

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
Laboratório de Pesquisa em Química dos Produtos Naturais (LPqPN)



Estudo Químico Biomonitorado de Extratos das Folhas e do Caule de
***Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae)**

Gerson Santos de lima

Maceió/AL
2008

Gerson Santos de Lima

**Estudo Químico Biomonitorado de Extratos das Folhas e do Caule de
Guettarda grazielae M.R.V. Barbosa (Rubiaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia (PPGQB) do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como cumprimento às exigências para obtenção do título de *Mestre em Ciências*, área de *Química Orgânica/Química dos Produtos Naturais*. Este trabalho foi realizado sob orientação da *Profa. Dra. Lucia Maria Conserva*.

Maceió/AL

2008

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

L732e

Lima, Gerson Santos de.

Estudo químico biomonitorado de extratos das folhas e do caule de *Guettarda grazielae* M. R. V. Barbosa (Rubiaceae) / Gerson Santos de Lima. – Maceió, 2008.

xii, 127 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Lucia Maria Conserva.

Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2008.

Bibliografia: f. [128]-160.

1. *Guettarda grazielae*. 2. Rubiaceae. 3. Triterpenos. 4. Anticolinesterásicos. 5. Larvicida. 6. Antioxidantes. I. Título.

CDU: 547.9



**PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

Instituto de Química e Biotecnologia
Universidade Federal de Alagoas
Tel. 55 82 3214-1384 Fax. 55 82 3214-1389
www.cpgqb@qui.ufal.br

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins
57072-970
Maceió-AL
Brasil

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Gerson Santos de Lima intitulada: "Estudo Químico Biomonitorado de Extratos das Folhas e do Caule de *Guettarda grazielae*", apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 21 de maio de 2008, às 8h30min na sala de Reuniões do IQB da UFAL.

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Lucia Maria Conserva
Orientadora – PPGQB/IQB/UFAL

Prof^ª. Dr^ª. Ana Paula Freitas da Silva
IQB/UFAL

Prof. Dr. João Xavier Araújo Júnior
ESEN FAR/UFAL

Prof. Dr. Jorge Mauricio David
IQ/UFBA

*Dedico a realização deste trabalho inicialmente a **Deus**, pelo dom da vida, por está comigo em todas as horas e por me apresentar pessoas amigas que me ajudaram a crescer.*

*Aos meus pais **Sabino e Neide**, pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida, pela base familiar de respeito e fidelidade e pelo exemplo de dignidade, força e superação.*

Agradecimentos

A **Profa. Dra. Lucia Maria Conserva**, por todo conhecimento transmitido durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como pelo exemplo de profissionalismo, oportunidade, amizade e confiança desde a iniciação científica;

A botânica **Rosângela Pereira de Lyra Lemos**, botânica do Instituto do Meio Ambiente/AL, pela coleta e identificação do material vegetal;

A **Profa. Dra. Patrícia Emanuella Silva de Oliveira**, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, pelo apoio nos ensaios larvicidas e anticolinesterásicos;

A **Profa. Dra. Ana Paula Freitas da Silva**, do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, pela colaboração nos ensaios de fenóis totais;

Ao **Prof. Dr. Edson de Souza Bento** do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, pelos espectros de RMN a 400 e 100 MHz;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, pelos ensinamentos transmitidos;

Aos colegas do **LPqPN**: **Fernando Maia**, **Edmilson Pinto**, **Osmarlino Jataí**, **Maria Lysete** e **Sandovânio Ferreira**, pela amizade, apoio e transmissão conhecimentos;

Aos colegas do Programa de Iniciação Científica: **Erika**, **Erlan**, **Jésu**, **Morgana**, **Nayara**, **Patrícia Vasconcelos** e **Vívian** pelos momentos agradáveis;

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação, pelos momentos agradáveis;

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão das Bolsas de Mestrado;

A **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (FAPEAL)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq)**, ao **Banco do Nordeste-Rede Nordestina de Biotecnologia (BNB-RENORBIO)** e ao **Instituto do Milênio do Semi-Árido (IMSEAR)** pelos recursos financeiros concedidos;

