



ABORDAGEM QUIMIOMÉTRICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Vismia* spp.

Ívina Thayná Miranda Trindade, Aquila de Souza Neves, Felipe Moura Araújo da Silva, Jaqueline de Araújo Bezerra, Dominique Fernandes de Moura do Carmo

Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia – Universidade Federal do Amazonas
Rua Nossa Senhora do Rosário, 3683 – Tiradentes – Itacoatiara/AM

ivinamiranda@gmail.com, aquilaneves07@gmail.com, felipemas@ufam.edu.br, jaqueline.araujo@ifam.edu.br, dominiquefmc@ufam.edu.br

Resumo: Espécies do gênero *Vismia* (Hypericaceae) são alvos de diversos estudos químico-biológicos por apresentarem compostos bioativos em abundância. O presente trabalho objetivou contribuir com estudos quimiométrico e biológico de espécies do gênero *Vismia*. Assim, os frutos de *V. cayennensis*, *V. guianensis*, *V. aff guianensis* foram coletados no entorno de Itacoatiara-AM e submetidos a extrações com solventes orgânicos. Os extratos obtidos foram sujeitos à análise por espectrometria de massas com ionização por electrospray para o posterior emprego de técnicas quimiométricas, e do potencial antioxidante frente ao radical DPPH. Quanto a atividade antioxidante, o extrato metanólico destacou-se pelo alto valor encontrado ($1592,6 \pm 3,8 \mu\text{M ET}$). A partir da análise quimiométrica foi possível observar semelhança química entre as amostras pertencentes às espécies *V. guianensis* e *V. aff guianensis*.

Palavras-Chave: Hypericaceae. DPPH. *Vismia aff guianensis*.

1. INTRODUÇÃO

As plantas são de extrema importância devido as suas mais diversas aplicabilidades, seja com medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002). Atualmente, as pesquisas científicas tem se voltado ao estudo dos metabolitos secundários, visto que, possuem um potencial efeito medicinal para os seres humanos (VIZOTO, 2010). Estas substâncias exibem uma grande quantidade de atividades biológicas como, por exemplo, fungicida, inseticida, citotóxica, antiviral, tranquilizante e analgésica (ROZWALKA et al., 2008).

As famílias da ordem Malpighiales Bercht. e J. Presl são fontes importantes para estudos fitoquímicos e farmacológicos, entre essas está a famílias Hypericaceae Juss. (PATRONO, 2013). Entre os gêneros pertencentes a família Hypericaceae, o gênero *Vismia* destaca-se pela produção de metabolitos secundários com elevado potencial biológico, como antimicrobiano, antifúngico, anti-inflamatório, antioxidante e antidepressivo (MEIRELLES et al., 2017). Quanto aos aspectos morfológicos, as espécies pertencentes a este gênero são bastante semelhantes entre si.

Assim, o presente trabalho objetivou contribuir com análise quimiométrica de extratos, de diferentes polaridades, de três espécies do gênero *Vismia* e determinar a atividade antioxidante frente ao radical de DPPH.



O restante do artigo está organizado da seguinte maneira. A Seção 2 apresenta alguns conceitos básicos e discute trabalhos relacionados. A Seção 3 apresenta a metodologia utilizada enquanto a Seção 4 mostra os resultados e as discussões. A Seção 5 apresenta as considerações finais e os trabalhos futuros.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Hypericaceae é uma família que possui grande destaque pela produção de metabólitos com alto potencial farmacológico (OZORIO, 2019). No Brasil, esta família apresenta dois gêneros predominantes: *Hypericum* L. e *Vismia* Vand. (MARTINS et al., 2018).

O gênero *Vismia* é mais frequente na região Amazônica e suas espécies são conhecidas popularmente como Lacre, atribuído em referência ao seu exsudato amarelado ou alaranjado (STEVENS, 2007). Entre as espécies mais estudadas deste gênero estão: *V. guianensis*, *V. guaramirangae* e *V. laurentii*. (ROJAS; BUITRAGO, 2018).

