

Identificação e Caracterização dos Compostos dos Extratos Vegetais das Folhas da Graviola (*Annona Muricata*) e dos Vegetais da Casca do Pau D'arco

Autores

Claudia de Jesus Aguiar Avanzi

Orientador

Adriana Mendes Aleixo

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

Nos últimos anos, tem sido objeto de grande interesse a pesquisa por agentes antioxidantes naturais, tanto para fins terapêuticos, como na área de tecnologia de alimentos, uma vez que, os antioxidantes fenólicos sintéticos demonstram ser potencialmente carcinogênicos (ITO, *et al.*, 1996). Há evidências consistentes da ação protetora dos antioxidantes naturais contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo decorrente do ataque dos radicais livres aos sistemas celulares (HALLIWELL, 1999).

O processo de envelhecimento está relacionado ao aparecimento de uma série de doenças degenerativas, incluindo doenças cardiovasculares, a aterosclerose, derrame cerebral, vários tipos de câncer (HARMAN, 1982). As reações provocadas por radicais livres são ubíquas em sistemas biológicos e são reguladas pelo sistema de defesa antioxidante enzimático, que em conjunto com os antioxidantes exógenos limitam a média de danos produzidos por radicais livres a um nível tolerável (HUDSON, 1990).

Muitos antioxidantes utilizados atualmente são de origem fenólica, e estão presentes na dieta humana. Dessa forma, compostos de natureza terpênica, principalmente diterpenos e outros fenilpropanóides e flavonóides passaram a ser pesquisados com maior intensidade buscando determinar seu mecanismo de ação e procurando relacioná-los com as propriedades químico-biológicas apresentadas pelos mesmos (SHARIDI, *et al.*, 1992).

A completa identificação da composição molecular dos antioxidantes possibilita uma melhor compreensão entre estrutura e função biológica (RAMARATHNAM, *et al.*, 1992). O objetivo desse trabalho é a caracterização e determinação da composição química dos compostos ativos dos diferentes extratos hidroalcoólicos e orgânicos das folhas da graviola (*Annona muricata*) e das cascas do pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*) que mostraram atividade antioxidante.

A *Annona muricata*, espécie cultivada em regiões tropicais das Américas, apresenta uma nova classe de fitoquímicos, as acetogeninas annonáceas (GLEYE; *et al.*, 1999). Compostos bioativos e fitoquímicos têm mostrado atividade anti-tumoral, pesticida, inseticida, antibacteriana, antiparasitário e efeito imunossupressor. A potente ação tumoral, pesticida e inseticida destes fitoquímicos tem sido relatada e já está patenteada, sendo que tais compostos estão presentes nas folhas, cascas e brotos (ALALI; *et al.*, 1999).

A *T. avellanedae*, é uma árvore de grande porte nativa das florestas tropicais da América do Sul, conhecida popularmente como Pau d'arco. A utilização medicinal do pau d'arco iniciou-se com os índios das tribos Tupi e Guarani que utilizavam as cascas no tratamento da malária, anemia, colite, problemas respiratórios, febres, artrite e reumatismo (BALEE, 1994). Muitos constituintes químicos e compostos ativos do pau d'arco foram identificados e caracterizados. O principal constituinte, o lapachol, demonstra atividade significativa contra diferentes tipos de tumores cancerosos e demonstrou ainda, atividade antiinflamatória (RAO; *et al.*, 1968; MULLER; *et al.*, 1999) e antiviral (STEINERT; *et al.*, 1994).

2. Objetivos

Esse trabalho, tem por objetivo dar continuidade aos estudos dos diversos extratos orgânicos e hidroalcoólicos da graviola (*Annona muricata*) e do Pau D'arco (*Tabebuia avellanedae*) visando caracterizar inicialmente as frações mais ativas dessas duas plantas. Dentro desse contexto, destaca-se a obtenção dos diferentes extratos hidroalcoólicos e orgânicos das folhas da graviola e da casca do Pau D'arco. A caracterização e determinação da composição química dos compostos ativos dos extratos que apresentaram potencial antioxidante.

3. Desenvolvimento

Conforme objetivos propostos, os diferentes extratos orgânicos das cascas da *T. avellanedae* foram novamente preparados, a partir de 196,0 g, através da técnica de maceração e percolação (PRISTA, 1975), nas frações hexânica, clorofórmica e metanólica.

Para a extração hidroalcoólica das duas plantas, foram utilizados 500,0 g e 260,0 g de pó com 1200mL de solução etanol/água 70% utilizando a técnica anterior para o pau d'arco e graviola, respectivamente.

As respectivas frações acetato de etila dos extratos hidroalcoólicos da graviola e do pau d'arco foram obtidas após o fracionamento dos extratos hidroalcoólicos com hexano (1,126 g para a graviola e 1,278 g para o pau d'arco) e posterior remoção do álcool etílico.

