



AVALIAÇÃO BIOLÓGICA, QUÍMICA E CROMATOGRÁFICA DE *CALYCOPHYLLUM SPRUCEANUM* BENTH (RUBIACEAE)

Viviane Magrini¹, Karina Fraige², Maria Luiza Zeraik³, Dulce Helena Siqueira⁴, Vanderlan da S. Bolzani⁵

RESUMO: Este trabalho tem por objetivo realizar o estudo cromatográfico e químico de *Calycophyllum spruceanum* Benth, visando caracterizar e diferenciar os extratos de diferentes partes da planta pelas técnicas de CLAE - DAD e RMN¹H, acompanhadas por testes de atividade antioxidante. As diferentes partes da planta foram submetidas à extração a frio com solventes de polaridade crescente e decocção seguidas pela avaliação da capacidade antioxidante, segundo os métodos do radical DPPH e cátion radical ABTS. Os resultados mais promissores foram obtidos para os extratos hidroalcoólicos.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante; *Calycophyllum spruceanum* Benth; CLAE-DAD; RMN.

1 INTRODUÇÃO

A procura de produtos naturais tem sido realizada com enfoque no fato de serem recursos disponíveis, renováveis e permitindo atividades sustentáveis, sendo que os produtos oriundos da biodiversidade se apresentam como estratégia de inovação nos países emergentes. Sendo o mercado de cosméticos promissor, algumas empresas brasileiras de cosméticos começaram a investir em linhas de produtos à base de produtos naturais (como, por exemplo, a empresa Natura), apresentando necessidade ininterrupta de pesquisas de modernos insumos e também a utilização de inovações em suas respectivas linhas de produtos (Garcia e Furtado, 2002). As marcas de cosméticos estão em constante busca de novas tecnologias, sendo necessário o recrutamento de cientistas e pesquisadores de inovação para que haja a comunicação das novas descobertas. Tanto o mercado como as ciências dos cosméticos se encontram em fases instigantes de desenvolvimento, surgindo uma competição em relação às pesquisas que exploram novos territórios (Calloni, 2014). O uso sustentável da biodiversidade demanda programas especiais com convergência de esforços, tanto do setor acadêmico quanto do setor produtivo (indústrias), via capaz de transformar o conhecimento gerado em desenvolvimento (produtos) com imediata comercialização. Dessa forma, a flora brasileira passa a adquirir valores cada vez mais inimagináveis, desde que haja uma exploração científica e tecnológica adequada, trazendo progresso não só econômico como também social para o nosso país.

O gênero *Calycophyllum* pertence à família Rubiaceae e abrange espécies que ocorrem desde a América Central até a América do Sul, as quais apresentam ampla semelhança morfológica entre si, como também em relação a outros gêneros da mesma tribo. As espécies pertencentes a este gênero são caracterizadas pela beleza, qualidade de sua madeira e alta diversidade de metabólitos secundários (Zuleta et al, 2003). A espécie *Calycophyllum spruceanum* Benth, conhecida popularmente como mulateiro, apresenta alta diversidade metabólica, e é utilizada no tratamento de diversas doenças como as dermatológicas, estomacais, diabetes, parasitoses, câncer, entre outras (Zuleta et al, 2003; Da Costa et al, 2011). Cada vez mais, antioxidantes naturais apresentam interesse como alternativa em relação a utilização de substâncias sintéticas, as quais são utilizadas de forma ampla nas indústrias farmacêutica, alimentícia e terapêutica no combate às espécies radiculares. Uma forma analítica de obter informações sobre a diversidade metabólica de extratos vegetais é denominada *fingerprint*, e aliada a testes biológicos de atividade é de grande utilidade na seleção de plantas com potencial de produto.

Os objetivos desse trabalho são caracterizar e selecionar os diferentes extratos de folhas, galhos e cascas de caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth de acordo com seu potencial antioxidante, utilizando os ensaios de capacidade redutora do radical DPPH[•] e do cátion radical ABTS^{•+}, e por meio de técnicas analíticas de CLAE-DAD e RMN¹H para a diferenciação dos extratos antioxidantes promissores.

