

ANÁLISE DE NAFTOQUINONAS EM EXTRATOS BRUTOS DE RAÍZES DE *ZEYHERIA MONTANA* M. (BOLSA-DE-PASTOR)

Rose Lisieux. R. Paiva Jácome* e Alaíde Braga de Oliveira

Faculdade de Farmácia - UFMG - Av. Olegário Maciel, 2360 - 30180-112 - Belo Horizonte - MG

Délio S. Raslan

Depto. de Química - Instituto de Ciências Exatas - UFMG - Av. Antônio Carlos, 6627 - 31270-010 - Belo Horizonte - MG

Andreas Müller e Hildebert Wagner

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München - Karlstr. 29 - 80333 - München - Germany

Recebido em 3/12/97; aceito em 9/6/98

ANALYSIS OF NAPHTHOQUIMONES IN *ZEYHERIA MONTANA* CRUDE EXTRACTS (BOLSA - DE - PASTOR). Four naphthoquinones, lapachol, α -lapachone, dehydro- α -lapachone and 4-hydroxy- α -lapachone were isolated from the ethanol extract of *Zeyheria montana* M. roots (Bignoniaceae) and were identified by spectroscopic methods. These naphthoquinones, except 4-hydroxy- α -lapachone, were quantified by HPLC, in the crude ethanol extracts of *Z. montana* roots. The separation of lapachol, α -lapachone and dehydro- α -lapachone was achieved and these compounds were identified in the chromatograms by their retention times and by their on line UV-spectra. The quantification of the three naphthoquinones, in four different samples showed medium contents of 11,0 μ g of lapachol, 6,1 μ g of α -lapachone and 4,3 μ g of dehydro- α -lapachone, in 100 mg of *Z. montana* roots.

Keywords: *Z. montana*; Bignoniaceae; naphthoquinones; HPLC.

INTRODUÇÃO

Extratos de produtos naturais têm sido largamente usados como medicamento desde tempos antigos. Muitas substâncias têm sido isoladas e purificadas e suas estruturas identificadas. Entretanto, extratos de plantas ainda são usados como medicamentos sem um conhecimento do perfil cromatográfico e sem averiguação da presença das substâncias ativas ou comumente encontradas na espécie vegetal.

As plantas medicinais necessitam de uma padronização dos seus extratos para serem empregadas na fitoterapia ou na preparação de fitoterápicos. Esta padronização deve ser rápida, eficiente e permitir a identificação das substâncias presentes no extrato vegetal. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) tem prestado grande auxílio nesta padronização, uma vez que ela é capaz de mostrar um perfil cromatográfico do extrato, tornando possível a averiguação das substâncias normalmente presentes e/ou responsáveis pela atividade farmacológica, mesmo em pequenas concentrações.

As naftoquinonas são descritas como principais constituintes do gênero *Tabebuia* da família Bignoniaceae por serem frequentes e algumas vezes abundantes em várias espécies deste gênero¹.

Zeyheria montana M.² é uma Bignoniaceae nativa no Brasil conhecida como bolsa-de-pastor, cujas raízes são usadas na medicina popular contra as doenças de pele³. Esta espécie, anteriormente denominada *Z. digitalis*, teve sua madeira estudada e dos extratos benzênico e etanólico foi isolada uma única naftoquinona, o lapachol (1)⁴.

No presente estudo, além do lapachol, mais três outras naftoquinonas foram isoladas das raízes desta espécie: α -lapachona (2a), desidro- α -lapachona (3) e 4-hidroxi- α -lapachona (2b). As estruturas químicas desses compostos estão representadas na Figura 1.

O estudo por CLAE desta espécie focalizou as naftoquinonas, uma vez que elas estão associadas a várias atividades biológicas. Os extratos de espécies dessa família tiveram suas atividades antimicrobianas comprovadas⁵; o lapachol apresentou ação antiinflamatória em ratos⁶ e atividade antineoplásica com baixa toxicidade em pacientes humanos⁷.

