

ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO HIDROALCOOLICO DAS CASCAS *PSEUDOBOMBAX SIMPLICIFOLIUM*

Wallace Amorim Machado de Queiroz ¹
Maria da Conceição Menezes Torres ²

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para cura, tratamento e prevenção de doenças pelo homem, é secular. O grande uso das plantas na medicina popular despertou o interesse nos cientistas em isolar seus princípios ativos e investigar seus mecanismos de ação. Estudos químicos, farmacológicos e clínicos, predominantemente com produtos naturais oriundos de plantas, constituem a base dos mais antigos e conceituados medicamentos, como aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina (VIEGAS JR; BOLZANI, 2006).

Atualmente, os produtos naturais têm grande importância na área da saúde, desde que cerca de 60% de todos os princípios ativos encontrados nas formulações dos medicamentos são originários de forma direta ou indireta de um produto natural (NEWMAN; CRAGG, 2016). É, portanto, notável a contribuição dos produtos naturais, como fonte de compostos bioativos, com perspectiva de medicamento, os quais podem ser oriundos de fontes diversas como, a partir de plantas, organismos marinhos e microrganismos marinhos ou terrestres.

Várias plantas da família Malvaceae fazem parte do elenco de plantas do sistema de medicina tradicional da região Nordeste, destacando-se quanto às propriedades anti-inflamatórias, antinociceptivas, antioxidantes, antimicrobianas e anticâncer (PAIVA et al., 2013; CHAVES et al., 2013; SHAIKH et al., 2016; BABU et al., 2016; MAH et al., 2017).

O gênero *Pseudobombax*, pertencente, atualmente, a família Malvaceae, possui distribuição exclusiva na América do Sul, especialmente na Bolívia, Brasil, Paraguai e Peru (BOVINI, 2010). No Brasil, as plantas desse gênero ocorrem nos estados da Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Rio Grande do Norte. Suas plantas são conhecidas popularmente como embiratanha, imbiruçu, paineira-imiruçu ou sumaúma e são, particularmente, relatada como possuidoras de ação anti-inflamatória no nordeste brasileiro. A casca de embiratanha apresenta emprego medicinal por populações da região Nordeste do Brasil, que utilizam o método de decocção como forma de preparo e aplicam nos casos de processos inflamatórios (AGRA et al., 2008). Estudos envolvendo a química de plantas do gênero *Pseudobombax*, são bastante incipientes e os poucos estudos fitoquímicos encontrados relatam a presença de compostos pertencentes às classes de flavonoides, esteroides e taninos (CHAVES et al., 2013; PAIVA et al., 2013; PAULA, BARBOSA; DEMUNER 1997), ressaltando a necessidade de estudos fitoquímicos visando o isolamento e elucidação estrutural desses metabólitos.

¹ Graduando do Curso de Química da Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, wallaceamorim2011@hotmail.com;

² Professora orientadora: Doutora, Universidade Estadual da Paraíba - UEPB, cei_menezes@yahoo.com.br

Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo realizar a prospecção química de *Pseudobambax simplicifolium* na busca por constituintes químicos biologicamente ativos.

METODOLOGIA

Material vegetal

Exemplares de plantas de *P. simplicifolium*, foram coletados no parque nacional do Catimbau-Pernambuco e uma exsicata já encontra-se depositada no Herbário IPA– Instituto Agrônômico de Pernambuco, Recife-PE, com o número 94.671.

Preparação dos extratos

As cascas do caule de *P. simplicifolium* foram secas em estufa por 7 dias a temperatura de aproximadamente 40 °C. O material seco foi triturado em moinho de facas, dando origem a droga vegetal das cascas de *P. simplicifolium* (DVC-PS). Esse material foi submetido à extração por maceração dinâmica, usando uma solução de etanol/água 30%, mantido em agitação por 24 horas. Foram realizadas três extrações (3 x 500 mL). Posteriormente, o extrato foi separado do resíduo através de filtração simples e o solvente foi evaporado em rotaevaporador a pressão reduzida, resultando no extrato hidroalcoólico das cascas de *P. simplicifolium* (EHC-PS) com uma massa de 25,03 g.

Análise no infravermelho

Uma alíquota do extrato EHC-PS (1 mg) foi submetida à análise por espectroscópica no infravermelho médio no intervalo de 500 a 4000 cm^{-1} , em um espectrômetro pertencente ao Laboratório de Certificação em Biomateriais (Certbio), da Universidade Federal de Campina Grande e analisados Software Origem (8.0).

