

# Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extratos e suas Frações, de Graviola (*Annona Muricata*), Pau D'arco (*Tabebuia Avelanadae*), Pariparoba (*Pipper Regnelli*)

## Autores

---

Ana Celia Ruggiero  
Maria de Fatima Nepomuceno  
Adriana Mendes Aleixo  
Cibeli Ferelli  
Paula n Dedalo  
Guilherme Mei Silva  
Claudia j a Avanzi  
Adriana Grandis  
Sabrina Condiev

## Apoio Financeiro

---

Fap

## 1. Introdução

---

O uso de plantas medicinais contribui com o cuidado primário à saúde. A flora brasileira é rica em plantas medicinais empregadas para grande número de doenças. A graviola (*Annona muricata*) possui um grupo de fitoquímicos denominados acetogeninas e várias delas são bem documentadas como antitumorais. As acetogeninas atuam como inibidores do complexo I da cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias de vários organismos, inclusive em células tumorais, levando à depleção dos níveis de ATP (Alali et al. 1999). O pau d'arco (ipê roxo) de várias espécies de *Tabebuia* entre elas a *T. avellanae*, tem sido utilizado no Brasil como antifúngico, antimutagênico, contra o câncer, doença de Hodgkin, leucemia entre outras. O lapachol, principal constituinte químico do ipê-roxo, apresentou atividade contra diferentes tipos de tumores bem como a b-lapchona, e seu mecanismo de ação parece estar relacionado com as espécies reativas de oxigênio além de induzir a apoptose em células tumorais (MULLER et al. 1999). Entre as plantas da família Piperaceae, particularmente as Pariparobas (*Photomorphe umbellata* L. Miq. e *Piper regnelli*), são amplamente usadas contra doenças do fígado. Investigações fitoquímicas feitas com as espécies *Piper* revelaram o acúmulo de várias classes de produtos naturais com atividade fisiológica como alcalóides, amidas, pironas, desidrocalconas, flavonóides, fenilpropanóides, lignanas, neolignanas, terpenos, esteróides, chalconas, flavonas e flavanonas.

## 2. Objetivos

---

O projeto teve como objetivo avaliar a capacidade antioxidante de extratos de plantas utilizados na medicina popular tradicional, a graviola, o ipê roxo e a pariparoba. Através de diferentes técnicas buscou-se caracterizar o mecanismo da atividade antioxidante.

## 3. Desenvolvimento

---

Os extratos vegetais da casca do pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*), das folhas de graviola (*Annona muricata*) e da pariparoba (*Piper regnellii*) foram elaborados com cascas adultas frescas e folhas adultas frescas das duas plantas. O pó de cada delas foi submetido à extração dos princípios ativos naturais através da técnica de maceração e percolação com solução etanol/água 70%.

Para separação de substâncias através de suas polaridades, os extratos hidroalcoólicos foram submetidos a processo de partição com hexano, acetato de etila e clorofórmio.

Cada extrato orgânico fracionado em coluna cromatográfica, utilizando como fase estacionária sílica gel e vários eluentes. Os compostos isolados foram submetidos à cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massa para identificação e aqueles com alto grau de pureza foram submetidos à ressonância magnética nuclear de próton (R.M.N.<sup>1</sup>H) e ressonância magnética nuclear de carbono (R.M.N.<sup>13</sup>C) para elucidar a estrutura química. Todas essas análises foram feitas no Instituto de Química da UNICAMP.

Determinou-se a quantidade de compostos fenólicos através do reativo de Folin-Ciocalteu e como referência o ácido gálico. A capacidade de doar hidrogênio para radicais estáveis foi avaliada através da cinética de decomposição de ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolona)-6sulfônico) e de DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazil). Avaliou-se ainda a capacidade de seqüestrar o ânion superóxido (gerado pelo sistema xantina/xantina oxidase) e a capacidade de quelar íons Fell. Através da oxidação da desoxiribose determinou-se a capacidade de seqüestrar os radicais hidroxila e a capacidade pró-oxidante. Os experimentos com os extratos orgânicos foram realizados em função da solubilidade destes, nos meios reacionais. Todos os valores apresentados representam a média e o desvio padrão, de pelo menos 3 experimentos em duplicata (n=6).

