

Estudo químico das frações polares e avaliações antifúngica e alelopática dos frutos de *Myrcia subcordata* (Myrtaceae), uma espécie nativa do Cerrado Paranaense.

João Luiz Zampiroli dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Silvana Maria de Oliveira (Orientador). E-mail: ra107114@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Exatas, Maringá, PR

1.06.01.05-8 Química dos Produtos Naturais

Palavras-chave: *Myrcia*, estudo fitoquímico, atividades biológicas.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivos o estudo fitoquímico das frações polares dos frutos de *Myrcia subcordata*, bem como as avaliações das atividades antifúngica e alelopática do extrato bruto e suas frações. A investigação fitoquímica resultou no isolamento do ácido-5-O-cafeoilquínico e 4,5-O-dicafeoilquínico, além de uma mistura dos isômeros de glicose, os quais foram identificados com base nos seus respectivos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C . O extrato bruto e as frações foram submetidos a avaliação da atividade alelopática. Nestes bioensaios, a fração hexânica deteve o melhor resultado inibindo totalmente a germinação das sementes de *Digitaria insularis* na concentração de 0,2 mg/mL. O potencial antifúngico dos frutos foi avaliado frente *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis*, dentre elas a que apresentou maior susceptibilidade antifúngica pelos frutos de *M. subcordata* foi a *C. glabrata*, apresentando para a fração acetato de etila CIM de $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ sendo o menor CIM, além de apresentar CFM de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Myrcia* têm sido frequentemente utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças gastrointestinais, infecciosas e hemorrágicas, além de serem empregadas como antiglicêmica, anti-inflamatória e analgésica. Para as espécies do gênero é descrito a ocorrência de flavonoides e acetofenonas, hidroxiketona cíclica, triterpenos e um esteroides. No Brasil existe uma grande variedade de espécies de frutos que possuem potencial nutricional desconhecido e que podem ser de grande interesse científico e econômico. Muitos desses frutos ainda são pouco consumidos *in natura* ou na forma de produtos derivados. A família Myrtaceae apresenta uma diversidade de espécies frutíferas pouco estudadas e apresentam frutas que podem ser uma fonte potencial de nutrientes

MATERIAIS E MÉTODOS

Os frutos foram secos em temperatura ambiente, triturados em moinho de facas perfazendo uma massa de 871 g. O material moído foi submetido ao processo de maceração empregando para extração metanol a frio (MeOH) (7 X de 600 mL). O extrato bruto metanólico (EB) resultante foi concentrado em evaporador rotativo, a 40 °C, obtendo-se 112 g de extrato. Parte do EB (59,92 g) de *M. subcordata* foi solubilizado em MeOH:H₂O 1:2 e submetido a uma partição líquido-líquido com solventes orgânicos de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio e acetato de etila). Deste processo foram obtidas as frações hexânica (FH 8,09 g), clorofórmica (FC 7,13 g), acetato de etila (FAC 5,34 g), e a remanescente aquosa (FHM 29,87 g). Parte da fração FAC (2,68 g) foi submetida a uma filtração em coluna de Sephadex LH-20 (h= 17 cm; Ø= 2 cm), utilizando MeOH como eluente de modo isocrático. A partir deste fracionamento, foram coletadas 13 novas subfrações de acordo com seu perfil cromatográfico. A subfração MSAc6 apresentou-se como sólido amorfo de cor castanho nomeado como a substância MS2 (108,3 mg) e a subfração FAC13 apresentou-se também como sólido amorfo de cor castanho sendo nomeado como a substância MS1 (90 mg). A fração FHM (5 g) foi submetida a repetidas lavagens com acetona, sendo obtida a substância MS3 (10 mg). Os compostos isolados foram submetidos à análise de ressonância magnética nuclear.

Estudo do potencial alelopático: Os bioensaios de germinação foram realizados para as amostras nas concentrações de 0,05; 0,10; 0,20 e 0,40 mg/mL. As sementes de *Digitaria insularis* (capim amargoso) foram dispostas sobre papel de filtro em placas de Petri (25 sementes). As placas foram umedecidas com 6 mL das soluções aquosas das amostras de *M. subcordata*, nas quais foram mantidas em câmara de germinação a 35 °C durante 72 h. As contagens das sementes germinadas foram realizadas a cada 24 horas e após todo o período de incubação. Neste experimento foram determinados os seguintes parâmetros: Porcentagem de Germinação (%G), Tempo Médio de Germinação (TMG) e Índice de Velocidade de Germinação (IVG).

