

ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MOLUSCICIDA DO *Calophyllum brasiliense* CMB (CLUSIACEAE)

Arquimedes Gasparotto Jr., Mislaine Adriana Brenzan, Izabel Cristina Piloto e Diógenes Aparício Garcia Cortez*

Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR

Celso Vataru Nakamura e Benedito Prado Dias Filho

Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900 Maringá - PR

Edson Rodrigues Filho e Antonio Gilberto Ferreira

Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, CP 676, 13560-970 São Carlos - SP

Recebido em 5/1/04; aceito em 17/12/04; publicado na web em 28/2/05

PHYTOCHEMICAL STUDY AND EVALUATION OF THE MOLLUSCICIDAL ACTIVITY OF *Calophyllum brasiliense* CMB (CLUSIACEAE). The bioassay-guided fractionation against *Biomphalaria glabrata* of hydroalcoholic extracts of *Calophyllum brasiliense* aerial parts led to the isolation of the coumarin, named (-) mammea A/BB. The compound had its structure determined by both spectroscopic techniques (NMR ¹H, NMR ¹³C, gHSQC, gHMBC and MS) and some literature comparison data. The probit analysis of (-) mammea A/BB showed LD₅₀ = 0.67 ppm and LD₉₀ = 1.47 ppm. In addition, the dichloromethane extract obtained from *C. brasiliense* leaves with significant molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* was analyzed by HPLC-UV.

Keywords: *Calophyllum brasiliense*; molluscicidal activity; coumarin.

INTRODUÇÃO

O *Calophyllum brasiliense* Camb. é uma árvore de grande porte, que cresce principalmente em regiões de floresta da Mata Atlântica no Brasil. Regionalmente conhecido como guanandi, o chá de suas cascas obtido por infusão é um remédio popular utilizado para tratamento de reumatismo, varicoses, hemorróidas e úlceras crônicas¹. Em 1992, um grupo de pesquisadores do Instituto Nacional do Câncer reportou uma cumarina, o (+) calanolideo A, isolada de espécies de *Calophyllum*, como uma das substâncias químicas mais ativas frente ao vírus HIV-1². Estudos fitoquímicos do caule e da resina do *Calophyllum brasiliense* revelaram a presença de diversas substâncias químicas, tais como xantonas, sitosterol e triterpenos³. Algumas cumarinas isoladas desta espécie apresentaram atividade anticancerígena e antimicrobiana^{2,4}. O extrato em diclorometano do caule *C. brasiliense* apresentou um efeito gastroprotetor em ratos⁵.

Extratos brutos obtidos de diversas partes de espécies da família Clusiaceae, como *Calophyllum verticillatum*, *C. inophyllum* e *C. Recedens*, apresentaram atividade moluscicida na concentração de 100 ppm para a primeira espécie e 10 ppm para as outras duas⁶. A cumarina (±) mammea A/BB, isolada das sementes do *C. Verticillatum*, apresentou atividade moluscicida na concentração de 10 ppm, com 20% de mortalidade dos moluscos *B. glabrata*⁷. O extrato metanólico do caule de *Kielmeyera variabilis* apresentou forte atividade moluscicida em 12,5 ppm⁸.

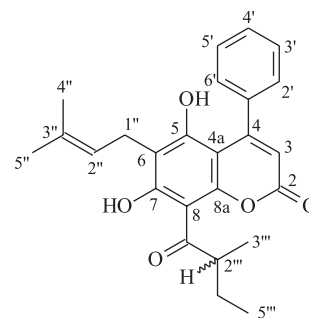
As substâncias moluscicidas são um fator crucial para o controle da esquistossomose. No momento, apenas uma substância sintética, a niclosamida, é recomendada pela ONU como moluscicida⁹. Em países do terceiro mundo, o uso de moluscicidas sintéticos tem causado problemas de toxicidade, contaminação do meio ambiente e resistência dos caramujos (*Biomphalaria glabrata*) transmissores da esquistossomose. Em contraste, o uso de plantas

