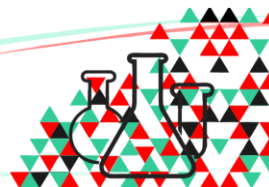




CONGRESSO BRASILEIRO
DE ENGENHARIA QUÍMICA EM
INICIAÇÃO CIENTÍFICA

21-24 Julho de 2019
Uberlândia/MG



PURIFICAÇÃO DE AMOSTRAS IMPURAS DE α - β AMIRINA POR CRISTALIZAÇÃO

L. O. N do NASCIMENTO¹, L. A. CAVALCANTE², Y. K. P. G. AUM¹; E. M. M. M. AGUIAR³.

¹ Universidade Federal do Amazonas; Departamento de Engenharia Química

² Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas, Departamento de Química, Ambiente e Alimentos

³ Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química

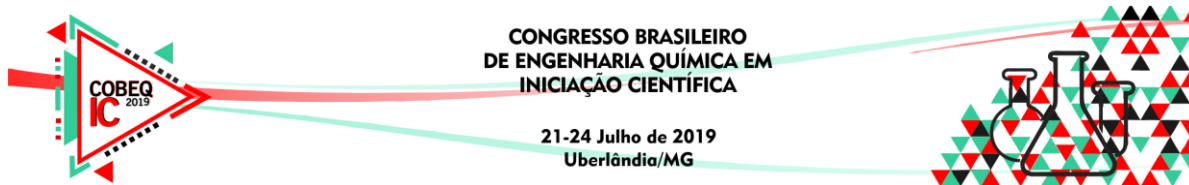
E-mail para contato: orleamlucas@gmail.com

RESUMO – A alfa e beta-amirina são triterpenóides encontrados em diversas espécies de plantas, dentre elas, as do gênero *Protium*. Esses compostos apresentam promissora aplicação na indústria farmacêutica. No entanto, há dificuldade de se encontrar um método para realizar a sua purificação e aplicá-la em grande escala. Portanto, nesse trabalho, foi avaliado um método de cristalização empregando etanol como solvente e água como agente de nucleação, a fim purificar amostras impuras de amirina e quantificar quantas etapas nesse processo serão necessárias para se obter uma alta pureza. Pela análise em cromatografia de camada delgada (CCD), observou-se que o método foi capaz de remover as impurezas a partir do primeiro processo.

1. INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Protium* (Burseraceae) encontram-se consideravelmente difundidas por várias partes do Brasil, como na região Amazônica, Piauí, Bahia, Minas Gerais, e em países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai. Dentre as espécies, tem-se a *Protium heptaphyllum*, conhecida também como breu-branco, da qual se extrai uma óleo-resina utilizada na medicina popular como cicatrizante, anti-inflamatório, analgésico, expectorante e antiulceroso (Rosilene, 2017; Melo, Caroline Mourão, 2009). É também utilizada na indústria de vernizes e tintas, em embarcações (calafetação) e em rituais religiosos como incensos (Corrêa, 1984; Aragão et al., 2007).

Entre os constituintes desse óleo-resina, está registrado a presença de um monoterpeno trioxigenado e quatro misturas binárias de triterpenóides (Bandeira et al., 2002) das quais se destaca a mistura isomérica α e β -amirina. Estas, por sua vez são triterpenos pentacíclicos da classe ursano (alfa-amirina) e oleano (beta-amirina) com extensos estudos abordando sobre a sua ação como agentes antimicrobianos e antifúngicos em plantas, atividades anti-inflamatórias, anti-nociceptivas, antiartrítico, ansiolítica, antidepressiva e gastroprotetoras comprovadas, inibidor da serina, por inibir a transcriptase-1 do HIV protease e a lipoxigenase (Johann et al., 2007; Krogh et al., 1999; Ramesh et al., 2001; Rajic et al., 2000; Kwefio-Okai and Macrides, 1992; Soldi et al., 2008; Okoye et al., 2009; Vitor et al., 2008; Oliveira et. Al., 2005).



Alguns estudos estão sendo desenvolvidos para a viabilização da produção de medicamentos a partir da amirina. Mais recentemente, Florentino (2018) realizou um estudo sobre sistemas nanoparticulados carreadores utilizando amirina, para facilitar a chegada do seu princípio ativo no organismo.

