

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Dissertação de Mestrado

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOFARMACOLÓGICO DE *Clusia grandiflora* (CLUSIACEAE)**

Amanda de Jesus Alves Miranda

São Luís

2021

Amanda de Jesus Alves Miranda

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOFARMACOLÓGICO DE *Clusia grandiflora* (CLUSIACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof Dr^a Cláudia Quintino da Rocha

São Luís

2021

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Diretoria Integrada de Bibliotecas/UFMA

Miranda, Amanda de Jesus Alves.

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL
BIOFARMACOLÓGICO DE *Clusia grandiflora* CLUSIACEAE / Amanda
de Jesus Alves Miranda. - 2021.

77 p.

Orientador(a): Cláudia Quintino da Rocha.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Química/ccet, Universidade Federal do Maranhão, São Luís,
2021.

1. Benzofenonas polipreniladas. 2. Clusiaceae. 3.
Flora Maranhense. 4. Frutos. I. da Rocha, Cláudia
Quintino. II. Título.

AMANDA DE JESUS ALVES MIRANDA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOFARMACOLÓGICO DE
Clusia grandiflora

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Química.

Aprovada em: 25/10/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Cláudia Quintino da Rocha (Orientadora-UFMA)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Roberto Batista de Lima (UFMA)
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof^a Dr^a Juliana Mara Serpeloni (UEL)
Universidade Estadual de Londrina-UEL

SÚMULA CURRICULAR

DADOS PESSOAIS

Nome: Amanda de Jesus Alves Miranda

Naturalidade: São Luís/MA

Nacionalidade: Brasileira

Formação Acadêmica

Graduação (2014 – 2018)

Licenciatura em Química – Universidade Estadual do Maranhão – UEMA – Campus São Luís.

Pós-Graduação: Mestrado concluído (2019-2021)

Mestrado em Química, realizado no Departamento de Química da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), tendo como orientadora Prof^ª Dra. Cláudia Quintino da Rocha.

Título do Projeto: Caracterização química e avaliação do potencial biofarmacológico de *Clusia grandiflora* (Clusiaceae)

TRABALHOS CIENTÍFICOS

Resumos em congressos

1. MIRANDA, A.J.A.; LIMA, C.A.; CUBERO, M.C.; FRANCO, Y.E.; RODRIGUES, C.D.; NASCIMENTO, J.R.; VENDRAMI-COSTA, D.B.; LONGATO, G.B.; ROCHA, C.Q. Atividade antiproliferativa de flavonoides diméricos raros, isolados das raízes de *Arrabidaea brachypoda*. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso)
2. MIRANDA, A.J.A.; PINHEIRO, A.A.; ROSÁRIO, M.S.; SOARES, I.S.; FARIAS, J.R.; CHAGAS, V.T.; GUERRA, R.N.M.; ROCHA, C.Q. Caracterização química e avaliação do potencial biológico de *Clusia grandiflora*. 2020. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Artigos Submetidos

1. Taxonomic, chemical and pharmacological *Annona tomentosa*R. E.Fr. aspects: A brief review.

Artigos em Redação

1. Chemical, biological and pharmacological aspects of the *Arrabidaea* genus.
2. Evaluation of antioxidante and anti-inflammatory potential of leaf extract of *Arrabidaea brachypoda* and quantification of the chemical marker.

Aos meus pais, minha razão de viver, por todas as vezes que lutaram por mim, por todo apoio e confiança em minhas escolhas e em minha capacidade!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter me dado saúde e forças para superar todas as dificuldades, permitindo que tudo isso acontecesse ao longo de minha vida.

Minha eterna gratidão especial a Profa Dr^a. Cláudia Quintino, minha orientadora e, sobretudo, uma querida e grande amiga, um exemplo de profissional. Obrigada por sua dedicação, que a fez por muitas vezes deixar de lado os seus momentos de descanso para me orientar. E, principalmente, obrigada por ter me aceitado sem nunca ter me visto na sua vida, e por ter depositado total confiança ao longo desses dois anos. Sem sua orientação, apoio, confiança, esse trabalho não teria chegado até aqui.

