

METABÓLITOS ANTIOXIDANTES DA FRAÇÃO EM ACETATO DE ETILA DE FOLHAS DE *Lippia Origanoides* KUNTH

Larissa Miranda Santos Matos¹; Angélica Maria Lucchese².

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: larissa.matos2@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, email: angelica.lucchese@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: composição química; bioautografia; atividade antioxidante.

INTRODUÇÃO

Com amplo uso na medicina popular, a espécie *Lippia origanoides* é uma planta nativa, que ocorre em alguns estados da região Norte, Nordeste, Centro-oeste e Sudeste, além de outros países da América Latina (SALIMENA, 2014). Estudos realizados sobre a composição química desse vegetal relatam a presença de ácidos fenólicos e flavonoides, os quais podem ser os responsáveis ou podem estar relacionados com o potencial terapêutico dessa e de outras espécies do gênero *Lippia* (AGUIAR, COSTA; 2005). A atividade antioxidante é um exemplo dos vários efeitos benéficos à saúde atribuídos aos compostos fenólicos presentes nas plantas (ABE et al, 2007).

Agentes antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, inibem ou atrasam significativamente os processos oxidativos (VAYA; AVIRAM, 2001). Os radicais livres desempenham várias funções essenciais no organismo, porém, o excesso deles pode ser responsável por uma variedade de efeitos, a exemplo do surgimento de câncer, envelhecimento precoce, entre outras doenças (ALVES et al., 2010).

Nesse contexto, a busca por substâncias de origem natural com atividade antioxidante, vem se intensificando nos últimos anos por ser considerada uma estratégia interessante no desenvolvimento de novos fármacos, e sendo assim, estudos fitoquímicos de análise são de grande importância, em razão ao vasto número de metabólitos secundários que podem ser encontrados nos vegetais (CECHINEL FILHO, 1997). Muitos desses compostos são de importância comercial não apenas na área farmacêutica, mas também nas áreas alimentar, agrônoma, perfumaria e outras (SIMÕES et al., 2007), justificando, dessa maneira, a necessidade de detectar compostos com potencial antioxidante.

A análise da potência das frações e das substâncias puras em relação à sua concentração, torna-se indispensável, pois prediz se o principal componente químico responsável pela atividade biológica foi realmente determinado, ressaltando assim, a importância e necessidade do isolamento de metabólitos dos vegetais. Tendo em vista a necessidade de aumentar o conhecimento sobre esses metabólitos para possíveis testes biológicos, este trabalho teve por objetivo o isolamento biomonitorado de metabólitos presentes na fração em acetato de etila das folhas de *Lippia origanoides*, já que esta foi a fração que apresentou os melhores valores de atividade antioxidante, de acordo com testes previamente realizados.

METODOLOGIA

1. Fracionamento por partição líquido-líquido:

Realizou-se fracionamento do extrato metanólico da folha de *Lippia origanoides* por extração líquido-líquido. Pesou-se 20 g do extrato, o qual foi ressuspenso em 150 mL de

solução hidrometanólica (70%) e extraído através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente, sendo eles, hexano, diclorometano e acetato de etila. O solvente foi removido sob pressão reduzida com auxílio de um evaporador rotativo, sendo os resíduos retirados por evaporação em capela de exaustão. O procedimento foi realizado em três repetições.

2. Fracionamento por cromatografia em coluna:

O fracionamento da amostra em acetato de etila foi realizado através da cromatografia em coluna clássica, utilizando sílica gel (0,060 – 0,200 nm) como fase estacionária.

