

ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO APOLAR DAS RAÍZES DE *Derris floribunda* E BIOPROSPECÇÃO DOS EXTRATOS DE *Montrichardia linifera*.

Francislani Nascimento dos SANTOS¹; Cecilia Veronica NUNEZ²; Pierre Alexandre dos SANTOS³

¹Bolsista PIBIC/CNPq;; ²Orientadora CPPN/INPA; ³Co-orientador e bolsista DCR/FAPEAM

1. Introdução

O emprego de espécies vegetais em pesquisas, visando avaliar seus princípios ativos, é atividade necessária, visto que muitas espécies produzem metabólitos secundários que tem sido comprovadamente eficazes no tratamento de diversas doenças. Apesar dos estudos já realizados, ainda há um grande número de plantas que não tem seus constituintes químicos e potenciais biológicos conhecidos. Nesse contexto tomaram-se para estudo as espécies *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott e *Derris floribunda* (Benth). A *Montrichardia linifera* pertencente à família Araceae é uma macrófita aquática vastamente distribuída nas várzeas amazônicas, ecossistemas inundáveis como os igapós, margens dos rios, furos e igarapés, ocorrendo também nos Estados do Piauí e Rio de Janeiro e Suriname (Amarante *et al.*, 2009). Popularmente conhecida como "aninga", "aningaçu", "aningaíba" ou "aninga-do-igapó" é utilizada tradicionalmente pela população como cicatrizante, anti-reumática e no tratamento de úlceras (Amarante *et al.*, 2009). Os aspectos morfológicos a caracterizam como uma herbácea com 4 – 6 metros de altura, folhas com cerca de 45 a 66 cm de comprimento e 35 a 63 cm de largura (Abreu *et al.*, 2006). Já a espécie *Derris floribunda* (Benth) pertencente à família Fabaceae e a subfamília Faboideae (Papilionoideae) é um arbusto pequeno e rasteiro, vulgarmente conhecida como "timbó venenoso", "timbó" e "timborana", ocorre no Pará, Amapá, Amazonas (Manaus), Guianas, Maranhão e Piauí. Estudos prévios de sua subfamília revelam grande potencial para flavonóides e terpenos (Mourão *et al.*, 1975).

No presente trabalho foi fracionado o extrato diclorometânico das raízes de *D. floribunda* com o objetivo de isolar as substâncias citotóxicas frente ao ensaio sobre *Artemia salina* e avaliar os extratos DCM, hexânico e metanólico, de ambas coletas, das folhas e caules de *M. linifera*, quanto à toxicidade sobre *Artemia salina*, inseticida sobre *Sitophilus zeamais*, antibacteriano sobre *Aeromonas hydrophila*, antioxidante em DPPH e assim contribuir com informações científicas sobre a espécie *M. linifera*, considerando a escassez de informações suas na literatura.

2. Materiais e Métodos

Material vegetal

A espécie *M. linifera* foi coletada em novembro de 2008 e em agosto de 2009 em Altamira (PA), às margens do rio Xingú. A espécie foi identificada pela MSc. e doutoranda Daiane Martins. A espécie *D. floribunda* foi coletada na Praia Dourada (AM) no ano de 2005, as suas exsiccatas foram depositadas no Herbário da Coordenação de Pesquisas em Botânica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, onde a espécie *D. floribunda* foi identificada botanicamente.

Preparo dos extratos

O material vegetal (folhas e caules) da *M. linifera* obtido da primeira coleta foi seco à temperatura ambiente, moído e extraído com diclorometano (DCM), metanol (MeOH) e água (H₂O), em banho de ultrassom por 20 minutos, para cada extração, realizada em triplicata. Após filtração, os extratos foram concentrados utilizando-se evaporador rotatório sob pressão reduzida e/ou liofilizador, dos quais foram reservados 70 mg de cada extrato para a realização dos testes biológicos. Em virtude da pequena quantidade de material obtido na primeira coleta, foi realizada uma nova coleta e nesta seguiu-se o mesmo procedimento, porém substituindo o DCM da primeira extração por hexano.

