

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro*
DE FRAÇÕES DOS EXTRATOS DICLOROMETANO E ACETATO DE ETILA DE
FOLHAS DE *Hyptis platanifolia*
Dayse Alessandra Almeida Silva¹; Carla Cardeal Mendes².**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dayse.aasilva@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: ccardealmentes@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Hyptis platanifolia*, atividade antioxidante, estudo fitoquímico.

INTRODUÇÃO

Existe uma grande variedade de compostos que podem ser extraídos e caracterizados a partir de plantas (ARAÚJO; LEON, 2001). Sendo assim, a extração, o isolamento e a purificação de novos compostos naturais, especialmente de origem vegetal, é um dos processos mais utilizados atualmente para a obtenção de novos compostos com ação terapêutica (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Nos últimos anos, estudos têm comprovado que o surgimento de patologias crônicas como câncer, diabetes mellitus, hipertensão arterial, Mal de Alzheimer, entre outras, bem como processos inflamatórios e o envelhecimento, estão relacionados ao desequilíbrio estabelecido entre os níveis de radicais livres e das substâncias antioxidantes no organismo, conhecido como estresse oxidativo. Antioxidantes são compostos que retardam ou previnem significativamente a oxidação de lipídios ou de outras moléculas biológicas inibindo a iniciação ou a propagação da reação de oxidação em cadeia, prevenindo ou reparando danos ocasionados às células por espécies reativas de oxigênio (HENSLEY, et al, 2000; OLIVEIRA et al, 2009).

A aplicação terapêutica dos produtos naturais vem aumentando em decorrência da ideia de que são mais seguros do que medicamentos sintéticos pelo fato de serem fontes naturais de substâncias antioxidantes. Diante da necessidade de novos antioxidantes, particularmente naturais, bem como do potencial químico e biológico das espécies vegetais, extratos de uma grande variedade de plantas com importância etnofarmacológica e compostos isolados de fontes vegetais têm sido objeto de estudos de bioprospeção dessa atividade alvo, que podem ser feitos pela avaliação da capacidade de captura de radicais livres, como o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (DAVID et al., 2007; SOUZA et al, 2007).

O gênero *Hyptis* (Lamiaceae), formado por cerca de 400 espécies, é rico em espécies vegetais de grande importância econômica e etnofarmacológica (FALCÃO; MENEZES, 2003). *Hyptis platanifolia*, é uma planta aromática endêmica da região do semi-árido brasileiro. Seus caules e folhas apresentam compostos com atividade antioxidante, conforme o primeiro estudo realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) em presença do radical livre DPPH (PINTO et al, 2009). O fracionamento cromatográfico preliminar do extrato diclorometano de folhas de *H. platanifolia* mostrou ação antioxidante frente ao DPPH de todas as sub-frações obtidas (SILVA et al, 2011).

Dessa forma, a atividade antioxidante e antimicrobiana constatadas nos estudos preliminares dos extratos de folhas de *H. platanifolia* estimularam a continuidade do estudo da atividade biológica e do perfil químico da planta a partir do estudo fitoquímico biomonitorado das frações ativas do extrato diclorometano de folhas, bem como o estudo do extrato acetato de etila de folhas; visando avaliar a evolução da atividade antioxidante e contribuir, futuramente, para o isolamento de novos compostos bioativos. Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar a separação cromatográfica das frações do extrato diclorometano de folhas com atividades biológicas constatadas; a separação cromatográfica preliminar do extrato acetato de etila de folhas, bem como avaliar o perfil químico e as atividades

antioxidante das frações obtidas.

METODOLOGIA

Realizou-se a separação por cromatografia de exclusão em coluna aberta das frações HPFD/1-2, HPFD/4-7, HPFD8-13, HPFD/20-21, HPFD/22-26 do extrato diclorometano de folhas de *H. platanifolia*. Utilizou-se como fase estacionária resina sephadex lipofílica (LH20 100-500g) da Sigma-Aldrich. Para todas as frações, foram utilizados como eluentes hexano:diclorometano (1:4), diclorometano:acetona (3:2), diclorometano:acetona (1:4) e metanol. O fracionamento da fração HPFD 17-19 foi realizado por cromatografia de adsorção em coluna aberta, utilizando-se como fase estacionária gel de sílica 60 (0,04 - 0,063mm) da Merck. As fases móveis utilizadas foram hexano, misturas de hexano:acetona com gradiente de polaridade crescente, acetona, misturas de acetona:metanol com gradiente de polaridade crescente e metanol.

Para o fracionamento cromatográfico do extrato acetato de etila de folhas, foi utilizada a cromatografia por adsorção em coluna filtrante tipo flash, acoplada à uma bomba de vácuo. Como fase estacionária, utilizou-se gel de sílica 60 (0,05-0,2mm) da Vetec. As fases móveis utilizadas foram hexano, diclorometano, acetona e metanol, com misturas de gradiente de polaridade crescente. As frações resultantes foram codificadas como HPFAE e o número correspondente à fração.

