

**17º Congresso de Iniciação Científica****PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS E ORGÂNICOS DAS FOLHAS E CAULES
DA PIPER REGNELLI****Autor(es)**

MILENE FRANCISCHINELLI

Orientador(es)

ADRIANA MENDES ALEIXO

Apoio Financeiro

FAPIC/UNIMEP

1. Introdução

Radicais Livres são espécies químicas que podem ocasionar modificações na estrutura molecular o que, conseqüentemente pode levar o organismo a estados patológicos como arterosclerose, hipertensão, doença de Parkinson, nefropatia, artrite inflamatória, diabetes, problemas cardiovasculares, câncer entre outras doenças (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; CIMEN, 2008; SAXENA et al, 2007; JÚNIOR et al, 2005). Os Radicais Livres derivados do oxigênio molecular denominam-se Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e podem reagir com diversas estruturas biológicas causando distintas lesões, inclusive em proteínas, ácido nucléicos, carboidratos e lipídios (FREITAS, 1999).

No caso da oxidação de lipídios, mais exatamente ácidos graxos poliinsaturados ocorre um fenômeno conhecido como Peroxidação Lipídica o que torna a membrana celular um alvo favorável à ação dos Radicais Livres devido à presença de lipídios na sua estrutura (FREITAS, 1999).

Os eritrócitos também conhecidos como hemácias ou glóbulos vermelhos também podem ser lesados com a ação das EROs, pois apresentam 40% de lipídio em sua membrana celular sendo que metade corresponde a ácidos graxos poliinsaturados (CIMEN, 2008). Para combater esses Radicais Livres o nosso organismo possui um sistema de defesa antioxidante que inibe ou atrasa essa oxidação das moléculas.

Quando não há um equilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, ou melhor, há um aumento da quantidade de agentes oxidantes ou deficiência de antioxidantes ocorre um fenômeno denominado de Estresse Oxidativo que nos eritrócitos leva a perda da integridade da membrana devido a alterações na estrutura lipídica e protéica (proteólise) e hemólise. Além disso, pode danificar outros componentes da circulação (CIMEN, 2008).

Dentro desse contexto, os vegetais estão sendo alvo de estudo por apresentarem substâncias que podem agir na defesa contra EROs. Algumas das espécies do gênero *Piper* pertencentes à família Piperaceae demonstram que componentes presentes em seus extratos possuem atividade antioxidante e dentre as espécies do gênero *Piper* foi escolhido a espécie *Piper regnellii* para a realização desse trabalho.

De acordo com Cronquist (1981) esta é uma espécie, conhecida popularmente como caapeba ou pariparoba e está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo. As folhas e raízes são usadas na forma de extratos, infusões ou emplastos para o tratamento de feridas, redução de inchaços e irritações na pele (PESSINI, 2005). Também é utilizada popularmente para problemas hepáticos (FREITAS, 1999).

Além dessas aplicações, pesquisas realizadas demonstram sua atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (PESSINI et al, 2003). A atividade analgésica do seu óleo volátil também já é comprovada (MESQUITA et al, 2005) assim como a atividade antileishmania do extrato obtido das suas folhas (NAKAMURA et al, 2006).

A atividade antioxidante dessa espécie foi estudada por FREITAS (1999) que verificou este efeito entre as folhas, caules e raízes desta planta e foram às folhas que apresentaram a maior atividade contra Peroxidação Lipídica espontânea em homogenato de cérebro de ratos. Neste estudo também foi possível identificar por Cromatografia de Camada Delgada do extrato um dos componentes ativos da espécie, a neolignana conocarpano. Desse modo, esse estudo busca preparar diferentes extratos orgânicos, hidroalcoólicos e acetato de etila, das folhas e caules da *Piper regnellii* a fim de avaliar sua capacidade antioxidante em eritrócitos contra a hemólise advinda do estresse oxidativo.

2. Objetivos

Esse trabalho tem como objetivo preparar os extratos hidroalcoólicos e acetato de etila das folhas e caules da *Piper regnellii*. Purificar e identificar os compostos químicos dos extratos que obtiverem atividade antioxidante em eritrócitos e assim conhecer melhor o mecanismo de ação dos agentes antioxidantes.

3. Desenvolvimento

Para a obtenção dos extratos hidroalcoólicos das folhas e caules de *Piper regnellii* o material vegetal foi seco em estufa com renovação e circulação de ar (Marca: MARCONI®, Modelo: MA 035) na temperatura de 32°C por 91 horas e moído em moinho de martelo (Marca: TECNAL, Modelo: TE 320, 60 ciclos) obtendo-se um rendimento de 196,81g de pó de folha e 166,45g de pó de caule. Para a preparação dos extratos hidroalcoólicos, através da técnica de maceração e percolação, utilizou-se 100,0g do pó e 750 mL de solução etanol/água 70% (v/v). Os pós tanto das folhas quanto dos caules ficaram macerando por um período de 94 e 77 horas, respectivamente, e posteriormente o conteúdo foi percolado com uma vazão de 30 gotas/minuto. Foi obtido 550 mL de extrato hidroalcoólico das folhas e 500 mL de extrato hidroalcoólico de caule. Partimos, então, para a obtenção do extrato acetato de etila após a evaporação do etanol do extrato hidroalcoólico, utilizando para isso um evaporador rotativo (Marca: TECNAL, Modelo: TE-210, 220V) a uma temperatura de 78°C, aplicando o método de Partição líquido-líquido. Obteve-se 450 mL de extrato acetato de etila do caule e 650 mL de extrato acetato de etila das folhas.

