



ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *CHROMOLAENA LAEVIGATA* (LAM.) R.M. KING & H. ROB. (ASTERACEAE)

Darlon Irineu Bernardi¹ (PIBIC/CNPq/UEM), Rodolfo Bento Balbinot¹ (PIBIC/CNPq), Beatriz Pereira Moreno¹ (PG), Erica Benassi Zanqueta² (PG), Tania Ueda Nakamura² (PQ), Marta Regina Barrotto do Carmo³ (PQ), Maria Helena Sarragiotto¹ (Co-orientadora), Debora Cristina Baldoqui¹ (Orientadora), e-mail: dcbaldoqui@uem.br.

¹Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Química/Maringá, PR.

²Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

³Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia/Ponta Grossa, PR

Ciências Exatas e da Terra – Química

Palavras-chave: Asteraceae, *Chromolaena*, fitoquímica.

Resumo:

Chromolaena laevigata é um arbusto nativo do Brasil, sendo que o estudo da fração diclorometano levou ao isolamento de um composto, cuja estrutura está em fase de elucidação. Foram realizados ensaios de citotoxicidade e avaliação da atividade antioxidante, sendo que em ambas análises as frações acetato de etila e butanólica apresentaram melhores resultados.

Introdução

O gênero *Chromolaena* pertence à família Asteraceae, compreendendo 71 espécies, sendo que 45 destas são endêmicas do Brasil, e estão distribuídas por todo o território nacional. Na literatura são descritos deste gênero flavonóides (Barua 1978), ácidos graxos (Hahn, 2011), lactonas sesquiterpênicas, germacrenos, além de diterpenos de diversas classes, como labdanos e clerodanos (Gómez-Hurtado, 2011).

A espécie *Chromolaena laevigata*, é um arbusto, nativo do Brasil, sendo usualmente encontrada no Cerrado, Mata Atlântica, Amazônia e Caatinga (Oliveira, 2015). O primeiro estudo químico desta espécie levou ao isolamento de derivados isocaudanos, clerodanos e norsesquiterpenos (Misra e col., 1985). Portanto, constitui-se como objetivos deste projeto o reestudo desta espécie vegetal, buscando isolar metabólitos secundários ainda não descritos, bem como avaliar a citotoxicidade e a atividade antioxidante de *C. laevigata*.



Materiais e métodos

Estudo Químico

O material vegetal foi coletado no Parque do Guaterlá e identificado pela Prof^a. Dr^a. Marta Regina Barrotto do Carmo, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O material seco e moído (946,15g) foi extraído com metanol, a temperatura ambiente, por maceração exaustiva. Após a remoção do solvente sob vácuo em evaporador rotativo à temperatura de 33-35°C obteve-se o extrato bruto metanólico (118,29 g). O extrato bruto foi dissolvido em MeOH/H₂O 1:1 (500 mL) e submetido à partição com 3 x 150 mL de cada um dos solventes orgânicos: hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Após a remoção dos solventes utilizando um evaporador rotativo, obtiveram-se as frações: hexânica (19,81 g), diclometano (12,1 g), acetato de etila (15,98 g), butanólica (10,75 g), e hidrometanólica (30,25 g). Parte da fração diclorometano (11,0 g) foi submetida à uma coluna cromatográfica (CC), em Sílica Gel 60, utilizando misturas crescentes de hexano, acetato de etila a metanol como eluentes, sendo coletadas 12 frações, que após análise de seu perfil cromatográfico em CCD foram reunidas em 8 novas frações. A Fração **FDCM-10** (256,8 mg) foi submetida a uma CC em Sílica Gel, utilizando como fase móvel misturas crescentes em polaridade de hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Foram obtidas 35 frações que após análise em CCD, foram reunidas em 11 novas frações, sendo que a subfração **FDCM-10-28** levou ao isolamento de **CL-1** (10 mg). As demais frações avaliadas até o momento não levaram ao isolamento de nenhum composto puro.

Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada à partir da atividade sequestradora de radical livre do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) (EL-MASSRY e col., 2002). A absorbância foi determinada em espectrofotômetro UV-Visível (Varian, Carey 50), em 515,5 nm. A porcentagem de inibição do radical livre DPPH, foi calculada pela fórmula: $(\% = (A_0 - A_1) \times 100 / A_0)$, onde A_0 é a absorbância da solução de DPPH e A_1 a absorbância na presença das amostras.

