

Análise do perfil metabólico da espécie *Acalypha herzogiana* pelo método de ressonância magnética nuclear (RMN) na caracterização da constituição química da planta.

Analysis of the metabolic profile of the species *Acalypha herzogiana* by the nuclear magnetic resonance (NMR) method in the characterization of the chemical constitution of the plant.

RESUMO

Carolina Pinheiro Machado Sanches
carolinasanches@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Rosilene Aparecida Prestes
raprestes@yahoo.com.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

Rafael Felipe Tasaka de Melo
rafaeltasaka@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Ponta Grossa, Paraná, Brasil

A espécie *Acalypha herzogiana*, conhecida popularmente por “rabo-de-gato”, pertence ao gênero *Acalypha* e a família Euphorbiaceae. Pesquisas sobre esse gênero mostram espécies utilizadas pela medicina tradicional e algumas aparecem na farmacopeia homeopática. Visto assim que haja um potencial para a espécie de estudo e considerando que atualmente os estudos existentes sobre a espécie são voltados para a taxonomia, este trabalho possui como objetivo analisar as diferentes estruturas da planta (folha, caule e flor) pela investigação química afim de levantar a presença de substâncias de interesse científico. Assim, utilizou-se a ressonância magnética nuclear (RMN) com frequências de 600 MHz para os espectros de ^1H , pois é uma técnica instrumental que possibilita a identificação direta dos componentes, é um método não destrutivo e que possui alta seletividade. Os resultados obtidos forneceram resultados preliminares frente a presença de ácido málico, frutose, flavonoide e álcoois na flor, galato de metila no galho e com a análise dos sinais dos espectros da folha da espécie precede adipato de dimetila. Conclui-se que os resultados são condizentes com a composição química de outras plantas já estudadas e de modo a obter uma melhor visualização do metaboloma propõem-se análises de cromatografia gasosa no futuro.

PALAVRAS-CHAVE: Rabo-de-gato. Metaboloma. Plantas- Composição.

ABSTRACT

The species *Acalypha herzogiana*, known as “rabo-de-gato”, belongs to the genus *Acalypha* and the family Euphorbiaceae. This species is believed to have research potential as its genus shows important applications. This work has the objective to analyze the different plant structures (leaf, stem and flower) by the nuclear magnetic resonance (NMR) with frequencies of 600 MHz for the spectra of ^1H to promote the presence of components of scientific interest. The method was chosen because besides being non-destructive, it allows a direct identification of the components and has high selectivity. The results provided preliminary presence of malic acid, fructose, flavonoid and alcohols in the flower, methyl gallate in the stalk and dimethyl adipate in the leaf. For a better visualization of the metabolome, future gas chromatographic analysis is proposed.

KEYWORDS: Rabo-de-gato. Metabolome. Plants- Composition.

Recebido: 19 ago. 2019.

Aprovado: 01 out. 2019.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

O gênero *Acalypha*, de acordo com Souza et al. (2017, p. 337), conhecida popularmente por “rabo-de-gato” possui aproximadamente 450 espécies e distribuição pantropical, é o terceiro maior gênero de Euphorbiaceae, a qual é uma das maiores famílias de Angiospermas. Segundo os autores ainda, a espécie manifesta hábito herbáceo ou subarborescente similar à *A. multicaulis*, entretanto, *A. herzogiana* possui poucas ramificações, com longa e delicada inflorescência estaminada terminal e a bráctea pistilada é orbicular e diminuta. Pesquisas sobre o gênero *Acalypha* apresentaram espécies conhecidas na medicina tradicional e algumas as quais aparecem na farmacopeia homeopática. Os autores Govindarajan et al. (2008, v.12, p. 299-302) relataram usos da espécie *Acalypha indica* L. com tratamento de pneumonia, asma, reumatismo e atividade contraceptiva. Enquanto as folhas secas dessa espécie são transformadas em cataplasma e o suco da mesma adicionado com cal ou óleo usados como tratamento de pele.

Os autores Krishnaraj et al. (2010, v.76, p.50-56) indicaram estudos da aplicação dos extratos de folha da espécie *A. indica* para a elaboração de nanopartículas de prata biossintetizadas que possuem comprovada atividade antimicrobiana de células bacterianas analisadas com nanopartículas de prata. Já os autores Adesina et al. (2000, p.371 apud Oliver, 1959) indicaram que o suco expresso nas folhas da espécie *A. wilkesiana* é utilizado no tratamento da pitiríase versicolor e outras infecções de pele semelhantes. Os autores Adesina et al. (2000, p. 371 apud Schindler, 1939) relataram também aplicação das folhas da espécie *A. hispida* no tratamento de feridas, úlcera, abscessos, compressas em lepra. Visto o potencial do gênero dessa espécie e considerando que atualmente os estudos sobre a espécie *A. herzogiana* são voltados para a taxonomia da mesma, o presente estudo tem como fim realizar a análise dos metabólitos da planta pela investigação química da espécie.