Aos meus pais, Berenice e Sérgio, por me mostrar que o estudo é a base de tudo, e que apesar de todas dificuldades, vocês me fortaleceram, me apoiaram e me deram tudo o que mais precisei desde a minha graduação. Vocês lutaram para que eu chegasse até aqui e sempre com muito amor. Obrigada, pai e mãe, dedico o meu diploma de mestra a vocês !

Às minhas irmãs, Bruna, Tati e Isa, que sempre estiveram ao meu lado sorrindo, chorando, mas sempre dispostas a caminharem comigo.

À minha avó Esmeralda (*in memoriam*), que eu tenho certeza que está feliz com essa minha conquista. As minhas tias da família Miranda e as minhas tias da família Alves, obrigada por todo apoio, vocês sempre lutaram por mim ! Muito obrigada, minhas tias !

Ao meu namorado Víctor Antônio por estar comigo em todos os momentos, obrigada por tudo, obrigada pela paciência, compreensão, carinho, amor e por me ajudar muitas vezes a achar soluções quando elas pareciam não existir.

Às professoras Mayara Cristina e Rosane Guerra por colaborarem neste trabalho, sempre com maior dedicação.

Um agradecimento especial a todos os meus amigos e colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN), especialmente a Aldilene e Aglaete, obrigada por toda amizade, acolhimento e ensinamento desde o 1º dia que pisei no laboratório, obrigada por tudo!

À todos os amigos e colaboradores de diversos laboratórios, especialmente meu amigo Régis, uma pessoa brilhante, sempre disponível a colaborar nos ensaios biológicos, muito obrigada, amigo ! Obrigada por estar comigo neste árduo percurso!!

À todos os professores que fazem parte do programa de Pós Graduação em Química (PPGQuim), obrigada por todo conhecimento disponibilizado.

À UFMA pela vaga do mestrado disponibilizada, pela sua infraestrutura e laboratórios.

À CAPES pela financiamento da bolsa do mestrado e do projeto PROCAD-AM.

RESUMO

Os produtos naturais, apresentam diversos metabólitos com elevado potencial terapêutico, tendo em vista sua ampla diversidade química e biológica. As plantas medicinais têm sido utilizadas empiricamente pela população para o tratamento de diversas doenças. O Brasil se destaca pelo uso de diversas plantas medicinais no tratamento de diferentes patologias. Nessa perspectiva o presente estudo teve como objetivo caracterizar os metabólitos secundários presentes no extrato dos frutos de *Clusia grandiflora*, conhecida popularmente como “cebola berrante”; uma espécie amplamente utilizada na medicina tradicional do estado do Maranhão; avaliar o potencial antioxidante, citotóxico (*in vivo* e *in vitro*) e antimicrobiano em extrato e frações, frente à duas bactérias e um fungo. Através da Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas (HPLC-MS) foram identificadas, no extrato bruto (EBCG), dez substâncias e na fração diclorometano (FDCG), oito substâncias, pertencentes à classe das benzofenonas. O resultado do ensaio de atividade antioxidante mostrou que em uma concentração de 1000 µg/mL, o extrato bruto inibiu 94,27% de radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil). Os resultados biológicos mostraram que o extrato bruto apresentou uma citotoxicidade a partir da concentração de 10 mg/mL nos dois ensaios realizados (*in vitro* e *in vivo*), diferente das frações (diclorometano e aquosa) que não apresentaram toxicidade em nenhuma das concentrações avaliadas. Realizou-se estudos para a avaliação do potencial antimicrobiano do extrato e das frações através do teste de microdiluição e do ágar difusão, em que o extrato e a fração diclorometano apresentaram promissoras atividade antimicrobiana nas três cepas avaliadas. Pelo teste de difusão em ágar, o extrato etanólico mostrou-se ativo nas primeiras concentrações avaliadas frente *S.aureus*, apresentando valores menores ao controle fluconazol (FLZ). A atividade leishmanicida mostrou que a fração diclorometano apresentou resultado similar ao do controle, a pentamidina, nas concentrações de 1000 e 500 µg/mL, e o extrato etanólico apenas na concentração de 1000 µg/mL. A atividade da enzima α -glucosidase mostrou que o extrato e a fração diclorometano não mostraram inibição, ao contrário da fração aquosa que mostrou inibição na concentração de 100 µg/mL, equivalente a 17,43%. Estudo *in silico* avaliaram o potencial de inibição da enzima alfa glucosidase dos compostos identificados por HPLC-MS, através de métodos como o PBSA e GBSA, em que destacou-se dois compostos (nemorosona e garcinol) que apresentaram interação do complexo e da proteína. A partir deste primeiro trabalho realizado com os frutos da *Clusia*, é possível

comprovar o potencial biofarmacológico do extrato etanólico de *Clusia grandiflora* e da fração diclorometano frente às atividades testadas.

