

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA DA ESPÉCIE *Avicennia schaueriana*

Tathiane Maria Sales Martins¹, Brenda Dias de Almeida², Maria Auxiliadora Coelho Kaplan², Catharina Eccard Fingolo¹

¹Fundação Centro Universitário Estadual da Zona Oeste (UEZO)

²Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

ABSTRACT:

There is a growing demand for products obtained from natural sources and some industries have created own lines of products developed from raw materials found in Brazilian biodiversity. The objective was to study the chemistry of *Avicennia schaueriana* (Acanthaceae). The leaves of *A. schaueriana* were dried and shaved and then subjected to static maceration and extracted exhaustively with ethanol. The ethanolic extract was subjected to the liquid-liquid partition with organic solvents of increasing polarities, resulting in four distinct phases: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol. After extraction, the material was chromatographed (CC, TLC, GC-MS) to separate and analyze the results. GC-MS analysis (DB-5MS column, injector at 270°C, interface at 230°C, with a temperature ramp of 60 to 290°C, varying 10°C/min) allowed to verify the presence of diterpene phytol and of the α -amirine triterpene, which will have their antifungal potential analyzed.

Keywords: α -amirin, *Avicennia schaueriana*, GC-MS, phytol.

RESUMO:

Há uma crescente procura por produtos obtidos de fontes naturais e algumas indústrias têm criado linhas próprias de produtos desenvolvidos a partir de matérias-primas encontradas na biodiversidade brasileira. O objetivo deste trabalho foi estudar a química de uma espécie de Acanthaceae. As folhas de *Avicennia schaueriana* foram secas e rasuradas e, em seguida, submetidas à maceração estática e extraídas exaustivamente com etanol. O extrato etanólico foi submetido à partição líquido-líquido com solventes orgânicos de polaridades crescentes, resultando em quatro fases distintas: hexânica, diclorometânica, acetato de etila e butanólica. Após a extração, a fase hexânica passou por cromatografias (CC, CCD, CG-EM) afim de separar e analisar os resultados. A análise por CG-EM (coluna DB-5MS, injetor a 270°C, interface a 230°C, com rampa de temperatura de 60 a 290°C, variando 10°C/min) permitiu verificar a presença do diterpeno fitol e do triterpeno α -amirina, os quais terão sua potencialidade antifúngica analisada posteriormente.

Palavras-chave: α -amirina, *Avicennia schaueriana*, CG-EM, fitol

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais e a biodiversidade no Brasil

Indústrias farmacêuticas e de cosméticos já despertaram para o segmento chamado “produtos naturais”. Muitas delas têm procurado atender à demanda crescente do mercado, criando linhas próprias de produtos desenvolvidos a partir de matérias-primas encontradas na biodiversidade brasileira (Antunes, Pereira e Ebole, 2006).

Devido à diversidade de plantas em um país tropical como o Brasil, é muito comum que certas famílias botânicas não tenham a devida atenção científica em relação a outras. Tal

situação se dá, na grande maioria das vezes, por falta de conhecimento da existência dos táxons. Apesar de ser frequentemente encontrada em mangues, a família Acanthaceae tem poucos registros de atividades relacionadas à população humana para uso em medicamentos e herbicidas.

Uso de fungicidas e consequências

Entre os principais agentes de doenças infecciosas em plantas cultivadas estão os fungos fitopatogênicos, que possuem o alto potencial de causar epidemias devastadoras. Eles possuem estratégias para invadir facilmente os tecidos vegetais (Knogge, 1996).

Os fungicidas são usados extensivamente para o controle de doenças pós-colheita em frutas e legumes (Rampersad e Teelucksingh, 2012). No entanto, existe a preocupação de que o uso excessivo destes produtos químicos pode causar danos ao meio ambiente e aos seres humanos (Al-Samarrai et al., 2012).

Os pesticidas (fungicidas sintéticos) são comumente utilizados para controle dos fungos. Na maioria das vezes possuem em sua composição algumas substâncias organocloradas e, entre eles, o BHC (do inglês, Benzene Hexachloride). Tal organoclorado possui grande resistência à luz do sol, calor e pode permanecer no solo, sem se decompor totalmente, por cerca de cinco anos (BERBERT & CRUZ, 1984). E, infelizmente, esta mesma substância é apresentada em muitos casos, agressivos à saúde humana, segundo um estudo realizado em algumas áreas da Índia, onde a principal fonte de água é o Rio Ganges – altamente poluído com pesticidas agrícolas. Este trabalho revelou que todos os participantes que possuíam câncer gastrointestinal (o terceiro tipo de câncer mais comum nas regiões) possuíam altas concentrações biliares de certos organoclorados e, entre eles, o BHC (SHUKLA et al., 2001). Essa substância pode trazer malefícios à saúde humana, à animal e também às plantas.