¹ Mestranda do Curso de Química – UNESP Araraquara, SP. Bolsista CNPq. viviane_magrini@yahoo.com.br

² Pós - Doutoranda do Curso de Química – UNESP Araraquara, SP. Bolsista Fapesp. kfraige@yahoo.com.br

³ Pós - Doutoranda do Curso de Química – UNESP Araraquara, SP. Bolsista Fapesp. marialuizaze@gmail.com

⁴ Professora do Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP. dhsilva@iq.unesp.br

⁵ Professora do Instituto de Química – UNESP Araraquara, SP. bolzaniv@iq.unesp.br



2 MATERIAL E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no laboratório de Produtos Naturais do Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais (NuBBE) - Instituto de Química/ Unesp Araraquara, utilizando material vegetal de *Calycophyllum spruceanum* Benth (folhas, galhos e cascas de caule), coletado no Jardim Botânico do Rio de Janeiro (RJ) (abril e agosto/2014). As diferentes partes vegetais foram secas em estufa com circulação de ar a 40 °C durante aproximadamente 3 dias e, posteriormente, trituradas em moinho. O material seco e moído (10,0 g) foi submetido às extrações em banho de ultrassom sob temperatura controlada, por três vezes consecutivas em cada solvente (150 mL), 40 min/ ciclo de solvente, em ordem crescente de polaridade: hexano, acetato de etila e metanol, sendo filtrados e concentrados em rotaevaporador. O extrato hidroalcoólico das partes das plantas foi obtido por meio da mesma metodologia descrita anteriormente, considerando que a solução utilizada corresponde à mistura de etanol: água (70 : 30 v/v). Os extratos aquosos de folhas, galhos e cascas do caule foram obtidos por meio da técnica de extração a quente (decocção), com a mesma quantidade de massa do material vegetal, e água como solvente extrator. Posteriormente, estes extratos foram submetidos à filtração e a parte sobrenadante liofilizada.

Os testes iniciais para a determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos foram baseados na avaliação de acordo com a redução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH[•]) ou do cátion radical 2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico (ABTS^{•+}), O ensaio de capacidade redutora de DPPH[•] foi realizado de acordo com o método desenvolvido por Brand-Williams et al (1995) com algumas modificações, e se baseia na facilidade com que o radical estável DPPH[•] recebe um átomo de hidrogênio de uma espécie química com potencial antioxidante. O método do cátion radical ABTS (ABTS^{•+}) foi outro ensaio de avaliação da capacidade antioxidante realizado. Neste ensaio o cátion radical ABTS (ABTS^{•+}) foi produzido por meio da reação de solução de ABTS estoque com persulfato de potássio. A mistura formada foi agitada e mantida no escuro à temperatura ambiente por cerca 16 h, sendo esta solução diluída 60 vezes com água para o ensaio. Os procedimentos de avaliação biológica foram realizados em triplicata, pela adição de uma alíquota de 215 µL da solução etanólica de DPPH[•] (1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹), ou da solução aquosa de ABTS^{•+}, a 35 µL dos extratos a serem estudados e do padrão (rutina) em diferentes concentrações. A variação na absorbância das diferentes soluções das espécies redutoras com o controle e com as amostras foi medida em 517 nm (DPPH[•]) ou 715 nm (ABTS^{•+}) após 30 min de reação, utilizando-se um espectrofotômetro de microplacas (Synergy2Multi-Mode, BioTek, EUA). O resultado positivo é baseado na observação da mudança de coloração característica em cada teste, ou seja, de uma cor amarela com intensidade variada de acordo com o poder antioxidante da amostra testada (teste de DPPH[•]), ou de azul para incolor (teste de ABTS^{•+}), devido ao grau de redução do cátion radical. Ao final do procedimento, a capacidade de redução do DPPH[•] ou ABTS^{•+} pelo padrão e amostras estudadas, foi expressa em termos de quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH[•] ou ABTS^{•+} em 50% (EC₅₀), calculado por meio da equação de regressão linear das curvas analíticas construídas para cada amostra na faixa linear (concentração dos extratos *versus* % DPPH[•] ou ABTS^{•+} reduzido).

