

ESTUDO BIOMONITORADO ATRAVÉS DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS SUB-FRAÇÕES DO EXTRATO CLOROFÓRMIO DE *Polygala* sp.

**Danielle Figuerêdo da Silva¹; José Luiz Carneiro da Rocha²; Clayton Alves Queiroz³,
Hugo Neves Brandão⁴**

1. Autora, Mestranda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: danyfigs@hotmail.com

2. Colaborador, Doutorando em Recursos Genéticos Vegetais, Universidade Estadual de Feira de Santana,
email: luiiz_farmaco@hotmail.com

3. Colaborador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: cleiroz@yahoo.com

4. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hugo@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: Citotoxicidade, Cumarina, *Polygala*.

INTRODUÇÃO

Atualmente a família Polygalaceae Hoffmanns & Link compreende 22 gêneros e cerca de 1.300 espécies com ampla distribuição no mundo, sendo que no Brasil, as espécies do gênero *Polygala* correspondem a cerca de 75%, com aproximadamente 140 táxons (MARQUES; PEIXOTO, 2007; ROCHA *et al.*, 2012).

Investigações com espécies do gênero *Polygala* mostram interessantes propriedades biológicas, a exemplo *P. japonica*, apresentando efeito neuroprotetor (LI *et al.*, 2012); *P. karensium*, antiviral (DAO *et al.*, 2012) e *P. tenuifolia*, utilizada para tratamento de amnésia, ansiedade, insônia, asma, bronquite (FANG *et al.*, 2012).

O estudo dos produtos naturais mostra-se como alternativa para os laboratórios de pesquisa e indústrias farmacêuticas na busca de novos compostos bioativos. No entanto, é necessário realizar triagens para avaliar a toxicidade e a ação biológica das amostras. Com relação à toxicidade, existem alguns métodos alternativos de testes *in vitro* que podem substituir ou diminuir o uso de animais na experimentação (BEDNARCZUK *et al.*, 2010).

O ensaio comumente utilizado é o teste de toxicidade frente *Artemia salina* (TAS) que pode fornecer informações valiosas, indicando fontes vegetais com importantes atividades biológicas, ou mesmo prever a toxicidade de substância ou extrato vegetal (NUNES *et al.*, 2008).

Devido às diferentes atividades relatadas em espécies de *Polygala*, bem como o desenvolvimento de trabalhos anteriores (SILVA, BRANDÃO, 2012) avaliando a citotoxicidade do extrato metanólico e frações de *P. boliviensis*, o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo biomonitorado através do TAS das sub-frações clorofórmicas dessa espécie.

METODOLOGIA

Em trabalhos anteriores foi possível realizar o estudo biomonitorado do extrato metanólico de *P. boliviensis* através do TAS (SILVA, BRANDÃO, 2012). Nesse estudo, o extrato metanólico foi particionado nas frações acetato de etila, clorofórmio e hexano, sendo a fração clorofórmio a que apresentou maior atividade citotóxica. Essa fração foi submetida à Cromatografia em Coluna (CC) e resultou em seis sub-frações (UPBFC01 a UPBFC06). Tais amostras foram avaliadas através do TAS, sendo a sub-fração UPBFC01 a que apresentou maior atividade e, por este motivo, foi utilizada para dar continuidade ao trabalho.

Após a obtenção da fração UPBFC01, observou-se que a mesma apresentava cristais finos com coloração esverdeada. Dessa forma, foi utilizada recristalização com metanol a frio e clorofórmio a quente para purificar o cristal encontrado (CPB1). Após a recristalização, o CPB1 foi avaliado por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) utilizando diferentes proporções dos sistemas de solventes hexano:acetato de etila e metanol:clorofórmio, sendo observado apenas a resolução de uma mancha. Nesse sentido,

como a amostra se apresentava aparentemente pura, o CPB1 foi enviado para o Grupo de Pesquisa de Produtos Naturais (GPPN), na Universidade Federal da Bahia para identificação da sua estrutura química.

Os espectros no Infravermelho (IV) foram registrados em espectrômetro Perkin Elmer 1000, utilizando-se pastilhas de KBr. As análises de Espectrometria de Massas (EM) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu LCMS-2310 e GCMS-QP2010S. Enquanto que os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e RMN de ^{13}C) foram obtidos em espectrômetro Varian Gemini 2000 operando a 500 MHz (^1H) e 125 MHz (^{13}C), empregando CD_3OD como solvente e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

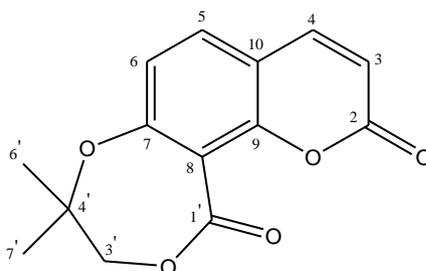
O sobrenadante da fração UPBFC01 (0,0506 g) foi submetida à Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP), utilizando placa de vidro (20x20 cm) recheada com sílica gel 60 F254 previamente ativada em estufa a 60°C , e como fase móvel uma solução contendo uma mistura de hexano:acetato na proporção 1:1 (400 mL) e 1 mL de ácido acético.

