



## 15° Congresso de Iniciação Científica

### **OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS HEXANICO E ACETATO DE ETILA PROVENIENTES DOS EXTRATOS HIDROALCOOLICOS DAS FOLHAS DA GRAVIOLA (ANNONA MURICATA) E DA**

#### **Autor(es)**

VALÉRIA ZATARIN PANDOLFO

#### **Orientador(es)**

Adriana Mendes Aleixo

#### **Apoio Financeiro**

FAPIC

#### **1. Introdução**

Os radicais livres ocorrem naturalmente como produto do metabolismo aeróbico e imunológico e são regulados pelo sistema de defesa antioxidante que, em conjunto com os antioxidantes exógenos limitam a média de danos produzidos por radicais livres a um nível tolerável (HUDSON, 1990; HARMAN,1982). O estresse oxidativo é um estado de vulnerabilidade do sistema de defesa, onde há uma produção destas espécies que supera a capacidade antioxidante de defesa do corpo, o que faz com que substâncias biologicamente importantes fiquem suscetíveis à ação de radicais livres (HALLIWELL, 1999; JARIWALLA, 1996). Há vários indicativos da relação entre doenças degenerativas e os radicais livres e embora inúmeras pesquisas recentes tenham foco na atividade antioxidante dos compostos fenólicos, o mecanismo de inibição da oxidação lipídica é ainda controverso. Muitas plantas são utilizadas na medicina popular contra uma grande variedade de doenças que têm sido relacionadas com os radicais livres. A pesquisa por agentes antioxidantes naturais que possam ser utilizados tanto para fins terapêuticos como industriais, tem sido objeto de grande interesse nos últimos anos, como fonte alternativa ao uso de antioxidantes fenólicos sintéticos, tanto na conservação de alimentos, como parte do sistema de defesa que impede ou retarda o estresse oxidativo decorrente do ataque dos radicais livres aos sistemas celulares. Os vegetais são ricos em compostos polifenólicos, que tem atividade antioxidante. Dessa forma, este projeto tem como objetivo melhorar a compreensão do mecanismo de ação de fitoquímicos, utilizados na medicina popular tradicional, tendo como alvo específico a Graviola e o Pau D'arco (ipê roxo). A Graviola (Annona muricata) é típica das regiões tropicais das Américas e tem todas as suas partes utilizadas na medicina natural. Muitos compostos bioativos e fitoquímicos são encontrados na Graviola, e vários estudos têm mostrado ação hipotensiva, antiespasmódica, vasodilatadora, relaxante do músculo estomacal e atividade citotóxica contra células

cancerígenas a partir dos extratos das folhas e troncos (Alali; et al., 1999). Pesquisas mostram que a Graviola possui um grupo de fitoquímicos denominados acetogeninas anonáceas, uma classe relativamente nova de produtos naturais encontrados somente na família das plantas do gênero Annonaceae (GLEYE; et al., 1999; KIM; et al., 1998).

O Pau D'arco (*Tabebuia avellanedae*) é uma árvore de grande porte, nativa das florestas tropicais da América do Sul, e suas cascas tem sido utilizadas no Brasil como anti-fúngico, anti-mutagênico, contra eczema, doença de Hodgkin, leucemia, estomatite, sífilis, úlceras, analgésico, anti-inflamatório e diurético (ALMEIDA, 1993; MIRANDA; et al., 2001). Seu principal constituinte, o lapachol, tem sido utilizado no tratamento de vários tipos de câncer e tem demonstrado atividade significativa contra alguns tipos de tumores cancerígenos (RAO; et al., 1968; BLOK; et al., 1974; LINARDI; et al., 1975), além de atividade antiinflamatória, antiviral e contra carcinosarcoma intramuscular de Walker (MULLER; et al., 1999; STEINERT; et al., 1994).

## 2. Objetivos

---

Esse trabalho tem como objetivo a obtenção dos extratos orgânicos de diferentes polaridades e hidroalcoólicos, provenientes das folhas da Graviola (*Annona muricata*) e das cascas do Pau D'arco (*Tabebuia avellanedae*); e, por meio de estudos da capacidade antioxidante desses extratos, caracterizar e determinar a composição química das frações dessas duas plantas, visando obter a melhor compreensão do mecanismo de ação dos antioxidantes.