Ao técnico **Aldy dos Santos**, pelo apoio e pelos inúmeros favores prestados;

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

<i>Agradecimentos</i>	<i>iv</i>
<i>Lista de Figuras</i>	<i>vii</i>
<i>Lista de Tabelas</i>	<i>viii</i>
<i>Lista de Quadros</i>	<i>ix</i>
<i>Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos</i>	<i>ix</i>
<i>Resumo</i>	<i>xi</i>
<i>Abstract</i>	<i>xii</i>
1. Introdução	1
2. Objetivos	3
2.1. Objetivo Geral	4
2.2. Objetivos Específicos	4
3. Considerações Gerais Sobre a Dengue, a Febre Amarela, Drogas Anticolinesterásicas e Doenças Relacionadas, Antioxidantes, a Família Rubiaceae, o Gênero <i>Guettarda</i> e a Espécie <i>Guettarda grazielae</i>	5
3.1. Considerações Gerais Sobre a Dengue	6
3.2. Considerações Gerais Sobre a Febre Amarela	7
3.3. Considerações Gerais Sobre Drogas Anticolinesterásicas e Algumas das Doenças Relacionadas	8
3.4. Considerações Gerais Sobre Radicais Livres e Sistemas de Defesa Antioxidante	10
3.5. Considerações Botânica, Química e Medicinal Sobre a Família Rubiaceae	11
3.6. Considerações Gerais Sobre o Gênero <i>Guettarda</i>	14
3.7. Considerações Sobre a Espécie Vegetal <i>Guettarda grazielae</i> M.R.V. Barbosa	15
4. Experimental	74
4.1. Solventes, Materiais e Equipamentos	75
4.2. Preparação das Soluções Utilizadas nos Ensaios Anticolinesterásicos	76
4.3. Coleta e Identificação da Espécie Vegetal	77
4.4. Preparação dos Extratos	77
4.5 Avaliação da Atividade Larvicida, Anticolinesterase e Antioxidante	77
4.5.1 Avaliação da Atividade Larvicida	77
4.5.2 Avaliação Preliminar da Atividade Anticolinesterásica	79
4.5.3 Avaliação do Potencial Antioxidante	81

4.5.3.1 Avaliação Qualitativa da Atividade Frente ao Radical Sintético DPPH	81
4.5.3.2. Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais	82
4.5.3.3 Avaliação Quantitativa da Atividade Frente ao Radical Livre DPPH.	83
4.6. Procedimento Experimental Efetuado no Isolamento dos Constituintes Químicos	85
4.6.1 Isolamento de Alguns dos Constituintes Químicos das Folhas	85
4.6.2 Isolamento de Alguns dos Constituintes Químicos do Caule	88
Dados Físicos e Espectroscópicos das Substâncias Isoladas	89
5. Resultados e Discussão	91
5.1. Resultados Referentes aos Ensaio Biológicos	92
5.1.1. Resultados dos Ensaio Larvicidas (<i>Aedes aegypti</i>)	92
5.1.2. Resultados dos Ensaio Anticolinesterásicos	94
5.1.3. Resultados dos Ensaio para Avaliação do Potencial Antioxidante	95
5.1.3.1 Resultados dos Ensaio Qualitativos (DPPH)	95
5.1.3.2 Resultados da Determinação do Conteúdo de Fenóis Totais (Folin-Ciocalteu)	95
5.1.3.3. Resultados dos Ensaio Antioxidantes Quantitativos (DPPH)	96
5.2. Resultados Referentes ao Estudo Fitoquímico	97
5.2.1 Identificação Estrutural da Substância Codificada de GGFH-2	99
5.2.2. Identificação Estrutural da Substância Codificada de GGFH-3	103
5.2.3. Identificação Estrutural da Substância Codificada de GGFC-3	107
5.2.4. Identificação Estrutural das Substâncias Codificadas de GGCA-1 e GGCA-2	112
5.2.5. Identificação Estrutural da Substância Codificada de GGFA-2	120
6. Considerações Finais	127
7. Referências Bibliográficas	130