Avaliação da Citotoxicidade

Placas de 96 poços foram preparadas com monocamada de células VERO e incubadas até confluência. Para os ensaios de citotoxicidade, as células foram lavadas com PBS e diluições seriadas dos extratos e frações foram preparados e adicionou-se 200 µL/poço de cada concentração, em triplicata, na placa, que foi incubada 72h, 37 °C e 5% CO₂. Após as 72h de incubação, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 50µl/poço de



ácido tricloroacético 10%, por 1h a 4°C. As placas foram então lavadas em água corrente e, após a secagem foram coradas com 50µL/poço de solução de Sulforodamina B 0,4%. Para suspensão do corante, foi utilizado 100µL/poço de Tris Base 10mM e, após agitação, as placas foram lidas em leitor de ELISA num comprimento de onda de 495nm. A citotoxicidade foi determinada de acordo com a fórmula: % destruição celular = 1 – (DO ttdo / DO cc), onde: DO ttdo é a densidade óptica dos tratados e DO cc é a densidade óptica do controle de células.

Resultados e Discussão

Identificação dos metabólitos isolados

O composto **CI-1** foi submetido a experimentos de RMN ¹H, ¹³C, HSQC e HMBC. A análise dos espectros mostrou que se trata de um diterpeno altamente oxigenado, entretanto sua estrutura ainda não foi completamente elucidada.

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das folhas de *C. laevigata* foi testada a partir do extrato bruto e demais frações obtidas da partição líquido-líquido. Os resultados são apresentados na tabela abaixo (**Tabela 1**):

Tabela 1: Resultado da atividade Antioxidante, frente ao DPPH.

Amostras	IC₅₀ (µg/mL)
Extrato Bruto	104,21 ± 1,80
Fração Hexânica	297,31 ± 0,46
Fração Diclorometano	211,80 ± 1,80
Fração Acetato de Etila	32,25 ± 1,05
Fração Butanólica	57,44 ± 2,58
Fração Hidrometanólica	168,60 ± 1,06

A fração que apresentou a melhor atividade antioxidante foi a fração acetato de etila. A fração butanólica também apresenta uma atividade razoável, quando comparamos com os valores obtidos para as demais frações, estas como apresentaram um valor de IC₅₀ superior à 100 µg/mL foram consideradas não ativas comparadas com o antioxidante padrão butilhidroxitolueno (BHT) que apresentou valor de IC₅₀ igual a 16,9 µg/mL.

Avaliação da Citotoxicidade

A análise da citotoxicidade foi realizada pelo método colorimétrico da Sulforodamina B, e os resultados encontram-se na **tabela 2**. Através do teste para a determinação de capacidade citotóxica de *C. laevigata*, observamos que as frações mais polares (acetato de etila,



butanólica e hidrometanólica), foram as menos tóxicas, devido os valores de CC_{50} serem altos, uma vez que este índice analisa concentração citotóxica capaz de destruir 50% das células.

Tabela 2: Avaliação da citotoxicidade de *C. laevigata*.

Amostras	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) \pm DP
Extrato Bruto	40,75 \pm 6,71
Fração Hexânica	19,2 \pm 2,55
Fração Diclorometano	27,5 \pm 2,12
Fração Acetato de etila	108,05 \pm 2,76
Fração Butanólica	116,1 \pm 2,40
Fração Hidrometanólica	123,35 \pm 3,18

Conclusões

O estudo fitoquímico de *Chromolaena laevigata* levou ao isolamento de um composto pertencente à classe dos diterpenos. A estrutura do composto ainda não foi completamente elucidada, entretanto foi possível concluir que se trata de um composto diferente dos descritos na literatura para esta espécie. As frações acetato de etila e butanólica apresentaram potente atividade antioxidante e baixa toxicidade, sendo que estas foram selecionadas para avaliação em ensaios antivirais.

Agradecimentos

Ao PIBIC/UEM, ao CNPq, Fundação Araucária, à organização do evento e à UEM.

Referências

BARUA, R. N.; SHARMA, R. P.; THYGARAJAN, G.; HERTZ, W. Flavonoids of *Chromolaena odorata*. **Phytochemistry**. V. 17, p. 1807-1808. 1978.

HANH, T. T. H.; HANG, D. T. T.; MINH, C. V.; DAT, N. T. Anti-inflammatory effects of fatty acids isolated from *Chromolaena odorata*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**. P. 760-763, 2011.

MISRA, L. N.; JAKUPOVIV, J.; BOHLMANN, F.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Isodaucane derivatives, norsesquiterpenes and cireodanes from *Chromolaena laevigata*. **Tetrahedron**, v. 41, n. 22, p. 5353-5356, 1985.

OLIVEIRA, C.T. *Chromolaena* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB16058>).