

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
Laguncularia racemosa (L.) Gaertn.f. (MANGUE BRANCO)**

Maria Betânia Delmiro dos Santos Silva

Recife – 2003

Maria Betânia Delmiro dos Santos Silva

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
***Laguncularia racemosa* (L.) Gaertn.f. (MANGUE BRANCO)**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE
PRODUTOS BIOATIVOS PARA OBTENÇÃO DO
TÍTULO DE MESTRE.

Área de concentração: Química de Compostos
Bioativos

Orientadora: Profa. Dra. Márcia da Silva Nascimento

Recife – 2003

MARIA BETÂNIA DELMIRO DOS SANTOS SILVA

Orientadora

Profa. Dra. Márcia da Silva Nascimento

Banca Examinadora

Professora Dra. Maria de Los Angeles Perez Palha
Departamento de Engenharia Química
Universidade Federal de Pernambuco

Professora Dra. Glícia Maria Calazans
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

Professora Dra. Maria do Carmo Alves de Lima
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco

“São muitas, Senhor Deus, as maravilhas que tens operado, e também os teus desígnios para conosco; ninguém há que se possa igualar contigo. Eu quisera anunciá-los e deles falar, mas são mais do que se pode contar.”

Salmos 40.5

Aos meus pais Gerson Delmiro dos Santos e Lindalva Ganzanêz dos Santos, pelo grande zelo, amor e estímulo aos estudos.

Ao meu esposo Salmon Ferreira da Silva, pela presença sempre constante e agradável, e por todo incentivo que tem dado.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus por sua presença constante em minha vida.

À Professora Dra. Márcia da Silva Nascimento, por sua dedicação, paciência e incentivo na orientação e desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais, pelo apoio e incentivo.

A Salmon Ferreira da Silva, pela convivência amigável e agradável em todas as horas.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pela parcela de contribuição em minha formação profissional.

À Professora Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, pela força amiga, colaboração e incentivo durante o curso.

À Professora Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque, pelos conselhos, incentivo e, principalmente, pela amizade que tem demonstrado.

Aos amigos e colegas de turma Ana Rosa Galdino Bandeira, Andréa Vasconcelos Lobato, Andréia Lopes Melo Soares, Antônio Mário Melo, Iêda Cristina da Silva Vicente, Josimar Alves de Santana, Laudelina Rodrigues Magalhães, Maria Tereza Corrêa Lima, Maria do Socorro Duarte e Patrícia Maria Sobral de Oliveira, pela companhia alegre e cumplicidade nas disciplinas estudadas e em todas outras oportunidades, tornando os momentos do curso mais agradáveis.

Aos alunos do Laboratório de Química de Produtos Naturais Jefferson Cunha dos Santos, Cláudia de Albuquerque Maranhão, Janaína Barbosa Pedroza Costa, Rafaella Satva de Melo Lopes, Thaís Maria da Silva, Jéssica Maria Monteiro Dias,

Ana Paula de Torres Valentin e Patrícia Bezerra Gomes, pela amizade e disponibilidade em ajudar na conclusão do trabalho.

Às amigas Ângela Maria Coelho de Andrade, Lourinalda Luiza Dantas da Silva e Paula Regina Xavier Leal, pela amizade e constante colaboração.

Aos meus familiares Ozéias Delmiro dos Santos, Martamiria Delmiro dos Santos, Rogério Alexandre Santana Ferreira e Joana Melo Nascimento, pela torcida de todos os dias.

A Salatiel Ferreira da Silva, pela disponibilidade, compreensão e suporte da digitação do trabalho.

Ao amigo Danilo Mamede da Silva Santos, pela realização dos testes microbiológicos e por sua alegria contagiante.

Aos técnicos Juliana Manso de Oliveira Silva, Ricardo Oliveira da Silva e Eliete Fátima Vasconcelos Barros da Silva, da Central Analítica, da UFPE, pelas análises realizadas.

À CAPES, pelo apoio financeiro, possibilitando a realização deste trabalho.