Estudo da atividade antifúngica: O EB e as frações foram submetidos a avaliação da atividade antimicrobiana segundo metodologia descrita por Côrrea *et al.* 2020, a partir de testes de micro diluição em caldo, de acordo com a padronização de acordo com CLSI (*Clinical Laboratory Standards Institute*), e com o documento M27-A3 (2008) para as leveduras com algumas modificações para produtos naturais. Foram avaliadas 10 concentrações diferentes, variando de 1000 µg mL⁻¹ a 1,95 µg mL⁻¹. Neste estudo foram empregadas células planctônicas das cepas de referência originária da American Type Culture Collection (ATCC) *Candida albicans* (ATCC 90028) *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. tropicalis* (ATCC 750), disponível na Micoteca do Laboratório de Micologia Médica da UEM, sendo estabelecidos os parâmetros de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Foi empregado o itraconazol como controle positivo e os resultados foram interpretados de acordo com Morales *et al.* 2008.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Elucidação estrutural dos isolados: as substâncias **MS1** e **MS2** foram isoladas da fração FAC como sólido amorfo acastanhado. Através de análises espectroscópicas

de RMN e comparações com dados da literatura, essas substâncias foram caracterizadas como os ácidos 5-O-cafeoilquínico e 4,5-O-dicafeoilquínico respectivamente. No espectro de RMN de ^1H para **MS1** foram observados sinais de uma unidade cafeoila como dupletos em δ_{H} 6,28 (H-8') e 7,58 (H-7') característicos de acoplamentos *trans* ($J= 15,9$ Hz) do sistema carboxílico- α,β -insaturado, e ainda sinais correspondentes ao anel aromático 1,3,4-trissubstituído em δ_{H} 7,03 (H-2') 6,86 (H-5') e 6,32 (H-6'). O grupo quínico foi caracterizado pelos sinais de hidrogênios metilênicos de δ_{H} 1,98 a 2,18 (H-2 e H-6) e oximetínicos em δ_{H} 4,16 (*d*, $J= 3$ Hz, H-3), 3,70 (*dd*, $J=10,0$ e $J=3,0$ Hz, H4) e 5,36 (*ddd*, $J=10,0$; 10,0 e 4,2 Hz, H-5). No espectro de ^{13}C foi possível verificar as carboxilas em δ_{C} 169,2 e 180,9 da unidade cafeoila e do grupo quínico. A análise de RMN de ^1H de **MS2** apresentou 4 dupletos referentes a hidrogênios olefínicos em acoplamentos *trans* ($J= 16$ Hz) em δ_{H} 7,58 e 6,26 (H7' e H8') e em δ_{H} 7,50 e 6,18 (H7'' e H8''), de dois duplos dupletos em δ_{H} 6,89 e 6,93 ($J= 7,8$ e 2,1 Hz H6' e H6'') e dos dupletos em δ_{H} 7,03 e 7,05 ($J= 2,1$ Hz H2' e H2'') e em δ_{H} 6,77 e 6,74 ($J= 7,8$ Hz H5' e H5'') correspondentes a dois grupos cafeoila. Além disso, foi observado presença de sinais de hidrogênios oximetínicos em δ_{H} 5,10 (*dd*, $J= 2,7$ Hz, H4), 5,65 (*m*, H5) e 4,38 (*m*, H3) e ainda, sinais compreendidos na faixa de δ_{H} 2,00 a 2,30 de hidrogênios metilênicos correspondente a uma unidade de ácido quínico. A confirmação dos grupos cafeoila e do esqueleto do ácido quínico foi baseado nos espectros de RMN de ^{13}C , especialmente, pelos sinais para dois grupos carboxila das unidades cafeoila em δ_{C} 168,6 e 168,4, do grupo carboxila em δ_{C} 178,4, de dois carbonos metilênicos em δ_{C} 40,1 (C-2) e 38,5 (C-6); de um carbono não hidrogenado em δ_{C} 76,3 (C-1) e três carbonos metínicos em δ_{C} 70,0 (C-3), 76,5 (C-4) e 69,3 (C-5). A substância **MS3** foi isolada da fração MSHM como um sólido amorfo branco. Através dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C de **MS3** foi possível observar sinais característicos de carbonos carbinólicos e anoméricos correspondentes a mistura de açúcares. A partir de estudos de análises de açúcares em extratos ou sucos de frutos já descritos na literatura, foi possível identificar a glicose e frutose em anéis de 5 e 6 membros para a mistura **MS3**. Os sinais característicos de C1 de isomerídeos de glicose foram observados em δ_{C} 96,9 (β -D-glucopiranoose), δ_{C} 92,7 (α -D-glucopiranoose), δ_{C} 101,9 (β -D-glucofuranose) e δ_{C} 98,4 (α -D-glucofuranose) (Chauvin *et al.* 1994). Com relação aos isomerídeos da frutose, os sinais em δ_{C} 64,9 e 63,3 foram atribuídos a β -D-frutofuranose e α -D-frutofuranose, respectivamente (Kimura *et al.* 2011)

