

## Isolamento e bioatividades do composto veboccidentafurano de *Baccharis punctulata* DC.

## Isolation and bioactivities of the compound veboccidentafuran from *Baccharis punctulata* DC.

### RESUMO

Christine Aparecida Quevedo  
[christinequevedo@alunos.utfpr.edu.br](mailto:christinequevedo@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Santa Helena,  
Paraná, Brasil

Jociani Ascari  
[jascari@utfpr.edu.br](mailto:jascari@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica  
Federal do Paraná, Santa Helena,  
Paraná, Brasil

Erika Izumi (colaborador)  
[erikaizumi@utfpr.edu.br](mailto:erikaizumi@utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Santa Helena, Paraná,  
Brasil

Fernanda Zantedeschi Rodrigues  
(colaborador)  
[fernandarodrigues.1998@alunos.utfpr.edu.br](mailto:fernandarodrigues.1998@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Santa Helena, Paraná,  
Brasil

Antonio Augusto Ignacio  
(colaborador)  
[ignacio@alunos.utfpr.edu.br](mailto:ignacio@alunos.utfpr.edu.br)  
Universidade Tecnológica Federal  
do Paraná, Santa Helena, Paraná,  
Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



Objetivou-se o isolamento e elucidação estrutural do composto veboccidentafurano presente no óleo essencial das folhas da espécie *Baccharis punctulata* e a avaliação da atividade antimicrobiana, visando o desenvolvimento de novos produtos e ou processos, assim como aplicações tecnológicas. O isolamento foi realizado por cromatografia em coluna de vidro utilizando-se sílica gel e hexano como fase móvel. A elucidação estrutural foi feita utilizando-se da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Para a avaliação da atividade antimicrobiana do composto isolado utilizou-se bactérias Gram positivas, - *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* ATCC 6569; bactérias Gram negativas - *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 e fungo leveduriforme - *Candida albicans* ATCC 26790. Avaliou-se o teste antimicrobiano pelo teste de microdiluição em caldo, onde o composto foi testado na concentração máxima de 1000 µg/mL, seguindo diluição seriada 1:2 até 15,625 µg/mL e posteriormente foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM). A composto se mostrou ativo contra o fungo leveduriforme *Candida albicans*.

**PALAVRAS-CHAVE:** veboccidentafurano, *Baccharis punctulata*, concentração inibitória

### ABSTRACT

The objective was the isolation and structural elucidation of the veboccidentafuran compound present in the essential oil of the leaves of the species *Baccharis punctulata* and the evaluation of the antimicrobial activity, aiming at the development of new products and or processes, as well as technological applications. The isolation was carried out by chromatography on a glass column using silica gel and hexane as the mobile phase. Structural elucidation was performed using the Nuclear Magnetic Resonance (NMR) technique. Gram positive bacteria were used to evaluate the antimicrobial activity of the isolated compound, - *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* ATCC 6569; Gram negative bacteria - *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 and yeast fungus - *Candida albicans* ATCC 26790. The antimicrobial test was evaluated by the broth microdilution test, where the compound was tested at the maximum concentration of 1000 µg / mL, following a 1: 2 serial dilution up to 15.625 µg / mL and subsequently the minimum inhibitory concentration (MIC) was determined. The compound was shown to be active against the yeast fungus *Candida albicans*.

**KEYWORDS:** veboccidentafuran, *Baccharis punctulata*, inhibitory concentration.



## INTRODUÇÃO

Muitas espécies vêm sendo estudadas quanto aos aspectos fitoquímicos e biológicos, devido à grande utilização da medicina popular para o controle ou tratamento de várias doenças. Dentre as espécies estudadas o gênero *Baccharis* vem sendo muito citado em trabalhos, pois as plantas apresentam uma pluralidade de metabolitos secundários com caráter antimicrobiano e antioxidante. Os compostos presentes nos óleos que mais se destacam são, os flavonoides e os terpenoides, como monoterpenos e sesquiterpenos (BARROSO e BUENO, 2001; DAVIS, 2004; MOREIRA, 2003).

Óleos essenciais são compostos aromáticos, voláteis que podem ser extraídos de raízes, caules, folhas, flores ou de todas as partes de plantas, sendo feitas extrações por destilação de arraste a vapor. Os óleos possuem grande importância industrial e são utilizados nas indústrias de perfumaria, cosmética, alimentícia e farmacêutica, possuindo componentes de ação terapêutica de plantas medicinais. Algumas substâncias presentes nos óleos essenciais possuem alto valor comercial, essas substâncias podem ser isoladas do óleo ou mesmo sintetizadas em laboratório (TRANCOSO et al., 2009).

