidase inhibitor from *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng.**

Augusto G. Filho<sup>1</sup>, Ademir F. Morel<sup>1</sup>, Luciana Adolpho<sup>1</sup>, Vinícius Ilha<sup>1</sup>, Ernest Giralt<sup>2</sup>,  
Teresa Tarragó<sup>2</sup>, Ionara I. Dalcol<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais- NPPN, Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria- RS, Brazil

<sup>2</sup> Institute for Research in Biomedicine. Barcelona Science Park. Barcelona, Spain

#### **\* Address for correspondence**

Profa. Ionara Irion Dalcol

Universidade Federal de Santa Maria

Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais. Departamento de Química. Campus - Camobi

CEP: 97105-900. Santa Maria, Brazil

Tel.: + 55-220-8869; fax + 55-220-8031

*E-mail address: iidalcol@gmail.com*

**Verbascoside:** yellow solid; mp 153- 155 °C; lit. mp 149- 151 °C (Sarkhail et al., 2006). RP-HPLC:  $t_R$  4.49 min (linear gradient from 0 to 100% MeCN in 8 min).  $^1H$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  ppm: 1.10 (*d*,  $J= 6.2$  Hz, 3H, H-6''), 2.80 (*m*, 2H, H-7), 3.32 (*m*, 1H, H-4''), 3.4 (*dd*,  $J= 9.2, 7.9$  Hz, 1H, H-2'), 3.56 (*m*, 2H, H-5', 6'), 3.59 (*m*, 2H, H-3'', 5''), 3.71 (*m*, 1H, H-6'), 3.75 (*m*, 1H, H-8), 3.81 (*t*,  $J= 9.2$  Hz, 1H, H-3'), 3.93 (*m*, 1H, H-2''), 4.05 (*m*, 1H, H-8), 4.39 (*d*,  $J= 7.9$  Hz, 3H, H-1'), 4.93 (*m*, 1H, H-4'), 5.20 (*d*,  $J= 2.0$  Hz, 1H, H-1''), 6.28 (*d*,  $J= 15.9$  Hz, 1H, H-8'''), 6.58 (*d*,  $J= 8.1$  Hz, 1H, H-6), 6.69 (*d*,  $J= 8.1$  Hz, 1H, H-5), 6.71 (*d*,  $J= 2.0$  Hz, 1H, H-2), 6.79 (*d*,  $J= 8.2$  Hz, 1H, H-5'''), 6.97 (*dd*,  $J= 8.2, 2.0$  Hz, 3H, H-6'''), 7.07 (*d*,  $J= 2.0$  Hz, 1H, H-2'''), 7.60 (*d*,  $J= 15.9$  Hz, 1H, H-7''').  $^{13}C$  NMR ( $CD_3OD$ )  $\delta$  ppm: 18.49 (C6''), 36.60 (C7), 62.41 (C6'), 70.46 (C4'), 70.64 (C5''), 72.09 (C''), 72.30 (C8), 72.39 (C2''), 73.83 (C4''), 76.07 (C5'), 76.24 (C2'), 81.70 (C3'), 103.07 (C1''), 104.23 (C1'), 114.74 (C8'''), 115.3 (C2'''), 116.36 (C5), 116.56 (C5'''), 117.16 (C2), 121.30 (C6), 123.26 (C6'''), 127.70 (C1'''), 131.52 (C1), 144.71 (C4), 146.16 (C3), 146.87 (C3'''), 148.06 (C7'''), 149.82 (C4'''), 168.35 (C9''').

### **Biological assays**

#### *POP activity assay using ZGP-AMC*

POP activity was determined following the method described by Toide et al. (1995). The reactions were performed in 96-well microplates, thereby allowing the simultaneous monitoring of multiple reactions. For each reaction, activity buffer (131  $\mu$ l, 100 mM of Na/K phosphate buffer, pH 8.0) was pre-incubated for 15 min at 37 °C with POP (7 nM) and with

the corresponding extract solution (3  $\mu$ l). Stock solutions of fractions at 5 mg/mL were prepared in DMSO and dilutions were prepared from each stock with DMSO. A control with the same DMSO concentration was performed. After pre-incubation, ZGP-AMC (10  $\mu$ l, 3 mM in 40 % of 1, 4-dioxane) was added and the reaction was incubated for 1 h at 37 °C. The reaction was stopped with sodium acetate (150  $\mu$ l, 1M, pH 4) and the formation of AMC was measured fluorometrically. The excitation and emission wavelengths were 360/40 and 485/20 nm, respectively. The IC<sub>50</sub> value was defined as the concentration of fraction required to inhibit 50 % of POP activity

#### *DPP IV activity assay using ZGP-AMC*

DPP IV activity was determined following the method described by Checler et al. (1985). The reactions were performed in a 96-well microplate. For each well, the reaction mixture contained activity buffer (131  $\mu$ l, 100 mM Na/K phosphate buffer, pH 8.0), 0.7 nM DPP IV, and 3  $\mu$ l of the corresponding solution (in DMSO). After pre-incubation (15 min at 37 °C), GP-AMC (10  $\mu$ l, 3 mM in 40 % 1, 4-dioxane) was added, and the reaction was incubated for 1 h at 37°C. Finally, the reaction was stopped with sodium acetate (150  $\mu$ l, 1 M, pH 4) and the formation of AMC was measured fluorimetrically. The excitation and emission wavelengths were 360/40 and 485/20 nm, respectively. The IC<sub>50</sub> value was defined as the concentration of compound required to inhibit 50 % of DPP IV activity.

### *AChE bioautographic assay*

The bioautographic assay in TLC plates was adapted from Marston and Hostettmann (2002). A stock solution of AChE (250 U) dissolved in 37.5 mL of Tris-hydrochloric acid buffer at pH 7.8 with 37.5 mg of bovine serum albumin was kept at 4°C. Before the sample applications, chromatographic plates were eluted with acetone and thoroughly dried before use. 1 µL of crude extract and fractions, prepared in a concentration of 25 µg/µL in *n*-hexane, MeOH or MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1) in function of their solubility, were spotted onto the TLC plates. Migrations were conducted with appropriate solvent systems. The plates were then sprayed with an enzyme stock solution (concentration 6.67 U/mL) and pre-incubated at 37 °C for 20 min in a humid atmosphere and revealed with a fresh solution of 12.5 mg of 1-naphthyl acetate in 5 mL of ethanol and 50 mg of Fast Blue B salt in 20 mL of water. After 1-2 min a purple stain appeared in the plates and AChE-inhibiting compounds showed white spots. Samples of verbascoside **1** and the controls galanthamine and physostigmine at concentrations of 10 µg to 0.6 ng were applied as spots onto the plates. AChE inhibitory activity was expressed as pMIQ (negative logarithm of the minimal inhibitory quantity in mole that produced the spot with the least observable whiteness). To measure these pMIQ values, serial 2-fold dilutions of each test compound were assayed bioautographically.

## 5 PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Procedimentos Experimentais Gerais

#### 5.1.1 Materiais e Métodos Cromatográficos

Todos os solventes utilizados foram de qualidade p.a. ou de nível técnico com tratamento para remoção de possíveis contaminantes e umidade.

Utilizou-se sílica gel tipo 60 230-400 mesh (Merck) e Sephadex LH20 como adsorventes nas separações cromatográficas em coluna (CC).

A cromatografia em camada delgada foi realizada utilizando-se folhas de alumínio como suporte e sílica gel 60 F<sub>254</sub> como fase estacionária. Foram utilizados como reveladores cloreto férrico 1 % (FeCl<sub>3</sub>) em etanol, anisaldeído em ácido sulfúrico e solução de ácido sulfúrico seguidos de aquecimento e também lâmpadas ultravioleta ( $\lambda = 254$  e 366 nm).

#### 5.1.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

Para os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C utilizou-se um espectrofotômetro Bruker DPX 400 operando a 400,11 e 100,61 MHz respectivamente, e espectrofotômetro Varian 400 operando a 400,12 e 100,61 MHz respectivamente, usando clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD) ou dimetilsulfóxido (DMSO-d<sub>6</sub>) como solventes e TMS como referência interna. Os deslocamentos químicos foram registrados em “ppm” (partes por milhão) e as constantes de acoplamento (*J*) calculadas em Hertz (Hz).

#### 5.1.3 Materiais e Métodos Analíticos

As análises por CLAE foram realizadas utilizando o sistema cromatográfico Waters Alliance 2695 (Waters, Massachusetts, USA) com um detector PDA 995, uma fase reversa C-

18 (coluna 4.6x100 mm, 3,5  $\mu\text{m}$ ) e fase móvel de água com TFA (0,045 %) e MeCN com TFA (0,036 %) com uma rota de fluxo de  $\text{mL min}^{-1}$ . As análises de CLAE-EM foram realizadas utilizando Waters 2998 Photodiode Array Detector; Waters 2695 Separations Module; Waters Micromass ZQ ESCi Multimode ionization Enabled.

As análises por cromatografia gasosa foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo Varian 3400 CX. Os sinais foram detectados através de um detector de ionização de chama (DIC) utilizando hidrogênio ultrapuro como gás de arraste (fase móvel), operando a uma pressão de 7 Psi, split 10, temperatura do injetor de 220 °C e do detector de 250 °C. Os experimentos foram realizados em coluna capilar de sílica fundida (CCSF) com dimensão de 25 m x 0,25 mm, contendo fase estacionária apolar SE-54 (Polimetilfenilsiloxano-5 % fenil) usando programa de injeção indicado nos cromatogramas. Os percentuais dos constituintes dos óleos analisados foram obtidos pela área do pico, considerando todos os fatores de resposta do detector DIC iguais a um. O solvente hexano, utilizado na preparação das amostras para cromatografia gasosa é solvente de grau cromatográfico.

As análises por cromatografia gasosa- espectrometria de massa foram realizadas em um cromatógrafo a gás modelo Varian 3800, equipado com coluna capilar VF-5 MS, 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura do filme. Foi utilizado como gás de arraste hélio ultrapuro 1 mL/min, sendo a temperatura do injetor de 220 °C e a programação de análise com  $T_{\text{inicial}} = 50$  °C e  $T_{\text{final}} = 250$  °C, com rampa de aquecimento de 3 °C/min e com uma pressão de gás de arraste de 7 Psi.

Após análise dos índices de Kovatz (IK), tempo de retenção e espectros de massa das amostras utilizadas compararam-se os dados com os existentes na literatura (Adams,1995) e identificaram-se os compostos presentes nos óleos.

#### 5.1.4 Ensaio de inibição da enzima POP

A atividade inibitória da POP foi determinada segundo o método descrito por Toid *et al.*(1995). As reações foram realizadas em placa de 96 micropoços, o que permite seguir um monitoramento simultâneo das múltiplas reações. Para cada reação, um tampão (131  $\mu\text{l}$ , 100 mM de tampão fosfato Na/K, pH 8.0) foi pré incubado por 15 minutos a 37°C com a enzima POP (7 nM) e com uma solução de extrato correspondente (3  $\mu\text{l}$ ). Soluções estoque das frações a 5mg/mL foram preparadas em DMSO e as soluções foram preparadas com cada



solução estoque com DMSO. Foi preparado um controle com a mesma concentração de DMSO. Depois de uma pré incubação, ZGP-AMC (10  $\mu$ l, 3 mM em 40 % de 1,4-dioxano) foi adicionado a cada poço e a reação foi incubada por 1 hora a 37°C. A reação foi interrompida com acetato de sódio (150  $\mu$ l, 1 M, pH 4) e a formação de AMC foi medida fluorometricamente. A excitação e a emissão dos comprimentos de onda foram de 360/40 e 485/20 nm, respectivamente. A IC<sub>50</sub> é definida como a concentração da fração necessária para inibir 50 % da atividade da enzima POP.

#### 5.1.5 Ensaios de inibição da enzima DPP IV

A atividade inibitória da enzima DPP IV foi determinada seguindo o método descrito por Checler *et al.* (1985). As reações foram realizadas em placa com 96 micropoços. Em cada poço, a mistura reativa continha um tampão (131  $\mu$ l, 100 mM de tampão fosfato Na/K, pH 8.0), 0,7 nM de DPP IV e 3  $\mu$ l da solução correspondente (em DMSO). Após a pré incubação (15 minutos a 37 °C), o GP-AMC (10  $\mu$ l, 3 nM em 40 % de 1,4-dioxano) foi adicionado a cada poço, e a reação foi incubada por 1 hora a 37 °C). Posteriormente, a reação foi interrompida com acetato de sódio (150  $\mu$ l, 1 M, pH 4,0) e a formação do AMC medida fluorometricamente. A excitação e a emissão dos comprimentos de onda foram de 360/40 nm e 485/20 nm, respectivamente. A IC<sub>50</sub> é definida como a concentração da fração necessária para inibir 50 % da atividade da enzima DPP IV.

#### 5.1.6 Ensaios de inibição da AChE pelo Método da Bioautografia

O ensaio da inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) em CCD foi realizado e adaptado de acordo com o método proposto por Marston e Hostettman, que consiste em partir de uma solução estoque de AChE (250 U) a 4 °C e 37,5 mg de albumina de soro bovino dissolvida em 37,5 mL de tampão de Tris-ácido hidrocloreídrico com pH 7,8. As placas cromatográficas foram eluídas em acetona antes de serem usadas, sendo o solvente evaporado antes da realização dos testes. As amostras a serem analisadas foram previamente dissolvidas em MeOH ou MeOH:H<sub>2</sub>O (1:1), de acordo com a solubilidade de cada amostra. O extrato bruto e as amostras das frações foram eluídas no sistema de solvente apropriado.

