



15° Congresso de Iniciação Científica

PURIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS DOS EXTRATOS HEXANICOS E ACETATO DE ETILA OBTIDOS PARTIR DOS EXTRATOS HIDROALCOOLICOS DAS FOLHAS E

Autor(es)

BIANCA MARRACCINI CAMPAGNOLO

Orientador(es)

Adriana Mendes Aleixo

Apoio Financeiro

FAPIC

1. Introdução

Durante a respiração celular, espécies reativas de oxigênio formam radicais livres cujos danos induzidos podem afetar muitas moléculas biológicas causando variadas doenças humanas. Antioxidante é qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (BIANCHI & ANTUNES, 1999). A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos e na medicina (BIANCHI & ANTUNES, 1999). 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). No entanto, os novos antioxidantes isolados devem ser estudados quanto ao aspecto toxicológico, concentrações adequadas, assim como atividade individual de cada fitoquímico, com a completa identificação dos componentes isolados e seus extratos brutos. 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 hexânico e acetato de etila obtidos a partir dos extratos hidroalcoólicos das folhas e, principalmente, do caule da pariparoba (*Piper regnellii*), pois é conhecido que extratos pertencentes ao gênero *Piper* 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 (na qual se encontra a espécie *Piper regnellii*) constituem-se como uma ampla fonte de fitoquímicos com extensas atividades biológicas (SCOTT et al., 2005). Seus membros são ricos em substâncias como terpenóides,

fenóis, ésteres fenólicos, éteres e ácidos que são antioxidantes naturais (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 emplastos 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).

2. Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo dar continuidade ao estudo dos extratos hexânico e acetato de etila obtidos a partir do extrato hidroalcoólico do caule da pariparoba (*Piper regnellii*) a fim de obter uma melhor compreensão do mecanismo de ação de antioxidantes. Assim, os extratos do caule que apresentarem tal capacidade serão purificados por cromatografia em coluna para posterior identificação e caracterização da composição química dos compostos ativos, através de análises espectroscópicas de RMN1H e RMN13C.

3. Desenvolvimento

Para a preparação do extrato hidroalcoólico foram utilizados 200,0 g do pó do caule da pariparoba, previamente triturado em moinho de martelo do tipo Wiley, utilizando malha com mesh 100, que foi submetido a um processo de extração dos princípios ativos através da técnica de maceração e percolação com 1500mL de solução etanol/água 70%. Após um período de 69 horas, o conteúdo foi percolado e obteve-se 1025mL de extrato hidroalcoólico do caule. A fim de obter uma separação de substâncias através de suas polaridades, o extrato hidroalcoólico foi submetido a um processo de partição líquido-líquido com hexano, rendendo 1315mL de extrato hexânico que, após evaporação sob pressão reduzida à 50°C em um evaporador rotativo, forneceu 1,73 g de extrato fluido. O extrato hidroalcoólico foi submetido à evaporação sob pressão reduzida à 60°C para remoção total do etanol e o extrato aquoso resultante passou pelo processo de partição líquido-líquido com acetato de etila, rendendo 950mL de extrato que, após evaporação sob pressão reduzida à 55°C, forneceu 7,41 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), empregando a mistura de eluentes hexano/acetato de etila 20%. A análise por CCD (utilizando placas de vidro preparadas com 30 g do adsorvente sílica gel G 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 anisaldeído sulfúrico) utilizando mistura de eluentes 20%, revelou a presença de um primeiro composto impuro, que passou por um processo de repurificação em coluna cromatográfica, utilizando como eluente hexano/acetato de etila 10%, fornecendo 0,110 g do composto C1. A análise por CCD, utilizando como fase móvel hexano/acetato de etila 20%, revelou que o composto ainda apresentava uma pequena quantidade de impureza proveniente, provavelmente, dos solventes utilizados. O composto isolado foi submetido à análise orgânica instrumental de ressonância magnética nuclear de próton (RMN1H) e ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN13C) em aparelhos espectrômetros Bruker 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.

4. Resultados

Para o início da análise químico-farmacológica da pariparoba, preparou-se um extrato hidroalcoólico de seu caule, pois, este possibilita a extração de um número maior de compostos. Como os resultados preliminares dos testes para avaliação da capacidade antioxidante mostraram-se interessantes, iniciou-se o preparo das frações orgânicas do caule com os solventes hexano e acetato de etila. O extrato acetato de etila, ao ser submetido à purificação em coluna cromatográfica, forneceu um composto C1 menos polar. Na análise para a determinação da composição química, através dos deslocamentos químicos (δ) do espectro de ressonância magnética de 1H, do composto C1 da fração acetato de etila, foi verificada a presença de prótons de anel aromáticos em δ 6,75 e δ 6,66 e prótons olefínicos ligados à heteroátomo em δ 6,70, 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 (90o) foi possível atribuir os carbonos primários, secundários, terciários e quaternários. Através da análise desses espectros pode-se verificar que o composto C1 está totalmente puro e apresenta esqueleto fenílico com cadeia lateral altamente insaturada. Esse composto isolado foi o mesmo encontrado na fração acetato de etila das folhas. Essas estruturas encontradas na fração acetato de etila, tanto das folhas quanto do caule, são bem típicas do gênero *Piper regnellii*, e pelo apresentado na literatura tratam-se de compostos inéditos.

5. Considerações Finais

Como, no ano anterior foi contemplado o trabalho com o extrato hidroalcoólico das folhas da pariparoba, nesse trabalho foi preparado o extrato hidroalcoólico do caule e este 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 da fração acetato de etila do caule da pariparoba forneceu um composto que quando submetido à análise de ressonância magnética nuclear ¹H e ¹³C teve parte da sua estrutura determinada. Estudos bidimensionais de COSY e HETCOR estão sendo feitos na tentativa de elucidação total de sua estrutura. Devido à falta de reagentes em quantidade necessária, não foi possível a purificação e análise do extrato hexânico do caule da pariparoba.

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.

BIANCHI, M. de L. P. ; ANTUNES, M. L. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, n. 12, p. 123-130, maio/ago., 1999.

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

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.

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.