

Purificação e Identificação dos Compostos Ativos dos Extratos Hidroalcoólicos das Folhas e Caules da Pariparoba (*Piper Regnelli*)

Autores

Bianca Marraccini Campagnolo

Orientador

Adriana Mendes Aleixo

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

Antioxidante é definido como qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações comparadas com aquelas de um substrato oxidável, retarda ou inibe, significativamente, a oxidação deste substrato, através do impedimento do início e/ou da propagação do processo oxidativo (BERGMAN, 2001 e HALLIWELL & GUTERIDGE, 1996). Antioxidantes naturais constituem uma grande variedade de compostos, incluindo compostos fenólicos, nitrogenados e carotenóides. Muitas funções biológicas, inclusive proteção contra mutação genética, carcinogênese entre outras, são atribuídas aos efeitos antioxidantes (BERGMAN, 2001).

Como a questão toxicológica e a segurança no uso de antioxidantes necessitam de maior aprofundamento, a completa identificação dos componentes isolados e seus extratos brutos é, portanto, necessária. Os novos antioxidantes isolados devem ser estudados quanto ao aspecto toxicológico, concentrações adequadas, assim como atividade individual de cada fitoquímico.

Como o estresse oxidativo pode ocorrer em diferentes sítios, diferentes tempos e diferentes mecanismos, a ação sinérgica de vários antioxidantes exige melhor investigação. Os antioxidantes que atuam em uma segunda linha de defesa podem suprir o ataque dos radicais sobre os substratos e também bloquear a cadeia de propagação. Compostos fenólicos ou misturas de compostos fenólicos extraídos na fração hidroalcoólica de batata doce apresentaram baixa atividade antioxidante, mas a combinação com uma mistura de aminoácidos apresentou uma elevada capacidade antioxidante (LARSON, 1988). Assim, o sinergismo tem papel importante na atividade antioxidante dos extratos de plantas.

Dessa forma, o presente trabalho pretende obter uma melhor compreensão do mecanismo de ação de antioxidantes naturais, através do efeito de dietas contendo extratos de plantas com comprovada atividade antioxidante. Dentro desse contexto, esse trabalho tem como alvo principal o estudo dos extratos hidroalcoólicos das folhas e caules da pariparoba (*Piper regnelli*), pois é conhecido que extratos pertencentes ao gênero *Piper* e *Photomorphe* têm demonstrado reduzir o estresse oxidativo em modelos de peroxidação lipídica quando testados *in vitro*.

Na agricultura e na medicina, as plantas da família Piperaceae (gêneros *Piper* e *Photomorphe*) constituem-se como uma ampla fonte de fitoquímicos com extensas atividades biológicas, justificando,

assim, o grande potencial para essas áreas (SCOTT *et al.*, 2005). Seus membros são ricos em substâncias como terpenóides, fenóis, ésteres fenólicos, éteres e ácidos. Muitos deles são antioxidantes naturais que protegem as células vivas da peroxidação, evitando a formação de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio (BENEVIDES, 1999).

A espécie *Piper regnellii*, uma das muitas pertencentes ao gênero *Piper*, está distribuída, em sua grande maioria, em regiões tropicais e subtropicais do mundo. O extrato foliar de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*, espécie popularmente utilizada como extratos brutos, infusões ou emplastros no tratamento da dor, de feridas, inflamações, irritações na pele, afecções febris e/ou reumáticas, apresenta atividade analgésica positiva (DI STASI, 1987 e PESSINI *et al.*, 2003).

Em pesquisa realizada com plantas medicinais brasileiras, relatou-se a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico das folhas de *Piper regnellii* contra as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e contra as leveduras *Candida krusei* e *Candida tropicalis* (PESSINI *et al.*, 2003).

2. Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo o estudo dos extratos hidroalcoólicos das folhas e caules da pariparoba (*Piper regnellii*) a fim de obter uma melhor compreensão do mecanismo de ação de antioxidantes. Assim, a partir da separação do extrato hidroalcoólico com solventes hexano e acetato de etila, são obtidas as frações orgânicas que serão purificadas por cromatografia em coluna para posterior identificação e caracterização da composição química dos compostos ativos.

3. Desenvolvimento

Para a preparação do extrato hidroalcoólico foram utilizadas 150,0 g do pó das folhas da pariparoba (*Piper regnellii*), que foi submetido a um processo de extração dos princípios ativos através da técnica de maceração e percolação (PRISTA & ALVES, 1975) com 1200mL de solução etanol/água 70%. Após um período de 63 horas de maceração, o conteúdo foi percolado fornecendo 750mL de extrato hidroalcoólico das folhas.