Apesar das perspectivas de formulação farmacológica, ainda há dificuldade de se encontrar um método de purificação que viabilize a sua produção em grande escala (Rüdiger, 2008). Alguns métodos para síntese podem surgir como alternativa, como o estudado por Yu Y et al. (2018), no qual, em resumo, foi feita a estimulação em uma bactéria de modo que ela produzisse amirina. Considerando que o controle de sistemas biológicos em escala industrial requer mais gastos, a purificação de plantas para a obtenção de amirina pode se tornar uma alternativa mais viável economicamente.

A cristalização é uma operação unitária chave amplamente utilizada em diversos tipos de indústria, principalmente a farmacêutica, e mostra-se aqui como uma alternativa para a purificação da amirina. O princípio da cristalização baseia-se na limitada solubilidade de um composto em um solvente em certas condições físico-químicas. Qualquer mudança em uma dessas condições, levará o composto a um estado em que a sua solubilidade será menor (supersaturação), o que acarretará na formação de um sólido cristalino. Este sólido, chamado de núcleo, guiará as demais moléculas do composto a se ligarem, formando assim uma rede cristalina altamente pura. As impurezas, por sua vez, ficarão diluídas no solvente, sendo assim necessário aplicar um outro processo para separá-las do composto cristalizado, que no caso será a filtração (Zhu, 2004).

Uma das formas de se atingir essa supersaturação é a alteração da concentração da solução através do gotejamento de um solvente, que promoverá a formação dos núcleos. Uma das dificuldades verificadas na literatura sobre a cristalização é o controle do polimorfismo dos núcleos cristalinos, uma vez que o mecanismo de como os cristais é formado ainda é desconhecido (Shekunov, 2000).

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A resina de *Protium* foi macerada, peneirada e armazenada. Em seguida, foi feito o seu fracionamento em coluna de gel de sílica, usando-se uma proporção de hexano/acetato, variando-se crescentemente o gradiente de polaridade. O mesmo foi feito com uma mistura impura de amirina. Após o término do fracionamento de cada coluna, foi preparada a CCD das amostras, para verificar quais possuíam altas concentrações de alfa e beta amirina. Dessas frações analisadas, observou-se que as das proporções: Hex/Acet 92:8 % v/v, Hex/Acet 93:7 % e Hex/Acet 88:12 % v/v, apresentavam essa alta concentração, por isso, foram escolhidas para passar pelo processo de purificação.

No processo de purificação, foi feita a diluição a quente de cada fração usando-se etanol 96% v/v, em um aquecedor. Após se atingir homogeneização da solução, gotejou-se água destilada até se observar o primeiro núcleo de insaturação. Atingido o primeiro núcleo, retirou-se a solução do aquecedor, vedando-a e colocando-a para arrefecer em temperatura ambiente.

Em seguida, as soluções cristalizadas foram submetidas às filtrações com papel filtro de celulose. Ao fim da filtração, foi feita a coleta da massa da amostra presente no filtro e a sua análise em CCD, para acompanhar qualitativamente a retirada de impurezas após cada processo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todas as amostras trabalhadas, tentou-se aplicar o máximo de etapas de purificação possíveis. Entretanto, na maioria dos casos, algumas acabavam não se solubilizando no álcool etílico, durante a etapa de cristalização. Algumas das hipóteses levantadas para explicar tal fenômeno foram: o grau de pureza das amostras, visto que, como a amirina interage muito fracamente com o etanol, uma maior pureza implicaria em uma maior dificuldade para a mesma se solubilizar; Impureza do papel filtro de celulose advindas da etapa de filtração, dado que, para evitar o mínimo possível de resquícios das amostras no papel filtro, muitas vezes se fazia uma raspagem intensa, o que poderia trazer partículas do mesmo as quais dificultariam a solubilização das amostras nas cristalizações subsequentes. Outra provável hipótese foi a ausência de controle da evaporação do etanol da solução durante o aquecimento da mesma, que dependia da chapa que realizava esse aquecimento e do recipiente que comportava essa solução.

Com os dados coletados das purificações realizadas em diferentes amostras, foi possível comparar o comportamento das mesmas, para assim poder definir os parâmetros de sua purificação. Analisou-se o caso da fração 93:7 % hexano/acetato, na qual foi feita em triplicata. A massa inicial de cada amostra utilizada foi de 1 g, cujos os dados encontram-se na tabela 1.

