



18º Congresso de Iniciação Científica

**PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPOSTOS ATIVOS DOS EXTRATOS
ORGÂNICOS ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS E CAULES DA PIPER REGNELLII**

Autor(es)

MILENE FRANCISCHINELLI

Orientador(es)

ADRIANA MENDES ALEIXO

Apoio Financeiro

FAPIC/UNIMEP

1. Introdução

A espécie *Piper regnellii* (Piperaceae) é uma planta arbustiva conhecida popularmente como caapeba ou pariparoba e está distribuída nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (CRONQUIST, 1981 apud PESSINI et al, 2005a). 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 (CORRÊA, 1984 apud PESSINI et al, 2005a). Também é utilizada popularmente para problemas hepáticos (FREITAS, 1999).

Diversos compostos já foram isolados das folhas, caules e raízes dessa planta, principalmente, terpenos, fenilpropanóides e neolignananas. Entre os terpenos os compostos frequentemente encontrados são: β -cariofileno, E-nerolidol, Espatuleno, Germacreno D, β -mirceno, Linalol e Limoneno (CONSTANTIN et al, 2001; MESQUITA et al, 2005; ANDRADE et al, 1998 apud MESQUITA et al, 2005). Três compostos pertencentes ao grupo dos fenilpropanóides foram isolados por Benevides, Sartorelli e Kato (1999): dilapiol, apiol e miristicina. A classe de compostos que apresentam maior atividade terapêutica nesta espécie são as neolignananas eupomatenóide-5, eupomatenóide-6, eupomatenóide-3 e conocarpano (PESSINI et al, 2003, 2005a).

Pesquisas realizadas com os extratos e compostos, principalmente a neolignana eupomatenóide-5, da *Piper regnellii* demonstraram ação antibacteriana, antifúngica, antitripanossomal e antileishmaniose (PESSINI et al, 2003; 2005; NAKAMURA et al, 2006; LUIZE et al, 2006). Percebe-se, então, que esta espécie possui uma gama de compostos com distintas ações terapêuticas o que leva a inclusão de novas moléculas no tratamento de patologias.

Os Radicais Livres são espécies químicas que podem levar o organismo a estados patológicos como arterosclerose, hipertensão, doença de Parkinson, câncer, entre outros (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; ÇIMEN, 2008; SAXENA et al, 2007; ANDRADE JÚNIOR et al, 2005). Substâncias denominadas antioxidantes possuem a função de combater esses radicais livres e, além disso, se ingeridas podem compor nosso sistema antioxidante quando substâncias endógenas com esta função se encontram deficientes no organismo (ÇIMEN, 2008).

O Estresse Oxidativo é um evento que ocorre quando há deficiência de substâncias antioxidantes ou quando há excesso de agentes oxidantes. Os eritrócitos por se encontrarem em um ambiente com grandes concentrações de oxigênio, de ferro e de possuir ácido graxos poliinsaturados em sua membrana celular são alvo do Estresse Oxidativo, pois podem sofrer danos devido a ação desses agentes. Portanto, para inibir ou retardar o efeito desses agentes é necessário a presença de substâncias com esse papel, no caso os antioxidantes (ÇIMEN, 2008).

O gênero *Piper* possui diversas espécies e entre elas existem algumas que apresentam essa ação antioxidante. A mais conhecida é a espécie *Piper umbellata* que revelou ação antiradicaís devido a presença do composto 4-nerolidilcatecol em suas raízes e folhas

(ALMEIDA et al, 2008).

A fim de verificar se a planta *Piper regnellii* possui ação antioxidante contra hemólise induzida por agentes oxidantes foram feitos extratos de suas folhas e caules e a partir dos extratos brutos obtidos empregou-se técnicas específicas em isolar compostos. Esses compostos terão suas estruturas químicas elucidadas e os que indicarem potencial ação poderão ser avaliados quanto sua possível ação antioxidante. Neste momento o interesse é isolar e caracterizar os compostos através das técnicas de Ressonância Magnética Nuclear Unidimensional e Bidimensional para obtenção de suas estruturas químicas.

2. Objetivos

Realizar a purificação das frações orgânicas acetato de etila das folhas e caules de *Piper regnellii* a fim de isolar os compostos presentes nesta espécie para que seja possível avaliar sua ação antioxidante e elucidar as estruturas químicas dos compostos isolados através de análises espectroscópicas de RMN de ¹H e ¹³C, COSY e HETCOR.

