

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Conocarpus erectus L. (Mangue botão)**

Ana Rosa Galdino Bandeira

Recife – 2003

Ana Rosa Galdino Bandeira

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Conocarpus erectus L. (Mangue botão)**

**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 Silva do Nascimento

Recife – 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR *ANA ROSA GALDINO BANDEIRA* AO **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DE PRODUTOS BIOATIVOS**, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM BIOTECNOLOGIA.

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 28 DE FEVEREIRO DE 2003 DIANTE DA BANCA EXAMINADORA:

Dra. JARCILENE SILVA DE ALMEIDA CORTEZ
Departamento de Botânica – UFPE

Dr. SEBASTIÃO JOSÉ DE MELO
Departamento de Antibióticos – UFPE

Dra. MARIA ALICE GOMES DE ANDRADE LIMA
Departamento de Engenharia Química – UFPE

**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

Profa. Dra. Ana Maria Santos Cabral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS

Profa Kêsia Xisto da Fonseca Ribeiro de Sena

COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO

Profa Dra. Alda de Andrade Chiappeta

VICE-COORDENADORA DO CURSO DE MESTRADO

Profa Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque

A Deus

*“Eu pedi Forças...
e Deus me deu dificuldades para me fazer forte.
Eu pedi Sabedoria...
e Deus me deu problemas para resolver.
Eu pedi Prosperidade...
e Deus me deu cérebro e músculos para trabalhar.
Eu pedi Coragem...
e Deus me deu perigo para superar.
Eu pedi Amor...
e Deus me deu pessoas com problemas para ajudar.
Eu pedi Favores...
e Deus me deu oportunidades.
Eu não percebi nada do que pedi...
mas recebi tudo que precisava.”*

Aos Meus Pais

*“Hoje, neste momento especial,
envolto em clima de encantamento e sonho,
procuro os teus olhos na plateia...
os mesmos olhos que , ansiosos,
acompanharam meus primeiros passos;
olhos que me viram crescer
e passaram noites velando meu sono agitado;
olhos preocupados, ao ver que eu já não era
mais criança e aos poucos ganhava o mundo;
olhos que brilharam com minhas novas conquistas;
olhos intensos, ternos, que transmitiram a força
necessária nos momentos críticos;
e quando encontro estes olhos na plateia
eles estão orgulhosos e conseguem ler no meu rosto
as palavras que a emoção me impede de dizer:*

MUITO OBRIGADA!!!”

AGRADECIMENTOS

À orientadora Profa. Dra. Márcia Silva do Nascimento, do Laboratório de Química de Produtos Naturais do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela orientação, colaboração e oportunidade do desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima pela amizade, incentivo e ensinamentos durante o estágio docência, que com certeza contribuíram na minha vida profissional, acadêmica e principalmente na minha caminhada da vida, me ajudando a crescer como ser humano.

À Profa. Dra. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque pelos ensinamentos, incentivos e amizade durante o curso.

Aos Professores do Curso de Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos da Universidade Federal de Pernambuco, que contribuíram direta e/ou indiretamente para o meu aperfeiçoamento profissional.

Aos amigos, Andréa Vasconcelos Lobato, Antônio Mário Melo, Iêda Cristina da Silva Vicente, Josimar Alves de Santana, Maria Betânia Delmiro dos Santos, Maria Tereza Côrrea de Lima, Laudelina Rodrigues Magalhães e Maria do Socorro Duarte pelo apoio, companheirismo e principalmente pela amizade verdadeira que até hoje demonstram.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais, Jefferson Cunha dos Santos, Cláudia de Albuquerque Maranhão, Janaína Barbosa Pedrosa Costa, Rafaella Satva de Melo Lopes, Ana Paula de Torres Valentin, Patrícia Bezerra Gomes, Thaís Maria da Silva e Jéssica Maria Monteiro Dias pelo apoio e colaboração para o desenvolvimento do trabalho.

Ao amigo Danilo Mamede da Silva Santos pela amizade e valiosa colaboração na realização dos teste microbiológicos.

Aos amigos que reencontrei e aqueles que ganhei durante o curso.