Tabela 1 – Média e desvio padrão dos dados coletados do processo aplicado em triplicata.

	Início	1ª processo	2ª processo
Massa ao fim dos processos (g)	1	$0,58 \pm 0,05$	$0,35 \pm 0,04$
Água destilada (mL)	*	$2,17 \pm 0,24$	$0,86 \pm 0,21$
Rendimento (%)	*	$58,00 \pm 0,05$	$59,94 \pm 0,08$

Observou-se que a quantidade de água destilada usada para a nucleação da solução diminuiu após o segundo processo. Isso deve a sua provável relação proporcional entre a massa e sua relação inversamente proporcional com a pureza.

Além disso, o rendimento final após todos os processos foi de aproximadamente 35%. Esse valor pode ser explicado pois uma parte da amostra acabava passando pelo filtro de celulose na etapa de filtração, e portanto, sendo coletada juntamente com o etanol e as impurezas.

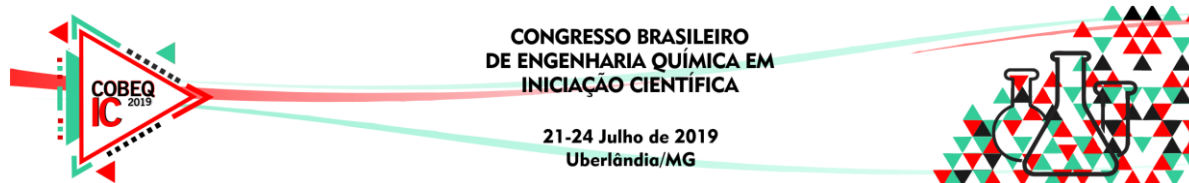
Figura 1 – Placa cromatográfica (CCD) das amostras de amirina.



O primeiro *spot* da esquerda representa a amostra antes do processo de purificação. Os demais, do meio e da direita são, respectivamente, após o 1^a e o 2^o processo. A CCD fornece uma maneira simples e rápida de se analisar os perfis de extrato de plantas e identificar, qualitativamente, os compostos.

A banda de amirina identificada apresenta cor violeta (Hernández-Vázquez et al., 2010). Observou-se que a amostra já apresentava uma pureza considerável antes mesmo do início do processo. No primeiro *spot*, as impurezas, com polaridade maior que a amirina, encontram-se circuladas. Após o primeiro processo, notou-se o desaparecimento das mesmas. A variação na intensidade das cores de violeta ao longo dos *spots* se deve às diferentes concentrações coletadas de cada amostra durante o preparo da placa.

Há referências do uso da técnica de cristalização para a purificação de triterpenos pentacíclicos. Dentre elas, destaca-se o trabalho feito por Ludeña (2017), no qual foram testados três diferentes métodos de cristalização em extratos da planta flor de arena (*clinopodium revolutum*) para a obtenção do ácido ursólico, que é um triterpeno muito semelhante aos isômeros α - β -amirina.



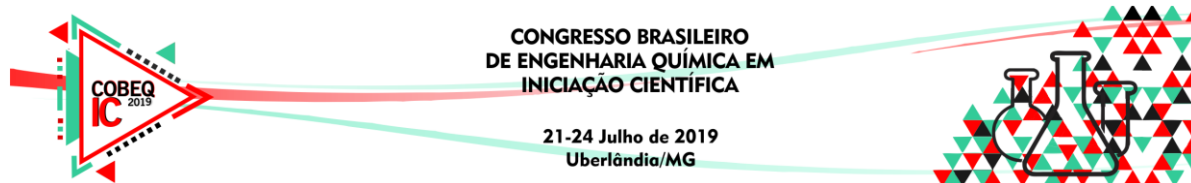
4. Conclusão

O método mostrou-se muito eficiente na limpeza das impurezas mostradas pela cromatografia de camada delgada. E a sua fácil execução pode-se tornar viável em condições industriais de grande escala. Entretanto, é necessário ter um alto controle do sistema para que a solubilização e posteriormente a cristalização, se façam de forma homogênea.

Espera-se que as futuras análises em cromatógrafos forneçam os dados necessários para a quantificação de amirina nas amostras, para assim determinar, quantitativamente, a eficiência do método.