3. Desenvolvimento

Para purificar e repurificar as frações orgânicas obtidas do extrato acetato de etila das folhas e caules empregou-se a técnica de Cromatografia em Coluna (CC) utilizando na fase estacionária Sílica Gel - Acrós Organics, 0.060-0.200mm, Ca. 6nm – e na fase móvel Hexano\Acetato de Etila (H/Ac). As amostras coletadas foram monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com placas cromatográficas de 3mm de espessura. Na fase estacionária empregou-se Sílica Gel 60GF254 (Merck) e na fase móvel Hexano\Acetato de Etila. A ativação das placas foi realizada em estufa (Fanem, Modelo 315SE) por 1 hora a 100°C. Após a realização da técnica as placas foram reveladas com anisaldeído sulfúrico e aquecidas a uma temperatura entre 60 e 100°C. Na purificação das frações variou a concentração da fase móvel tanto da CC ([H/Ac]/CC) como da CCD ([H/Ac]/CCD), a massa adicionada (mad) na coluna e o número de amostras coletadas (Acol).

A fração orgânica 2+3 das folhas foi purificada utilizando [H/Ac]/CC=15%, [H/Ac]/CCD= 15%, mad=124,3mg e Acol =12. As amostras reunidas foram as de número 1,2 e 3 e obteve-se uma nova fração. Esta, por sua vez, foi repurificada utilizando [H/Ac]/CC=5%, [H/Ac]/CCD= 15%, mad=50,2mg e Acol =10. As amostras de 2 a 5 foram reunidas e obteve-se o composto “A”. Na purificação da fração 5+6 das folhas utilizou-se [H/Ac]/CC=5% e 10%, [H/Ac]/CCD= 10%, mad=461,7mg e Acol =30 e foi obtido o composto “B”. Na purificação da fração 10-17 foi utilizado [H/Ac]/CC=15%, [H/Ac]/CCD= 15%, mad=263mg e Acol =46. As amostras reunidas foram as de número 7-11, 14-19, 43-46, 1-6\12-13, 20-28 e 29-42. A fração 7-11 foi repurificada utilizando [H/Ac]/CC=10%, [H/Ac]/CCD= 15%, mad=127,3mg e Acol =24. As de número 11 a 17 foram reunidas e obteve-se o composto “C”. A fração 73-192 das folhas foi purificada utilizando [Hex/AcOEt]/CC=30%, [Hex/AcOEt]/CCD= 20%, mad=164,8mg e Acol =12. Foram reunidas as frações de 5 a 12 obtendo-se a amostra “T”. A fração 1-10 do caule foi purificada utilizando [Hex/AcOEt]/CC=5%, [Hex/AcOEt]/CCD= 15%, mad=375,5mg e Acol =18. Das 18 amostras coletadas as de número 2 e 3 foram reunidas e foi isolado o composto “A2”. A fração 1-10 foi repurificada pela segunda vez utilizando-se uma massa de 30,6 mg. Os solventes utilizados para a CC e a CCD foram os mesmos do anterior. O total de amostras coletadas foi 10 e as reunidas foram as de número 2 e 3. Essa amostra recebeu a denominação de “B2”. A fração 28-48 do caule foi purificada utilizando [Hex/AcOEt]/CC=100 mL de H/Ac 10% e 50 mL de Acetato de Etila puro, [Hex/AcOEt]/CCD= 15%, mad=146,6mg e Acol =32. As amostras reunidas foram as de 1-24/29-32 e as de 25 a 28. A fração 1-24/29-32 foi repurificada com Hex/AcOEt 15% e 10 amostras foram coletadas. Na CCD utilizou-se o mesmo solvente do anterior. As amostras 9 e 10 foram reunidas e obteve-se o composto “D2”. A fração 49-78 do caule foi purificada utilizando Hex/AcOEt/CC=15%, [Hex/AcOEt]/CCD= 15%, mad=176,7mg e Acol =48. As amostras de 1 a 42 e de 43 a 48 foram reunidas e denominadas “E2” e “F2”, respectivamente. As amostras “B” e “A2” resultantes da purificação da fração acetato de etila 5+6 das folhas e 1-10 dos caules foram submetidas à análise orgânica instrumental de RMN¹H, RMN¹³C, COSY e HETCOR a fim de elucidar suas estruturas químicas. Todas as análises foram feitas no Instituto de Química da UNICAMP. As técnicas foram realizadas em aparelhos espectrômetros da marca Bruker AC-300 P e Gemini 300BB, respectivamente, utilizando 300 MHz para ¹H e 75,5 MHz para ¹³C.