De acordo com Magalhães (2020) cerca de 160 compostos químicos já foram associados a espécies pertencentes ao gênero *Vismia*, principalmente das classes das antronas, xantonas, antraquinonas, flavonoides, benzofenonas e terpenos. Algumas destas substâncias possuem atividade biológica comprovada, como por exemplo, a vismiona A, com potencial antineoplásico, flavonoide kaempferol, com atividades contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e as xantonas laurentixantonas A e B com atividade antimicrobiana contra *Streptococcus faecalis* e *Candida glabrata* (CASSINELLI et al., 1986; NGUEMEVING et al., 2006)

Considerando a grande quantidade de metabolitos já identificados, as técnicas quimiométricas são hábeis na seleção de informações relevantes sobre a natureza química de espécies (GUIMARÃES, 2019). Quando se analisa amostras com a finalidade de identificar sua identidade, é possível calcular o grau de similaridade entre uma amostra e aquela de referência (VANDER, 2006).

A quimiometria utiliza métodos estatísticos e matemáticos para o tratamento e interpretação das características químicas do objeto de estudo (CHRÉTIEN, 2003). Por meio de métodos como análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamentos hierárquicos (HCA) há a possibilidade de investigar se existe agrupamentos em um conjunto de dados, sem necessariamente utilizar informação a respeito das classes (BEEBE; PEL; SEASHOTLTZ, 1998). A PCA é uma técnica que permite observar, interpretar e correlacionar às diferenças existentes entre as amostras e ainda viabiliza a formação de grupos com características semelhantes entre si e o HCA agrupa os objetos com características semelhantes apresentados em forma de dendogramas (WORLEY; HALOUSKA; POWERS, 2013).

O isolamento e a determinação estrutural dos constituintes químicos já identificados em *Vismia* spp. se fazem necessário, pois colaboram na descoberta de compostos bioativos e no uso medicinal dessas espécies, bem como corroboram para a identificação taxonômica. Neste contexto, este artigo visa analisar comparativamente a composição química de diferentes extratos obtidos a partir de frutos das espécies de *V. cayennensis*, *V. guianensis*, *V. aff guianensis*



(Hypericaceae) por Espectrometria de Massas, auxiliado por ferramentas quimiométricas. Deste modo, propõe-se uma abordagem diferenciada, moderna, empregando pequenas quantidades de material vegetal, volumes reduzidos de solventes de baixo custo, utilizando equipamentos robustos (Espectrômetro de Massas com ionização por electrospray – ESI-MS) e ferramentas quimiométricas (PCA e HCA) com o intuito de desreplacar essas matrizes vegetais. Os resultados obtidos permitirão construir um modelo de similaridade química entre as espécies selecionadas, bem como auxiliarão no isolamento futuro dos principais constituintes químicos presentes nessas matrizes vegetais.

3. MATERIAL E MÉTODO

3.1. Coleta dos materiais botânicos

Os frutos das espécies *Vismia cayennensis*, *Vismia guianensis* e *Vismia aff. guianensis* foram coletadas em mata de terra firme aos arredores de Itacoatiara-AM.

3.2. Preparação do extrato bruto

As amostras foram pesadas, maceradas e submetidas a extrações sequencial com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, os solventes utilizados foram: hexano (Hex), diclorometano (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH). A concentração dos extratos com grande volume de solvente (sobrenadante) foi efetuada em evaporador rotativo a vácuo (modelo 801 FISATOM) com pressão. Os extratos obtidos foram codificados de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1– Código das amostras.

Espécie	Solvente de extração			
	Hex	CHCl_3	AcOEt	MeOH
<i>V. cayennensis</i>	EH-VC	ED-VC	EA-VC	EA-VC
<i>V. guianensis</i>	EH-VG	ED-VG	EA-VG	EA-VG
<i>V. aff. guianensis</i>	EH-VX	ED-VX	EA-VX	EA-VX

Fonte: O autor (2021)

3.3. Análise quimiométrica

Para a realização da análise quimiométrica, inicialmente, foram produzidas soluções estoques dos extratos analisados com solventes de baixa (AcOEt acrescido de MeOH) e alta polaridade (de MeOH), a concentração de 1mg/mL. Cada extrato foi diluído com o solvente de mesma polaridade e assim, uma alíquota desta solução foi injetada por infusão direta em duplicata no espectrômetro de massas ion trap, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific). A fonte de ionização utilizada foi a electrospray nos modos positivo e negativo. Os dados espectrais obtidos pela análise de MS dos extratos de todas as espécies, foram tabulados no Excel® em uma matriz linhas x colunas. As análises do componente principal (PCA) e análise hierárquica



de cluster (HCA) foram plotadas com o emprego do software Chemoface, versão 1.5. A análise PCA foi calculada através da normalização da variação das espécies analisadas, sendo a HCA calculada através da distância euclidiana e média de ligação dos três principais componentes.