Análise da atividade antioxidante utilizando DPPH

Todos os extratos obtidos da 1ª coleta foram testados quanto à capacidade de descolorir o oxidante DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila), visto que o mesmo apresenta coloração violeta, e os resultados obtidos foram comparados em termos de equivalente com ácido ascórbico, utilizado como antioxidante padrão. O DPPH é um radical livre com considerável estabilidade usado na quantificação da capacidade antioxidante em plasma sanguíneo e em extratos vegetais (Molyneux, 2004). Na presença de um redutor, o DPPH de coloração violeta ($\Delta_{\text{max}} = 517 \text{ nm}$) é convertido a DPPH de coloração amarelo pálido. Para o teste quantitativo, aproximadamente 5,0 mg de cada extrato foi solubilizado com 10 mL de metanol ou do solvente em foi preparado, grau P.A, obtendo a concentração de 0,5 mg/mL. A quantificação foi realizada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro (Aquamate). A solução de DPPH foi preparada dissolvendo 3,0 mg do reagente em 100 mL de MeOH grau P.A., resultando numa concentração de 30 $\mu\text{g/mL}$. A reação foi iniciada pela adição de 990 μL desta solução e 10 μL de amostra (0,5 mg/mL), realizado em triplicata com leituras após 30 minutos. O preparo do branco consiste em adicionar 10 μL de MeOH com 990 da solução de DPPH ($\Delta\text{ABS}_{\text{branco}}$).

Ensaio Biológicos

Atividade Antibacteriana

O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado em duplicata pelo método de difusão em ágar pela técnica do poço, como proposto por (Hu *et al.*, 2004). A *Aeromonas hydrophila* foi semeada em placa de Petri contendo ágar Muller-Hinton onde foram feitas cavidades com diâmetro de 6,0 mm. A partir do extrato na concentração de 100 mg/mL, foram feitas diluições, dos quais 0,1 mL foram inoculados em cada cavidade gerando as concentrações de 10 mg, 5 mg e 1 mg/cavidade. Utilizou-se água destilada estéril como controle negativo e oxitetraciclina (20 $\mu\text{g/cavidade}$) como controle positivo. Após evaporação, as placas foram incubadas em estufa a 30 °C de 18 às 24h. Ao final do período de incubação, verificou-se a formação dos halos de inibição de crescimento e mediu-se o diâmetro com o auxílio de uma régua.

Atividade citotóxica frente ao ensaio com Artemia salina

O teste de atividade citotóxica frente ao micro crustáceo *Artemia salina* foi realizado em triplicata segundo (Meyer 1982). Pesaram-se 38 g de sal marinho e diluíram-se em 1 litro de água destilada. Em seguida adicionaram-se 10 mg de cistos de *Artemia salina* na solução para os mesmos eclodirem. Como as larvas são fototrópicas utilizou-se uma luminária para melhorar a porcentagem de eclosão. Após 48 h, transfere-se 10 larvas para cada poço da placa de teste. A concentração utilizada do extrato no poço para o teste foi de 1000 $\mu\text{g/mL}$, obtida a partir de uma solução mãe de 30 mg/mL do extrato em DMSO.

Atividade Inseticida sobre Sitophilus zeamais

Por contato em superfície contaminada (papel-filtro)

O ensaio de exposição por contato em superfície tratada, seguiu a metodologia proposta por (Huang *et al.*, 1997) e (Huang e Ho 1998) com algumas modificações feitas por (Tavares *et al.*, 2008). Foram utilizadas placas de Petri de 9 cm de diâmetro, nas quais foram adicionadas folhas de papel-filtro impregnadas com 1 mL das concentrações de cada extrato. No controle dos extratos orgânicos foi utilizado solvente específico: MeOH, para os extratos em metanol e hexano, para os extratos em hexano. Todos os tratamentos foram deixados em temperatura ambiente por 1 hora para volatilização do solvente, em seguida, 20 adultos não-sexados com idade entre 10 e 20 dias foram confinados por placa de Petri. A contagem dos indivíduos mortos foi feita após cinco dias da montagem do experimento, foram considerados mortos os exemplares com ausência total de movimento. Para cada tratamento foram feitas cinco repetições.