E a todos, que de alguma maneira, contribuíram para a elaboração deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1.INTRODUÇÃO.....	18
2. OBJETIVOS	25
2.1. Geral.....	25
2.2. Específicos.	25
3. REVISÃO DA LITERATURA	27
3.1. Manguezais	27
3.2. Família Combretaceae.....	32
3.3. Gênero	36
3.4. <i>Laguncularia racemosa</i> (L.) Gaertn.f.....	36
3.4.1. Descrição botânica.....	37
3.4.2. Estudo fitoquímico de <i>L. racemosa</i>	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	43
4.1.Solventes e reagentes utilizados.....	43
4.2. Equipamentos e materiais.....	43
4.3. Métodos espectroscópicos e dados físicos.....	44
4.4. Coleta e preparo do material botânico.....	45
4.5. Abordagem fitoquímica.....	45
4.5.1. Teste para fenóis e taninos.....	45
4.5.2. Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	45
4.5.3. Teste para esteróides e triterpenóides (Liebermann-Buchard)...	46
4.5.4. teste para saponinas.	47
4.5.5. Teste para alcalóides.....	47
4.6. Preparação dos extratos de <i>L. racemosa</i>	47
4.7. Fracionamento dos extratos de <i>L. racemosa</i>	48
4.8. Determinação estrutural e da pureza	49
4.9. Metodologia da atividade biológica....	49
4.9.1Teste de atividade antimicrobiana.....	49

4.9.2. Preparação dos meios de culturas.....	50
4.9.3. Composição dos meios de cultura.....	50
4.9.4. Preparo dos inóculos.....	51
4.9. 5. Teste de difusão em disco	51
4.9.6. Teste de atividade citotóxica.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Abordagem fitoquímica.....	55
5.2. Obtenção dos extratos brutos de <i>L. racemosa</i>	56
5.3. Purificação do extrato <i>n</i> -hexânico de <i>L. racemosa</i>	56
5.4. Identificação dos compostos.....	57
5.4.1. Análise elementar.....	57
5.4.2. Análise espectroscópica da amostra LR-12.....	58
5.4.3. Análise espectroscópica da substância LR 4.....	67
5.4.4. Análise da amostra LR 11.....	72
5.5. Resultados e discussão da atividade biológica.....	72
5.5.1. Atividade antimicrobiana dos extratos brutos de <i>L. racemosa</i>	72
5.5.2. Teste de atividade citotóxica	72
6. CONCLUSÕES.....	74
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Exemplos de substâncias usadas na terapêutica.....	18
Figura 2 – Ocorrência dos manguezais no Brasil.....	30
Figura 3 – Estrutura da arjunina isolado de <i>Terminalia arjuna</i>	33
Figura 4 – Estrutura da punicalina isolado de <i>Terminalia arjuna</i>	34
Figura 5 – Ácido galoilarjunólico isolado de <i>Terminalia macroptera</i>	34
Figura 6 – Compostos isolados do gênero <i>Combretum</i>	35
Figura 7 – Caule de <i>L. racemosa</i>	38
Figura 8 – Galho de <i>L. racemosa</i>	38
Figura 9 – Folha de <i>Laguncularia racemosa</i>	39
Figura 10 – Frutos de <i>L. racemosa</i>	40
Figura 11 – Espectro de IV da amostra LR 12 de <i>L. racemosa</i>	59
Figura 12 – Núcleo básico de triterpenos pentacíclicos.....	60
Figura 13 – Estrutura de α -amirina e β -amirina.....	61
Figura 14 – Espectro de RMN ¹³ C da mistura LR-12.....	65
Figura 15 – Estrutura do Lupeol.....	66
Figura 16 – Espectro de IV da substância LR 4.....	67
Figura 17 – Estrutura do estigmasterol.....	68
Figura 18 – Espectro de RMN ¹ H da substância LR 4.....	69
Figura 19 – Espectro de massas da substância LR 4.....	71

LISTA DE TABELAS E ESQUEMAS

Esquema 1 – Preparação dos extratos brutos de <i>L. racemosa</i>	48
Tabela 1 – Principais espécies encontradas no manguezal de Vila Velha, Itamaracá/PE.....	31
Tabela 2 – Posição Taxonômica da <i>L. racemosa</i>	37
Tabela 3 – Colorações indicativas da presença de alguns compostos químicos	46
Tabela 4 – Microorganismos utilizados nos ensaios de atividade antimicrobiana.....	50
Tabela 4 – Resultados da abordagem fitoquímica comparado com dados da literatura para <i>T. arjuna</i> (Combretaceae).....	55
Tabela 5 – Rendimentos dos extratos de <i>L. racemosa</i>	56
Tabela 6 – Dados de ponto de fusão, solubilidade e Rf dos compostos LR-11, LR-12 e LR-13.....	57
Tabela 7 – Resultados da análise elementar para as amostras LR-11, LR-12 e LR-13.....	58
Tabela 8 – Deslocamentos químicos dos carbonos 12 e 13 de LR 12 e LR 13 comparados com dados da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994).....	61
Tabela 9 - Deslocamentos químicos do carbono-3 de LR 1 e LR 2 comparados com dados da literatura para β -amirina e α -amirina (MAHATO; KUNDU, 1994).....	62
Tabela 10 - Deslocamentos químicos dos carbonos 18 e 19 e 20 de LR 1 e LR 2 comparados com dados da literatura para β -amirina e α -amirina (MAHATO; KUNDU, 1994).....	63
Tabela 11 – Dados do deslocamento químico para o C-27, de LR 1 e LR 2 comparados com dados da literatura para β -amirina e α -amirina (MAHATO; KUNDU, 1994).....	63
Tabela 12 – Valores de ^{13}C -RMN das substâncias LR 1, LR 2 e LR 3 comparados com dados publicados para α -amirina, β -amirina e lupeol(MAHATO; KUNDU, 1994).....	64
Tabela 13 – Deslocamentos químicos dos carbonos-3, 20 e 29 de LR 3 comparados com dados da literatura para lupeol (MENEZES, <i>et al.</i> , 1998; OLEA; ROQUE, 1990).....	66