As amostras resultantes da CCDP e a amostra CPB1 foram submetidas ao teste de citotoxicidade frente à *A. salina*. O teste foi baseado no método desenvolvido por Meyer (1982) e adaptado por Serrano, Ortega e Villar (1996) no qual os *nauplii* recém-eclodidos foram colocados em contato com o extrato, em concentrações diferentes, e incubados por 24 horas. Após esse período foram contados os *nauplii* sobreviventes para a determinação da porcentagem de citotoxicidade das amostras. Os *nauplii* foram considerados mortos caso não exibissem nenhum movimento durante dez segundos de observação. Todo o teste foi realizado em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_5$ foi proposta com base no espectro de massas (EM-APCI) pela presença do íon *pseudo-moleculare* em m/z 261 $[\text{M} + \text{H}]$ aliado aos dados de RMN (uni e bidimensional). No espectro de IV, foram observadas bandas em 1735,93 e 1726,29 cm^{-1} que sugerem a presença de duas carbonilas. A presença de bandas em 1600,92 cm^{-1} e 1465,90 cm^{-1} indica estiramento de ligações $\text{C}=\text{C}$ presentes em anel aromático e as bandas em 3059,10 cm^{-1} e 2983,88 cm^{-1} podem indicar estiramento de ligações $\text{C}-\text{H}$, também em anéis aromáticos.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais característicos de hidrogênios de sistemas α,β insaturados em δ 6.45 (1H) e δ 7.76 (1H), e sinais típicos de hidrogênios de anéis aromáticos em δ 6.96 (1H) e δ 7.62 (1H). Os singletos observados em δ 4.19 (2H) e 1.35 (6H) foram atribuídos a hidrogênios ligados a carbono oximetínico e metílico, respectivamente. Através da análise dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° foi possível identificar a presença de treze sinais de carbono, onde os sinais em 159.9, 116.1, 143.9, 133.3, 120.2, 156.4, 114.8, 154.2 e 117.3 ppm foram atribuídos a um núcleo cumarínico 7,8-dissubstituído, e os sinais em 164, 84, 71 e 24 ppm a uma carbonila lactônica, carbono oximetínico, oximetilênico e dois carbonos metílicos, respectivamente. As correlações observadas no espectro de HMBC entre os hidrogênios em δ 4.19 e o carbono em δ 164.7 e entre os hidrogênios em δ 1.35 e os carbonos em δ 24.1, δ 84.7 e δ 71.5 levaram a concluir que esta parte da molécula está ligada aos carbonos C-7 e C-8 do núcleo cumarínico.



Polygalina

Figura 1: Estrutura química e nome da amostra CPB1

Após a identificação da estrutura da amostra CPB1 foi possível a confirmação da mesma como uma cumarina. A presença de cumarinas em espécies de *Polygala* vem sendo relatada por alguns autores (PIZZOLATTI; LUCIANO; DELLE MONACHE, 2000; CUNHA JUNIOR, 2002), entretanto este é o primeiro relato da determinação estrutural desta substância, o que a torna uma cumarina inédita. Dentre as atividades já atribuídas às cumarinas, pode-se destacar: atividade hepatoprotetora, antioxidante (BEILLEROT *et al.*, 2008), antineoplásica (STANCHEV *et al.*, 2008), dentre muitas outras.

O fracionamento da amostra UPBC01 por CCDP resultou na obtenção de duas frações CCDP1 e CCDP2 não sendo possível a separação de todos os componentes da fração. Quando submetidas ao TAS, os resultados apresentados não possibilitaram a determinação da CL₅₀. No entanto, para a maior concentração testada (400 µg/mL), observou-se que a CCDP2 foi mais citotóxica do que a CCDP1, apresentando letalidade de 96,67% e 20,00%, respectivamente. Dessa forma, pode-se sugerir que a atividade citotóxica de UPBFC01 (apresentando CL₅₀ de 103,35 µg/mL) esteja relacionada à presença de substâncias encontradas na CCDP2. Observa-se, ainda, pela análise por CCDC, que o composto CPB1 se mostra como predominante na amostra CCDP1, sendo assim, a baixa toxicidade da CCDP1 vem corroborar com os testes realizados com CPB1, que apresentou porcentagem máxima de inibição de 30%.

