

## **ESTUDO QUÍMICO DE *Vismia japurensis* REICH (CLUSIACEAE) VISANDO SUBSTÂNCIAS ANTIOXIDANTES**

Orleylson Cunha GOMES<sup>1</sup>; Francislani Nascimento dos SANTOS<sup>2</sup>; Cecilia Veronica NUNEZ<sup>3</sup>.  
<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/INPA/FAPEAM; <sup>2</sup>Bolsista ITI-A/CNPq; <sup>3</sup>Orientadora CPPN/INPA.

### **1. Introdução**

A natureza é a maior produtora de substâncias orgânicas conhecidas. O reino vegetal contribui abundantemente no fornecimento de metabólitos secundários, sendo muitos de grande valor agregado devido às aplicações como medicamentos, produtos para as agroindústrias, alimentos e cosméticos (Pinto et al., 2002). A procura pela cura de doenças através da ingestão de folhas, cascas e seus preparados tem sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações apresenta vários exemplos da utilização de recursos naturais na medicina e no controle de pragas, entre outros (Viega Jr. et al. 2005). No Brasil, em especial na região amazônica, existem diversas espécies de plantas medicinais de uso local, com possibilidade de gerar medicamentos com menor custo para a população. Nesse sentido destacamos a família Clusiaceae que compreende aproximadamente 1.370 espécies, distribuídas em 45 gêneros de ocorrência em regiões tropicais (Stasi e Hiruma-Lima, 2002). No Brasil ocorrem 21 gêneros, com aproximadamente 131 espécies utilizadas popularmente como citotóxica, antiinflamatória, antimicrobiana e hipotensiva (Wagner, 1977 apud. Lima et al. 1999). Do ponto de vista químico, as espécies estudadas são reconhecidas como fontes, entre outros, de xantonas, benzofenonas, terpenóides, alquil e fenil cumarinas, antraquinonas e de derivados antranóides, cromonóis e floroglucinóis ativos contra diversos fins (Ishikawa & Oliveira, apud. Lima et al., 1999), e possuem de ampla distribuição por todo o território nacional. Os gêneros, distribuídos em três subfamílias, apresentam alguns com importância medicinal no Brasil, como *Hypericum* e *Vismia* (Hypericoideae), *Clusia* (Calophylloideae) e *Kielmeyera* (Bonnetioideae). Destacam-se nesses gêneros importantes espécies econômicas para a produção de madeira, gomas, pigmentos, óleos essenciais e resinas. O gênero *Vismia*, possui aproximadamente 35 espécies, sendo estas pouco estudadas. A espécie *Vismia japurensis* Reicht, conhecida popularmente na região como "lacre", "picharrinha", "pau-de-lacre" e "purga-de-vento", tem hábito arbustivo, chegando a medir de 9 a 11 m, ocorrendo principalmente em toda a Amazônia brasileira, assim como na Colômbia, Equador e Venezuela (Mobot, 2009). Merece destaque por ser usada na medicina popular no combate ao reumatismo, dermatoses como as impigens (*Tinea corporea*) e ferimentos por inseto (Santos et al., 2007). A família Clusiaceae apresenta como substâncias características as xantonas, que podem ser utilizadas como marcadores químicos. Esta classe química também pode conter hidroxilas fenólicas, o que possibilita a estabilização de radicais livres presentes nas células. O consumo de antioxidantes naturais, como as substâncias fenólicas presentes na maioria das plantas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (Droge, 2002). Entre estas doenças, temos o reumatismo que é um processo inflamatório provocado por reações de oxidação-redução. Assim, o presente projeto visou a avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *Vismia japurensis* Reicht e o fracionamento dos seus extratos.

### **2. Material e métodos**

O material vegetal foi coletado no campus universitário da UFAM – Manaus. Segundo Matias (2011), a identificação de uma planta desconhecida consiste em determinar se é idêntica ou semelhante a outra previamente conhecida. Dispondo das descrições botânicas e usando as chaves de identificação, foi possível determinar que a espécie vegetal coletada trata-se da *Vismia japurensis*, e não *V. duckei*, como havia sido previamente identificada.

*Extração:* As folhas foram secas à temperatura ambiente, moídas e extraídas com hexano, metanol e água, em polaridade crescente, utilizando ultrassom por 20 min, sendo feitas cinco extrações para cada solvente. A concentração dos extratos foi feita utilizando rotaevaporador Fisatom 820.

*Atividade antioxidante qualitativa:* Para o ensaio em DPPH, fez-se um solução de 0,2 % em MeOH, usadas para a revelação de CCDC.

