

ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO METANÓLICO DO LÁTEX DO LEITE DE AMAPA

Paula Suellen da Paz SILVA¹; Sergio Massayoshi NUNOMURA²;
Rita de Cássia Saraiva NUNOMURA³.

¹Bolsista PIBIC/CNPq/ INPA; ² Orientador CPCR/ INPA; ³Co-Orientadora UFAM.

1. Introdução

Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem contribuído de forma mais ampla e significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grandes valores agregados devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (Phillipson e Anderson, 1998). As plantas medicinais há muito tempo vem sendo utilizada como principal meio terapêutico pela população amazônica. Na Amazônia, como exemplos de plantas medicinais destacam-se os amapazeiros que são produtores de látex, conhecido na região como Leite de Amapá e pertencentes a famílias botânicas distintas. Por exemplo, temos a *Parahancornia amapa* (Huber) pertencente à família Apocynaceae e o *Brosimum parinarioides* (Ducke), da família Moraceae. O látex dessas duas espécies é indicado contra asma, bronquite, tuberculose e traumatismo, em particular no tórax. São citados também como bons cicatrizantes. (Borrás, 2003; Matta, 2003; Mors et al., 2000; Shanley et al., 2005).

Em estudos anteriores envolvendo os extratos menos polares das cascas e do látex da espécie *Parahancornia amapa*, foram isolados triterpenos pentacíclicos: lupeol, α -amina e β -amirina, fridolina e seus derivados acetilados, ácidos alifáticos e o éster de 3-O-acil-lupeol. Das suas raízes foram isolados os esteróides β -sitosterol, estigmasterol, e β -sitosterona. No extrato metanólico, foi identificada uma grande quantidade de mistura de carboidratos, de metilmioinositol e derivados de feniletanóides tendo como principal constituinte o cornosídeo (Velloso, 2001; Carvalho et al., 2008). A partir de *B. parinarioides*, os estudos realizados atestaram a presença de alcalóides, antraquinonas, derivados de cumarina, purinas, esteróides e triterpenóides. No extrato metanólico das cascas de *B. parinarioides*, observou-se uma maior atividade antioxidante nas frações mais polares (Yano et al., 2007; Quadros et al., 2008).

Este trabalho teve como objetivo o trabalho fitoquímico do extrato metanólico obtido do látex do leite de Amapá das espécies, *Parahancornia amapa* e *Brosimum parinarioides* e a avaliação da atividade antioxidante desses extratos em diferentes ensaios.

2. Material e Métodos

Os extratos foram preparados inicialmente suspendendo cada amostra de látex das duas espécies em metanol que, após filtração utilizando funil de Büchner, 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.

Com cada extrato metanólico obtido das duas espécies, realizou-se um fracionamento por partição líquido-líquido, onde as amostras foram inicialmente solubilizadas em uma mistura de metanol e água na proporção (7/3). Essa solução foi transferida para um funil de separação e particionada por três vezes com diclorometano. Logo em seguida, foi feito o mesmo procedimento com a fração hidroalcoólica remanescente, utilizando dessa vez, acetato de etila como solvente extrator (três extrações). Para fins de comparação, foram feitas análises cromatográficas em CCD das frações obtidas desse fracionamento, onde as mesmas foram reveladas com diferentes reveladores químicos, tais como: anisaldeído, DPPH, NP-PEG e β -caroteno. As fases de acetato de etila das duas espécies foram submetidas separadamente a um fracionamento cromatográfico, utilizando uma coluna de permeação em gel empacotada com Sephadex LH-20 com o intuito de separar essas frações de acordo com o tamanho de seus constituintes.

Para cada extrato e frações obtidas de cada uma das duas espécies, realizou-se um ensaio de quantificação de padrão externo (fenólicos totais), onde o mesmo baseia-se na quantificação de fenólicos totais por meio de espectrometria, utilizando como reagente específico, o Folin-Ciocalteu. Para a realização da quantificação, fez necessária a realização de uma curva de calibração utilizando como padrão o ácido gálico em de diferentes concentrações. O ensaio empregado foi descrito por Velioglu em 1998 e consiste em transferir 200 μ L da solução padrão de ácido gálico, extrato ou fração para um frasco âmbar e adicionar 1,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes) e aguardar por 5 minutos, após isso adicionar mais 1,5 mL de solução de bicarbonato de sódio (6%) e aguardar por 90 minutos. Após o termino da reação, mede-se a absorbância no comprimento de onda a 725nm. O branco é obtido apenas com 3,0 mL de água mili-Q. Estas análises foram realizadas em duplicata.