González (2019) em seu estudo verificou que os óleos essenciais de *Baccharis punctulata*, coletadas em Buenos Aires na Argentina, que apresentou como um dos compostos majoritários para o espécime feminino e masculino o composto verbocidentafurano.

Estudo realizado por Ascari et al. (2019), no intuito de avaliar as propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes, do óleo essencial da *B. punctulata*. A análise química apresentou alta proporção de sesquiterpenos nas amostras voláteis obtidas da *B. punctulata* parte masculina, como  $\delta$ -elemeno (14,29%), germacreno D (11,29%) e biciclogermacreno (10,90%) e na amostra da *B. punctulata* parte feminina, biciclogermacreno (42,44%), germacreno D (21,18%) e  $\beta$ -cariofileno (14,06%).

*B. punctulata* DC, possui poucos relatos de estudos sobre a composição química. Em estudo feito por Schosler (2009), que analisou o óleo essencial das folhas de *B. punctulata* coletadas em Guaíba-RS. Os compostos majoritários presentes no óleo essencial foram o biciclogermacreno (9,73%), cis-cadin-4-en-7-ol (6,77%), Z-ocimeno (6,33%) e limoneno (6%). Minteguiaga et al. (2018) analisou os compostos voláteis obtidos de partes aéreas de *B. punctulata* coletadas em Paysandú, Uruguai, observou-se como compostos majoritários o germacreno D-4-ol (7%),  $\beta$ -felandreno (5,20%) e acetato de bornila (5,20%). Budel et al. (2018) analisou o óleo essencial das folhas de *B. punctulata* coletadas em Campos Gerais, Ponta Grossa-PR, os compostos majoritários presentes foram espatulenol (9,96%), germacreno D (3,63%) e  $\beta$ -cariofileno (3,35%).

Estudo realizado no intuito de verificar a atividade antifúngica do óleo essencial de *B. trimera*, apresentou um fraco poder inibidor contra *Candida albicans* (CIM=2mg/mL). O óleo essencial de *B. trimera* foi investigado quanto à atividade antifúngica contra sete linhagens de fungos que causam onicomicose. Os resultados revelaram que *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533); *T. mentagrophytes* (ATCC 11480), *T. rubrum* (CCT 5507 URM 1666), *Microsporum canis* (ATCC 32903) e *M. gypseum* (ATCC 14683) não apresentaram crescimento fúngico visível quando expostos ao óleo de *B. trimera* (1000 $\mu$ g/mL  $\beta$ -pineno). No

entanto, *T. mentagrophytes* (ATCC 11481) e *Epidermophyton floccosum* (CCF-IOC 3757) apresentaram algum crescimento. Existe a possibilidade de sinergismo entre diferentes moléculas do óleo essencial, que podem ser responsáveis pela atividade farmacológica (CANESCHI et al., 2015).

O objetivo do presente trabalho foi isolar, purificar e elucidar o composto verboccidentafurano presente no óleo essencial do espécime *B. punctulata*, e avaliar a sua atividade antimicrobiana através de métodos de microdiluição em caldo.

## MATERIAIS E METODOS

O óleo essencial da espécie *B. punctulata* foi obtido em trabalho anterior por nosso grupo e já divulgado em artigo científico (ASCARI et al., 2019).

O óleo essencial (1,1 g) foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna de vidro utilizando-se sílica gel (0.040-0.063 mesh). Foram recolhidas aproximadamente 7,5 mL de cada fração, utilizando-se um gradiente de polaridade de solvente hexano e clorofórmio.

As frações contendo o composto foram reunidas através da técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A fase móvel utilizada foi hexano e reveladas inicialmente através da observação na câmara com lâmpada UV no comprimento de onda 254nm e após com o revelador químico anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> específico para a classe de compostos terpênicos.

A elucidação estrutural com composto verboccidentafurano foi realizada utilizando-se da técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN). Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e RMN de <sup>13</sup>C foram obtidos em espectrômetros da Bruker DRX-400, linha AVANCE do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá. Os deslocamentos químicos foram registrados em unidade  $\delta$  e as constantes de acoplamento escalar *J* fornecidas em Hz. O tetrametilsilano, TMS, foi usado com padrão de referência interno. Como solventes, foram utilizados clorofórmio deuterado.

A atividade antimicrobiana foi realizada utilizando-se seguintes microrganismos: bactérias Gram positivas - *Streptococcus mutans* ATCC 25175, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecium* ATCC 6569; bactérias Gram negativas - *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 10031, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442; fungo leveduriforme - *Candida albicans* ATCC 26790.

