

## ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE PRODUTOS BIOATIVOS EXTRAÍDOS DE *Ulomoides dermestoides* (FAIRMAIRE, 1893)

Aline Lima do Nascimento<sup>1</sup>; Ricardo Yara<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante do Curso de Bacharelado em Biomedicina - CCB – UFPE; E-mail: liman.aline@gmail.com, <sup>2</sup>Docente/pesquisador do Departamento de Engenharia Biomédica – CTG – UFPE. E-mail: ricardo.yara@gmail.com.

**Sumário:** O *Ulomoides dermestoides* (besouro do amendoim) é frequentemente considerado uma praga de produtos armazenados, apesar de ser amplamente utilizado pela medicina popular para o tratamento de inflamações, câncer, tuberculose, asma, HIV, diabetes e impotência sexual, além de outras patologias. A ação anti-inflamatória e imunomoduladora já foram relatadas, bem como sua ação anti-irritante, e efeitos citotóxicos e genotóxicos. Ainda assim, informações sobre a estrutura química dessas substâncias bioativas ainda são escassas, sendo necessária sua elucidação química. Neste estudo, o extrato hidroalcoólico de *U. dermestoides* foi testado para confirmar sua atividade frente a *Staphylococcus aureus*. Posteriormente este extrato bruto foi submetido a fracionamento por coluna cromatográfica de topo sólido com solventes de polaridade decrescente. As frações obtidas foram submetidas a revelação microbiológica em meio inoculado com *S. aureus*. Em seguida com a fração ativa foram realizados testes de análise espectroscópica na região do UV-VIS, infravermelho com transformada de Fourier e Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (RMN-<sup>1</sup>H). O extrato apresentou atividade antimicrobiana. A partir do fracionamento cromatográfico foram identificadas três frações com ação antimicrobiana, estas por sua vez foram submetidas a um segundo fracionamento por cromatografia flash (Isolera One) e analisadas por RMN-<sup>1</sup>H. As análises espectroscópicas na região do UV-VIS, infravermelho e RMN-<sup>1</sup>H indicaram a presença de políenos carboxilados.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana; metabólitos secundários; políenos; *Staphylococcus aureus*; *Ulomoides dermestoides*.

### INTRODUÇÃO

Os insetos são o maior grupo de animais e o mais diversificado existente na Terra, com cerca de 750 mil espécies vivas descritas (mas existem suposições que existam até 30 milhões de espécies), constituindo 75% da vida animal na Terra (WILSON, 1997). Com uma imensa variedade de cores, formas, tamanhos e modos de vida, eles desempenham um papel significativo para a manutenção da estrutura de diversos ecossistemas terrestres (reciclagem de nutrientes, polinização, dispersão de sementes, manutenção do solo, controle de populações de organismos, entre outros). O *Ulomoides dermestoides* (FAIRMAIRE, 1893), popularmente conhecido como besouro do amendoim, é utilizado pela medicina popular no tratamento de doenças inflamatórias, câncer, tuberculose, leucemia, asma, HIV, diabetes, entre outros, além de sua utilização como afrodisíaco e energético (CRESPO et al., 2011; SANTOS et al., 2009, 2010; COSTA NETO & RESENDE, 2010; VILLAVARDE et al., 2009; SPILMAN, 1960; COSTA NETO & RAMOS-ELORDUY, 2006; MENDOZA & SAAVEDRA, 2013). Sua ação anti-inflamatória e imunomodulatória já foram observadas em experimentos *in vivo*, assim como seu efeito linfoproliferativo *in vitro* (SANTOS et al., 2010), anti-irritante (MENDOZA & SAAVEDRA, 2013). Nascimento et. al (2102) descrevem a atividade antimicrobiana do extrato de *U. dermestoides* contra linhagens multirresistentes de

*Staphylococcus aureus*. Este trabalho justifica-se pelo número atual de micro-organismos multirresistentes e o vasto campo de metabólitos secundários ainda inexplorado, presentes nos insetos. Ademais, de acordo com a referência bibliográfica utilizada, este foi a primeira indicação dos bioativos extraídos de *U. dermestoides*.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Insetos:** *U. dermestoides* foram adquiridas de criatórios e a confirmação taxonômica foi realizada pela Professora Dra. Luciana Iannuzzi do Departamento de Zoologia - CCB.

**Multiplicação das Amostras:** Os insetos foram multiplicados em recipientes plásticos cobertos com telas vazadas contendo grãos de amendoim e farelo de trigo no Laboratório de Engenharia Biomédica, em temperatura e umidade ambiente. Uma vez por semana foram adicionadas às culturas, fatias de batata inglesa sem casca, as quais foram removidas no dia seguinte para evitar a contaminação por microrganismos.