Posteriormente à eluição, as placas de CCD foram secas a temperatura inferior a 40 °C. Os compostos puros foram aplicados pontualmente nas placas de CCD nas concentrações de 5,0; 1,66; 0,55; 0,018; 0,006; 0,0002 µg. Após aplicação das amostras as placas cromatográficas foram borrifadas com a solução estoque da enzima e secas novamente. Fez-se então a incubação das placas em atmosfera úmida a 37 °C por 20 minutos, e reveladas com uma solução preparada imediatamente antes do uso, de 12,5 mg de acetato de 1-naftila em 5 mL de etanol e 50 mg de sal Fast Blue B em 20 mL de água. Com 1 ou 2 minutos da revelação, uma coloração púrpura começou a surgir nas placas, sendo o positivo, os pontos esbranquiçados que demonstram a inibição da enzima.

#### 5.1.7 Atividade antimicrobiana *in vitro*

Foram utilizadas cepas padrão da American Type Culture Collection (ATCC), que são constituídas de fungos, microorganismos Gram-positivos e Gram-negativos, representados na Tabela 1.

**Tabela 1** – Microorganismos indicadores utilizados nos testes de atividade antimicrobiana

| <b>Microorganismos</b>             |  |   |
|------------------------------------|--|---|
| <b><i>Gram-negativos</i></b>       | <b><i>Gram-positivos</i></b>               | <b><i>Fungos</i></b>                    |
| <i>Escherichia coli</i> 25922      | <i>Bacillus subtilis</i> 6633              | <i>Cryptococcus neoformans</i><br>28952 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> 13883 | <i>Streptococcus pyogenes</i><br>19615     | <i>Candida albicans</i> 10231           |
|                                    | <i>Staphylococcus aureus</i><br>6538       | <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>2601 |
|                                    | <i>Staphylococcus epidermidis</i><br>12228 |   |

Os microorganismos foram repicados de 16 a 24 horas antes da análise e 48 horas antes para os fungos.

Os meios de cultura utilizados foram o Caldo de caseína de soja para bactérias e Caldo Saboraund para fungos, com adição de 2 % de TWEEN 80, sendo esterilizados em autoclave.

As substâncias utilizadas como padrão foram nistatina para fungos e cloranfenicol para bactérias.

A determinação da MIC (Concentração Inibitória Mínima) pelo método de microdiluição descrito por NCCLS modificado (Hamburger e Fucchs, 1970) foi realizada em microplacas de 96 poços, onde as amostras foram diluídas sucessivamente iniciando em 500 µg/mL e em triplicata. As placas são incubadas por 48 horas a 25-27 °C para fungos e 24 horas a 35-37 °C para bactérias. A determinação da MIC é observada após o período de incubação.

As frações analisadas quanto à atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos foram: extrato bruto, fração hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração butanol (obtido através do Método de fracionamento II da planta *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng) e o composto verbascosídeo (**1**), metabólito isolado da planta. Outras frações também testadas frente à atividade antimicrobiana foram obtidas através do fracionamento da planta *Artemisia verlotorum*: extrato bruto, fração hexano, fração diclorometano, fração acetato de etila e fração butanol.

#### 5.1.8 Ensaio de prospecção fitoquímica

O ensaio de prospecção fitoquímica de extratos e frações foi realizado a partir de um conjunto de testes qualitativos que tem como objetivo identificar qualitativamente a presença de substâncias determinadas, utilizando para tanto, reagentes específicos que auxiliam a identificação das principais classes de metabólitos secundários. Foram realizados testes para flavonóides, cumarinas, polifenóis, alcalóides, terpenóides, ácidos graxos, triterpenos e esteróides, baseado nos testes descritos por Moreira (1979) e por Wagner & Bladt (1996).

- a) **Flavonóides** – o teste foi realizado em um tubo de ensaio sob o gelo, se adicionou 5 mL de cada fração a ser analisada, 2 g de limalha de magnésio e 2 mL de ácido clorídrico concentrado. Espera-se reagir por 15 minutos para posterior observação.

O desenvolvimento de coloração vermelha ou rósea indica a presença de heterosídeos flavônicos.

- b) **Cumarinas** – o teste foi realizado com a utilização de placas de CCD, onde as frações e amostras foram aplicadas pontualmente sobre as placas, para posterior aplicação de Hidróxido de Sódio 1 N. A visualização de fluorescência azul ou verde-amarelada sob luz ultravioleta indica a presença de cumarinas.
- c) **Alcalóides** – o teste foi realizado com a utilização de placas de CCD, onde as amostras e frações foram aplicadas pontualmente sobre a mesma, para posterior revelação com o Reagente de Dragendorff e subsequente aquecimento. A presença de turvação nas placas indica a presença de alcalóides.
- d) **Triterpenos e esteróides** – o teste foi realizado de acordo com a reação de Liebermann – Burchard, que consiste em adicionar 3 mL das frações e amostras já solubilizadas em tubos de ensaio, acrescentando a seguir 2 mL de anidrido acético. Cautelosamente adiciona-se 3 gotas de ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul a verde indica provável presença de núcleo esteroidal e o aparecimento da coloração rósea, vermelha, púrpura ou violácea indica a presença de policíclicos terpênicos.
- e) **Polifenóis** – o teste foi realizado com a utilização de placas de CCD, onde as amostras e frações foram aplicadas pontualmente sobre a mesma, para posterior revelação com  $\text{FeCl}_3$  e subsequente aquecimento. A presença de turvação nos pontos aplicados indica a presença de polifenóis.
- f) **Terpenóides e Ácidos Graxo** – o teste foi realizado com a utilização de placas CCD, onde as amostras foram aplicadas pontualmente sobre a mesma, para posterior revelação com o revelador vanilina e subsequente aquecimento. A presença do aparecimento de coloração amarela ou marrom indica a presença de terpenóides e a presença da coloração azul indica a presença de ácidos graxo.

## 5.2 *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng

### 5.2.1 Material Vegetal

A planta foi coletada nos meses de setembro de 2008 e em agosto de 2010 (para a extração do óleo essencial), na cidade de Santa Maria, no distrito da Boca do Monte, Rio Grande do Sul, sendo identificada pela Dra. Thaís Scotti Canto Dorrow. Uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria sob o nº 11461.

### 5.2.2. Extração e Fracionamento

#### 5.2.2.1 *Método de Fracionamento I*

As raízes e folhas de *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng foram secas em estufa a uma temperatura de 40 °C, obtendo-se 1.415 g de material seco que foi distribuído em balões de 1 e 2 L com metanol:água (8:2), durante 36 horas a temperatura ambiente. Diversas evaporações foram realizadas até exaustão, sendo o extrato concentrado por evaporação. Obteve-se no final das extrações 172,6 g de extrato bruto (EB), rendimento de 12,2 %. Este extrato bruto (17 g) foi submetido a fracionamento direto através de filtração em coluna cromatográfica utilizando como adsorvente sílica gel (170 g) e como eluentes diferentes sistemas de solventes em grau crescente de polaridade. A coluna cromatográfica foi eluída com hexano, diclorometano:acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1), metanol, metanol:água (9:1) e metanol:água (4:1), resultando em 100 frações (Tabela 2).

**Tabela 2** – Coluna cromatográfica do extrato bruto de *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng (*Método de Fracionamento I*).

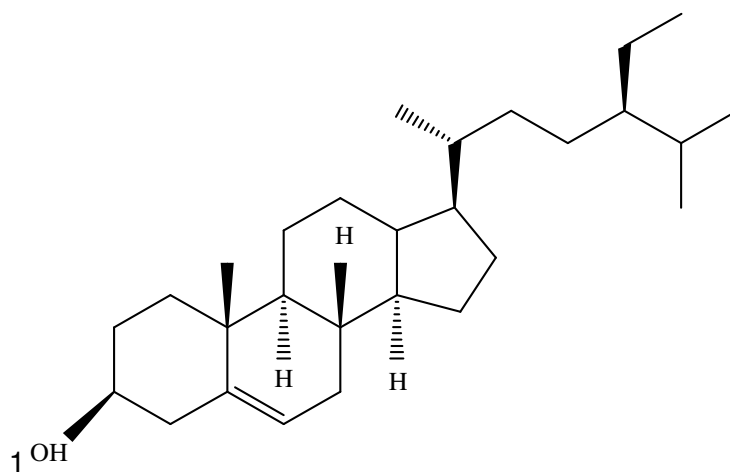
| FRAÇÃO | SOLVENTE                           | PESO (G) |
|--------|------------------------------------|----------|
| 1      | Hexano                             | 0,02     |
| 2      | Diclorometano                      | 0,24     |
| 3      | Acetato de etila:diclorometano 1:1 | 0,64     |
|        | Acetato de etila                   |          |
| 4      | Acetato de etila:Metanol 1:1       | 3,86     |
| 5      | Acetato de etila:Metanol 1:1       | 1,02     |
| 6      | Acetato de etila:Metanol 1:1       | 1,48     |
|        | Metanol                            |          |
| 7      | Metanol                            | 0,99     |
| 8      | Metanol                            | 1,70     |
| 9      | Metanol                            | 2,80     |
| 10     | Metanol                            | 0,17     |
| 11     | Metanol                            | 0,64     |
|        | Metanol:H <sub>2</sub> O 9:1       |          |
| 12     | Metanol:H <sub>2</sub> O 4:1       | 0,02     |

As principais frações obtidas foram avaliadas quanto à atividade inibitória frente às enzimas POP, DPP IV e AChE, selecionando-se neste ensaio bioguiado as frações F4 e F12 para seguimento do trabalho de isolamento. Assim, 1,69 g da fração F4 (obtida no sistema Acetato de Etila:Metanol 1:1) foi submetida a novo fracionamento em coluna cromatográfica usando 27 g de Sephadex LH20 como fase estacionária (denominada coluna A), obtendo-se assim 7 subfrações. Destas, a subfração denominada A5-10 (1,5 g) foi purificada novamente em uma coluna cromatográfica de sílica gel (denominada coluna B), da qual foram obtidas então 14 frações, dentre as quais as frações B30-40 (270 mg) e B41-49 (332 mg) que destacaram-se como as mais ativas frente a enzima POP.

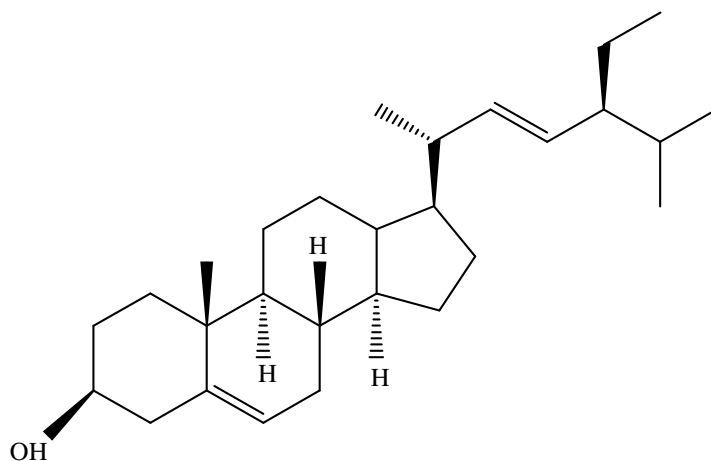
A fração B30-40 foi purificada através de coluna de sílica gel, resultando em 4 novas frações. Obteve-se um composto principal na fração 18-33 (49 mg), que foi denominado Z02. A fração B41-49 (210 mg) foi submetida a purificação em coluna cromatográfica em sílica gel (denominada coluna C), resultando em 5 frações, dentre as quais a fração C20-24 (54 mg). Esta fração resultou num composto sólido, denominado Z01, que foi recristalizado em

metanol:clorofórmio (PF experimental: 156-157 °C). A amostra Z01 foi submetida à elucidação estrutural através da análise por CLAE, CLAE-EM e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , sendo então identificada como o fenilpropanóide verbascosídeo (**1**; PF lit.: 149-151 °C; Sarkhail, 2006). Z02 também foi analisada por CCD e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , verificando-se tratar-se do mesmo composto antes denominado Z01.

Foram analisadas por CCD as demais frações principais obtidas pelo Método I de fracionamento: F2, F3, F5, F7, F8, F10 e F12. As frações menos polares (F2 e F3) foram analisadas por CCD em quatro sistemas diferentes de solventes (hexano:acetato de etila 10:2; hexano:acetato de etila 6:2; hexano:diclorometano 2:1 e hexano:acetona 6:1), utilizando-se como padrões para comparação amostras autênticas disponíveis no laboratório, e como reveladores solução de anisaldeído em ácido acético e solução de ácido sulfúrico em etanol. Desta forma identificou-se em ambas frações a presença dos esteróides  $\beta$ -sitosterol (**54**) e estigmasterol (**55**). Estes metabólitos foram quantificados no extrato bruto de *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng através do fracionamento neutro realizado pelo Método II.



(54)



(55)

**Figura 17** – Estrutura dos metabólitos isolados pelo Método de Fracionamento I

A análise por CCD da fração F5 indicou ainda o predomínio do composto Z01 isolado na F4. As frações mais polares F8, F10 e F12 mostram-se muito complexas por CCD, apresentando várias manchas escuras quando reveladas com solução etanólica a 2 % de FeCl<sub>3</sub>, indicando a presença de polifenóis e flavonóides. Foram empregados diferentes sistemas cromatográficos na tentativa de se isolar e purificar os metabólitos presentes nestas frações polares, utilizando-se fases móveis e fases estacionárias diferentes (sílica gel, sephadex LH20 e sílica de fase reversa C<sub>18</sub>), porém em nenhum caso foi possível a obtenção dos metabólitos com pureza e quantidade suficientes para dar seguimento às análises para elucidação estrutural dos mesmos.