A avaliação da atividade antimicrobiana contra bactérias e leveduras foi realizada através do teste de microdiluição em caldo, seguindo instruções do NCCLS, com modificações. Foram utilizados os meios de cultivo Mueller Hinton para bactérias, e Sabouraud para leveduras.

O composto foi testado na concentração máxima de 1000  $\mu$ g/mL, seguindo diluição seriada 1:2 até 15,625  $\mu$ g/mL. Após a incubação, foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) por observação direta de crescimento no poço.

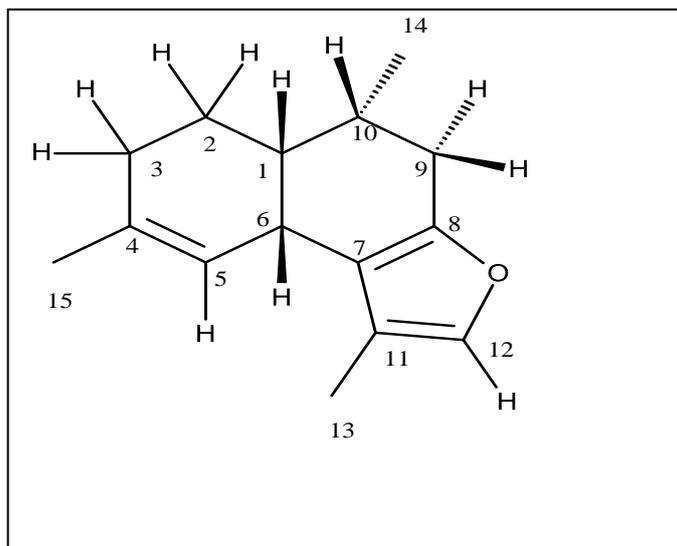
O composto foi preparado para o teste antimicrobiano na concentração de 2000  $\mu$ g/mL, em meio de cultivo, contendo 2,5% de DMSO como solvente. Foi

realizada a diluição seriada 1:2 nos poços, fazendo com que a maior concentração da droga no teste fosse 1000 µg/mL contendo 1,25% de DMSO, evitando assim seu efeito tóxico em concentrações superiores.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

O composto verboccidentafurano (Figura 1) isolado a partir do fracionamento do óleo essencial das folhas de *B. punctulata* por cromatografia em coluna de vidro utilizando-se sílica gel e fase móvel hexano. O composto puro apresentou massa de 69,3 mg sendo o composto majoritário presente no óleo essencial (27,42%). Apresentou-se como um óleo amarelado e, quando submetido à CCDS, utilizando-se como fase móvel hexano e revelação com anisaldeído/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> sob aquecimento apresentou uma única mancha de coloração marrom.

Figura 1 – Estrutura química do composto verboccidentafurano



Fonte: Autoria própria (2019).

A identificação foi feita utilizando a técnica de RMN mono (<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C RMN) e bidimensional (COSY, HSQC e HMBC) tabela 1 e por comparação com a literatura Gonzalvez (2019). Analisando os mapas de contornos, observa-se deslocamentos relacionados ao anel furano trissubstituído em C-8 (δC 150,0 ppm), C-7 (δC 119,5 ppm) e com o carbono metílico C-13 (δC 8,9 ppm). que apresenta uma interação, com o H-12 (δH 7.03 ppm).

O espectro de <sup>1</sup>H apresenta um singleto em δH 7.03 atribuído ao H-12 do anel furânico. Um duplete de 3H em δ 2.02 (d, J 1.2) relacionado ao grupo metílico no anel furânico. Observa-se também no espectro de <sup>13</sup>C dois carbonos vinílicos relativo a grupos metílicos em δC 8.9 e em δC 23.8, atribuídos aos C-13 e C-15 respectivamente.