A fim de obter uma separação de substâncias através de suas polaridades, 720mL do extrato hidroalcoólico das folhas foram submetidos a um processo de partição líquido-líquido com hexano, rendendo 600mL de extrato hexânico que, após evaporação sob pressão reduzida à 40°C, forneceu 4,92 g de extrato fluido.

No fracionamento com acetato de etila submeteu-se o extrato hidroalcoólico à evaporação sob pressão reduzida à 45°C, para remoção total do etanol. O extrato aquoso resultante foi submetido ao processo de partição líquido-líquido, rendendo 300mL de extrato acetato de etila que, após evaporação sob pressão reduzida à 43°C, forneceu 3,21 g de extrato fluido.

Para a purificação de 1,00 g de extrato fluido acetato de etila, preparou-se uma coluna cromatográfica com sílica gel (0,060-0,200 nm) da Acrôs Organics como fase estacionária, empregando a mistura de eluentes hexano/acetato de etila 20% até a extração da primeira mancha e, em seguida, elevou-se a polaridade da mistura para 30%. A análise por CCD (utilizando placas de vidro preparadas com 30 g do adsorvente sílica gel G da Merck e 60mL de água destilada, com a espessura da camada de 0,3 mm e ativadas em estufa à temperatura de 115 °C por uma hora e reveladas com anisalaldeído sulfúrico) revelou a presença de 5 manchas com mistura. A mancha menos polar foi repurificada em coluna cromatográfica com sistema de eluentes hexano/acetato de etila 20%, fornecendo um composto puro com 0,075 g em massa. Da mancha

proveniente da fração de polaridade intermediária foi removida a clorofila, fornecendo 0,007 g de composto puro. A mancha mais polar após repurificação em coluna cromatográfica com sistema de eluentes 40%, forneceu 0,038 g de composto.

O extrato fluido hexânico foi submetido a um processo de eliminação de clorofilas, fornecendo uma massa de 2,57 g de extrato hexânico aclorofilado. Esse extrato foi purificado em coluna cromatográfica com sistema de eluentes 10%, cuja análise por CCD revelou a presença de 7 manchas, das quais a mancha menos polar (0,030 g) revelou elevado grau de pureza.

Os compostos isolados puros foram submetidos à análise orgânica instrumental de ressonância magnética nuclear de próton (RMN¹H) e ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN¹³C) em aparelhos espectrômetros Brucker AC-300 P e Gemini 300BB e INOVA 500, utilizando 300 e 500 MHz para ¹H e 75,5 para ¹³C, no Instituto de Química da UNICAMP, a fim de elucidar a estrutura química.

O extrato hidroalcoólico do caule da pariparoba foi obtido pelo mesmo procedimento utilizado para as folhas. Posteriormente, este extrato será submetido a testes para avaliação da capacidade antioxidante e, se demonstrar resultados promissores, terá sua composição química avaliada.

4. Resultados

Um dos métodos considerado mais adequado para a análise químico-farmacológica de plantas é a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água), pois, este extrato é análogo às tinturas realizadas na cultura popular e também possibilita a extração de um número maior de compostos (CECHINEL & YUNES, 2001). Como os resultados preliminares dos testes para avaliação da capacidade antioxidante mostraram-se interessantes, iniciou-se o preparo das frações orgânicas das folhas com os solventes hexano e acetato de etila.

O extrato hexânico, ao ser submetido à purificação em coluna cromatográfica, forneceu um composto puro proveniente da mancha menos polar, cujo espectro de ressonância magnética de ¹H, na análise para a determinação da composição química, apresentou deslocamentos químicos em δ 5,35-5,05 mostrando a presença de prótons olefínicos e em δ 2,70-2,10 e 1,60 provenientes de prótons ligados a carbonos saturados CH₂ e CH₃, respectivamente. Já a ressonância magnética nuclear de carbono (RMN¹³C) apresentou sinais relativos a um único composto. Através da análise desses espectros pode-se verificar que o composto pode ser um terpeno com carbonos insaturados.

