OBTENÇÃO DA 4'-O-METILEPIGALOCATEQUINA PARA UTILIZAÇÃO NA SÍNTESE DE NOVOS DERIVADOS

Sandra Grzygorczyk (PIBIC/ UEPG), Patrícia Mathias Doll Boscardin,
Josiane de Fátima Padilha de Paula, Joel Toribio Espinoza,
Domingos Sávio Nunes.
Cássia Gonçalves Magalhães (orientador), e-mail:cgmagalhaes@uepg.br

Química/ Química Orgânica

Palavras-chave: *Maytenus salicifolia*, nanopartículas de prata, citotoxicidade.

Resumo
Maytenus salicifolia é usada popularmente para problemas estomacais e afecções cutâneas, sendo uma espécie de interesse científico devido a seus efeitos terapêuticos. Neste trabalho foi isolada a 4'-O-metilepigalocatequina do extrato etanólico da raiz de *M. salicifolia*, composto esse que apresenta atividades antioxidante e antimicrobiana. Avaliou-se o potencial citotóxico do extrato utilizando linhagens de células oriundas de fibroblastos de camundongos. O extrato exibiu ação dose-dependente frente às células avaliadas. Foi analisado também o seu potencial redutor, por meio da análise da viabilidade da formação de nanopartículas de prata (AgNPs) por um processo ecologicamente seguro e de baixo custo. O extrato estudado foi capaz de formar AgNPs de diâmetro variado e formato esférico. Futuramente, pretende-se avaliar a aplicabilidade biológica das AgNPssintetizadas.

Introdução
Maytenus salicifolia (Celastraceae) é encontrada geralmente em matas do interior dos estados do sudeste brasileiro. A espécie é bastante empregada na medicina popular para o tratamento de úlceras estomacais e alergias de pele[1]. Além disso, *M. salicifolia* apresenta-se como fonte de 4'-O-metilepigalocatequina, que exibe atividades antioxidantes e antimicrobiana[2].
A síntese de nanopartículas metálicas tem sido extensamente desenvolvida, devido às suas diversas aplicações físicas e biológicas. As AgNPs, em particular, são amplamente usadas na área médica e industrial, devido à sua toxicidade seletiva e capacidade antimicrobiana de amplo espectro[3,4].Assim, justifica-se a importância de pesquisas que visam estudar a síntese e aplicabilidade de nanopartículas. Contudo, a síntese desses materiais, geralmente, demanda energia, é de alto custo e não ecológica.[4] Buscando-se um método ecologicamente benigno, uma alternativa seria produzir nanopartículas a partir de extratos vegetais com potencial redutor.
Tendo em vista a importância de se obter nanopartículas a partir de métodos ambientalmente seguros, a produção desses materiais empregando-se extratos de *M. salicifolia* leva à possibilidade de nova aplicação para os mesmos, agregando valor econômico à espécie. Assim, o objetivo desse trabalho consistiu em isolar a 4'- O-metilepigalocatequina a partir do extrato etanólico da raiz de *M. salicifolia* , assim como a avaliar a atividade citotóxica desse extrato, além de seu potencial na obtenção de AgNPs pelo método da síntese verde.

Material e Métodos

Obtenção da 4'-O-metilepigalocatequina

O extrato etanólico da raiz de *M. salicifolia* (EER) foi previamente preparado conforme descrito por Magalhães et al. 2016. Em seguida, foi submetido à purificação pelo método de cromatografia em coluna de sílica-gel 6, cujo eluente foi a mistura de diclorometano e acetato de etila em constante aumento da polaridade. Foram recolhidas 66 frações, as quais foram submetidas à análise por CCDS (cromatografia em camada delgada de sílica). Foram reunidas as frações finais em dois grupos. As demais foram armazenadas para posterior estudo. Esse procedimento foi realizado quatro vezes, a fim de reunir quantidade suficiente para realizar o estudo do grupo.

No grupo A02, após purificação por cromatografia em coluna com clorofórmio e metanol, nas análises por CCDS foi observada a fração 19 (13,6 mg), que se apresentou como um ponto isolado na placa. Após estar livre de solvente, a amostra foi submetida para análise em RMN de ^{1}H e ^{13}C.

