

QUANTIFICAÇÃO POR CLAE DE NAFTOQUINONAS DO EXTRATO DAS RAÍZES DE *Cordia leucocephala* Moric.

Fernanda Maria de Oliveira¹; Hélio Moreira da Silva Junior¹; Francisco Arnaldo Viana¹; Jaécio Carlos Diniz¹; Simone Alves Serafim Rocha¹

¹ Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Departamento de Química, Mossoró - RN.

*fernandamary_cdi@hotmail.com

Resumo

Três naftoquinona, (11S,13S, 16R) - cordiaquinona J ((+)-cordiaquinona J), 6-[10-(12,12-dimetil-13 α -hidroxi-16-metil-ciclohexil)-1,4-naftalenodiona (cordiaquinona L) e 5-metil-6-[10-(12,12-dimetil-13 β -hidroxi-16ciclohexil)metil-1,4-naftalenodiona (cordiaquinona M) foram isoladas do extrato etanólico das raízes da *Cordia leucocephala*. Estas naftoquinonas, exceto a cordiaquinona M foram quantificadas por CLAE no extrato bruto das raízes de *C. leucocephala*. Os padrões da (+)-cordiaquinona J e cordiaquinona M foram identificados no cromatograma pelos respectivos tempo de retenção e espectro-UV. A quantificação das duas naftoquinonas apresentou teores de 310 μ g de (+)-cordiaquinona J e 180 μ g de cordiaquinona M, em 100 mg de raízes.

Abstract

Three naphthoquinone, (11S,13S, 16R)-cordiaquinone J ((+)-cordiaquinone J), 6-[10-(12,12-dimethyl-13 α -hydroxy-16-methenyl-cyclohexyl)ethyl]-1,4-naphthalenedione (cordiaquinone L) and 5-methyl-6-[10-(12,12-dimethyl-13 β -hydroxy-16ciclohexil) methyl-1,4-naphthalenedione (cordiaquinone M) were isolated from the ethanol extract of the roots of *Cordia leucocephala*. These naphthoquinones, except cordiaquinone M were quantified by HPLC in crude extract of the roots of *C. leucocephala*. The standards of (+)-cordiaquinone J and cordiaquinone M in the chromatogram were identified by their retention time and its UV spectrum. the quantification of two naphthoquinones, had average contents of 310 μ g of (+) J-cordiaquinone and 180 μ g of cordiaquinone M in 100 mg of roots.

Palavras-chave: *Cordia leucocephala*; Naftoquinonas; CLAE.

Introdução

A família Boraginaceae possui cerca de 130 gêneros e 2300 espécies, com ampla distribuição nas regiões temperadas, subtropical e tropicais do mundo, destacando-se o gênero *Cordia L.* com aproximadamente 300 espécies (Abrantes e Agra 2004). Quimicamente, esse gênero, tem apresentado uma ampla diversidade de estruturas de metabólitos secundários,

destacando-se as quinonas, triterpenos, compostos fenólicos, flavonoides, saponinas, taninos, compostos cianogênicos, mucilagens, esteroides, compostos nitrogenados e ácidos graxos (Barroso et al. 2002).

Inúmeras espécies do gênero *Cordia* tem apresentado estudos com destacada atividade biológica, com ação anti-inflamatória (Al-Awadi et al. 2001), antimicrobiana, antioxidante (Okusa et al. 2007), antitumoral (Parisotto et al. 2011) analgésica, anti-ulcerogênica (Roldão et al. 2008) entre outras. Dentre as variedades de plantas com potencial bioativo destaca-se a espécie *Cordia leucocephala* Moric., popularmente conhecida como moleque-duro; endêmica da região Nordeste brasileira. Suas folhas e raízes têm sido usadas na medicina popular contra reumatismos, indigestões e tônico geral. O xarope das flores é indicado contra raquitismo e artrismo (Agra, 1996), e é amplamente cultivada para fins ornamentais (Barroso et al., 2002).