Inicialmente montou-se um sistema utilizando uma coluna de vidro, a qual foi empacotada com 214 g de sílica suspensa em hexano (coluna 1). Tomou-se uma alíquota de 20,4g da fração em acetato de etila, na qual adicionou-se metanol, até completa solubilização, seguida pelo acréscimo de 20g de sílica para a preparação da pastilha (proporção aproximada de 1:10). O metanol foi removido sob pressão reduzida com auxílio de um evaporador rotativo, sendo possível remover a amostra completamente misturada com a sílica, a qual foi transferida seca para o topo da coluna. Em seguida, adicionou-se os solventes utilizados como fase móvel – hexano, clorofórmio, metanol e água destilada – puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. As frações foram coletadas em balões de 100 mL e concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida, sendo em seguida ressuspensas em metanol para avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD). Realizou-se análise comparativa das frações, e aquelas com perfil cromatográfico semelhante foram reunidas, as quais foram avaliadas por ensaios de atividade antioxidante por bioautografia (Marston, 2011), usando o radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). As cromatoplacas foram também reveladas com o reagente Produtos Naturais-Polietilenoglicol, para detecção de compostos fenólicos.

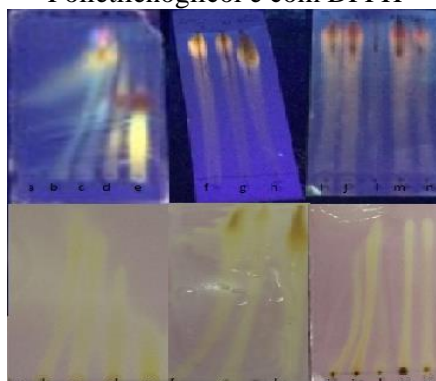
Em seguida, montou-se uma nova coluna utilizando a fração 14-15, a qual foi escolhida, pela fluorescência em CCD, devido a sua polaridade média e peso intermediário (coluna 2). Empacotou-se 72 g de sílica, a qual foi suspensa em clorofórmio. Tomou-se uma alíquota de 2,38 g da fração 14-15(proporção aproximada de 1:30), que foi transferida para um gral de porcelana, juntamente com uma pequena quantidade de sílica, sendo misturadas e transferidas novamente para o topo da coluna. Após isso, adicionou-se os solventes da fase móvel – clorofórmio e metanol – puros ou misturados, em ordem crescente de polaridade. As frações foram coletadas em frascos de aproximadamente 15 mL, onde os resíduos de solvente foram retirados por evaporação em capela de exaustão, sendo em seguida ressuspensas em metanol para avaliação em CCD. Após, realizou-se o mesmo procedimento utilizado na coluna 1.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a preparação das frações pela técnica de extração líquido-líquido, a fração em acetato de etila foi submetida a purificação por cromatografia em coluna. Da fração inicial de acetato de etila foram coletadas 50 sub-frações, as quais foram submetidas à CCD para realização de análise comparativa. Após análise, as frações puderam ser reunidas em 13 grupos: as frações 1-8 (3,02g); 9-10 (0,59g); 11-13 (1,61g); 14-15 (2,38g); 16-18 (6,04g); 19-25 (6,02g); 26-27 (0,88g); 28-31 (1,19g); 32-36 (0,80g); 37-40 (0,49g); 41-47 (0,9g). O volume das frações recolhidas varia em função da quantidade de amostra e do grau de dificuldade da separação (DEGANE; CASS; VEIRA, 1998). Após a reunião das frações, realizou-se nova CCD, a qual foi biomonitorada conforme descrito na metodologia. Com exceção da fração 1-8, todas as demais frações apresentaram reação positiva para os reveladores DPPH e Produtos Naturais-Polietilenoglicol, indicando dessa forma, a presença

de compostos fenólicos, a exemplo dos flavonoides, com potencial antioxidante em quase todas as frações obtidas, como observado na Figura 1.

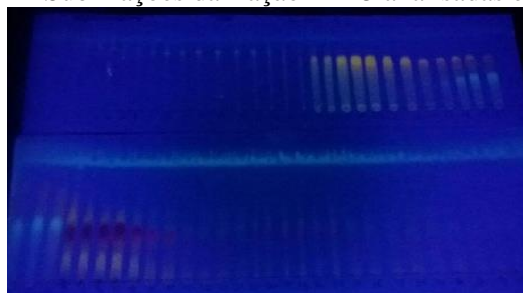
Figura 1 – Placas de sílica das frações reunidas reveladas com Reagente produtos Naturais Polietilenoglicol e com DPPH



Fonte: autora, 2016.

