



ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DE *STEVIA LEPTOPHYLLA* SCH.BIP. EX BAKER (ASTERACEAE)

Darlon Irineu Bernardi¹ (PIBIC/CNPq/UEM), Rodolfo Bento Balbinot¹ (PIBIC/CNPq), 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 /Centro de Ciências Exatas.

²Centro de Ciências Básicas e da Saúde/Maringá, PR.

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

Ciências Exatas e da Terra – Química

Palavras-chave: *Stevia*, Asteraceae, atividades.

Resumo

Stevia leptophylla é um arbusto nativo do Brasil, sendo que o estudo da fração clorofórmica levou ao isolamento de uma lactona sesquiterpênica, do tipo guaianolideo. Foram realizados ensaios de citotoxicidade e avaliação da atividade antioxidante, sendo que em ambas análises as frações acetato de etila, butanólica e hidrometanólica apresentaram melhores resultados.

Introdução

O gênero *Stevia* pertencente a família Asteraceae, compreende aproximadamente 230 espécies (BRENDLE & TELMER, 2007). Na literatura são descritos deste gênero substâncias pertencentes às classes de lactonas sesquiterpênicas, derivados de longuipinenos, diterpenos lábdanos, além de flavonoides. Entretanto, o maior destaque deste gênero dá-se a uma espécie em específico, *S. rebaudiana*, que apresenta um diterpeno glicosilado do tipo caureno, com propriedades adoçantes (PHILLIPS, 1987).

S. leptophylla Sch.Bip. ex Baker é uma erva nativa do Brasil, todavia não é endêmica, sendo confirmada sua presença no sul do estado do Paraná (NAKAJIMA, 2015). Não há registros na literatura de estudos químicos ou biológicos desta espécie de *Stevia*, assim o objetivo deste trabalho é avaliar a composição de metabólitos secundários, bem como, a atividade antioxidante e citotoxicidade de *S. leptophylla*.

Materiais e Métodos

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 (g) foi extraído com metanol, a temperatura ambiente, por maceração exaustiva. Após a remoção do solvente em evaporador rotativo à temperatura de 33-35°C obteve-se o extrato bruto metanólico (4,5307 g). O extrato bruto foi dissolvido em MeOH/H₂O 1:1 (110 mL) e submetido à partição com 3 x 20 mL de cada um dos solventes orgânicos: hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Após a remoção dos solventes utilizando um evaporador rotativo, obtiveram-se as frações: hexânica (0,74 g), clorofórmica (1,68 g), acetato de etila (0,38 g), butanólica (0,57 g), e hidrometanólica (1,22 g). Parte da fração clorofórmica (1,0 g) foi submetida a uma separação em coluna cromatográfica CC, de Sílica Gel 60, utilizando misturas crescentes de hexano, clorofórmio, acetato de etila a metanol como eluentes, coletaram-se 138 frações. Entre as frações 36 a 45 correu precipitações de um sólido cristalino, que foram ressuspensos em acetato de etila e separados dos seus respectivos sobrenadantes, que após análise de seu perfil cromatográfico em CCD juntamente com as demais frações, foram reunidas em 11 novas frações. A fração codificada como **F.CHCl₃-7** (39,9 mg) forneceu o isolamento de **SL-1**.

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 A₀ é a absorbância da solução de DPPH e A₁ a absorbância na presença das amostras.

Avaliação da Citotoxicidade

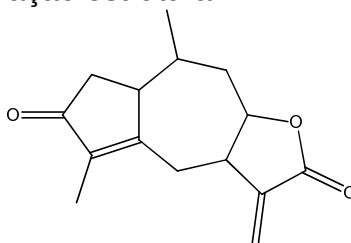
Placas de 96 poços foram preparadas com monocamada de células VERO e incubadas até confluência. Para os ensaios de citotoxicidade, diluições seriadas do extrato e frações foram preparados e adicionou-se 200 µL/poço de cada concentração, em triplicata, na placa, que foi incubada 72h, 37 °C e 5% CO₂. Após a incubação, o meio antigo foi removido, os poços lavados com 100 µL de PBS (tampão fosfato salino), e, posteriormente, adicionados 50 µL/poço de MTT (2 mg/mL), exceto no branco, incubando por 4h, ao abrigo da luz, em estufa 37°C. Em seguida, o reagente foi removido e foram adicionados 150 µL/poço de DMSO, inclusive no branco, e a leitura da placa realizada em leitor de ELISA, em 570 nm. Foi possível calcular o índice de seletividade, que é a razão entre o CC₅₀. A citotoxicidade foi determinada de acordo com a fórmula: $\% \text{ destruição celular} = 1 - (DO_{\text{tdo}} / DO_{\text{cc}})$; Onde: DO tdo é a densidade óptica dos tratados DO cc é a densidade óptica do controle de células