O acetato de etila foi evaporado a 73°C em evaporador rotativo (Marca: MARCONI, Modelo: MODTE120, 220V) obtendo-se um extrato oleoso com rendimento de 2,82g do caule e 9,73g das folhas.

A etapa seguinte foi o fracionamento desses extratos acetato de etila com a utilização da técnica de Cromatografia em Coluna (CC). Foram testados três fases móveis, sendo que o melhor resultado foi com hexano/acetato de etila 30%. Para a obtenção dos compostos das folhas foi adicionado à coluna 1,9658g de extrato oleoso e 1,4339g para obter as do caule. Utilizou-se a mesma fase estacionária sílica gel (Marca: Acrós Organics. Silicagel para coluna cromatográfica, 0.060-0.200mm, diâmetro do poro ca.6nm) e mesma fase móvel hexano/acetato de etila 30%, tanto para as folhas quanto para os caules. As amostras coletadas de cada coluna foram monitoradas pela técnica de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando como fase móvel Hexano/ Acetato de Etila 30%. A revelação dessas placas foi feita com anisaldeído sulfúrico e aquecidas a 100°C em manta de aquecimento (Marca: Catel-Chapa, 220V). As frações que apresentaram manchas iguais foram reunidas e o solvente evaporado em evaporador rotativo a 65°C.

Foram obtidas nove frações para o extrato das folhas e três para o extrato dos caules. As massas das frações obtidas do extrato das folhas foram: Fração 2+3= 0,1243g, 5+6= 0,4617g, 10-17= 0,263g, 19-29= 0,1282g, 34-42= 0,1679g, 46-48= 0,0187g, 55-72= 0,023g, 73-192= 0,1648g e a fração Coluna 0,0986g. Com o extrato dos caules obtivemos as seguintes massas para as frações: Fração 1-10= 0,4061g, 28-48= 0,1772g e 49-78= 0,1767g.

Das frações obtidas do extrato das folhas uma delas (5+6) foi purificada através do método de CC com o uso de 300 mL de hexano/acetato de etila a 5% e mais 100mL de solvente a 10%. A massa de fração adicionada foi de 0,4617g e foram coletadas 30 amostras. O monitoramento da coluna foi feito pela técnica de CCD utilizando na fase móvel Hexano/ Acetato de Etila 10% e todas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico e aquecidas a 100°C em manta de aquecimento.

As frações que apresentaram manchas iguais foram reunidas e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a 65°C. Foi feita CCD dessa fração e a massa obtida deste composto foi de 0,349g.

Com o objetivo de comparar se os princípios ativos extraídos pela técnica de Maceração e Percolação / Partição líquido-líquido são os mesmos que os extraídos pelo sistema de Soxhlet resolveu-se empregar também a extração por esse método. O procedimento foi feito com 30g de droga obtida das folhas que foi submetido ao sistema Soxhlet por aproximadamente 30 horas utilizando como solvente

750 mL de acetato de etila. O acetato de etila presente no extrato foi evaporado em um evaporador rotativo a 55°C obtendo-se 4,39g de extrato oleoso das folhas. Foram feitas Cromatografia em Camada Delgada do extrato oleoso obtido utilizando para fase móvel as misturas hexano/acetato de etila a 30% e 50% e diclorometano/metanol a 1%. A técnica de CCD foi realizada e as placas foram secas e reveladas com anisaldeído sulfúrico e aquecidas a 100°C em uma manta de aquecimento.

4. Resultado e Discussão

Com relação aos compostos presentes no extrato das folhas e dos caules verifica-se compostos iguais e uma grande quantidade de compostos distintos.

Na Cromatografia em Coluna das folhas obtivemos nove frações orgânicas. (Figura 1) Escolhemos a fração 5 + 6 para purificar porque apresentou a menor quantidade de compostos e a maior massa entre as frações obtidas, de 0,4617g.

Com a eluição da amostra conseguimos purificar o composto mais apolar presente nesta fração orgânica, pois foi o componente menos atraído pela fase estacionária e, portanto, se deslocou mais facilmente pela fase móvel. (Figura 2)

Na Cromatografia em Coluna dos caules obtivemos três frações orgânicas, sendo que a fração 1 – 10 será a próxima a ser purificada, pois apresenta menos compostos e obtivemos uma massa maior comparando-a com as outras, de 0,4061g. (Figura 3)

As frações que ainda não foram purificadas serão feitas no decorrer do novo projeto aprovado e os compostos orgânicos que obtivermos serão avaliados a fim de identificar suas estruturas químicas o que contribuirá para o reconhecimento de novas moléculas orgânicas e para confirmação de qual delas apresenta ação antioxidante ou se este efeito é advindo de uma ação sinérgica.