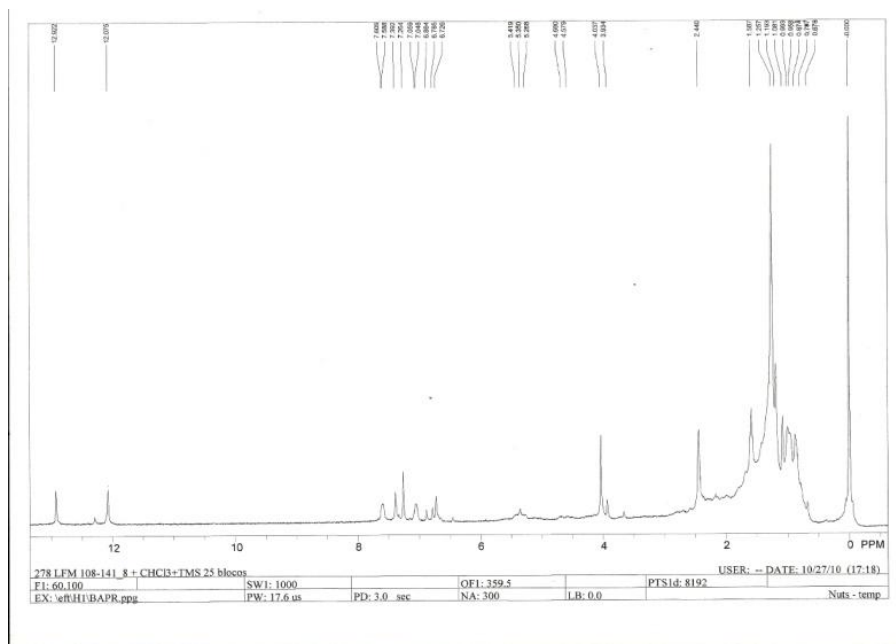
*Atividade antioxidante quantitativa:* A solução foi preparada solubilizando 28 mg do DPPH• com 1 mL de DCM e posteriormente avolumado com MeOH até 100 mL. Em seguida foi preparada uma solução de ácido ascórbico 0,88 mg/mL (solução mãe), esta foi usada para obter cinco novas soluções com concentração de: 0,704 mg/mL; 0,528 mg/mL; 0,352 mg/mL; 0,176 mg/mL; 0,088 mg/mL, as quais foram usadas para obter a curva de calibração do ácido ascórbico. Esperou-se por 30 minutos para verificar se o resultado da curva foi satisfatório. Após a verificação da curva de calibração e sua linearidade, adicionou-se 0,5 mg/mL dos extratos nas soluções de DPPH•. Realizou-se a leitura da absorbância (517 nm) no espectrofotômetro, e após 30 minutos de reação, a leitura é realizada novamente. A variação da absorbância dos extratos é comparada com o ácido ascórbico para a avaliação quantitativa do potencial antioxidante.

*Fracionamento cromatográfico:* O extrato metanólico (13 g) foi submetido a uma coluna filtrante, utilizando gradientes de polaridade crescente hexano (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt), metanol (MeOH) obtendo-se 7 frações. Destas, a fração reunida 2-5 com massa de 900 mg foi escolhida para ser fracionada por apresentar colorações laranja e azul ao revelar a placa cromatográfica com anisaldeído sulfúrico e coloração laranja ao revelar com sulfato cérico. Primeiro foi testado o fracionamento em coluna aberta com poliamida como fase estacionária, usando 56 mg da fração 2-5, eluindo com solventes de diferentes polaridades obtendo 26 frações. Como os resultados obtidos da coluna teste mostraram-se satisfatórios, 800 mg da fração foram submetidos a separação cromatográfica em poliamida, obtendo 180 frações que foram analisadas em CCDC. Dessas 180 frações, a fração reunida 18-24 (50 mg) foi submetida a cromatografia em coluna aberta, utilizando sílica como fase estacionária e Hex/Acetona e Acetona/MeOH como fase móvel, obtendo 40 frações. Todas foram analisadas em CCDC e reveladas com DPPH, para o monitoramento da atividade antioxidante. As análises da sub-fração 108-141 em CCDC permitiram verificar uma mancha laranja persistente no visível, e, quando revelada em anisaldeído sulfúrico e sulfato cérico a mesma não apresentava alteração na sua cor. Sendo assim, a sub-fração 108-141, com massa de 110 mg, foi submetida a fracionamento cromatográfico, para possível isolamento das substâncias, utilizando sílica como fase estacionária e os gradientes Hex/Acetona e Acetona/MeOH, obtendo 34 frações, todas foram analisadas e reveladas utilizando DPPH. Após as análises em CCDC realizadas, a fração 8 apresentou-se mais interessante, pois apresentou atividade antioxidante significativa quando analisada qualitativamente com DPPH, e apresenta em sua constituição uma mancha laranja, indicando assim a presença de possível substância antioxidante. A sub-fração foi enviada a análise em RMN de  $^1\text{H}$  e a análise do espectro indicou a presença de flavonoide. A sub-fração 108-141(8) apresentava manchas bem próximas quando analisadas em CCDC, devido a sua massa (13 mg) a mesma foi analisada em CLAE analítico para encontrar a condição apropriada para realizar o fracionamento em CLAE semi-preparativo.