Às amigas Ana Paula Teixeira de Souza, Angela Maria Coelho de Andrade, Elizangela Batista de Moura, Anne Cristine Costa do Nascimento, Paula Regina Xavier Leal, Patrícia Maria Sobral de Oliveira e Lourinada Luíza da Silva pelas boas conversas e alegria constante.

A todos os funcionários e estagiários do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pelo carinho e serviços prestados.

À secretária do pós-biotec Maria Suely Rodrigues Cavalcanti pelo apoio, presteza e amizade demonstrado em todas as horas.

Ao corpo técnico, Juliana Manso de Oliveira Silva, Ricardo Oliveira da Silva e Eliete Fátima Vasconcelos Barros da Silva, da central analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco pela realização dos espectros.

Aos meus pais, Bartolomeu de Melo Bandeira e Maria José Galdino Bandeira; e ao meu irmão André Luís Galdino Bandeira que suportaram todo o meu humor, dando-me forças para caminhar.

À Fundação e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro, possibilitando a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Digitoxina <u>1</u>	22
Figura 2 – Reserpina <u>2</u>	22
Figura 3 – Artemisinina <u>3</u>	23
Figura 4 – Quinina <u>4</u>	23
Figura 5 – Taxol <u>5</u>	24
Figura 6 – Mapa ilustrando as áreas de mangue no mundo	30
Figura 7 – Triterpenos isolados de <i>Terminalia chebula</i>	35
Figura 8 – Taninos isolados de <i>Terminalia arjuna</i>	36
Figura 9 – Flavonóide isolado de <i>Combretum leprosum</i>	37
Figura 10 – Ramos característicos de <i>Conocarpus erectus</i> L.	39
Figura 11 – Representação do tronco de <i>Conocarpus erectus</i> L.	40
Figura 12 – Representação da folha de <i>Conocarpus erectus</i> L.	40
Figura 13 – Representação do pecíolo de <i>Conocarpus erectus</i> L.	41
Figura 14 – Representação das flores de <i>Conocarpus erectus</i> L.	41
Figura 15 – Representação da infrutescência de <i>Conocarpus erectus</i> L.	42
Figura 16 – Coluna de separação do extrato <i>n</i> -hexânico	58
Figura 17 – Espectro de IV da substância CEF ₁ em pastilhas de KBr	65
Figura 18 – Espectro de RMN ¹³ C da substância CEF ₁	66
Figura 19 – Espectro de RMN ¹ H da substância CEF ₁	66
Figura 20 – Estrutura provável da substância CEF ₁	67
Figura 21 – Espectro de IV da substância CEF ₂ em pastilhas de KBr	70
Figura 22 – Espectro <u>6</u> e <u>7</u> de RMN ¹³ C da substância CEF ₂	71
Figura 23 – Espectro de RMN ¹ H da substância CEF ₂	72
Figura 24 – Estrutura provável da substância CEF ₂	72
Figura 25 – Espectro de IV da substância CEF ₃ em pastilhas de KBr	77
Figura 26 – Espectro de RMN ¹³ C da substância CEF ₃	77
Figura 27 – Estruturas prováveis da mistura CEF ₃	78
Figura 28 – Espectro de RMN ¹³ C da substância CEF ₄	79
Figura 29 – Estrutura do Estigmasterol	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies de mangue, sua taxonomia e distribuição global	31
Tabela 2 – Espécies de plantas do manguezal, Vila Velha, Itamaracá-PE	33
Tabela 3 – Identificação dos flavonóides, antocianinas e antocianidinas	46
Tabela 4 – Microrganismos utilizados no teste de atividade antimicrobiana	50
Tabela 5 – Dados referente à triagem química realizada com as folhas secas e trituradas de <i>Conocarpus erectus</i> L.	56
Tabela 6 – Cálculo do rendimento dos extratos bruto	57
Tabela 7 – Dados físico-químicos dos compostos isolados das folhas de <i>Conocarpus erectus</i> L.....	59
Tabela 8 – Valores de absorção da CEF ₁ no espectro de IV em pastilhas de KBr	62
Tabela 9 – Deslocamentos químicos obtidos no espectro de RMN ¹³ C da CEF ₁ comparados com a literatura (CARVALHO <i>et al.</i> , 1998)	62
Tabela 10 – Deslocamento químico dos carbonos quaternários	63
Tabela 11 – Deslocamento químico dos grupamentos metilas presentes na estrutura da substância CEF ₁	63
Tabela 12 – Valores de absorção no IV da substância CEF ₂	68
Tabela 13 – Representação dos sinais quaternários	69
Tabela 14 – Valores de absorção no IV da substância CEF ₃	74
Tabela 15 – Sinais do carbono	75
Tabela 16 – Comparação dos valores obtidos na substância CEF ₃ com dados da literatura (MAIA <i>et al.</i> , 2000)	76
Tabela 17 – Dados espectroscópicos de RMN utilizado na determinação da substância CEF ₄ (mahato; kundu, 1994)	79