Estudo das raízes e folhas da *C. leucocephala* propiciou o isolamento de novos metabólitos secundários; dentre estes as naftoquinonas denominadas cordiaquinona L e cordiaquinona M (Diniz et al. 2009), além do re-isolamento da (+)-cordiaquinona J que apresentou uma destacada atividade citotóxica em linhagens de células tumorais (Marinho et al. 2010); as estruturas desses metabólitos, encontram-se representadas respectivamente na Figura 1.

A padronização química de plantas medicinais envolve técnicas cromatográficas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que permite análises qualitativa e quantitativas de misturas complexas com resolução e sensibilidade significativa. Quando a CLAE é acoplada a técnica de detecção por varredura no espectro do ultravioleta, torna-se uma ferramenta muito útil na caracterização do perfil químico de plantas, permitindo simultaneamente quantificar os constituintes e identificar os principais grupos funcionais (Paiva et al. 2002).

O objetivo principal desse trabalho foi o desenvolvimento de um método utilizando CLAE, em fase normal, para a separação e quantificação das naftoquinonas presentes no extrato etanólico das raízes da *Cordia leucocephala*.

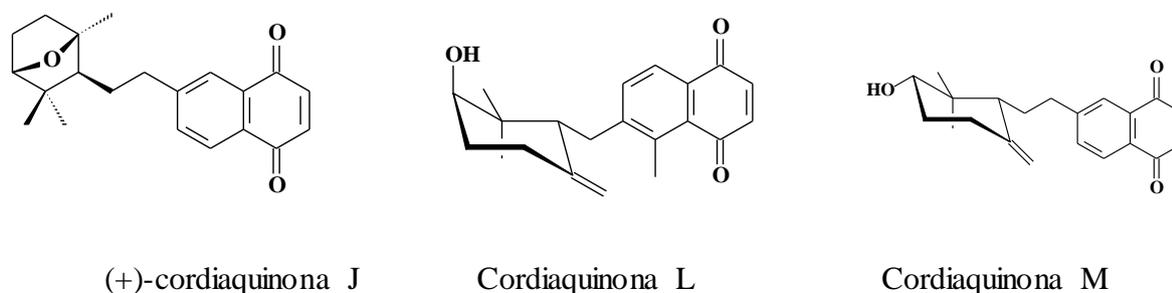


Figura 1- Estruturas químicas das naftoquinonas isolada das raízes de *C. leucocephala*.

Metodologia

Material Botânico

O material vegetal em estudo foi coletado as margens da estrada vicinal Mossoró-Barrinha no município de Mossoró-RN. Sua exsicata encontra-se depositadas no Herbário Dárdano de Andrade Lima, da Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA, sob o registro de número MOSS 8827.

Instrumentação e parâmetros de separação da CLAE

Para as análises cromatográficas foi utilizado cromatógrafo líquido Shimatzu Class-VP, constituído de três bombas LC-10ATvp, detector por varredura de espectro ultravioleta por arranjo de fotodiodo SPD-M10Avp, forno CTO-10ASvp, injetor automático SIL10AF, coletor automático FRC10A e degaseificador em linha CTO10AS. Para separação dos compostos utilizou-se uma coluna analítica *Shim-pack CLC-SIL* (M), tamanho de 4,6 x 150 mm em fase normal, sistema isocrático hexano/acetato de etila 88:12, fluxo de 0,9 mL/min, e detecção em comprimento de onda 250 nm, pressão 407 psi. Os solventes utilizados na extração foram de grau P.A. da Merck e para as análises cromatográficas foram de grau HPLC.

Após o ajuste do método cromatográfico nas condições ideais, a solução da fração acetato e dos padrões foi injetada em quadruplicata para verificar a reprodutibilidade dos parâmetros cromatográficos.

Obtenção dos compostos de referência

As raízes de *C. leucocephala* (213,16 g) foram seco, moído e submetido à extração exaustiva em etanol 95% (5 x 700 mL). O solvente foi removido em evaporador rotatório Fisaton 802 equipado com controlador de vácuo e banho refrigerante, posteriormente levado ao banho-maria a uma temperatura de 50°C para completa secagem (19,45 g). Uma alíquota do extrato etanólico (11,541 g) foi dissolvido em etanol/água (3:7) e extraída com hexano. O extrato hexânico (5,09 g), depois de concentrado a vácuo, foi cromatografado em coluna filtrante de sílica gel 60 com eluentes de polaridade crescente (hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol). Isolaram-se a (+) cordiaquinona J (120mg), cordiaquinona L (30,5mg) e cordiaquinona M (30,0mg). As estruturas das substâncias foram confirmadas através da comparação dos dados espectroscópicos de RMN¹H, RMN¹³C, espectrometria de massas com os dados reportados por Diniz (2009) e Marinho (2010).