com atividade moluscicida pode representar uma alternativa barata, além de evitar a poluição do meio ambiente, pelo fato de elas serem biodegradáveis¹⁰.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo isolar o(s) princípio(s) ativo(s) das partes aéreas do *Calophyllum brasiliense* Camb., responsável pela atividade moluscicida.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos brutos obtidos das folhas e galhos de *C. brasiliense* foram submetidos ao bioensaio de atividade moluscicida com *Biomphalaria glabrata*, sendo que o extrato **RF** foi ativo na concentração de 25 ppm, com 100% de mortalidade. Esse extrato foi refracionado e apenas a fração **F1** apresentou atividade em 1,20 ppm, com 100% de mortalidade (Tabela 1). A fração **F1** resultou no isolamento de uma cumarina denominada de (-) mammea A/BB (**1**). A substância **1** apresentou após 24 h uma DL₅₀ de 0,67 ppm e DL₉₀ de 1,47 ppm (Tabela 2). Por meio dos dados parciais apresentados, pode-se concluir que a substância **1** tem potencial moluscicida, quando comparada com a niclosamida (DL₅₀ de 0,77 ppm e DL₉₀ de 1,75 ppm)¹¹, podendo ser um substituto em potencial desta substância que é utilizada atualmente. Estes resultados diferem dos obtidos pela literatura para a (±) mammea A/BB isolada das se-



*e-mail: dagcortez@uem.br

Tabela 1. Atividade moluscicida sobre a *Biomphalaria glabrata* dos extratos **RF**, **LF**, **RG** e **LG** das frações **F1** a **F8** e da substância química **1** (subfração F1.12) do *Calophyllum brasiliense* e do moluscicida sintético niclosamida, que foi utilizado como controle positivo (C)

Tempo de exposição	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h	6 h	24 h
[α] _D [ppm]	100	100	50	50	25	25	10	10	5,0	5,0	2,5	2,5	1,2	1,2	0,6	0,6	0,3	0,3
RF	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LF	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RG	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LG	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F1	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
F2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

LF = extrato liofilizado das folhas; **LG** = extrato liofilizado dos galhos; **RF** = resíduo das folhas, **RG** = resíduo dos galhos; (+) = caramujos mortos; (-) = caramujos sobreviventes.

Tabela 2. Valores de DL₅₀ e DL₉₀ (ppm) e intervalos de confiança de 95% para (-) mammea A/BB (**1**)

Tempo de exposição	DL ₅₀	Intervalo de confiança	DL ₉₀	Intervalo de confiança
24 h	0,67	0,48-0,93	1,47	1,00-2,99

mentes do *C. verticillatum*, que apresentaram atividade em 10 ppm, com 20% de mortalidade dos caramujos *B. glabrata*⁷. A substância **1** isolada das folhas do *C. brasiliense*, com uma rotação óptica [α]_D = -10 (c 0,14, CHCl₃), apresentou maior atividade que sua forma racêmica, isolada do *C. verticillatum*, podendo-se supor que o enantiômero levógiro é mais ativo que a mistura racêmica.

Para confirmar a fórmula molecular C₂₅H₂₆O₅ e a massa molecular de 406 u.m.a. da estrutura proposta para **1**, foi obtido o espectro de massas dessa substância, utilizando a ionização por "electrospray" (ESI-MS), em que foram observados o íon quasi molecular [M-H]⁻ em m/z 405 (24%), compatível com a estrutura proposta. O espectro de RMN ¹H mostrou sinais de quatro metilas H-4'': δ_H 1,70 sl; H-5'': δ_H 1,65 d, J=1,2 Hz; H-3''': δ_H 1,28 d, J=6,9 Hz e H-5''': δ_H 0,99 t=6,6 Hz), dois hidrogênios olefínicos, um multipeto em δ_H 5,07-5,12 (m) e um singlete em δ_H 6,00, representantes dos hidrogênios H-2'' e H-3, respectivamente, e dois sinais de hidrogênios metilênicos H-1'': δ_H 3,29 d, J=6,9 Hz e H_A-4''': δ_H 1,81-2,00 m; H_B-4''': δ_H 1,42-1,52 m. A presença de um anel fenila foi reconhecida pela presença de dois multipletos em δ_H 7,41-7,44 e δ_H 7,53-7,58 com uma integral para cinco hidrogênios. No espectro de RMN ¹H, foi observado na região desblindada um singlete em δ_H 14,57 referente a uma hidroxila quelatogênica. A posição do grupamento prenila no carbono C-6 foi determinada através das interações heteronucleares de átomos de carbono e hidrogênio observados nos espectros gHSQC (¹J_{CH}) gHMBC (^{2,3}J_{CH}), permitindo também identificar os sinais dos carbonos hidrogenados e quaternários da unidade aromática (Tabela 3). Os dados espectroscópicos da substância isolada foram comparados aos da literatura para a (±) mammea A/BB^{4,12}. Com base nesta comparação, a substância isolada foi caracterizada como (-) mammea A/BB (**1**).