Palavras-Chaves: Frutos. Clusiaceae. Benzofenonas polipreniladas. Flora Maranhense

ABSTRACT

Natural products have several metabolites with high therapeutic potential, given their wide chemical and biological diversity. Medicinal plants have been used empirically by the population to treat various diseases. Brazil stands out for the use of various medicinal plants in the treatment of different pathologies. In this perspective, the present study aimed to characterize the secondary metabolites present in the extract of the fruits of *Clusia grandiflora*, popularly known as “cebola berrante”; an expanded species in traditional medicine in the state of Maranhão; evaluate the antioxidant, cytotoxic (*in vivo* and *in vitro*) and antimicrobial potential in extracts and fractions, against two bacteria and one fungus. By Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry (HPLC-MS) ten substances were identified, not crude extract (EBCG), and in the dichloromethane fraction (FDCG), eight substances belonging to the benzophenone class. The result of the antioxidant activity test revealed at a concentration of 1000 µg/mL, the crude extract inhibited 94.27% of the DPPH radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). The biological results induced that the crude extract showed a cytotoxicity from the concentration of 10 mg/mL in the two tests performed (*in vitro* and *in vivo*), different from the fractions (dichloromethane and diarrhea) that did not dissipate in any of the evaluated evaluations. Studies were carried out to evaluate the antimicrobial potential of the extract and fractions through the microdilution test and agar diffusion test, in which the dichloromethane extract and fraction used showed promising antimicrobial activity evaluated in the three strains. By the agar diffusion test, the ethanolic extract was known to be active in the application tools evaluated against *S.aureus*, groups values lower than the fluconazole control (FLZ). The leishmanicidal activity showed that the dichloromethane fraction had a similar result to the control, pentamidine, at the concentrations of 1000 and 500 µg/mL, and the ethanol extract only at the concentration of 1000 µg/mL. The activity of the α-glucosidase enzyme showed that the extract and the dichloromethane fraction showed no inhibition, unlike the aqueous fraction, which showed inhibition at a concentration of 100 µg/mL, equivalent to 17.43%. An *in silico* study evaluated the potential of inhibition of the alpha glucosidase enzyme of the compounds identified by HPLC-MS, through methods such as PBSA and GBSA, in which two compounds (nemoroson and garcinol) that showed interaction of the complex and the protein were highlighted. From this first work carried out with the fruits of *Clusia*, it is possible to prove the biopharmacological potential of the ethanol extract of *Clusia grandiflora* and the dichloromethane fraction against the activities tested.

Keywords: Fruits. Clusiaceae. Polyprenylated benzophenones. Flora Maranhense

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Detalhes da parte interna de <i>Clusia grandiflora</i>	20
Figura 2: Esqueleto químico básico das benzofenonas.....	24
Figura 3: Estrutura do grupo prenil.....	25
Figura 4: Estrutura do grupo geranil.....	25
Figura 5: Estruturas das benzofenonas, tipo A, B, C e D.....	25
Figura 6: Estrutura da Nemorosona, Clusianona e 7 epi-clusianona.....	26
Figura 7: Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo positivo, do extrato etanólico dos frutos de <i>Clusia grandiflora</i> . Coluna Phenomex Luna C18 (250x4,6nm;5µm) fluxo 1mL/min.A(254nm);B(365nm).....	36
Figura 8: Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo positivo, da fração diclorometano dos frutos de <i>Clusia grandiflora</i> . Coluna Phenomex Luna C18 (250x4,6nm;5µm) fluxo 1mL/min.A(254nm);B(365nm).....	37
Figura 09: Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo positivo, do extrato etanólico dos frutos de <i>Clusia grandiflora</i>	38
Figura 10: Cromatograma HPLC-ESI-IT-MS, modo positivo da fração diclorometano dos frutos de <i>Clusia grandiflora</i>	39
Figura 11: Estruturas das substâncias identificadas no extrato etanólico e na fração diclorometano dos frutos de <i>Clusia grandiflora</i>	40
Figura 12: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e Ms ⁿ referentes à <i>m/z</i> 553(EBCG).....	42
Figura 13: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e Ms ⁿ referentes à <i>m/z</i> 553 (FDCG).....	43
Figura 14: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e Ms ⁿ referentes à <i>m/z</i> 1037(EBCG).....	44
Figura 15: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e Ms ⁿ referentes à <i>m/z</i> 1037(FDCG).....	44
Figura 16: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e Ms ⁿ referentes à <i>m/z</i> 519(EBCG).....	45
Figura 17: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e Ms ⁿ referentes à <i>m/z</i> 519(FDCG).....	46