Algumas sub-frações obtidas da separação cromatográfica do extrato diclorometano de folhas e as frações obtidas da separação cromatográfica do extrato acetato de etila foram submetidas à triagem fitoquímica por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). As soluções das amostras (5mg/mL) foram aplicadas em placas cromatográficas pré-fabricadas revestidas com uma camada de gel de sílica 60 G e eluídas em fases móveis previamente selecionadas. As placas foram reveladas com luz UV 365 nm e 254 nm e, em seguida, com Reagente de Anisaldeído-Ácido Sulfúrico (AS) para detecção de terpenos e/ou esteroides e Reagente de Produtos Naturais-Polietilenoglicol (NP/PEG) para detecção de flavonoides, conforme metodologia descrita por Wagner e Bladt (1995). Foram feitos controles negativos. Posteriormente, as sub-frações com perfis cromatográficos semelhantes foram reunidas, secas em capela de exaustão e pesadas em balança analítica de precisão.

A avaliação da atividade antioxidante foi baseada no ensaio do DPPH por CCD (Silva, 2005). Algumas sub-frações do extrato diclorometano de folhas e as frações do extrato acetato de etila foram solubilizadas em solvente adequado (5mg/mL). Foram aplicados 20 µL sobre placas cromatográficas de gel de sílica 60 G, obtendo-se, no ponto de aplicação, massa de 0,10mg. Como padrão positivo, utilizou-se 0,7 µL de quercetina (5mg/mL). Para as frações do extrato acetato de etila, o ensaio antioxidante foi realizado somente após a eluição das amostras em cuba cromatográfica. Todas as placas foram reveladas com solução metanólica de DPPH a 0,004%. O surgimento de bandas amarelas, em até 45 minutos, foi considerado resultado positivo para atividade antioxidante. O grau de resposta das amostras ao DPPH foi avaliado em função do tempo de reação em minutos, assim classificado: início da reação < 5 min. (rápido), entre 5-30 min. (intermediário) e > 30 min. (lento) (HUANG et al, 2005).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O critério de seleção das frações do extrato diclorometano para a separação cromatográfica foi baseado na avaliação conjunta dos seguintes parâmetros: atividade antioxidante e/ou atividade antimicrobiana, massa e perfil cromatográfico. A separação por cromatografia de exclusão por tamanho das frações HPFD/1-2, HPFD/4-7, HPFD8-13, HPFD/20-21, HPFD/22-26 do extrato diclorometano de folhas resultaram em 52, 43, 40, 78 e 75 sub-frações, respectivamente. O fracionamento por adsorção em gel de sílica de HPFD/17-19 resultou em 77 frações. As sub-frações obtidas, exceto as de HPFD/17-19, foram

analisadas por CCDC.

Os rendimentos das separações cromatográficas das frações HPFD 8-13, HPFD 17-19, HPFD 20-21, HPFD 22-26, que correspondem a 98,24%, 86,14%, 89,26% e 84,23%, respectivamente, podem ser considerados bastante satisfatórios, uma vez que é comum a perda de cerca de 30% da amostra por adsorção irreversível na fase estacionária, particularmente no caso de amostras de polaridade média a alta. As perdas por adsorção observadas nessas separações foram de 1,76%, 13,86%, 10,74% e 15,77%, respectivamente.

O fracionamento preliminar do extrato acetato de etila resultou em 15 frações, as quais foram submetidas à análise por CCDC. Os cromatogramas foram revelados por irradiação com luz ultravioleta (365nm) para observar o perfil cromatográfico e unir as amostras com perfis semelhantes. A massa utilizada para o fracionamento do extrato acetato de etila foi de 9,1728g e a massa resultante da soma das frações obtidas no fracionamento foi de 8,1899g, indicando um rendimento de 89,28%. Considerando-se a alta polaridade do extrato acetato de etila, bem como da fase estacionária, o rendimento obtido foi bastante satisfatório. De acordo com os perfis cromatográficos observados de todas as sub-frações do extrato diclorometano de folhas, bem como de todas as frações do extrato acetato de etila de folhas, as amostras apresentaram-se quimicamente complexas.

Na triagem fitoquímica a maioria das amostras testadas mostrou reatividade ao reagente AS, sugerindo a presença de esteroides, terpenos e/ou triterpenos. Estes resultados são compatíveis com o estudo químico de *Hyptis platanifolia*, coletada no estado do Ceará, que resultou no isolamento de cinco diterpenos do extrato das raízes, bem como de dois esteroides e dois triterpenos do extrato das partes aéreas (ARAÚJO et al., 2005).

