

## Estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica das substâncias isoladas do extrato metanólico de *Clusia obdeltifolia*

Ana C. S. Lopes<sup>1</sup>; Laís L. Reis<sup>1</sup>; Paulo R. R. Jesus<sup>1</sup>; Caline G. Ferraz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Metabolomics Research Group, Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Brasil

**Palavras-Chave:** Clusiaceae, benzofenona poliprenilada, antioxidante

### Introdução

O Brasil possui uma rica flora, sendo potencialmente grande fonte de pesquisa para produtos naturais, e a química de Produtos Naturais (QPN) é, dentro da Química brasileira, a área mais antiga e a que, talvez ainda hoje, congregue o maior número de pesquisadores<sup>1</sup>. A maioria dos fármacos em uso clínico é de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese planejada a partir de produtos naturais.

O gênero *Clusia* L. é um dos maiores representantes da família Clusiaceae, com cerca de 300 espécies distribuídas entre América do Norte e América do Sul, no Brasil há registros de 70 espécies<sup>2</sup>. As espécies do gênero são utilizadas na medicina popular como antisséptico e purgativo para problemas estomacais.

Na Bahia encontra-se 11 espécies, sendo uma delas a *Clusia obdeltifolia*, que é nativa do Brasil e encontrada apenas em Minas Gerais, além da Bahia, que popularmente é conhecida como leite-de-mocó<sup>3</sup>.

O estudo fitoquímico dos extratos de plantas do gênero *Clusia*, possibilitou o isolamento e identificação de vários metabólitos, tais como: triterpenos, esteróides, flavanóides, ácidos tocotrienolólicos, bifenilas, xantonas e benzofenonas<sup>4</sup>, encontra-se pesquisas da identificação de benzofenonas e ácidos tocotrienolólicos na *Clusia obdeltifolia*. Estes diversos metabólitos encontrados no gênero *Clusia* L estão ligados à atividades biológicas, sendo importante o estudo fitoquímico de diversas espécies deste gênero para ampliar os conhecimentos e o uso do mesmo.

Neste trabalho realiza-se estudos acerca da *Clusia obdeltifolia*, endêmica do Brasil, utilizando o extrato metanólico das folhas, coletadas em Palmeiras-BA com o objetivo de estudar a composição química em termos de metabólitos secundários e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato e frações obtidas. O estudo que está sendo realizado permitiu o isolamento de um triterpeno, a friedelina, no extrato metanólico das folhas, esta substância possui atividades biológicas já estudadas, e de derivados de benzofenonas preniladas, metabólitos secundários.

### Material e Métodos

Para o fracionamento dos extratos obtidos e isolamento de substâncias foram utilizados métodos de Cromatografia: em coluna, camada delgada e preparativa. Iniciou-se com o extrato metanólico das folhas que foi fracionado por meio de uma coluna cromatográfica utilizando bomba de vácuo e a partir disso foram obtidas 3 frações: em diclorometano, acetato de etila e metanol. Os dois primeiros passaram por colunas cromatográficas sem utilização de vácuo para maior fracionamento. Para isolamento de substâncias foi feita uma cromatografia em placa

preparativa e após este procedimento as frações foram submetidas à análise de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  para determinação.

A análise da atividade antioxidante foi determinada a partir do Método de Sequestro de Radical Livre DPPH. Neste método é feito uma curva analítica utilizando soluções de DPPH de concentrações definidas e medindo a absorvância utilizando um espectrofotômetro UV/Vis no comprimento de onda de 515nm. Em seguida são feitas soluções com o extrato e frações estudadas com diferentes concentrações, sendo 50% do volume total de uma solução de DPPH de concentração conhecida e os outros 50% do analito e metanol, que não reage com o DPPH, e também mede-se a absorvância destas soluções e constrói-se curvas de absorvância X concentração afim de encontrar o  $\text{IC}_{50}$ , ponto que equivale redução de metade do DPPH presente no meio, comparando com a curva analítica.