3. Resultados e discussão

Todas as fases obtidas da partição dos extratos metanólicos de *P. amapa* e *B. parinarioides* foram analisadas por CCD (cromatografia em camada delgada), com a finalidade de identificar a classe de substâncias presentes e encontrar um sistema de solventes adequado para o posterior isolamento dos constituintes químicos.

O melhor sistema encontrado para a realização das análises em CCD em fase normal foi n-BuOH/Ac. acético/H₂O na proporção 40/20/20. Nesse sistema foi feita a comparação das duas espécies com a intenção de verificar o perfil químico e a melhor forma de separação das substâncias presentes nas frações. As revelações das placas foram feitas utilizando reveladores universais como anisaldeído e reveladores de substâncias específicas, tais como β -caroteno e DPPH para atividade antioxidante e NPP-PEG para flavonóides (figura 1).

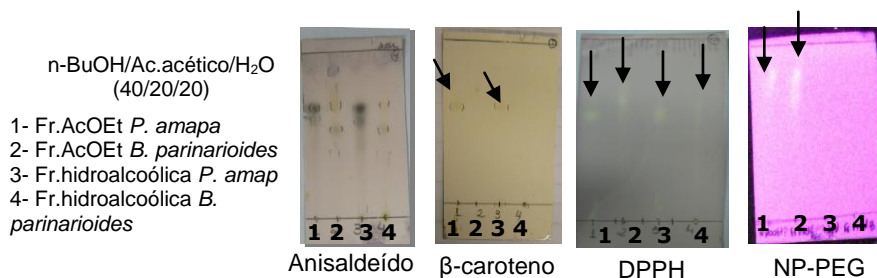


Figura1 - Análise em CCD das frações de AcOEt e hidroalcoólica de *P. amapa* e *B. parinarioides*.

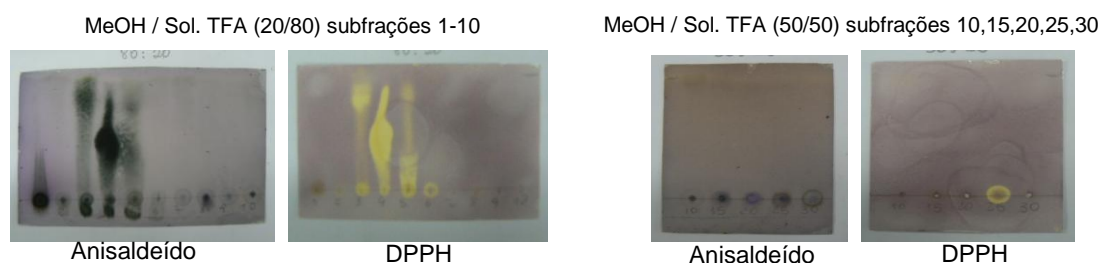
Nesta análise, foi possível verificar que as frações de acetato de etila das espécies *Parahancornia amapa* e *Brosimum parinarioides* apresentaram atividade antioxidante quando reveladas com DPPH e β -caroteno, além da presença de flavonóides quando reveladas com NP-PEG.

Devido às frações acetato de etila das espécies *P. amapa* e *B. parinarioides* terem apresentado resultado positivo para a atividade antioxidante, decidiu-se realizar, com cada fase de acetato de etila de cada espécie, um fracionamento em permeação em gel, utilizando Sephadex LH-20 que tem a capacidade de separar essas frações de acordo com o tamanho de seus constituintes. Para a identificação de macromoléculas e micromoléculas foi levada em consideração a ordem de eluição em que as frações foram obtidas, onde as primeiras frações são constituídas por substâncias de maiores pesos moleculares, e ao decorrer da eluição foram obtidas as frações contendo substâncias de menores pesos. Para o fracionamento da fase de acetato de etila da espécie *P. amapa*, utilizou-se uma coluna de Sephadex LH-20 com 626,1 mg de amostra, eluída com MeOH 100% e as amostras foram coletadas a cada 50 mL. Desse fracionamento foi possível obter 48 amostras, tendo suas massas descritas na tabela1.