**Extração:** Extratos hidroalcoólicos (Etanol a 70%) de besouros adultos coletados vivos foram obtidos por maceração até esgotamento (3 ou 4 extrações sucessivas com intervalos de 48 horas) em temperatura ambiente, seguido de destilação à vácuo e o extrato foi colocado em dessecador para eliminação da umidade residual.

**Determinação do pH:** A amostra foi diluída em solução de metanol em água destilada (1:10) e analisada em pHmetro eletrônico (827 pH lab - Metrohm).

**Triagem de metabólitos secundários:** Para este ensaio, 0,4g do extrato foi diluído em 50 mL de etanol, distribuídos em 5 tubos de ensaio. Foram realizados ensaios para verificação da presença de saponinas, antocianinas, antocianidinas, flavononóis e alcalóides segundo metodologia preconizada por GAZONI (2009).

**Avaliação Antimicrobiana:** Após a obtenção dos extratos, a atividade antimicrobiana foi confirmada para *S. aureus* pelo método de difusão em disco de papel (BAUER et al, 1966). Os microrganismos foram obtidos da Coleção do Departamento de Antibióticos da UFPE.

**Isolamento e purificação:** O extrato foi fracionado de acordo com sua polaridade por cromatografia em coluna utilizando um gradiente de polaridade (tolueno, acetato de etila e metanol) com polaridade crescente. Observaram-se bandas que foram visualizadas em comprimentos de onda na região do UV (254 nm e 366 nm).

**Revelação antimicrobiana:** A bioautografia foi realizada em duplicata, onde placa cromatográfica foi coberta com Agar Mueller Hinton contendo um inóculo de *S. aureus* na concentração de  $10^6$  UFC/ml (pela escala de MacFarland) e utilizando uma solução aquosa de cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazóleo (TTC). Após incubação do micro-organismo por 24 h zonas de inibição indicaram os compostos bioativos.

**Análise espectroscópica:** Os compostos bioativos foram analisados por: Ultravioleta-vis, Infravermelho com transformada de Fourier e por Ressonância Magnética Nuclear. Após todas essas análises, as três frações bioativas foram submetidas a um segundo fracionamento por cromatografia flash e analisadas por RMN-<sup>1</sup>H.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

**Obtenção dos extratos:** O extrato etanólico de *U. dermestoides* foi obtido utilizando-se 20,92 g de besouros coletados vivos, de onde foram obtidas 2,32 g de extrato seco após concentração, o que corresponde a um rendimento de 11,08.

**Análise de pH:** O extrato apresentou um valor de 5,56, evidenciando que a substância em estudo tem caráter ácido.

**Triagem de metabólitos secundários:** Foi detectada a presença de saponinas devido a formação de espuma persistente e abundante. Quanto aos demais metabólitos o extrato apresentou resultado negativo para alcaloides e uma discreta quantidade de flavononóis.

**Isolamento e purificação:** Foram realizadas quatro purificações cromatográficas até o isolamento de 10 frações. Como fases móveis, foi novamente utilizado um gradiente de polaridade utilizando-se misturas de tolueno-acetato (9:1, 8:2, 7:3, 6,5:3,5 e 1:1); tolueno-acetona (1:1); CH<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>; hexano-acetato (7:3) e tolueno-metanol (8:2 e 9:1). Uma banda vermelha foi verificada apenas em uma fração, com rápida mudança de cor. Uma hipótese para o que foi observado é a de que esta substância vermelha (visualizada a 365nm) possivelmente tenha sofrido degradação, para a perda da coloração.

**Revelação microbiológica:** A revelação microbiológica em extratos etanólicos frente ao *S. aureus* foi utilizada, em placas cromatográficas, em triplicata. Os demais ensaios foram realizados com as frações isoladas e reveladas com MTT. Após 7 meses do isolamento das frações, o teste de revelação, no segundo ensaio apresentaram halo de inibição, em sua maioria no ponto de aplicação. No terceiro ensaio foram identificadas três frações (**a**, **b** e **c**) com atividade antimicrobiana. Para a análise espectroscópica apenas com as frações que apresentaram halo de inibição mais significativo (**a**, **b** e **c**), porque se apresentaram purificadas na análise cromatográfica.

### Análise espectroscópica:

#### Ultravioleta visível (UV-vis)

As análises na Região do UV-vis foram realizadas em espectrofotômetro UV-1800, Shimadzu, registrados a 25°C com o caminho óptico de 1 cm em solução (188mg da fração **a**, 121mg da fração **b** e 6mg da fração **c**), diluídos em diclorometano e analisados na faixa espectral de 200 a 400nm. Os máximos a 230nm foram observados para as frações **a**, **b** e **c**, característicos de alcenos.

