

ESTUDO FITOQUÍMICO DO EXTRATO METANÓLICO DO LÁTEX DO LEITE DE AMAPA

Autores; Paula Suellen da Paz SILVA¹, Rita Cynara de Oliveira SALLES¹, Sergio Massayoshi NUNOMURA²; Rita de Cássia Saraiva NUNOMURA³.

Identificação autores: 1 (Bolsista PIBIC/CNPq); 2 (Orientador INPA/CPCR); 3 (Co-Orientadora UFAM).

1. Introdução

A região Amazônica possui uma grande biodiversidade, de plantas medicinais utilizadas no tratamento de diversas doenças pelas populações locais. Entre as várias espécies de plantas medicinais podemos citar os amapazeiros, que são árvores que produzem o leite de Amapá, tais como a *Parahancornia amapa* (Huber) que pertence a família Apocynaceae e a *Brosimum parinarioides* (Ducke) da família Moraceae. Os látex dessas duas espécies são indicados contra a asma, bronquite, tuberculose e traumatismo, em particular no tórax. São citados também como bons cicatrizantes para golpes e feridas. (Borrás, 2003; Matta, 2003; Mors et al., 2000; Shanley et al., 2005).

Em estudos realizados com os extratos menos polares da casca e látex de *P. amapa*, foram isolados triterpenos pentacíclicos: lupeol, α -amina e β -amirina, fridelina, seus derivados acetilados, como o éster de 3-O-acil-lupeol e outros ácidos alifáticos. Além dos esteróides β -sitosterol, estigmasterol e β -sitosterona isolados das raízes de *Parahancornia Amapá*. Do extrato metanólico de *P. amapa*, identificou-se uma grande quantidade de mistura de carboidratos, como o metil-mioinositol e derivados de feniletanóides tendo como principal constituinte o cornosídeo. (Velloso, 1998; Carvalho et al., 2008). A partir de *B. parinarioides*, estudos realizados atestaram a presença de alcalóides, antraquinonas, derivados de cumarina, purinas, esteróides e triterpenóides. O extrato metanólico da casca de *B. parinarioides*, observou-se uma maior atividade antioxidante nas frações mais polares. (Yano et al., 2007; Quadros et al., 2008).

Este projeto teve como foco principal a comparação dos principais constituintes fitoquímicos presentes no extrato metanólico do látex das duas espécies assim como o isolamento desses constituintes para ser feita uma análise de forma comparativa entre essas duas espécies distintas.

2. Material e Métodos

Os extratos foram preparados suspendendo o látex em metanol, que após filtração utilizando funil de Büchner, o mesmo foi concentrado em evaporador rotatório a baixa pressão (Fisatom modelo 802), obtendo assim, o extrato metanólico. Em seguida, o resíduo obtido, foi novamente suspenso utilizando-se diclorometano, dando origem ao extrato diclorometânico. Esse procedimento foi realizado para as duas espécies. Ao final, foram obtidos os extratos metanólicos e diclorometânicos para as duas espécies.

Os extratos diclorometânicos das duas espécies foram submetidos separadamente a diversos fracionamentos por cromatografia em coluna. Para a espécie *P. amapa*, utilizando sílica gel 60 Merck 63-200 μm em Hex/AcOEt, pôde-se a partir da fração com maior massa (PAL-c), identificar 4 substâncias, sendo 3 na forma de uma mistura de triterpenos (118,2 mg), e uma outra substância isolada, identificada como o éster 3-O-acil-lupeol (315,2 mg). Já duas outras frações, PAL-e e PAL-f, foram purificadas por recristalização com leve aquecimento, resultando em outro éster de 3-O-acil-lupeol. As substâncias isoladas tiveram suas estruturas identificadas por meio de espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e de ^{13}C , obtidos junto às facilidades da Central Analítica do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA-Suframa).

Em seguida, as substâncias isoladas da espécie *P. Amapá* foram submetidas a testes de atividade larvicida com o mosquito *Aedes aegypti*, com larvas de terceiro estágio. As amostras foram solubilizadas com Tween 20 a 25% na concentração 100 µg/mL. Estes testes foram realizados em triplicata pela bolsista Dulcimar Quadros.

Para a *B. parinarioides*, após dois fracionamentos por coluna utilizando sílica gel 60 (40-63 µm) e Hex/éter etílico (96/4) como mistura de eluente, foi possível obter duas frações, que após reunidas e purificadas por recristalização em acetato de etila, resultaram na substância 6.