5. Referências

- ARAGÃO, G.F.; CARNEIRO, L.M.V.; FROTA-JUNIOR, A.P.; BANDERA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; VIANA, G.S.B. Antiplatelet activity of α - and β -amyrin, isomeric mixture from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical Biology*, v.45, p.343-349, 2007;
- BANDEIRA, P. N. Contribuição ao Estudo Químico de Plantas do Nordeste Brasileiro: *Protium heptaphyllum* March e *Protium tenuifolium* Engl. Fortaleza. Tese (Doutorado): Universidade Federal do Ceará, Edições UFC. 2002.
- CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura/ Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984;
- FERREIRA, R. G S. Obtenção da mistura triterpênica de alfa, beta amirenona e avaliação de seus efeitos hipolipemiantte, hipoglicemiante e antiobesidade. 2017;
- FLORENTINO, S. N. Desenvolvimento e caracterização físico, química e biológica in vitro de nanopartículas poliméricas contendo alfa e beta amirina. Dissertação (mestrado em ciências farmacêuticas) – Universidade Federal do Amazonas. 2018;
- JOHANN, S.; SOLDI, C.; LYON, J.P.; PIZZOLATTI, M.G.; RESENDE, M.A. Antifungal activity of the amyrin derivatives and in vitro inhibition of *Candida albicans* adhesion to human epithelial cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 2007;
- KROGH, R.; KROTH, R.; BERT', C.; MADEIRA, A.O.; SOUZA, M.M.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE-MONACHE, F.; YUNES, R.A. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., *Pharmazie.*, v.54, n.6, p.464466, 1999;
- KWEIFIO-OKAI, G.; BIRD, D.; FIELD, B.; AMBROSE, R.; CARROL, A.R.; SMITH, P.; VALDES, R. Anti-inflammatory activity of a Ghanaian antiarthritic herbal preparation: Ill., *J Ethnopharmacology.*, v.46, n. 1, p. 7 —15, 1995;
- MELO, C. M. Estudo do efeito farmacológico da α,β -amirina, uma mistura de triterpenos isolada de *protium heptaphyllum*, na pancreatite aguda experimental. Universidade Federal do Ceará. 2009.
- OKOYE, N.N.; AJAGHAKU, D.L.; OKEKE, H.N.; ILODIGWE, E.E.; NWORU, C.S.; OKOYE, F.B. Beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. *Pharm. Biol.* 2014;
- OLIVEIRA, F.A.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; LIMA, R.C.; SILVA, R.M.; MAIA, J.L.; BRITO, G.A.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2005;



RÜDIGER, A. L. Estudo fotoquímico do Oleo-resina exsudado de espécies de Burseraceae. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Brasil: 2008;

SHEKUNOV, B.Y., YORK, P. Crystallization processes in pharmaceutical technology and drug delivery design. *Journal of Crystal Growth* 2000.

SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G.; LUIZ, A.P.; MARCON, R.; MEOTTI, F.C.; MIOTO, L.A.; SANTOS, A.R. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorg. Med. Chem.* 2008;

VÁZQUEZ L. H., PALAZON J., NAVARRO-OCAÑA, A. The Pentacyclic Triterpenes α , β -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities. A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), ISBN: 978-953-51-0296-0, InTech, Available: from: <http://www.intechopen.com/books/phytochemicals-a-global-perspective-of-their-role-in-nutrition-and-health/the-pentacyclic-triterpenes-amyrins-a-review-of-sources-and-biological-activities>;

VITOR, C.E.; FIGUEIREDO, C.P.; HARA, D.B.; BENTO, A.F.; MAZZUCO, T.L.; CALIXTO, J.B. Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes, α - and β -amyrin, in a mouse model of colitis. *Br. J. Pharmacol.* 2009;

YU, Y., HUAN, Y., CHANG, P., REN, H. Productive Amyrin Synthases for Efficient α -Amyrin Synthesis in Engineered *Saccharomyces cerevisiae*. 2018;

ZHU, Y. Etude expérimentale de la cristallisation du bicarbonate de sodium. Doctorat en sciences appliquées. *Université libre de Bruxelles, Faculté des sciences appliquées – Chimie*, Bruxelles. 2004.