

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA, QUANTIFICAÇÃO DOS LABDANOS E ESTUDO DE DESREPLICAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *AUSTROEUPATORIUM INULIFOLIUM*

Maria Eduarda Vieira de Souza (PIBIC/FA/Uem), Francielli Alana Pereira (PG), Anderson Valdiney Gomes Ramos (PG), Marta Regina Barroto do Carmo (PQ), Tatiana Shioji Tiuman (PQ), Maria Helena Sarragiotto (PQ), Debora Cristina Baldoqui (Orientadora), e-mail: dcbaldoqui@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Exatas /
Departamento de Química / Maringá-PR

Ciências Exatas e da Terra – Química – Química Orgânica

Palavras-chave: Labdanos, *Austro eupatorium*, desrepliação

Resumo:

O estudo da espécie de *Austro eupatorium inulifolium*, pertencente à família *Asteraceae* foi iniciada em 2019, durante o desenvolvimento do projeto PIBIC nº 2960 de 2019, no qual foi realizada a partição do extrato bruto e o levantamento bibliográfico sobre a espécie. Sendo assim, no presente trabalho realizou-se otimizações para a quantificação dos diterpenos encontrados e análise de substâncias por desrepliação, além de submeter o extrato bruto aos ensaios biológicos.

Introdução

A técnica de desrepliação é fundamental na triagem de extratos brutos e estudos em metabolômica, fornecendo uma identificação rápida de substâncias conhecidas, acelerando as pesquisas quimiosistemáticas e fracionamento guiados por bioatividade para a descoberta de novas moléculas e seus derivados em diferentes matrizes de produtos naturais (HUBERT *et al.*, 2017).

Austro eupatorium inulifolium (Kunth) R.M. King & H. Rob. (basônimo *Eupatorium inulifolium*), objeto de estudo neste trabalho, é nativa do Brasil, sendo encontrada nos estados do Pará, Alagoas, Bahia, Sergipe, e em toda região Centro-Oeste, Sudeste e Sul do Brasil. (ALMEIDA, 2020). Diterpenos do tipo labdano são os principais metabólitos especializados descritos desta espécie.

Materiais e métodos

Análise do extrato bruto por HPLC-DAD

O extrato bruto de *Austro eupatorium inulifolium* (2 mg) foi solubilizado em metanol (1 mL), filtrado e submetido a diferentes condições cromatográficas

em CLAE-DAD, utilizando uma coluna Supelcosil C18 (25 cm x 4,6 mm, 5 µm), a fim de determinar a melhor otimização para a quantificação dos labdanos do extrato. Para essa análise utilizou-se um volume de injeção de 10 µl para cada condição. Os cromatogramas foram registrados com detector DAD em varredura de 190-500nm, sendo 220nm o comprimento de onda escolhido para a obtenção dos cromatogramas (Tabela 1).

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas para separação dos constituintes químicos de *A. inulifolium*

| Condição | Vazão (mL/min) | Fase móvel | Eluição |
|----------|----------------|-------------------------------|---|
| 1 | 0,8 | H ₂ O (A)/MeOH (B) | 40%(B) → 70%(B) → 70%(B) → 100%(B) 10' 10' 5' |
| 2 | 0,6 | H ₂ O (A)/MeOH (B) | 40%(B) → 70%(B) → 70%(B) → 100%(B) 10' 10' 5' |
| 3 | 0,8 | H ₂ O (A)/ACN(B) | 40%(B) → 70%(B) → 70%(B) → 100%(B) 10' 10' 5' |
| 4 | 0,8 | H ₂ O (A)/ACN(B) | 20%(B) → 40%(B) → 40%(B) → 100%(B) 10' 10' 5' |
| 5 | 0,6 | H ₂ O (A)/ACN(B) | 30% → 40% → 40% → 100% 10' 15' 5' |
| 6 | 0,8 | H ₂ O (A)/ACN(B) | 20%(B) → 30%(B) → 30%(B) → 40%(B) → 100%(B) 10' 10' 10' 5' |
| 7 | 0,8 | H ₂ O (A)/MeOH (B) | 45% MeOH |
| 8 | 0,8 | H ₂ O (A)/MeOH (B) | 50% MeOH |
| 9 | 0,8 | H ₂ O (A)/ACN(B) | 20% ACN |
| 10 | 0,8 | H ₂ O (A)/ACN(B) | 25% ACN |
| 11 | 0,8 | H ₂ O (A)/ACN(B) | 30% ACN |

Desrepliação do extrato bruto de *A. inulifolium* por UHPLC-HRMS/MS

O extrato bruto foi inicialmente solubilizado em metanol (2 mg/mL), em seguida filtrado, centrifugado e foi submetido à análise em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (UHPLC) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com analisador quadrupolo-tempo de voo (Q-tof) e uma fonte de ionização por electrospray (ESI), em modo positivo e negativo. As separações cromatográficas foram realizadas em uma coluna Symmetry LC18 XR-ODS III (75 x 2,0 mm, 1,6 µm), e como fase móvel utilizou-se um gradiente de acetonitrila e água. Os dados obtidos foram também introduzidos e processados na plataforma do *Global Natural Products Social Networking* - GNPS a fim de organizar os espectros de massa (MS/MS) em redes moleculares de acordo com as similaridades espectrais e os perfis de fragmentação, buscando auxiliar na etapa desrepliação (WANG *et al.* 2016).

Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato bruto e frações de *A. inulifolium* foi realizada pelo método de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2012) por microdiluição seriada em microplaca de 96 poços, contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus*

(INCQS 00003), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Salmonella enteritidis* (ATCC 13076). A CIM foi determinada como a menor concentração de amostra capaz de inibir o crescimento microbiano visível.

Resultados e Discussão

A partir das otimizações realizadas com gradientes exploratórios e isocráticos, como mostrado na tabela 1, foi possível analisar seus respectivos cromatogramas.

O cromatograma mostrado na figura 1, que corresponde a condição com fase móvel de H₂O/ACN com eluição de 30% ACN e fluxo 0,8 mL/min, apresentou a melhor condição entre as demais, pois foi possível observar uma melhor separação entre os picos. Porém essa separação não foi ideal para os labdanos serem quantificados.

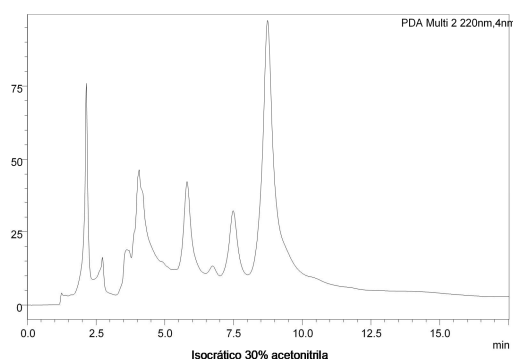


Figura 1 – Cromatograma obtido após a injeção do extrato bruto. Condição de análise: H₂O/ACN, com 30% de ACN. Fluxo: 0,8 mL/min.

Ao analisar a rede molecular obtida no modo positivo de ionização, observou-se a presença de uma família molecular principal (A) (Figura 2), sugerindo a presença de substâncias da classe de terpenoides no extrato. No modo negativo, observou-se a presença de 3 famílias moleculares (B D) (Figura 2) com compostos anotados pela biblioteca do GNPS, indicando a presença de flavonoides (O-glicosilados e agliconas) e ácidos fenólicos. Contudo, a análise de desreplicação do extrato bruto de *A. inulifolium* resultou na identificação putativa de 13 substâncias até o momento, sendo 6 diterpenos do tipo labdano, além de 6 flavonoides (rutina, isoquercitrina, astragalina, canferol-3-O-rutinosídeo, 4'-O-metilescutelarina e luteolina), e 1 ácido fenólico (ácido clorogênico). A identificação foi realizada com base no padrão de fragmentação dos compostos, erro de massa e comparação com dados da literatura. Todas as substâncias identificadas apresentaram erro de massa inferior a 10 ppm.

O extrato bruto de *A. inulifolium* apresentou atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, com CIM de 0,62 e 2,50 mg/mL, respectivamente. A fração diclorometano promoveu a inibição de *S. aureus* na CIM de 1,25 mg/mL.

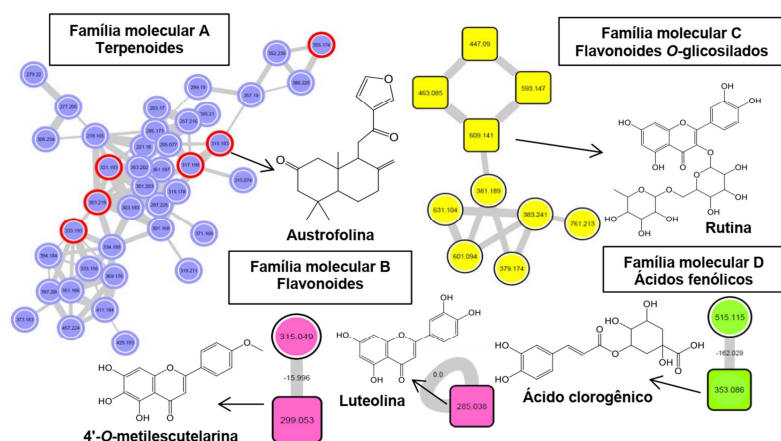


Figura 2: Parte da rede molecular contendo as principais famílias moleculares identificadas na análise de desreplcação do extrato bruto de *A. inulifolium* utilizando a plataforma GNPS.

Conclusões

Apesar de terem sido estabelecidas várias condições para a quantificação dos labdanos, não foi possível realizá-la, sendo necessário estabelecer novas otimizações e obter uma condição efetiva. A desreplcação do extrato bruto de *A. inulifolium* resultou na identificação putativa de 13 substâncias. Além disso, os ensaios mostraram que o extrato bruto e a fração diclorometano apresentaram moderada atividade antimicrobiana.

Agradecimentos

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

Referências

ALMEIDA, G.S.S.; GROSSI, M.A. **Austro eupatorium inulaefolium** in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB26850>>. Acesso em: 24 Ago. 2021.

Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI. (2012). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: Approved standard (9th ed.). Wayne, PA, USA: CLSI.

HUBERT, J.; NUZILLARD, J. M.; RENAULT, J. H. Dereplication strategies in natural product research: How many tools and methodologies behind the same concept?. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 1, p. 55–95, 2017.

Wang MX, Carver JJ, Phelan VV, et al. (2016). Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. **Nat Biotechnol** 34(8):828–837.