Com os extratos metanólicos das duas espécies, realizou-se ainda um fracionamento por partição líquido-líquido, onde as amostras foram inicialmente solubilizadas em uma mistura metanol e água na proporção (7/3). Essa solução foi transferida para um funil de separação e particionadas com diclorometano, esse processo foi repetido por três vezes. As fases extraídas com DCM foram reunidas e concentradas em rotaevaporador, sob vácuo. Logo em seguida, foi feito o mesmo procedimento com a fração hidroalcoólica remanescente, utilizando dessa vez, acetato de etila como solvente extrator (três extrações). As frações resultantes foram pesadas e suas composições analisadas por CCD, utilizando diferentes reveladores tais como, NP-PEG, DPPH, Dragendorff, β-caroteno e anisaldeído. Em seguida, foi realizado um fracionamento em fase reversa com a fração acetato de etila da espécie *P. amapa*, utilizando sílica gel derivatizada do tipo C-18, num gradiente de água e metanol.

3. Resultados e discussão

Através da análise por CCD, observou-se que foi possível isolar da fração diclorometânica de *P. amapa*, substâncias diferentes, pois os mesmos apresentaram R_f s diferentes entre si. Três dessas substâncias foram isoladas em mistura.

A substância obtida por recristalização das subfrações PAL-e e PAL-f, foi nomeada como substância 3, um produto cristalino com bom grau de pureza em cada um dos procedimentos de recristalização. Através de análise por CCD, observou-se que os cristais, apresentaram-se puros, com uma única mancha. As outras duas substâncias nomeadas como 1 e 2, isoladas por cromatografia em coluna (figura 1), também apresentaram-se puras.

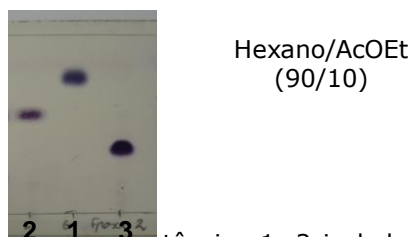


Figura 1: Placa de CCD realizada com as substâncias 1, 2 isoladas por cromatografia em coluna e 3 por recristalização utilizando anisaldeído como revelador.

As substâncias isoladas foram analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz). Os dados obtidos foram comparados com os dados da literatura (Sobrinho et al., 1991 e Velloso, 1998) e foi possível identificar as estruturas dos dois ésteres de 3-O-acil-lupeol, além de uma mistura de triterpenos acetilados (acetato de α e β -amirina e acetato de lupeol).

Os espectros de RMN ^1H para as substâncias 1 e 3 respectivamente, revelaram a presença de singletos correspondentes a sete metilas sendo uma delas com δ_{H} 1,68 para a substância 1 e δ_{H} 1,67 para a substância 3, que foi atribuída à metila ligada ao carbono sp^2 (C-30). Também foram observados sinais correspondentes a hidrogênios dos carbonos olefínicos com δ_{H} 4,68 (d, $J=2$) para o hidrogênio H-29a das substâncias 1 e 3; δ_{H} 4,56 (d, $J=2$) para substância 2 (H-29-b) e 4,56 (d, $J=1,5$) para a substância 3 (H-29-b). Os hidrogênios com δ_{H} 4,47 (dd, $J=5,5, 11$) referente ao H-3 da substância 1 e 4,53 (dd, $J=6, 10$) ao H-3 da substância 3, devem-se à presença do grupo acila ligado a esse carbono. O sinal em δ_{H} 3,97 (m), de hidrogênio do carbono carbinólico (H-3') foi identificado somente para a substância 3.

Os espectros de RMN de ^{13}C apresentaram deslocamentos químicos dos carbonos C-3 com δ_{C} 81,64 para a substância 3 e δ_{C} 80,83 para a substância 1. Os carbonos C-20 das substâncias 1 e 3 foram atribuídos ao sinal δ_{C} 151,08; enquanto os sinais em δ_{C} 109,61, foi atribuído ao

carbono metilênico (C-29) para ambas as substâncias. A carbonila C-1' para a substância 1 foi atribuída ao sinal δ_c 173,86 (C-1'), enquanto o sinal δ_c 173,04 para o carbono C-1' da substância 3. O sinal em δ_c 68,43, referente ao carbono carbinólico para a substância 3, está ausente na substância 1. A comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de C com os deslocamentos da literatura (Sobrinho *et al*, 1991) confirmaram a proposta dos ésteres de 3-O-*acil*-lupeol para as substâncias 1 e 3, diferenciando somente pela cadeia lateral (figura 2)