#### Infravermelho com transformada de Fourier (IV-TF)

As frações **a**, **b** e **c**, foram avaliadas na Região do Infravermelho na faixa de 1000cm<sup>-1</sup> a 4.000cm<sup>-1</sup> e a análise dos resultados foi baseada em SILVERSTEIN (2004) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Análise dos principais máximos de absorção do espectro de infravermelho

Máximos (cm <sup>-1</sup> )	POSSÍVEL GRUPO FUNCIONAL
~1200 - 1300 (I)	Deformação de alquino
~1400 (II)	Deformação de aldeído alquil
~1700 (III)	Deformação de cetonas
~2800 - 2950 (IV)	Deformação de dímeros de COOH

### Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H (RMN-<sup>1</sup>H)

No que diz respeito a análise das frações **a**, **b** e **c** após um segundo fracionamento, foram obtidos espectros de RMN (1H, 13C, DEPT, HSQC e HMBC). Os espectros de RMN de 1H, mostraram um conjunto de sinais, na região alifática ( $\delta$  3.0-0.5 ppm), que é comum as amostras analisadas e que integra o principal componente presente nas amostras. Apenas a amostra **a** apresenta sinais entre  $\delta$  8.0 e 7.2 ppm, que podem ser associados a grupos aromáticos. Considerando as áreas de integração sob os sinais, pode-se inferir que há pelo menos três compostos principais, destacando-se o grupamento alquílico. O conjunto de sinais atribuído aos carbinólicos e os sinais atribuídos a grupos aromáticos. Entretanto é necessária uma maior quantidade de compostos com maior grau de pureza para conclusão sobre o esqueleto estrutural das substâncias bioativas.

## CONCLUSÕES

- A pesquisa de metabólitos secundários demonstrou a presença de saponinas e flavononóides no extrato hidroalcoólico bruto.
- Nos testes antimicrobianos foi confirmada a ação do extrato contra *Staphylococcus aureus*.
- As frações com atividade antimicrobiana isoladas a partir do sistema de cromatografia flash apresentaram baixo rendimento, com aspecto amarelado e denso. A análise espectroscópica mostra que a substância provavelmente é um polieno.
- O fracionamento permitiu a detecção de três substâncias majoritárias, com características poliênicas contendo grupamentos carboxilados que foram comprovados pelo pH ácido preservado do extrato.

## AGRADECIMENTOS

À Pró-reitoria para Assuntos Estudantis - UFPE, ao LBQ – CCB/UFPE, à Central Analítica – DQF/UFPE e ao Lab de Microbiologia Clínica – CCB/UFPE.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, O.M.S. **Morfologia e biologia do *Palembus dermestoides* (Fairmaire, 1893) (Coleoptera, Tenebrionidae)**. 1982.136 f. Dissert de Mestrado, UFPR, 1982.
- BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. **Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method**. *Am J Clin Pathol.*, v.45, p. 493-496, 1966.
- COSTA NETO, E.M. & RESENDE, J.J. **A percepção de animais como “insetos” e sua utilização como recursos medicinais** *Acta Scient. Biol Sci*, v.26, n.2, p.143-149, 2004.
- COSTA NETO, E.M & RAMOS-ELORDUY, J. **Los insectos comestibles de Brasil**. *Bol Soc Entomol Arag*, n.38, p.423-442, 2006.
- GAZONI, J. Análise fitoquímica e atividade antioxidante de *Dioscorea multiflora* Universidade Regional de Blumenau, Curso de Farmácia, CCS, 2009.
- MENDOZA, D.L.M. et al. **Chemical composition and anti-irritant capacity of whole body extracts of *Ulomoides dermestoides***. *Vitae*, v20, p.41-48, 2013.
- NASCIMENTO, A. L. et al **Avaliação antimicrobiana de *Ulomoides dermestoides* (FAIRMAIRE, 1893)**. In: IV Simpósio de Produtos Naturais do Brasil (SIMPRONAT), 2012, João Pessoa. IV Simpósio de Produtos Naturais do Brasil (SIMPRONAT), 2012.SANTOS, R.C.V. et al. **Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *U. dermestoides* on induced pleurisy in rats**. *Inflam*, v.33, p.173-179, 2010.
- SBFgnosia*, Disp em: <<http://www.sbfgnosia.org.br/Ensino/saponinas.html>>. Acesso: 28 jan. 2015.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; XIEMLE, D. **Identificação espectroscópica de compostos orgânicos**. 7ª ed. Wiley. New York. 2004.
- SPILMAN, T.J. **The tenebrionid *Dirrclina lagi* as a medicine in the Orient**. *Coleopr. Bull.*, v.14, p. 12, 1960.
- VILLAVERDE, M.L. et al. **Volatile secretions and epicuticular hydrocarbons of the *U. dermestoides***. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.*, v.4, p.381-386, dez. 2009.
- WILSON, E.O. **Biodiversidade**, 1997. cap.13, p.158-165, 1997.