Como a maioria das frações apresentaram potencial antioxidante, a escolha da fração para a continuidade dos testes foi baseada na sua menor polaridade (extraída com os eluentes clorofórmio e metanol nas proporções de 86:14 e 84:16) e peso intermediário. Da sub-fração 14-15 foi possível extrair 101 novas frações, as quais foram também analisadas em CCD para posterior agrupamento das que se comportaram da mesma maneira (Figura 2).

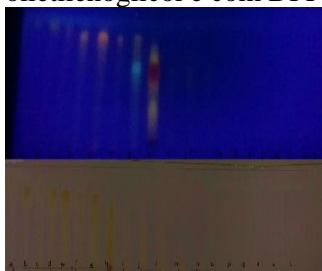
Figura 2 - Sub-frações da fração 14-15 analisadas em CCD.



Fonte: autora, 2016.

As 101 amostras foram reunidas em 19 frações, realizando novamente CCD para avaliação da presença de constituintes antioxidantes. Foram reunidas as frações 01-07; 08-15; 16-18; 19-23; 24-25; 27-30; 31-33; 34-40; 41-44; 45-50; 51-60; 61-68; 69-74; 75-82; 83-88; 89-91; 92-97; 98-101. As frações coletadas após a 61-68 reagiram negativamente aos reveladores, indicando que nessas proporções os constituintes da amostra não apresentam potencial antioxidante.

Figura 3 - Placas de sílica das frações reunidas reveladas com Reagente produtos Naturais-Polietilenoglicol e com DPPH



Fonte: autora, 2016

Foi possível perceber, através da observação da coluna, que uma quantidade de massa relativamente grande, foi extraída quase que totalmente quando o eluente se encontrava na proporção de 88:12 (clorofórmio:metanol), proporção essa que está bem próxima daquela que a sub-fração inicial (14-15) foi extraída da coluna 1. Dessa maneira, muitos constituintes com potencial antioxidante estão concentradas nessa amostra (fração 34-40 da coluna 2), representando uma fração promissora para a continuidade dos experimentos.

CONCLUSÃO

A fração em acetato de etila da folha de *Lippia origanoides* apresenta potencial antioxidante promissor. Através do fracionamento dessa amostra, foi possível perceber que os diferentes constituintes presentes neste vegetal apresentam, em sua maioria, potencial antioxidante, já que as frações extraídas com solventes de diferentes polaridades reagiram positivamente ao DPPH, indicando assim, sua capacidade sequestradora de radicais.

O processo de purificação ainda se encontra em andamento, dessa maneira as análises para identificação, determinação estrutural, e determinação da atividade antioxidante das substâncias isoladas não foram possíveis de serem realizadas. A fração 34-40, extraída na coluna 2, é uma amostra promissora para identificação de possíveis constituintes com capacidade antioxidante, sendo necessário a realização de novo fracionamento em coluna.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T. et al. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 27(2): 394-400, abr./jun. 2007.

AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown (Verbanaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. V. 8, n. 1, p. 79-84, 2005.

ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**. 2010;33(10):2202-10.

CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, vol. 21, n. 1, 1998.

DEGANE, A.L.G.; CASS, Q.B.; VEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química nova na escola**. n. 7. Maio, 1998.

MARSTON, A. Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry. **J. of Chromatography A**, v. 1218, n. 19, p. 2676-2683, 2011.

SALIMENA, F.R.G.; Mulgura, M. *Lippia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB21449>>. Acesso em: 19 de julho de 2016.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2007. p.467-496.

VAYA, J.; AVIRAM, M. Nutritional antioxidants: mechanisms of action, analyses if activities and medical applications. **Curr Med Chem Imm Endoc Metab Agents** 1: 99-117. 2001.