A análise metabolômica não há uma metodologia padrão para ser realizada. Entre as técnicas relatadas para a função encontram-se: métodos baseados na espectroscopia de infravermelho (FTIR), ressonância magnética nuclear (RMN), cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa (GC) e espectrometria de massas. De acordo com Caprini (2007, p.35) a seleção das técnicas envolve um compromisso entre velocidade, seletividade e sensibilidade. Para o projeto, a técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi escolhida em razão da possibilidade de identificação direta dos componentes pelos sinais verificados, por ser um método não destrutivo, não invasivo e quase que totalmente automatizado. Para o projeto a técnica de RMN, que apesar de apresentar baixa sensibilidade, foi escolhida requerer amostras mais concentradas para análise, suas vantagens prevalecem sobre as demais técnicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o desenvolvimento do projeto foram coletadas amostras da espécie *A. herzogiana* na região dos Campos Gerais, as quais passaram por uma classificação visual com o objetivo de selecionar amostras isentas de contaminações que pudessem ser constatadas. Em seguida, foram lavadas com água corrente e reunidas em grupos de folhas (F), galhos (G) e flores (F). Estes grupos foram pesados e separados em aglomerados de maneira com que o experimento pudesse ser realizado em duplicata.

Após nomeadas, as amostras foram reduzidas em pequenas partículas e pesadas, mantidas à 30°C na estufa do laboratório de Lácteos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelo período de 12 dias. Esta temperatura foi definida e mantida constante a fim de não degradar possíveis grupos funcionais dos óleos da espécie de estudo que segundo Brito (2014, p. 39) apesar da produção de óleos essenciais ser mais efetiva em ambientes com altas temperaturas, caso o aumento seja excessivo o teor poderá ser diminuído. Após serem retiradas da estufa as amostras foram sujeitas à extração hexânica, permaneceram por 1 dia na estufa à 30°C e iniciou o preparo para à extração hidroalcoólica. Para tanto, as amostras foram pesadas, embaladas com papel de filtro em formato de cone e submetidas a extração via Soxhlet, utilizando solvente hidroalcoólico a 80%.

As 6 amostras preparadas foram extraídas por aproximadamente 8 horas até a exaustão completa do material vegetal. O álcool foi logo em seguida evaporado em evaporador rotativo e a água em um liofilizador após as amostras permanecerem por 48 horas em um ultrafreezer mantido à -23,8°C. Em seguida, foram efetuadas as análises dos extratos hidroalcoólicos com a técnica espectroscópica de RMN de ^1H operando a 600 MHz na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) em São Carlos, utilizando como solvente água deuterada e o preparo ocorreu utilizando 50 mg de amostra de extrato para 300 mL da solução TMS preparada com 300 mL D₂O, homogeneizados e centrifugados. Os espectros de RMN em alta resolução foram adquiridos em espectrômetro Ascend modelo Bruker 600, com campo de 9,4 Tesla, com modo de operação de pulso com transformada de Fourier e frequências de 600 MHz. A análise dos espectros ocorreu pelo programa TopSpin versão 3.6.1

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme descrito na metodologia, no quadro 1 encontra-se a relação de massa obtida das amostras ao longo do procedimento com a massa inicial após terem sido moídas e secas na estufa, massa obtida após a extração hexânica e a massa obtida após a extração hidroalcoólica.

Quadro 1 - Relação de massa obtida antes e após a extração a quente por solvente.

Amostras	Massa inicial [g]	Massa após Extrato Hexânico [g]	Massa após Extrato Hidroalcoólico [g]	Massa ext. Hex. - Massa ext. Hidroalcoólico
FOLHA				
Amostra 1:	6,1145	6,0625	4,9710	1,0915
Amostra 2:	6,2124	6,1480	5,2110	0,9370
GALHO				
Amostra 1:	6,7864	6,6443	5,9390	0,7053
Amostra 2:	6,8828	6,7103	6,1180	0,5923
FLOR				
Amostra 1:	8,1977	8,1317	5,3900	2,7417

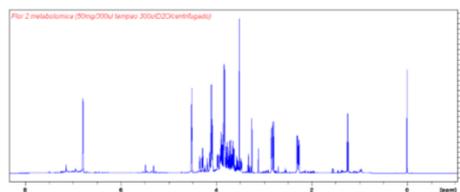
Amostra 2:	8,1620	8,1306	5,3200	2,8106
------------	--------	--------	--------	--------

Fonte: Autoria própria (2019).