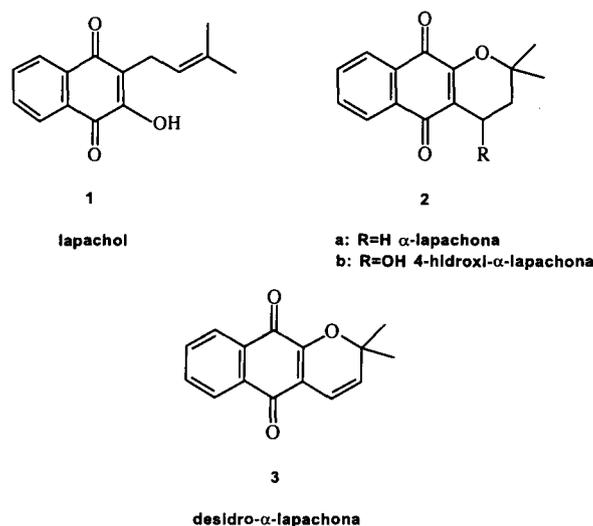


Figura 1. Estruturas químicas das naftoquinonas isoladas das raízes de *Z. montana*.

Publicação prévia de condições utilizadas na CLAE, para separação de uma mistura de lapachol, α -lapachona, β -lapachona e desidro- α -lapachona foi descrito por Awang *et al.*, utilizando fase móvel isocrática [acetonitrila (MeCN) com 0,25% de sol. aquosa de ácido acético], a qual não foi testada em extratos brutos de plantas⁸. Kreher descreveu a identificação e quantificação de lapachol, desidro- α -lapachona e outras naftoquinonas presentes em *Tabebuia avellanedae* utilizando como fase móvel um gradiente de MeCN - água (10-60% MeCN) em 30 min. Desta forma foram quantificados a desidro- α -lapachona (7,0 mg) e o lapachol (0,2 mg) em 100 g da planta seca⁹. Condições semelhantes foram usadas no presente trabalho.

O objetivo principal desse trabalho foi desenvolver um método utilizando CLAE, em fase reversa, para separação dos constituintes químicos e análise quantitativa das principais

naftoquinonas presentes no extrato etanólico das raízes de *Z. montana*. O estudo fitoquímico das raízes foi realizado previamente para isolamento de constituintes químicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Material vegetal

A planta foi coletada durante a primavera de 1993 em São Gotardo, Minas Gerais, Brasil e identificada por J. L. Pedersoli, do Departamento de Botânica, da Universidade Federal de Minas Gerais. Uma exsicata encontra-se no Herbário do Museu de História Natural, Belo Horizonte, Brasil (n° 4466).

Instrumentação e parâmetros da separação por CLAE

As análises por CLAE foram feitas em um cromatógrafo líquido HP 1090 com detector de *diode-array* HP 1040 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemanha) coluna de fase reversa Lichrospher 100 RP-18 (12,5 cm x 1,0 cm) com partículas de 5 µm (Merck, Darmstadt, Alemanha). Para separação dos compostos empregou-se um gradiente linear dos solventes A (H₂O + 1% H₃PO₄ 0,1 N) e B (acetonitrila + 1% H₃PO₄ 0,1 N); 10% - 95% B em 55 min.; fluxo 1 mL/min. A detecção foi realizada no comprimento de onda de 210 nm.