Além dos ensaios bioguiados de atividade enzimática, as principais frações obtidas pelo *Método de fracionamento I* (F4, F5, F7, F8, F10 e F12) foram também analisadas através de prospecção fitoquímica.

#### 5.2.2.2 Método de Fracionamento II

Uma parte do material vegetal (150,6 g), seco e tratado como descrito no item 5.2.2.1, foi submetida a um método de extração a quente em metanol:água (2:1) utilizando-se aparelho de Soxhlet. Foram feitas três extrações de 48 horas cada, onde se obteve um total de



32,43 g de extrato bruto (rendimento: 21,5 %). Uma parte deste extrato bruto (30 g) foi então submetida ao método de fracionamento neutro tradicional, no qual o extrato bruto inicial é suspenso em água, sendo então realizadas várias extrações com solventes de diferentes graus de polaridade. Obteve-se assim as frações Hexano (2,16 g; 6,66 %), Diclorometano (0,64 g; 1,97 %), Acetato de etila (0,72 g; 2,22 %) e Butanol (3,73 g; 11,5 %). Estas frações foram analisadas através de prospecção fitoquímica e pela análise por CCD em diferentes sistemas de solventes, utilizando como padrões amostras autênticas existentes no laboratório ( $\beta$ -sitosterol (**54**) e estigmasterol (**55**)), além do verbascosídeo (**1**), composto majoritário isolado no fracionamento bioguiado descrito no item 4.2.2.1. As placas de CCD foram preparadas em quadruplicata e eluídas nos sistemas de solventes hexano:acetato de etila (4:1 e 6:1), clorofórmio:éter etílico (2:1), clorofórmio:metanol (95:5) e hexano:acetona (5:1), sendo posteriormente reveladas com solução de anisaldeído em ácido acético e com solução etanólica de  $\text{FeCl}_3$ .

O composto estigmasterol (**55**) foi identificado por CCD nas frações Hexano e Diclorometano, utilizando padrão conhecido como referência. Para confirmar a presença deste esteróide na fração hexano, 56 mg desta fração foi submetida a purificação por cromatografia CCD preparativa em sílica gel, utilizando para eluição clorofórmio:éter etílico (2:1). Uma banda de cor violácea foi identificada através da revelação com solução de anisaldeído de uma pequena faixa na borda da placa. Desta forma obteve-se 29 mg de uma mistura correspondente a banda isolada. Esta mistura foi purificada através de nova placa preparativa utilizando como sistema de solventes hexano: acetato de etila (4:1). Isolou-se 6 mg de uma substância denominada H1. A amostra H1 foi identificada como estigmasterol (**55**) através de CCD com padrão comercial Sigma-Aldrich, pela determinação de seu ponto de fusão e análise de RMN  $^1\text{H}$ .

O composto  $\beta$ -sitosterol (**54**) também foi identificado por CCD nas frações Hexano e Diclorometano. Para confirmar a presença deste metabólito na fração Hexano, 80 mg desta fração foi submetida a purificação por cromatografia CCDP em sílica gel, utilizando para eluição o sistema de solventes hexano:acetato de etila (5:1). Foram observadas quatro bandas principais de coloração violeta após revelação de uma pequena borda da placa preparativa com anisaldeído. As bandas foram removidas da placa por raspagem, extraídas com 10 mL de clorofórmio para remoção da sílica e secas em rotaevaporador. Isolou-se 4 mg de uma substância denominada de H3. A amostra foi submetida à análise por CCD com padrão conhecido e a análise por RMN  $^1\text{H}$ , onde foi confirmada como sendo  $\beta$ -sitosterol (**54**) (H3).

O metabólito verbascosídeo (**1**), composto majoritário isolado no fracionamento bioguiado descrito no item 4.2.2.1 (*Método I*), foi identificado nas frações acetato de etila e butanol do fracionamento neutro por análise por CCD utilizando FeCl<sub>3</sub> como revelador.

### 5.2.3 Compostos isolados de *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex Spreng.

#### **Verbascosídeo (1):**

Sólido amarelo. Ponto de Fusão: 153- 155 °C (lit. PF 149- 151 °C; Sarkhail et al., 2006).

CLAE C18:  $t_R$  4,49 min (gradiente linear de 0 a 100 % MeCN em 8 min).

Dados de <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD) δ ppm: 1,10 (*d*, *J*= 6,2 Hz, 3H, H-6''), 2,80 (*m*, 2H, H-7), 3,32 (*m*, 1H, H-4''), 3,4 (*dd*, *J*= 9,2, 7,9 Hz, 1H, H-2'), 3,56 (*m*, 2H, H-5', 6'), 3,59 (*m*, 2H, H-3'', 5''), 3,71 (*m*, 1H, H-6'), 3,75 (*m*, 1H, H-8), 3,81 (*t*, *J*= 9,2 Hz, 1H, H-3'), 3,93 (*m*, 1H, H-2''), 4,05 (*m*, 1H, H-8), 4,39 (*d*, *J*= 7,9 Hz, 3H, H-1'), 4,93 (*m*, 1H, H-4'), 5,20 (*d*, *J*= 2,0 Hz, 1H, H-1''), 6,28 (*d*, *J*= 15,9 Hz, 1H, H-8'''), 6,58 (*d*, *J*= 8,1 Hz, 1H, H-6), 6,69 (*d*, *J*= 8,1 Hz, 1H, H-5), 6,71 (*d*, *J*= 2,0 Hz, 1H, H-2), 6,79 (*d*, *J*= 8,2 Hz, 1H, H-5'''), 6,97 (*dd*, *J*= 8,2, 2,0 Hz, 3H, H-6'''), 7,07 (*d*, *J*= 2,0 Hz, 1H, H-2'''), 7,60 (*d*, *J*= 15,9 Hz, 1H, H-7'''). Dados de NMR <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD) δ ppm: 18,49 (C6''), 36,60 (C7), 62,41 (C6'), 70,46 (C4'), 70,64 (C5''), 72,09 (C''), 72,30 (C8), 72,39 (C2''), 73,83 (C4''), 76,07 (C5'), 76,24 (C2'), 81,70 (C3'), 103,07 (C1''), 104,23 (C1'), 114,74 (C8'''), 115,3 (C2'''), 116,36 (C5), 116,56 (C5'''), 117,16 (C2), 121,30 (C6), 123,26 (C6'''), 127,70 (C1'''), 131,52 (C1), 144,71 (C4), 146,16 (C3), 146,87 (C3'''), 148,06 (C7'''), 149,82 (C4'''), 168,35 (C9''').

**$\beta$ -sitosterol (54):**

CG modelo Varian 3400 CX, coluna fase estacionária apolar SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise:  $T_{\text{injetor}} = 220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{detector}} = 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $t_R$  21,157 min [ $t_R$  do padrão de  $\beta$ -sitosterol isolado e caracterizado por Maldaner (2010): 21,237 min].

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz, em  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 5,35 (1H, m H-6), 3,54 (1H, H-3), 2,26-0,80 (demais hidrogênios).

**Estigmasterol (55):**

CG modelo Varian 3400 CX, coluna fase estacionária apolar SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise:  $T_{\text{injetor}} = 220 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{detector}} = 250 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .  $t_R$  20,640 min ( $t_R$  do padrão comercial de estigmasterol: 20,652 min)

Dados de RMN de  $^1\text{H}$  a 200 MHz, em  $\text{CDCl}_3$   $\delta$  (ppm): 5,36 (1H, m H-6), 5,14 (1H, H-22), 5,06 (1H, H-23), 3,52 (1H, m, H-3), 2,0- 0,8 (demais hidrogênios).

#### 5.2.4 Obtenção do óleo essencial

Para a obtenção dos óleos essenciais de folhas e flores de *Buddleja brasiliensis* utilizou-se o processo de hidrodestilação empregando-se um aparelho de Clevenger modificado (Figura 18), onde a fração de óleo é coletada diretamente de éter etílico. Foram utilizadas 503 g de folhas frescas. O tempo total de extração foi de 4 horas, e após obtenção do óleo volátil em éter etílico, este foi seco com  $\text{MgSO}_4$  anidro, separado por filtração a gravidade e o solvente foi removido em rotaevaporador. Os óleos obtidos foram pesados, obtendo-se 16 mg (0,0031 %) de óleo essencial das folhas, armazenado sob atmosfera de nitrogênio em frasco âmbar e sob refrigeração a  $4^{\circ}\text{C}$ . Este óleo foi analisado por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometro de massa (0,2  $\mu\text{L}$  de óleo dissolvido em hexano, injetado utilizando seringa Hamilton com capacidade de 10  $\mu\text{L}$ ).

O óleo foi submetido aos ensaios de inibição enzimática frente às enzimas POP, DPP  
IV.



**Figura 18** – Aparelho Clevenger modificado

#### 5.2.5 Determinação do Índice de Kovats (IK) para os constituintes dos óleos voláteis

Os índices de Kovats foram determinados através da injeção de uma mistura de *n*-alcanos (C8 a C26) com tempo de retenção e ordem de eluição conhecidos, juntamente com os constituintes que tiveram seus índices calculados. Os IK dos constituintes dos óleos foram determinados e comparados com os padrões de igual índice de retenção, encontrados na literatura (Adams, 1995) e com os dados obtidos pela análise em CG-EM.

Fórmula de cálculo utilizada:

$$I_r = 100n + 100 \frac{\Delta n}{tr_m - tr_n} (tr_i - tr_n)$$

onde:

**$I_r$** = índice de retenção de *i*;  **$n$** = número de carbonos do alcano que elui antes de *i*;  **$m$** = número de carbonos do alcano que elui depois de *i*;  **$\Delta n$** = número de carbonos do alcano que

elui depois de  $i$  menos o número de carbonos do alceno que elui antes de  $i$ ;  $tr_i$ = tempo de retenção de  $i$ ;  $tr_n$ = tempo de retenção do alceno que elui antes de  $i$  e  $tr_m$ = tempo de retenção de  $i$ ;  $tr_n$ = tempo de retenção do alceno que elui depois de  $i$ .

### **5.3 *Artemisia verlotorum***

#### 5.3.1 Material Vegetal

A planta foi coletada no mês de julho de 2009 no campus da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, sendo identificada pela Dra. Thaís Scotti Canto Dorrow. Uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria sob o nº 12.982.

#### 5.3.2 Fracionamento

As folhas foram secas em estufa a 40°C, sendo após a secagem colocadas num triturador, obtendo-se 263 g de material vegetal moído. A extração exaustiva a frio do material com metanol foi realizada através de uma série de cinco extrações de 48 horas cada. Obteve-se assim 45,5 g de extrato bruto (rendimento de 17,3 %). Este extrato foi submetido a fracionamento neutro utilizando metodologia semelhante à descrita no item 5.2.2.2, obtendo-se as frações Hexano (7,16 g; 15,7 %), Diclorometano (1,1 g; 2,4 %), Acetato de Etila (4,4 g; 9,7 %) e Butanol (2,02 g; 4,4 %). Estas frações foram analisadas através de prospecção fitoquímica e pela análise por CCD em diferentes sistemas de solventes, sendo então utilizadas diretamente para avaliação da capacidade inibitória das enzimas POP, AChE e DPP IV e de avaliação da atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas, Gram negativas e fungos.

### 5.3.3 Obtenção do óleo essencial

Para a obtenção dos óleos essenciais de folhas *Artemisia verlotorum* utilizou-se o mesmo processo de hidrodestilação utilizado para a planta *Buddleja brasiliensis*, citado no item 5.2.4. Para realizar-se a extração, foram utilizadas 250,5 g de folhas frescas. O óleo obtido foi pesado, obtendo-se 289 mg (0,4 %), sendo armazenado sob atmosfera de nitrogênio em frasco âmbar e sob refrigeração a 4 °C. A análise deu-se através de cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada à espectrometro de massa (0,2 µL de óleo dissolvido em hexano, injetado utilizando seringa Hamilton com capacidade de 10 µL).

A separação do composto  $\alpha$ -cadinol, obtido do óleo de *Artemisia verlotorum*, deu-se através de placa preparativa no sistema de solventes hexano:acetato de etila 20 %, com posterior extração com hexano (obtendo-se o peso de 10 mg) e análise por cromatografia gasosa.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a abordagem etnofarmacológica, neste trabalho foram realizados o estudo fitoquímico, estudo de inibição enzimática e avaliação da atividade antimicrobiana das espécies *Buddleja brasiliensis* e *Artemisia verlotorum*.

### 6.1 *Buddleja brasiliensis*

A espécie *Buddleja brasiliensis* foi fracionada através de duas metodologias diferentes. O Método de fracionamento I, originalmente planejado para este trabalho, consistiu na preparação do extrato bruto a frio por maceração exaustiva. Uma vez obtido o extrato bruto, este foi submetido ao fracionamento direto através de filtração em coluna cromatográfica, utilizando sistemas de solventes com polaridade crescente. Este foi o método que apresentou mais baixo rendimento de extrato bruto (12,2 %). O fracionamento direto do extrato bruto em coluna cromatográfica resultou em muitas frações similares. Estas frações foram difíceis de classificar entre *principais* e *similares* para serem trabalhadas nos ensaios biológicos posteriores.