Lista de Figuras

Figura 1.	Incidência de dengue no Brasil no ano de 2007	7
Figura 2.	Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela AchE.	9
Figura 3.	Perfil dos esqueletos de triterpenos relatados em espécies de Rubiaceae.	13
Figura 4.	Esquema geral de obtenção dos extratos das folhas (A) e do caule (B).	78
Figura 5.	Formas evolutivas do <i>A. aegypti</i> (A = larvas e pupas, B = pupa, C = transformação de pupas para o adulto e D = mosquito adulto efetuando repasto sangüíneo).	79
Figura 6.	Gráfico da correlação entre as porcentagens de mortalidade das larvas e as concentrações testadas da fração em C ₆ H ₁₄ das folhas (GGFEH).	93
Figura 7.	Gráficos do comportamento cinético dos padrões: <i>Ácido ascórbico</i> (A), <i>α-Tocoferol</i> (B) e <i>BHT</i> (C). As concentrações estão expressas em µg/mL.	97
Figura 8.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância GGFH-2 .	101
Figura 9.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância GGFH-2 .	102
Figura 10.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (100 MHz, CDCl ₃) da substância GGFH-2 .	103
Figura 11.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da substância GGFH-3 .	105
Figura 12.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) da substância GGFH-3 .	106
Figura 13.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (100 MHz, CDCl ₃) da substância GGFH-3 .	107
Figura 14.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) da substância GGFC-3 .	110
Figura 15.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃ -CD ₃ OD) da substância GGFC-3 .	111
Figura 16.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância GGCA-1 .	116
Figura 17.	Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância GGCA-2 .	117
Figura 18.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da substância GGCA-1 .	118
Figura 19.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da substância GGCA-2 .	119
Figura 20.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (100 MHz, CD ₃ OD) da substância GGCA-2 .	120
Figura 21.	Espectros de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância GGFA-2 .	124
Figura 22.	Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da substância GGFA-2 .	125
Figura 23.	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT (100 MHz, CD ₃ OD) da substância GGFA-2 .	126

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Triterpenos relatados em espécies da família Rubiaceae	16
Tabela 2.	Uso Etnomedicinal, atividades biológicas e substâncias relatadas em espécies do gênero <i>Guettarda</i> .	66
Tabela 3.	Resultados preliminares dos ensaios larvicidas (250 ppm).	92
Tabela 4.	Resultados preliminares da avaliação da atividade anticolinesterásica.	94
Tabela 5.	Resultados da avaliação do conteúdo de fenóis totais (Folin-Ciocalteu).	96
Tabela 6.	Dados de RMN (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz CDCl_3) da substância GGFH-2 e da <i>Cicloartenona</i> (^1H : 300 MHz; ^{13}C 75 MHz, CDCl_3).	100
Tabela 7.	Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 , J em Hz) da substância GGFH-3 e da <i>sitostenona</i> (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, CD_3OD).	104
Tabela 8.	Dados de RMN (^1H : 400; ^{13}C 100 MHz, CDCl_3 - CD_3OD , J em Hz) de GGFC-3 e dos ácidos <i>ursólico</i> (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e <i>oleanólico</i> .	109
Tabela 9.	Dados de RMN ^1H das substâncias GGCA-1 e GGCA-2 (400 MHz, CD_3OD , J em Hz), <i>Ácido rotúndico</i> (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) e <i>Ácido 3β,6β,19α,23-tetraidroxiolean-12-en-28-óico</i> (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).	114
Tabela 10.	Dados de RMN ^{13}C das substâncias GGCA-1 e GGCA-2 (100 MHz, CD_3OD), <i>Ácido rotúndico</i> (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$), <i>Ácido 3β,6β,23-triidroxiolean-12-en-28-óico</i> e <i>Ácido 3β,6β,19,23-tetrahidroxiolean-12-en-28-óico</i> (75 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$).	115
Tabela 11.	Dados de RMN (^1H : 400 e ^{13}C 100 MHz, CD_3OD , J em Hz) da substância GGFA-2 , <i>Ác. 3-O-β-D-glicopiranosilquinóvico</i> [^1H : 500 MHz, $\text{DMSO}-d_6$; ^{13}C : 69,5 MHz, CD_3OD], <i>Ácido 28-O-β-D-glicopiranosilquinóvico</i> e <i>Ácido 3-O-β-D-quinovopiranosilcinchólico</i> (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).	123

