

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

UTILIZAÇÃO DA ENERGIA DE MICROONDAS FOCALIZADA NA EXTRAÇÃO DO ÁCIDO BETULÍNICO A PARTIR DO *Zizyphus joazeiro* Mart

Fernanda Carolina Sousa Fonseca¹; Alexsandro Branco² e Carla Rodrigues Cardoso³

1. Bolsista PROBIC, Graduanda em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: nanda.fonseca05@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: branco@uefs.br

3. Participante do projeto, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: carlacardoso@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: microondas, ácido betulínico, *Zizyphus joazeiro*.

INTRODUÇÃO

Diversos gêneros da família Rhamnaceae destacam-se pela presença de triterpenóides, alcalóides e saponinas. No Brasil ocorrem 9 gêneros pertencentes a esta família, dentre eles o *Zizyphus*. Dentre as espécies deste gênero, a *Zizyphus joazeiro* é típica da região nordeste do Brasil, tendo ampla distribuição nesta localidade (SCHUHLY et al. 1999).

Sabe-se que os vegetais através do seu metabolismo secundário sintetizam muitos compostos químicos que desempenham diversas funções, como por exemplo, proteção contra agentes externos. Desta forma, o estudo fitoquímico apresenta-se como ferramenta para conhecimento do perfil químico das plantas. O *Zizyphus joazeiro*, como preconiza a família a que pertence, caracteriza-se também pela presença principalmente de triterpenóides, alcalóides e saponinas (HIGUCHI et al, 1984; BARBOSA FILHO et al, 1985; SCHUHLY et al. 1999; SCHUHLY et al, 2000). Dentre os triterpenóides investigados, o ácido betulínico destaca-se pelas suas importantes propriedades farmacológicas. Devido à importância e a potencialidade química do ácido betulínico, diversos ensaios biológicos estão sendo desenvolvidos no intuito de testar sua bioatividade. A literatura preconiza o ácido betulínico como tendo uma atividade antibactericida, antifúngica, anti-leucêmica, anti-inflamatória, anti-HIV, dentre outras (HUANG et al, 2006; QIAN et al, 2007; GANSER-PORNILLOS et al, 2008; DAFONSECA et al, 2008; FULDA, 2008; CHOI et al. 2009).

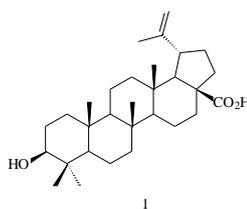


Figura 1: Estrutura química do ácido betulínico

Diante desse contexto, buscam-se novas técnicas de extração que se mostrem eficientes e de baixo custo, a fim de otimizar a obtenção não só do ácido betulínico, mas de qualquer composto bioativo. Nos últimos anos, com o desenvolvimento da técnica de extração utilizando energia de microondas focalizada (FMAE), foi possível registrar diversos parâmetros no procedimento de extração, principalmente temperatura e pressão. FMAE oferece um aumento significativo na qualidade das informações do sistema reacional através de um monitoramento contínuo do tempo de análise e da temperatura do solvente em meio de microondas, além de exigir um volume menor de solvente e analito no processo. (BIERI et al, 2006; NAZARI et al, 2007).

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

Sendo assim, o presente trabalho visa otimizar a obtenção do ácido betulínico a partir do *Zizyphus joazeiro* através da utilização da energia de microondas focalizada, fazendo um análise comparativa entre diferentes técnicas de extração (maceração e refluxo), através de análises qualitativas e quantitativas, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

METODOLOGIA

O material pulverizado obtido a partir das cascas do *Zizyphus joazeiro* foram pesadas (um grama) e submetidas à extração com solvente acetato de etila (30ml), utilizando os métodos convencionais (maceração 24h, 48h e 72h; refluxo 2h, 5h e 8h) e a energia de microondas focalizada (temperatura 65°C, 70°C e 75 °C e tempo de extração 10min, 15 min, e 20 min). Após término dos experimentos, os extratos foram filtrados e concentrados. Todas as extrações foram realizadas em triplicata. O monitoramento das reações foi realizado utilizando cromatografia em camada delgada utilizando como solução eluente acetato de etila: hexano, em igual proporção, e como solução reveladora, solução de ácido sulfúrico a 20%. Realizou-se posteriormente a quantificação do ácido betulínico presente nos extratos obtidos a partir de FMAE e de um extrato de cada método convencional para comparação. Nesta etapa utilizou-se o equipamento *HPLC EZCHROM ELITE*, coluna *Purospher Star*® RP8e (250mm X 4,6mm i.d.) (5µm) Merck, fase móvel isocrática acetonitrila e solução aquosa de ácido fosfórico (0,05%) (80:20), fluxo 1,0 ml/min, volume de injeção 20µl, temperatura do forno 35°C e tempo de análise de 30min.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente obteve-se o rendimento qualitativo das extrações, representado pela relação massa/massa entre o material vegetal de partida e o extrato concentrado. Através do monitoramento utilizando Cromatografia em Camada Delgada, observou-se a presença do ácido betulínico em todas as amostras, sendo utilizado um padrão para comparação. A partir de então se justificou o prosseguimento dos experimentos, já que os resultados preliminares corroboraram com plano de trabalho. O rendimento dos extratos foi calculado a partir da fórmula abaixo e se encontram descritos na tabela 1.