Tabela 1 - Massa e rendimento das frações obtidas em Sephadex LH-20 da fase de AcOEt de *P. amapa*.

Descrição	Massa (mg)	Rendimento (%)
Fr. 1-10	597,7	95,0
Fr. 11-20	10,1	1,6
Fr. 21-30	10,7	1,7
Fr. 31-48	8,0	1,2

De acordo com as massas das frações descritas na tabela 1 e de acordo com as análises realizadas em CCD, foi possível verificar que a fração de acetato de etila é composta em maior parte por macromoléculas, provavelmente taninos. Os reveladores associados à atividade antioxidante mostraram que, na fração contendo substâncias macromoleculares, foi observada a maior parte da atividade antioxidante. Apenas uma pequena fração da atividade antioxidante foi encontrada em frações contendo substâncias micromoleculares. As análises por CCD com diferentes reveladores comprovaram esses resultados (figura 2).

**Figura 2** - Análise em CCD das frações da coluna de Sephadex LH-20 da fase AcOEt de *P. amapa*.

A fase de acetato de etila da espécie *B. parinarioides* foi submetida ao mesmo tipo de fracionamento, utilizando Sephadex LH-20 com cerca de 1,0 g de amostra. A eluição foi realizada com MeOH 100%, e a coleta das amostras foi feita a cada 50 mL. Desse fracionamento, foi possível obter 58 frações, tendo suas massas descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Massa e rendimento das frações obtidas em Sephadex LH-20 da fase de AcOEt de *B. parinarioides*.

Descrição	Massa (mg)	Rendimento (%)
Fr. 1-10	858,3	89,8
Fr. 11-30	13,9	1,4
Fr. 31-40	6,6	0,7
Fr.41-58	11,9	1,3

Deste fracionamento, foi possível verificar semelhanças com relação à outra espécie, indicando uma grande quantidade de substâncias macromoleculares na fase de Acetato de etila, e que grande parte da atividade antioxidante presente nesta fase estava contida em substâncias de maiores pesos molecular, e apenas uma pequena fração de atividade antioxidante estão contidas em amostras contendo substâncias micromoleculares, como também podemos verificar na figura 3.

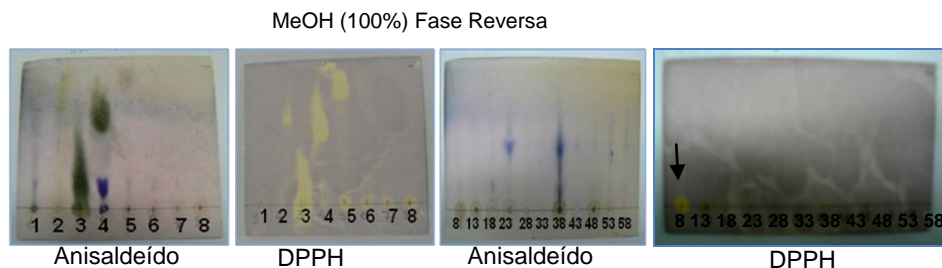


Figura 3- Análise em CCD das frações da coluna de Sephadex LH-20 da fase de AcOEt de *B.parinarioides*.

Para a realização do ensaio de quantificação de fenólicos totais, foi feita a construção de uma curva de calibração de ácido gálico em diferentes concentrações. Os resultados e as concentrações obtidas estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Resultados obtidos da curva de calibração do padrão de ácido gálico em diferentes concentrações no ensaio de fenólicos totais.