Lista de Quadros

Quadro 1.	Extratos, frações e substâncias submetidos a ensaios larvicidas.	77
Quadro 2.	Extratos, frações e substâncias submetidos a ensaios anticolinesterásicos.	80
Quadro 3.	Extratos, frações e substâncias submetidos a ensaios antioxidantes.	81
Quadro 4.	Extratos e frações submetidos a ensaio Quantitativo (DPPH).	83
Quadro 5.	Fracionamento cromatográfico da subfração em C ₆ H ₁₄ -AcOEt 9:1.	86
Quadro 6.	Fracionamento Cromatográfico da fração AcOEt (0,900 g) das folhas.	88
Quadro 7	Extratos que forneceram resultados positivos nos ensaios qualitativos (DPPH).	95

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

a.C.	Antes de Cristo
Ach	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterase
AchEIs	Inibidores da acetilcolinesterase
AcOEt	Acetato de Etila
BHT	Ditercutilidroxitolueno
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CD ₃ OD	Metanol deuterado
C ₅ D ₅ N	Piridina deuterada
CI ₅₀	Concentração Inibitória capaz de diminuir 50% da população
CL ₅₀	Concentração Letal capaz de eliminar 50% da população
d	Dupleto
DA	Doença de Alzhmeir
DC	Dengue Clássico
dd	Duplo dupleto
DEPT	Distortioless Enhancement by Polarization Transfer
DH	Dengue Hemorrágico
DMSO-d ₆	Dimetilsulfóxido deuterado

DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DP	Desvio Padrão
et al.	Colaboradores
EtOH	Etanol
Glu	Glutamato
His	Histidina
Hz	Hertz
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
p.	Página
pp.	Páginas
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
s	Simpleto
SDC	Síndrome do Choque associado ao Dengue
Ser	Serina
sl	Simpleto largo
SVS/MS	Secretaria de Vigilância Sanitária/ Ministério da Saúde
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
WHO	World Health Organization
δ	Deslocamento Químico

Resumo

O presente trabalho descreve o isolamento, monitorado pelas atividades larvicida, anticolinesterásica e antioxidante, de alguns dos constituintes químicos presentes em extratos das folhas e do caule de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa. Ademais, também foi efetuada uma revisão das atividades biológicas observadas para extratos e substâncias descritas em espécies deste gênero, bem como uma compilação dos triterpenos relatados em Rubiaceae.

