

BUSCA POR SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTIRADICALAR EM *Hydrocotyle leucocephala*

Suelen Andrade de Moraes (IC) e Edgard Antonio Ferreira (Orientador)

Apoio: PIBIC Mackenzie

RESUMO

As macrófitas aquáticas, estão divididas por mais de 450 gêneros com aproximadamente 2600 espécies. No entanto, são poucos os relatos sobre a composição química e atividade biológica dos extratos e/ou substâncias isoladas, apesar da grande diversidade de espécies. O gênero *Hydrocotyle* pertence à família Araliaceae que compreende 40 gêneros e cerca de 1500 espécies com ocorrência desde os Estados Unidos até a Argentina e Chile. A medicina popular faz grande uso das espécies do gênero *Hydrocotyle* no tratamento de úlceras de pele, dermatites, reumatismo, tuberculose e eczema. Devido ao grande número de espécies de macrófitas aquáticas e o baixa quantidade de relatos acerca da potencialidade de tais espécies como fonte de substâncias bioativas, este estudo buscou avaliar o potencial do extrato da espécie *Hydrocotyle leucocephala* como fonte de substâncias antirradicalares.

Para isto, o extrato em metanol foi preparado a partir das partes aéreas (folhas e caules) da espécie vegetal e por partição líquido-líquido a partir deste extrato, as fases em hexano, acetato de etila e butanol foram obtidas. As soluções estoques de cada fase orgânica foram preparadas na concentração inicial de 100,0 mg/mL. Então, a partir destas, outras soluções de menores concentrações de cada fase orgânica foram preparadas por diluição nas concentrações de 75,0; 50,0; 25,0; 10,0 e 5,0 mg/mL. A avaliação da atividade antirradicalar foi realizada pela reação entre as soluções preparadas e o radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) em placa cromatográfica de camada delgada.

A fase butanólica foi a mais ativa levando em consideração a substância controle quercetina. Assim, esta fase foi submetida a um fracionamento cromatográfico em sephadex[®], onde a fração 9 quando analisada por Ressonância Magnética Nuclear de ¹H, apresentou sinais característicos de substâncias fenólicas que são conhecidas por sua atividade antirradicalar.

Palavras-chave: Atividade antioxidante; Macrófita aquática; DPPH.

ABSTRACT

The aquatic macrophytes are divided by more than 450 genera with approximately 2600 species. However, there are few reports on the chemical composition and biological activity of extracts and / or isolated substances, despite the great diversity of species. The genus *Hydrocotyle* belongs to the family Araliaceae that comprises 40 genera and about 1500 species occurring from the United States to Argentina and Chile. Folk medicine makes great use of species of the genus *Hydrocotyle* in the treatment of skin ulcers, dermatitis, rheumatism, tuberculosis and eczema. Due to the large number of species of aquatic macrophytes and the low amount of reports about the potential of these species as a source of bioactive substances, this study sought to evaluate the potential of the extract of the species *Hydrocotyle leucocephala* as a source of antiradical substances. For this, the extract in methanol was prepared from the aerial parts (leaves and stems) of the plant species and by liquid-liquid partition from this extract, the phases in hexane, ethyl acetate and butanol were obtained. Stock solutions of each organic phase were prepared at the initial concentration of 100.0 mg / mL. Then, from these, other solutions of lower concentrations of each organic phase were prepared by diluting at concentrations of 75.0; 50.0; 25.0; 10.0 and 5.0 mg / ml. The antiradical activity was evaluated by the reaction between the solutions prepared and the free radical 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) in thin layer chromatographic plates. The butanolic phase was the most active taking into consideration the quercetin as control substance. Thus, this phase was subjected to a chromatographic fractionation in sephadex®, where fraction 9 when analyzed by ¹H Nuclear Magnetic Resonance showed characteristic signals of phenolic substances that are known for their antiradical activity.

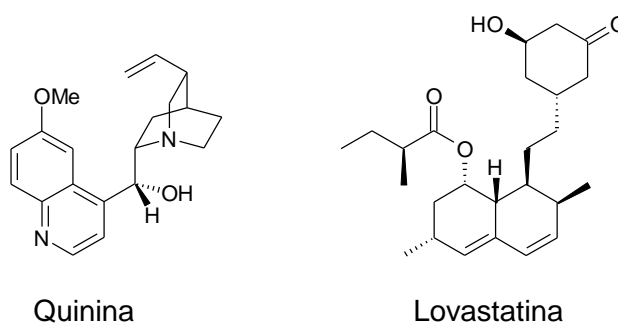
Keywords: Antioxidant activity; aquatic macrophyte, DPPH.