Os diversos problemas causados pelos fungicidas sintéticos usados na agricultura têm elevado as buscas por métodos alternativos, seguros, viáveis e eficientes no controle de fungos fitopatogênicos (SILVA et al., 2010). Extratos vegetais e óleos essenciais têm sido usados como potentes biofungicidas e inseticidas naturais, cujos resultados alcançados têm-se mostrado promissores para a utilização prática no controle de diversos fitopatógenos (WALLER; BRIDGE, 2009).

Princípios ativos encontrados em plantas

Os extratos de plantas possuem

princípios ativos que, além de serem inofensivos ao meio ambiente por serem biodegradáveis, muitas vezes trazem resultados até mesmo superiores aos de produtos sintéticos na ação antimicrobiana (Miguel & Miguel, 1999; Stein et al., 2005). Além disso, é certo que, em comparação aos fungicidas sintéticos, produtos alternativos originados de plantas são utilizados há séculos, são de baixo custo, de fácil aquisição e uma alternativa para países em desenvolvimento (CHOWDURY; RAHIM, 2009).

A busca de pesticidas mais seguros, com menos toxicidade sobre o meio ambiente e os animais é um objetivo importante (Oliva et al., 2003).

Um levantamento bibliográfico realizado sobre todos os artigos científicos referenciados no Chemical Abstracts de 1907 até 2016 com o termo *Avicennia* mostrou poucas referências relacionadas com estudo fitoquímico, das quais a espécie *A. shaueriana* apresentou um único registro, evidenciando potencial antifúngico sobre o crescimento de fungos filamentosos do gênero *Avicennia* causando grandes perdas na qualidade e quantidade de frutos (Fandin & Young, 2015).

Gênero Avicennia

Os estudos sobre o gênero *Avicennia* mostraram a presença de iridoides glicosilados, flavonoides, diterpenos e naftoquinonas. A espécie *A. marina*, tem demonstrado atividade antiviral, antioxidante e alelopática. Por essa questão, *A. marina* tem sido utilizada para combater fungos patogênicos de raízes em quiabo e feijão (Fandin & Young, 2015). Este estudo foi extremamente importante para projetar possíveis atividades contra fungos da área médica também, levando em consideração a similaridade estrutural dos fungos de uma maneira geral.

O gênero *Avicennia* é comumente encontrado no país, no entanto, estudos com

abordagem química e atividade biológica são escassos.

Existem poucos trabalhos científicos registrados para a espécie *A. shaueriana*; as informações sobre os constituintes químicos e a farmacologia dessas plantas são escassas. Por isso, é extremamente interessante estudar espécies de Acanthaceae para detectar a presença de seus metabólitos especiais, consolidando e atualizando as bases de dados da nossa rica biodiversidade além de conhecer melhor suas funcionalidades biológicas.

O grande interesse neste estudo é descobrir novas substâncias e desenvolver novos produtos naturais com atividade antifúngica sem prejudicar a saúde humana e o próprio ambiente.

METODOLOGIA

Coleta e preparo do material vegetal

Folhas da espécie *Avicennia schaueriana* foram coletadas com a colaboração do professor Filipe de Oliveira Chaves, do Núcleo de Estudos em Manguezais (NEMA/UERJ).

O órgão vegetal foi seco em estufa, fragmentado manualmente e extraído por maceração estática com etanol, com renovação periódica de solvente. O extrato bruto etanólico obtido foi filtrado com papel de filtro e concentrado sob pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório, equipado com banho aquecedor, em temperatura controlada de 40°C.

Fracionamento do extrato por partição líquido-líquido

O extrato bruto etanólico de folhas obtido foi fracionado por partição líquido-líquido entre água:etanol (7:3) e os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol.

Cromatografia em Coluna (CC);

Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia com Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A fase hexânica foi submetida às técnicas de cromatografia em coluna para obtenção dos componentes, cromatografia em camada delgada para análise dos perfis químicos e cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para avaliação dos resultados. A análise final foi realizada em coluna DB-5MS, injetor a 270°C, interface a 230°C, com rampa de temperatura de 60 a 290°C, variando 10°C/min. As substâncias foram identificadas de acordo com o perfil de fragmentação no espectro de massas e comparadas ao banco de dados do aparelho e à literatura especializada. Na cromatografia em camada delgada, as placas desenvolvidas foram reveladas utilizando a visualização sob luz ultravioleta (254nm e 365nm) e borrifação com solução de ácido sulfúrico em etanol seguido de aquecimento em placa aquecedora.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análise dos perfis químicos das amostras obtidas

A cromatografia em coluna utilizando gel de sílica rendeu várias frações. Em alguns frascos foi observado a formação de cristais, que submetidos à CCD e, ao serem revelados física e quimicamente, mostrou a presença de uma única mancha. As frações que cristalizaram foram submetidas à Cromatografia com Fase Gasosa (CG) acoplada ao espectômetro de massas (EM). Uma das frações, eluída em hexano 100%, apresentou o resultado mostrado na Figura 1.