Assim, com o objetivo de aumentar o rendimento de extrato bruto e facilitar seu fracionamento com a obtenção de frações mais definidas em classes de metabólitos secundários, utilizou-se uma parte do material vegetal para, em paralelo, proceder ao Método de fracionamento II. Neste método o extrato bruto foi obtido utilizando-se aquecimento em aparelho de Soxhlet com um rendimento superior ao anteriormente obtido (21,5 %), e o fracionamento foi realizado pelo método tradicional com a obtenção das frações hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. O extrato bruto e as frações obtidas por ambas metodologias foram analisadas quanto a seus perfis fitoquímicos (Tabela 3), onde observa-se uma definição melhor entre as diferentes frações oriundas do Método de fracionamento II.

**Tabela 3** – Resultados da prospecção fitoquímica realizada com as principais frações e extrato bruto de *Buddleja brasiliensis*

| CLASSE DE COMPOSTOS         | EB | FH  | FD  | FA  | FB  | F4  | F5  | F6  | F8  | F10 | F12 |
|-----------------------------|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Flavonóides                 | +  | -   | +   | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++  | ++  |
| Cumarinas                   | +  | -   | +   | ++  | ++  | +++ | +++ | +++ | +++ | +++ | ++  |
| Polifenóis                  | +  | -   | +   | +++ | +   | ++  | +   | +   | +   | +   | +   |
| Alcalóides                  | +  | -   | +++ | ++  | -   | ++  | ++  | ++  | ++  | +   | -   |
| Ácidos Graxos               | +  | +++ | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| Triterpenóides e Esteróides | ++ | +++ | +++ | -   | +   | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

+++ = abundante; ++ = moderadamente presente; + = presente; - = ausente

Como indicado na Tabela 3, as principais classes de metabólitos secundários observadas no extrato bruto e nas frações de *Buddleja brasiliensis* foram os triterpenóides/esteróides, flavonóides, cumarinas e alcalóides. No EB, observou-se a presença de todas as classes de compostos testadas com exceção dos ácidos graxos. Na FH observa-se abundante presença de ácidos graxos e triterpenos, sendo que os ácidos graxos não aparecem presentes nas demais frações. Na FD verifica-se a presença de alcalóides, triterpenóides e esteróides. Na FA, há uma abundante presença de flavonóides e polifenóis. Na FB, os flavonóides são predominantes enquanto cumarinas estão moderadamente presentes. As F4, F5, F6, F8, F10, F12 apresentam classes de compostos muito semelhantes, com destaque para a ausência de ácidos graxos, triterpenóides e esteróides, e predomínio de flavonóides e cumarinas.

O extrato bruto e as frações obtidas no fracionamento pelo Método de fracionamento I foram analisadas por cromatografia em CCD e estudadas em relação à atividade inibitória enzimática frente às enzimas POP, DPP IV e AChE. Nos ensaios de atividade inibitória das enzimas POP e DPP IV foram utilizados testes fluorimétricos baseados nos substratos ZGP-AMC e GP-AMC, respectivamente. Nestes ensaios estabeleceu-se como padrão para a análise de extratos e frações a concentração de 100 µg/mL. As frações F4 e F12 apresentaram-se como as de maior potencial inibidor da POP (83,3 % e 84,9 %, respectivamente). No ensaio realizado com a enzima DPP IV, todas as frações testadas na



concentração padrão mostraram baixa atividade inibitória (entre 14 % e 38 %), como mostra a Tabela 4.

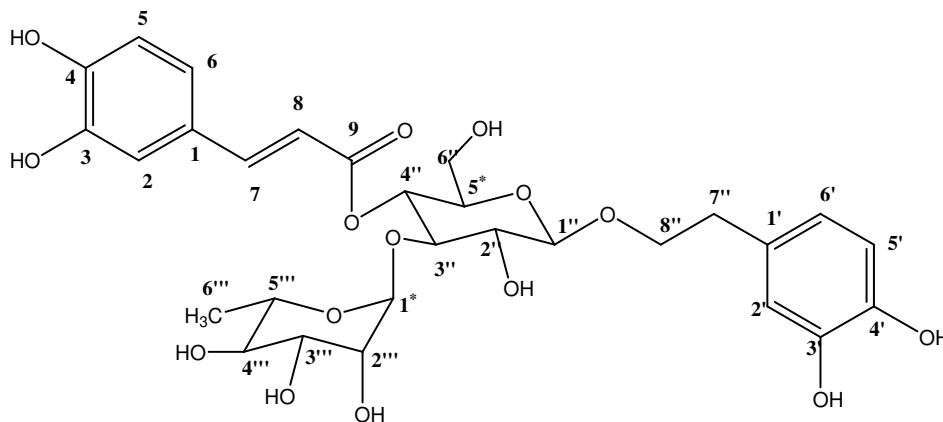
**Tabela 4** – Resultados da atividade inibitória das principais frações e extrato bruto de *Buddleja brasiliensis* frente à POP e DPP IV.

| Amostra (100 µg/mL) | % de Inibição da POP | % de Inibição da DPP IV |
|---------------------|----------------------|-------------------------|
| Extrato Bruto       | 79,7                 | 22,9                    |
| Fração 4            | 83,3                 | 31,3                    |
| Fração 6            | 75,8                 | 27,8                    |
| Fração 8            | 65,0                 | 38,1                    |
| Fração 9            | 72,0                 | 22,8                    |
| Fração 11           | 60,7                 | 14,2                    |
| Fração 12           | 84,9                 | 33,1                    |

Visto que diversos compostos naturais isolados de plantas medicinais tem potencial inibitório frente a AChE (Barbosa Filho et al., 2006), neste trabalho foram realizados testes através do método de autobiografia com o extrato bruto e as principais frações de *Buddleja brasiliensis*, sendo que somente as frações F4 e F12 na concentração de 25 µg mostraram resultado positivo, com visíveis áreas de inibição da enzima nas placas cromatográficas de sílica gel.

De acordo com os resultados obtidos nos testes inibitórios preliminares com as frações de *B. brasiliensis*, foi selecionada a F4 do Método de Fracionamento I para o isolamento bioguiado do(s) metabólito(s) principal(is) responsável(is) pela sua atividade enzimática. Foram realizadas sucessivas purificações por coluna cromatográfica em sílica gel e Sephadex LH20, isolando-se Z01 e Z02. Através de elucidção estrutural por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatográfica líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massa (CLAE-EM) e ressonância magnética nuclear (RMN), Z01 e Z02 foram então identificados como sendo o mesmo metabólito, o fenilpropanóide [2-(3,4-diidroxifeniletíl)-1-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1  $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-(4-*O*-cafeoil)-glucopiranosídeo], conhecido como verbascosídeo ou acteosídeo (**1**). Este metabólito é um glicosídeo fenólico caracterizado por um núcleo 4,5-hidroxifeniletanol e um núcleo cafeoil ligados a um  $\beta$ -D-glucopiranosídeo, sendo que já foi isolado previamente de algumas espécies de *Buddleja*, mas

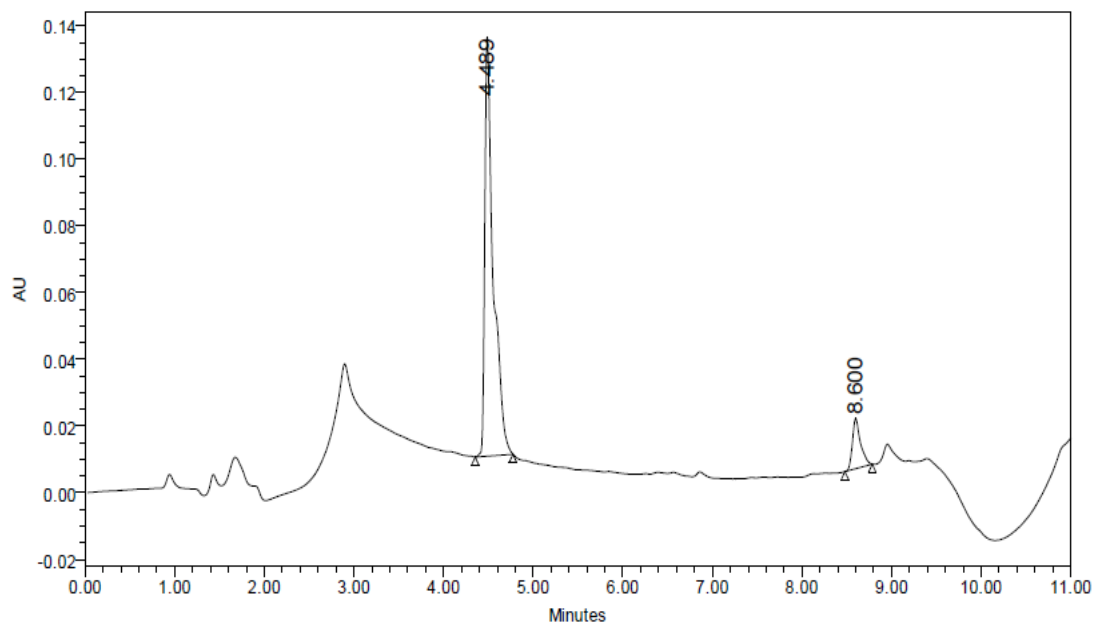
nunca anteriormente da *Buddleja brasiliensis*. Diversos estudos tem atribuído a **1** várias atividades biológicas, tais como atividade analgésica (Backhouse et al, 2008), fotoprotetora (Avila Acevedo et al., 2005), antimicrobiana (Avila et al., 1999), e atividade antioxidante (Liu et al, 2003).



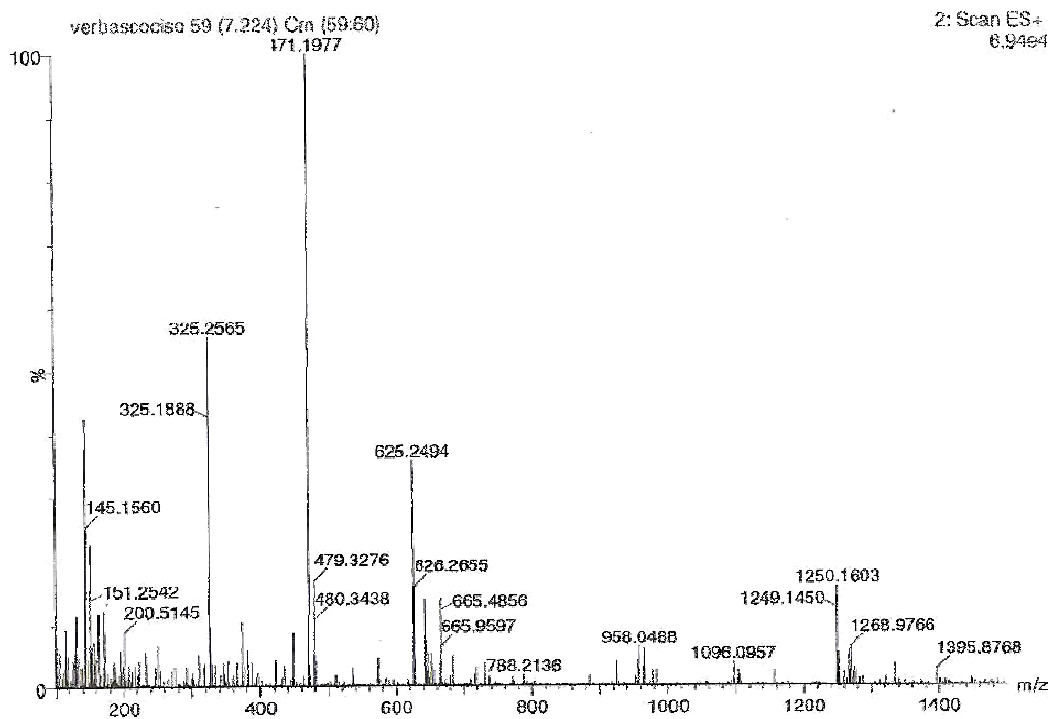
**Figura 19** – Estrutura do verbascosídeo (**1**)

O composto **1** foi caracterizado e identificado por CCD, CLAE, CLAE-EM e espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e DEPT 135°, sendo os dados obtidos comparados com dados existentes na literatura. O cromatograma de CLAE (Figura 20a) mostra **1** eluindo com um tempo de retenção de 4,49 min (gradiente linear de 0- 100 % MeCN em 8 min). O espectro de massa referente a este composto (Figura 20b) mostra um íon pseudomolecular a  $m/z$  625,249 referente a  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (Figuras 21 e 22) indicam a presença dos núcleos feniletanol, cafeoil e dos açúcares glicose e ramnose. No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observa-se, na região entre 3,2 e 5,15 ppm, vários sinais pertencentes a hidrogênios de carbonos ligados a heteroátomos. Na região entre 6,15 e 7,55 ppm observam-se sinais de hidrogênios ligados a carbonos insaturados. O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  mostra vários sinais entre 62,4 - 81,7 ppm relativos a carbonos ligados a heteroátomos, sinais de carbonos olefínicos (entre 114,74 e 149,83 ppm) e um sinal a 168,35 ppm correspondente a um carbono carbonílico da função éster do verbascosídeo (**1**), como demonstra a Figura 23.

a)

