

1.06.01 - Química / Química Orgânica.

## ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA DO EXTRATO EM DICLOROMETANO DAS FOLHAS DE *Deguelia costata* (LEGUMINOSAE).

Rebeca Lopes Santos<sup>1\*</sup>, Juliana Medrado Ribeiro Figueiredo<sup>1</sup>, Lilian da Silva Miguez<sup>2</sup>, Lourdes Cardoso de Souza Neta<sup>3</sup>

1. Licenciada em Química pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB - Campus I)
2. Mestra em Química Aplicada pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB - Campus I)
3. Professora Doutora da UNEB (Campus I) – Curso de Licenciatura em Química/ Orientadora

### Resumo

A *Deguelia costata* é uma espécie remanescente da Mata Atlântica, pertence à família Fabaceae, subfamília Papilionoideae, seção *Multiovulis* do gênero *Deguelia*. A presença majoritária de isoflavonoides nas espécies de *Deguelia*, como derivados de 4-hidroxi-3-fenilculmarinas e de isoflavonas, são descritos na literatura. Algumas destas substâncias apresentam propriedades antioxidantes, antifúngicas e antibacterianas, dentre outras. Neste contexto, a continuação do estudo fitoquímico do extrato em diclorometano das folhas de *D. costata* foi proposto neste trabalho, juntamente com a avaliação das atividades antibacteriana e antifúngica de suas frações, pelo método de microdiluição em caldo, a fim de determinar seus efeitos microbicidas e/ou microbiostáticos frente a nove microrganismos. A fração mais promissora quanto a atividade antimicrobiana foi a F5 contra *Salmonella choleraesuis* e *Cândida glabrata* com valor de concentração inibitória mínima de 500 µg. mL<sup>-1</sup> para ambos. Além disto, o estudo fitoquímico resultou na identificação da substância 4'-O-metilalpinum isoflavona em algumas frações.

**Palavras-chave:** isoflavonoides; microdiluição em caldo; quimiotaxonomia.

**Apoio financeiro:** FAPESB/IC e UNEB

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UNEB.

### Introdução

A Fabaceae é a terceira maior família de plantas com cerca de 650 gêneros e 18.000 espécies, alocadas em suas três subfamílias: Mimosoideae, Papilionoideae e Caesalpinoideae (NASCIMENTO, 2012; WINK, 2013). Suas espécies apresentam propriedades biológicas diversas, como antimaláricas (BATISTA et al, 2018), anti-inflamatórias (LONE et al, 2018) e antimicrobianas, dentre outras.

*Deguelia* é um gênero da subfamília Papilionoideae que possui dezessete espécies de ocorrência no Brasil. Essas são divididas, basicamente, em duas seções pela quantidade de óvulos por ovário das flores, a seção *Deguelia* possui doze espécies com até 6 óvulos por ovário e cinco espécies pertencem a seção *Multiovulis* com 7 a 15 óvulos por ovário (TOZZI, 1989). As espécies desse gênero produzem metabólitos secundários das classes dos isoflavonoides, estilbeno, triterpenos e esteróides. Além disso, são reportados na literatura o potencial biológico dessas espécies, como atividades antimicrobianas, antitumorais e antimaláricas (LIMA et al, 2017).

*Deguelia costata* (Benth.) A. M. G. Azevedo é uma espécie de ocorrência em remanescentes de Mata Atlântica dos estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e Espírito Santo (CAMARGO; TOZZI, 2014), pertence à seção *Multiovulis* de *Deguelia*, juntamente com *D. densiflora* (Benth.) A. M. G. Azevedo, *D. hastchbachii* (Benth.) A.M.G. Azevedo, *D. longeracemosa* (Benth.) A.M.G. Azevedo e *D. spruceana* (Benth.) A. M. G. (CAMARGO; TOZZI, 2014; MARQUES; SERAFIM; LEMES, 2015). Estudos fitoquímicos prévios destas espécies demonstram produção majoritária de metabólitos secundários das classes das 4-hidroxi-3-fenilculmarinas e das isoflavonas (MARQUES; SERAFIM; LEMES, 2015) e em ensaios antimicrobianos anteriores o extrato em diclorometano das folhas apresentou atividade frente às bactérias *M. luteus* e *B. subtilis*, com concentração inibitória mínima (CIM) de 250 e 31,2 µg. mL<sup>-1</sup>, respectivamente (SERAFIM, 2014). Diante disso, o presente trabalho teve a finalidade de avaliar as atividades antibacterianas e antifúngicas de amostras de frações e substâncias isoladas do extrato em diclorometano das das folhas de *D. costata*.