Após comparação por CCD com duas fases móveis diferentes (hexano/acetato de etila 30% e diclorometano/metanol 1%) dos extratos das folhas obtidos através das duas metodologias de extração de compostos orgânicos, Sistema Soxhlet (realizada a quente) e Maceração e Percolação/ Partição Líquido-Líquido (realizada a frio), foi possível verificar compostos iguais que foram extraídos por ambas as técnicas, mas também a presença de compostos diferenciados.

5. Considerações Finais

Com relação aos processos extrativos ainda não é possível indicar quais deles extraíram mais compostos ou ainda quais foram os compostos distintos extraídos de cada um deles.

Nesta primeira purificação conseguimos obter nove frações do extrato acetato de etila proveniente das folhas e três frações do extrato acetato de etila do caule e a partir de uma das frações obtida das folhas conseguimos isolar um composto orgânico. No novo projeto aprovado essas frações serão repurificadas por técnicas de cromatografia em coluna e placa preparativa na tentativa de isolar os produtos totalmente puros. A identificação e caracterização do composto isolado e dos demais compostos, que ainda iremos isolar, será realizada juntamente com padrões através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, ou à análise orgânica instrumental de ressonância magnética de próton (RMN1H) e de carbono (RMN13C).

Com relação à atividade antioxidante foi testado somente o extrato hidroalcoólico das folhas que apresentou uma excelente atividade protetora contra a oxidação. O extrato hidroalcoólico do caule, os extratos acetato de etila tanto do caule como das folhas e os compostos isolados destes irão ser testados para que seja confirmada ou não a sua ação sinérgica contra a oxidação em eritrócitos.

Referências Bibliográficas

CIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam v. 390, p. 1-11, 2008.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. In: PESSINI, G. L. et al. Neolignan e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. *var palleescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 3, p. 199-204, jul/set 2005.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan./mar. 1997.

FREITAS, Paulo Chanel Deodato de Freitas. **Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq e *Piper regnellii* (Miq) C. DC.** São Paulo: 1999. 115 p.

JÚNIOR, D. R. A. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 31, jan. / fev. 2005.

MESQUITA, J. M. O. et al. Estudo comparativo dos óleos de algumas espécies de Piperaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 1, p. 6-12, jan./mar. 2005.

NAKAMURA, C. V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) c. DC. var *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 61-66, jan/mar 2006.

PESSINI, G. L. et al. Neolignanas e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 3, p. 199-204, jul/set 2005.

_____. Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, dec. 2003.

SAXENA, R. et al. Antioxidant activity of commonly consumed plant foods of Índia: contribution of their phenolic content. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Inglaterra, v. 58, n. 4, p. 250-260, jun. 2007.

Anexos



Figura 2: Princípio ativo isolado da fração 5+6 das folhas.

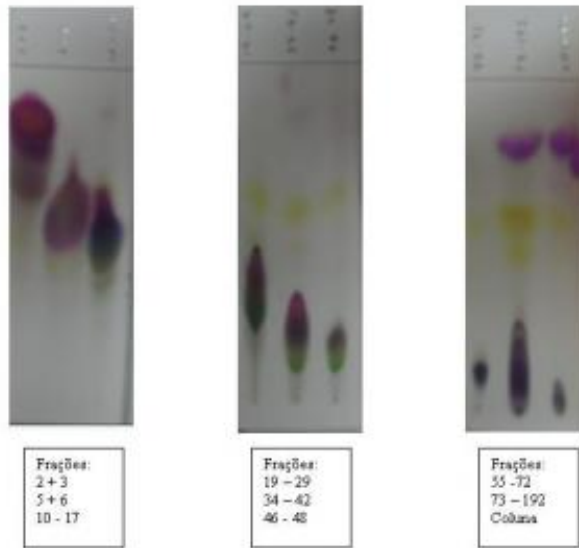


Figura 1 : CCD das frações orgânicas das folhas.

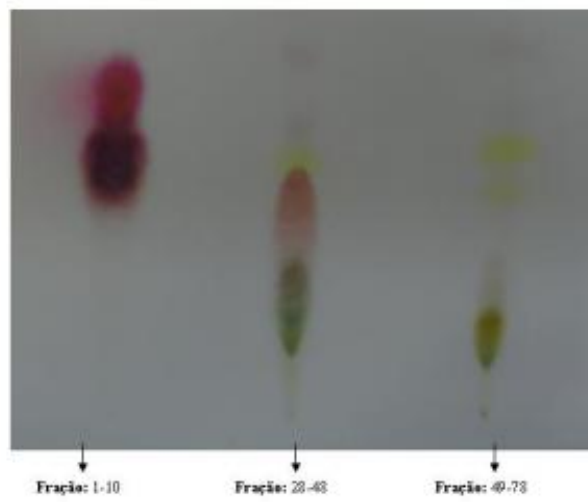


Figura 3 : CCD das frações orgânicas do caule