No cromatograma típico do extrato em diclorometano (**RF**) das folhas de *C. brasiliense*, apresentado na Figura 1, foi possível identificar a substância **1** com o tempo de retenção de 28,84 min, por meio da comparação dos dados da literatura de ultravioleta obtidos

pelo detector de arranjo de fotodiodo e por comparação com o cromatograma da amostra pura, realizados nas mesmas condições. O perfil cromatográfico obtido do extrato **RF** permite sua padronização, para fins de controle de qualidade, contribuindo para a futura utilização desse extrato bruto no controle da esquistossomose como alternativa à utilização da substância **1**.

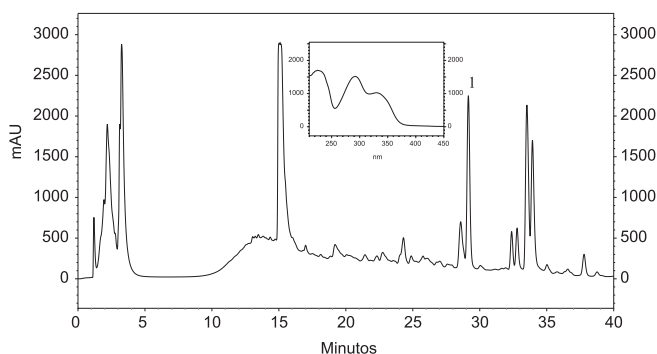


Figura 1. Cromatograma típico a 254 nm do extrato em diclorometano (**RF**) das folhas de *C. brasiliense* em CLAE com coluna Metasil ODS. Fase móvel 0,6 mL/min. ACN-H₂O 5:95 - 55:45 em 10 min., 55:45 - 80:20 em 20 min, 80:20 - 100 em 30 min e 100 em 40 min. Detector arranjo de fotodiodo (λ : 200-450 nm, monitorado em m 254 nm). (1): (-) mammea A/BB

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

Os espectros no infravermelho foram registrados em espectrômetro Bomen - MV 100, Hartmann & Braun- Michelson. Os espectros de RMN de ¹H (400,13 MHz) e de ¹³C (100,6 MHz) foram obtidos em espectrômetro Bruker Avance e Varian, modelos

Tabela 3. Dados de RMN¹H (δ , CDCl₃, 300 MHz) e RMN¹³C (100 MHz) de 1*

C	1			
	gHSQC			gHMBC
	δ_H			
2	158,6		H-3	
3	112,1	6,00 (s)		
4	154,2			
4a	100,5			
5	157,1		H-6',H-2',H-1'',H-3	
6	112,6			
7	166,9		H-1''	
7-OH		14,57 (s)		
8	104,2		H-3	
8a	155,7		H-3	
1'	136,8			
2'	127,5	7,41-7,44 (m)		
3'	129,5	7,53-7,58 (m)	H-2',H-6'	
4'	130,2	7,53-7,58 (m)		
5'	129,5	7,53-7,58 (m)	H-2',H-6'	
6'	127,5	7,41-7,44 (m)		
1''	21,6	3,29-(d, J=6,9 Hz)		
2''	120,8	5,07-5,12 (m)	H-1'',H-4'',H-5''	
3''	134,1		H-1'',H-4'',H-5''	
4''	17,8	1,70 (sl)		
5''	25,7	1,65 (d, J=1,2 Hz)		
1'''	210,5		H-2''',HA-4''',HB-4''', H-5'''	
2'''	47,0	3,96 (sex J=6,9 Hz)	HA-4''',HB-4''', H-5'''	
3'''	16,6	1,28 (d, J=6,9 Hz)	HA-4''',HB-4''', H-2''', H-3'''	
A4'''	27,2	1,81-2,00 (m)	H-5''', H-2''', H-3'''	
B4'''		1,42-1,52 (m)		
5'''	11,8	0,99 (t=6,6 Hz)		

*Os sinais de carbonos C, CH, e CH₃ foram reconhecidos pela análise comparativa dos espectros de DEPT 90° e 135°. O espectro de 2D gCOSY foi utilizado, os deslocamentos químicos e constantes de acoplamentos (J) dos sinais de hidrogênio foram deduzidos do espectro 1D de RMN¹H.

Gemini 2000 BB, 300 MHz (300,06 MHz para ¹H e 75,45 MHz para ¹³C), utilizando-se CDCl₃ como solvente e TMS como referência interna. Para obtenção de espectro no ultravioleta foi utilizado o aparelho Varian Cary 1E. Os espectros de massa por "electrospray" foram obtidos em espectrômetro Micromass Quattro LC. O espectro de CD foi obtido no equipamento Jasco 810.