Tabela 1- identificação química do composto verboccidentafurano

Posição	$\delta_c$ / ppm	$\delta_H$ (J / Hz) / ppm	HMBC
1	38.4	1.64 - 1.65 (m)	H-5( $J^3$ ), H-14( $J^3$ ), H-9'/H-9''( $J^3$ )
2	25,0	1.87 - 2.0 (m)	H-3 ( $J^2$ ), H-1 ( $J^2$ )
3	26.6	1.87 - 2.0 (m)	H-5 ( $J^3$ ), H-2 ( $J^2$ ), H-1 ( $J^3$ )
4	133.2		H-3 ( $J^2$ ), H-2 ( $J^3$ ), H-15( $J^2$ )
5	123.3	5.39 (s)	H-15 ( $J^3$ ), H-1 ( $J^3$ )
6	33.6	3.25 (s)	H-5 ( $J^2$ ), H-1 ( $J^2$ ), H-10 ( $J^3$ )
7	119.5		H-12 ( $J^3$ ), H-14 ( $J^3$ ), H-13 ( $J^3$ )
8	150.0		H-9'/H-9'' ( $J^2$ ), H-12( $J^2$ )
9'	31.2	2.50 (dd, J 5.3; 16.0)	H-10 ( $J^2$ ), H-14 ( $J^3$ )
9''	31.2	2.20 (m)	
10	28.0	1.87 - 2.0 (m)	H-9'/H-9'' ( $J^2$ ), H-14( $J^2$ )
11	120.3		H-12 ( $J^2$ ), H-13 ( $J^2$ )
12	137.4	7.03 (s)	H-13 ( $J^3$ )
13	8.9	2.02 (d, J 1.2)	H-12 ( $J^3$ )
14	19.2	1.05 (d, J 6.7)	H-9'/H-9'' ( $J^3$ )
15	23.8	1.64 - 1.65 (m)	H-5 ( $J^3$ )

Fonte: Autoria própria (2019).

A leitura do CIM apresentou os seguintes resultados para os microrganismos testados Tabela 2. A droga se mostrou ativa contra o fungo leveduriforme *Candida albicans*, sendo a CIM determinada em 1.000  $\mu\text{g/mL}$ . Para as bactérias Gram positivas e Gram negativas testadas, a droga não apresentou inibição de crescimento de 100% até a maior concentração avaliada. Este resultado nos mostra que a droga provavelmente age em algum alvo celular específico de *C. albicans*, que não está presente nas bactérias testadas. Encontrar uma droga

altamente seletiva é muito interessante do ponto de vista médico, pois reduz a chance de efeitos colaterais adversos provenientes da toxicidade da medicação.

**Tabela 2** – Valores de concentração inibitória mínima obtidos no teste antimicrobiano. ND: não determinada. \*Fluconazol. \*\*Cloranfenicol

	Microrganismos	CIM droga teste (µg/mL)	CIM droga padrão (µg/mL)
Fungo leveduriforme	<i>C. albicans</i>	1.000	*15,6
Bactérias Gram positivas	<i>S. mutans</i>	> 1.000	ND
	<i>S. aureus</i>	> 1.000	**7,8
	<i>E. faecium</i>	> 1.000	ND
Bactérias Gram negativas	<i>E. coli</i>	> 1.000	**3,9
	<i>K. pneumoniae</i>	> 1.000	ND
	<i>P. aeruginosa</i>	> 1.000	ND

Fonte: Autoria própria (2019).

Quassinti et al. (2012) estudaram as atividades antimicrobiana e antifúngicas do óleo essenciais de *Smyrniolum olusatrum* L. (Apiaceae). A espécie destaca um alto conteúdo de furanosesquiterpenóides, como isofuranodieno (19,5-45,8%), curzereno (2,6-10,5%), furanoeremofil-1-ona (15,2-33,1%) e 1b-acetoxifuranoedesm-4 (15) -eno (0,3-31,0%). Os óleos essenciais de frutas e raízes foram testados contra um painel de microrganismos, incluindo *S. aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Candida albicans* ATCC 24433. A atividade inibitória, foi muito baixa. Os óleos extraídos não foram ativos contra as espécies Gram-negativas, *P. aeruginosa* e *E. coli*. Um nível muito baixo de inibição foi observado no caso das espécies Gram-positivas, *S. aureus* e *E. faecalis*. O mesmo resultado foi obtido para a levedura *C. albicans*. Em conclusão, na concentração testada, os óleos essenciais de *Smyrniolum olusatrum* L. não mostraram atividade antimicrobiana relevante.

De acordo com o trabalho realizado por Oliveira (2016), da espécie *B. oreophila* Malme, no intuito de avaliar suas atividades antimicrobiana e antifúngica. No óleo essencial foram identificados 57 componentes, nos majoritários foram detectados o kusimono (16,37%), o espatulenol (16,12%), o  $\delta$ -cadinene (5,68%) e o biciclogermacreno (4,09%). A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi realizada para os microrganismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *C. albicans* ATCC 18804 e *C. tropicalis* ATCC 13803, os resultados revelaram que o óleo essencial mostrou atividade contra o *S. aureus* com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1250 µg/mL. Tais resultados

demonstram que o óleo essencial de *B. oreophila* apresentou potencial antimicrobiano frente a *S. aureus* e interessante atividade antioxidante.