Avaliação da atividade citotóxica do extrato

A avaliação do potencial citotóxico de EER foi realizada em linhagens de células oriundas de fibroblastos de camundongos T3. A atividade citotóxica foi determinada pelo método colorimétrico de Mosman[5].

Obtenção de nanopartículas deprata

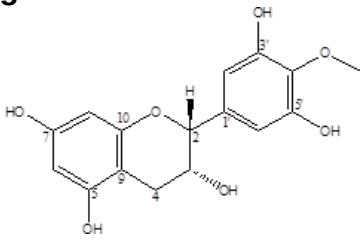
Para síntese das AgNPs, foi preparada uma solução aquosa de nitrato de prata ($AgNO_3$)1,0 mM. Em seguida, diluiu-se EER, a partir de 3mg de extrato em 8ml de etanol e 12 ml de água destilada. Em seguida, a 1ml da solução diluída do extrato, adicionaram-se 9 ml da solução de $AgNO_3$ 1,0 mM. A mistura levada a aquecimento (65 °C) e rotação contínua. As amostras foram caracterizadas por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG), espectroscopia na região do UV-Vis e determinação do Potencial Zeta(PZ).

Resultados e Discussão

Determinação estrutural da fração 19

No espectro de RMN ^{13}C e subespectro DEPT-135 da fração 19 foram observados 14 sinais, que foram classificados como sendo um CH_3 de grupo metoxila, um CH_2, cinco sinais de CH e sete sinais de átomos de carbono não hidrogenado. A comparação dos dados obtidos (Tabela 1, p.3) com a literatura[6], permitiu identificar a fração 19 como a 4'-O-metil-epigalocatequina (Fig. 1).

Figura 1 – Estrutura da 4'-O-metil-epigalocatequina.



Fonte: a autora

Tabela 1 – Comparação dos sinais do espectro de RMN de ^{13}C (110 MHz, DMSO) da fração 19 com dados da literatura[6].

Fração 19		4'-O-metilepigalocatequina [6] (CD_3OD)	
Carbono	**δ_C**	**DEPT-135**	**δ_C**
2	78,4	CH	79,8
3	65,3	CH	67,6
4	28,6	CH_2	29,3
5	99,0	CH	100,2
6	95,6	CH	96,6
7	156,0	C	157,3
8	94,5	CH	96,0
9	156,9	C	158,1
10	156,6	C	157,8
1'	135,3	C	136,8
2'	106,5	CH	107,3
3'	150,4	C	151,5
4'	134,9	C	136,3
5'	150,4	C	151,5
6'	106,5	CH	107,3
Ome	60,0	CH_3	60,9

Avaliação da atividade citotóxica do extrato

Observou-se que atividade citotóxica do extrato tem ação dose-dependente. Quando o extrato está em concentrações superiores a 30 µg/ml, é citotóxico, e em concentrações inferiores, não altera a viabilidade celular. Portanto, o extrato apresenta atividade citotóxica dependendo de sua concentração. Como a viabilidade celular foi mantida em concentrações menores, é necessária a realização do teste em células tumorais.