3.5. Determinação da capacidade de sequestrar radicais livres

O radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH[•]) tem sido utilizado com grande frequência para avaliar a capacidade de antioxidantes naturais em sequestrar radicais livres. A partir disto, os extratos hexânicos, diclorometano, acetato de etila e metanol foram solubilizados em metanol P.A. a 2,0 mg/mL. Estas amostras foram submetidas a análises de capacidade sequestrante do radical DPPH e a determinação de fenóis totais.

Para o ensaio de DPPH, foram adicionados 10 µL da amostra em 190 µL da solução de DPPH (60 µM), para posterior incubação em ambiente escuro durante 30 minutos. Foi feita a leitura das absorvâncias em Leitora de Microplaca a 515 nm (Epoch 2, Biotek) e a curva padrão de Trolox de 100 a 2000 µM ($y = -0,0004x + 0,7397$, $R^2 = 0,997$), os resultados foram expressos em µM de Equivalentes de Trolox.

O ensaio de fenóis totais foi realizado a partir da amostra acrescida a mistura reacional (1:1) do reagente de Folin Cicoaltea e bicarbonato de sódio (6%), mantida no escuro por 90 min para posterior análise em Leitora de Microplaca a 725 nm (Epoch 2, Biotek). A curva padrão analítica de ácido gálico variou de 7,8 a 1000 µg/mL, apresentando a equação da reta $y = 0,0029x + 0,2062$ e $R^2 = 0,9932$. Os resultados foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

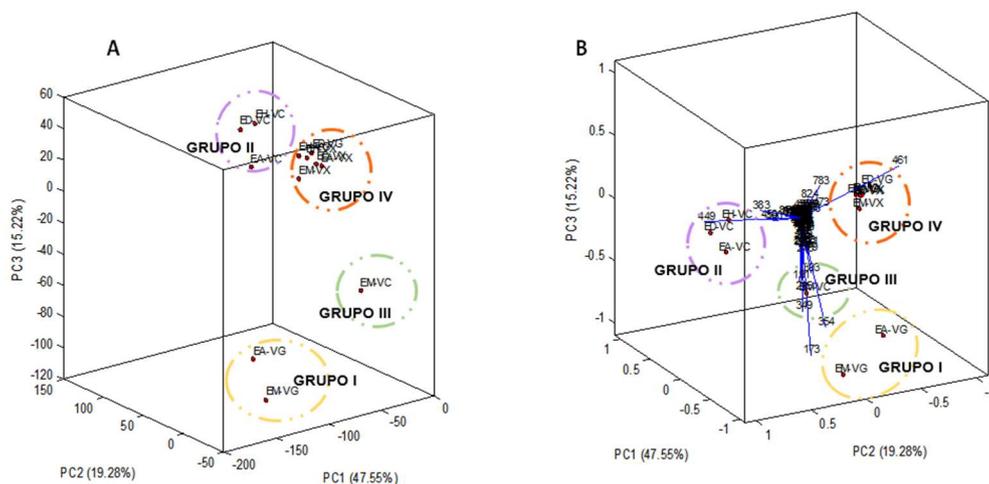
4.1. Análises quimiométricas

Neste caso em específico a PCA foi utilizada com o objetivo de verificar as diferenças e as semelhanças químicas dos extratos obtidos das três espécies do gênero *Vismia*.

O gráfico de score PCA (Figura 1A) representou 82,05% da variação total com os espectros no modo negativo e fornecem informações discriminatórias das amostras. O primeiro componente principal (PC1) descreve 47,55% da variação total, a segunda (PC2) 19,28% e a terceira 15,22% (PC3), foi observada a formação de quatro grupos principais, sendo o grupo I composto pelas amostras EM-VG e EA-VG, o grupo II por EA-VC, ED-VC e EH-VC, o grupo III somente pela amostra EM-VC e por fim o grupo IV formado pelas amostras ED-VG, EH-VG, EM-VX, EH-VX, EA-VX e ED-VX.

