

Estudo fitoquímico e avaliação de algumas atividades biológicas de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)

Adriana Spirotto Stein MESQUITA¹; Denny William de Oliveira MESQUITA²; Evelyse Soares de SOUZA³; José Augusto Almendros de OLIVEIRA⁴; Cecília Veronica NUNEZ⁵

¹Bolsista PIBIC INPA/CNPq; ²Mestrando em Química de Produtos Naturais/UFAM; ³Bolsista PIBIC/FAPEAM-projeto; ⁴Colaborador CPCS/INPA; ⁵Orientadora CPPN/INPA.

Duroia macrophylla Huber, pertencente à família Rubiaceae, é uma árvore de porte mediano conhecida popularmente como cabeça-de-urubú ou puruí. Encontrada tanto na campinarana como na floresta de terra firme, ocorre no Peru, Venezuela e Brasil (BAZE *et al.*, 2003). Diversas classes de metabólitos secundários têm sido isolados de espécies de Rubiaceae, destacando-se os alcalóides com propriedades antimaláricas e antieméticas (BARREIRO, 1990). O material estudado foi coletado na Reserva Particular de Proteção Natural Cachoeira da Onça, na BR-174, no município de Presidente Figueiredo-AM. As folhas foram secas a temperatura ambiente, moídas e extraídas com diclorometano, metanol e água, cada extração foi realizada em triplicata e usando ultra-som por 20 minutos. Após filtração, os extratos foram concentrados utilizando-se rota evaporador e liofilizador. Os extratos diclorometânico, metanólico e aquoso das folhas de *D. macrophylla* Huber foram obtidos e submetidos à avaliação da atividade antioxidante através de dois métodos medindo a capacidade de seqüestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (2 e 20 min, em 517 nm) e do cátion radical ácido 6-sulfônico-2,2-azinobis-3-etilbenzotiazolina (ABTS) (1 e 6 min, em 734 nm). As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-Visível (VARIAN Série 364) e os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico. Para atividade de citotoxicidade foi realizado o ensaio frente ao microcrustáceo *Artemia salina* (MEYER, 1982), em concentrações inferiores a 1000 µg/mL, sendo realizadas leituras em 24 e 48 horas. Para a análise antifúngica, a metodologia aplicada foi a que utiliza a difusão por cavidade-placa (Método de Kirby-Bauer), recomendada internacionalmente para a determinação da sensibilidade, através da difusão em ágar (GROVE *et al.*, 1955, apud GIESBRECHT, 1980). Os extratos foram testados na concentração de 0,1 mg/µL, para a verificação de atividade inibitória contra os fungos filamentosos dermatofíticos (*Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* 32905, *Microsporum gypseum* 29/00, *Trichophyton mentagrophytes* ATCC 9533/03, *Trichophyton rubrum* ATCC 28189 e *Trichophyton tonsurans* 21/97), os fungos filamentosos não dermatofíticos (*Cladosporium cladosporioides*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Fusarium U.* 662/06 e *Scytilidium U.* 661/06) e leveduriformes (*Candida albicans* ATCC 3632 e *Candida albicans U.* 5/99). Para o ensaio de redução do DPPH e ensaio de descoloração do ABTS, o extrato metanólico foi o mais ativo, em seguida, o aquoso. O extrato diclorometânico mostrou-se pouco ativo em DPPH (tabela 1) e com atividade média em ABTS⁺ (tabela 2). Quanto à atividade citotóxica, o extrato aquoso apresentou-se bioativo e os resultados foram analisados para determinar a CL₅₀ (concentração letal mediana) cujo valor encontrado foi de 880 µg/mL, enquanto os extratos diclorometânico e metanólico foram pouco ativos, numa concentração de 1000 µg/mL. Os extratos não apresentaram atividade antifúngica para concentração testada.

Tabela 1 - Resultados da avaliação antioxidante nos extratos vegetais pelo ensaio de redução do DPPH[•]

Extratos	2 min		20 min	
	% de Redução do DPPH	Equiv. de ác. ascórbico	% de Redução do DPPH	Equiv. de ác. ascórbico
DCM	13,78	32,2	15,37	21,3
MeOH	47,86	12,2	93,73	4,9
H ₂ O	30,31	20,0	57,83	8,0

Tabela 2 - Resultados da avaliação antioxidante nos extratos vegetais pelo ensaio de descoloração do ABTS^{•+}

Extratos	1 min		6 min	
	% de descolor. do ABTS	Equiv. de ácido ascórbico	% de descolor. do ABTS	Equiv. de ácido ascórbico
DCM	58,10	12,1	74,44	9,6
MeOH	99,67	7,2	99,45	7,2
H ₂ O	98,38	7,3	100,00	7,0

No presente trabalho foi ainda realizado o fracionamento químico dos extratos diclorometânico e metanólico, conforme mostrado no fluxograma 1. O extrato diclorometânico foi submetido a cromatografia em coluna (CC) de sílica gel (SiO_2) resultando em 47 frações. As frações 1 à 5 foram reunidas e recristalizadas em acetona. A elucidação estrutural da substância isolada foi baseada nos dados de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) uni e bidimensionais. A comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da substância 1 com os dados da literatura (Saitoa, Klinklaib, Kawahara, 2007), possibilitaram identifica-la como esqualeno.