As respostas positivas das sub-frações HPFD 20-21/ 46 – 66 e HPFD 20-21/ 67 – 74, bem como das frações HPFAE 3-6, HPFAE 7-9, HPFAE 10-12, HPFAE 13-15 ao reagente NP/PEG sugerem a presença de flavonoides. Estes resultados são compatíveis com a química do gênero *Hyptis* visto que, segundo uma revisão sobre o gênero *Hyptis* realizada por Falcão e Menezes (2003), as substâncias de origem biossintética mista, como os flavonoides, estão presentes nas plantas desse gênero, mesmo que em menor ocorrência. A detecção de flavonoides nas últimas frações da coluna é esperada, visto que são frações de maior polaridade comparativamente às obtidas inicialmente, e os flavonoides possuem estruturas intrinsecamente polares.

Todas as sub-frações obtidas da separação cromatográfica de HPFD 4-7 e HPFD 22-26 apresentaram resultados negativos frente ao reagente NP/PEG, sugerindo a ausência de flavonoides. Comparando-se os resultados obtidos no trabalho de Silva et al. (2011) com os resultados do presente trabalho, as frações HPFD 4-7 e HPFD 22-26 foram reativas ao NP/PEG, portanto sugerindo a presença de flavonoides, porém não apresentaram o mesmo perfil químico após o fracionamento cromatográfico. Isso pode ser explicado considerando que, com o fracionamento, a concentração de outros compostos pode ter aumentado relativamente à concentração dos flavonoides. Dessa forma, a sensibilidade do método utilizado no ensaio fitoquímico provavelmente não foi suficiente para a detecção destes compostos das sub-frações. No entanto, nas sub-frações de HPFD 20-21, apenas HPFD 20-21/ 46 – 66 e HPFD 20-21/ 67 – 74 foram reativas ao NP/PEG, sugerindo a presença de flavonoides. Esses resultados sugerem que, após o fracionamento, esses compostos químicos foram separados e mantiveram-se apenas nas frações supra-citadas.

Todas as amostras testadas foram reativas frente ao DPPH. Os resultados obtidos de atividade antioxidante mostrou que 100% das amostras testadas apresentaram atividade antioxidante, sugerindo que compostos presentes nessas amostras são doadores de hidrogênio e/ou elétrons, capazes de reduzir o radical DPPH formando 2,2-difenil-1-picril-hidrazina, de coloração amarela. Das amostras testadas, 95,3% apresentaram reações com cinética favorável, ou seja, reagiram com o radical livre DPPH em um tempo menor que 5 minutos.

Esses resultados podem estar relacionados à presença significativa de terpenos e flavonoides nos extratos diclorometano e acetato de etila de folhas de *H. platanifolia*, conforme os resultados obtidos na triagem fitoquímica. Esses resultados estimulam a continuidade do estudo da atividade antioxidante de *H. platanifolia* a partir de métodos quantitativos para confirmar a atividade detectada nos ensaios qualitativos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo preliminar do perfil químico das frações e sub-frações de extratos de folhas de *H. platanifolia*, através da triagem fitoquímica, sugere a predominância de compostos terpênicos, bem como a presença de flavonoides, sendo os resultados compatíveis com os dados reportados na literatura sobre a química do gênero *Hyptis*. As folhas de *H. platanifolia* apresentam atividade antioxidante frente ao DPPH. As frações do extrato acetato de etila e sub-frações do extrato diclorometano de folhas apresentaram um potencial antioxidante, visto que esta atividade foi mantida após os processos de fracionamentos cromatográficos, sendo necessária a confirmação desta atividade por métodos quantitativos. Diante dos resultados obtidos neste trabalho, a espécie *Hyptis platanifolia* pode ser uma fonte promissora de metabólitos ativos. A continuidade do estudo químico e biológico desta planta torna-se importante, uma vez que é uma das representantes de um gênero botânico com relevância etnofarmacológica e econômica. A continuidade do estudo das frações mais ativas de *H. platanifolia*, em futuros trabalhos, poderá aumentar a perspectiva de isolamento de novos compostos antimicrobianos e/ou antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological Activities of *Curcuma longa* L. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.
- ARAÚJO, E. C. C. et al. Abietane diterpenes from *Hyptis platanifolia*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, p. 1336-1341, 2005.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial de novos fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p. 679-688, 2009.
- DAVID, J. P.; et al. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v.78, p. 215-218, 2007.
- FALCÃO, D.Q.; MENEZES, F.S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.84, p. 68-74, 2003.
- HUANG, D.; et al. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v. 53, p.1841-1856, 2005.
- HENSLEY, K. et al. A reactive oxygen species, cell signaling and cell injury. **Free Radical Bio Medicine**, v. 28, p. 1456-1462, 2000.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n.3, p. 689-702, 2009.
- PINTO, R. P. MENDES, C.C. 2009. **Estudo do perfil químico e da atividade biológica de *H. platanifolia***. In: XIII Seminário de Iniciação Científica da UEFS.
- SILVA, A. F. S. 2005. ***Hippeastrum vittatum* (L'Hér) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- SILVA, D. A. A; et al. 2011. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante de frações do extrato hexânico e diclorometano de *Hyptis platanifolia***. In: XV Seminário de Iniciação Científica da UEFS, Feira de Santana.
- SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1995.