Os extratos das diferentes partes do vegetal, mais promissores frente aos testes biológicos, foram submetidos às análises cromatográfica e espectroscópica, para uma maior exploração do perfil e da natureza dos metabólitos secundários presentes. Foram realizadas análises das amostras antioxidantes promissoras via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos (CLAE- DAD) em escala analítica. As amostras foram solubilizadas em MeOH:H₂O (70:30 v/v) e submetidas a um *clean up* utilizando cartuchos de sílica octadecilsilano (C₁₈). As análises foram feitas em um cromatógrafo Shimadzu equipado com bombas LC-20AT, detector UV-DAD SPD-M20A, auto injetor SIL-20A, controlador CBM-20^a, e os cromatogramas foram registrados e processados utilizando software LC-solution. O sistema utilizado para análise em CLAE-DAD foi coluna analítica Luna Phenomenex C-18 (5 µm; h x Φ = 250 x 4,6 mm), volume de injeção de 15,0 µL e eluição em gradiente utilizando como fases móveis água (A) e MeOH (B), partindo de 15 % B a 70 % B em 60 min, 100% B em 65 min, permanecendo em 100 % B por 3 min e retornando à condição inicial. O fluxo utilizado foi de 1,0 mL min⁻¹ e λ de monitoramento de 254 nm. Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ¹H) dos extratos antioxidantes promissores foram realizados em um espectrômetro Varian Inova 300 operando a 300 MHz. Para estas análises utilizou-se cerca de 10,0 mg do extrato bruto que foi dissolvido em solvente deuterado DMSO (Merck).

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os extratos brutos de folhas, galhos e cascas do caule, em concentrações na faixa de 1 a 100 µg/mL, foram analisados frente ao ensaio da capacidade redutora do radical DPPH[•], para uma avaliação preliminar, e do cátion ABTS^{•+} no decorrer do trabalho, para uma maior exploração da atividade destes extratos. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Teste da capacidade redutora do radical DPPH[•] e ABTS^{•+} dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule



Amostra	Código	DPPH [•] / EC ₅₀ (µg/mL)	ABTS ^{•+} / EC ₅₀ (µg/mL)
Padrão	Rutina	6,34	10,05
Folhas	CFEAc	61,92	49,71
	CFEM	14,26	13,29
	CFEHidr	14,37	40,48
	CFEAq	149,02	146,17
Galhos	CGEAc	201,70	47,50
	CGEM	22,61	23,50
	CGEHidr	17,48	41,89
	CGEAq	81,30	429,98
Casca do Caule	CCEAc	41,01	27,75
	CCEM	12,23	11,48
	CCEHidr	12,33	25,03
	CCEAq	16,28	16,10

C = *Calycophyllum spruceanum* Benth; F = Folha; G = Galho; C = Caule; E = Extrato; Ac = Acetato de Etila; M = Metanol; Hidr = Hidroalcoólico; Aq = Aquoso

Fonte: Dados da Pesquisa

Como pode-se observar na Tabela 1, os extratos metanólicos, hidroalcoólicos de folhas, galhos e cascas do caule, assim como o respectivo extrato aquoso desta parte vegetal, apresentaram menores valores de EC₅₀ frente ao teste de DPPH, assim indicando um maior potencial antioxidante das amostras devido às substâncias presentes nestes extratos. O teste de ABTS também apresentou resposta positiva frente aos extratos metanólicos, corroborando com parte dos resultados anteriormente obtidos. Com as análises cromatográficas dos extratos brutos com atividade antioxidante mais relevante das diferentes partes do vegetal (Figura 1) foram observados picos com diferentes intensidades e característicos de compostos com distintas polaridades, variando de média a alta.