4. Resultado e Discussão

Os metabólitos secundários encontrados na espécie *Piper regnellii* correspondem aos que já foram isolados do gênero *Piper* que são os terpenos, as neolignanas e seus constituintes os fenilpropanóides. A maior gama de compostos identificados pertencem a classe dos terpenos, principalmente monoterpênicos e sesquiterpênicos presente no óleo volátil extraído das folhas.. Os extratos hidroalcoólicos obtidos no projeto anterior foram testados por Luizetto e Ruggiero (2009) e foi demonstrado que apresentam um efeito protetor significativo contra a hemólise induzida por azoiniciador. A fim de avaliar qual(is) substância(s) é(são) responsável(is) pela ação antioxidante é necessário isolar os compostos presentes da espécie. Das 9 frações das folhas e das 3 dos caules, 7 foram purificadas e

destas 3 foram repurificadas. A Figura 1 e 2 mostra as frações obtidas e suas respectivas massas. Dois compostos foram isolados das frações iniciais, “B” e “A2”, sendo o primeiro constituinte do extrato bruto das folhas e o segundo dos caules. Através dos deslocamentos químicos (δ) do espectro de RMN de ^1H , para o composto B foi verificada a presença de prótons de anel aromáticos em δ 6,29 e δ 5,93, prótons olefínicos de dupla terminal em δ 5,03, prótons de metila ligados a heteroátomos em δ 3,87 e 3,84, além dos sinais de deslocamentos característicos de prótons metilênicos em δ 3,26 e 2,36. A RMN ^{13}C apresentou sinais relativos a um único composto. O espectro de COSY mostrou que as metoxilas estão ligadas ao anel aromático. Os prótons metilênicos da cadeia lateral mostraram correlações com os prótons olefínicos da cadeia e correlação a longa distância com o anel aromático. As correlações do HETCOR mostraram a relação dos prótons e carbonos da estrutura. Através da análise desses espectros pode-se verificar que o composto B está totalmente puro e apresenta esqueleto fenílico com cadeia lateral insaturada característica de compostos fenilpropanóides altamente oxigenados (Figura 3). Esse tipo de esqueleto encontrado na fração acetato das folhas são bem típicas do gênero *Piper regnellii*, e já reportados na literatura para a fração acetato de etila dos caules. Os espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C para a amostra A2 mostrou que a mesma encontra-se como mistura de compostos terpênicos não saturados com baixo peso molecular devendo, portanto, ser repurificada para ser submetida novamente à essas análises, mas como obtivemos uma massa pequena desse composto a repurificação se torna inviável.

5. Considerações Finais

As frações orgânicas 2+3 / 1-3, 10-17 / 7-11 das folhas e 28-48 / (1-24/29-32) dos caules originaram as amostras “A”, “C” e “D2” e provavelmente tratam-se de compostos puros. O composto “A2” demonstrou ser uma mistura de terpenos, mas devido a massa obtida ser pequena uma nova repurificação torna-se inviável. Já o composto “B” das folhas está totalmente puro e trata-se de um composto fenilpropanóide altamente oxigenado. O extrato hidroalcolólico das folhas inicialmente obtido no projeto foi testado por pesquisadores e apresentou uma excelente atividade protetora contra radicais livres, assim como o extrato acetato de etila.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, R. L. et al. Padronização e determinação da fotoestabilidade do extrato de folhas de *Pothomorphe umbellata* L. Miq (pariparoba) e avaliação da inibição in vitro de metaloproteínas 2 e 9 na pele. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 44, n. 1, p.43-50, jan./mar. 2008.

ANDRADE, E. H. et al. Essential oil of *Piper gaudichaudianum* Kunth and *Piper regnellii* (Miq.) C.D.C. In: 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.

ANDRADE JÚNIOR, D. R. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. Jornal Brasileiro de Pneumologia, Brasília, v. 31, n.1, p. 60-68, jan./fev. 2005.

BENEVIDES, P. J. C.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and neolignans from *Piper regnellii*. Phytochemistry, v. 52, p. 339-343, 1999.

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

CONSTANTIN, M. B. et al. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial Activities and Analysis by GC/MS and ^{13}C -NMR. Planta Médica, v. 67, p. 771-773, 2001.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. In: 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. 2005a.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants. In: 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 2005a.

Farmacopéia Brasileira. 4 ed. Atheneu, São Paulo, 1998, Parte I.

