

Obtenção de triterpenos pentacíclicos a partir do extrato aquoso de *Zizyphus joazeiro* Mart (Rhamnaceae)

Fernanda Carolina Sousa Fonseca¹; Alexsandro Branco²

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

PALAVRAS-CHAVE: triterpenos, extrato aquoso, *Zizyphus joazeiro*

1. INTRODUÇÃO

Os triterpenos ocorrem significativamente no reino vegetal. Apresentam uma grande diversidade quanto ao esqueleto e funcionalização que é predominantemente oxigenada (Simões *et al*, 2007). Consistem grandemente de compostos cuja estrutura é policíclica podendo ser tetracíclicos ou pentacíclicos que contém no máximo um ou duas ligações duplas respectivamente (OLEA; ROQUE, 1990).

O ácido betulínico (ácido 3 β -hidroxi-lup-20(29)-en-28-óico) é um derivado do triterpeno betulina com um grupamento ácido carboxílico na posição C-28, sendo um membro da classe dos lupanos. Os resultados dos estudos referentes à investigação química e às propriedades farmacológicas do ácido betulínico e de seus análogos apresentam uma gama de atividades biológicas, como, por exemplo, anti-retroviral (Qian *et al*, 2007; Dafonseca *et al*, 2008), antineoplásica (Fulda, 2008), propriedade anti-inflamatória (Recio *et al*, 1995), e tratamento de diabetes tipo II e obesidade (Choi *et al*, 2009).

Dentre as espécies vegetais cujo estudo fitoquímico apontou a presença do ácido betulínico, pode-se destacar o *Zizyphus joazeiro* Mart. Esta árvore é nativa da região Nordeste do Brasil, e pertence à família Rhamnaceae. Distribui-se desde as zonas secas do Piauí até Minas Gerais, onde é utilizada pela população no tratamento de febre, bronquite, úlceras gástricas, doenças do sangue e dores de cabeça, sendo conhecida popularmente pelos nomes de joazeiro, juazeiro, joá, juá, juá-espinho, juá-mirim, laranjeira-de-vaqueiro, juá-de-boi, juá-bravo (Schuhly *et al*. 1999; Maracajá *et al*, 2008). O estudo fitoquímico desta espécie foi caracterizado principalmente pela presença de terpenóides, saponinas e alcalóides (Higuchi *et al*, 1984; Barbosa Filho *et al*, 1985; Schuhly *et al*, 1999; 2000). A presença de saponinas justifica a utilização desta planta também como ferramenta na higiene pessoal devido às suas propriedades detergentes.

Em geral, as saponinas ocorrem na forma de misturas complexas, com variações quanto ao número de açúcares presente para uma aglicona específica e/ou abrangendo variações quanto às agliconas e aos açúcares presentes, o que torna seu isolamento um processo bastante trabalhoso. As saponinas mais frequentemente encontradas na natureza possuem 30 átomos de carbono e núcleo triterpênico (Simões *et al*, 2007). A obtenção destas agliconas pode ser realizada através da reação de hidrólise, que pode ser enzimática, em meio ácido, em meio básico ou por hidrotermólise. A hidrólise química pode ser principalmente ácida ou básica, onde há a adição do álcali ou ácido mineral diluído ou concentrado.

O presente trabalho visa investigar o produto de hidrólise do extrato aquoso de *Zizyphus joazeiro* visando obter triterpeno(s) através de hidrólise ácida das saponinas.

2. METODOLOGIA

2.1 Obtenção das cascas de *Z. joazeiro*

Cascas de *Zizyphus joazeiro* Mart. foram adquiridas comercialmente através da *Quimer Ervas e Especiarias* (São Paulo, SP, Brasil) em 10 de janeiro de 2008.

2.2 Obtenção do extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado utilizando cascas secas e pulverizadas de *Z. joazeiro* após maceração por 7 dias com 3 litros de solução hidro-alcoólica, o extrato foi filtrado por um sistema de filtração a vácuo, utilizando filtro de papel, e parcialmente concentrado.

2.3 Identificação das Saponinas

O extrato aquoso foi analisado através de técnicas qualitativas e quantitativas acerca da presença de saponinas. Para tal, selecionou-se o teste de espuma (Farmacopéia Brasileira, 2000) e o teste de teor de saponinas totais, através de modificações na metodologia de Chen, Xie e Gong (2007).

2.4 Hidrólise ácida

A reação de hidrólise utilizando um ácido mineral (H_2SO_4) se procedeu sob refluxo a uma temperatura de aproximadamente $100^\circ C$ por um período de 4h. A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada. Realizou-se a extração da fase orgânica com acetato de etila por três vezes.