As separações cromatográficas em coluna por adsorção foram realizadas utilizando-se a técnica de cromatografia no modo "flash" com sílica-gel 60 (230-400 mesh ASTM, Merck). Para as cromatografias em camada delgada analítica utilizou-se sílica-gel GF₂₅₄ Merck, e as placas foram reveladas sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 a 366 nm, e pela utilização de reveladores com vanilina-ácido sulfúrico e vapores de iodo. Foram também utilizadas CC em gel de SEPHADEX® LH-20 para a purificação de substâncias.

Material vegetal

As partes aéreas foram coletadas na Ilha do Cardoso no estado de São Paulo, e uma exsiccata foi depositada no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (SP 363818).

Obtenção dos extratos

As folhas e galhos, depois de secos em temperatura ambiente, foram triturados em moinho de facas e martelo, obtendo-se as massas do pó de 985 e 446 g, respectivamente. O pó dos galhos e das folhas foi extraído pelo processo de maceração com etanol:água (9:1) até o esgotamento total dos princípios ativos. Os extratos hidroalcoólicos das folhas e galhos foram filtrados e evaporados em rotaevaporador a vácuo em temperatura de 45 °C, até a eliminação total do solvente orgânico. Do concentrado, em forma de xarope viscoso das folhas e caules, foram separados os resíduos e solubilizados em diclorometano e denominados **RF** = resíduo das folhas e **RG** = resíduo dos galhos. O solvente orgânico foi eliminado em rotaevaporador à vácuo, a 45 °C. Os filtrados das folhas e caules foram liofilizados e armazenados em freezer e denominados **LF** = liofilizado das folhas e **LG** = liofilizado dos galhos. Foram obtidos os extratos brutos das folhas **RF** = 30,87 g e **LF** = 150 g e dos galhos **RG** = 2,94 g e **LG** = 41,5 g.

Extração e fracionamento

O extrato bruto das folhas em diclorometano (**RF** = 23,54 g) foi cromatografado em coluna empacotada com sílica-gel à vácuo, utilizando-se como fase móvel solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano; hexano:diclorometano (1:1); diclorometano; diclorometano:acetato de etila (9:1); diclorometano:acetato de etila (4:1); diclorometano:acetato de etila (1:1); acetato de etila; metanol, e metanol:água (9:1). Foram obtidas 9 frações após a evaporação do solvente orgânico: (**F1** = 8,73 g), (**F2** = 1,82 g), (**F3** = 0,63 g), (**F4** = 0,88g), (**F5** = 0,61 g), (**F6** = 1,12 g), (**F7** = 2,26 g), (**F8** = 5,47 g) e (**F9** = 0,09 g). As frações obtidas foram submetidas a ensaio da atividade moluscicida, utilizando-se caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* (Tabela 1). A fração bioativa **F1** (5,0 g) foi cromatografada em coluna de sílica-gel, utilizando-se como eluentes: hexano; hexano:diclorometano (98:2, 95:5, 90:10, 80:20 e 50:50); diclorometano; diclorometano:acetato de etila (98:2, 95:5, 90:10, 80:20 e 50:50); acetato de etila, e metanol, sendo obtidas 122 frações. As frações **F9** a **F12** e **F73** a **F77** com identidade cromatográfica foram reunidas, obtendo-se as subfrações **F1.12** (58,2 mg) e **F1.77** (278 mg), as quais foram submetidas à atividade moluscicida (Tabela 1). A subfração F1.12 foi identificada como uma cumarina, a (-) mamea A/BB (**1**) e a subfração **F1.77** como uma mistura de três xantonas, por meio da análise dos espectros de UV, IV, EM. Foi feita aplicação de técnicas bidimensionais de RMN (gCOSY, gHSQC, gHMBC), comparando-se com os dados registrados na literatura^{4,12}.

Mamea A/BB (**1**). Cristal branco, ponto de fusão 124-125 °C (lit.:124-125 °C, hexano)¹³; [α]_D = -10 (CHCl₃, c 0,14), CD_{λmax} nm ($\Delta\epsilon$): 287(+3,69), 316 (-3,23), UV (CHCl₃) λ_{max} /nm (log ϵ): 226 (4,42), 295 (4,28), 333 (4,24). IV: nm_{max}.NaCl cm⁻¹: 3439, 2926, 1733, 1596, 1441, 1391, 1229, 1185, 1095, 774. RMN de ¹H (Tabela 2). RMN de ¹³C (Tabela 2). ESI-MS: m/z (int. rel.): 405 [M-H]⁻ (100). ESI-MS/MS: m/z (int. rel.): 405 [M-H]⁻ (24), 277(100), 305 (51), 333 (36).