Figura 18: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 520(EBCG).....	47
Figura 19: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 520(FDCG).....	48
Figura 20: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 503(EBCG).....	49
Figura 21: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 503(FDCG).....	49
Figura 22: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 503(EBCG).....	50
Figura 23: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 503(FDCG).....	50
Figura 24: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 603(EBCG).....	52
Figura 25: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 603(FDCG).....	52
Figura 26: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 603(EBCG).....	53
Figura 27: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 603(EBCG).....	54
Figura 28: Espectros de ESI-MS, modo positivo full scan e M_s^n referentes à m/z 603(EBCG).....	54
Figura 29: Atividade antioxidante do extrato e das frações avaliadas por 1,1–difetil-2-picrilhidrazil (DPPH).....	56
Figura 30: Atividade hemolítica do extrato e das frações em sangue de carneiro	58
Figura 31: Curva de sobrevivência das larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	59
Figura 32: Ensaio de ágar difusão.	65
Figura 33: Efeito <i>in vitro</i> do extrato e das frações de <i>Clusia grandiflora</i> em amastigotas de <i>Leishmania amazonenses</i>	66
Figura 34: Moléculas analisadas para a docagem molecular	68
Figura 35: Gráfico comparativo dos 3 ligantes pelo método PBSA e GBSA	69
Figura 36: Relação do ranking pelo método GBSA com o autodock	69
Figura 37: RMSD dos complexos, lig1(nemorosona), lig4(propolona C) e lig7(garcinol).	69
Figura 38: RMSD das proteínas, sys1, sys2 e sys3	70

LISTAS DE TABELAS E ESQUEMAS

Tabela 1: Caracterização dos compostos por HPLC-ESI-IT-MS do extrato bruto de <i>Clusia grandiflora</i>	39
Tabela 2: Caracterização dos compostos por HPLC-ESI-IT-MS da fração diclorometano do extrato de <i>Clusia grandiflora</i>	40
Tabela 3: Valores de IC ₅₀ do extrato e das frações no ensaio de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).	56
Tabela 4: Concentração inibitória mínima (CIM) do EBCG, FDCG e FACG, antibiótico Imipenem (IMP) e Fluconazol (FLZ)	61
Tabela 5: Zona de inibição (mm) do extrato etanólico dos frutos de <i>Clusia grandiflora</i> e antibiótico Imipenem (IMP).	63
Tabela 6: Zona de inibição (mm) da fração diclorometano dos frutos do extrato de <i>Clusia grandiflora</i> e antibiótico Imipenem (IMP).	64
Tabela 7: Zona de inibição (mm) da fração aquosa dos frutos do extrato de <i>Clusia grandiflora</i> e antibiótico Imipenem (IMP).	64
Tabela 8: Ensaio de atividade inibitória de α -glucosidase do EBCG, FDCG e FACG.....	67
Tabela 9: Valores das energias (GBSA e PBSA) dos ligantes analisados.	68
Esquema 1: Esquema geral da biossíntese das benzofenonas	24
Esquema 2: Proposta de fragmentação da propolona B	43
Esquema 3: Proposta de fragmentação da propolona C	45
Esquema 4: Proposta de fragmentação da propolona D.....	46
Esquema 5: Proposta de fragmentação da garcinielipitona I	48
Esquema 6: Proposta de fragmentação da nemorosona	49
Esquema 7: Proposta de fragmentação da propolona A.....	51
Esquema 8: Proposta de fragmentação da gutiferona A.....	53
Esquema 9: Proposta de fragmentação da gutiferona E.....	53
Esquema 10: Proposta de fragmentação do garcinol	54
Esquema 11: Proposta de fragmentação do xantocimol.....	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BHI – Ágar Infusão de Cérebro e Coração