A partir da análise do biplot de PCA (Figura 1B), é possível destacar quais foram os íons m/z responsáveis pela desagregação e agrupamentos observados no gráfico de score. Assim. É possível identificar que os íons de m/z 173, 349 e 354 são os responsáveis pelo agrupamento I. Os íons de m/z 449 e 383 reúnem as amostras no grupo II. Os grupos II e IV, são agrupados devido aos íons com m/z correspondente a 191, 215 e 393, e 461, respectivamente.

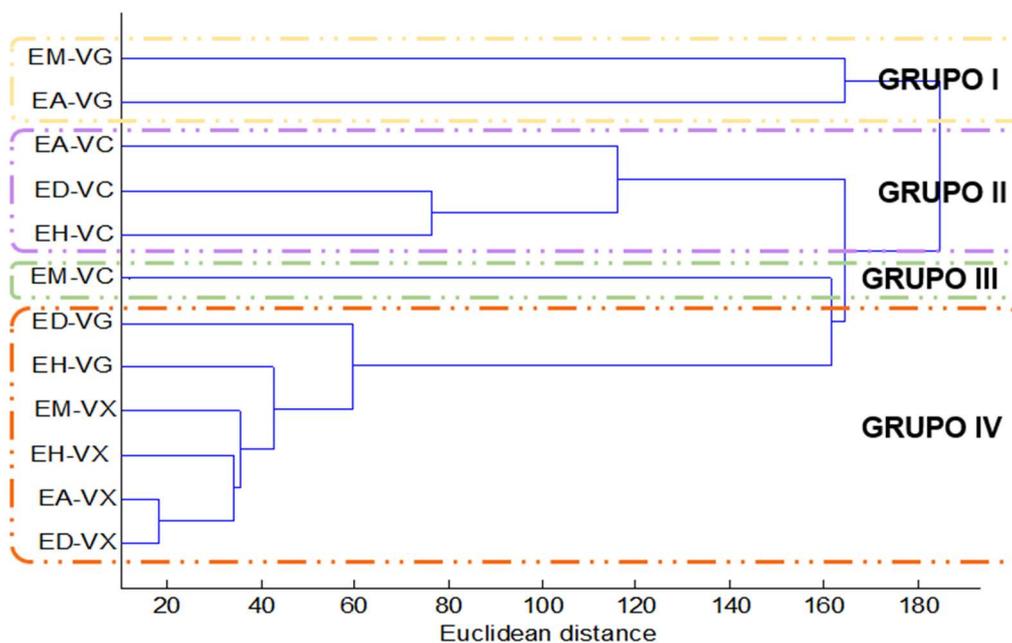
Figura 1 – Gráfico de score PCA (A) e biplot (B) das diferentes espécies de *Vismia* baseados no perfil química por ESI-MS no modo negativo



Fonte: O autor (2021)

A partir da análise do dendrograma de HCA (Figura 2) foi possível observar que a correlação química entre as amostras ED-VG, EH-VG, EM-VX, EH-VX, EA-VX e ED-VX (Grupo IV), que seriam aquelas pertencentes às espécies *V. guianensis* e *V. aff. guianensis*, o que corrobora com a semelhanças entre as duas espécies.

Figura 2 – Dendrograma de HCA das diferentes espécies de *Vismia*



Fonte: O autor (2021)



A análise Hierárquica de Cluster (HCA) corroborou a PCA, cujo dendograma mostra a formação de quatro grupos distintos pelos espécimes. Portanto, a abordagem metodológica proposta mostrou-se eficiente, pois possibilitou a criação de um modelo de similaridade química entre as três espécies de *Vismia*.

4.2. Análise quantitativa da atividade antioxidante

O potencial antioxidante é correlacionado com a quantidade de compostos fenólicos presentes nas plantas. Desta forma o teor destes compostos foi determinado nas frações estudadas e assim, quanto maior a quantidade de ácido gálico encontrada em equivalente por g, mais elevado será o percentual de fenólicos detectados.

A capacidade de sequestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) foi aplicada por ser uma metodologia simples, rápida e apropriada para realização da triagem considerando o número de amostras e as distintas polaridade. Com isso, os resultados do ensaio de fenólicos totais (FT) das frações dos extratos analisados estão apresentados na Tabela 2, assim como a capacidade de sequestrar radicais livres DPPH.