#### 4. Resultados

---

No extrato clorofórmico de pau d'arco determinou-se 3,3% de compostos fenólicos e 6,6 % no extrato metanólico.

A fração clorofórmio do extrato de ipê apresentou, a partir da concentração 0,05 mg/mL, capacidade de quelar os íons Fell e capacidade de sequestrar o radical superóxido, cerca de 50% de inibição nas concentrações de 0,10 – 0,50 mg/mL

Com o extrato hexânico de ipê-roxo, avaliou-se o efeito contra a peroxidação lipídica induzida por hidroperóxido de cumeno em suspensões de eritrócitos, e observou-se cerca de 20% de proteção em relação ao controle oxidativo, nas concentrações de 1,0 a 2,0 mg/mL. Na decomposição do DPPH o extrato hexânico apresentou capacidade de interagir com o radical na concentração de 1,00 mg/mL.

O extrato metanólico de pau d'arco apresentou proteção contra a peroxidação lipídica induzida por peróxido de hidrogênio, capacidade de decompor o radical de ABTS, cerca de 50% na concentração de 1,0 mg/mL e nenhum efeito foi observado na capacidade de seqüestrar os radicais hidroxila e superóxido e nem atividade quelante. Essa fração apresentou apenas capacidade redutora.

Foram fracionados os extratos orgânicos da casca do ipê roxo (hexânico e clorofórmico). Para extrato hexânico foi possível o isolamento de 3 compostos que foram submetidos à análise de RMN<sup>1</sup>H e RMN<sup>13</sup>C. Através dos deslocamentos químicos (

A repurificação das amostras obtidas do extrato orgânico clorofórmico do pau d'arco forneceu um composto puro referente à fração menos polar. A fração foi submetida à análise por RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C e pode-se verificar que se trata de um composto com 10 carbonos e com estrutura de epoximonoterpeno.

Os extratos de folhas de graviola possuem, em média 6,8% de compostos fenólicos na fração metanólica e 14% na fração acetato de etila.

O extrato metanólico de folhas de graviola foi capaz de interagir com o radical de ABTS nas concentrações de 0,50 e 1,00 mg/mL. Não apresentou capacidade de sequestrar o ânion superóxido, mas a partir da concentração de 0,25 mg/mL foi capaz de quelar os íons FeII e na concentração de 1,0 mg/mL capacidade de reduzir os íons FeIII.

Quanto à fração acetato, pôde-se observar que o extrato apresentou capacidade antioxidante na cinética de decomposição do DPPH nas concentrações de 0,25 mg/mL e 0,5 mg/mL. Observou-se ainda capacidade de quelar os íons ferro, de seqüestrar os radicais hidroxila e de reduzir os íons FeIII, mesmo em baixas concentrações de extrato e ainda pequena capacidade de seqüestrar o radical superóxido.

O extrato hidroalcoólico de folhas de pariparoba contém cerca de 3,0% de compostos fenólicos. Não protege contra a peroxidação lipídica induzida por hidroperóxido de cumeno e protege contra a peroxidação lipídica induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Na cinética de redução do ABTS apresentou índice de proteção de cerca de 30% na concentração de 1,0 mg/mL e não foi capaz de seqüestrar os radicais hidroxila e superóxido. Também não apresentou atividade quelante, mas apresentou atividade redutora.

O extrato hidroalcoólico quando submetido à partição líquido-líquido forneceu os extratos orgânicos com hexano e acetato de etila que foram submetidos à purificação em coluna cromatográfica.

Para o extrato hexânico foi possível o isolamento de um composto puro cujo espectro de RMN<sup>1</sup>H, apresentou deslocamentos químicos de prótons olefínicos e prótons ligados a carbonos saturados CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>, respectivamente. Já a RMN<sup>13</sup>C apresentou sinais relativos a um único composto. Através da análise desses espectros pode-se verificar que o composto pode ser um terpeno com carbonos insaturados.

Para a fração de acetato de etila foram obtidos três compostos e os menos polares estavam puros. O RMN<sup>1</sup>H, para a mancha menos polar, revelou a presença de prótons de anel e prótons olefínicos ligados a heteroátomo além dos demais sinais característicos de carbonos metilênicos. O RMN<sup>13</sup>C apresentou sinais relativos a um único composto e verificou-se que composto menos polar está totalmente puro e apresenta esqueleto de composto fenilico com cadeia lateral altamente insaturada.