A média da massa obtida da subtração do extrato hexânico com o extrato hidroalcoólico das amostras de folhas é de $1,0143 \pm 0,0773$ g e rendimento de 82%. Nas amostras de galho a média da massa é de $0,6488 \pm 0,0565$ g e rendimento de 89,4%. Já nas flores, a média é de $2,7762 \pm 0,0345$ g e rendimento de 66,3%.

Os estudos dos espectros de ^1H nas flores (Figura 1) e para as outras partes estudadas (Figura 2a e 2b, referentes a folha e galho, respectivamente) forneceram espectros bastante semelhantes entre as duplicadas. No caso das flores, em ambas amostras o deslocamento químico máximo encontrado do espectro foi em 7 ppm como pode ser observado na Figura 1. O sinal relativo na região 4,01 a 3,96 pressupõem ser o sinal da frutose. A presença de dois duplos dupletos ao redor de 4,35 ppm e 2,8 ppm sugerem a presença de ácido málico. O tripleto encontrado na região de 1,3 a 1,2 ppm sugere sinal de etanol e próximo a 1,5 ppm de propanol. No deslocamento químico correspondente a 6,8 ppm sugere sinal de flavonóide. Ademais, nota-se a presença de água deuterada pelo sinal próximo de 4,7 ppm. Essas estruturas foram identificadas por comparação dos dados espectroscópicos de RMN ^1H obtidos com os relatados na literatura.

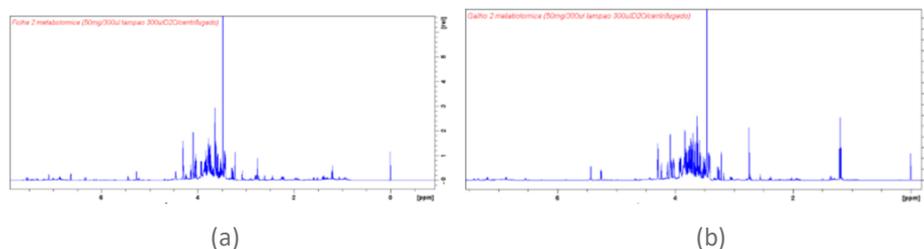
Figura 1 – Espectros do RMN de ^1H do perfil metabólito de extrato hidroalcoólico da flor da espécie *Acalypha herzogiana*.



Fonte: Autoria própria (2019).

Os estudos do espectro de ^1H (Figura 2a) das folhas apresentaram em ambas as alíquotas deslocamento máximo encontrado em 7,6 ppm. Devido a isso, ao comparar os sinais com a literatura possivelmente não há presença de aldeídos visto que as regiões características desses se encontram entre 9 e 10 ppm. E pouco provável a presença de aromáticos e heteroaromáticos, pois a região característica de deslocamento é de 6 a 9 ppm, enquanto que no espectro obtido apenas há simpletos nessa região. Os sinais obtidos próximos aos deslocamentos 3,5 ppm, 2,5 ppm e 1,5 ppm supõe a presença de adípato de dimetila. Nos estudos do espectro de ^1H nos galhos (Figura 2b), nota-se também um deslocamento químico máximo próximo de 7,5 ppm. E ao analisar os sinais e comparar com a literatura presume a presença de galato de metila.

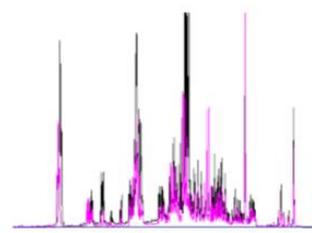
Figura 2 – Espectros do RMN de ^1H do perfil metabólito de extrato hidroalcoólico da espécie *Acalypha herzogiana*: (a) folha; (b) galho.



Fonte: Autoria própria (2019).

O perfil metabólico da planta estudada por meio dos espectros de ^1H foram obtidos a partir da normalização com relação a área do sinal em 0 ppm do tetrametilsilano (TMS). As substâncias foram extraídas em polaridades diferentes para que todos os constituintes, ou a maior parte deles pudessem ser extraídos. Primeiramente, com o uso do software TopSpin 3.6.1 da Bruker foi processado os espectros, os quais foram plotados no software Origin para que se pudesse contrapor os espectros das amostras que foram realizadas em duplicadas e, assim, analisar por analogia as conformidades dos componentes com suas respectivas identificações (Figura 3).