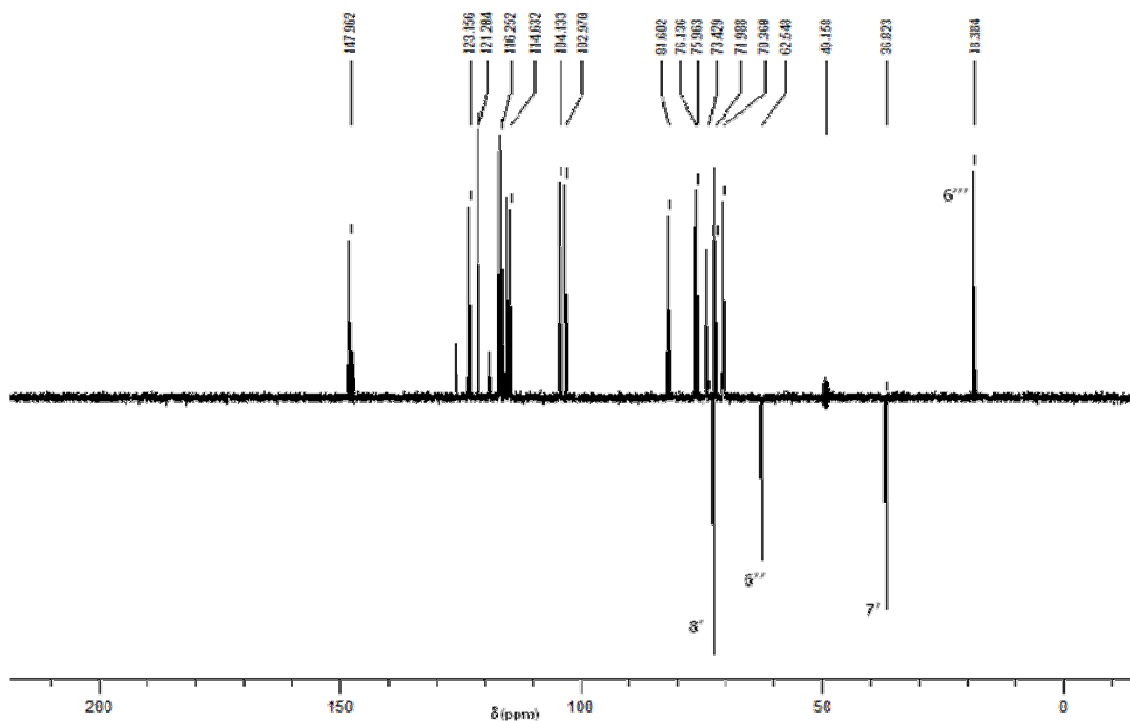


b)



**Figura 20 – a)** Cromatograma de CLAE em coluna C18 (gradiente linear de 0- 100 % MeCN em 8 min); **b)** Espectro de massa (CLAE-EM) do verbascosídeo (**1**) isolado de *Buddeja brasiliensis*





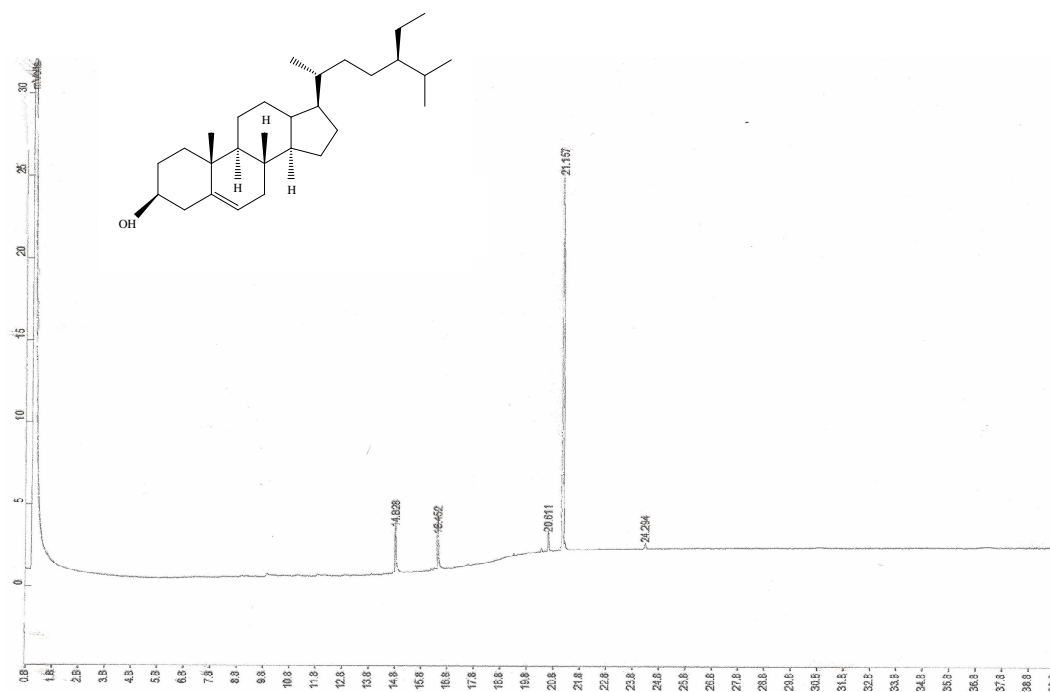
**Figura 23** – Espectro de RMN DEPT 135° em CD<sub>3</sub>OD do verbascosídeo (**1**).

As frações obtidas pelo Método de fracionamento II foram analisadas por prospecção fitoquímica (Tabela 3) e por CCD com padrões conhecidos existentes no laboratório e com o verbascosídeo (**1**), isolado conforme descrito acima. Desta forma foram identificados como componentes das frações hexano e diclorometano, juntamente com vários pigmentos, os esteroides  $\beta$ -sitosterol (**54**) e estigmasterol (**55**). Foi observado através de CCD em diferentes sistemas de solvente o metabólito verbascosídeo (**1**) como principal componente da fração Acetato de etila. Este composto também foi observado na fração Butanol, sendo um dos componentes de uma mistura bastante complexa de compostos relativamente polares que revelaram positivamente com solução etanólica de FeCl<sub>3</sub>.

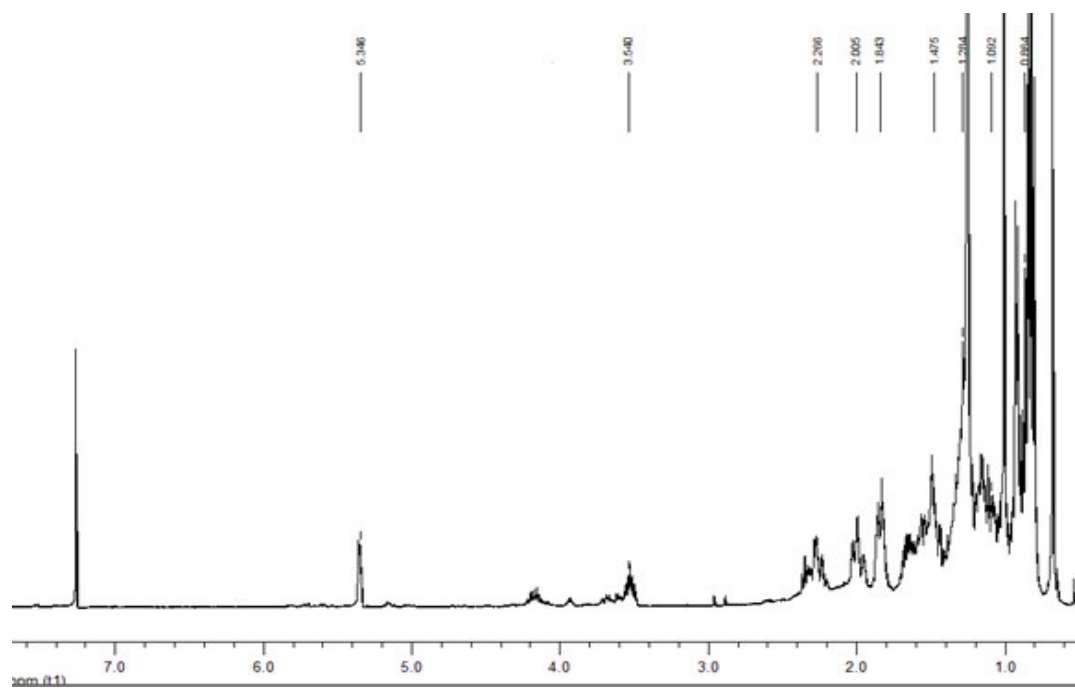
A partir da análise por CCD em diferentes sistemas de solventes e análise de cromatogramas de CG utilizando padrões conhecidos, foi possível a identificação nas frações hexano e diclorometano de dois metabólitos secundários identificados anteriormente nos extratos brutos de outras espécies de *Buddleja*. Os metabólitos identificados da espécie em estudo utilizando técnicas como CCD, CG e RMN de <sup>1</sup>H foram os esteróides  $\beta$ -sitosterol (**54**) e estigmasterol (**55**). A presença destes compostos na planta foi confirmada pela comparação

com padrões autênticos, pela análise através de espectroscopia de RMN de  $^1\text{H}$  e comparação dos dados obtidos com os dados existentes na literatura.

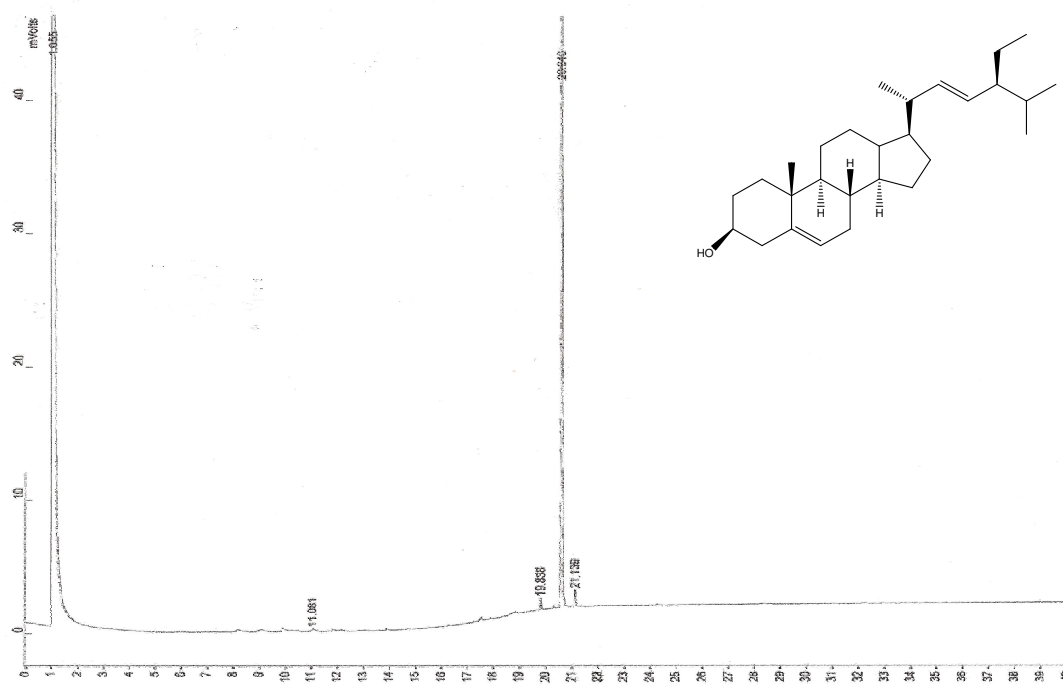
O cromatograma de CG da Figura 24 mostra um pico majoritário com tempo de retenção 21,157 min referente ao  $\beta$ -sitosterol (**54**). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Figura 25 verifica-se a presença característica de um sinal a 5,35 ppm referente ao hidrogênio olefínico ligado ao carbono C6 do  $\beta$ -sitosterol (**54**), além de um multiplete a 3,54 ppm referente ao hidrogênio do C3. Observam-se ainda vários sinais na região entre 0,7 e 2,2 ppm referentes aos hidrogênios dos vários grupos metílicos e dos grupos metilênicos presentes na estrutura do  $\beta$ -sitosterol (**54**). O cromatograma de CG da Figura 26 mostra um pico majoritário com tempo de retenção 20,640 min referente ao composto estigmasterol (**55**). No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **55** da Figura 27 verifica-se a presença característica de sinais referentes aos hidrogênios olefínicos ligados aos carbonos C6, C22 e C23, a 5,36, 5,10 e 5,03 ppm respectivamente, além de um multiplete a 3,52 ppm referente ao hidrogênio ligado ao C3. Observa-se ainda vários sinais na região entre 1,88 e 0,71 ppm relativos aos hidrogênios dos grupos metílicos e dos grupos metilênicos presentes na estrutura do estigmasterol (**55**).