C (μM)	A1	A2	A média	Desvio Padrão	Erro relativo%
0,016	0,022	0,022	0,022	0,000	0,000
0,031	0,057	0,057	0,057	0,000	0,000
0,063	0,152	0,151	0,152	0,001	0,467
0,125	0,346	0,361	0,354	0,011	3,000

Após obtenção dos dados descritos na tabela 3, plotou-se uma curva de calibração levando em consideração as concentrações e a média das absorbâncias obtidas das mesmas. Em seguida foi feito o cálculo da regressão linear, onde foi possível obter a equação da reta e o valor de R^2 descrito no gráfico 1.

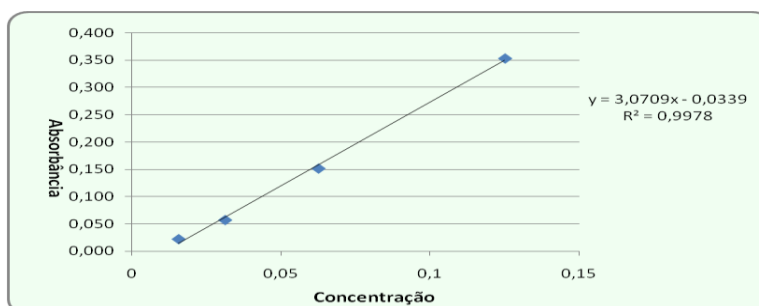


Gráfico 1 - Curva de calibração do padrão de ácido gálico.

Neste gráfico foi possível verificar uma boa linearidade dos dados obtidos na faixa de concentrações de ácido gálico analisadas, com valores de R^2 aproximados de 1,0.

Após a realização da curva de calibração de ácido gálico, foram feitas as quantificações de fenólicos totais, em cada um dos extratos e frações obtidas do látex do leite de amapa das espécies *Parahancornia amapa* e *Brosimum parinarioides*.

Tabela 4 - Resultados da quantificação de fenólicos totais em extratos e frações do látex do leite de amapa de *Parahancornia amapa*.

Amostras	Média	DP	Erro%	EAG(mg/mL)
Extrato metanólico	0,029	0,003	9,753	0,020
Extrato DCM	0,041	0,000	0,000	0,024
Fração DCM	0,034	0,000	0,000	0,022
Fração AcOEt	0,069	0,001	2,050	0,034
Fração Hidroalcoólica	0,038	0,000	0,000	0,023

Tabela 5 - Resultados da quantificação de fenólicos totais em extratos e frações do látex do leite de amapa de *Brosimum parinarioides*.

Amostras	Média	DP	Erro%	EAG(mg/mL)
Extrato metanólico	0,236	0,000	0,000	0,088
Extrato DCM	0,261	0,009	3,529	0,096
Fração DCM	0,117	0,008	6,677	0,049
Fração AcOEt	0,145	0,001	0,975	0,058
Fração Hidroalcoólica	0,094	0,005	5,294	0,041

Como podemos verificar nos dados descritos na tabela 9 e 10, a espécie *B.parinarioides* apresenta uma maior concentração de fenólicos totais, principalmente no extrato MeOH, DCM e na fração AcOEt. A outra espécie apresenta uma significativa concentração apenas na fração AcOEt.

4. Conclusão

Os resultados obtidos neste trabalho, demonstram uma grande quantidade de substâncias macromoleculares com atividade antioxidante, provavelmente composta de taninos, nas frações acetato de etila do extrato metanólico do látex do leite de amapa das duas espécies. De acordo a quantificação de fenólicos totais, a espécie *B. parinarioides* apresentou uma maior concentração de fenólicos totais, tanto no extrato metanólico como na fração acetato de etila, quando comparado a outra espécie. Isso indica que as frações polares de *B. parinarioides* possuem provavelmente maior atividade antioxidante, se comparados aos de *P. amapa*.

5. Referências

- Borrás, M.R.L. 2003. *Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – Plantas comercializadas no Mercado municipal Adolpho Lisboa*. Ed. Valer, Manaus, Amazonas. 737pp.
- Carvalho, M. G.; Velloso, C.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.
- Phillipson, G. W.; Anderson, A. C. 1998; *Journal of Ethnopharmacology* 25: 61.
- 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.
- Velloso, C. 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. Caracterização Físico-Química do Latéx do amapá-doce Proveniente do Município de Moju, Pará.