Análises fitoquímicas de EHC-PS

O *screening* qualitativo seguiu a metodologia descrita por Matos (1997) e adaptada por Costa (2010). A pesquisa dos metabólitos secundários do extrato da *P. simplicifolium* foi feita por testes que foram aplicados para determinados grupos químicos de metabólitos secundários. Para saponinas foi aplicado o teste da espuma. Para polissacarídeos foi aplicado o teste do lugol. Para fenóis e taninos foi-se aplicado o teste com FeCl_3 1%. Para flavonoides foram aplicados o teste de shinoda e Oxalo-bórico. Para esteroides e triterpenoides foi aplicado o teste de Liebermann-Buchard e finalmente, para alcaloides os testes de Dragendorff, Bouchard e Mayer.

Análise quantitativa EHC-PS

A análise quantitativa do extrato EHC-PS para o grupo químico foi realizada em placas de 96 poços e foi efetuada a leitura das absorvâncias em Leitor de ELISA série Expert Plus.

O teor total de flavonoides foi quantificado por um método colorimétrico. Cada amostra (200 μ L) a 2 mg/mL foi misturada com 100 μ L de solução de $AlCl_3$ a 2% em metanol. Permitir à reação a temperatura ambiente por 10 minutos. A absorvância foi medida a 410 nm. Uma curva de calibração foi realizada simultaneamente nas mesmas condições operacionais usando Quercetina (Qct) como controle positivo. Os resultados foram expressos como equivalente de quercetina por grama de extrato seco (mg eq/g).

Fracionamento cromatográfico e isolamento dos constituintes químicos

As preparações cromatográficas foram realizadas com o uso de gel de sílica como adsorvente padrão; no caso da cromatografia em coluna foi utilizado gel de sílica; para a cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi utilizado gel de sílica aderido em cromatoplasmas de alumínio com espessura de 0,20 mm. A revelação das substâncias em CCDA foi realizada mediante o uso de luz ultravioleta, vapores de iodo sublimado ou ainda por aspersão com solução de vanilina ($C_8H_8O_3$), seguida de aquecimento a 100°C.

O extrato das cascas de *P. simplicifolium* (24,03 g) foi cromatografado em coluna aberta, utilizando 75,82 g de sílica gel para a composição da fase estacionária e como fase móvel foi usada os solventes hexano, acetato de etila e metanol, puros em misturas binárias de polaridade crescente. Dessa coluna foram obtidas 9 frações, as quais foram monitoradas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). As frações C1F2 e C1F3 mostraram-se visualmente semelhantes e, assim, foram reunidas para uma nova coluna, utilizando 27,96 g de sílica para a fase estacionária e como fase móvel os solventes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias de polaridade crescente. Dessa coluna foram obtidas 51 frações, as quais foram monitoradas por CCDA e agrupadas de acordo com a semelhança na placa cromatográfica em 7 frações. A análise por CCDA das subfrações C2F11 a C2F13, as quais se apresentaram na forma de um material cristalino, permitiu identificar um elevado grau de pureza para essas frações. Tais frações foram reunidas, fornecendo 137,0 mg de substância pura, a qual foi codificada por **PS-01**.

A partir da fração F7 a F23 da C4, após sucessivas cromatografias, utilizando como fase móvel solventes hexano, acetato de etila e metanol, puros em misturas binárias de polaridade crescente, foi isolado 10,9 mg de uma substância, a qual foi codificada de **PS-02**.

Atividade biológica

O extrato e suas frações do EHC-PS foram submetidos inicialmente à avaliação da atividade antioxidante, a qual foi realizada no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica no Centro de biociências da Universidade Federal do Pernambuco, sob a coordenação da Profa. Dra. Márcia Vanusa da Silva. Onde foram utilizados 3 métodos, a avaliação da atividade sequestradora do cátion radical 2',2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato) ($ABTS^{+}$), onde baseou-se na geração do radical catiônico cromóforo obtido a partir da oxidação de ABTS por persulfato de potássio. Para esta análise, foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999). A avaliação da atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH), onde foi medida por meio de