Resultados e Discussão



Metabólito isolado

A fração **F.CHCl₃-7** foi identificado como sendo lactona sesquiterpênica, com núcleo guaianolideo, 8-epixerantolideo, comumente denominada de **xerantolideo (SL-1)**, que através da comparação de seus dados espectroscópicos com dados da literatura (MISKI *et al*, 1987; SAMEK *et al*, 1977), permitiu a determinação estrutural.



SL-1

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das folhas de *S. leptophylla* 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	IC ₅₀ (µg/mL)
Extrato Bruto	87,52 ± 0,98
Fração Hexânica	365,03 ± 0,77
Fração clorofórmica	224,06 ± 1,05
Fração Acetato de Etila	22,16 ± 1,44
Fração Butanólica	52,37 ± 1,19
Fração Hidrometanólica	65,83 ± 0,84

Os melhores resultados foram obtidos para a fração fração acetato de etila, no qual apresentou IC₅₀ muito próximo numericamente ao do padrão BHT (t-butil-hidroxitolueno). A fração butanólica e extrato bruto apresentaram atividade antioxidante moderada, e as frações clorofórmica e hexânica foram consideradas inativas.

Citotoxicidade

O extrato bruto e frações foram submetidos aos ensaios de citotoxicidade e atividade antiviral frente à cepa KOS, em células VERO, empregando-se o método colorimétrico do MTT [Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio], descrito por Mosmann (1983), com modificações (**Tabela 2**).

Tabela 2: Citotoxicidade do extrato bruto e frações de *S. leptophylla* em células Vero

Frações ou EB	CC ₅₀ (µg/ml) ± DP
Fração clorofórmica	< 31,25
Fração hidrometanol	354,67 ± 18,23
Fração hexânica	71,67 ± 7,37
Extrato bruto	89,83 ± 1,04
Fração acetato de etila	201 ± 5,29
Fração butanólica	189,33 ± 9,07

Os valores encontrados no ensaio de citotoxicidade, apresentam apenas um valor de toxicidade considerável para a fração clorofórmica, tendo em vista que o extrato bruto e demais frações apresentaram CC₅₀ superior a 70 µg/ml.

Conclusões

O estudo fitoquímico de *Stevia leptophylla* levou ao isolamento de uma substância pertencente à classe dos guaianolideos, comumente encontrados em espécies do gênero *Stevia*. As frações acetato de etila, butanólica e hidrometanólica apresentaram atividade antioxidante e baixa toxicidade, sendo que estas foram selecionadas para avaliação em ensaios antivirais.

Agradecimentos

Ao PIBIC/UEM, ao CNPq, Fundação araucária, á organização do evento e á UEM.

Referências

BRANDLE, J., TELMER, P. Steviol glycoside biosynthesis. **Phytochemistry**, v. 68 , p. 1855–1863, 2007.

MISKI, M.; LUENGO, D. H.; MARRY, T.J. Guaiane Sesquiterpenes from *Decachaeta scabrella*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 199-200, 1987.

NAKAJIMA, J.N. *Stevia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB27400>. Acesso em: 15 Jul. 2015.

PHILLIPS, K.C. *Stevia*: steps in developing a new sweetener. Developments in Sweeteners 3. **Elsevier Applied Science**, p. 1–43, 1987.

SAMEK, Z.; HOLUB, M.; DROŽDŽ, B.; GRABARCZYK, H.; HŁADOŃ, B. Xerantholide - A new cytotoxically active sesquiterpenic lactone from *Xeranthemum cylindraceum* SIBTH. et SMITH. **Collection of Czechoslovak chemical communications**, v. 42, p. 2441, 1977.

