

NOVO DITERPENO ISOLADO DOS RESÍDUOS MADEIREIROS DE *Ocotea neesiana* (Miq.) Kosterm E SEU POTENCIAL ANTIFÚNGICO FRENTE À *Cryptococcus*

Jennifer A. O. Lima¹; Junior A. Chaves¹; Priscila B. A. Souza¹; Davi S. Oliveira¹; Helena G. Ramos¹; Luiz H. K. Queiroz Junior²; João V. B. de Souza³; Ana C.A. Cortez³; Claudete C. do Nascimento⁴; Maria P. Lima⁴.

¹ Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus 69080-900, Amazonas, Brazil

² Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 74001-970, Goiás, Brazil

³ Laboratório de Micologia, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 69067-375, Amazonas, Brazil

⁴ Coordenação de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 69067-375, Amazonas, Brazil

Palavras-Chave: Fitoquímica, RMN, isorionodano

Introdução

O Brasil é o país de maior extensão da América do Sul e possui a maior biodiversidade do planeta. Abriga em seus seis biomas cerca de 20% de todas as espécies catalogadas do mundo, contando aproximadamente 46.000 espécies vegetais (terrestre e marinho) conhecidas no país, e muitas são endêmicas. Dentre os seus biomas destaca-se a Amazônia que compõe a maior floresta tropical úmida do mundo, onde crescem cerca de 2.500 espécies de árvores que corresponde a um terço de toda madeira tropical do mundo (Brasil, 2024). Apesar de todo esse potencial, estudos das partes lenhosas sobre os constituintes químicos e suas propriedades farmacológicas são escassos, dentre elas a espécie *Ocotea neesiana* (Lauraceae), popularmente conhecida na Amazônia como “louro-aritu”. Esta espécie apresenta apenas um estudo realizado por Alcântara *et. al* (2019) por meio da extração do óleo essencial da madeira de demolição resultando na identificação de 24 substâncias voláteis.

Dessa forma, considerando a carência de estudos, este trabalho foi direcionado para estudos de investigação fitoquímica e antifúngica dos resíduos madeireiros de demolição de *O. neesiana*. A proposta de integrar os estudos fitoquímicos de *O. neesiana* com a busca de atividade antifúngica é devido na família Lauraceae, bem como no gênero *Ocotea*, apresentarem na sua composição química terpenos. Esta classe de substância na literatura apresenta potencial antifúngico (Nogueira *et al*, 2021; Guoruoluo *et al*, 2017) sendo promissora a realização deste ensaio.

Material e Métodos

Os resíduos madeireiros são provenientes da estrutura de telhado da demolição de um prédio do Instituto de Pesquisas da Amazônia – INPA (3°05'44.1"S; 59°59'15.1"W) os quais foram identificados como *Ocotea neesiana* (Miq.) Kosterm na Xiloteca do INPA, por técnicas de identificação anatômica macroscópica da madeira. Os resíduos madeireiros tiveram suas propriedades tecnológicas avaliadas pelo Laboratório de Tecnologia da Madeira da Coordenação de Tecnologia e Inovação (COTEI) do INPA e os resíduos resultantes foram fornecidos para os estudos fitoquímicos.

Inicialmente os resíduos foram cortados, moídos e pesados (1219,8 g). Em seguida, eles foram submetidos a macerações à frio, com extrações feita com hexano e depois metanol (Figura 1). Após essa etapa, as soluções resultantes passaram por um processo de filtração e foram concentradas sob vácuo, resultando nos extratos hexânico (3,6 g) e metanólico (19,8 g).

O extrato metanólico foi fracionado em coluna aberta em sílica gel 70-230 mesh (h=35,0 cm e Ø=4,5 cm) em ordem crescente de polaridade (Hex; Hex/AcOEt; AcOEt/MeOH; MeOH), obtendo-se 25 frações. As frações foram analisadas em CCD, seguindo-se de fracionamentos

posteriores. A fração codificada como LAM-14 (431,9 mg) foi submetida a uma coluna Sephadex- LH20, eluída em metanol, originando 17 subfrações. A subfração 4 (LAM-14.4) foi refracionada em coluna de sílica gel (230-400 mesh) em sistema isocrático de DCM:MeOH (97:3). A subfração 25 (LAM-14.4.25) foi submetido a um tratamento com MeOH o que possibilitou a purificação da substância **1**. Esta foi enviada para análises de RMN uni e bi-dimensionais.