ENSAIO BIOLÓGICO

Avaliação da atividade moluscicida¹⁴

O ensaio moluscicida foi realizado com os extratos **RF**, **LF**, **RG** e **LG**, frações **F1** a **F8**, subfração **F1.77** e substância química **1**. Para cada concentração foram utilizados três caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* de tamanho uniforme. As amostras fo-

ram diluídas em água filtrada do aquário, sem cloro, com o auxílio de 100 µl de DMSO nas concentrações de 100; 50; 25; 10; 5,0; 2,5; 1,2; 0,6 e 0,3 ppm em temperatura ambiente. Cada caramujo ficou separadamente, em contato com 50 ml dessa solução. Foi utilizada uma prova em branco apenas com o DMSO e como controle positivo a niclosamida. Foram realizadas leituras em 6 e 24 h e após esse tempo, foram observados os batimentos cardíacos por meio de uma lupa para verificar a mortalidade deles.

Para a obtenção de DL₅₀ e DL₉₀ da substância pura, foram utilizados dez caramujos adultos da espécie *B. glabrata* para cada concentração da amostra, de acordo com as recomendações da Organização Mundial da Saúde¹⁵ para a análise de plantas moluscicidas.

Os dados obtidos foram analisados pelo Programa Probit Versão 1.5¹⁶.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e CAPES pelas bolsas e apoio financeiro aos Profs. D. A. G. Cortez e B. P. Dias Filho; a aluna de Iniciação Científica M. A. Brenzan; à Prof^a. M. C. M. Young do Instituto de Botânica de São Paulo, pela coleta e identificação botânica do espécimen utilizado e ao Prof. R. J. Ward, do Departamento de Química da FFCLRP-USP, pela obtenção do espectro de CD.

REFERÊNCIAS

1. Correa, M. P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984, vol. III, p. 388.
2. Ito, C.; Itoigawa, M.; Mishina, Y.; Cechinel-Filho, V.; Enjo, E.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Furukawa, J.; *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 368.
3. Da Silva, K. L.; Dos Santos, A. R.; Mattos, P. E.; Yunes, R. A.; Delle-Manache, F.; Cechinel-Filho, V.; *Therapie* **2001**, *56*, 431.
4. Chilpa, R. R.; Muñoz, E. E.; Apan, T. R.; Amekraz, B.; Aumelas, A.; Jankowski, K.; Torrez, M. V.; *Life Sci.* **2004**, *75*, 1635.
5. Sartori, N. T.; Canepelle, D.; Sousa Jr, P. T.; Martins, D. T. O.; *J. Ethnopharmacol.* **1999**, *67*, 149.
6. Ravelonjato, B.; Kunesch, N.; Poisson, J. E.; *Phytochemistry* **1987**, *26*, 2973.
7. Ravelonjato, B.; Libot, F.; Ramiandrasoa, F.; Kunesch, N.; Cayral, P.; Poisson, J.; *Planta Med.* **1992**, *58*, 51.
8. Pinheiro, L.; Vidotti, G. J.; Young, M. C. M.; Ferreira, A. G.; Cortez, D. A. G.; *Quim. Nova* **2003**, *26*, 157.
9. D'Arcy, P.; Harron, D. W. G.; *Pharm. Int.* **1983**, *4*, 16.
10. Marston, A.; Hostettmann, K.; *Phytochemistry* **1985**, *24*, 639.
11. Giovanelli, A.; Silva, C. L. P. A.; Medeiros, L.; Vasconcellos, M. C.; *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 743.
12. Morel, C.; Guilet, D.; Oger, J. M.; Séraphin, D.; Sévenet, T.; Wiart, C.; Hamid, A. H. A.; Richomme, P.; Bruneton, J.; *Phytochemistry* **1999**, *50*, 1243.
13. Combrie, L.; Games, D. E.; *J. Chem. Soc. (C)* **1967**, 2553.
14. Hostettmann, H.; Kizu, H.; Tomimori, T.; *Planta Med.* **1982**, *44*, 34.
15. WHO-World Health Organization; *Bull. Wld. Hlth. Org.* **1984**, *33*, 567.
16. <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm#probit>, acessada em Agosto 2004.