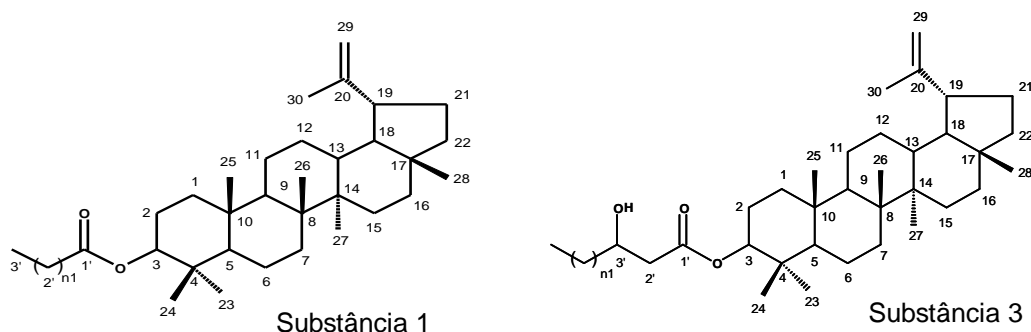


Figura 2: Estruturas das substâncias 1 e 3 isoladas do extrato diclorometânico da espécie *P. amapa*.

Embora as análises por CCD, em vários sistemas indicassem a substância 2 como uma substância pura, o espectro de RMN de ^{13}C mostrou claramente tratar-se de uma mistura de triterpenos acetilados pelos deslocamentos químicos dos carbonos sp^2 em δ_c 124,5 e δ_c 139,8 ppm (C-12 e C-13) para o acetato de α -amirina e δ_c 121,8 e δ_c 145,4 (C-12 e C-13) para o acetato de β -amirina; além de deslocamentos em δ_c 109,6 (C-29) e δ_c 151,1 (C-20) para o acetato de lupeol, e dois deslocamentos em δ_c 171,1 referentes aos carbonos carbonílicos.

A comparação dos deslocamentos químicos dos carbonos com valores descritos na literatura para o acetato de lupeol, acetato de α -amirina e acetato de β -amirina, revelou estarem de acordo com as estruturas destes triterpenos (figura 3) na mistura já isolada do látex e casca desta espécie anteriormente (Sobrinho *et al*, 1991). A análise de dados de RMN 1H também confirmou a presença dessa mistura de triterpenos acetilados.

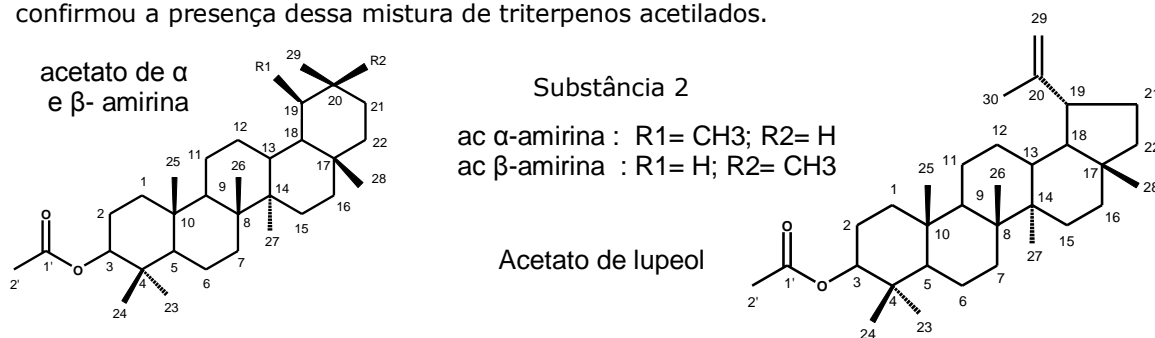


Figura 3: Estruturas da mistura de triterpenos acetilados, acetato de α -amirina, acetato de β -amirina e acetato de lupeol

A partir do extrato diclorometânico da espécie *B. parinarioides* foi possível isolar, após vários fracionamentos por recristalização com diferentes solventes (hexano, acetato de etila, etanol, iso-propanol e acetona), a substância codificada como 6, a partir da recristalização em acetato de etila com uma maior pureza a pesar do baixo rendimento e em etanol menor pureza.

Após análise por CCD, verificou-se que a recristalização em acetato, forneceu um precipitado puro, com uma única mancha, porém com pouca massa e também o mesmo R_f da substância codificada como substância 2 (mistura de triterpenos), isolada da espécie *P. amapa*. (figura 4)



Hex/ Acetona
(85/15)

- 1- Precipitado por recristalização com AcOEt
- 2- Precipitado por recristalização com AcOEt saturado com H₂O
- 3- Substância 2 (L) isolada de *P. amapa*

Figura 4: Análise em CCD dos precipitados obtidos da recristalização com acetato e acetato saturado com H₂O em comparação com substância isolada.

Devido à pequena quantidade de substância isolada, só foi possível obter os espectros de RMN de ¹H, o que mostrou grande semelhança com o espectro de RMN de ¹H da mistura de triterpenos isolada de *P.amapa*, portanto acredita-se que a mistura isolada de *P. amapa*, também esteja presente em *B.parinarioides*.