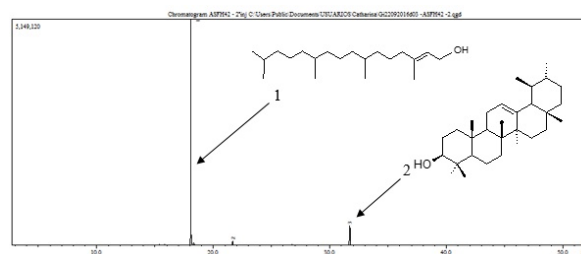


Figura 1: Cromatograma obtido por CG; 1: fitol (m/z 296; TR 18,19 min; 83,78%) e 2: α-amirina (m/z 426; TR 31,72 min; 16,21%).

A partir das Figuras 1, 2 e 3 observou-se a presença das substâncias: diterpeno fitol e triterpeno α -amirina. Ambas as substâncias possuem estudos publicados sobre a ação antifúngica em microorganismos como *Arpegillus*.



Figura 2: Espectro de massas do fitol ($C_{20}H_{40}O$; m/z 296).

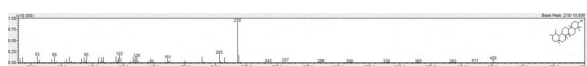


Figura 3: Espectro de massas da α -amirina ($C_{30}H_{50}O$; m/z 426).

Tendo os diterpenos a ação de selar e cicatrizar perfurações na planta, e os triterpenos a propriedade hemolítica de alterar a permeabilidade das membranas celulares da planta, ambos se auxiliam e são úteis em processos de proteção contra microrganismos, tal qual é desejada e referida na introdução deste trabalho.

CONCLUSÕES E EXPECTATIVAS

Pôde-se comprovar a presença de dois possíveis agentes antifúngicos em plantas da espécie *Avicennia schaueriana* como o diterpeno fitol e o triterpeno α -amirina.

O próximo passo do trabalho será estudar as outras frações, em buscas de novas substâncias e avaliar as propriedades antifúngicas, que serão realizadas no Laboratório de Estrutura de Superfície de Microorganismos I e II, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, UFRJ, em colaboração com as Profas.: Dra. Celuta Sales Alviano e Dra. Daniela Sales Alviano.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AL-SAMARRAI, G., Singh, H. and SYARHABIL, M. Evaluating eco-friendly

botanicals (natural plant extracts) as alternatives to synthetic fungicides. *Ann Agric Environ Med* 19, p. 673–676, 2012.

ANTUNES, A.; PEREIRA, Jr. N.; EBOLE, F. M.; Gestão em biotecnologia. Cap. “A biodiversidade brasileira”, p. 90, 2006.

BERBERT, P.R.F. & CRUZ, P.F.N., Níveis residuais de BHC (HCH) nos principais rios e lagos da região cacauieira sul da Bahia, Brasil. In: Encontro Nacional de Analistas de Resíduos de Pesticidas, Resumos, p.55. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1984.

CHOWDURY, M.N.A.; RAHIM, M.A. Integrated crop management to control anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) of mango. *Journal of Agriculture and Rural Development*, v. 7, n. 1 e 2, p.115-120, 2009.

FANDIN, K.M. & YOUNG, M.C.M. Antifungal potential of *Avicennia schaueriana* Stapf & Leech. (Acanthaceae) against *Cladosporium* and *Colletotrichum* species. *Letters in Applied Microbiology* 61, p. 50–57, 2015.

KNOGGE W. Fungal Infection of Plants. *Plant Cell*. Oct;8 (10) p. 1711–1722, 1996. MAIER, M. E. *Natural Products Reports*, 26, p. 1105-1124. 2009

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O.G. Desenvolvimento de fitoterápicos. São Paulo: Tecmedd, p. 115, 2004.

OLIVA, A., MEEPAGALA, K.M., WEDGE, D.E., HARRIES, D., HALE, A.L., ALIOTTA, G. and DUKE, S.O. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J Agric Food Chem* 51, p. 890–896, 2003.

RAMPERSAD, S.N. and TEELUCKSINGH,

,L.D. Differential responses of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. truncatum* isolates from different hosts to multiple fungicides based on two assays. *Plant Dis* 96, p. 1526–1536, 2012.

SHUKLA, V.K; RASTOGI, A.N; ADUKIA, T.K; RAIZADA, R.B; REDDY, D.C.S. & SINGH, S., Organochlorine pesticides in carcinoma of the gallbladder: a case-control study. *European Journal of Cancer Prevention*, v.10, p.153-156, 2001.

SILVA, M. B.; MORANDI, M. A. B.; PAULA JÚNIOR, T. J.; VENZON, M.; FONSECA, M. C. M. Uso de princípios bioativos de plantas no controle de fitopatógenos e pragas. *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 70-77, mar./abr. 2010.

WALLER, J. M.; BRIDGE, P. D. Recent advances in understanding disease of some tropical perennial crops. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). *Colletotrichum: Host specificity, Pathology, and host-pathogen interaction*. St. Paul, Minnesota: APS Press, 2 ed., cap.20, p. 337-345, 2009.