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. 1999. 115 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

LUIZE, P. S. et al. Activity of neolignans isolated from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) YUNCK against *Trypanosoma cruzi*. Biological Pharmaceutical Bulletin, v. 29, n. 10, p. 2126-2130, 2006.

LUIZETTO, C. M. B.; RUGGIERO, A. N. Ação do extrato de *Piper regnellii* sobre hemólise induzida por indutores de peroxidação lipídica. Unimep: Anais do 17º Congresso de Iniciação Científica. Piracicaba, nov. 2009.

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. 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, dez. 2003.

PESSINI, G. L. et al. Antifungal activity of the Extracts and Neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. Journal of Brazilian Chemical Society, v. 16, n. 6A, p. 1130-1133, 2005.

PESSINI, G. L. et al. Neolignan 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. 2005a.

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

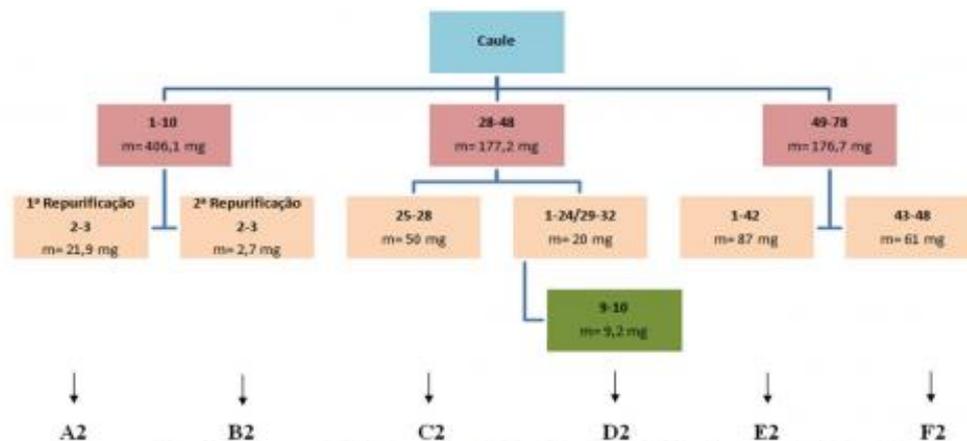


Figura 2: Organograma das Amostras obtidas na Purificação das Frações Orgânicas Acetato de Etila dos Caules de *Piper regnellii*. (m= Corresponde a massa obtida de cada fração).

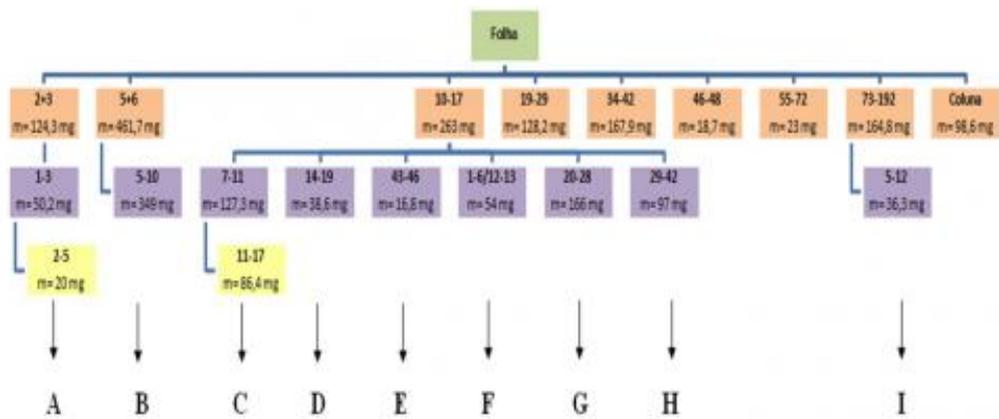


Figura 1: Organograma das Amostras obtidas na Purificação das Frações Orgânicas Acetato de Etila das Folhas da *Piper regnellii*. (m= Corresponde a massa obtida de cada fração).

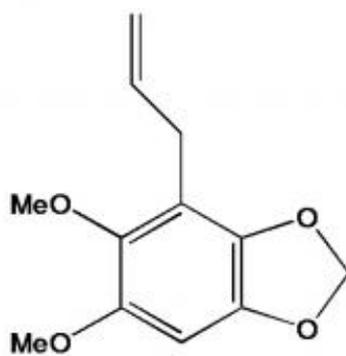


Figura 3: Estrutura do composto "B".