Tabela 2– Teor de fenólicos totais (mg EAG/g) e potencial antioxidante ($\mu\text{M ET}$) das três espécies do gênero *Vismia*

Frações	Teor de fenólicos totais (mg EAG/g) *	DPPH ($\mu\text{M ET}$) **
EHVcFr	202,9 \pm 0,5	1540,9 \pm 5,2
EHVgFr	166,3 \pm 0,7	1491,7 \pm 4,3
EHVxFr	264,6 \pm 0,5	1483,4 \pm 2,9
EDVcFr	72,2 \pm 0,5	1167,5 \pm 3,9
EDVgFr	179,4 \pm 0,5	1473,4 \pm 3,8
EDVxFr	289,7 \pm 0,5	1490,9 \pm 2,9
EAVcFr	81,7 \pm 0,7	870,1 \pm 5,2
EAVgFr	495,1 \pm 0,7	974,2 \pm 2,5
EAVxFr	285,0 \pm 0,7	1460,9 \pm 3,8
EMVcFr	85,4 \pm 0,3	790,9 \pm 5,2
EMVgFr	614,2 \pm 0,5	1066,7 \pm 4,3
EMVxFr	726,5 \pm 0,7	1592,6 \pm 3,8

Fonte: O autor (2021). *miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra; ** microlitro de Equivalentes de Trolox

Os conteúdos de fenóis totais das três espécies estavam na faixa de 264,6 \pm 0,5 a 726,5 \pm 0,7 e DPPH entre 790,9 \pm 5,2 a 1592,6 \pm 3,8. A partir dos resultados, foi verificado que para este teste a fração do extrato metanólico da espécie *V. aff guianensis* possui maior conteúdo de



compostos fenólicos ($726,5 \pm 0,7$) quando comparado com os demais, o que conseqüentemente constata-se que esta mesma amostra tem maior atividade antioxidante ($1592,6 \pm 3,8$). Foi observado ainda que os conteúdos de fenólicos totais para o extrato metanólico exibiram diferenças entre as espécies analisadas, visto que para a espécie *V. aff guianensis* foi oito vezes maior do que o da *V. cayennensis*.

Em relação aos extratos acetato de etila, a fração obtida do extrato da espécie *V. aff guianensis*, o potencial antioxidante foi no valor de $1460,9 \pm 3,8$; relativamente maior que os demais, no entanto, o teor de fenólicos totais mais elevado foi de $495,1 \pm 0,7$ para a espécie *V. guianensis*. A maior atividade antioxidante das frações dos extratos de diclorometano foi também da espécie *V. aff guianensis* com DPPH no valor de $1490,9 \pm 2,9$ e do hexânico foi da espécie *V. cayennensis* com $1540,9 \pm 5,2$.

Os resultados encontrados corroboram aqueles encontrados na literatura de que espécies do gênero *Vismia* possuem potencial antioxidante. Alvarez e colaboradores (2008), por exemplo, detectaram que as bagas de *V. baccifera* ssp. *ferruginea* e *V. guianensis* podem ser uma fonte antioxidante natural de acordo com as análises obtidas pelo método de DPPH, que em particular apontou o extrato de acetato de etila com maior potencial, IC_{50} de $4,16 \pm 0,07$ e $5,86 \pm 0,72$, respectivamente, e maior teor de compostos fenólicos. Na espécie *V. baccifera* foi detectado atividade sequestradora no extrato metanólico das cascas utilizando o mesmo método, com IC_{50} correspondente a $5,87 \mu\text{g/mL}$ (BUITRAGO et al., 2016)

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de extração sequenciada em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol), potencializou a resposta antioxidante frente ao radical livre DPPH, considerando que o extrato EMVxFr apresentou melhor potencial antioxidante ($1592,6 \pm 3,8 \mu\text{M ET}$) e maior contribuição com conteúdo de fenólicos totais ($726,5 \pm 0,7 \text{ mg EAG/g}$) quando comparado com os demais extratos. As análises por ESI-MS dos principais íons dos extratos avaliados de *Vismia* spp, estão em andamento a fim de viabilizar a identificação dos constituintes. A partir deste estudo, foi possível construir um modelo de similaridade química qualitativo utilizando um método rápido, barato e reprodutível que possibilita a comparação entre essas espécies, cujos resultados evidenciam perfis químicos semelhantes, porém distinguíveis em nível de espécie e tipo de extrato. Assim sendo, espera-se que o modelo empregado nessas espécies seja eficaz não somente na diferenciação entre as composições químicas das espécies selecionadas nesta proposta, mas para auxiliar novos estudos na identificação, por espectrometria de massas, dos principais constituintes químicos de maior relevância neste modelo e no isolamento de substâncias que não apresentam registro na literatura e foram identificados nessas matrizes vegetais.

