

Obtenção de extratos e estudo fitoquímico do extrato *n*-butanólico

Obtaining extracts and phytochemical study of the *n*-butanolic extract

RESUMO

A descoberta de novas moléculas com potencial antitumoral é de grande importância mundial e, como a biodiversidade brasileira é imensa, tem-se buscado por moléculas, provenientes de plantas, que sejam mais eficazes no tratamento contra o câncer e que sejam menos nocivas ao corpo. Pensando nisso, este trabalho tem como objetivos, obter extratos brutos do tubérculo Cará Moela (*Dioscorea bulbifera*), avaliar a toxicidade do extrato *n*-butanólico do tubérculo, fracionar e isolar os compostos presentes nesse extrato, utilizando técnicas cromatográficas, avaliar a atividade antitumoral dos compostos isolados e identificar por meio de técnicas espectroscópicas os compostos isolados. Utilizando como material vegetal tubérculos do Cará Moela (*Dioscorea bulbifera*), obteve-se o extrato etanólico 75%, por meio de extração exaustiva. A partir desse extrato, por meio de partição com solventes de diferentes polaridades foram obtidos os extratos *n*-butanólico e o clorofórmico, que em trabalhos subsequentes serão purificados e os metabólitos secundários assim obtidos serão testados em células tumorais.

PALAVRAS-CHAVE: Cará moela, *Dioscorea bulbifera*, Atividade antitumoral, Partição, Fitoquímica.

ABSTRACT

The discovery of new molecules with antitumor potential is of great importance worldwide and, as the Brazilian biodiversity is immense, there has been a search for molecules, from plants, that are more effective in treating cancer and that are less harmful to the body. Thinking about it, this work aims to obtain crude extracts of the tuber yam-gizzard (*Dioscorea bulbifera*), evaluate the toxicity of the *n*-butanolic extract of the tuber, fractionate and isolate the compounds present in the *n*-butanolic extract using chromatographic techniques, evaluate the antitumor activity of the isolated compounds and identify the isolated compounds using spectroscopic techniques. Using tuber yam-gizzard (*Dioscorea bulbifera*), as plant material, 75% ethanol extract was obtained by means of exhaustive extraction. From this extract, through partitioning with solvents of different

Deisy Antunes da Costa
deisycosta@alunos.utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Sirlei Dias Teixeira
sirlei@utfpr.edu.br
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Beatriz Godoy Martins Moreira
Beatriz-gms@hotmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Edimir Andrade Pereira
edimir@gmail.com
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

Direito autoral: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



polarities, the *n*-butanolic and chloroform extracts were obtained, that in subsequent works will be purified and the secondary metabolites thus obtained will be tested in tumor cells.

KEYWORDS: Tuber yam-gizzard, *Dioscorea bulbifera*, Antitumor activity, Partition, Phytochemistry.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma forma muito antiga da prática medicinal popular, que vem sendo transmitida de geração em geração, e segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), muitos países em desenvolvimento dependem dessa prática como única forma de acesso a cuidados básicos com a saúde. Porém, a própria instituição diz que há necessidade de estudos dessas plantas para garantir a saúde das pessoas que as utilizam, e também para saber sua eficácia, toxicidade e propriedades farmacológicas (VEIGA, 2005).

Vários estudos etnofarmacológicos estão sendo realizados na busca de conhecer melhor a utilização de plantas na medicina popular e de organizar esse conhecimento a fim de encontrar novas moléculas bioativas, e com isso muitas plantas já vêm servindo de base para a formulação de medicamentos (FERREIRA et al., 2017).

O Brasil é detentor da maior diversidade biológica do planeta, com muitas espécies não catalogadas ainda, pensando nisso vemos que não conhecemos quase nada e muito menos a utilização de toda essas plantas (SOUZA et al., 2017). Dentre essas plantas não conhecidas, estão as plantas alimentícias não convencionais, a sua maior utilização é doméstica, tendo grande importância na alimentação, sendo fonte de vitaminas, fibras, minerais, carboidratos e proteínas (CANDIDO et al., 2017).

O cará moela (*Dioscorea bulbifera*) é uma hortaliça não convencional, uma trepadeira herbácea, que produz tubérculos aéreos, que são consumidos como alimento em diversas regiões do mundo (JIMÉNEZ e AGUILAR, 2017). Além de alimento ela é utilizada como remédio caseiro para várias enfermidades, pois apresenta propriedades antimicrobiana, analgésica, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmica, antioxidante, anti-hiperlipidêmica e antitumoral (GHOSH et al., 2015).

Neste contexto, este projeto de pesquisa tem como objetivo obter extratos do tubérculo cará moela (*Dioscorea bulbifera*), utilizando solventes de diferentes polaridades e realizar o fracionamento desses extratos brutos obtidos, isolamento e purificação de metabólitos secundários com potencial atividade antitumoral.