### 3. Resultados e Discussão

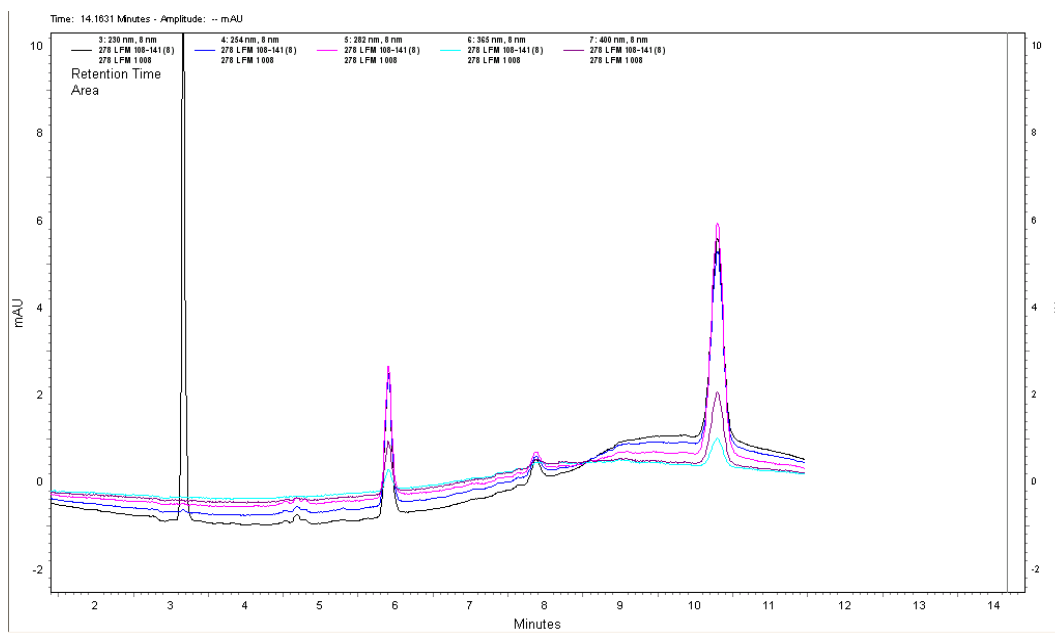
O fracionamento cromatográfico foi guiado pela análise das frações em CCDC, identificando as frações pela alta atividade antioxidante apresentada quando reveladas com a solução de DPPH. A fração 18-24 foi submetida a uma cromatografia em coluna aberta obtendo 40 frações. Por apresentarem massa insuficiente para continuar o fracionamento, as frações desta coluna estão guardadas. As mais puras serão analisadas em RMN de 500 MHz, para assim tentar identificar os constituintes presentes. A sub-fração 108-141 foi escolhida para ser fracionada. Assim, os 110 mg desta fração foram submetidos a fracionamento cromatográfico obtendo 34 frações, analisadas em CCDC e reveladas utilizando DPPH. Em análises de CCDC a fração 8, foi mais interessante, pois apresenta atividade antioxidante significativa quando revelada qualitativamente com DPPH, e apresenta em sua constituição uma mancha laranja, indicando assim a presença de possível flavonoide. A sub-fração foi enviada a análise em RMN  $^1\text{H}$  (Fig. 1). A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração 108-141(8) revelou a presença de sinais em  $\sim 12$  ppm, os quais analisados em conjunto com sinais entre 6,5 e 7,5 ppm sugerem a presença de flavonoide. Estes sinais praticamente excluem a presença de carotenóides, pois os sinais são bem diferentes dos sinais característicos para esta classe de substâncias. Caso haja carotenóides, estão em pequena quantidade quando comparado com os sinais das demais substâncias. Esta amostra será

enviada para a obtenção dos espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  (DEPT e APT) e bidimensionais HMBC, HSQC e COSY para identificação estrutural.



