



## Estudo químico das frações polares e avaliação da atividade citotóxica de *Grazielia gaudichaudeana* (DC.) R.M.King & H.Rob. (Asteraceae)

Rodolfo Bento Balbinot<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Darlon Irineu Bernardi<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Érica Benassi Zanqueta<sup>2</sup>, Tânia Ueda Nakamura<sup>2</sup>, Marta Regina Barroto do Carmo<sup>3</sup>, Maria Helena Sarragiotto<sup>1</sup> (Coorientadora), Debora Cristina Baldoqui<sup>1</sup> (Orientadora)  
e-mail: dcbaldoqui@uem.br

Universidade Estadual de Maringá/ <sup>1</sup>Centro de Ciências Exatas / <sup>2</sup>Centro de Ciências Básicas da Saúde/Maringá, PR.

<sup>3</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa / Departamento de Biologia Geral / Ponta Grossa, PR

### Ciências Exatas e da Terra – Química

**Palavras-chave:** Asteraceae, *Grazielia gaudichaudeana*, Fitoquímica.

#### Resumo:

O gênero *Grazielia*, pertencente à família Asteraceae, compreende treze espécies, sendo que nove delas são endêmicas do Brasil. Existem na literatura relatos do isolamento de lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, triterpenos, flavonas e ácidos cinâmicos de espécies de *Grazielia*. O estudo químico da fração diclorometano levou ao isolamento de dois triterpenos e da fração acetato de etila foram isolados dois flavonoides. Foram realizados ensaios para verificação da atividade citotóxica de *G. gaudichaudeana*, sendo que as frações hidrometanólica, butanólica e acetato de etila foram as menos tóxicas frente a células Vero.

#### Introdução

O gênero *Grazielia*, pertencente à família Asteraceae, compreende treze espécies, sendo que nove delas são endêmicas do Brasil. O primeiro estudo químico de espécies deste gênero foi relatado em 1981 por Bohlmann, e descreve o isolamento lactonas sesquiterpênicas e diterpenos de *G. intermedia*, *G. dimorpholepsis* e *G. serrata*.

A espécie *Grazielia gaudichaudeana* é endêmica do Brasil, e esta distribuída nos estados de Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Da espécie *G. gaudichaudeana* foi relatado o isolamento de diterpenos, triterpenos e ácidos cinâmicos, sendo que não foi isolado lactonas sesquiterpênicas, uma classe de metabólitos comum neste gênero (Taleb, 1999).

Portanto, o reestudo de *G. gaudichaudeana* tem por objetivo buscar substâncias que ainda não foram descritas nesta espécie e avaliar a atividade citotóxica de seu extrato e frações.





## Materiais e Métodos

### *Isolamentos dos constituintes químicos*

O material vegetal foi coletado em Março de 2014 no Parque do Guaterlá e identificado pela Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marta Regina Barrotto do Carmo, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa. O material seco e moído (1155 g) foi extraído com etanol, a temperatura ambiente, por maceração exaustiva. Obteve-se o extrato bruto etanólico (76,10 g), sendo este submetido à partição líquido-líquido com hexano (F.HEX), diclorometano (F.DCM), acetato de etila (F.AE) e butanol (F.BuOH). Após a remoção dos solventes utilizando um evaporador rotativo, obtiveram-se as frações: F.HEX (28,45 g), F.DCM (19,03 g), F.AE (3,30 g), F.BuOH (3,00 g), e hidrometanólica (6,41 g).

Parte da fração diclorometano (F.DCM) (10,0 g) foi submetida a uma CC filtrante ( $\phi=5,0\text{cm}$  x  $h=20\text{cm}$ ), em sílica gel 60, utilizando como fase móvel um gradiente crescente de polaridade de clorofórmio e metanol. Coletaram-se 10 subfrações, que após análise de seu perfil cromatográfico em CCD foram reunidas em 7 novas frações. Sendo que a fração F.DCM-1 nos forneceu a mistura das substâncias codificadas como **GG-6** e **GG-7** (7,0 mg).

A fração F.DCM-3 (1,0 g) foi submetida a uma separação em CC ( $\phi=2,5\text{cm}$  x  $h=25\text{ cm}$ ), em sílica gel 60, os solventes clorofórmio, acetato de etila e metanol foram utilizados como fase móvel em um gradiente crescente de polaridade. Coletaram-se 41 subfrações, que foram reunidas em 16 frações de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD. A fração codificada como F.DCM-3-15 levou ao isolamento da substância codificada como **GG-8** (15,0 mg). Já a fração codificada como F.DCM-3-32 levou ao isolamento da mistura de substâncias codificadas como **GG-8** e **GG-10** (12,0 mg).

Outra fração analisada foi a F.DCM-4 (1,0 g), a qual foi submetida a CC ( $\phi=3,0\text{cm}$  x  $h=25\text{cm}$ ), em sílica gel 60, sendo usado como fase móvel clorofórmio, acetato de etila e metanol em gradiente crescente de polaridade. Coletaram-se 61 subfrações, que após análise em CCD foram reagrupadas em 24 novas frações. A fração F.DCM-4-23 (161,3 mg) foi submetida a uma nova separação por CC ( $\phi=1,5\text{ cm}$  x  $h=23\text{ cm}$ ), em sílica flash, sendo a fase móvel um gradiente crescente de polaridade de diclorometano, acetato de etila e metanol. Foram coletadas 34 subfrações, que de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD foram reagrupadas em 12 frações. A fração codificada como F.DCM-4-23-17 levou ao isolamento da substância codificada como **GG-9** (7,4 mg).