## 3. Desenvolvimento

---

As folhas de Graviola (*Annona muricata*), já secas e moídas, na forma de chá de Graviola (lote 06.08.1H.GRV), e as cascas do Pau D'arco (*Tabebuia avellanedae*) já secas e pulverizadas (receita N° 000741), foram fornecidas pela farmácia de manipulação Prof. Accorsi. Para a preparação do extrato hidroalcoólico foram utilizadas 160g das folhas secas da Graviola e 150g das cascas secas e moídas do Pau D'arco, que foram submetidas a um processo de extração dos princípios ativos através da técnica de maceração e percolação (PRISTA, 1975) com 1075mL e 350mL respectivamente, de solução etanol/água 70%. Após um período de 70 horas de maceração, o conteúdo foi percolado, com uma vazão de 1 gota por segundo, fornecendo 650mL e 210mL respectivamente dos extrato hidroalcoólicos das duas plantas. Para a obtenção dos extratos orgânicos de diferentes polaridades da Graviola foi realizado o mesmo processo acima, utilizando 160g de folhas secas e moídas. Foram utilizados 583mL de hexano, 600mL de acetato de etila e 600mL de metanol. As folhas permaneceram em processo de maceração por 69 horas. Após percolação, os extratos foram obtidos em 250mL, 525mL e 450mL respectivamente, que após evaporação sob pressão reduzida em evaporador rotativo da marca Tecnal TE-210, a uma temperatura média de 48°C, forneceu 1,93g; 2,99g e 22,55g de extrato fluido respectivamente. A obtenção dos extratos orgânicos do Pau D'arco foi realizada utilizando 300g das cascas secas e moídas, utilizando-se os mesmos procedimentos da Graviola. Foram utilizados 630mL de hexano, 700mL de clorofórmio e 650mL de metanol. As cascas permaneceram em processo de maceração por 70 horas. Após percolação foram obtidos 250mL, 420mL e 650mL de extratos respectivamente. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotativo da marca Tecnal TE-210, a uma temperatura média de 53°C, obtendo-se assim: 0,54g; 2,04g e 23,89g de extrato fluido respectivamente. Posteriormente, os extratos obtidos foram testados e, as frações que apresentaram atividade biológica pronunciada, foram submetidos à procedimentos cromatográficos para isolamento e purificação dos compostos (CECHINEL, 2001), através de duas técnicas de separação: cromatografia em coluna (CC) e cromatografia em camada delgada (CCD); utilizando placas de vidro preparadas com 30,0 g do adsorvente sílica gel G e 60mL de água destilada, com a espessura da camada de 0,3 mm e ativadas em estufa à temperatura de 115 °C por uma hora e reveladas com anisaldeído sulfúrico. Os compostos que mostraram alto grau de pureza foram submetidos à análise orgânica instrumental de Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN 1H) e Ressonância Magnética Nuclear de carbono-13 (RMN 13C) em aparelhos espectrômetros Brucker AC-300 P e Gemini 300BB, utilizando 300 MHz para 1H e 75,5 para 13C a fim de elucidar a estrutura química. Todas essas análises se deram no

#### 4. Resultados

Foram obtidos os extratos orgânicos (hexano, acetato de etila e metanol) e hidroalcoólico das folhas da Graviola (*Annona muricata*) e os extratos orgânicos (hexano, clorofórmio e metanol) e hidroalcoólico das cascas do Pau d'arco (*Tabebuia avellanedae*), por meio de percolação direta. O extrato bruto de acetato de etila da Graviola (*Annona muricata*), que apresentou resultados promissores em testes de atividade antioxidante, foi purificado em coluna cromatográfica, utilizando como fase móvel o sistema de solventes diclorometano/metanol 2%. Os compostos não foram isolados satisfatoriamente, e dessa forma, optou-se por repurificar as amostras coletadas. O melhor sistema encontrado foi diclorometano/metanol 0,5%. A separação por esses solventes resultou na obtenção de 4 compostos na forma de misturas. A análise por CCD dessas amostras mostrou que as manchas g1 e g2 eram os mesmos compostos, que foram unidos (G1, 0,369g) e por apresentar considerável grau de pureza, foi submetido para análise da composição química. A análise dos espectros de RMN 1H do composto G1 proveniente da Graviola, indicou a presença de prótons olefínicos (d 5,36 e d 5,22), prótons de metilas ligadas a duplas olefínicas (d 1,66, d 1,60), prótons ligados à heteroátomos (d 4,40), e sinais característicos de prótons ligados a carbonos saturados CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>. Os resultados de RMN 13C, apresentaram sinais relativos a um único composto, com deslocamento em d 52,3, referente à carbono metínico vizinho à carbonilas. Esses deslocamentos são freqüentes nas estruturas de terpenos oxigenados. Na tentativa de obter uma melhor separação dos outros componentes da Graviola realizou-se um teste com outros solventes, dos quais os melhores resultados foram obtidos com o sistema de solventes hexano/acetona 20%. Foram obtidas 3 manchas, das quais uma delas (G2 = 0,0014g), foi submetida à análise orgânica instrumental de RMN 1H e RMN 13C a fim de elucidar a estrutura química, porém como foi obtida em muito pouca quantidade, sua identificação tornou-se inviável. O extrato bruto clorofórmico (2,039g) do Pau D'arco (*Tabebuia avellanedae*) que demonstrou uma grande atividade antioxidante, foi purificado em coluna cromatográfica utilizando como fase móvel o sistema de solventes diclorometano/metanol 2%. Nessa coluna foram obtidos dois compostos parcialmente puros. A amostra P1 foi repurificada em CC, utilizando sistema de solventes diclorometano/metanol 0,5%. E foi enviado para análise de sua estrutura. O espectro de RMN 1H para o composto P1, através dos deslocamentos químicos (d), verificou-se a presença de prótons olefínicos em d 5,36 e d 5,15 e prótons ligados a heteroátomo em d 4,07, além de sinais de prótons ligados a carbonos saturados CH<sub>2</sub> e CH<sub>3</sub>. Estudos de RMN 13C apresentaram sinais relativos a um único composto, que possui deslocamentos típicos de estruturas de terpenos oxigenados.