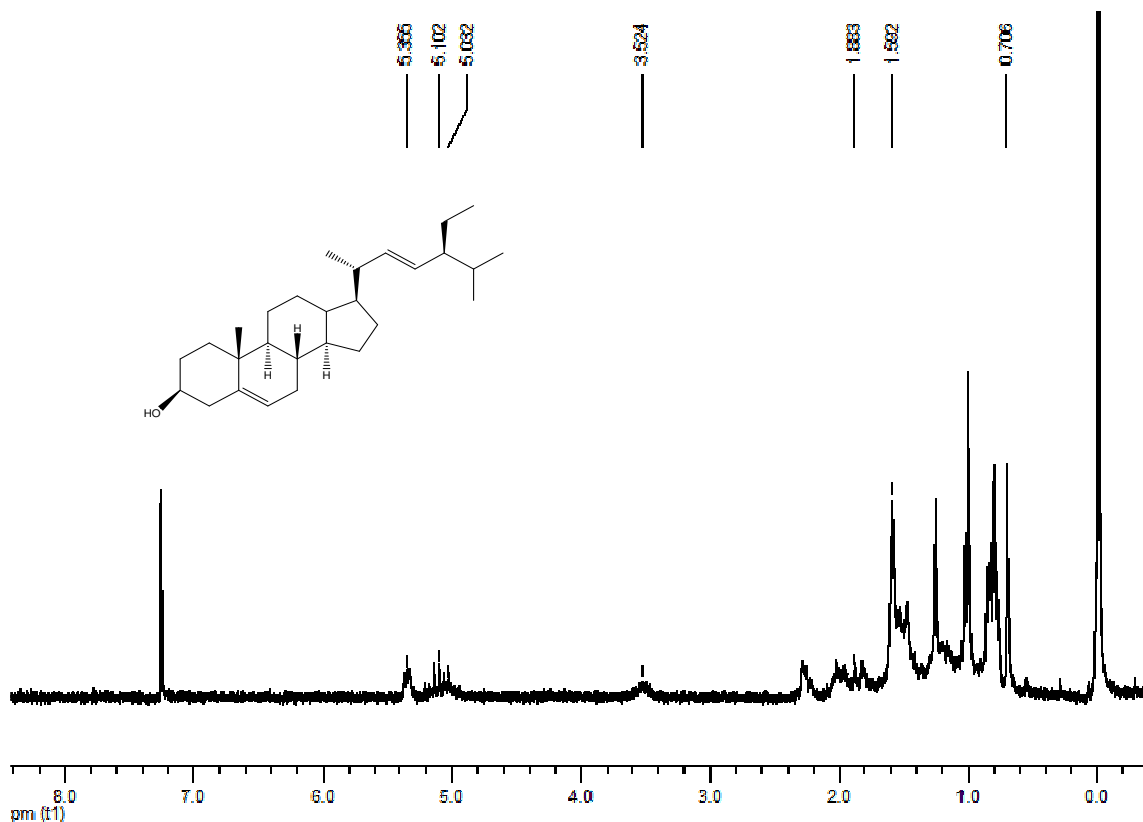
**Figura 24** – Cromatograma de CG em coluna apolar do composto  $\beta$ -sitosterol (**54**) isolado.



**Figura 25** – Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do composto  $\beta$ -sitosterol (**54**) isolado.



**Figura 26** – Cromatograma de CG em coluna apolar do composto estigmasterol (**55**)



**Figura 27** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H do composto isolado estigmasterol (**55**)

Nos testes de atividade enzimática realizados com o composto isolado verbascosídeo (**1**) verificou-se que este não inibiu de forma significativa as enzimas DPP IV e AChE. No ensaio realizado com DPP IV, houve uma fraca atividade inibidora da enzima ( $IC_{50} \gg 150 \mu M$ ). A avaliação da atividade frente a AChE foi realizada através do método de autobiografia descrito por Marston et al. (2002) e validado por Mroczek (2009), onde a bioatividade frente a esta enzima é estimada a partir de valores de pMIQ (representando o logaritmo negativo da mínima quantidade inibitória em mol que produz um halo branco observável nas placas de CCD). Di Giovanni *et al.* (2008) determinaram que o valor de pMIQ mínimo para considerar-se um composto inibidor da AChE por bioautografia é de 10,5, sendo compostos com valores acima deste limite considerados ativos. Para os controles positivos galantamina e fisostigmina obtiveram-se valores de pMIQ de 11,38 e 11,66, respectivamente. O verbascosídeo (**1**) mostrou um pMIQ de 9,6 podendo, portanto, ser considerado inativo contra a AChE.

Em contrapartida, **1** demonstrou ter uma significativa e seletiva atividade inibitória frente à enzima POP, com um  $IC_{50}$  de  $1,3 \mu M$ . Isto demonstra que o composto apresenta





**Tabela 5** – Composição do óleo volátil das folhas de *Buddleja brasiliensis*.

| Nº | Composto                            | Porcentagem | IK   | Identificação |
|----|-------------------------------------|-------------|------|---------------|
| 1  | Butirato de pentila                 | 2,66        | 1095 | CG            |
| 2  | 2,2-Dimetil-3,4-Octadienal          | 0,93        | 1110 | CG            |
| 3  | Anetofurano                         | 0,77        | 1184 | CG            |
| 4  | Acetato de <i>trans</i> -sabineno   | 0,67        | 1253 | CG-EM         |
| 5  | Ácido Nonanóico                     | 0,49        | 1280 | CG            |
| 6  | Acetato de furfurila                | 0,42        | 1367 | CG            |
| 7  | $\alpha$ -tujaplicina               | 11,51       | 1407 | CG            |
| 8  | $\alpha$ -bisaboleno                | 4,70        | 1504 | CG-EM         |
| 9  | Sesquicineol                        | 0,51        | 1514 | CG-EM         |
| 10 | Octanoato de furfurila              | 0,33        | 1567 | CG-EM         |
| 11 | Salicilato de pentila               | 2,07        | 1572 | CG            |
| 12 | $\beta$ -acorenol                   | 0,51        | 1634 | CG-EM         |
| 13 | Vulgarona B                         | 1,08        | 1647 | CG-EM         |
| 14 | $\alpha$ -eudesmol                  | 0,39        | 1652 | CG-EM         |
| 15 | Tiglato de citronelil               | 0,51        | 1667 | CG            |
| 16 | Acetato de Z-neridol                | 3,00        | 1676 | CG-EM         |
| 17 | Deodarona                           | 0,75        | 1694 | CG            |
| 18 | Acetato de cariofileno              | 0,61        | 1698 | CG-EM         |
| 19 | Butilideno-ftalido                  | 0,42        | 1711 | CG            |
| 20 | Acetato de E-neridol                | 0,53        | 1714 | CG            |
| 21 | Acetato de guaiol                   | 0,52        | 1724 | CG-EM         |
| 22 | Kusimol                             | 0,43        | 1733 | CG-EM         |
| 23 | $\beta$ -santalol                   | 0,53        | 1741 | CG-EM         |
| 24 | Acetato de cedrila                  | 0,65        | 1762 | CG-EM         |
| 25 | Acetato de epi- $\alpha$ -bisabolol | 1,89        | 1801 | CG-EM         |
| 26 | $\alpha$ -vetivona                  | 2,05        | 1835 | CG-EM         |

| Nº | Composto                | Porcentagem | IK   | Identificação |
|----|-------------------------|-------------|------|---------------|
| 27 | Ternina                 | 0,94        | 1838 | CG            |
| 28 | Acetato de lanceol      | 0,48        | 1860 | CG-EM         |
| 29 | Cedrano-diol            | 0,37        | 1884 | CG            |
| 30 | Catalpona               | 1,52        | 1889 | CG            |
| 31 | Tetraidrorimueno        | 2,00        | 1955 | CG-EM         |
| 32 | Manool                  | 1,85        | 1961 | CG            |
| 33 | Heneicosano             | 14,52       | 2100 | CG            |
| 34 | Laurenan-2-ona          | 0,68        | 2110 | CG            |
| 35 | Octadecanoato de metila | 0,48        | 2136 | CG            |
| 36 | Osthol                  | 0,87        | 2138 | CG            |
| 37 | Oroselona               | 0,47        | 2148 | CG            |

A Figura 28 e a Tabela 5 indicam que o óleo essencial das folhas de *Buddleja brasiliensis* é constituído por compostos monoterpênicos, sesquiterpênicos e diterpênicos, sendo o diterpeno heneicosano e o monoterpeneo  $\alpha$ -tujaplicina os componentes majoritários, com 14,52 % e 11,51 %, respectivamente.

Inicialmente realizaram-se ensaios de atividade inibitória frente as enzimas POP e DPP IV do óleo essencial de *Buddleja brasiliensis* utilizando-se a concentração padrão de 100  $\mu\text{g/mL}$ , porém como em nenhum ensaio realizado o óleo apresentou atividade inibitória observável por fluorimetria, decidiu-se repetir os testes com o dobro da concentração recomendada para este tipo de teste enzimático. A 200  $\mu\text{g/mL}$  o óleo das folhas mostrou 7,26 % de atividade inibitória da enzima POP, sendo esta percentagem indicativa de baixa capacidade de inibição. Considerando-se a alta concentração testada, os resultados com a enzima DPP IV também não foram satisfatórios, pois o óleo das folhas mostrou atividade frente à enzima DPP IV na faixa de 34 %.

## 6.2 *Artemisia verlotorum*

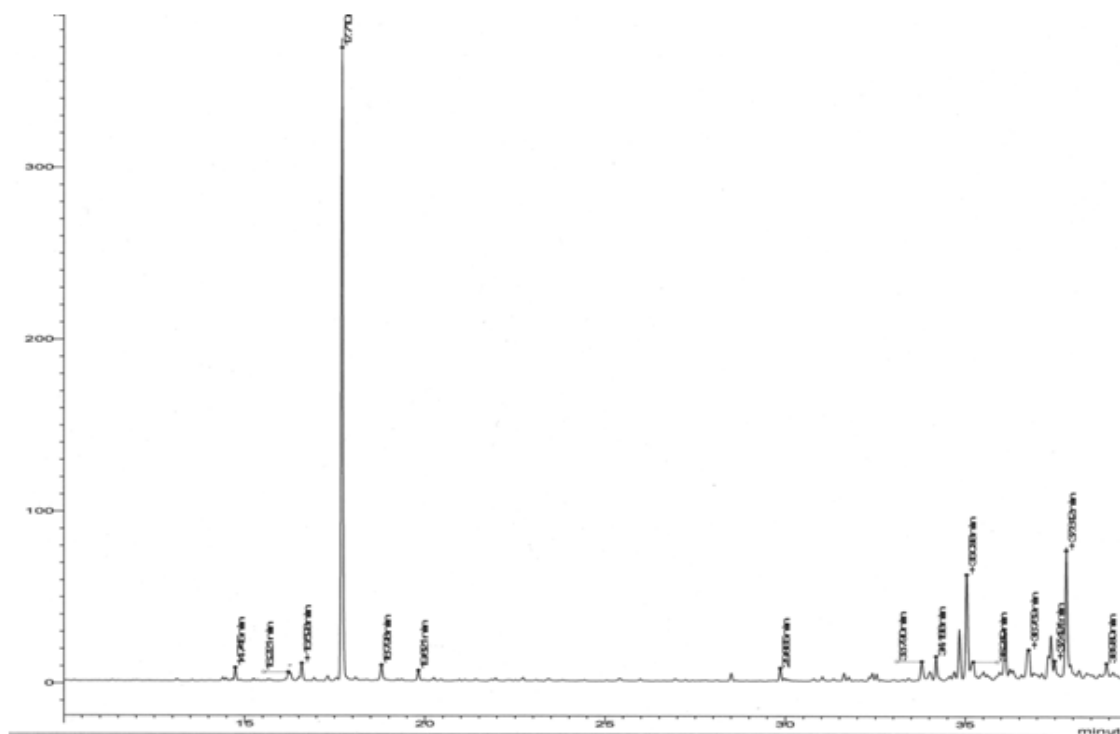
Após a extração exaustiva a frio das partes aéreas desta planta com metanol obteve-se o extrato bruto de *Artemisia verlotorum* com rendimento de 17,3 %. Este foi então submetido a fracionamento neutro, obtendo-se as frações hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. As frações hexano, diclorometano e acetato de etila foram analisadas frente às enzimas POP, DPP IV e AChE. Nos testes com POP e DPP IV foi utilizada a concentração padrão de 100 µg/mL. Verificou-se que as frações de maior potencial inibitório da POP foram hexano e acetato de etila (Tabela 6). As frações testadas também mostraram atividade de inibição da AChE até a concentração de 0,006 µg/mL por bioautografia. Os ensaios de potencial inibitório frente à DPP IV indicaram que nenhuma fração foi capaz de inibir esta enzima acima de 50 % na concentração padrão testada. Estes resultados sugerem que esta planta medicinal poderá ser uma fonte promissora de metabólitos capazes de inibir as enzimas POP e AChE, sendo estes metabólitos localizados principalmente na fração Acetato de etila. Como a inibição destas enzimas está relacionada com enfermidades como a esquizofrenia, o transtorno bipolar e o mal de Alzheimer, estes resultados mostram a necessidade de uma pesquisa mais intensa com o fim de identificar os metabólitos ativos, que poderão vir a ser candidatos a componentes de fármacos utilizados no tratamento destas doenças.

**Tabela 6** – Atividade inibitória das frações de *Artemisia verlotorum* frente às enzimas POP e DPP IV

| Amostra (100 µg/mL)     | % de Inibição da POP | % de Inibição da DPP IV |
|-------------------------|----------------------|-------------------------|
| Fração Hexano           | 77,97                | 19,02                   |
| Fração Diclorometano    | 62,90                | 19,77                   |
| Fração Acetato de etila | 89,13                | 42,55                   |

### 6.2.1 Obtenção do óleo essencial de *Artemisia verlotorum*

Além das frações do extrato bruto, obteve-se também óleo essencial de *Artemisia verlotorum* a partir de hidrodestilação em sistema de Clevenger modificado. Este óleo (rendimento: 0,4 %) foi analisado por cromatografia gasosa (Figura 29) e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa (Tabela 7). Os quatro principais constituintes químicos do óleo foram identificados por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa, sendo eles acetato de santonilila (37,2 %),  $\alpha$ -cadinol (9,59 %), óxido de cariofileno (7,97 %) e óxido de  $\beta$ -himachaleno (3,82 %). Tal como observado com *Buddleja brasiliensis*, o óleo essencial de *Artemisia verlotorum* a uma concentração de 200  $\mu\text{g/mL}$  não apresentou significativa capacidade inibitória das enzimas POP (2,34 % de inibição) e DPP IV (27,94 %). Porém, este óleo mostrou atividade de inibição da enzima AChE até a concentração de 0,006 $\mu\text{g/mL}$ .