MATERIAL E MÉTODOS

Os tubérculos foram coletados no município de Pato Branco-PR, no horto do Câmpus da UTFPR, em fevereiro de 2020. A identificação do material vegetal foi realizada pela professora Dr^a. Giovana Faneco Pereira, do Departamento de Agronomia da UTFPR, Câmpus Pato Branco, e a exsicata está depositada no herbário da UTFPR sob número HPB 1103.

Aproximadamente 1,7 kg do tubérculo foi processado, inicialmente fez-se uma lavagem em água potável corrente, em seguida a sanitização dos tubérculos com hipoclorito de sódio 200 mg L⁻¹ por 5 minutos (ANTONIOLLI et al., 2005). As amostras foram trituradas, embaladas em plástico, seladas a vácuo, congeladas e posteriormente liofilizadas.

Para o extrato etanólico 75%, os tubérculos liofilizados foram submetidos a extração a frio, com etanol 75% e agitação constante, fazendo-se 3 renovações do solvente com intervalo de 48 horas (WANG et al., 2012). Posteriormente o extrato foi filtrado a vácuo e concentrado em evaporador rotativo a pressão reduzida e temperatura de 40 °C, o resíduo remanescente foi desprezado. O extrato concentrado foi armazenado na capela para completa evaporação do solvente e posteriormente liofilizado.

O extrato liofilizado foi ressuspenso em água e particionado em funil de separação com os solventes clorofórmio, acetato de etila e *n*-butanol sucessivamente. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura de 40 °C, armazenados na capela para completa evaporação do solvente e posteriormente liofilizados (GAO et al., 2002).

O extrato liofilizado será submetido à purificação em coluna cromatográfica, as frações obtidas do processo de purificação serão então submetidas à CCD para identificação e agrupamento por similaridade de composição química. As sub-frações agrupadas serão então submetidas à Cromatografia em Camada Preparativa para isolamento e purificação dos metabólitos secundários que serão identificados usando os métodos espectroscópicos usuais.

O potencial efeito hemolítico dos metabólitos será avaliado por meio de uma suspensão de sangue desfibrinado de carneiro em solução estéril de glicose, várias concentrações de extrato serão adicionadas a cada tubo de teste, os tubos serão misturados e incubados a 37 °C. Após aproximadamente 2 horas de incubação a absorbância do sobrenadante será determinada no comprimento de onda de 540 nm (VALDEZ et al., 2009).

As células utilizadas no estudo serão de linhagens K562 (Leucemia Mieloide Crônica), HL60 (Leucemia Mieloide Aguda), Raji, constituída de células B linfoblásticas e Jurkat (leucemia linfoide aguda tipo T). Todas as células serão

cultivadas em RPMI 1640 e suplementadas com 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de 2-mercaptoetanol e 5-10% de soro bovino fetal, em uma atmosfera constituída de CO_2 a 6%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo o plano de trabalho: “Obtenção de extratos e estudo fitoquímico de um dos extratos obtidos”, foi possível realizar parte da proposta.

Fez-se a coleta do material vegetal, e a partir dessa coleta, todos os procedimentos de obtenção dos extratos. Foi utilizado aproximadamente 1,7 Kg do tubérculo *in natura*, que resultou em 0,8223g do extrato *n*-butanólico liofilizado e 24,3250g do extrato clorofórmico também liofilizado. É importante destacar que o interesse maior era na obtenção do extrato *n*-butanólico, pois em trabalho anterior (STADNIKI, 2019), o extrato bruto apresentou significativa atividade antitumoral, ao ser testado em quatro linhagens de células tumorais, relatada na tabela 01.

Tabela 01: Atividade antitumoral para os extratos da *Dioscorea bulbifera*

Células Tumorais	DB-A $\mu\text{g mL}^{-1}$	DB-N $\mu\text{g mL}^{-1}$	DB-C $\mu\text{g mL}^{-1}$	DB-W $\mu\text{g mL}^{-1}$	VCR
Raji	19,60 $\pm$ 0,82	5,90 $\pm$ 0,89	23,20 $\pm$ 0,82	>100	0,01 $\pm$ 0,00
K562	37,5 $\pm$ 2,17	13,70 $\pm$ 1,16	33,70 $\pm$ 1,78	>100	0,50 $\pm$ 1,61 ¹
HL60	18,80 $\pm$ 0,32	5,70 $\pm$ 0,21	19,90 $\pm$ 0,71	>100	0,03 $\pm$ 0,01
Jurkat	12,10 $\pm$ 3,39	10,10 $\pm$ 0,20	18,7 $\pm$ 0,26	>100	0,01 $\pm$ 0,00

DB-E: Extrato etanólico, DB-C: Extrato clorofórmico, DB-N: Extrato *n*-butanólico, DB-A: Extrato acetato de etila.

Fonte: Adaptado de Jéssica Stadniki, 2019.