Obtenção dos compostos de referência

Os compostos de referências foram obtidos do extrato etanólico, previamente preparado por percolação das raízes secas de *Z. montana*. O extrato etanólico (12 g), depois de concentrado a vácuo, foi dissolvido em água/etanol (3:7) e extraído com hexano. O extrato hexânico, depois de concentrado a vácuo (3,0 g), foi cromatografado em coluna de sílica gel com eluentes de polaridades crescentes (hexano, diclorometano e metanol). Isolaram-se o ác. esteárico (40 mg) e quatro naftoquinonas: lapachol (140 mg), α -lapachona (40 mg), desidro- α -lapachona (7 mg) e 4-hidroxi- α -lapachona (7 mg). Estas substâncias foram identificadas pela comparação com amostras autênticas, isoladas das raízes de *Z. tuberculosa*, por cromatografia em camada delgada de sílica¹⁰. As estruturas das substâncias foram confirmadas comparando-se os dados das espectrometrias no IV, RMN¹H e ¹³C e de massas com aqueles da literatura^{11,12}. A pureza dos compostos isolados foi testada em CLAE de fase reversa (RP-18).

Preparação das substâncias de referência

Pesaram-se exatamente 10 mg de cada padrão das naftoquinona (lapachol, α -lapachona e desidro- α -lapachona), que foram dissolvidos em balão volumétrico de 10 mL completando o volume com acetonitrila. Uma alíquota de 1 mL da solução estoque foi retirada e diluída para um volume final de 10 mL de acetonitrila. Volumes desta solução, variando de 0,06 µL até 1,0 µL foram injetados para construção das curvas de calibração, pelo método do padrão externo.

Preparação do extrato da planta para injeção em CLAE

Raízes secas de *Z. montana* foram pulverizadas e o pó (3 g) foi extraído exaustivamente com EtOH, durante 2 horas, em extrator de Soxhlet. O extrato etanólico foi evaporado até seca e o resíduo foi retomado, quantitativamente, com 10 mL de acetonitrila. Uma alíquota de 1 mL desta solução foi filtrada através de cartucho Sep-Pak RP18, acondicionado com acetonitrila e 10 µL desta solução foram injetados no cromatógrafo para quantificação.

Quantificação

A quantificação das naftoquinonas foi feita segundo o método do padrão externo. As curvas de calibração para as

naftoquinonas foram obtidas pela injeção de volumes crescentes das soluções-padrão [0,06* µL, 0,08* µL, 2 µL, 4 µL, 6 µL, 8 µL, 10 µL (*= apenas para desidro- α -lapachona)]. Cada volume foi injetado 5 vezes e utilizou-se a média aritmética das áreas para construção das curvas de calibração.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tanto a planta em estudo como outras espécies do gênero *Tabebuia* apresentam naftoquinonas na sua composição química. Com o objetivo de quantificar algumas naftoquinonas nos extratos brutos de *Z. montana* e de outras espécies procuramos desenvolver um método de CLAE, de fase reversa, no qual obtivéssemos uma separação satisfatória dos picos e boa reprodutibilidade dos cromatogramas. Procuramos desenvolver uma fase móvel que permitisse uma separação adequada tanto dos compostos polares quanto apolares, usualmente presentes em extratos brutos.

Dentre os compostos mais apolares foi isolado o ácido esteárico nas primeiras frações da coluna cromatográfica do extrato hexânico das raízes de *Z. montana* (eluente:hexano) que foi identificado pela aparência oleosa, pelo espectro no IV e pelo espectro de massas. Este ácido foi injetado no cromatógrafo, tendo apresentado tempo de retenção de 46,8 min.

As naftoquinonas isoladas: α -lapachona, desidro- α -lapachona e lapachol, foram separadamente injetadas no cromatógrafo e os tempos de retenção e seus espectros no UV "on line" obtidos pelo detector de *diode-array* (Figura 2). O extrato bruto de *Z. montana* foi injetado posteriormente e o perfil cromatográfico pode ser observado na Figura 3. Os picos correspondentes às três naftoquinonas podem ser identificados no cromatograma do extrato bruto por comparação com o tempo de retenção de cada uma delas, obtido separadamente: 24,17 min. para α -lapachona, 25,77 min. para desidro- α -lapachona e 29,75 min. para o lapachol. A quantificação das naftoquinonas nos extratos brutos foi feita tomando como base a área dos picos obtidos nas amostras-padrão.