Por ingestão de grãos contaminados.

Os ensaios de ingestão foram instalados com base no trabalho realizado por (Llanos *et al.*, 2008) com algumas modificações. Foram utilizados 20 gramas de milho comercial. Foram utilizados frascos plásticos com capacidade para 500 mL e tampados com tecido filó. A cada massa de grão foram misturados 2 mL das concentrações dos extratos. A massa foi revolvida para homogeneização e depois deixada em temperatura ambiente por 1 hora. A seguir, foram confinados 20 adultos não-sexados entre 10 e 20 dias de idade de *S. zeamais* por frasco; as observações foram feitas após 15 dias da aplicação dos extratos.

Análise cromatográfica da espécie Derris floribunda

Foram realizadas seis colunas cromatográficas do extrato diclorometânico das raízes (8 g), utilizando como fase estacionária sílica gel (230-400 Mesh, Merck) e misturas de solventes com polaridade crescente. As cromatografias em camadas delgada (CCD) foram efetuadas em cromatofolhas de sílica (Merck). A detecção dos compostos foi feita por visualização na luz UV (254 e 365 nm) e borrifação com os reveladores anisaldeído, sulfato cérico e cloreto férrico.

3. Resultados e discussão

Resultados para os extratos de *M. linifera*

Quadro 1. Ensaio dos extratos da *Montrichardia linifera*

Extrato	Atividade Antioxidante	Citotóxico		Antibacteriano	Inseticida	
					Concentração (1000 ppm)	
		Concentração (µg/mL)	% Mortalidade		% Mortalidade	
Ingestão	Contato					
Primeira coleta						
DCM/Fo	83,089	400	53,3	Inativo	1	0
MeOH/Fo	70,789	1000	16,6	Inativo	0	0
MeOH/Ca	41,656	1000	Inativo	Inativo	0	0
Segunda coleta						
Hex/Ca	NA	1000	100	Inativo	3	0
MeOH/Ca	NA	1000	83,3	3 mm (inibição)	0	1
Hex/Fo	NA	1000	93,3	Inativo	0	4
MeOH/Fo	NA	NA	NA	1 mm (inibição)	0	0

NA: Não avaliado

De acordo com os resultados dos ensaios apresentados no quadro 1, aos quais os extratos da espécie vegetal foi submetida, houve alterações das respostas em relação ao período de coleta. Na primeira coleta a espécie apresentou-se menos tóxica para *Artemia salina* e com uma menor atividade inseticida em comparação com a segunda coleta ocorrida nove meses depois. Na segunda coleta houve um aumento tanto da toxicidade frente ao micro crustáceo *Artemia salina*, quanto para a porcentagem de indivíduos mortos da espécie *Sitophilus zeamais*. Apesar de não ser muito elevada, o melhor resultado foi com o extrato Hex/fo, onde morreram 4 % por contato em uma concentração de 1000 ppm. Como na literatura são usadas concentrações de até 100.000 ppm para avaliar a toxicidade de extratos brutos, o resultado encontrado para 1000 ppm é muito promissor. Em decorrência de problemas com o espectrofotômetro de UV/VIS, não foi possível obter a comparação das atividades antioxidantes. A espécie mostrou-se ineficaz no ensaio antibacteriano frente a *Aeromonas hydrophila*, dentre os extratos testados os únicos que mostraram halos de inibição foram os extratos metanólicos dos caules (3 mm) e das folhas (1 mm), porém halos de 1 a 6 mm são considerados de baixa atividade. Assim, estes extratos não são eficazes para o controle desta espécie de bactéria.