REFERÊNCIAS

ÁLVAREZ, R. E.; JÍMENEZ G. O. J.; POSADA A. C. M.; ROJANO, B. A.; GIL, G. H. J.; GARCÍA, C. M. P.; DURANGO, D. L. R. Actividad antioxidante y contenido fenólico de los



extractos provenientes de las bayas de dos especies del género *Vismia* (GUTTIFERAE), *Vitae*, **Revista de la Facultad de Química Farmacéutica**. Volumen 15, número 1. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. págs. 165-172, 2008.

BEEBE, K.; PEL, R.; SEASHOTLTZ, M. B. *Chemometrics – A practical Guide*. New York, Jhon Wiley & Sons, 1998.

BUITRAGO, A. D.; ROJAS-VERA, J.; PENALOZA, Y. In vitro antioxidant activity and qualitative phytochemical analysis of two *Vismia* (Hypericaceae) species collected in Los Andes, Venezuela. **Revista de Biología Tropical**, v. 64, n. 4, p. 1431-1439, 2016.

CASSINELLI, G.; GERONI, C.; BOTTA, B. MONACHE, G.D.; MONACHE, F. D. Cytotoxic and antitumor activity of vismiones isolated from *Vismieae*. **Journal of Natural Products**, n.49, p. 929-931, 1986.

CHRÉTIEN, J. R. 'Boosting Chemometrics in Europe', *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 67, 1-2, 2003.

GUIMARÃES, Davi Dantas. Perfil químico e atividade fungicida dos extratos de fusarium equiseti: abordagem metabolômica e quimiométrica. 2019. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

MAGALHÃES, N. M. G. *Vismia gracilis* Hieron. (Hypericaceae): caracterizações químicas e atividade biológica em *Aedes aegypti*. 105 f., il. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2020.

MARTINS, M. V; SHIMIZU, G.H.; BITTRICH, V. Flora da Reserva Ducke, Estado do Amazonas, Brasil: Hypericaceae. **Hoehnea** 45(3): 361-371, 2018.

MEIRELLES, G. C.; PIPPI, B.; HATWING, C.; BARROS, F. M. C.; OLIVEIRA, L. F. S.; POSER, G. L. V.; FUENTEFRIA, A. M. Synergistic antifungal activity of the lipophilic fraction of *Hypericum carinatum* and fluconazole. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.27, 118-123, 2017.

OSORIO, M. I. C. **Estudo químico e biológico dos ramos de espécies do gênero *Vismia* Vand. (Hypericaceae)**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Botânica) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2019

PATRONO, C. Chapter 53 – Aspirin. In: *Platelets*, p. 1099–1115, 2013.

PINTO, Â. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. DE A. Produtos naturais: atualidades, desfi os e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, Supl.1, p. 45-61, 2002.

ROJAS J, BUITRAGO A. The Genus *Vismia*: Geographical Distribution, Chemical Composition and Recent Biological Studies. In: Martinez JL, Muñoz-Acevedo A, 101 Rai M, editors. **Ethnobotany Application of Medicinal Plants**. Boca Raton, FL: CRC Press; p. 105–35, 2018.

ROZWALKA, L.C.; LIMA, M.L.R.Z.C.; MIO, L.L.M.; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, v.38, n.2, p.301-307, 2008.



STEVENS, **Hypericaceae**. In: K. Kubitzki (ed.). The families and genera of vascular plants. Flowering plants. Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales p.p., Geraniales, Gunnerales, Myrtales p.p., Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae alliance, Passifloraceae alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae, Sabiaceae. Springer, Berlin, v. 9, pp. 194-201, 2007.

VAN DEN BERG, R. A.; HOEFSLOOT, H.C.; WESTERHUIS, J.A.; et al.; Centering, scaling and transformations: Improving the biological information content of metabolomics data. BMC Genomics, [s.l: s.n], v. 15, p. 1–15, 2006.

VIZZOTO, M. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância** / Marcia Vizzoto, Ana Cristina Krolow e Gisele Eva Bruch Weber – Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316), 2010.