Estudos da Atividade Alelopática: Os ensaios de atividade alelopática foram realizados para o EB e frações dos frutos de *M. subcordata* para *Digitaria insularis*, uma espécie considerada infestante nas lavouras, principalmente de soja e milho. O EB apresentou atividade alelopática como observado nos parâmetros de PG de 7,00%, TMG de 2,58 dias e IVG de 0,56 plântulas/dia na concentração de 0,2 mg/mL. Para as frações, os melhores resultados foram observados para as frações apolares que apresentaram inibição de crescimento. Os resultados mais promissores foram para a fração FH que inibiu totalmente a germinação das sementes de *D. insularis* na concentração de 0,2 mg/mL. Para a fração FC o resultado foi similar que inibiu totalmente a germinação na maior concentração (0,4 mg/mL). As frações polares FAc e FHM apresentaram atividade moderada nas maiores concentrações (0,4 mg/mL), observados pelos parâmetros PG- 7,00%;

TMG- 3,00 dias e IVG- 0,44 plântulas/dia e PG- 16,00%; TMG- 3,29 dias e IVG- 1,31 plântulas/dia respectivamente.

Estudo da atividade antifúngica: Dentre as três linhagens de *Candida* avaliadas, a que apresentou maior susceptibilidade antifúngica pelos frutos de *M. subcordata* foi a *C. glabrata*, em que a FAc que apresentou CIM de $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$ sendo o menor CIM, além de apresentar CFM de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ classificado portanto, como potente atividade (potente atividade: $\text{CIM} \leq 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). A fração FHM apresentou o 2º menor CIM, sendo $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$, e CFM de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. glabrata* classificado então, como potente atividade também. No EB ambas as linhagens de fungos apresentaram sensibilidade significativa, sendo $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de CIM para *C. albicans* e *C. tropicalis* e CFM de $15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. glabrata*. Para as frações apolares, com exceção da cepa de *C. glabrata* na fração FC com CIM de $31,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ que demonstrou potente atividade, os ensaios para CIM e CFM das frações FC e FH apresentaram moderada atividade para ambas as cepas.

CONCLUSÕES

O estudo químico das frações polares dos frutos de *M. subcordata* levou ao isolamento do ácido-5-O-cafeoilquinico e 4,5-O-dicafeoilquinico, além dos isômeros de glicose β -D-glucopiranosose, α -D-glucopiranosose, β -D-glucofuranose e α -D-glucofuranose. Por meio da avaliação da atividade alelopática do extrato e frações verificou-se que as amostras possuem capacidade de inibir o crescimento de *D. insularis* sendo os melhores resultados na fração hexânica. Para atividade antifúngica os frutos de *M. subcordata* demonstraram resultados mais pronunciáveis na fração acetato de etila frente *C. glabrata*, sendo classificado como potente atividade antifúngica.

AGRADECIMENTOS

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, Fundação Araucária, Universidade Estadual de Maringá e ao grupo de pesquisa Fitosin.

REFERÊNCIAS

CORRÊA, J. L.; VEIGA, F. F.; JARROS, I. C.; COSTA, M. I.; CASTILHO, P. F.; DE OLIVEIRA, K. M. P.; ROSSETO, H. C.; BRUSCHI, M. L.; SVIDZINSKI, T. I. E.; NEGRI, M., **Propolis extract has bioactivity on the wall and cell membrane of *Candida albicans***. Journal Of Ethnopharmacology, v. 256, p. 112791, 2020.

Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola LA. **Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile**. Molecules. 2008;13(4):790-94.

Kimura, H.; Nakahara, M.; Matubayasi, N. **In situ kinetic study on hydrothermal transformation of D-glucose into 5-hydroxymethylfurfural through D-fructose with C-13 NMR**. J. Phys. Chem. A 2011, 115, 14013–14021.

32º Encontro Anual de Iniciação Científica
12º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



23 e 24 de Novembro de 2023

Chauvin, M.F.; Megninchanet, F.; Martin, G.; Lhoste, J.M.; Baverel, G. **The rabbit kidney tubule utilizes glucose for glutamine synthesis—A C-13 Nmr-study.** J. Biol. Chem. 1994, 269, 26025–26033.