Obtenção de nanopartículas de prata

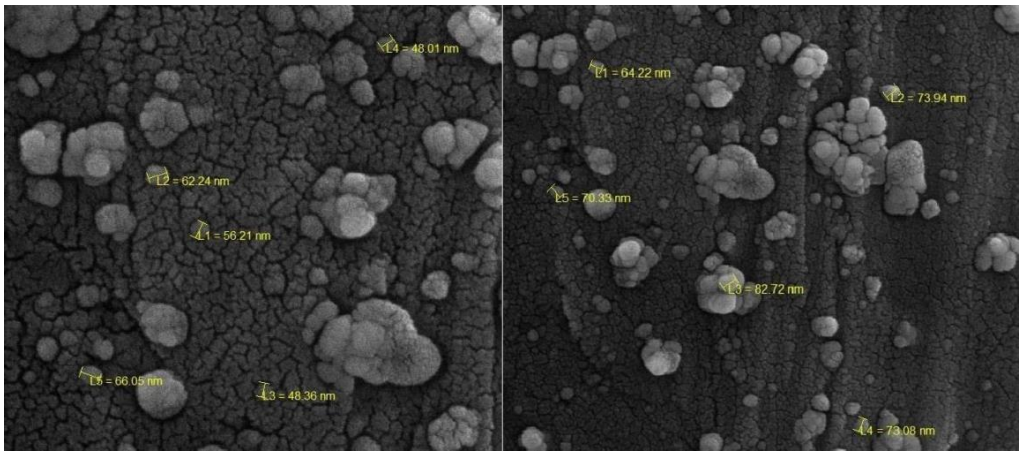
EER demonstrou potencial redutor, reduzindo a prata a AgNPs. Essa propriedade foi inicialmente indicada a partir da mudança de cor da solução, de incolor para uma coloração amarela, observada após 25 minutos de aquecimento. A influência do tempo e da exposição ao aquecimento na formação das nanopartículas pode ser observada a partir da análise do espectro obtido na região do UV-Vis, pois a banda em torno de 420 nm, característica da prata, apresentou valores de absorção significativos. A presença dessa banda indica também que as nanopartículas apresentam formato esférico e tamanho inferior a100nm.[7]

A atividade desse extrato pode ser justificada pela presença de compostos fenólicos, como a 4'-O-metilepigalocatequina e a proantocianidina A.[2] Durante a síntese das nanopartículas, observou-se a influência negativa da exposição à luz solar. Quando o material era sintetizado próximo à luz, a banda observada no espectro UV-vis era mais larga e em uma faixa maior que 420 nm, indicando a formação de nanopartículas instáveis, maiores ou com aglomerados. Essa diferença de comportamento pode ser explicada devido ao fato de que compostos fenólicos, que são os majoritários no extrato avaliado, são sensíveis à luz e a temperaturas elevadas, o que consequentemente pode acarretar na diminuição do potencial redutor do mesmo.

ISSN 1676-0093

O valor de Potencial Zeta, -27,1 mV, indica que as partículas obtidas são estáveis, pois a estabilidade é associada ao valor absoluto do PZ próximo de 30 mV e -30 mV[7]. Através da microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (FEG), foi possível verificar que as AgNPs obtidas (Figura 2 a e b) apresentaram aspecto esférico, apresentando diâmetro variando de 48,01nm a82,72nm.

Figura 2 – Imagens obtidas por FEG das AgNPs, que exibiram tamanho entre 48,01 nm e 66,05 nm (A) e entre 64,22 nm e 82,72 nm (B).



A **B**

Fonte: a autora

Conclusão

Obteve-se a flavana 4'-O-metilepigalocatequina a partir do extrato etanólico da raiz de *M. salicifolia*, composto da espécie que apresenta interesse científico devido à propriedades terapêuticas. O extrato demonstrou atividade citotóxica dependendo da sua concentração, e apresentou potencial redutor expressivo na síntese de nanopartículas. As AgNPs obtidas pelo extrato apresentaram formato esférico e são de tamanho variado, além de apresentar grande potencialidade de aplicação biológica. O método de síntese verde utilizado nos experimentos proporciona também a praticidade na execução, podendo ser realizada em larga escala se necessário, além de minimizar a formação de resíduos tóxicos.Agradecimentos
Ao PIBIC-UEPG pelo auxílio financeiro.

Referências

[1] SILVA, F. C.; DUARTE, L. P.; VIEIRA FILHO, S. A. **Rev. Virtual Quim.**, v. 6, n.5, p.1205-1220, 2014.
[2] MAGALHÃES, C. G. *et al.* **Rev. Virtual Quim.** v. 8, n. 5, p.1524-1536,2016.
[3]AHMED, S.*et al.***JournalofAdvanced Research**, v. 7, p. 17–28, 2016.
[4] Aishwarya S. **J. Res. Pharm. Sci.**, 9(2), 263-267,2018.
[5]MOSMANN, T. **Journal of Immunological Methods.** v. 65, p. 55-63, 1983.
[6] MIRANDA, R. R. S. **Belo Horizonte, Departamento de Química, UFMG, Tese de Doutorado**,2007.
[7] ROCHA,R.R.**Florianópolis, UFSC, Trabalho de Conclusão de Curso**, 47 p, 2010.