Na continuidade das purificações provenientes dos extratos orgânicos, o extrato fluido clorofórmico do ipê, 2,071 g, após purificação em coluna cromatográfica, indicou mistura de compostos em duas frações isoladas (amostras 1 e 2), e foram repurificados.

Na seleção do sistema de eluentes para a repurificação em coluna cromatográfica, empregou-se a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD), sendo utilizadas as misturas de hexano/acetato de etila 10%, para amostra 1 e dicloro/metanol 3% para amostra 2. As placas de vidro foram recobertas com sílica gel G e Si-60 GF₂₅₄ da Merck com a espessura da camada de 0.3 mm. Para visualização dos componentes, as placas secas foram vaporizadas com anisaldeído sulfúrico e, em seguida, carbonizadas à temperatura de 110 °C.

Na repurificação das amostras preparou-se a coluna cromatográfica utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh) da Merck como fase estacionária, empregando-se a fase móvel hexano/acetato de etila 15% para a amostra 1 e dicloro/metanol 1% para amostra 2.

A análise cromatográfica da amostra 1 indicou a presença de um composto puro na fração de polaridade intermediária. A mancha menos polar foi evaporada sob pressão reduzida fornecendo 0,115 g em massa. A repurificação com hexano/acetato 3% forneceu três compostos puros, com massas de 0,052 g, 0,047 g e

0,018 g, respectivamente, e foram reservados para a análise da composição química.

Na repurificação da amostra 2 (0,067 g) foi possível isolar um composto puro na fração de polaridade intermediária com massa de 0,015 g. A mancha de menor polaridade indicou mistura de compostos, sendo então concentrada sob pressão reduzida fornecendo 0,051 g em massa e reservada para repurificação.

A identificação dos compostos isolados efetuou-se mediante técnicas de cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa em aparelho QP 5000 CG-17 Shimadzu, com coluna DB 5% (5% fenil metilpolisiloxano) e análise orgânica instrumental de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H) e de carbono (RMN¹³C) em aparelhos espectrômetros Bruker AC-300 P e Gemini 300 BB utilizando 300 MHz para ¹H e 75,5 MHz para ¹³C.

4. Resultados

Na continuidade aos estudos dos diversos extratos orgânicos e hidroalcoólicos da graviola (*A. muricata*) e do Pau D'arco (*T. avellanae*), visando caracterizar inicialmente as frações mais ativas dessas duas plantas, iniciou-se a repurificação das frações provenientes do extrato orgânico clorofórmico do pau d'arco.

A purificação do extrato orgânico clorofórmico do pau d'arco, forneceu duas amostras (1 e 2) que se apresentaram como misturas, quando analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa. Desse modo, iniciou-se as repurificações dessas amostras empregando-se os sistemas de solventes hexano/ acetato 15% para a amostra 1 e hexano/ acetato 20% para a amostra 2.

A análise cromatográfica da amostra 1 revelou um composto puro na fração de polaridade intermediária.

A repurificação da fração menos polar proveniente da amostra 1, forneceu três compostos isolados.

Os compostos isolados foram submetidas à análise por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H e ¹³C para elucidação da composição química dos compostos isolados.

O espectro de RMN ¹H para o composto proveniente da fração menos polar, através dos deslocamentos químicos (d) verificou-se a presença de prótons olefínicos (d 5,36 e d 5,15) e prótons ligados a heteroátomo (d 4,07), além dos demais sinais característicos de prótons ligados a carbonos saturados CH₂ e CH₃. O RMN ¹³ C apresentou sinais relativos a um único composto.

Nos deslocamentos químicos (d) observados no espectro de RMN ¹H para o composto proveniente da fração de polaridade intermediária, foi verificado a presença de prótons olefínicos (d 5,37 e d 5,16) e prótons ligados à heteroátomo (

Pelos deslocamentos químicos apresentados nos espectros de RMN¹H e RMN¹³C para os dois compostos verificou-se que as duas amostras analisadas referem-se ao mesmo composto.

A repurificação da amostra 2 em coluna cromatográfica, forneceu um composto puro referente à fração menos polar.

Através dos deslocamentos químicos (d) dos sinais observados no espectro de RMN¹H para o composto dessa fração verificou-se a presença de prótons olefínicos (d 5,28), prótons ligados à heteroátomo (

Ressonância magnética nuclear de ¹³C e Dept (90) apresentaram sinais relativos a um único composto, com deslocamentos referentes a carbonos olefínicos.

Pelos deslocamentos químicos apresentados nos espectros de RMN¹H e RMN¹³C pode-se verificar que se trata de um composto com 10 carbonos e com estrutura de epoximonoterpeno.