$$\text{Porcentagem da extração (m/m)} = \frac{\text{Massa do extrato}}{\text{Massa do material seco (casca)}} \times 100$$

A análise por CLAE-DAD, por sua vez, permitiu quantificar o ácido betulínico presente nestes extratos utilizando uma curva de calibração (Figura 2). A construção da curva foi realizada utilizando ácido betulínico padrão em um intervalo de 0,01-0,1 mg/ml (n=10), através de uma solução estoque (0,1 mg/ml), injetada em volumes diferentes. A curva foi validada utilizando três soluções preparadas em concentrações diferentes (0,05 mg/ml e 0,1mg/ml). A curva de calibração apresentou-se linear ($r^2=0,9979$) nas concentrações utilizadas, e o método analítico foi validado de acordo com os parâmetros: especificidade, linearidade, limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), demonstrando que o método consegue separar especificamente a substância de interesse dos demais interferentes. Nesta etapa o procedimento também foi realizado em triplicata. A construção da curva foi realizada utilizando Microsoft Office Excel 2007 através das áreas encontradas nos cromatogramas. Comparando as análises de CLAE-DAD do ácido betulínico padrão com os extratos obtidos a partir de diferentes métodos de extração foi possível observar o mesmo tempo de retenção (18,9 minutos), o que corrobora para a demonstração da especificidade do

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

método. Os espectros de ultravioleta (absorção em 205nm) obtidos para o padrão e para as amostras, apresentaram o mesmo perfil, e indicaram um valor de similaridade maior que 0,99, o que corrobora para a pureza do pico. Os cromatogramas obtidos por maceração, refluxo e FMAE, mostraram um pico característico para o ácido betulínico (Figura 3).

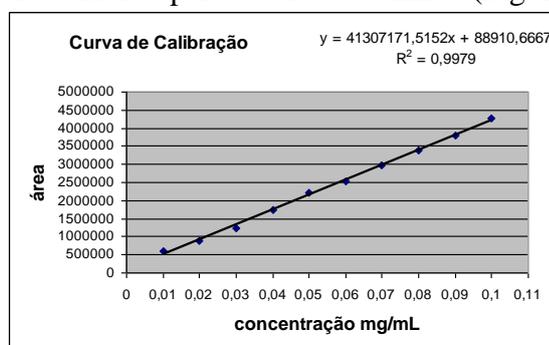


Figura 2: Curva de Calibração

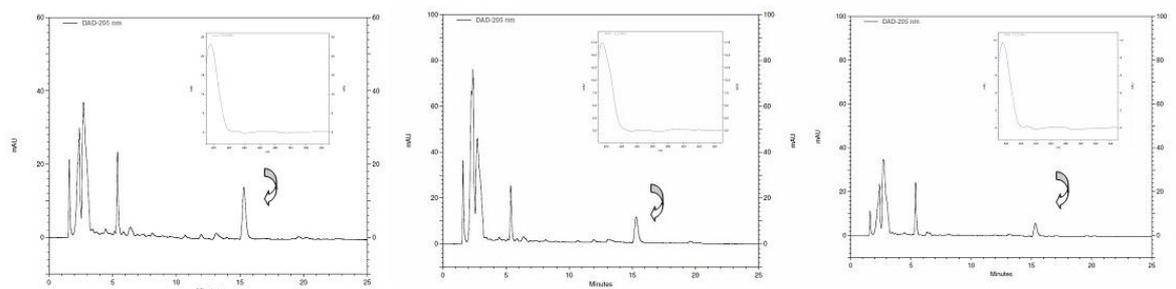


Figura 3: Cromatogramas CLAE-DAD para ácido betulínico extraído por maceração, refluxo, e microondas, respectivamente.