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 : Obtenção dos extratos brutos de <i>Conocarpus erectus</i> L.	47
Esquema 2 : Procedimento utilizado para o teste de atividade antimicrobiana....	52
Esquema 3 : Organograma obedecido para o teste de atividade antimicrobiana	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ActOH	Acetato de etila
CLC	Cromatografia líquida em coluna
CCP	Cromatografia em camada preparativa
dd	Duplo dublete
EtOH	Etanol
Há	Hectare
IV	Infravermelho
MetOH	Metanol
MHz	Megahertz
p.f.	Ponto de fusão
p/v	Peso sobre volume
R _f	Retention factor (fator de retenção)
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
OMS	Organização mundial de saúde
MEM	Meio essencial mínimo
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão salino fosfato)

RESUMO

Substâncias bioativas provenientes de plantas demonstram um excelente aproveitamento na produção de medicamentos. Estas substâncias estão presentes em todas as espécies vegetais encontradas em diversos biomas brasileiros, dentre eles os manguezais, que vem sofrendo constante processo de devastação nos últimos anos. De acordo com a etnofarmacologia a família Combretaceae possui espécies utilizadas na medicina popular no tratamento de várias doenças. Dois gêneros desta família possuem espécies que ocorrem nos manguezais brasileiros que são *Laguncularia racemosa* e *Conocarpus erectus* L., sendo esta encontrada em menor quantidade. A espécie *Conocarpus erectus* L. também conhecida como mangue botão, fornece madeira pesada de cor avermelhada, que se tornam amarelo-clara quando secas, servindo para caibros, lenha e carvão. São utilizadas no tratamento de infecções catarrais, conjuntivites, diabetes e sífilis. Suas folhas são de forma espiraladas, com um pecíolo curto e glândulas características apresentando flores masculinas e femininas numa mesma árvore. Nosso estudo foi realizado no manguezal de Vila Velha, localizado em Itamaracá (PE), que apesar de apresentar diversos estudos científicos, não existe registro de estudo fitoquímico de nenhuma das espécies vegetais lá encontrada. Neste trabalho, realizamos a avaliação preliminar dos constituintes químicos das folhas de *Conocarpus erectus* L. de acordo com a metodologia descrita por (Matos, 1997). Avaliamos a atividade antimicrobiana dos extratos pelo método de difusão em discos de papel e a atividade citotóxica em células da Linhagem NCI-H292. O extrato *n*-hexânico foi submetido a fracionamento cromatográfico e as frações obtidas foram purificadas e analisadas por espectroscopia de RMN¹H, RMN¹³C e IV. Das cinco substâncias obtidas o CEF₄ é o estigmasterol, o CEF₃ uma mistura e CEF₁, CEF₂ e CEF₅ triterpenos pentacíclicos da série oleonena.