### CONCLUSÃO

O espécime *B. punctulata* possui um grande potencial de matéria-prima relacionado à extração de óleo essencial e a obtenção de moléculas bioativas. Seu grande potencial em metabólitos secundários e atividades descritas na medicina popular, deixam um vastíssimo campo aberto para a pesquisa de novas moléculas ativas.

Os resultados revelam a ocorrência do composto verboccidentafurano no óleo da *B. punctulata*, sendo o primeiro estudo a ser realizado no Brasil deste composto, descrito na literatura. O presente estudo foi o primeiro a realizar testes antimicrobianos do mesmo, obtendo resultados promissores. Logo ressalta-se a importância da continuidade dos estudos com esse composto.

Através desse estudo, houve a possibilidade de se aprimorar os conhecimentos científicos e técnicos, aprendizagens essas que contribuíram para minha formação pessoal e profissional.

### AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus colegas do grupo de pesquisa, a professora orientadora Dra. Jociani Ascari, por toda a aprendizagem e conhecimento que nos proporcionou.

Agradeço também a fundação araucária pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e a UTFPR, pela oportunidade de fazer parte deste projeto e aprimorar meus conhecimentos.

## REFERÊNCIAS

ASCARI, J.; SILVA DE OLIVEIRA, M.; NUNES, D. S.; GRANATO, D.; RIVA SCHARF, D.; SIMIONATTO, E.; OTUKI, M.; SOLEY, B.; HEIDEN, G. **Composição química, atividades antioxidantes e anti-inflamatórias dos óleos essenciais de espécimes masculinos e femininos de *Baccharis punctulata* (Asteraceae)**. Volume 234 , 24 de abril de 2019 , páginas 1-7.

BARROSO, G.H; BUENO, O. L. Compostas: subtribo *baccharidinae*. **Flora ilustrada catarinense**. Itajaí: herbário Barbosa Rodrigues, 2001.

BUDEL, J. **Essential Oils of Five *Baccharis* Species: Investigations on the Chemical Composition and Biological Activities**. *Molecules*, v. 23, n. 10, p. 2620, 2018.

CANESCHI, C.A. MARTINS, F.J. LARRUDÉ, D.G. ROMANI, E.C. BRANDÃO, M.A.F. RAPOSO, N.R.B. **In vitro antifungal activity of *Baccharis trimera* less (DC) essential oil against dermatophytes**, *Trop. J. Pharmaceut. Res.* 14 (2015) 2083–2089.

DAVIES, P. **Fichas técnicas de cultivo**. In: **Estudios en domesticación y cultivo de especies medicinales y aromáticas nativas**. Publicação Técnica do Instituto Nacional de Investigacion Agropecuaria (INIA), Projeto FPTA 137, Uruguai, 2004.

GONZÁLEZ, M. D. **Chemical composition of the leaf oil from *Baccharis punctulata* DC.** at two phenological stages, *Journal of Essential Oil Research*, 2019.

MINTEGUIAGA, M.; GONZÁLEZ, A.; CASSEL, E.; et al. **Volatile Constituents from *Baccharis spp. L.* (Asteraceae): Chemical Support for the Conservation of Threatened Species in Uruguay**. *Chemistry and Biodiversity*, v. 15, n. 5, 2018.

MOREIRA, F.P.M. **Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* - Bioatividade sobre *Artemisia salina***. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 309-311, 2003.

OLIVEIRA, C.T. **Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *baccharis oreophila malme***. Dissertação (mestrado) - Universidade Tecnológica Federal Do Paraná, Pato Branco, 2016.

QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; LUPIDI, G.; BARBONI, L.; RICCIUTELLI, M.; SAGRATINI, G.; PAPA, F.; CAPRIOLI, G.; PETRELLI, D.; VITALI, L. A.; VITTORI, S.; MAGGI, F. **In vitro biological activity of essential oils and isolated furanosesquiterpenes from the neglected vegetable *Smyrniololus olusatrum* L. (Apiaceae)**, *Food Chemistry*, 27 nov. 2012.

SCHOSSLER, P. **Volatile compounds of *Baccharis punctulata*, *Baccharis dracunculifolia* and *Eupatorium laevigatum* obtained using solid phase microextraction and hydrodistillation**. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 277-287, 2009.

Trancoso, M.D. ; Baptista, B.A.V.; Gomes, G.A.; Gonzalez, M.M. ; Ribeiro, T.B. **Métodos de extração dos óleos essenciais (2012)**, Disponível em : <http://oleos essenciais naturais.blogspot.com.br>. Acesso em: 10 jan. 2020.