Tabela 1: Condições e rendimentos obtidos nos experimentos

Experimentos	Tempo	Temperatura °C	Rendimento extratos (%)	Rendimento Ácido Betulínico (%)
FMAE 1	20 min	75	2,60	0,33
FMAE 2	20 min	65	2,29	0,23
FMAE 3	10 min	75	2,47	0,31
FMAE 4	10 min	65	1,06	0,13
FMAE 5	15 min	70	2,65	0,33
Maceração	72h	30 (temp. ambiente)	0,60	0,14
Refluxo	8h	70	1,10	0,25

Através da análise dos resultados obtidos pode-se inferir que a temperatura e o tempo utilizados para realizar os experimentos de extração são fatores determinantes para o rendimento final. Observando os dados descritos na tabela 1, observa-se que o aumento da temperatura quando associado a um aumento do tempo, conduzem a um melhor resultado referente à extração do composto de interesse. Esta discussão é ratificada quando analisa-se as menores concentrações de ácido betulínico encontradas, nestes casos empregou-se temperaturas abaixo de 70°C.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho mostrou que a utilização da energia de microondas focalizada pode ser utilizada como uma ferramenta alternativa aos métodos convencionais de extração, apresentando um rendimento satisfatório com ganho de tempo e economia de solventes orgânicos. Os experimentos realizados permitem concluir que uma das melhores condições de

Anais do XIV Seminário de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana, 18 a 22 de outubro de 2010

extração do ácido betulínico a partir do *Zizyphus joazeiro* pode ser obtida em meio de microondas associando um tempo reacional de 15 minutos a uma temperatura de 70°C.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA FILHO, J. M.; TRIGUEIRO, J. A.; CHERIYAN, U. O.; BHATTACHARYYA, J. Constituents of the stem-bark of *Zizyphus joazeiro*. Journal of Natural Products. Vol.48. n.1. jan-feb, 1985.
- BIERI, S.; ILIAS, Y.; BICCHI, C.; VEUTHEY, J.; CHRISTEN, P. Focused microwave-assisted extraction combined with solid-phase microextraction and gas-chromatography-mass spectrometry for the selective analysis of cocaine from coca leaves. Journal of Chromatography A. vol.1112, 2006.
- CHOI, J. Y.; NA, M.; HWANG, I. H.; LEE, S. H.; BAE, E. Y.; KIM, B. Y.; AHN, J. S. Isolation of betulinic acid, its methyl ester and guaiane sesquiterpenoids with protein tyrosine phosphatase 1b inhibitory activity from the roots of saussurea lappa C.B. Clarke. Molecules. Vol.14, 2009.
- DAFONSECA, S.; CORIC, P.; GAY, B.; HONG, S.; BOUAZIZ, S.; BOULANGER, P. The inhibition of assembly of HIV-1 virus-like particles by 3-O-(3',3'-dimethylsuccinyl) betulinic acid (DSB) is counteracted by Vif and requires its Zinc-binding domain. Virology Journal. Vol. 5:162, 2008.
- FULDA, S. Betulinic acid for cancer treatment and prevention. Internal Journal of Molecular Sciences. Vol.9, 2008.
- GANSER-PORNILLOS, B. K.; YEAGER, M.; SUNDQUIST, W. The structural biology of HIV assembly. Current Opinion in Structural Biology. Vol.18, 2008.
- HIGUCHI, R.; KUBOTA, S.; KOMORI, T.; KAWASAKI, T.; PANDEY, V. B.; SINGH, J. P.; SHAH, A. H. Triterpenoid saponins from the bark of *Zizyphus joazeiro*. Phytochemistry. Vol.23. n.11, 1984.
- HUANG, L.; HO, P.; LEE, K.; CHEN, C. Synthesis and anti-HIV activity of bi-functional betulinic acid derivatives. Bioorganic and Medicinal Chemistry. Vol.14, 2006.
- NAZARI, F.; EBRAHIMI, S. N.; TALEBI, M.; RASSOULI, A.; BIJANZADEH, H. R. Multivariate Optimisation of Microwave-assisted Extraction of Capsaicin from *Capsicum frutescens* L. and Quantitative Analysis by ¹H-NMR. Phytochem. Anal. Vol.18, 2007.
- QIAN, K.; NAKAGAWA-GOTO, K.; YU, D.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; NITZ, T. J.; KILGORE, N.; ALLAWAY, G. P.; LEE, K. Anti-AIDS agents 73: Structure-activity relationship study and asymmetric synthesis of 3-O-monomethylsuccinyl-betulinic acid derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. Vol. 17, 2007.
- SCHUHLY, W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O. New Triterpenoids with Antibacterial Activity from *Zizyphus joazeiro*. Planta Medica. Vol. 65, 1999.
- SCHUHLY, W.; HEILMANN, J.; ÇALIS, I.; STICHER, O. Novel triterpene saponins from *Zizyphus joazeiro*. Helvetica Chimica Acta. Vol.83, 2000.