Tabela 14 – Valores de deslocamentos químicos da substância LR-4 comparados com os dados da literatura (KOJIMA <i>et al.</i> , 1990).....	68
Tabela 15 – Fragmentos identificados no espectro de massas da substância LR-4.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
AcOEt	Acetato de etila
C ₆ H ₁₂	<i>n</i> -hexano
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCl ₃	Clorofórmio deuterado
CLC	Cromatografia líquida em coluna
DAUFPE	Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco
DMSO	Dimetilsulfóxido
GC/MS	Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectro de Massas
IV	Infravermelho
MEM	Meio essencial mínimo
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
NCI-H292	Carcinoma muco epidermóide de pulmão
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Pernambuco
p.p.m.	Partes por milhão
R _f	Retention factor (fator de retenção)
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
UV	Ultra-violeta

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS

REITOR

Prof. Dr. Mozart Neves Ramos

VICE-REITOR

Prof. Dr. Geraldo José Marques Pereira

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Paulo Roberto Freire Cunha

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a Dr^a. Leonor Costa Maia

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Prof^a Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Prof^a Késia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena

COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO

Prof^a Dr^a. Alda de Andrade Chiappeta

VICE-COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO

Prof^a Dr^a. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

RESUMO

A família Combretaceae possui espécies utilizadas na medicina popular no tratamento de diversas doenças. O gênero *Laguncularia* apresenta como única espécie a *Laguncularia racemosa* e é típico de manguezal. Os caules de *L. racemosa*, conhecida popularmente como mangue branco, são utilizados na medicina popular para combater disenteria e em casos de afta, febre e escorbuto. Apresenta folhas arredondadas com um pecíolo vermelho contendo duas glândulas circulares características e inflorescências terminais livres. Esta espécie representa a segunda maior participação em números de indivíduos, no manguezal de Vila Velha, localizado na Ilha de Itamaracá (PE). Apesar deste manguezal ter sido recentemente tema de inúmeras pesquisas científicas, não há registros de estudos fitoquímicos de *L. racemosa* neste ambiente. Neste trabalho realizamos o screening fitoquímico das folhas da planta de acordo com a metodologia descrita por Matos. Avaliamos a atividade antimicrobiana dos extratos pelo método de difusão em discos de papel e atividade citotóxica com células da Linhagem Celular NCI-H292. O extrato *n*-hexânico foi submetido a fracionamento cromatográfico. As frações obtidas foram purificadas e analisadas por métodos cromatográficos. Os compostos obtidos foram analisados por espectroscopia de massas, infravermelho, RMN¹H, RMN¹³C, e identificados como triterpenos pentacíclicos e esteróides.

ABSTRACT

The family Combretaceae possesses species used in the popular medicine in the treatment of several diseases. The genus *Laguncularia* presents as only species the *Laguncularia racemosa* and it is typical of mangroves communities. The stem bark of *Laguncularia racemosa*, known popularly as white mangrove, they are used in the popular medicine to combat dysentery and in cases of afta, fever and scurvy. It presents round leaves with a red petiole containing two characteristic circular glands and free terminal inflorescências. This species represents the second largest participation in numbers of individuals, in the mangroves communities of Vila Velha, located in the Island of Itamaracá (PE). In spite of this mangroves it was recently theme of countless scientific researches, there are not registrations of studies fitoquímicos of *Laguncularia racemosa* in this it adapts. In this work we accomplished the screening fitoquímico of the leaves of the plant in agreement with the methodology described by Matos. We evaluated the activity antimicrobiana of the extracts for the diffusion method in paper disks and activity citotóxico with cells of the Cellular Lineage NCI-H292. The *n*-hexanic extract was submitted to chromatographic division. The obtained fractions were purified and analyzed by chromatographic methods. The obtained compounds were analyzed by mass spectra, IR, ¹HNMR, ¹³CNMR, and identified as triterpenes pentacyclics and esterols.