#### 5. Considerações Finais

Foram obtidos os extratos orgânicos (hexano, acetato de etila, clorofórmio, metanol) e hidroalcoólicos das folhas da Graviola (*Annona muricata*) e das cascas do Pau D'arco (*Tabebuia avellanedae*), por meio de percolação direta. Optou-se por trabalhar com as frações acetato de etila (Graviola) e clorofórmio (Pau D'arco), pois estas frações apresentaram resultados promissores quanto à sua atividade antioxidante. Para o extrato bruto acetato de etila das folhas da Graviola foi possível o isolamento de dois produtos puros e identificação parcial de um deles (G1) quando submetidos à análise de RMN 1H e 13C. Para extrato bruto clorofórmico da casca do Pau D'arco foi possível o isolamento de um composto puro (P1) e sua parcial identificação quando submetido à análise de RMN 1H e 13C. Ambos os compostos que foram analisados revelaram possuir estruturas características de terpenos oxigenados. Estudos bidimensionais de COSY e HETCOR para os dois compostos estão sendo feitos na tentativa de elucidação total dos mesmos.

#### Referências Bibliográficas

ALALI, F.Q.; LIU, X.X.; McLAUGHLINI, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. *J. Nat. Prod.*, 62 (3):504-540, 1999.

ALMEIDA, E. R. **Plantas Medicinais Brasileiras, conhecimentos populares e científicos**. São Paulo, Brasil: Hemus Editora Ltda, 1993.

BLOCK, J. B.; SERPRICK, A.A.; WEIRNICK, P.H. Early clinical studies with lapachol. **Câncer Chemother**, Rep. 4:27-28; 1974.

CECHINEL, V. F<sup>o</sup>.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos, p. 48-75, 2001.

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 & GUTTERIDGE. **Free radicals in biology and Medicine**, NY: Oxford Unieversity, 1999

HARMAN, D. The free radical theory of aging. In: **Free Radicals in Biology**. Academic Press, vol. V, 1982. p. 255-272.

HUDSON, B. J. F. **Food antioxidants**. New York : Elsevier Science Publishers LTD,1990.

JARIWALLA, R. J. Imunidade: antioxidantes endógenos e vit. C. **Rev. de Oxidologia**, Assoc. Méd. de Oxidologia, ano IV, n<sup>o</sup> 2, mar/ abr., 1997.

KIM, G.; ZENG, L.; ALLALI, F.; ROGERS, L.; WU, R.; SASTRODIHARDJO, S.; McLAUGHLIN, J. L. Muricoreacin and murihexocin c, mono-tetrahydrofuran acetogenins from the leaves of *Annona Muricata*. **Phytochem**. 49 (2):565-571, 1998.

LINARDI, M. da C.F.; OLIVEIRA, M.M. de. A lapachol derivative active against mouse lymphocyte leukemia P-388. **J. Med. Chem**, 18(11):1159-1162, 1975.

MIRANDA, F.G.G. de; VILAR, J.C.; LAVES, I.A.N.; CAVALCANTI, S.C. de H.; ANTONIOLLI, A.R. Antinociceptive and antiedematogenic properties acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. Inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, p.1-6, sept 13. 2001.

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**. 2. ED. V.1. LISBOA: FUNDAÇÃO CALOUSTE GULBENKIAN, 1975. P. 389-400.

RAO, K. V; McBRIDE, T.J.; OLESON, J.J. Recognition and evaluation of lapachol as and antitumor agent. **Canc. Res**; 28:1952-1954, 1968.

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.