De acordo com a tabela 01, é possível identificar a atividade dos extratos DB-A, DB-C, DB-N e DB-W. A que apresentou a atividade antitumoral mais expressiva foi a amostra DB-N, a qual necessitou da menor concentração para obter resultados de inibição de 50% da atividade celular e entre todas as amostras de extratos testados o DB-N, foi o extrato cuja atividade antitumoral mais se aproximou do controle positivo vincristina (VCR), fármaco com atividade antitumoral, capaz de induzir morte de células cancerígenas.

Portanto, a partir desse extrato *n*-butanólico, seria iniciado toda a parte fitoquímica de purificação e isolamento de metabólitos secundários (em razão

disso não retiramos a metodologia que estava prevista no plano de trabalho), mas a partir do início da pandemia de corona vírus, o desenvolvimento do plano de trabalho foi prejudicado.

Prosseguimos com revisão bibliográfica, buscando diferentes métodos cromatográficos que poderiam ser utilizados no processo de purificação, colunas cromatográficas, cromatografia em camada delgada analítica e preparativa, diferentes sistemas de solventes, além de literatura atualizada sobre o cará-moela.

É importante destacar que esse trabalho terá continuidade após a normalização na utilização dos laboratórios.

CONCLUSÃO

A partir da realização da etapa inicial do plano de trabalho foi possível obter o extrato de interesse (*n*-butanólico) para a realização do Projeto de Pesquisa ao qual este plano de Trabalho está vinculado. A obtenção do mesmo, possibilitou trabalhar com a técnica de extração via maceração a frio, além de na sequência trabalhar com a partição do extrato bruto hidroalcoólico.

Associado a essa parte experimental uma ampla revisão bibliográfica foi feita, do material vegetal, das técnicas cromatográficas de purificação e de potenciais atividades tumorais.

REFERÊNCIAS

ANTONIOLLI, L. R.; BENEDETTI, B. C.; DE SOUZA FILHO M. S.; BORGES, M. S. **Efeito do hipoclorito de sódio sobre a microbiota de abacaxi 'Pérola' minimamente processado**. Revista Brasileira de Fruticultura, v. 27, n. 1, p. 157-160, 2005.

CANDIDO, H. T.; RODRIGUES, J. P. A.; STURZA, J. A. I.; DA CRUZ BARBOSA, R. **Teste de aceitação da salada de vinagreira (hibiscussabdariffa L.) no restaurante universitário da Universidade Federal de Mato Grosso – campus Rondonópolis**. Cadernos de Agroecologia, v. 11, n. 2, p. 1-7, 2017.

FERREIRA, C. D.; BRITO, D. R. S.; LUCENA, D. S.; ARAÚJO, J. M.; SALES, F. C. V. **Uso medicinal de plantas pela comunidade do bairro Nova Conquista (multirão) – Patos – PB**. Agropecuária Científica no Semiárido, v. 12, n. 4, p. 376-382, 2017.

GAO, H.; KUROYANAGI, M.; WU, L.; KAWAHARA, N.; YASUNO, T.; NAKAMURA, Y. **Antitumor-promoting constituents from Dioscorea bulbifera L. in JB6 mouse epidermal cells**. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 25, n. 9, p. 1241-1243, 2002.

GHOSH, S.; S, J.; MORE, P.; SHETE, U. J.; MAHESHWARI, N. O.; RAO, S. J.; KITTURE, R.; KALE, S.; BELLARE, J.; PATIL, S.; PAL, J. K.; CHOPADE, A. B. A. **Dioscorea bulbifera Mediated Synthesis of Novel AuCoreAgshell Nanoparticles with Potent Antibiofilm and Antileishmanial Activity.** Journal of nanomaterials, 2015.

JIMÉNEZ, M. M.; AGUILAR, M. A. **Evaluación morfoagronómica de la papa de aire (*dioscorea bulbifera* L.) en Panamá.** Cultivos Tropicales, v. 37, n. 1, p. 14-21, 2017.

SOUSA, I. J. O. et al. **A diversidade da flora brasileira no desenvolvimento de recursos de saúde.** Revista Uningá Review, v. 31, n. 1, p. 35-39, 2017.

STADNIKI, Jéssica. **Caracterização química e da atividade biológica de metabólitos especializados presentes em extratos do tubérculo do cará-moela (*Dioscorea bulbifera*) – aplicações potenciais em processos biotecnológicos.** 2019.

VALDEZ, Rodrigo Hinojosa e colab. **Biological activity of 1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamides against *Trypanosoma cruzi*.** Acta Tropica, v. 110, n. 1, p. 7–14, 2009.

VEIGA, Valdir F. e PINTO, Angelo C. e MACIEL, Maria Aparecida M. **Medicinal plants: Safe cure?** Quimica Nova, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.

WANG, J. M.; JI, L. L.; BRANFORD-WHITE, C. J.; WANG, Z. Y.; SHEN, K. K.; LIU, H.; WANG, Z. T. **Antitumor activity of *Dioscorea bulbifera* L. rhizome in vivo.** Fitoterapia, v. 83, n. 2, p. 388–394, 2012.