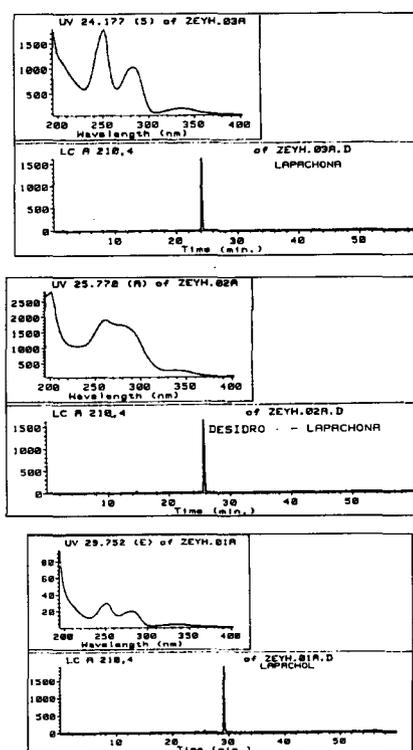


Figura 2. Cromatogramas obtidos por CLAE e espectros no UV "on line" para as substâncias de referência: α -lapachona, desidro- α -lapachona e lapachol isoladas das raízes de *Z. montana*.

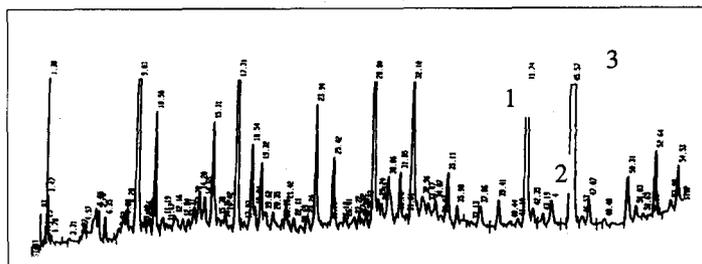


Figura 3. Cromatograma, obtido por CLAE, do extrato bruto das raízes de *Z. montana*. Identificação dos picos: 1= α -lapachona (23,94 min.), 2=desidro- α -lapachona (25,42 min.), 3= lapachol (28,80 min.). Condições cromatográficas: vide parte experimental.

Os gráficos de calibração linear (Figura 4) foram obtidos através da área dos picos das naftoquinonas (y), usadas como padrão externo, versus a quantidade injetada (x μ g). As equações de regressão e os coeficientes de correlação obtidos foram $y = 8\,547\,000x - 116\,900$ ($r=0,9939$) para o lapachol, $y = 7\,780\,000x + 45\,670$ ($r=0,9998$) para a α -lapachona e $y = 8\,992\,000x - 629,9$ ($r=0,9999$) para a desidro- α -lapachona. A média das concentrações obtidas, em 100 mg das raízes da planta, foram de 0,011 ($\pm 0,0012$)% de lapachol, 0,0061 ($\pm 0,0002$)% de α -lapachona e 0,0043 ($\pm 0,0002$)% de desidro- α -lapachona.

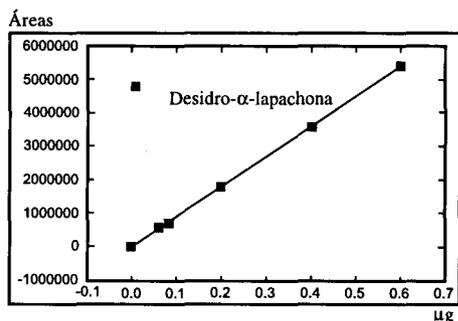
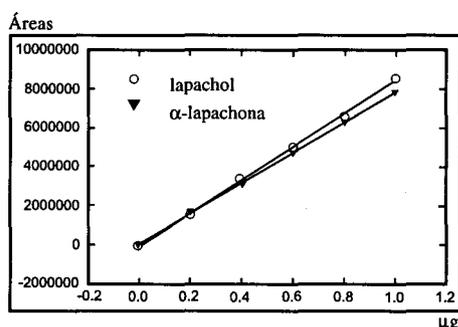


Figura 4. Curvas de calibração para as substâncias de referência: lapachol, α -lapachona e desidro- α -lapachona isoladas de *Z. montana*.