### Metodologia

A coleta das folhas do espécimen em estudo foi em remanescentes de Mata Atlântica, Vitória-ES, no campus de Goiabeiras, da Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, em 18 de setembro de 2010. A exsicata foi depositada com o número 26414, no Herbário VIES da UFES, Vitória, Espírito Santo. A classificação botânica foi realizada pela curadora Dr<sup>a</sup> Luciana Dias Thomaz.

Para a continuidade do estudo fitoquímico do extrato em diclorometano das folhas foram selecionadas as frações F5.6, F10 e F10. 9-10, obtidas de estudos fitoquímicos anteriores deste extrato que foram conduzidos

em nosso grupo de pesquisa Potencial Químico e Biológico de Plantas da Caatinga e Mata Atlântica (SERAFIM, 2014).

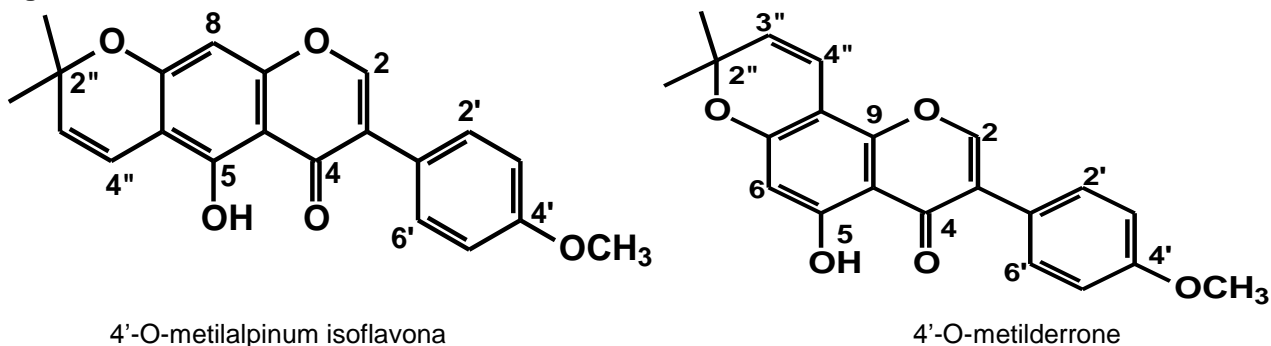
A fração F5.6 (m = 182,6 mg) foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) em sílica de fase reversa, C18, eluída com Hexano: Diclorometano: Acetato de etila [(6:1:0,1), 5x], rendendo 10 subfrações. A fim de enriquecer a quantidade destas subfrações, realizou-se este procedimento em 3 cromatoplasas. As novas subfrações foram reunidas com as primeiras, após monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD), onde as placas cromatográficas foram reveladas por radiação UV nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm e por borrifação com solução de anisaldeído (Etanol: Anisaldeído: Ácido Sulfúrico: Ácido Acético Glacial na proporção de 9:1:1:0,1).