É possível que a atividade citotóxica de CCDP2 seja atribuída a apenas um composto, ou mesmo a união de todas as substâncias presentes nessa sub-fração, que podem agir sinergicamente. A toxicidade da fração CCDP2 pode contribuir para a descoberta de ativos citotóxicos que possam ser utilizados terapêuticamente como antimicrobiano e antiparasitário (MAYORGA *et al.*, 2010), ou mesmo, como antineoplásico (CARBALLO *et al.*, 2002).

Por outro lado, como o teste de letalidade da *A. salina* é um primeiro indicativo da toxicidade de extratos, frações ou substâncias testadas. Dessa forma, os resultados encontrados para o CPB1 mostram-se como promissores quando se visa a aplicação terapêutica dessa substância, visto que alguns autores afirmam a correlação do TAS com testes de toxicidade *in vivo* (PARRA *et al.*, 2001).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Uma vez que a literatura não menciona nenhum estudo fitoquímico e avaliação da atividade citotóxica de *P. boliviensis*, com exceção dos testes realizados pelo próprio grupo de pesquisa Estudos Químicos e Atividades Biológicas em Produtos Naturais, esse trabalho fornece uma contribuição inédita acerca desta espécie.

O fracionamento da fração clorofórmica de *P. boliviensis* possibilitou o isolamento e identificação de uma cumarina inédita (CPB1). Além disso, o teste de citotoxicidade frente à *A. salina* mostrou que a toxicidade da UPBC01 encontrada em trabalhos anteriores pode não estar relacionada à presença de CPB1, mas sim de outros compostos, como aqueles presentes na sub-fração CCDP2, já que a mesma se mostrou mais citotóxica do que a CCDP1, o que proporciona perspectiva no sentido de facilitar a utilização terapêutica do cristal. Vale

ressaltar que outros processos cromatográficos serão realizados a fim de isolar novas substâncias que possam ser testadas pelo ensaio de TAS.

REFERÊNCIAS

- BEDNARCZUK, V.O. *et al.* 2010. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. *Visão Acadêmica*, Curitiba, 11: 43-50.
- BEILLEROT, B. *et al.* 2008. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 18: 1102-1105.
- CARBALLO, J. L. *et al.* 2002. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.* 2: 1-5.
- CUNHA JUNIOR, A. 2002. Constituintes químicos da espécie vegetal *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae): isolamento e atividade biológica. Universidade Federal de Santa Catarina. Dissertação.
- DAO, T. T. *et al.* 2012. Xanthonés from *Polygala karensium* inhibit neuraminidases from influenza A viruses. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 22: 3688–3692.
- FANG, M. F. *et al.* 2012. Genetic diversity in natural populations of the medicinal herb *Polygala tenuifolia* Willd. and its implications for conservation. *Biochem. System. Ecol.*, 44: 400–406.
- MARQUES, M. C. M.; PEIXOTO, A. L. 2007. Estudo taxonômico de *Polygala* subgênero *Ligustrina* (Chodat) Paiva (Polygalaceae). *Rodriguésia*, 58: 95-146.
- MAYORGA, P. *et al.* 2010. Comparison of bioassays using the anostraca crustaceans *A. salina* and *Thamnocephalu splateyurus* for plant extract toxicity screening. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 20: 897-903.
- MEYER, B. N. *et al.* 1982. Brine Shrimp: A convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *J. Med. Plants. Res.*, 45: 31 -34.
- NUNES, X. P. 2008. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.* 18:718-723.
- PARRA, A. L. *et al.* 2001. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium letal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*.8: 395-400.
- PIZZOLATTI, M. G. 2008. Trypanocidal activity of coumarins and styryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* A.W. Bennett (Polygalaceae). *Rev Bras de Farmacogn*, 18: 177-182.
- ROCHA, J. L. C. *et al.* 2012. Quantificação de salicilato de metila em quatro gêneros de Polygalaceae, por CLAE-DAD. *Quim. Nova*, 35 (11): 2263-2266.
- SERRANO, C.; ORTEGA, T.; VILLAR. 1996. A biological activity of traditional medicines from Spain and Guatemala *A. salina* bioassay: a revision. *Phyther. Res*, 10: 118 – 120.
- SILVA, D. F.; BRANDAO, H. N. 2012. Estudo fitoquímico e avaliação citotóxica *in vitro* de *Polygala* sp. Universidade estadual de Feira de Santana. Relatório de pesquisa.
- STANCHEV, S. *et al.* 2008. Synthesis, computational study and cytotoxic activity of new 4-hydroxycoumarin derivatives. *Eur. J. Med. Chem*, 43: 694-706.