2.5 Análise por Cromatografia Gasosa

As fases orgânicas obtidas a partir da hidrólise ácida foram submetidas à análise por Cromatografia Gasosa. Para esta análise o volume de injeção foi de $1\mu L$, método split, a coluna utilizada foi a RTX-1, 30 metros de comprimento, diâmetro de $0,25mmID$, e utilizando os gases hélio, nitrogênio e ar. A temperatura do injetor foi de $290^\circ C$ e a coluna permaneceu a $180^\circ C$ por 5 minutos, passando a $6^\circ C$ por minuto até atingir a temperatura de $290^\circ C$, permanecendo neste patamar por 10 minutos. A duração total da corrida foi de 33 minutos para cada análise

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Teste de Espuma

O teste de espuma foi realizado com o extrato aquoso obtido a partir da maceração do vegetal em solvente hidro-etanólico. Foram transferidos aproximadamente 1g do extrato aquoso para um tubo de ensaio, completando-se com água destilada, com posterior agitação por 15 segundos. Foi registrada imagem dos dois tubos, o controle e o submetido ao teste antes e depois da agitação. O tubo permaneceu em repouso por 15 minutos, observando-se a manutenção de uma espuma persistente com mais de 1 cm de espessura. A formação de espuma persistente é indicativa da presença de saponinas no extrato aquoso de *Z. joazeiro*

3.2 Teor de Saponinas Totais

Para análise do teor de saponinas totais utilizou-se de um método espectrofotométrico para quantificação das análises. A curva de calibração foi construída utilizando aescina como substância padrão, apresentando-se linear ($R^2=0,9906$) nas concentrações utilizadas (figura 2). Entretanto sabe-se que por se tratar da análise de um extrato bruto, o extrato aquoso de *Zizyphus joazeiro* deve possuir uma mistura de saponinas de estruturas que podem ser, ou não, diferentes entre si. Desta forma, este teste quantitativo pode produzir um falso negativo. A curva de calibração plotada na figura 1, foi validada utilizando três soluções preparadas em concentrações diferentes. Observou-se que o teor de saponinas totais variou entre 43,9% e 46,5%, equivalendo a um valor médio de 45,2%.

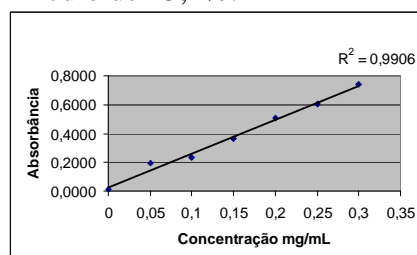


Figura 1: Curva de calibração

3.3 Hidrólise Ácida

Com os valores obtidos referentes ao teor de saponinas totais, buscou-se analisar as características da agliconas dessas saponinas através da realização de uma hidrólise ácida. Neste momento, o objetivo principal foi buscar o triterpeno ácido betulínico após a realização desta metodologia de hidrólise através de um monitoramento das reações através de Cromatografia em Camada Delgada, comparando com o padrão desta substância. Através da análise obtidas a partir das reações de hidrólise, observou-se mudança de Rf em relação ao material de partida, porém não foi encontrado a presença do triterpeno ácido betulínico. Desta forma, as amostras referentes ao extrato orgânico produzidas na hidrólise ácida foram analisadas qualitativamente por Cromatografia Gasosa.

3.4 Análises Cromatografia Gasosa

O resultado da análise qualitativa da fase orgânica através da Cromatografia Gasosa permitiu identificar um pico majoritário em um tempo de retenção (TR) de aproximadamente 25 minutos, região onde se observa predominância de estruturas triterpênicas. O sinal referente ao TR=25,5 minutos não foi caracterizado como ácido betulínico uma vez que a cromatografia em camada delgada não apontou a presença deste triterpeno. Analisando outros trabalhos que investigam as saponinas a partir de cascas de *Z. joazeiro*, pôde-se observar o isolamento de moléculas que continham uma aglicona denominada jujubogenina (derivada de um núcleo damarano) (Figura 3) (Higuchi *et al*, 1984; Schuly *et al*, 2000). A elucidação estrutural do composto majoritário presente na fase orgânica ainda não foi concluída, mas espera-se que possua o mesmo perfil encontrado pelos autores citados anteriormente.