Parte da fração acetato de etila (F.AE) (1,00 g) foi submetida a uma CC ( $\phi=2,00\text{ cm}$  x  $h=46,0\text{ cm}$ ), em Sephadex LH-20, utilizando como fase móvel metanol. Coletaram-se 47 subfrações, que após análise de seu perfil cromatográfico em CCD foram reunidas em 11 novas frações. Sendo que a fração F.AE-28 (35,0 mg) nos forneceu o isolamento da substância codificada como **GG-11**. A fração F.AE-34 (38,1 mg) foi ressuspendida e precipitada com metanol, sendo que a subfração





precipitada nomeada como F.AE-34ppt (12,0 mg) nos forneceu a substância codificada como **GG-12**.

### *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 preparadas e adicionou-se 200 µL/poço de cada concentração, em triplicata, na placa, que foi incubada 72h, 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. 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<sub>ttdo</sub> / DO<sub>cc</sub>), onde: DO<sub>ttdo</sub> é a densidade óptica dos tratados e DO<sub>cc</sub> é a densidade óptica do controle de células.

## **Resultados e Discussão**

### *Identificação dos metabólitos isolados*

Os compostos **GG-6** e **GG-7** foram identificados como triterpenos através da análise de seus dados de RMN mono e bi-dimensionais e comparações com dados da literatura. O composto **GG-6** foi caracterizado como sendo o ácido oleanóico (Mendes, 1999) e o composto **GG-7** foi identificado como o ácido betulínico (Siddiqui, 1988). Já os compostos codificados como **GG-8**, **GG-9** e **GG-10** ainda encontram-se em fase de determinação estrutural.

O composto codificado como **GG-11** foi identificado com base nos dados de RMN em comparação com a literatura (Markham, 1978) como sendo um flavonoide, o Canferol-3-O-β-D-glucosídeo. Já a substância codificada como **GG-12** foi identificados através das análises dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, e em analogia com os dados da literatura (Agrawal, 1989), como sendo também um flavonoide, a pedalitina.

### *Avaliação da citotoxicidade*

Os resultados obtidos através do ensaio para verificação da atividade citotóxica dos extratos e frações obtidos das partes aéreas de *G. gaudichaudiana* estão listados na **Tabela 1**. Dentre as frações analisadas de *Grazielia gaudichaudiana*, as frações aquosa, butanol e acetato de etila foram menos tóxicas para as células Vero.





**Tabela 1:** Citotoxicidade do extrato bruto e frações de *G. gaudichaudiana* em células Vero

<b>Amostra</b>	<b>CC<sub>50</sub> (µg/ml) ± DP</b>
Extrato Bruto	64,2 ± 15,1
Fração Hexânica	28,0 ± 2,9
Fração Diclorometano	45,4 ± 12,8
Fração Acetato de etila	99,0 ± 19,5
Fração Butanólica	114,0 ± 10,7
Fração Hidrometanólica	121,4 ± 10,0

CC<sub>50</sub> = Concentração capaz de destruir 50% da monocamada de células Vero.  
Número de experimentos independentes (realizados em triplicata): 03

## Conclusões

O estudo das frações diclorometano e acetado de etila das partes aéreas de *G. gaudichaudiana* levou ao isolamento de dois triterpenos, sendo estes descritos pela primeira vez no gênero, e dois flavonoides que estão sendo relatados pela primeira vez nesta espécie vegetal, além de três compostos que encontram-se em fase de determinação estrutural. Quanto à avaliação da citotoxicidade de *G. gaudichaudiana*, os testes demonstraram que as frações hidrometanólica, e butanólica apresentam uma menor toxicidade as células Vero, e por sua vez foram selecionadas para a realização de testes antivirais.

## Agradecimentos

Ao PIBIC/UEM, ao CNPq, Fundação Araucária, à organização do evento e à Universidade Estadual da Maringá.

## Referências

BOHMANN, F.; ZDERO, C.; KING, R. M.; ROBINSON, H. Germacranolides, a guaianolide with a β-lactone ring and further constituents from *Grazielia* species. **Phytochemistry**, v. 20, n. 5, p. 1069-1075, 1981.

MARKHAM, K. R.; TERNAI, B.; STANLEY, R.; GLIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III. **Tetrahedron**, 34, 1389-1397, 1978.

MENDES, C. C.; CRUZ, F. G.; DAVID, J. M.; NASCIMENTO, I. P.; DAVID, J. P. Triterpenes esterified with fatty acid and triterpene acids isolated from *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**. 22, 185-188, 1999.

SIDDIQUI, S.; HAFEEZ, F.; BEGUM, S.; SIDDIQUI, B. S. Oleanderol, a new pentacyclic triterpene from the leaves of *Neurium oleander*. **Journal of Natural Products**. 51, 2, 229-233, 1988.

TALEB, S. H.; OLIVEIRA, D. C. R.; LOPES, J. L. C. Constituents of *Grazielia gaudichaudiana* (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, n. 5, p.





547-549, 1999.



**FUNDAÇÃO  
ARAUCÁRIA**



**PARANÁ**  
GOVERNO DO ESTADO  
Secretaria da Ciência, Tecnologia  
e Ensino Superior