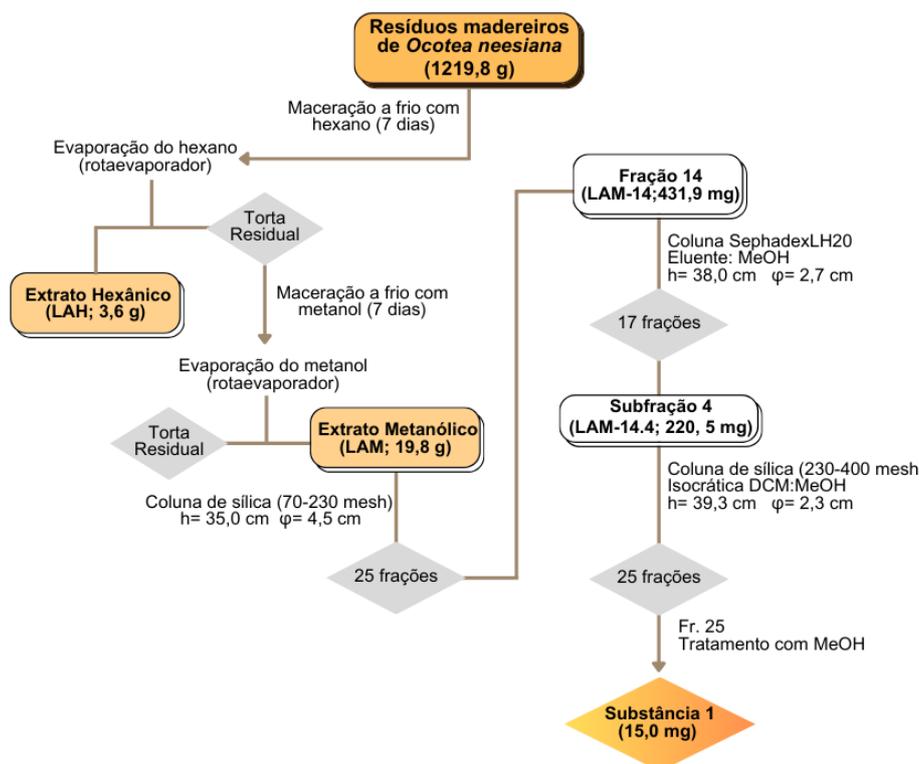


Figura 1. Esquema da obtenção dos extratos hexânico e metanólico de *Ocotea neesiana* e fracionamento do extrato metanólico para obtenção da substância **1**.

A atividade antifúngica da substância **1** foi avaliada frente as espécies de *Cryptococcus neoformans* e *C. gattii* por meio do teste de microdiluição em calda em microplaca de 96 poços conforme as recomendações descritas pelo CLSI nos documentos M27-A3 (2008). Realizou-se o teste partindo da concentração de 320 µg/mL à 0,625 µg/mL, após 72 h de incubação realizou-se a leitura macroscópica da placa para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) da substância, considerando o score à 100% de inibição.

Resultados e Discussão

A substância **1** apresentou aspecto de sólido cristalino branco. No espectro de RMN de ^1H observou-se sinais na região de campo alto com deslocamentos de 3,74 a 0,89 ppm. A presença de hidrogênios metílicos por meio de três dubletos em δ 0,91 ($J=6,5$), δ 1,04 ($J=7,0$) e δ 1,06 ($J=6,5$) e um singlete em δ 1,28 que foram atribuídos aos hidrogênios H-20, H-15, H-19 e H-17 respectivamente. Os sinais em δ 3,74 ($d, J= 1,6$) e 3,73 são referentes aos hidrogênios oximetínicos.