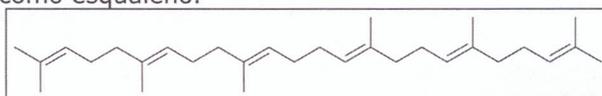
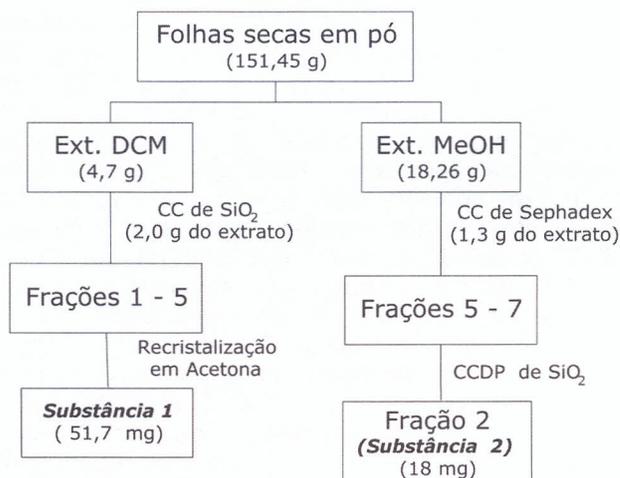


Figura 1 – Esqualeno isolado das folhas de *D. macrophylla* Huber.

O extrato metanólico foi fracionado em cromatografia em coluna de Sephadex LH-20, resultando em 13 frações, as frações 5 à 7 foram reunidas e submetidas à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) de SiO_2 , resultando em 9 frações, numeradas de cima para baixo na placa, a fração 2 mostrou resultado positivo para alcalóide quando submetida à teste com reagente de Dragendorff. A substância isolada será identificada e/ou terá sua estrutura elucidada por análise de RMN ^1H e RMN ^{13}C , em uma e duas dimensões (COSY, HETCOR, HMBC e HSQC). As propriedades físico-químicas das substâncias estão mostradas na Tabela 3.



Fluxograma 1 - Fracionamento químico das folhas de *D. macrophylla* Huber.

Tabela 3 - Propriedades físico-químicas das substâncias isoladas.

Substâncias	Aspecto	Cor	R _f *
1 [†]	amorfo	amarelo esverdeado	0,62
2 [‡]	amorfo	vermelho - alaranjado	0,63

*Eluentes: substância 1 (hexano puro); substância 2 (diclorometano/metanol - 95:5). [†]Não apresentou revelação de fluorescência em câmara de UV, absorveu vapor de iodo e quando revelada com sulfato cérico apresentou coloração lilás. [‡]Apresentou coloração escura no UV₂₅₄, absorveu vapor de iodo, quando revelado com sulfato cérico apresentou coloração marrom clara.

Até o momento, o estudo fitoquímico das folhas de *D. macrophylla* Huber resultou no isolamento do esqualeno e de um alcalóide ainda não identificado, o estudo mostrou ainda que os extratos polares apresentam elevada atividade antioxidante. Quanto a atividade antifúngica, os extratos testados foram inativos na concentração ensaiada, devendo ser analisados numa concentração mais alta.

Palavras-chave: Atividade antioxidante, atividade citotóxica, DPPH, ABTS.

Bibliografias citadas

- Baze, A.; Cordeiro, A.C.; *et al.*, 2003. Reserva Ambiental da Cachoeira da Onça. Fundação Rede Amazônica/Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas. 100p.
- Barreiro, E. J. 1990. Produtos Naturais Bioativos de Origem Vegetal e o Desenvolvimento de Fármacos. Química Nova, 13 (1): 29-39.
- Grove, D. C.; Randall, W. S. 1955. Assay methods of Antibiotics. New York, Medical Encyclopedia, p.192.
- Meyer, B. N.; Ferrigni, Putnam, J.E.; *et al.* 1982. A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. Planta Medica, 45: 31-34.
- Saitoa, T., Klinklaib, W., Kawahara, S. 2007. Characterization of epoxidized natural rubber by 2D NMR. Spectroscopy. Polymer, 48(3):750-757.