Preparação das substâncias de referências

Pesou-se 100,6 mg de (+)-cordiaquinona J, que foi dissolvido em acetato de etila e posteriormente transferido para um balão volumétrico de 25 mL. Uma alíquota de 2,5 mL dessa solução foi retirada e diluída para um volume final de 25 mL de acetato de etila.

Para preparação da solução padrão da cordiaquinona M, pesou-se 10,9 mg do metabólito, que foi dissolvido em acetato de etila e posteriormente transferido para um balão volumétrico de 10 mL.

Preparação do extrato da planta para injeção em CLAE

Pesou-se uma alíquota de 199,4 mg do extrato etanólico, que foi solubilizado em 5 mL de acetato de etila, seguido de filtração em membrana 0,45 µm Whatman. A solução obtida desse processo foi aplicada em um cartucho *SPE* sílica 10g/60 mL sendo em seguida eluída com 10 mL de acetato de etila obtendo-se uma fração rica em naftoquinonas. Posteriormente o cartucho foi eluído com 20 mL de uma solução etanol/água 80:20. As duas frações foram analisadas e comparadas por CCD utilizando um sistema hexano/acetato de etila 60:40 observando a ausência de naftoquinonas na fração etanol/água.

Preparou-se uma solução da fração rica em naftoquinonas, dissolvendo-se 120,9 mg em 50 mL de acetato de etila, obtendo-se uma solução de concentração de 2,4 mg/mL.

Quantificação

Foram realizadas injeções da solução padrão da (+)-cordiaquinona J nos volumes de 2, 4, 6, 8 e 10 µL e injeções da solução do padrão cordiaquinona M em 1, 3, 5, 7, 9, 11 µL para construção das curvas de calibração, utilizou-se a média aritmética das áreas, segundo o método do padrão externo (Ciola, 1998).

Resultados e discussões

A identificação, das naftoquinonas no cromatograma foi realizada comparando o tempo de retenção e os espectros na região do ultravioleta, dos compostos presentes no extrato, com os dados dos espectros UV e do tempo de retenção dos padrões das naftoquinonas catalogados numa espectroteca. O cromatograma da fração rica em naftoquinonas e os espectros das substâncias com tempo de retenção 3,7 e 6,3 min estão representados na Figura 2. As áreas picos e os tempos de retenção, das naftoquinonas em estudo, além da identificação das substâncias presentes no cromatograma foram obtidos utilizando o software padrão da Shimadzu Chromatography Workstation CLASS-VP Release 6.12 SP5.