As frações obtidas foram analisadas por CCDC e, em seguida, enviadas para obtenção de dados espectrais de RMN de  $^1\text{H}$  e avaliação do efeito antimicrobiano. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana, pelo método da microdiluição em caldo, foram conduzidos segundo as normas técnicas (CLSI, 2005), com modificações. Além dessas frações, foram selecionadas para os ensaios antimicrobianos o extrato em diclorometano das folhas, as frações oriundas desse extrato: F4, F4.7, F5, F5.6, F10, F10.9-10.15 e a substância 4'-O-metilderrone, isolada por Miguez (2018) da fração F5.6. Estas foram testadas contra *Staphylococcus aureus* (ATCC = 6538), *S. epidermidis* (Winslow & Winslow) Evans (Nº CCT = 1488; ATCC = 12228), *Bacillus subtilis* (ATCC = 6633), *B. cereus* Frankland & Frankland (Nº CCT = 0096), *Micrococcus luteus* (ATCC = 10240), *Pseudomonas aeruginosa* (Nº CCT = 0090; ATCC = 27853), *Salmonella choleraesuis* (ATCC = 14028), *Candida albicans* (ATCC = 18804) e *C. glabrata* (CCT = 0728).

## Resultados e Discussão

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de F5.6.3 apresentou sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,84, característico do H2 do anel C de derivados de isoflavonas (DEYOU; JANG, 2018), e demais sinais em  $\delta_{\text{H}}$  7,46 (d, H-2' e H-6'); 6,98 (d, H-3' e H-5');  $\delta_{\text{H}}$  6,73 (d, 1H);  $\delta_{\text{H}}$  5,64 (d, 1H);  $\delta_{\text{H}}$  1,48 (s, 1H) e  $\delta_{\text{H}}$  3,85 (s, 4'-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta_{\text{H}}$  6,34 (s, 1H). Adicionalmente, o sinal em  $\delta_{\text{H}}$  13,18 (s, 1H) sugeriram a presença do grupo hidroxila com ligação de hidrogênio intramolecular com a carbonila do anel C. A comparação destes dados de RMN de  $^1\text{H}$  com os da literatura (MOHAN RAO; IYER; IYER, 1987) e os que foram obtidos por Miguez (2018) para fração F5.6 (Tabela 1) permitiram a identificação da substância majoritária da F5.6.3 como sendo a 5-hidroxi-4'-metoxi-6,7-(2'',2'')-dimetilpirano isoflavona conhecida como 4'-O-metilalpinum isoflavona (Figura 1). Esta isoflavona é o regioisômero de 4'-O-metilderrone (Figura 1), que foi isolada do extrato em diclorometano das folhas de *D. costata* por Serafim (2014) e Miguez (2018).

**Figura 1:** Fórmula estrutural das isoflavonas identificadas no extrato em diclorometano das folhas de *D. costata*.



Os resultados do ensaio antimicrobiano com o extrato em diclorometano e suas frações ativas encontram-se na tabela 2. 4'-O-metilderrone foi fungicida para *C. albicans* e 4'-O-metilalpinum isoflavona e apresentou efeito contra *M. luteus*. O extrato em diclorometano das folhas apresentou efeito bacteriostático e bactericida contra *S. epidermidis* e fungicida contra *C. glabrata*. A fração F4 também inibiu *S. epidermidis*. Já a subfração F4.7 além de apresentar efeito para *S. epidermidis* também foi bacteriostático para os *Bacillus cereus* e *B. subtilis*. Já F5 foi antimicrobiana contra *S. epidermidis*, *Salmonella choleraesuis* e *C. glabrata*. A sua subfração F5.6 não apresentou atividade frente aos microrganismos testados. Contudo F5.6.0 foi bacteriostática e bactericida frente *S. epidermidis* e *Bacillus cereus*, respectivamente. A F10.9-10.15 mostrou atividade contra *S. epidermidis* e *M. luteus*. O seu espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresenta sinais que indicam a presença de uma mistura de derivados de isoflavonas, assim como o espectro do extrato em diclorometano das folhas.