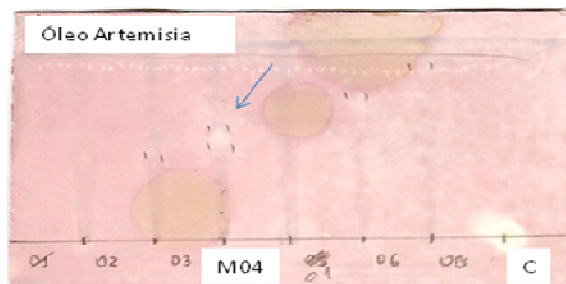
**Figura 29** – Perfil cromatográfico do óleo das folhas de *Artemisia verlotorum*. Coluna utilizada: fase estacionária apolar SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise:  $T_{\text{injetor}} = 220$  °C,  $T_{\text{detector}} = 250$  °C.

**Tabela 7** – Composição do óleo volátil das folhas de *Artemisia verlotorum*.

| Nº | Composto                                | Porcentagem | IK   | Identificação |
|----|---|-------------|------|---------------|
| 1  | Maltol                                  | 0,80        | 1108 | CG            |
| 2  | Acetato de santonilila                  | 37,2        | 1173 | CG-EM         |
| 3  | Acetato de endo-fenchila                | 0,80        | 1220 | CG            |
| 4  | Acetato de para-cimen-7-ol              | 0,53        | 1419 | CG            |
| 5  | Etil vanilina                           | 0,83        | 1452 | CG            |
| 6  | Germacreno B                            | 1,00        | 1556 | CG            |
| 7  | Acetato de (Z)-3-hexenila               | 0,47        | 1570 | CG            |
| 8  | (Z)-Isoeemicina                         | 0,70        | 1573 | CG            |
| 9  | Óxido de cariofileno                    | 7,97        | 1582 | CG-EM         |
| 10 | (E)-Deidro-apofarnesol                  | 2,28        | 1587 | CG            |
| 11 | Wildrol                                 | 0,60        | 1597 | CG            |
| 12 | Óxido de $\beta$ -himachileno           | 3,82        | 1610 | CG-EM         |
| 13 | 1,10-Di- <i>epi</i> -cubenol            | 0,82        | 1614 | CG            |
| 14 | 8-isobutiriloxi-isoborneol              | 3,66        | 1628 | CG            |
| 15 | (E)-Sesquilandulol                      | 0,57        | 1632 | CG            |
| 16 | $\beta$ -acorneol                       | 0,50        | 1634 | CG            |
| 17 | 4- $\alpha$ -hidroxi-diidro agarofurano | 1,42        | 1648 | CG            |
| 18 | $\alpha$ -cadinol                       | 9,59        | 1656 | CG-EM         |
| 19 | Patchouli álcool                        | 1,56        | 1659 | CG            |
| 20 | Bulnesol                                | 0,91        | 1666 | CG            |
| 21 | Valeranona                              | 0,63        | 1672 | CG            |

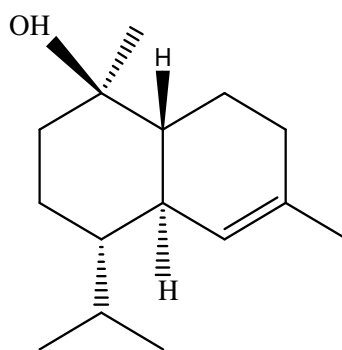
Após a obtenção do óleo essencial de *Artemisia verlotorum*, 40  $\mu$ L do óleo diluído em cloroformio foi aplicado sobre uma placa preparativa e eluído com o sistema de solventes hexano:acetato de etila 20 %. Foram observadas sete bandas principais na revelação em câmara UV a 254 nm. Todas as bandas foram removidas da placa por raspagem, extraídas

com 10 mL de hexano para remoção da sílica, secas em rotaevaporador e quantificadas, sendo após aplicados 2  $\mu$ L de cada em placa de CCD para análise por bioautografia com a enzima AChE (Figura 30). Observou-se que somente a banda correspondente a fração M04 apresentou halo branco indicativo de inibição da AChE.



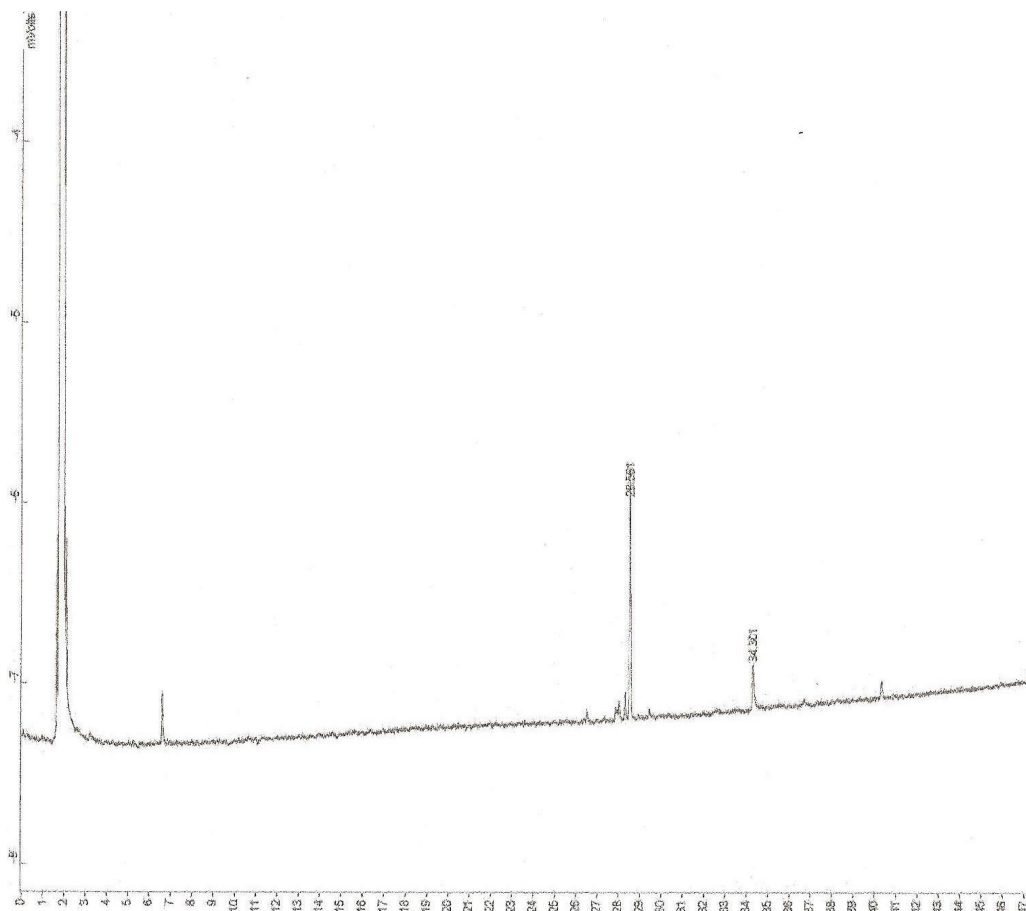
**Figura 30** – Atividade inibitória de M04 frente a acetilcolinesterase por bioautografia. (C = Controle – Fisostigmina)

A substância M04 com atividade inibitória da AChE foi analisada por cromatografia gasosa, observando-se um pico único de tempo de retenção 28,561 min (Figura 32) correspondente ao sesquiterpeno  $\alpha$ -cadinol (**56**) (Figura 31). O  $\alpha$ -cadinol foi analisado também quanto a capacidade de inibição da POP e da DPP IV a uma concentração de 200  $\mu$ g/mL, sendo inativo frente à POP (2,77 % de inibição) e muito pouco ativo frente à DPP IV (30% de inibição).



(56)

**Figura 31** – Sesquiterpeno  $\alpha$ -cadinol isolado do óleo essencial de *Artemisia verlotorum*



**Figura 32** – Cromatograma de CG em coluna apolar do composto isolado do óleo de *Artemisia verlotorum*,  $\alpha$ -cadinol. Coluna utilizada: fase estacionária apolar SE-54, CCSF de 25 m. Programa de análise:  $T_{\text{injetor}} = 220\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $T_{\text{detector}} = 250\text{ }^{\circ}\text{C}$

### 6.3 Determinação da Atividade Antimicrobiana de *Buddleja brasiliensis* e *Artemisia verlotorum*

As frações de *Buddleja brasiliensis* que demonstraram maior atividade foram as frações diclorometano e acetato de etila (CIM) para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*. Esta frações demonstraram atividade tanto frente à bactérias gram-positivas como gram-negativas, mas pouca ou nenhuma atividade frente aos fungos testados. As frações



hexano e butanol apresentaram-se pouco ativas, enquanto que o extrato bruto e o verbascósídeo (**1**) foram inativas frente aos microorganismos testados (Tabela 8).

Com relação ao extrato bruto e frações de *Artemisia verlotorum*, onde se observa que a fração Diclorometano demonstra melhor atividade frente ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*, com uma CIM de 125 µg/mL. Em relação às bactérias gram-positivas e gram-negativas, o extrato bruto e as demais frações apresentaram pouca ou nenhuma atividade tanto em relação à (CIM) quanto à (CLM) (Tabela 9).

**Tabela 8** - Resultados da atividade antimicrobiana de frações e composto isolado de *Buddleja brasiliensis*

| <i>Buddleja brasiliensis</i>                   |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                                   |                  |                  |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------------------|------------------|------------------|
| MICROORGANISMOS <sup>a</sup>                   | EB               |                  | FH               |                  | FD               |                  | FA               |                  | FB               |                  | VERBASCOSÍDEO PADRÃO <sup>c</sup> |                  |                  |
|  | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup>                  | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)       | NA               | -                | 250              | >500             | 125              | >500             | 125              | >500             | 500              | >500             | NA                                | -                | 3,12             |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) | NA               | -                | 250              | >500             | 125              | >500             | 125              | >500             | 500              | >500             | NA                                | -                | 3,12             |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)           | NA               | -                | 250              | >500             | 125              | >500             | 125              | >500             | 500              | >500             | NA                                | -                | 1,56             |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)      | NA               | -                | 250              | >500             | 125              | >500             | 125              | >500             | 500              | >500             | NA                                | -                | 3,12             |
| <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)           | NA               | -                | 250              | >500             | 125              | >500             | 125              | >500             | 500              | >500             | NA                                | -                | 3,12             |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)     | NA               | -                | 250              | >500             | 125              | >500             | 125              | >500             | 500              | >500             | NA                                | -                | 6,25             |
| <i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 28952)    | NA               | -                | 500              | >500             | 500              | >500             | 250              | >500             | NA               | -                | NA                                | -                | 10,3             |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)    | NA               | -                | 500              | >500             | 500              | 500              | 250              | 500              | 500              | >500             | NA                                | -                | 10,3             |
| <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)           | NA               | -                | 500              | >500             | 500              | 500              | 250              | >500             | 500              | >500             | NA                                | -                | 10,3             |

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection); <sup>b</sup> em µg/mL; NA = Não Ativo

<sup>c</sup> Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras

**Tabela 9** - Resultados da atividade antimicrobiana de frações de *Artemisia verlotorum*

| <i>Artemisia verlotorum</i>                    |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |                  |
|--|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| MICROORGANISMO <sup>a</sup>                    | EB               |                  | FH               |                  | FD               |                  | FA               |                  | FB               |                  | PADRÃO           |
|  | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> | CLM <sup>b</sup> | CIM <sup>b</sup> |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)       | NA               | -                | 500              | >500             | 500              | >500             | 500              | >500             | NA               | -                | 3,12             |
| <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) | NA               | -                | 500              | >500             | 250              | >500             | 250              | >500             | NA               | -                | 3,12             |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)           | NA               | -                | 250              | >500             | 250              | >500             | 250              | >500             | 500              | >500             | 1,56             |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 13883)      | NA               | -                | 500              | >500             | 500              | >500             | 500              | >500             | NA               | >500             | 3,12             |
| <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)           | 500              | >500             | 250              | >500             | 250              | >500             | 250              | >500             | 500              | >500             | 3,12             |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC 19615)     | NA               | -                | 250              | >500             | 250              | >500             | 500              | >500             | NA               | -                | 6,25             |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)       | NA               | -                | NA               | -                | NA               | -                | NA               | -                | NA               | -                | 10,3             |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 2601)    | 500              | 500              | 250              | 250              | 125              | 250              | 250              | 250              | 500              | 500              | 10,3             |
| <i>Candida albicans</i> (ATCC 10231)           | NA               | -                | NA               | -                | 500              | >500             | NA               | -                | NA               | -                | 10,3             |

<sup>a</sup> ATCC (American Type Culture Collection); <sup>b</sup> em µg/mL;  
NA = Não Ativo

<sup>c</sup> Cloranfenicol para bactérias e nistatina para leveduras

## 7 CONCLUSÃO

O Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais- NPPN da Universidade Federal de Santa Maria vem realizando um estudo sistemático para a descoberta de novos inibidores naturais a partir de plantas nativas da medicina popular do RS. Dentro deste contexto, o presente trabalho envolveu o estudo fitoquímico e a avaliação da atividade biológica das espécies *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex. Spreng e *Artemisia verlotorum* Lamotte. Deste trabalho destacam-se como conclusões principais:

- O método de obtenção do extrato bruto de *Buddleja brasiliensis* Jacq. ex. Spreng em meio metanólico a quente, seguido do fracionamento tradicional utilizando solventes com polaridades crescentes foi o método em que se obteve maior rendimento de extrato e frações mais diferenciadas em classes de metabólitos secundários específicos.