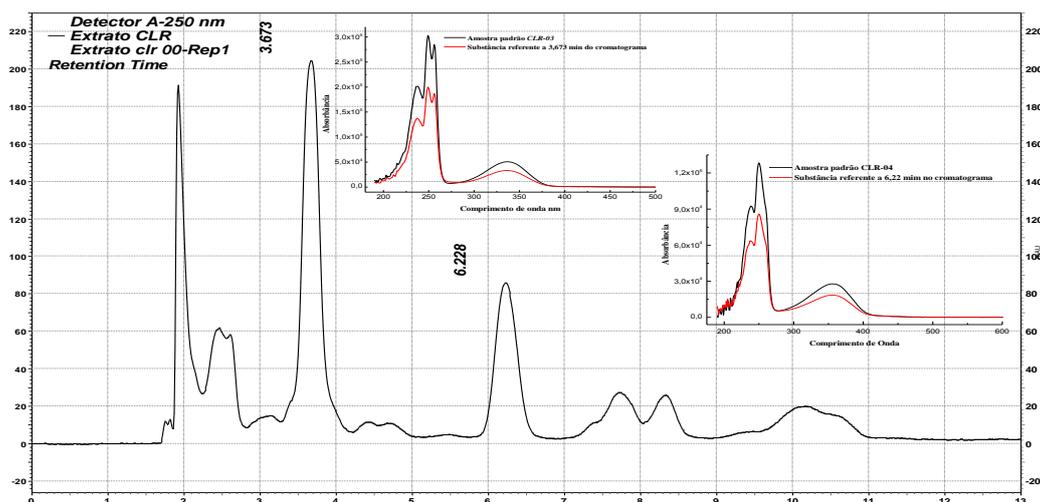


Figura 2 - Cromatograma da fração rica em naftoquinonas e espectros das substâncias com tempo de retenção de 3,7 e 6,3 min

No cromatograma os picos com tempo de retenção de 3,7 e 6,2 min foram caracterizados como sendo a (+)-cordiaquinona J e a cordiaquinona M respectivamente, pois apresentaram os mesmos tempos de retenção e um índice de similaridade, na comparação dos espectros UV dos padrões, muito próximo de 100 %. As resoluções desses picos foram maiores que 1,5 estando portando em condições analíticas para a suas quantificações. A cordiaquinona L, apesar de ter sido re-isolada, não apresentou condições analíticas de quantificação. A média das áreas dos picos dos padrões da (+)-cordiaquinona J e cordiaquinona M, juntamente com os seus respectivos tempos de retenção médio estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1- Média da área do pico e do tempo de retenção das naftoquinonas

cordiaquinona	Média da área	Tempo de retenção (min)
(+)-cordiaquinona J	3538438,5	3,7
cordiaquinona M	1708332,5	6,2

A quantificação da (+)-cordiaquinona J e da cordiaquinona M foi realizada utilizando o método do padrão externo, a partir da construção de suas respectivas curvas de calibração, da área média do pico em função do volume injetado, nas mesmas condições utilizadas para a solução do extrato rico em naftoquinonas. Suas linearidades foram trabalhadas na faixa de 0,8 a 4 µg para (+)-cordiaquinona J e 0,6 a 6,6 µg para cordiaquinona M. Na Tabela 2 estão descritos os coeficientes de correlação, encontrados pelo método dos mínimos quadrados, e nas figuras 3 e 4 estão representados as curvas de calibração dos padrões da (+)-cordiaquinona J e cordiaquinona M respectivamente.

Tabela 2 - Coeficiente de correlação R^2 e coeficiente linear (a) e angular (b) da equação $y=a+bx$

Analíto	Coeficiente de correlação	Coeficientes $y= a + bx$	
	R^2	a	b
(+)-cordiaquinona J	0,99964	- 15912,3	1,29646E6
cordiaquinona M	0,99974	- 188550,9	1,7911E6