**Tabela 1:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da F 5.6.3 e comparação com os da literatura

	F 5.6.3	4'-O-metilalpinum isoflavona	S2
<b>Posição</b>	<sup>1</sup> H (mult; integração) [500 MHz; CDCl <sub>3</sub> ]	<sup>1</sup> H (MOHAN RAO; IYER; IYER, 1987) [100 MHz; CDCl <sub>3</sub> ]	<sup>1</sup> H (MIGUEZ, 2018) [500 MHz; CDCl <sub>3</sub> ]
<b>2</b>	7,84 (s; 1H)	7,85 (s; 1H)	7,84 (s; 1H)
<b>3</b>			
<b>4</b>			
<b>5</b>			
<b>6</b>			
<b>7</b>			
<b>8</b>	6,34 (s,1H)	6,36 (s,1H)	6,35 (s,1H)
<b>9</b>			
<b>10</b>			
<b>2'</b>	7,46 (d; 1H)	7,48(d;8,0;1H)	7,46 (d ;8,8; 1H)
<b>3'</b>	6,98 (d; 1H)	7,00(d; 8,0; 1H)	6,99 (d; 8,8; 1H)
<b>4'</b>			
<b>5'</b>	6,98 (d; 1H)	7,00 (d; 8,0 1H)	6,99 (d; 8,8; 1H)
<b>6'</b>	7,46 (d; 1H)	7,48 (d;8,0;1H)	7,46 (d; 8,8; 1H)
<b>2''</b>			
<b>3''</b>	5,64 (d; 1H)	5,65 (d; 10,0;1H)	5,63 (d;10,0; 1H)
<b>4''</b>	6,73 (d; 1H)	6,75 (d;10,0;1H)	6,74 (d;10,0; 1H)
<b>5-OH</b>	13,18 (s;1H)	13,16 (s; 1H)	13,18 (s;1H)
<b>4'-OCH<sub>3</sub></b>	3,85 (s;3H)	3,86 (s;3H)	3,86 (s;3H)
<b>2xCH<sub>3</sub></b>	1,48 (s; 6H)	1,44 (s; 6H)	1,49 (s; 6H)

**Tabela 2:** Atividade antimicrobiana de amostras de *D. costata* (valores de MIC, MBC e MFC, em µg mL<sup>-1</sup>).

Amostras	MI		Sep		Bc		Bs		Sc		Ca		Cg	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CFM	CIM	CFM
<b>Extrato</b>	Nt		62,5	500	>500		Nt		Nt		Nt		500	>500
<b>F4</b>			500	500			>500							
<b>F4.7</b>	>100		50	100	100	>100	100	>100	>100		>100		>100	
<b>F5</b>	Nt		500	500	Nt		>500		500	>500	Nt		500	>500
<b>F5.6.0</b>	>100		25,0	100	50	100	>100		>100		>100		>100	
<b>F5.6.3</b>	100	100	>100		>100		>100		>100		>100		>100	
<b>4'-O-metilderrone</b>	Nt		>100		>100		>100		>100		100	>100	>100	
<b>F10.9-10.15</b>	6,25	12,5	100	>100	>100		>100		>100		>100		>100	
<b>Cloranfenicol</b>	25		1,56	>25	3,12	6,12	0,78	1,56						
<b>Benzilpenicilina<sup>a</sup></b>	>5,00		2,5	>5,00			0,08	0,08						
<b>Benzilpenicilina<sup>b</sup></b>							0,08	0,16						
<b>Garamicina</b>									0,04	0,08				
<b>Ciprorolpoxclamina</b>											12,5	>25	12,5	>25

**MI** – *Micrococcus luteus*; **Sa**- *Staphylococcus aureus*; **Sep**- *Staphylococcus epidermidis*; **Bc**- *Bacillus cereus*; **Bs**- *Bacillus subtilis*; **Pa**- *Pseudomonas aeruginosa*; **Sc** *Salmonella choleraesius*; **Ca**-*Candida albicans*; **Cg**-*Candida glabrata*. **Nt** – não testado; **a** - concentração de 5,0 µg mL<sup>-1</sup> **b** - concentração de 2,5 µg mL<sup>-1</sup>.

## Conclusões

Através da análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H das frações do extrato em diclorometano das folhas de *D. costata* foi possível identificar a presença de 4'-O-metilalpinum isoflavona na fração F5.6.3 e de derivados de isoflavonas em mistura nas demais frações. O extrato em diclorometano das folhas, suas frações e substâncias

mostraram potencial antibacteriano mais seletivo para bactérias Gram-positiva, com exceção da fração 5, que foi ativa para *Salmonella choleraesuis* (Gram-negativa). Algumas frações foram antifúngicas contra espécies de *Candida*. A continuidade do estudo fitoquímico destas frações permitirá o isolamento e identificação estrutural das substâncias responsáveis pelo efeito antimicrobiano observado neste estudo.