Para a fração de acetato de etila foram obtidos três compostos, dos quais os dois de menor polaridade estão puros. O espectro de ressonância magnética de ¹H, para o composto de menor polaridade, através dos deslocamentos químicos (δ), revelou a presença de prótons de anel aromático em δ 6,75 e δ 6,66 e prótons olefínicos ligados à heteroátomo em δ 6,70 e prótons olefínicos de dupla terminal em δ 5,03, prótons de metila ligados a duplas ligações em δ 1,59 e 1,52 e prótons de metila ligados a carbonos saturados em δ 1,43 e 1,23, além dos sinais de deslocamentos característicos de carbonos metilênicos. A ressonância magnética nuclear de carbono (RMN¹³C) apresentou sinais relativos a um único composto. Através dos sinais de deslocamentos químicos do Dept (90°) foi possível atribuir os carbonos primários, secundários, terciários e quaternários. Através da análise desses espectros pode-se verificar que o composto de menor polaridade está totalmente puro e apresenta esqueleto de composto fenílico com cadeia lateral altamente insaturada.

No espectro de ressonância magnética de ¹H, para o composto de polaridade intermediária da fração acetato de etila, através dos deslocamentos químicos (δ), foi verificada a presença de prótons de anel aromáticos em δ 6,72 e δ 6,60 e prótons olefínicos em δ 5,22 e prótons ligados a heteroátomo (dioxóis) em δ 5,93 além dos

sinais de deslocamentos característicos de carbonos metilênicos e metínicos. A ressonância magnética nuclear de carbono (RMN¹³C) apresentou sinais relativos a um único composto. Através dos sinais de deslocamentos químicos do Dept (90°) foi possível atribuir os carbonos primários, secundários, terciários e quaternários.

As estruturas desses dois compostos da fração acetato são bem típicas do gênero *Piper regnellii*, e pelo apresentado na literatura tratam-se de compostos inéditos. Estudos bidimensionais de COSY e HETCOR para esses dois compostos analisados estão sendo feitos na tentativa de elucidação total dos mesmos.

Já o composto proveniente da mancha mais polar da fração acetato de etila não foi possível de análise, pois como a quantidade de amostra foi muito pequena a obtenção do espectro de ressonância magnética de ¹H não apresentou boa resolução.

5. Considerações Finais

Nesse trabalho foi preparado o extrato hidroalcoólico das folhas da *Piper regnellii* e este, por apresentar resultados interessantes quando submetido à avaliação da capacidade antioxidante, foi fracionado com solventes orgânicos de diferentes polaridades.

Os extratos fluidos hexânico e acetato de etila, obtidos a partir do extrato hidroalcoólico, foram submetidos à avaliação da capacidade antioxidante e, os que apresentaram resultados promissores, foram purificados mediante as técnicas de separação e identificação dos compostos ativos.

A purificação das frações hexânicas e acetato de etila provenientes do extrato hidroalcoólico das folhas da pariparoba forneceram quatro compostos puros que quando submetidos à análise de ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C tiveram parte da sua estrutura determinada.

Estudos bidimensionais de COSY e HETCOR para os compostos puros provenientes da fração acetato (m1 e m3) estão sendo feitos na tentativa de elucidação total de sua estrutura e serão analisados em novos projetos.

Por problemas encontrados com relação a alguns equipamentos (moinho de martelo), só foi possível a obtenção do extrato hidroalcoólico do caule da pariparoba, cujo fracionamento e análise serão realizados no segundo ano desse projeto.

Referências Bibliográficas

BENEVIDES, P. J.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenilpropanóids and neolignans from piper regnellii. **Phytochemistry**, 52: 339 - 343, 1999.

BERGMAN, M.; VARSHAVSKI, L.; GOTTLIED, H. E.; GROSSMAN, S. The antioxidant activity of aqueous spinach extract: chemical identification of active fractions. **Phytochemistry**. n. 58, p. 143-145, 2001.

CECHINEL, V. F^o.; YUNES, R. A. Estudo químico de plantas medicinais orientado para análise biológica. Obtenção, determinação e modificação estrutural de compostos bioativos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Eds.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Santa Catarina: Argos, p. 48-75,

2001.

DI STASI, L. C. **Triagem farmacológica das plantas medicinais com atividade analgésica.** 1987. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1987.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine.** 2. ed. New York: Oxford University Press, p. 236, 1996.

LARSON, R. The antioxidants of higher plants. **Phytochem.** n.27, p. 969-978, 1988.

PESSINI, G. L.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (miq.) C. DC. Var. *pallescens* (C. DC.) yunck. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica.** 2. ed. v.1. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 389-400, 1975.

SCOTT, I. M.; PUNIANI, E.; JENSEN, H.; LIVESEY, J. F.; POVEDA, L.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; DURST, T.; ARNASON, J. T. Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from *Piper* spp extracts. **J. Agric. Food Chem.** n. 53, p. 1907-1913, 2005.