As frações remanescentes foram concentradas em 0,052 g e, submetidas à nova purificação com sistema de solvente hexano/acetato 20%. Sucessivas tentativas de separação, com diferentes sistemas de eluentes, foram sem sucesso, além da obtenção sempre de misturas houve dificuldade de visualização dos componentes da mistura em vários sistemas de reveladores: anisaldeído sulfúrico, ácido sulfúrico/metanol 1:1, ácido fosfomolibdico.

Como parte integrante desse ano de trabalho, para fins de comparação com os extratos orgânicos obtidos da graviola (*Annona muricata*) e do pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*), os extratos hidroalcoólicos das duas plantas foram novamente preparados e as respectivas frações acetato de etila das duas plantas foram obtidas com êxito mediante a remoção do etanol, evitando a formação de emulsões.

A análise cromatográfica (CCD) dessas frações mostrou a presença dos mesmos princípios ativos provenientes dos extratos orgânicos, observados através dos tempos de retenção (Rf).

δ 4,06), prótons de metila ligados a duplas olefínicas (δ 1,68), além dos demais sinais característicos de prótons ligados a carbonos saturados CH₂ e CH₃. O RMN¹³C apresentou sinais relativos a um único composto, com deslocamentos referentes a carbonos vizinhos a heteroátomo (O ou N) e carbonos olefínicos. δ 3,90), além dos prótons metilênicos (δ 2,30) e prótons de metila saturada (δ 1,20).

5. Considerações Finais

Em continuidade aos estudos realizados, os extratos hidroalcoólicos das folhas da graviola e da casca do pau d' arco mostraram resultados promissores quando submetidos à avaliação da capacidade antioxidante e, portanto, foram novamente preparados para serem submetidos à separação com solventes orgânicos de polaridade intermediária.

Na seqüência das purificações dos extratos orgânicos, realizou-se a repurificação das amostras 1 e 2 provenientes do extrato bruto clorofórmico da casca do pau d'arco. Desse modo, para a amostra 1 foi possível o isolamento de 4 compostos puros, dos quais dois deles quando submetidos à análise de ressonância Magnética Nuclear ¹H e ¹³C mostraram ser o mesmo composto e tiveram parte da sua estrutura determinada.

A amostra 2 proveniente do extrato clorofórmico do pau d'arco permitiu o isolamento de um composto puro ,que quando submetido à análise de RMN de ¹H e ¹³C mostrou ser o mesmo composto obtido da fração hexânica, caracterizado como um epoximonoterpeno.

Estudos bidimensionais de COSY e HETCOR para o composto estão sendo feitos na tentativa de elucidação total de sua estrutura e serão analisados em novos projetos.

O fracionamento dos extratos hidroalcoólicos das duas plantas com solvente de polaridade intermediária apresentou, em análise por CCD, os mesmos tipos de compostos quando comparados com os respectivos extratos orgânicos.

Referências Bibliográficas

- ALALI, F. Q.; et al. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J. Nat. Prod.**, 62 (3):504-540, 1999.
- BALEE, W. Footprints of the Forest Ka'apor Ethnobotany – the historical ecology of plant utilization by the amazonian people. **Columbia University Press**, New York, NY, 1994.
- GLEYE, C.; LAURENS, A.; LAPREVOTE, O.; SERANI, L.; HOCQUEMILLER, R.. Isolation and structure elucidation of sabadelin, an acetogenin from roots of *Annona muricata*, **Phytochemistry**, 52:1403-1408, 1999.
- HALLIWELL, B.; J. M. C. GUTTERIDGE.. **Free radicals in biology and Medicine**, NY: Oxford University, 1999.
- HARMAN, D.. The free radical theory of aging. In: Free Radicals in Biology. **Academic Press**, vol V:255-272, 1982.
- HUDSON, B. J. F. Food antioxidants. New York : Elsevier Science Publishers LTD, 1990.
- ITO, N.. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food Chem. Toxic**, 24:1071-1082, 1986.
- MULLER, K.; SELLMER, A.; WIEGREBE, W.. Potencial antipsoriatic agents: lapachol compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. **J. Nat. Prod.**, 62:1134-1136, 1999.
- PRISTA, L. N., ALVES, A. C.. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 2ª ed. v. 1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p. 389 – 400, 1975.
- RAO, K. V; et al. Recognition and evaluation of lapachol as and antitumor agent. **Canc. Res**; 28:1952-1954, 1968.
- RAMARATHNAM, N. A.; OCHI, H.; TAKEUCHI, M. **Antioxidants defense sistem in Vegetables extracts**, p. 77.
- SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D.. Phenolic antioxidants. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr**, 32:67-103, 1992.
- STEINERT, J.; KHALAF, H.; RIMPLER, M.. HPLC separation and determination of naphthol[2,3-b]furan-4,9-diones and related compounds in extracts of *Tabebuia avellanedae*. **Journal of Chromatography A**, 693 p. 281-287, 1995.