Folhas e caule, após secagem e trituração, foram extraídos através de maceração com acetona e/ou etanol. Os extratos obtidos foram então particionados entre MeOH-H₂O 3:2 e solventes de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio e acetato de etila). Os extratos brutos, bem como as frações provenientes deste procedimento, foram avaliados quanto ao potencial larvicida (larvas do 4º estágio de *Aedes aegypti*), anticolinesterásico e antioxidante (teor de fenóis totais e DPPH). As frações em hexano e em AcOEt, oriundas dos extratos em etanol das folhas e do caule foram as mais promissoras nos ensaios larvicidas (CL₅₀ 131,73 e 58,18 ppm, respectivamente). O extrato bruto em acetona das folhas, bem como algumas das suas subfrações provenientes de filtração em gel de sílica das frações em hexano e em clorofórmio, foram efetivas em inibir qualitativamente a ação da enzima acetilcolinesterase, quando comparados com a cafeína. Por outro lado, nos ensaios antioxidantes, as frações em MeOH-H₂O do caule (347,75 ± 0,02 EAG/g) e em AcOEt das folhas (298,03 ± 0,002 EAG/g) foram as mais ricas em compostos fenólicos. Destas, somente a fração em AcOEt foi moderadamente ativa (CI₅₀ 164,85 ± 2,76 µg/mL) frente ao DPPH. As demais frações apresentaram fraca atividade ou foram inativas. Algumas das frações das folhas e do caule, consideradas promissoras nestes ensaios, foram investigadas e conduziram ao isolamento e identificação estrutural (RMN, incluindo DEPT) de um fitoesteróide (*Sitostenona*) e de cinco triterpenos (*Cicloartenona*, *3β,19α,23-triidroxi-urs-12-eno*, *ácido 3β,6β,19α,23-tetrahidroxi-urs-12-en-28-óico*, *ácido 3-O-β-D-glicopiranosilquinóico* e *ácido ursólico*) que de um modo geral, irão contribuir para ampliar o perfil químico do gênero *Guettarda*, bem como da família Rubiaceae.

O levantamento bibliográfico dos triterpenos que ocorrem na família Rubiaceae revelou que dentre as espécies até então investigadas, um total de 373 triterpenos com 12 diferentes tipos de esqueletos, sendo oleanano e ursano os mais representativos, foram até então isolados. Em relação ao gênero *Guettarda*, a literatura registra a ocorrência de 44 diferentes compostos distribuídos em dez espécies, sendo os alcalóides e os triterpenos os mais abundantes.

Abstract

This work describes the isolation of some chemical constituents from the extracts of leaves and stems of *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa, guided by larvicidal, anticholinesterase and antioxidant activities. Furthermore, a review of the biological activities of extracts and substances described in species this genus, and a compilation of triterpenes reported in the Rubiaceae species was also made.

The leaves and stems, after drying and grounded, were extracted by maceration with acetone and/or ethanol. The extracts were submitted to a liquid partition between MeOH-H₂O 3:2 and solvents of different polarity (hexane, chloroform and ethyl acetate). The crude extracts, as well as the fractions from this procedure, were evaluated for their potential larvicidal (larvae of the 4th stage of *Aedes aegypti*), antioxidant (total phenols content and DPPH) and anticholinesterase. The hexane and EtOAc fractions from ethanol extract of the leaves and stem, respectively, were the most promising in larvicidal assays, LC₅₀ 131.73 ppm and LC₅₀ 58.18 ppm. In comparison with caffeine (standard), the crude acetone extract from the leaves, as well as some of its sub-fractions from filtering into the silica gel of the fractions in hexane and chloroform, were qualitatively effective in inhibiting the action of the enzyme acetylcholinesterase. On the other hand, in the antioxidants tests, MeOH-H₂O from stem (347.75 ± 0.02 GAE/g) and EtOAc fractions from the leaves (298.03 ± 0.002 GAE/g) exhibit higher phenolic content. Of these, only the EtOAc fraction showed moderately active (IC₅₀ 164.85 ± 2.76 µg/mL) against DPPH. The other fractions showed weak activity or were inactive. Some of the fractions from leaves and stems that were considered promising in these assays were investigated and led to the isolation and identification structural (NMR, including DEPT) of a phytosteroid (*Sitostenone*) and five triterpenes (*Cicloartenone*, *3β,19α,23-trihydroxy-urs-12-ene*, *3β,6β,19α,23-tetrahydroxy-urs-12-en-28-oic acid*, *3-O-β-D-glucopyranosylquinovic acid* and *ursolic acid*), that in general will help to expand the chemical profile of the genus *Guettarda* as well as of the family Rubiaceae.

The review of the triterpenes that occurs in the family Rubiaceae revealed that among all species investigated, it was isolated a total of 373 triterpenes with 12 different types of skeletons and being oleanane and ursane the most representatives. Regarding the genus *Guettarda*, the literature records the occurrence of 44 different compounds distributed in ten species, which alkaloids and triterpenes are the most abundant compounds.