ACN–Acetonitrila

AMH – Ágar Muller Hinton

ASD – Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC – American Type Culture Collection

C18 – Sílica ligada à cadeia de carbono octadecil

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CIM – Concentração inibitória mínima

CL₅₀ – Concentração letal média

CTRL – Controle

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2 – difenil – 1 – picrilhidrazila

EBCG – Extrato bruto *Clusia grandiflora*

ESI – Fonte de ionização eletrospray

EtOH – Etanol

FACD – Fração aquosa *Clusia grandiflora*

FDCG – Fração dicloro *Clusia grandiflora*

HPLC-PDA – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção de matriz fotodiódodo

HPLC-UV/VIS – Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta e visível

IC₅₀ – Concentração inibitória 50%

IT – Analisador de armadilha de Íons

m/z – relação massa/carga

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

PBS – Tampão fosfato salino

HPLC-ESI-IT-MS – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com ionização por eletrospray e analisador do tipo íon-trap.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVO	19
2.1 – Objetivo Geral.	19
2.2 – Objetivos Específicos.	19
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	20
3.1 – Gênero <i>Clusia</i> , Família Clusiaceae	20
3.2 – Atividade antimicrobiana na Família Clusiaceae	22
3.3 – Benzofenonas polipreniladas.	23
3.4 – Estudos <i>in silico</i> e as benzofenonas polipreniladas.	26
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 – Procedimentos fitoquímicos.	28
4.1.1 – Coleta.....	28
4.1.2 – Preparo do extrato	28
4.1.3 – Partição líquido/líquido	28
4.2 – Identificação dos constituintes químicos do extrato de <i>Clusia grandiflora</i>	28
4.2.1 – Perfil cromatográfico do extrato etanólico dos frutos de <i>Clusia grandiflora</i> e da fração diclorometano por HPLC-UV	29
4.2.2 – Caracterização do EBCG e da FDCG por HPLC-ESI-IT/MS	29
4.3 – Avaliação do potencial antioxidante do EBCG, FDCG e FACG por DPPH.....	29
4.4 – Avaliação do potencial citotóxico por hemólise de eritrócitos do EBCG, FDCG e FACG.....	29
4.5 – Avaliação da toxicidade aguda <i>in vivo</i> do EBCG, FDCG e FACG em modelo invertebrado (<i>Tenebrio molitor</i>)	30
4.5.1 – Aquisição e manutenção das larvas de <i>Tenebrio molitor</i>	30
4.5.2 – Ensaio da toxicidade aguda	30
4.5.3 – Análise estatística	31
4.6 – Avaliação da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> do EBCG, FDCG e FACG.....	31
4.6.1 – Microorganismos.....	31
4.6.2 – Ensaio de ágar difusão em poços.	31

4.6.3 – Determinação da concentração inibitória mínima	32
4.7 – Atividade Anti-Leishmanicida	33
4.7.1 – Atividade antipromastigota do EBCG, FDCG e FACG de <i>Clusia grandiflora</i>	33
4.8 – Ensaio de inibição de α -glicosidase.....	33
4.9 – Docagem molecular.	34
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1– Identificação das moléculas presentes no EBCG e na FDCG do fruto de <i>Clusia grandiflora</i>	35
5.2 – Potencial antioxidante do EBCG, FDCG e FACG pelo método do DPPH.....	54
5.3 – Potencial de hemólise do EBCG, FDCG e FACG.	56
5.4 – Determinação da concentração inibitória mínima (MIC)	59
5.5 – Ágar difusão.	61
5.6 – Atividade Anti-leishmanicida.....	64
5.7 – Ensaio de inibição de α -glicosidase.....	65
5.8 – Docagem Molecular.	66
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