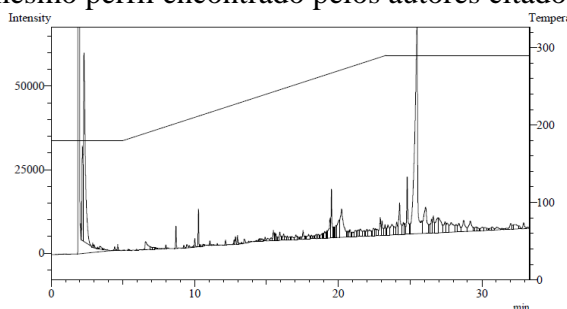


Figura 2: Cromatograma da fase orgânica após reação de hidrólise em meio ácido

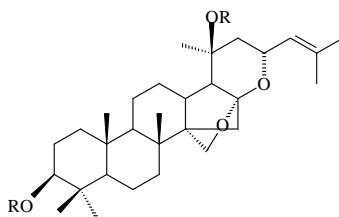


Figura 3: Estrutura Cromatograma da fase orgânica após reação de hidrólise em meio ácido

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A extração das cascas de *Z. joazeiro* em meio hidro-alcóolico levou à obtenção de um extrato rico em saponinas, que foram hidrolizadas em meio ácido. A análise por cromatografia em camada delgada das agliconas resultantes da hidrólise constatou a presença de um constituinte majoritário que não foi caracterizado como ácido betulínico, como esperado inicialmente. Entretanto a presença de um núcleo majoritário, que está em fase de elucidação estrutural, pode vir a representar uma substância com potencial atividade biológica. Sugere-se em trabalhos futuros a continuação desta investigação através de técnicas específicas para isolamento e identificação das agliconas e de suas porções glicosídicas.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA FILHO, J.M.; J.A TRIGUEIRO; U.O. CHERIYAN; J. BHATTACHARYYA. (1985). Constituents of the stem-bark of *Zizyphus joazeiro*. J. Nat. Prod. 48 (1): 152-153.
- CHEN, Y.; M. XIE; X. GONG. (2007). Microwave-assisted extraction used for isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. J. Food Eng. 81: 162-170.
- CHOI, J. Y.; M. NA; I.H. HWANG; S.H. LEE; E.Y. BAE; B.Y. KIM; J.S. AHN. (2009). 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. 14: 266-272.
- DAFONSECA, S.; P. CORIC; B. GAY; S. HONG; S. BOUAZIZ; P. BOULANGER. (2008). 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. Virol. J. 5:162.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. (2000). 4.ed. Parte II/2. fascículo. SãoPaulo: Atheneu.
- FULDA, S. (2008). Betulinic acid for cancer treatment and prevention. Int. J. Mol. Sci. 9: 1096-1107.
- HIGUCHI, R.; S. KUBOTA; T. KOMORI; T. KAWASAKI; V.B. PANDEY; J.P. SINGH; A.H. SHAH. (1984). Triterpenoid saponins from the bark of *Zizyphus joazeiro*. Phytochemistry 23 (11): 2597-2600.
- MARACAJA, P.B.; J.A.S. MADALENA; E. ARAUJO; B.G. LIM; P.C.F. LINHARES. (2008). Estimativa da área foliar de juazeiro por dimensões lineares do limbo foliar. Rev. Verde 3 (4).
- OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. (1990). Análise de misturas de triterpenos por RMN de ¹³C. Química Nova. 13: 278-281.
- QIAN, K.; K. NAKAGAWA-GOTO; D. YU; S.L. MORRIS-NATSCHKE; T.J. NITZ; N. KILGORE; G.P. ALLAWAY; K. LEE. (2007). Anti-AIDS agents 73: Structure-activity relationship study and asymmetric synthesis of 3-O-monomethylsuccinyl-betulinic acid derivatives. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17: 6553-6557.
- RECIO, M.C., R.M. GINER; S. MANEZ; J. GUEHO; H.R. JULIEN; K. HOSTETTMANN; J.L. RIOS. (1995). Investigations on the steroidal anti-inflammatory activity of triterpenoids from *Diospyros leucomelas*. Planta Med. 61:9-12.
- SCHUHLY, W.; J. HEILMANN; I. ÇALIS; O. STICHER. (1999). New Triterpenoids with Antibacterial Activity from *Zizyphus joazeiro*. Planta Med. 65: 740-743.
- SCHUHLY, W.; J. HEILMANN; I. ÇALIS; O. STICHER (2000). Novel triterpene saponins from *Zizyphus joazeiro*. Helv. Chim. Acta. 83:1509-1515.
- SIMÕES, C.M.O. (Ed). 2007. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC.
- TREASE, G.E.; W.C EVANS. (1989) Pharmacognosy. 13 ed. London; Philadelphia: Bailliere Tindall.