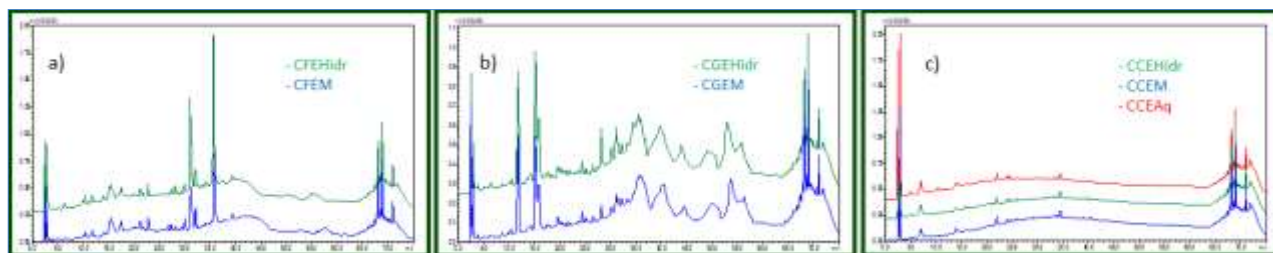


Figura 1 - Cromatogramas dos extratos metanólico (azul), hidroalcoólico (verde), aquoso de folhas (vermelho) (a), galhos (b) e cascas do caule (c) em $\lambda=254$ nm

Fonte: Dados da Pesquisa

Foi possível observar uma semelhança entre os perfis cromatográficos, somente variando a intensidade dos picos, o que pode indicar uma maior obtenção de metabólitos utilizando a metodologia de extração hidroalcoólica, quando comparada à extração metanólica e/ou aquosa. Pode-se observar a variação metabólica dos diferentes extratos em 254 nm, com uma quantidade significativa de picos por todo o cromatograma. A absorção neste comprimento de onda indica a presença de uma ampla variedade de compostos, entre eles aromáticos de forma geral, fenólicos, compostos insaturados. As análises espectroscópicas de RMN¹H, dos mesmos extratos foram de grande valia para a realização de um *fingerprint* dentro do estudo fitoquímico, auxiliando de forma ampla na identificação de certas classes de produtos naturais. Destaca-se que esta análise corroborou com os resultados observados em CLAE - DAD, demonstrando que os extratos apresentam perfis das espécies metabólicas majoritárias semelhantes. Foi observado nos espectros um sinal intenso em δ_H 2,5, atribuído ao solvente DMSO-*d*6 utilizado para as análises, assim como sinais relevantes em δ_H 0,5 - 8,0, característicos de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos (δ_H 0,7 - 3,0), sinais característicos de açúcares (δ_H 2,0 - 5,0), hidrogênios carbinólicos (δ_H 3,0 - 4,0), hidrogênios olefínicos (δ_H 4,5 - 6,0), além de uma região complexa de aromáticos (δ_H 6,5 - 8,0).

4 CONCLUSÃO

Apesar de cada teste antioxidante avaliar comportamentos químicos distintos e atuar por diferentes mecanismos, de uma forma geral levaram ao resultado de que os extratos metanólicos e hidroalcoólicos foram os mais promissores, visto ser esta uma atividade importante para a elaboração de produtos cosméticos. Estes resultados, em conjunto com as análises via CLAE -DAD e RMN¹H, indicaram o direcionamento e continuação



dos estudos frente aos extratos hidroalcoólicos, que serão fracionados e submetidos aos mesmos procedimentos para identificação dos constituintes responsáveis pela atividade antioxidante. Testes adicionais serão realizados visando a possível aplicação dos extratos e frações na linha de cosmético funcional.

REFERÊNCIAS

CALLONI, G. **Ingredientes sustentáveis e Inovações em Cosméticos**. São Paulo: Revista Cosmetics & Toiletries. Brasil: Tecnopress, v.26, n.3, p. 66-74. 2014.

GARCIA, R.; FURTADO, J. **Estudo da competitividade de cadeias integradas no Brasil: impactos das zonas de livre comércio – Cadeia de cosméticos**. MDIC/MCT/FINEP/UNICAMP/UFRJ. Nota Técnica Final, Campinas. 2002. 91 p.

ZULETA, L. M.; CAVALHEIRO, A.; SILVA, D.; FURLAN, M.; YOUNG, M. C.; ALBURQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. **Seco-iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae)**. *Phytochemistry*, v. 64, n.2, p. 549-553. 2003.