No RMN<sup>1</sup>H a mancha de polaridade intermediária apresentou prótons de anel aromáticos, prótons olefínicos e prótons ligados a heteroátomo (dioxóis) além dos sinais de deslocamentos característicos de carbonos metilênicos e metínicos. O RMN<sup>13</sup>C apresentou sinais relativos a um único composto.

As estruturas da fração acetato são bem típicas do gênero *Piper regnellii*, e pelo apresentado na literatura tratam-se de compostos inéditos.

δ)) dos sinais observados nos espectros de 2 compostos menos polares foi possível verificar a presença de hidrocarbonetos saturados de baixo peso molecular e de hidrocarboneto insaturado. O espectro de RMN <sup>1</sup>H indicou a presença de prótons olefínicos e prótons de metilas ligadas à duplas olefínicas. O extrato clorofórmico do ipê forneceu um composto puro e análise dos espectros de RMN <sup>1</sup>H indicou a presença de prótons olefínicos e prótons de metilas ligadas à duplas olefínicas e prótons ligados a carbonos saturados CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>. O RMN <sup>13</sup>C apresentou sinais relativos a um único composto, carbonos metínicos vizinhos à carbonilas, carbonos ligados à heteroátomo (O ou N) e de carbonos olefínicos além do sinal referente à carbonila. Os deslocamentos são coerentes com estruturas de terpenos oxigenados.

## 5. Considerações Finais

Dos resultados obtidos com os extratos de casca de de ipê-roxo pode-se concluir que os fitoquímicos da fração clorofórmica tem atividade antioxidante impedindo o progresso das reações, os componentes do extrato metanólico atuam reduzindo os radicais formados. Os resultados obtidos com esses dois extratos permitem concluir que o mecanismo antioxidante é como finalizadores das reações em cadeia, pela doação de hidrogênio para os radicais formados.

O extrato hexânico, devido a sua baixa polaridade não pôde ser avaliado em todas as metodologias e, portanto não foi possível concluir sobre o mecanismo da atividade antioxidante.

Com os extratos de folhas de graviola, pode-se concluir que os fitoquímicos presentes podem efetivamente seqüestrar os radicais, mas provavelmente não tem capacidade de doar hidrogênio (baixa capacidade de decompor o radical de ABTS). Esses compostos podem atuar como antioxidantes interrompendo o processo pela habilidade em seqüestrar os radicais formados ou mesmo os íons metálicos, catalisadores do processo radicalar. Por outro lado, devido a essa habilidade, podem também atuar como pró-oxidantes, ao doar elétrons se tornam oxidantes.

Na avaliação do extrato hidroalcoólico de folhas de pariparoba observou-se efeito contra a peroxidação lipídica induzida por peróxido de hidrogênio, evidenciando o acesso dos componentes do extrato, devido a sua hidrossolubilidade, à região polar. Os resultados obtidos aqui permitem concluir também que os compostos apresentam atividade antioxidante doando hidrogênio ou elétrons para os radicais formados e é também possível concluir que a ação pró-oxidante do extrato pode ocorrer em função de sua baixa capacidade de quelar metais e a capacidade de doar elétrons.

A solubilidade é um fator determinante para o acesso aos sítios de geração e/ou de propagação dos radicais livres e a polaridade dos diferentes extratos e seus efeitos nas diferentes metodologias testadas depende da capacidade dos fitoquímicos em atingir os sítios gerados das espécies radicalares.

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

Na continuidade das repurificações um terceiro composto pôde ser isolado e a análise de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C mostrou ser o mesmo composto obtido da fração hexânica caracterizado como um epoximonoterpeno.

A purificação das frações hexânica e acetato de etila provenientes do extrato hidroalcoólico das folhas da pariparoba forneceram quatro compostos puros que quando submetidos à análise de RMN<sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C tiveram parte da sua estrutura determinada.

Estudos bidimensionais de COSY e HETCOR para os compostos puros provenientes da fração acetato (m1 e m3) estão sendo feitos na tentativa de elucidação total de sua estrutura e serão analisados em novos projetos.

## Referências Bibliográficas

---

ALALI, F.Q. et al. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J. Nat. Prod.** 62: 504-540, 1999.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. **Free radicals in biology and medicine**. N.York: Oxford University.

1999.

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.