Com relação ao extrato metanólico, todas as frações obtidas da partição dos extratos metanólicos de *P. amapa* e *B. parinarioides*, foram analisadas em CCD (cromatografia em camada delgada), com a finalidade de identificar a eventual presença de substâncias e encontrar um sistema adequado para a realização de cromatografia em coluna para posterior isolamento dos constituintes químicos. As frações acetato de etila e hidroalcoólica quando aplicadas em cromatoplasas de sílica, não apresentaram uma boa separação, uma boa parte da amostra ficou retida na base da placa, mesmo na presença de eluentes com gradiente crescente de polaridade. Um dos melhores sistemas realizados em fase normal foi (n-BuOH/Ac.acético/H₂O) na proporção (40/20/20) (figura 5). Nesse sistema comparar as duas espécies, com a intenção de verificar o perfil químico e a melhor forma de separação das substâncias presentes nas frações, utilizando reveladores universais e reveladores de substâncias específicas, tais como NP-PEG para flavonóides, Dragendorff para alcalóides e DPPH e β-caroteno para substâncias antioxidantes.



n-BuOH/Ac.acético/H₂O
(40/20/20)

Figura 5: Análise em CCD das frações AcOEt e hidroalcoólica de *P. amapa* e *B. parinarioides* utilizando anisaldeído, β-caroteno e DPPH, respectivamente como revelador.

Observou-se a presença de flavonóides nos extratos metanólicos de *P. amapa* e *B. parinarioides*. Ao se analisar as frações utilizando-se como revelador β-caroteno e DPPH (figura 3) que são reveladores de substâncias antioxidantes foram observadas que as frações acetato de etila e hidroalcoólica de *P. amapa* mostraram um resultado positivo para substâncias antioxidantes com dois reveladores, diferenciando das frações de *B. parinarioides* o qual mostrou um resultado positivo apenas para a fração acetato de etila e a fração hidroalcoólica somente DPPH.

Portanto, devido à fração acetato de etila da espécie *P. amapa* ter apresentado um melhor resultado quando revelada com β-caroteno e DPPH, selecionou-se essa fração para realizar o isolamento dos constituintes.

4. Conclusão

O presente trabalho mostrou que a composição fitoquímica dos extratos diclorometânicos dos látex das espécies, conhecidas ambas como leite de amapá, apesar de bastante distinta, também apresentam triterpenóides.

5. Referências (de acordo com as normas da Acta Amazonica)

- BORRÁS, M.R.L. 2003. *Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas*. Plantas comercializadas no Mercado municipal Adolpho Lisboa. Ed. Valer/Governo do Estado do Amazonas, 737 pp.
- Carvalho, M. G.; Velloso, Carlos R.X.; Braz-Filho, R.; Costa, W.F. 2001. Acyl-lupeol Esters from *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society* 12: 556-559.
- CARVALHO, M. G.; Braz-Filho, R. 1991 Triterpenoids Isolated from *Parahancornia amapa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2: 15-20.

- CARVALHO, M. G.; Albuquerque, L. A.; Alves, c. C.F.; Cascon, V. 2008. Revista Brasileira de Farmacognosia 18 (Supl.): 667-669.
- MATTA, A. 2003. *Flora Médica Brasileira*. Editora Valer, Manaus, 3ª. Edição revista, 356 pp.
- MORS, W.B, Rizzini, C. T. e Pereira, N. A. 2000. *Medicinal Plants of Brasil*. Reference Publications, Inc, Algonac, Michigan, 27, 246 pp.
- QUADROS, D.S.; Nunomura, S.M.; Nunomura, R.C.S.; Resumos 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), Águas de Lindóia, Brasil, 2008.
- SHANLEY, P. ; MEDINA, G. ; CORDEIRO, S. 2005. *Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica*, 101 pp.
- YANO, C. Y. B.; MATTIETTO, R. A.; CORDEIRO, B. S. 2007. Caracterização Físico-Química do Latéx do amapá-doce Proveniente do Município de Moju, Pará.
- Velloso, Carlos R.X. 2001. Triterpenos Isolados de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae) e triterpenos Isolados de *Pinus caribaea* var. *bahamensis* Barr et Golf. Dissertação de Mestrado. RJ.
- YANO, C. Y. B.; Mattietto, R. A.; Cordeiro, B. S. 2007. Resumos da 59ª da SBPC, Belém, Brasil.
- SOBRINHO, D. C.; Hauptli, M. B.; Appolinário E. V.; Kollenz, C. L.M.; Carvalho, M. G.; Braz-Filho, R. Triterpenoids Isolated from *Parahancornia amapa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 2: 15-20.