ABSTRACT

Plants bioactive substances demonstrate an excellent development in the search for new drugs. These substances are present in all of the vegetable species found in several Brazilian biomas, among them the growth of mangroves, that it is suffering constant devastation process in the last years. In agreement with the ethnopharmacology the family Combretaceae possesses species used in the folk medicine in the treatment of several diseases. Two goods of this family possess species that happen in the Brazilian growth of mangroves that are *Laguncularia racemosa* and *Conocarpus erectus* L., being is found in smaller amount. The species *Conocarpus erectus* L. also known as button mangrove, it supplies heavy wood of red color, that if they turn yellow-egg white when you dry, being for rafters, firewood and coal. They are used in the treatment of catarrh, conjunctivitis, diabetes and syphilis. Their leaves are in way spiraled, with a short stem and characteristic glands presenting masculine and feminine flowers in a same tree. Our study was accomplished in the growth of mangroves of Vila Velha, located in Itamaracá (PE), that in spite of presenting several scientific studies, registration of study phytochemistry doesn't exist of none of the vegetable species there found. In this work, we accomplished the screening chemical of the leaves of *Conocarpus erectus* L. in agreement with the methodology described for (Matos, 1997). we Evaluated the activity antimicrobiana of the extracts for the diffusion method in paper disks and the activity cytotoxicity in cells culture of the Linhagem NCI-H292. The extract *n*-hexânico was submitted to division chromatographyc and the obtained fractions were purified and analyzed by spectroscopy of ¹HNMR, ¹³CNMR and Infra-red. Of the five obtained substances CEF4 is the stigmasterol, CEF3 a mixture of the α - β -amirina and CEF1, CEF2 and CEF5 pentacyclic triterpenoides of the series oleonena.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE ESQUEMAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiii
SUMÁRIO	xiv
1. INTRODUÇÃO	18
1.1. A importância da biodiversidade na descoberta de novos fármacos	19
2. OBJETIVOS	26
2.1. Geral	26
2.2. Específicos	26
3. REVISÃO DA LITERATURA	28
3.1. Os manguezais	28
3.2. Distribuição global do mangue	29
3.3. O mangue brasileiro	33
3.4. Descrição da espécie em estudo	34
3.4.1. Classificação taxonômica	34
3.4.2. Família Combretaceae	34
3.4.3. Gênero <i>Conocarpus</i>	37
3.4.4. Espécie <i>Conocarpus erectus</i> L.	38
3.4.5. Descrição botânica	39
4. MATERIAL E MÉTODOS	44
4.1. Coleta do material botânico	44
4.2. Processamento das folhas de <i>Conocarpus erectus</i> L.	44
4.3. Avaliação fitoquímica preliminar dos constituintes químicos.....	44
4.3.1. Teste para alcalóides	44

4.3.2. Teste para esteróides e triterpenóides (Lieberman-Burchard).....	45
4.3.3. Teste para flavonóides, antocianinas e antocianidinas	46
4.3.4. Teste para saponinas	46
4.3.5. Teste para taninos e fenóis	46
4.4. Obtenção dos extratos brutos de <i>Conocarpus erectus</i> L.	47
4.5. Métodos cromatográficos	48
4.6. Métodos espectroscópicos	49
4.7. Ponto de fusão	49
4.8. Atividade biológica	50
4.8.1. Teste de atividade antimicrobiana	50
4.8.2. Meios de cultura	50
4.8.3. Preparo dos inóculos	51
4.8.4. Teste de difusão em disco de papel	51
4.8.5. Teste de atividade citotóxica	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
5.1. Teste preliminar dos constituintes químicos no extrato bruto das folhas de <i>Conocarpus erectus</i> L.	56
5.2. Obtenção dos extratos bruto das folhas de <i>Conocarpus erectus</i> L.	57
5.3. Estudo fitoquímico do extrato <i>n</i> -hexânico das folhas de <i>Conocarpus erectus</i> L.	57
5.4. Propriedades físico-químicas dos compostos obtidos no fracionamento do extrato <i>n</i> -hexânico	59
5.5. Análise cromatográfica	60
5.5.1. Cromatografia em coluna líquida em camada (CLC) do extrato <i>n</i> -hexânico	60
5.5.2. Lavagem do precipitado do grupo 12, frações 40-61	60
5.6. Análise espectroscópica	61
5.6.1. Identificação da substância CEF ₁	61
5.6.1.1. Estrutura provável para a substância CEF ₁	67
5.6.2. Identificação da substância CEF ₂	67
5.6.2.1. Estrutura provável para a substância CEF ₂	72
5.6.3. Identificação da substância CEF ₃	73

5.6.3.1. Estrutura provável para a substância CEF ₃	78
5.6.4. Identificação da substância CEF ₄	78
5.6.4.1. Estrutura provável para a substância CEF ₄	80
5.6.5. Identificação da substância CEF ₅	80
5.7. Atividade biológica	81
5.7.1. Teste de atividade antimicrobiana	81
5.7.2. Teste de atividade citotóxica	81
6. CONCLUSÕES	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86