A quantificação de fenólicos foi feita através do método de Folin – Ciocalteu Modificado<sup>5</sup>. Neste método é feita uma curva analítica de absorvância X concentração de soluções contendo ácido gálico a partir de uma solução padrão de  $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ , água, o reagente de Folin – Ciocalteu e carbonato de sódio 7,5% m/v em diferentes concentrações e deixadas no escuro reagindo por 120 minutos e a absorvância foi lida num espectrofotômetro UV/Vis a 725nm.  $60 \mu\text{L}$  de cada amostra a uma concentração de  $2 \text{ mg mL}^{-1}$  foram misturadas com água destilada, solução de carbonato de sódio (7,5% m/v) e o reagente de Folin – Ciocalteu. O meio reacional foi armazenado em local escuro durante 120 minutos e, por fim, a absorvância foi lida. A determinação dos compostos fenólicos foi realizada através de interpolação utilizando uma curva padrão de ácido gálico. Os resultados foram analisados em triplicata e expressos em  $\text{mgEA g}^{-1}$  de extrato.

Os ensaios para a avaliação da atividade antimicrobiana das frações foram realizados no Laboratório de Bioensaios do Departamento de Ciências Exatas e da Terra, campus I, da Universidade Estadual da Bahia (UNEB). Para isso, empregou-se o método de microdiluição em caldo, realizado segundo as normas CLSI (2005)<sup>6</sup>, com modificações, utilizando as bactérias Gram positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538); *Bacillus subtilis* (ATCC 6633); e Gram negativas *Escherichia coli* (ATCC 94863); *Pseudomonas aeruginosa* (CCT0090; ATCC 27853). Todas as cepas foram adquiridas da Coleção de Culturas Tropical (CCT) da Fundação André Tosello, localizada em Campinas, São Paulo.

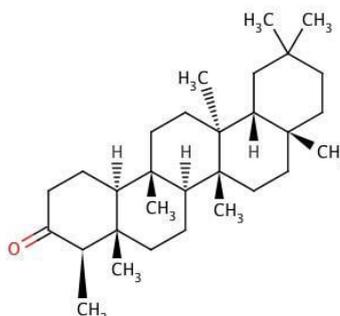
## Resultados e Discussão

### 1. Fracionamento, Isolamento e Determinação de substâncias.

Foi realizado uma coluna cromatográfica com a fração do extrato metanólico diclorometânica onde 2 frações chamaram atenção pois houve a formação de cristais a presença de um líquido amarelo no qual os cristais eram insolúveis. Utilizou-se da diferença de solubilidade para separa os cristais do líquido amarelo, o hexano solubilizava apenas o líquido amarelo e o mesmo foi retirado com o auxílio de uma pipeta. Ao realizar as cromatografias em camada delgada foi identificado que o sólido de ambas as frações era semelhante e apresentavam apenas 1 mancha na placa, assim foi feita a análise de RMN  $^1\text{H}$  e a partir de comparações com a literatura a substância foi identificada como a friedelina, metabólito

secundário já encontrado em outras plantas do gênero *Clusia* e no extrato hexânico do caule da *C. obdeltfolia*<sup>4,7</sup>.

Figura 10: Estrutura da Friedelina



Fonte: FERRAZ, 2005

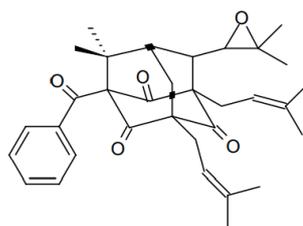
Frações semelhantes do extrato dicloreometânico provenientes da mesma coluna foram reunidas e submetidas a outra coluna cromatográfica que gerou 95 frações, denominadas de COD3-1 a COD3-95, a partir de CCD foi possível identificar que de 25 a 41 as frações eram praticamente iguais e possuíam 2 manchas características. A partir disso estas frações foram agrupadas e foi realizado o RMN <sup>1</sup>H das mesmas e observou-se sinais característicos de benzofenonas preniladas na mistura. Então foi realizada uma cromatografia preparativa, onde após seguidas eluições as manchas tinham uma separação adequada para o corte como pode ser observado na figura 2.