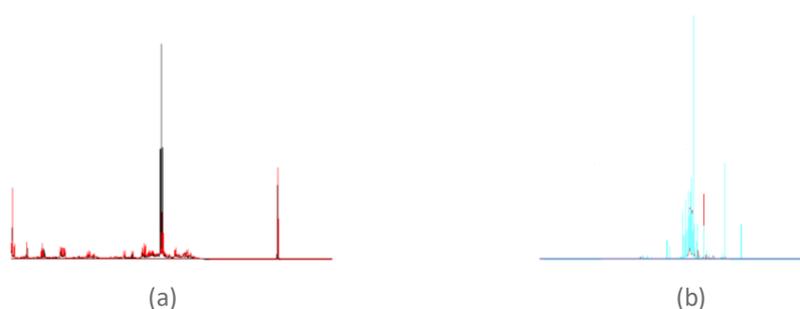
Figura 3 – Sobreposição dos espectros de ^1H nas alíquotas das flores. A coloração preta representa a flor 1 e a coloração rosa representa a flor 2.



Fonte: Autoria própria (2019).

Novamente foi realizado a sobreposição dos espectros obtidos (Figuras 4a e 4b) das duplicatas da amostra de folha e galho para que pudesse ser realizado uma análise visual entre os espectros.

Figura 4 – Sobreposição dos espectros de ^1H nas alíquotas: (a) das folhas, a coloração preta representa a folha 1 e a coloração vermelha representa a folha 2; (b) no galho, a coloração azul representa o galho 1 e a coloração vermelha representa o galho 2.



Fonte: Autoria própria (2019).

Esta análise tem por objetivo, segundo Lião et al. (2012, p. 1306 – 1311) conferir se as diferenças espectrais, onde possuem origem da composição das amostras estão associadas a problemas nas medições espectroscópicas, como por exemplo mau ajuste do campo magnético na região próxima à amostra, correção de fase e linha de base, entre outros.

CONCLUSÃO

As análises dos extratos hidroalcoólicos da espécie *Acalypha herzogiana* por meio do RMN possibilitou resultados preliminares frente a presença de ácido

málico, frutose, flavonoide, álcoois, galato de metila e adipato de dimetila. Essas identificações enriquecem cientificamente a área da botânica, química e outras áreas afins. Conclui-se que a técnica utilizada possui alta seletividade e precisão e para complementar a visualização do metaboloma propõem-se análises de cromatografia gasosa no futuro.

AGRADECIMENTOS

À UTFPR e a Embrapa Instrumentação, São Carlos – SP.

REFERÊNCIAS

SOUZA, A.A.C; CORDEIRO I.; CARDIEL, J., M.; CARUZO, M. B. R. **Sinótese do gênero *Acalypha* L. (Euphorbiaceae) no Estado de São Paulo**, Brasil. Hoehnea, São Paulo, v. 44, n° 3, p.336-348, maio 2017.

GOVINDARAJAN, M.; JEBANESAN, A.; REETHA D.; AMSATH, R.; PUSHPANATHAN, T. SAMIDURAI, K. **Antibacterial activity of *Acalypha indica* L.** *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, v. 12, p.299-302, 2008.

KRISHNARAJ, C.; JAGAN, E. G.; RAJASEKAR, S.; SELVAKUMAR, P.; KALAICHELVAN, P. T.; MOHAN, N. **Synthesis of silver nanoparticles using *Acalypha indica* leaf extracts and its antibacterial activity against water borne pathogens.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v.76, p. 50-56, 2010.

ADESINA, S. K.; IDOWU, O.; OGUNDAINI, A. O.; OLADIMEJI, H.; OLUGBADE, T. A.; ONAWUNMI, G. O.; PAIS, M. **Antimicrobial constituents of the leaves of *Acalypha wilkesiana* and *Acalypha hispida*.** *Phytotherapy Research*, Res. 14, p. 371-374, 2000.

CAPRINI, G. P. **Metabolômica de plantas: análise fitoquímica de *Pentas lanceolata*, estudos com culturas celulares e experimentos iniciais de biossíntese com precursores marcados utilizando uma espécie de *Mentha* como Sistema modelo.** 2007. Tese (Mestrado em Biociências e Biotecnologia) – Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes.

BRITO, A. V. R. **Determinação da composição química e avaliação da atividade antioxidante do óleo essencial de *Croton linearifolius* (Euphorbiaceae).** 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga.

LIÃO, L. M.; CHOZE, R.; CAVALCANTE, P. P. A.; SANTOS, S. C.; FERRI, P. H. **Perfil químico de cultivares de feijão (*Phaseolus vulgaris*) pela técnica de high resolution magic angle spinning (HR-MAS).** *Rev. Química Nova*, vol. 35, n° 7, pp. 1306-1311, 2012.