Resultado para os extratos de *Derris floribunda*

Foi realizada a reunião das frações 5.4 e 5.5, por apresentarem características idênticas em CCDC e a mesma foi submetida ao fracionamento em coluna aberta de sílica com gradientes Hex/AcOEt 7:3 até MeOH puro. Obtiveram-se 50 frações as quais foram analisadas em CCDC, por métodos físicos: UV 254 nm e 365 nm e químicos - reveladas com $Ce(SO_4)_2$, $FeCl_3$ e anisaldeído nas quais foram observadas a presença de possíveis terpenos e compostos fenólicos. Desta forma, o fracionamento destas frações deve ser continuado para direcionar o fracionamento até a obtenção das substâncias puras.

4. Conclusão

Diante dos resultados obtidos até o momento, será dada continuidade aos estudos fitoquímicos da espécie *D. floribunda* com intuito de identificar as moléculas responsáveis pelos efeitos tóxicos descritos em estudos anteriores.

Os resultados obtidos dos ensaios realizados com os extratos da *M. linifera* mostraram grandes diferenças devidas à época de coleta. Na 1ª coleta, os extratos foram menos tóxicos frente *Artemia salina* que na 2ª coleta. Isto pode ser em função de haver uma variação na concentração das moléculas tóxicas, pela influência da sazonalidade. Assim, deve-se realizar o fracionamento fitoquímico dos extratos a fim identificar as moléculas ativas e contribuir com dados científicos sobre a composição química da mesma.

5. Referências

Abreu, E.M.A. de; Fernandes, A.R.; Martins, A.R.A.; Rodrigues, T.E. 2006. Produção de forragem e valor nutritivo de espécies forrageiras sob condições de pastejo, em solo de várzea baixa do Rio Guamá. *Acta Amazonica*, 36 (1): 11-18.

Amarante, C. B.; Silva, J. C. F.; Solano, F. A. R.; Nascimento, L. D.; Moraes, L. G.; Silva, G. F.; Uno, W. S. 2009 Estudo espectrométrico das folhas da aninga (*Montrichardia linifera*) coletadas à margem do rio Guamá no campus da UFPA, BELÉM-PA. Uma contribuição ao estudo químico da família Araceae. *Revista científica da UFPA.*, 7 (1): 2-5.

Huang, Y.; Tan, J.M.W.L.; Kini, R.M.; Ho, S.H. 1997. Toxic and Antifeedant Action of Nutmeg Oil Against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *J. Stored Prod. Res.*, 33: 289-298.

Hu, S. H.; Wang, J. C.; Kung, H. F.; Wang, J. T.; Lee, W. L.; Yang, Y. H. 2004. Antimicrobial effect of extracts of cruciferous vegetables. *Kaohsiung Journal of Medical Science*, 12: 591-599.

Huang, Y.; Ho, S.H. 1998. Toxicity and Antifeedant Activities of Cinnamaldehyde Against the Grain Storage Insects, *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *J. Stored Prod. Res.*, 34: 11-17.

Llanos, C.A.H.; Arango, D.L; Giraldo, M.C. 2008. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Colombiana de Entomol.*, 34: 76-82.

Meyer, B. N.; Ferrigini, N. R.; McLaughlin, J. L.; Putnam, J. E.; Jacobsen, L.B.; Nichols, D. E. 1982. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Med*, 45, 31.

Mourão, A.P. 1975. Estudo químico de três timbós da Amazônia: *Derris floribunda*, *Derris amazônica* e *Derris rariflora*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química, São Paulo. 107pp.

Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrilhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, 26: 211-219.

Tavares, M.A.G.C.; Vendramim Llanos, C.A.H.; Arango, D.L; Giraldo, M.C. 2008. Actividad insecticida de extractos de semilla de *Annona muricata* (Anonaceae) sobre *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Rev. Colombiana de Entomol.*, 34: 76-82.