Figura 2. Placa preparativa COD3- 25 a 41



Estas frações obtidas foram submetidas a análise de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C que por comparação com a literatura foi identificado que uma das substâncias no meio é a 28,29-epoxyplukenetione A, um derivado poliprenilado de benzofenonas. Esta substância foi isolada pela primeira vez no extrato dos frutos da espécie *Clusia havetiodes* e já foi identificada também no extrato hexânico do caule da *C. obdeltfolia*<sup>8,9</sup>.

Figura 3: Estrutura da 28,29-epoxyplukenetione A



Fonte: TEIXEIRA, 2005

A fração do extrato em acetato de etila também foi submetida a uma coluna cromatográfica e 2 frações obtidas tinham a presença de sólidos em formato de agulhas, um branco e outro amarelado, que foram analisados por meio de CCD e estão em processo de análise de RMN  $^1\text{H}$  para avaliação das funções orgânicas presentes e possivelmente determinação da estrutura caso estejam realmente puras.

## 2. Atividade Antioxidante

O 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) é um radical livre, estável e tem muitas vantagens, tais como uma boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade e é utilizado na maioria dos estudos de avaliação antioxidante<sup>10</sup>. Este radical possui coloração violeta ou púrpura e substâncias antioxidantes podem doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para a molécula de DPPH• que é reduzido a hidrazina, alterando a coloração para amarela que altera os valores de absorvância da solução e pode ser monitorado por meio de um espectrofotômetro. Os resultados estão expressos na tabela 1, a seguir.

**Tabela 1.** Valores de  $\text{IC}_{50}$

Amostra	$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
Extrato metanólico da folha	$83,4 \pm 0,17$
CODCM	$676,5 \pm 92$
COAcet	$31,4 \pm 0,85$
COMet	$125,9 \pm 11$
Padrão de ácido gálico	$1,63 \pm 0,03$

Dentre as amostras testadas aquela com maior atividade antioxidante foi a fração de acetato de etila, visto que foi necessário menor concentração do mesmo para consumir metade da concentração do radical livre. Enquanto a fração de diclorometano é aquela com menor atividade antioxidante. A partir destes resultados pode-se supor que grande parte das substâncias antioxidantes do extrato metanólico das folhas de *Clusia obdeltifolia* se encontram na fração de acetato de etila. Não foram encontrados dados na literatura para comparação de resultados acerca desta espécie e é de grande interesse a busca por substâncias antioxidantes, principalmente aquelas presentes nos produtos naturais, visto que antioxidantes possuem a capacidade de proteger um organismo dos danos causados por radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças.

## 3. Teor de fenólicos

Os compostos fenólicos são aqueles que possuem em sua estrutura ao menos um grupo fenol, um benzeno substituído com pelo menos um grupo OH. Nas plantas os compostos fenólicos estão relacionados principalmente com a proteção, conferindo resistência a microrganismos e pragas. Além disso constituem majoritariamente os compostos antioxidante presentes numa planta, possuem uma elevada atividade antioxidante<sup>11</sup>.

Foi empregado o método usando o reagente de Folin-Ciocalteu, que consiste na mistura de ácidos de tungstênio e de molibdênio com estado de oxidação +6. Este reagente possui a cor amarelada, que ao reagir com compostos fenólicos ocorre a variação do estado de oxidação para +5 acompanhada da mudança de coloração para azul<sup>12</sup>. Utilizando um espectrofotômetro é possível avaliar a variação da concentração do reagente de Folin-Ciocalteu com estado de oxidação +6 e interpolar com uma curva padrão feita a partir da reação do mesmo com ácido gálico. Os resultados estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2.** Teor de Fenólicos Totais

<b>Amostra</b>	<b>Fenólicos Totais (mg EA g<sup>-1</sup> de extrato)</b>
Extrato metanólico da folha	19,34 ± 0,19
CODCM	75,10 ± 0,08
COAcet	43,46 ± 0,19
COMet	17,76 ± 0,13

Como dito anteriormente os compostos fenólicos são responsáveis pela maior parte da atividade antioxidante das plantas e, exceto pela fração COD, as frações seguem a mesma tendência da atividade antioxidante no teor de fenólicos. A fração diclorometânica apresentou maior teor de fenólicos totais, enquanto teve a menor atividade antioxidante registrada na avaliação. Isso pode se dá pela presença de possíveis outros redutores que não reagem com o DPPH da mesma forma que reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu e será necessário a busca de outros métodos para determinar estas atividades e avaliar estes componentes e repetir os procedimentos a fim de descartar erros do operador.