- As frações F4 e F12 de *B. brasiliensis* obtidas pelo método de fracionamento I apresentaram-se como as de maior potencial inibidor da POP. Todas as frações testadas mostraram baixa atividade inibitória da enzima DPP IV. As frações F4 e F12 mostraram-se capazes de inibir também a enzima AChE em testes bioautográficos preliminares.

- Os testes de atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações do método de fracionamento II de *B. brasiliensis* indicaram como mais ativas as frações Diclorometano e Acetato de etila para *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pyogenes*.

- O estudo fitoquímico de *B. brasiliensis* permitiu o isolamento de três constituintes fixos conhecidos, um fenilpropanóide e dois esteroides: verbascosídeo (**1**),  $\beta$ -sitosterol (**54**) e estigmasterol (**55**). A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa do óleo essencial de *B. brasiliensis* indicou a presença do monoterpene  $\alpha$ -tujaplicina (11,5 %) e do diterpene heneicosano (14,5 %) como constituintes principais.

- O fenilpropanoide verbascosídeo (**1**) exibiu forte e seletiva capacidade de inibição da POP de uma maneira dose-dependente. Esta sua potente ação farmacológica indica um possível valor terapêutico de **1** no tratamento de doenças neuropsiquiátricas como a esquizofrenia e o transtorno bipolar.

- A fração acetato de etila de *Artemisia verlotorum* foi a que apresentou maior atividade inibitória da POP e da AChE, indicando que esta planta medicinal é uma fonte

importante de inibidores naturais destas enzimas. A fração Diclorometano demonstrou a melhor atividade antimicrobiana, principalmente frente ao fungo *Saccharomyces cerevisiae*.

- A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa do óleo essencial de *Artemisia verlotorum* indicou a presença do monoterpene acetato de santonilila e do sesquiterpene  $\alpha$ -cadinol como constituintes principais, sendo este com baixa atividade inibitória frente às enzimas POP e DPP IV, mas com atividade frente a AChE, significando portanto, ter importância terapêutica.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARCINIEGAS, A. et al. Flavonoids from *Buddleja parviflora*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 25, p. 185-186, 1997.

AVILA, J. G. et al. Mode of action of *Buddleja cordata* vernascoside against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 66, p. 75-78, 1999.

AVILA ACEVEDO, J. G. et al. Photoprotective activity of *Buddleja scordioides*. **Fitoterapia**, v. 76, p. 301-309, 2005.

BACKHOUSE, N. et al. Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant proprieties of *Buddleja globosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 263-269, 2008.

BARBOSA FILHO, J. M. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 158-285, 2006.

BEVILAQUA, G.A., et al. Identificação e tecnologia de plantas medicinais da flora de clima temperado. **Revista Circular Técnica**, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2007.

BINGEN, E. et al. Emergence of macrolides-resistant of *Streptococcus pyogenes* strains in French children. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p. 3559-3562, 2004.

BLAGOJEVIC, P. et al. Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 4780-4789, 2006.

BORLOZ, A. et al. The determination of huperzine A in european Lycopodiaceae species by HPLC-UV-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 17, p. 332-336, 2006.

BREEN, G. et al. Two peptidase activity decrease in treated bipolar disorder not schizophrenic patients. **Bipolar Disorders**, v.6, p. 156-161, 2004.

CHECLER, F. et al. Inactivation of neurotensin by rat brain synaptic membranes partly occurs through cleavage at the Arg<sup>8</sup>-Arg<sup>9</sup> peptide bond by a Metalloendopeptidase. **Journal of Neurochemistry**, v. 105, p. 346-351, 2006.

CORTÉS, A. L. et al. The antispasmodic activity of *Buddleja scordioides* and *Buddleja perfoliata* on isolated intestinal preparations. **Biological Pharmacological Bulletin**, v. 29, p. 1186-1190, 2006.

CUONG VUONG, M. O.. *Staphylococcus epidermidis* infections. **Microbes and Infection**, v.4, p. 481-489, 2002.

DEACON, C. F.; AHRÈN, B.; HOLST, J. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: a novel approach for the prevention and treatment of type 2 diabetes? **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 13, p. 1091-1102, 2004.

DECLERCK, Y. A. et al. Proteases, Extracellular Matrix, and cancer. **American Journal of Pathology**, v. 164, n. 4, 2004.

DEVIENNE, K.F., et al. Das plantas medicinais aos fitofármacos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.3, p.11-14, 2004.

ELSOHLY, H. N. et al. Analysis of the antimalarial sesquiterpene artemisin in *Artemisia annua* by High-performance liquid Chromatography (HPLC) with postcolumn derivatization and ultraviolet detection. **Pharmaceutical Research**, v. 4, p. 258-260, 1987.

EMAM, A. M. et al. Two flavonoid triglycosides from *Buddleja madagascariensis*. **Phytochemistry**, v. 48, p. 739-742, 1998.

EMAM, A. M. et al. Isolation of mimengoside B, a triterpenoid saponin from *Buddleja madagascariensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.58, p. 215-217, 1997.

FAN, P. et al. Acetylcholinesterase-inhibitory activity of linarin from *Buddleja davidii*, structure-activity relationships of related flavonoids, and chemical investigation of *Buddleja nitida*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n° 9, p. 596-601, 2008.

FOGLIO, M.A. et al. Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo interdisciplinar. **Divisão de Fitoquímica**. Campinas: CPQBA/UNICAMP. 2006.

GUO, H. et al. Saponins from flower buds of *Buddleja officinalis*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 10-13, 2004.

JOLY, A. B. Botânica – **Introdução à taxonomia vegetal**. 4 ed. [S.I]: Companhia Editorial Nacional, p. 276, 582, 1977.

HAMBURGER, A. L.; FUCHS, A. Direct autobiography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v.51, p. 327-329, 1970.

HEINRICH, M. et al. Ethnopharmacology of mexican Asteraceae (Compositae). **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 38, p. 539-365, 1998.

HOUGHTON, P. J. Ethnopharmacology of some Buddleja species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 11, p. 293-308, 1984.

HOUGHTON, P. J. et al. Anti-hepatotoxic activity of extracts and constituents of Buddleja species. **Planta Med**, v. 55, p. 123-126, 1989.

HOUGHTON, P. J. et al. Terpenoids in Buddleja: relevance to the chemostatics, chemical ecology and biological activity. **Phytochemistry**, v. 64, p. 385-393, 2003.

JUDZENTIENE, A.; BUZELYTE, J.; Chemical composition of essential oil of *Artemisia vulgaris* L. (mugwort) from North Lithuania. **Chemija**, v.17, p. 12-15, 2006.

LEE, J. Y. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-unducible nitric oxide synthase expression by acteoside through blocking of AP-1 activation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 561-566, 2005.

LEE, D. et al. Neuroprotective effect of *Buddleja officinalis* extract on transient middle cerebral artery occlusion in rats. **Biological Pharmacological Bulletin**, v. 29, p. 1608-1612, 2006.

LIAO, M. S. et al. Antioxidative constituents from *Buddleja officinalis*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 26, p. 453-457, 2003.

LIU, M. et al. The effects of verbascoside on plasma lipid peroxidation level and erythrocyte membrane fluidity during immobilization in rabbits: a time course study. **Life Sciences**, v. 73, p.883-892, 2003.

LORENZI, H., MATOS, F.J. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Ed Plantarum, Nova Odessa, SP, p. 354-355, 2002.

LORENZO, D. et al. Composition and chiral characterization of the essential oil of *Buddleja tucumanensis* from Bolivia. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 21, p. 95-98, 2006.



McINTOSH, C. H. et al. Applications of dipeptidyl peptidase IV inhibitors in diabetes mellitus. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.38, p. 860-872, 2006.

MACIEL, M.A. et al. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MAES, M. et al. Alterations in plasma prolyl endopeptidase activity in depression, mania, and schizophrenia – effects on depressants, mood stabilizers, and antipsychotic-drugs. **Psychiatry Research**, v.58, p. 217-225, 1995.

MAES, M. et al. Effects of psychological stress on serum prolyl endopeptidase and dipeptidyl peptidase IV activity in humans: Higher serum prolyl endopeptidase activity is related to stress-induced anxiety. **Psyconeuroendocrinology**, v. 23, p. 485-495, 1998.

MAHLKE, J. D. et al. In vitro antimicrobial and antioxidant activity of crude extract and fractions from *Buddleja thyrsoides* Lam. Leaves. **Química Nova**, v. 32, p. 277-281, 2009.

MALDANER, G. **Estudo dos metabólitos secundários de *Scutia buxifolia* e suas atividades biológicas**. Tese de Doutorado, Universidade federal de Santa Maria, Santa Maria, 2010.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioutographic method for the detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13p. 51-54, 2002.

MENSAH, A. Y. et al. Known and novel terpenes from *Buddleja globosa* displaying selective antifungal activity against dermatophytes, **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1210-1213, 2000.

MENSAH, A. Y. et al. Effects of *Buddleja globosa* leaf and its constituents relevant to wound healing. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 219-266, 2001.

MICHELIN, D. C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 316-320, 2005.

MITCHELL, T. G.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis in the era of AIDS – 100 years after discovery of *Cryptococcus neoformans*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 515-548, 1995.

MOREIRA, E.A., Contribuição ao estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeladii* R. Braga, Campanulaceae. **Tribuna Farmacêutica** v.47, p. 13-34, 1979

MORRIS, D.O. et al. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius* and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). **European Society of Veterinary Dermatology**, v. 17, p. 332-337, 2006.

MROCZEK, T. Highly efficient, selective and sensitive molecular screening of acetylcholinesterase inhibitors of natural origins by solid-phase extraction-liquid chromatography/electrospray ionisation/octopole-orthogonal acceleration time-of-flight-mass spectrometry and novel thin-layer chromatography based bioautography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 2519-2528, 2009.

MURRAY, P.R. et al. Staphylococcus e microrganismos relacionados. **Microbiologia Médica**, 4<sup>a</sup> ed., Ed. Guanabara-Koogan S. A., p. 188-201, 2004.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.1, p. 142-201, 1998.

OKADA, C. et al. T cells expressing high activity of prolyl endopeptidase are susceptible to activation-induced cell death. **FEBS Letter**, v. 7, n. 512, 2002.

OLIVEIRA, D. F. et al. Antibacterial activity of plants extracts from Brazilian southeast region. **Fitoterapia**, v. 78, p. 142-145, 2007.

PEREIRA, A. S. et al. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, p. 301-308, 2003.

RAMAGE, G. et al. Investigation of multidrug efflux pumps in relation to fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, p. 973-980, 2002.

ROEHL, M. H. A.; WANG J. Y.; WAGNER G. A general framework for development and data analysis of competitive high-throughput screens for small-molecule inhibitions of protein – Protein interactions by fluorescence polarization. **Biochemistry**, v. 43, p. 16056-16066, 2004.

SARKHAIL, P. et al. Phytochemical study of *Phlomis olivieri* Benth. and *Phlomis persica* Boiss. **DARU**, v.14, 2006

SHENG, G. et al. Protective effect of verbascoside on 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity in PC12 cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v451, p. 119-124, 2002.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7<sup>a</sup> ed. [S.I]: Guanabara Koogan. 2006.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 90, p. 124-128, 2009.

STEIN, T. *Bacillus subtilis* antibiotics: structures, syntheses and specific functions. **Molecular Microbiology**, v. 56, p. 845-857, 2005.

TARRAGÓ, T. et al. Identification of F-19 NMR of tradicional chinese medicinal plants processing prolyl oligopeptidase inhibitory activity. **ChemBioChem**, v.2, p.827-833, 2006.

TARRAGÓ, T. et al. The natural product berberine is a human prolyl oligopeptidase inhibitor. **ChemMedChem**, v.2, p. 354-359, 2007.

TARRAGÓ, T. et al. Baicalin, a prodrug able to reach CNS, is a prolyl oligopeptidase inhibitor. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, p. 7516-7524, 2008.

TOIDE. K. JTP-4819: a novel prolyl endopeptidase inhibitor with potential as a cognitive enhancer. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 274, p. 1370-1378, 1995.

TORTORA, G. J. et al. Eucariotos: fungos, algas, protozoários e helmintos. **Microbiologia**, 8<sup>a</sup> Ed. Artmed, p. 334-375, 2005.

TORTORA, G. J. et al. Procariotos: Domínios bacteria e Archaea. **Microbiologia**, 8<sup>a</sup> Ed. Artmed, p. 304-333, 2005.

TRABULSI, L. R. **Outras espécies aeróbias e anaeróbias facultativas**; 4<sup>a</sup> ed., Atheneu, p. 718, 2004.

VENALAINEN, J. et al. Slow-binding inhibitors of prolyl oligopeptidase with different functional groups at the P1 site. **Biochemical Journal**, v. 382, p. 1003-1008, 2004.

VIEGAS JR. et al. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, p. 655-660, 2004.

VEIGA JUNIOR et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis - A thin layer chromatography atlas**. 2<sup>a</sup>ed. Springer, Berlim, p. 384, 1996.