No espectro de RMN de ^{13}C verificou-se deslocamentos de carbonos carbinólicos em δ 80,8; 82,1; 88,8 e 86,4 atribuídos aos carbonos C-14, C-13, C-7, respectivamente e um sinal característico de carbonila de éster em δ 174,4. O mapa de contorno HSQC mostrou a correlação do sinal em δ_{H} 3,70 característicos para metoxila com δ_{C} 50,6. O mapa de contorno HMBC mostrou correlações no dos sinais à J^3 dos δ_{H} 2,58 e 1,82 com o δ_{C} 174,4 que caracterizou o grupo éster na molécula.

Mediante os dados analisados e em comparação com os dados da literatura Chai *et al.* (2008) pode-se identificar a substância **1** como 16-Metilesteritol A (figura 2)., um diterpeno do tipo isorionodano o qual apresenta ser inédito por apresentar um grupo éster na posição 16.

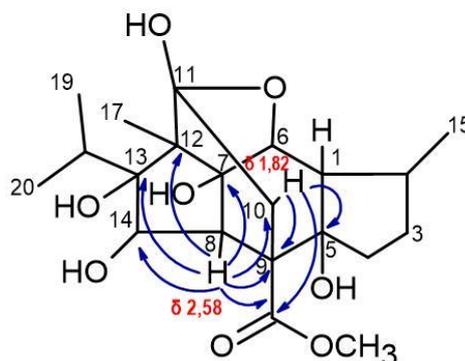


Figura 2. Correlações no HMBC do 16-metilesteritol A que confirmam a posição 16 para do grupo éster.

Nos ensaios de avaliação antifúngica o diterpeno 16-metilesteritol A apresentou inibição de 100% na concentração 40,6 µg/mL para *C. neoformans* e 81,2 µg/mL para *C. gatti*.

Conclusões

O estudo colaborou no conhecimento químico da espécie *O. neesiana* proporcionando o isolamento do novo diterpeno 16-Metilesteritol A. Este é o primeiro relato de diterpeno do tipo isorionodano no gênero *Ocotea* e de atividade antifúngica para esse tipo de diterpeno. Desta forma agregou-se valor em resíduos madeireiros que seriam descartados.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa Estado do Amazonas (FAPEAM pelas bolsas concedidas à Jennifer Araújo de Oliveira Lima (Edital 2021-2022 - POSGRAD) e Maria da Paz Lima (Edital nº 013/2022 – Produtividade - CT&I).

Referências

- ALCÂNTARA, J.M.; NASCIMENTO, C.C.; MARQUES, M.O.M.; FACANALI, R.; FREITAS, J.A.; LIMA, M.P. Volatile composition, anatomical and technological aspects of demolition wood from *Ocotea neesiana* (Miq.) Kosterm. *Review of Research*, 8(5): 1-7, 2019.
- BRASIL. 2024. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE E MUDANÇA DO CLIMA. Biodiversidade. Disponível em: < <https://www.gov.br/mma/pt-br/assuntos/biodiversidade>>. Acesso em: 03 de outubro de 2023.
- CHAI, X.Y.; BAI, C.C.; SHI, H.M.; XU, Z.R.; REN, H.Y.; LI, F.F.; LU, Y.N.; SONG, Y.L.; TU, P.F. Six insecticidal isorionodane diterpenoids from the bark and twigs of *Itoa orientalis*. *Tetrahedron*, 64, 5743–5747, 2008.
- CLSI - Clinical And Laboratory Standards Institute. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, CLSI M27 – A3 (28). 3rd ed.
- GUORUOLUO, Y.; ZHOU, H.; ZHOU, J.; ZHAO, H.; AISA, H.A.; YAO, G. Isolation and Characterization of Sesquiterpenoids from Cassia Buds and Their Antimicrobial Activities. *Journal Agriculture Food Chemistry*, 65(28), 5614–5619, 2017.
- NOGUEIRA, C.R.; CARBONEZI, L.H.; DE OLIVEIRA, C.T.F.; GARCEZ, W.S.; GARCEZ, F.R. Sesquiterpene derivatives from *Ocotea minarum* leaves. *Phytochemistry Letters*, 42, 8-14, 2021.