**Figura 1** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz) da fração 108-141(8).

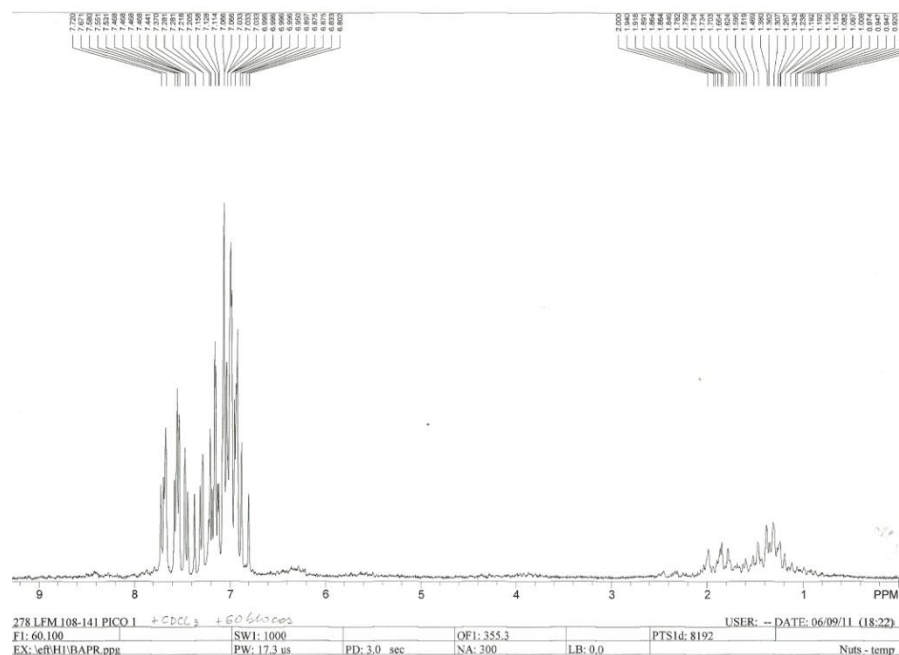
A fração 108-141(8) apresentava mistura de substâncias com polaridade bem próxima quando analisadas em CCDC e por esta razão, juntando com a pequena massa (13 mg) a mesma foi analisada em CLAE analítico, com fluxo de 1,0 mL por minuto, em coluna C18, em condição isocrática – MeOH- visando encontrar uma condição para realizar o fracionamento em CLAE semi-preparativo. Figura 2.



**Figura 2** - Cromatograma obtido por CLAE da fração 108-141 (8).

Após serem purificadas em CLAE, as substâncias obtidas passaram a ser analisadas em RMN de  $^1\text{H}$ , figura abaixo, os sinais sugerem a presença de flavonoides, pois os sinais mostram-se intensos na região dos aromáticos, entre 6,5 e 7,5, porém ainda se percebe uma grande

mistura. A substância 1 (pico 1), será novamente purificada em CLAE, a fim de separar as possíveis substâncias em mistura.



**Figura 3** - Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (em  $\text{CDCl}_3$ , 60 MHz) da fração 108-141(8) (Substância 1).

#### 4. Conclusão

O estudo fitoquímico do extrato das folhas de *V. japurensis*, família Clusiaceae, merece ser continuado, pois até o momento temos indicativos da presença de flavonoides em frações que estão sendo purificadas via CLAE e sendo analisados por RMN.

#### 5. Referências Bibliográficas

- Droge, W.2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, 82: 47-95.
- Lima, A. C. A.; Oliveira, F. M.; Conserva L. M. 1999. Contribuição ao conhecimento químico de Guttiferae. Composição química de *Tovomita brevistaminea* Engl. Resumo de Anais da Universidade Federal de Alagoas.
- Matias, L.Q. 2011. Morfologia e Taxonomia de Espermatófitos. [www.biologia.ufc.br](http://www.biologia.ufc.br). Acesso dia 04/06/2011.
- Mobot, 2011. Clusiaceae, *Vismia japurensis*. [www.mobot.com](http://www.mobot.com). Acesso em 25/05/2011.
- Pinto, A.C.; Silva, D.H.S.; Bolzani, V.S.; Lopes, N.P.; Epifanio, R.A. 2002. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. *Química Nova*.25:45-61,
- Santos, A. L. 2007. Ensaio Microbiológico dos Extratos e Frações de *Vismia guianenses* Clusiaceae (Aubl) Pers. Resumo da 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.
- Viegas Junior, V.; pinto, C, A.; Maciel, M.A.M. 2005 Plantas medicinais. Cura segura? *Química Nova*. 28:519-528.
- Stasi, L.C; Hiruma-lima, C.A. 2002. *Plantas Mediciniais da Amazônia e na Mata Atlântica*. 2. Ed. Rev. e Ampl. - São Paulo: Editora UNESP, 592 pp.