doação de hidrogênio usando o radical estável DPPH (Blois, 1958). E por fim, a capacidade antioxidante total por fosfomolibdênio (CAT). A capacidade antioxidante total (CAT) dos compostos foi avaliada pelo método do fosfomolibdênio, que consistiu na capacidade da composição em reduzir o molibdênio e formar o complexo fosfato-molibdato (Pietro et al., 1999).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise do espectro de infravermelho (IV) do extrato hidroalcoólico das cascas do caule de *P. simplicifolium* (EHC-PS), foi possível identificar os principais grupos funcionais presentes no mesmo. O espectro apresentou bandas de estiramentos na região de 3400 cm^{-1} sugestivos de grupamento hidroxila. Foi possível verificar também uma banda em aproximadamente 1700 cm^{-1} sugestivo de função carbonilada. As absorções próximas de 1000 cm^{-1} são compatíveis com ligações C-O, mostrando a presença de grupos funcionais oxigenados (PAVIA *et al.*, 2015). O espectro de EHC-PS apresentou bandas mais bem resolvidas na região de 1500 cm^{-1} compatível com estiramento da ligação =C-H de anel aromático (PAVIA *et al.*, 2015).

O extrato hidroalcoólico das cascas do caule (EHC-PS) foi submetido à prospecção fitoquímica e as principais classes de metabólitos secundários encontrados foram positivas para saponinas, fenóis e taninos e parcialmente positivo para alcaloides. Estes resultados positivos para presença das classes de fenóis, taninos nos extratos estão de acordo com os encontrados na literatura para espécie *Pseudobombax marginatum*, porém os metabólitos saponinas e alcaloides não foram detectados na literatura para a referida espécie (PAIVA *et al.*, 2013).

A análise quantitativa evidenciou teores de flavonoides $0,603\pm 0,03\text{ mg/g}$. Essa classe de substâncias já foi detectada em outras espécies de *Pseudobombax*, no entanto, ainda não havia estudos semelhantes realizados para *Pseudobombax simplicifolium*.

O fracionamento cromatográfico do extrato EHC-PS permitiu o isolamento de dois compostos (PS-01 e PS-02). As estruturas de PS-01 e PS-02 1-3, foram determinadas com base na análise de seus dados espectrais, particularmente, de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN ^1H e ^{13}C), incluindo experimentos uni e/ou bidimensionais. O espectro de RMN ^{13}C de PS-01 apresentou 30 linhas espectrais característico de um triterpeno, que em comparação com o espectro RMN ^{13}C - DEPT 135° , permitiu verificar a presença de 7 carbonos metílicos (CH_3), 11 metilênicos (CH_2) e 6 metínicos (CH), e devido a diferença, restaram-se 6 carbonos não hidrogenados. Um sinal em δ_{C} 79,24 sugeriu a ocorrência de carbono metínico oxigenado, e dois sinais em δ_{C} 109,54(CH_2) e 151,19(C), foram atribuídos a sinais de carbonos referentes a uma ligação dupla dissubstituída e terminal. O espectro de RMN ^1H exibiu um grande número de sinais na região entre δ_{H} 0,81-1,73, sendo que nessa faixa foram observados 7 singletos, que foram atribuídos a hidrogênios de grupo metila ligados a átomos de carbono saturados e não hidrogenados. A análise desses dados e comparação com os da literatura (ARATANECHMUGE *et al.*, 2004; JEFFREYS & NUNEZ, vol.46,2016) foi possível determinar sua estrutura de PS-01 como sendo o lupeol,

um triterpeno comumente isolado de plantas e que apresenta atividade biológica, tais como: Anti-inflamatória, anticâncer, antimicrobiana, entre outras.

Já a substância **PS-02** foi identificada como β -sitosterol, que é um esteroide comumente isolado de plantas, sua estrutura foi confirmada pelo espectro de RMN ^1H , que mostrou sinal característico do hidrogênio da ligação dupla e de hidrogênio ligado ao carbono oxigenado, os quais são compatíveis com os da literatura para o β -sitosterol (ANDRADE, 2003).