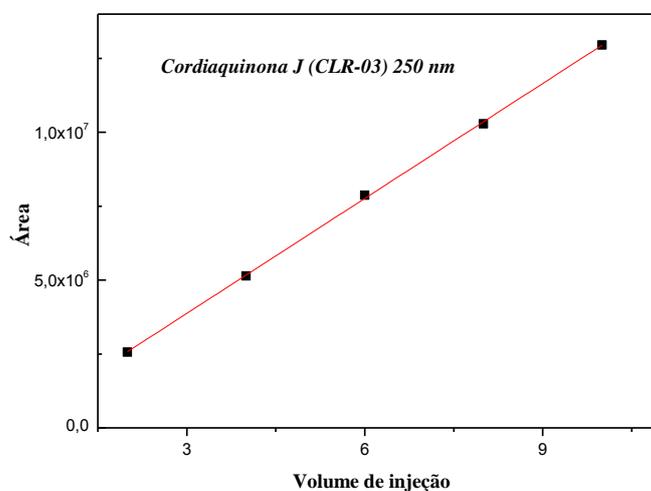


Figura 3 - Curva de calibração das naftoquinonas (+)-cordiaquinona J, λ 250 nm

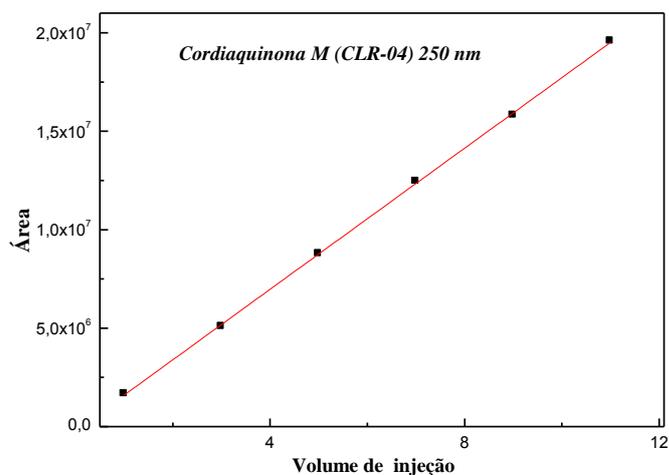


Figura 4 - Curva de calibração das naftoquinonas cordiaquinona M, λ 250 nm

Tomando como base, as equações obtidas no processo de regressão linear, a área dos picos das naftoquinonas (+)-cordiaquinona J e cordiaquinona M no cromatograma e o volume de injeção da fração rica em naftoquinonas, foi possível determinar o percentual de cada naftoquinona nas raízes da *Cordia leucocephala*, como mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Percentual de naftoquinonas nas raízes da *Cordia leucocephala*

Cordiaquinona	Percentual de naftoquinonas	
	No extrato seco	Na raízes seca
(+)-cordiaquinona J	3,4	0,31
cordiaquinona M	2,0	0,18

Conclusão

O método analítico desenvolvido segundo a técnica cromatográfica líquida de alta eficiência mostrou-se rápido e reprodutivo na análise das naftoquinonas presentes no extrato das raízes de *C. leucocephala*. Este mesmo método revelou-se eficiente, uma vez que permitiu, com precisão, a análise e quantificação das (+)-cordiaquinona J e cordiaquinona M, mostrando que a mais (+)-cordiaquinona J é a naftoquinona majoritária do extrato das raízes.

Agradecimentos

Ao laboratório de cromatografia - UERN e ao CNPq.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, H. F. L.; AGRA, M. F. **Revista Brasileira de Farmácia**, 85, 7, 2004.
- AGRA, M. F., **Plantas da medicina populares dos Cariris Velhos, Paraíba, Brasil: Espécies mais comuns** . Ed. União, Joao Pessoa, 1996.
- AL-AWADI, F. M.; SRIKUMAR, T.S.; ANIM, J.T.; KHAN I., **Nutrition**, 17, 391,2001.
- BARROSO, I. C. E.; OLIVEIRA, F.; BRANCO, L. H. Z.; KATO, E. T. M.; DIAS, T. G., **Revista Lecta**, 20, 15, 2002.
- CIOLA, R.; **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC**. Ed. Edgar Blucher, São Paulo, 1998.

DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; OLIVEIRA, O. F.; MACIEL, M. A. M.; TORRES, M. C. M.; BRÁZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. **Magnetic Resonance in Chemistry**, 47, 190, 2009.

MARINHO-FILHO, J. D. B.; BEZERRA, D. P.; ARAUJO, A. J.; MONTENEGRO, R. C. PESSOA, C.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V., **Chemico-Biological Interactions**, 183, 369, 2010.

OKUSA, P.N.; PENGE, O.; DEVLEESCHOUWER, M.; DUEZ, P. **Journal of Ethnopharmacology**, 112, 476, 2007.

PAIVA, S.R.; FONTOURA, L.A.; FIGUEIREDO, M.R., **Química Nova**, 25, 717, 2002

PARISOTTO, E. B.; MICHIELIN, E. M. Z.; BISCARO, F.; FERREIRA, S. R.S.; WILHELM FILHO, D.; PEDROSA, R. C. **The Journal of Supercritical Fluids**, In Press, Corrected Proof, 2011.

ROLDÃO, E. F.; WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; DI STASI, L. C.; **Journal of Ethnopharmacology**, 119, 94, 2008.