#### 4. Atividade antimicrobiana

Para a realização do teste é preciso solubilizar a amostra em algum solvente que não gere interferências no crescimento do microrganismo, o utilizado nesta técnica foi o DMSO. Como pode ser observado nas tabelas 3 foi testado apenas 1 amostra, isso porque esta foi a única que foi solúvel. O extrato bruto, as frações em diclorometano e acetato de etila não são solúveis em DMSO, tentou-se ainda utilizar o Tween, um tensoativo, mas ainda não foi o suficiente. A visualização do resultado é feita observando até que linha houve inibição do crescimento do microrganismo nas colunas em que foram aplicadas amostras. Para a concentração máxima testada, 500 µg mL<sup>-1</sup>, a fração COMet foi capaz de inibir o crescimento da bactéria *Bacillus subtilis*.

## Conclusões

A partir deste trabalho foi possível se ter dados importantes acerca deste extrato, demonstrando a importância do contínuo estudo do mesmo para identificação de outras substâncias com importantes atividades biológicas como já foi identificado em outras espécies de mesmo gênero.

## Referências



1. RODRIGUES, L. S. Avaliação Fitoquímica e Biológica de Plantas da Medicina Tradicional Baiana. TCC (Graduação - Bacharelado em Química) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química da UFBA, 2019.
2. SILVA, L. A. P. Distribuição do gênero *Clusia* L. (Clusiaceae) no Brasil e estratégias reprodutivas de *Clusia nemorosa* G. Mey (Clusiaceae) na Caatinga. Dissertação (Mestrado – Biologia Vegetal) - Departamento de Botânica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.
3. BITTRICH, V.; Trad, R.J.; Cabral, F.N.; Nascimento-Jr, J. E.; Souza, V.C. 2015 Clusiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil2015.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16871>>.
4. FERAZ, C. G. Benzofenonas, triterpenos e esteróides de *Clusia burle-marxii*. Dissertação (Mestrado – Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005
5. SANTOS, P. M. et al. Identification of antioxidant and antimicrobial compounds from the oilseed crop *Ricinus communis* using a multiplatform metabolite profiling approach. *Industrial Crops and Products*, v. 124, p. 834 - 844, 2018.
6. SANTOS, R. L. et al. Antileishmania, anti-Trypanosoma cruzi and antimicrobial activities of scandenin and 4'-Omethyliderrone from *Deguelia costata*. *Natural Product Research*, 2022. DOI: 10.1080/14786419.2022.2140336. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14786419.2022.21403>. Acesso em: 10 mar. 2023
7. TEIXEIRA, J. S. R.; MOREIRA, L. M.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. A New Biphenyl from *Clusia melchiorii* and a New Tocotrienol from *C. obdeltifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 17, No. 4, p. 812-815, 2006.
8. CHRISTIAN, O. E. et al. Prenylated Benzophenone Derivatives from *Clusia havetiodes* var. *stenocarpa*. (2001)
9. TEIXEIRA, J. S. R.; CRUZ, F. Polyisoprenylated benzophenone derivatives from *Clusia obdeltifolia*. (2005)
10. OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.
11. ROCHA, W. S. et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 33, n. 4, p. 1215 - 1221, 2011.
12. LAZZAROTTO, S. R. S. et al. Método de folin ciocalteau adaptado para quantificar polifenóis em extratos de erva-mate. *Revista Moviementa*, v. 13, n. 3, p. 419-426 . 2020.