Os extratos EHC-PS e frações exibiram atividade antioxidante frente aos métodos DPPH, ABTS e CAT, sendo as frações mais polares foram as mais ativas, apresentando o IC_{50} muito baixo em relação ao controle positivo usado em cada método testado. A eficiência de um antioxidante é dependente de sua capacidade de sequestrar os radicais livres (Sharma & Singh, 2013). Os compostos fenólicos são responsáveis pela transferência de hidrogênio que neutraliza a ação desses radicais (Brewer, 2011). A atividade antioxidante pode ser justificada pela presença de compostos fenólicos que foram identificados na análise fitoquímica preliminar do extrato. Bem como, pela presença de substâncias fenólicas nas frações mais polares (presença detectada em CCDC, revelada com FeCl_3) as quais, por reação radicalar, estabilizam o radical livre do DPPH, mostrada pela mudança de coloração e indicando atividade.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos testes fitoquímicos foram detectados metabólitos secundários que não foram estudados na literatura para espécies do gênero *Pseudobambax*, como alcaloides e saponinas, já a quantificação de flavonoides apresentou resultados significativos para o EHC-PS, sendo o primeiro estudo sobre essa classe para referida espécie.

A prospecção fitoquímica do extrato das cascas do caule de *P. simplicifolium*, através de técnicas cromatográficas permitiu o isolamento de dois constituintes químicos (**PS-01 e PS-02**), os quais tiveram suas estruturas elucidadas, após análise de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono 13 (RMN de ^1H e ^{13}C), como sendo o lupeol e β -sitosterol. Os extratos EHC-PS e frações exibiram a atividade antioxidante frente aos métodos DPPH, ABTS e CAT. Estes resultados estimulam a continuidade do estudo fitoquímico visando isolar as demais substâncias presentes.

REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. R., Alcalóides De Rutaceae: Química E Atividade Biológica. Tese de Doutorado, São Carlos, 2003. Disponível em: http://www.bdt.d.ufscar.br/htdocs/tedeSimplificado//tde_busca/arquivo.php?cod_Arquivo=440. Acesso em: 28 de Junho.

BABU, SAYYAD SIPAI; MADHURI, DASARI BINDU; ALI, SHAIK LIAKHAT . A pharmacological review of Urena lobata plant. **Asian J. Pharm. Clin. Res.** v. 9, p. 20-22, 2016.

BOVINI, M. G. Malvaceae s. str. na Reserva Rio das Pedras, Mangaratiba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia.** v. 61, p. 289-301, 2010.

BLOIS, M. Antioxidant Determinations by the use of a Stable Free Radical. *Nature*. v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BREWER, M.S. Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v.10, p.221-247, 2011. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2011.00156.x.

CHAVES, T. P.; SANTANA, C. P.; VÉRAS, G.; BRANDÃO, D. O.; FELISMINO, D. C.; MEDEIROS, A. C. D, TROVÃO, D. M. B. M. Seasonal variation in the production of secondary metabolites and antimicrobial activity of two plant species used in Brazilian traditional medicine. *Afr. J. Biotechnol.* v. 12, p. 847-853, 2013.

MAH, SIAU HUI; TEH, SOEK SIN; EE, GWENDOLINE CHENG LIAN. Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of *Sida rhombifolia*. *Pharm. Biology*, v. 55, p. 920-928, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014 *J. Nat. Prod.* v. 79, 629-661, 2016.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.L.; KRIZ, S. G.; VYVYAN, J. R.. Introdução à espectroscopia. 2º ed. São Paulo: Cengage Learning. 2015.

PAIVA, D. C. C.; SANTOS, C. A.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; THOMAZZI, S. M.; FALCÃO, D. A. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic extract from *Pseudobombax marginatum* inner bark from caatinga potiguar. *J. Ethnopharmacol.* v. 149, p. 416-421, 2013.

PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J. A química da família Bombacacea. *Quím. Nova*, v. 20, p. 627-630, 1997.

PIETRO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, v. 269, n. 2, p. 337-341, 1999.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.* v.26, p.1231-1237, 1999.

SHARMA, P.; SINGH, R.P. Evaluation of antioxidant activity in foods with special reference to TEAC method. *American Journal of Food Technology*, v.8, p.83-101, 2013. DOI: 10.3923/ajft.2013.83.101.

SHAIKH, SABA; JOSHI, Y. M.; KADAM, VILASRAO. Comparative study of anti-inflammatory activity of aqueous and methanolic extracts of *Hibiscus cannabinus* leaf (Malvaceae). *Intern. J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* v. 8, p. 64-68, 2016.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna *Quím. Nova*, v. 29, p. 326-337, 2006