Os valores das áreas determinadas por CLAE, referentes às três naftoquinonas presentes nas raízes de *Z. montana* estão representados na Tabela 1.

CONCLUSÕES

Lapachol, desidro- α -lapachona e α -lapachona foram quantificados no extrato etanólico das raízes de *Z. montana*. Destas, o lapachol é o componente majoritário. O cromatograma do extrato mostra picos correspondentes a várias outras substâncias. A 4-hidroxi- α -lapachona, também isolada, corresponde ao pico com tempo de retenção de 17,30 min. e a substância com maior pico no extrato, nas condições de análise, foi identificada como ácido esteárico com tempo de retenção igual a 45,56 min. A metodologia desenvolvida para *Z. montana* permite a quantificação de naftoquinonas usualmente presentes em

Tabela 1. Áreas dos picos referentes a lapachol, α -lapachona e desidro- α -lapachona nas raízes de *Z. montana*.

<i>Z. montana</i>	α -Lapachona	Desidro- α -lapachona	Lapachol
Peso	Áreas	Áreas	Áreas
3 mg	1 496 900	1 236 300	2 637 900
3 mg	1 318 600	1 277 200	2 642 200
3 mg	1 489 600	1 180 500	2 622 500
3 mg	1 550 900	1 122 300	2 792 400
3 mg	1 590 700	1 017 400	2 543 100
Soma	7 446 700	5 833 700	13 238 100
Média	1 489 340	1 166 740	2 647 620

extratos de espécies do gênero *Tabebuia*, também usadas como fitoterápicos, o que viabiliza a utilização de extratos brutos de plantas com rigoroso controle de qualidade.

AGRADECIMENTOS

Ao KFA Deutsches Forschungszentrum Juelich GmbH pela bolsa de estudos e ao CNPq pela passagem concedida.

REFERÊNCIAS

- Oliveira, A. B.; Raslan, D. S.; Miraglia, M. C.; Mesquita, A. A. L.; Zani, C. L.; Ferreira, D. T.; Maia, J. G. S.; *Quim. Nova* **1990**, *13*, 302.
- Gentry, A. H.; *The New York Botanical Garden*, New York 1992.
- Corrêa, M. P.; *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, IBDF, Brasil 1931.
- Silveira, J. C.; Gottlieb, O. R.; Oliveira, G. G.; *Phytochemistry* **1975**, *14*, 1829.
- Anesini, C.; Perez, C.; *J. of Ethnopharmacology* **1993**, *39*, 119.
- Almeida, E. R.; Silva Filho, A. A.; Santos, E. R.; Lopes, C. A. C.; *J. of Ethnopharmacology* **1990**, *29*, 239.
- Santana, C. F.; Lins, L. J. P.; Asfora, J. J.; Melo, A. M.; Lima, O. G.; d'Albuquerque I.L.; *Rev. do Instituto de Antibióticos* **1980/1**, *20*, 61.
- Awang, D. V. C.; Kindack, D.; Dawson, B. A.; *Chromatogr.* **1986**, *18*, 439.
- Kreher, B.; *Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Universität München*, Juni 1989.
- Weinberg, M. L. D.; Gottlieb, O. R.; Oliveira, G. G.; *Phytochemistry* **1976**, *15*, 510.
- Ferreira, C. A. C.; Ferreira, V. F.; Pinto, A. V.; Lopes, R. S. C.; Pinto, M. C. R.; Silva, A. J. R.; *An. Acad. Brasil. Ci.* **1987**, *59*, 5.
- Elwood, T. A.; Dudley, K. H.; Tesarek, J. M.; Rogerson, P. F.; Bursey, M. M.; *Organic Mass Spectrometry* **1970**, *3*, 841.