### Referências bibliográficas

- BATISTA, R. et al. In vivo antimalarial extracts and constituents of *Prosopis juliflora* (Fabaceae). **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 74-78, 2018.
- CAMARGO, R. A.; TOZZI, A. M. G. A. A synopsis of the genus *Deguelia* (Leguminosae, Papilionoideae, Millettieae) in Brazil. **Brittonia**, v. 66, n. 1, p. 12–32, 2014.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Microdiluição em caldo, segundo metodologia proposta pelo NCCLS**, 6. ed, v. 23, n. 2, 2005.
- DEYOU, T.; JANG, Y. P. A new prenylated isoflavone from the seeds of *Millettia ferruginea* ssp. *ferruginea*. **South African Journal of Botany**, v. 117, p. 155-157, 2018.
- LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B. D.; MACKINDER, B. A.; LOCK, M. Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens**, 2005.
- LIMA, N. M. et al. Genus *Deguelia* : Chemistry , Chemotaxonomy , Ethnopharmacology and Pharmacological Characteristics – A Review. **The Pharmaceutical and Chemical Journal**, v. 4, n. 5, p. 13–26, 2017.
- LIU, Y. et al. Methylalpinumisoflavone inhibits hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) activation by simultaneously targeting multiple pathways. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 9, p. 5859–5868, 2009.
- LONE, A. M. Preparation and evaluation of antibacterial potential of *Pithecellobium dulce* root extract against Gram positive and Gram negative bacteria. **Microbial pathogenesis**, v. 116, p. 49-53, 2018.
- MARQUES, E. J.; SERAFIM, J. C. R. B.; LEMES, B. B. Occurrence and Distribution of Polyphenolics in Species of *Deguelia* (Leguminosae). **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 7, n. 6, p. 327–333, 2015.
- MARTINS, M. V. et al. Espécies arbóreas de Papilionoideae (Leguminosae) na região noroeste do estado de São Paulo, Brasil. **Rodriguésia-Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**, v. 67, n. 1, p. 085-104, 2016.
- MIGUEZ, L. S. **Estudo Fitoquímico e Atividades Antibacteriana, Antifúngica e Citotóxica em Células Tumorais C6 de Glioma de *Deguelia costata* (benth) A. M. G. AZEVEDO**. Salvador, 2018. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado da Bahia.
- MOHAN RAO, K. S. R.; IYER, C. R.; IYER, P. R. Synthesis of alpinum isoflavone, derrone and related pyranoisoflavones. **Tetrahedron**, v. 43, n. 13, p. 3015-3019, 1987.
- NASCIMENTO, I. A. D. Flavonolignoids and other compounds isolated from *Mimosa artemisiana* Heringer e Paula. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2159-2164, 2012.
- SERAFIM, J. C. R. B. **Estudo fitoquímico das folhas e raízes de *Deguelia costata* (Benth.) A. M. G. Azevedo e avaliação das atividades antimicrobiana e citotóxica contra linhagem de célula tumoral HepG2**. Salvador, 2014. Dissertação de mestrado, Universidade do Estado da Bahia, 116p.
- TOZZI, A. M. G. A. **Estudo taxonômico dos gêneros *Lonchocarpus Kunth* e *Degelia Aubl.* no Brasil**. Campinas, 1989. Tese (Doutorado área Biologia) Universidade Estadual de Campinas.
- VINCKEN, J. P. et al. The position of prenylation of isoflavonoids and stilbenoids from legumes (Fabaceae) modulates the antimicrobial activity against Gram positive pathogens. **Food chemistry**, v. 226, p.193-201, 2017.
- WINK, M. Evolution of secondary metabolites in legumes (Fabaceae). **South African Journal of Botany**, v. 89, p.164-175, 2013.