1. INTRODUÇÃO

Há vários relatos de antigas civilizações sobre a utilização de plantas para tratar uma grande diversidade de doenças. Manuscritos deixados por povos na Mesopotâmia por volta de 2600 a.C. relatam o uso de óleos de espécies de *Cedrus*, *Cupressus sempervirens*, *Glycyrrhiza glabra*, espécies de *Commiphora* e *Papaver somniferum* com fins medicinais e após tantos anos estes ainda são usados para o tratamento de tosses, resfriados, inflamações e infecções parasitárias. (CRAGG e NEWMAN, 2013)

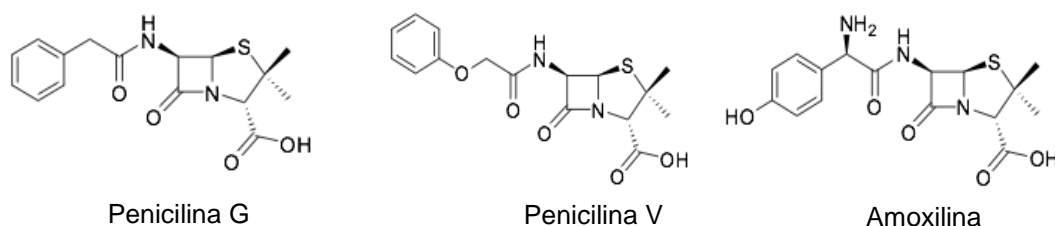
Reconhecidamente os compostos obtidos a partir de fontes naturais são um dos principais métodos para a aquisição de moléculas biologicamente ativas. Entre os muitos compostos utilizados com êxito no que diz respeito às suas propriedades terapêuticas podem ser citados a quinina, obtida a partir da árvore *Cinchona pubescens* utilizada no tratamento da malária (CUNICO et. al., 2008) e a lovastatina, isolada de cultura de fungos *Aspergillus terreus* (Figura 1). (TOBERT, 2003)

Figura 1: Estruturas moleculares da Quinina e da Lovastatina.



Além da utilização para fins terapêuticos, os compostos de origem natural também podem atuar como protótipos para a síntese de novas moléculas biologicamente ativas. Um importante exemplo é a Penicilina G, que foi o primeiro antibiótico da classe das β -lactamas e a partir da observação de que a atividade do composto estava na presença do anel β -lactâmico uma série de outros compostos com atividade antibiótica foram sintetizados mantendo-se a estrutura responsável pela atividade biológica (Figura 2).

Figura 2: Estruturas moleculares dos antibióticos β -lactâmicos Penicilina G, V e Amoxicilina.



2. REFERENCIAL TEÓRICO

As plantas são uma importante fonte de moléculas com as mais diversas funções orgânicas e diversidade estrutural. Além, deste aspecto muitas destas têm um papel central no tratamento ou prevenção de várias doenças tais como diabetes, câncer e distúrbios inflamatórios crônicos (CRAGG e NEWMAN, 2013). Ao longo da história, muitas espécies de plantas foram reconhecidas por ter propriedades medicinais, que fornecem um impacto benéfico na saúde humana. Hoje em dia, muitos relatórios confirmam uma relação positiva entre o consumo de frutas e legumes ricos em compostos fenólicos e a prevenção de doenças relacionadas com o envelhecimento causadas pelo estresse oxidativo.

2.1. Macrófitas aquáticas

As macrófitas aquáticas são conhecidas popularmente como plantas aquáticas. Ao longo de seu processo evolutivo adaptaram-se ao ambiente aquático de forma muito eficiente. Apresentam aproximadamente 2600 espécies espalhadas por mais de 450 gêneros e estão representadas por sete grandes grupos: cianobactérias, clorófitas, rodófitas, xantófitas, briófitas, pteridófitas e espermatófitas (CHAMBERS et al., 2008).

As macrófitas aquáticas apresentam uma grande versatilidade com relação ao seu habitat, assim sete classificações são atribuídas de acordo com suas características adaptativas ao ambiente aquático (ESTEVES, 2011).

- a. Anfíbia: capaz de viver tanto na forma emersa quando imersa;
- b. Emergente: apresenta as raízes no fundo do ambiente aquático, e parte dos caules e folhas estão parcialmente emersos;
- c. Flutuante fixa: as raízes estão no fundo do ambiente aquático, mas os caules e folhas estão flutuando;
- d. Flutuante livre: não apresentam raízes fixas e podem ser levadas pela correnteza;
- e. Submersas fixas: as raízes estão fixas no fundo do ambiente aquático assim como todas as outras partes da planta;
- f. Submersas livres: As raízes não estão fixas no fundo dos lagos ou rios e todas as outras partes da planta também estão submersas;
- g. Epífitas: estão instaladas sobre outras plantas aquáticas.

2.2. Aspectos químicos e biológicos

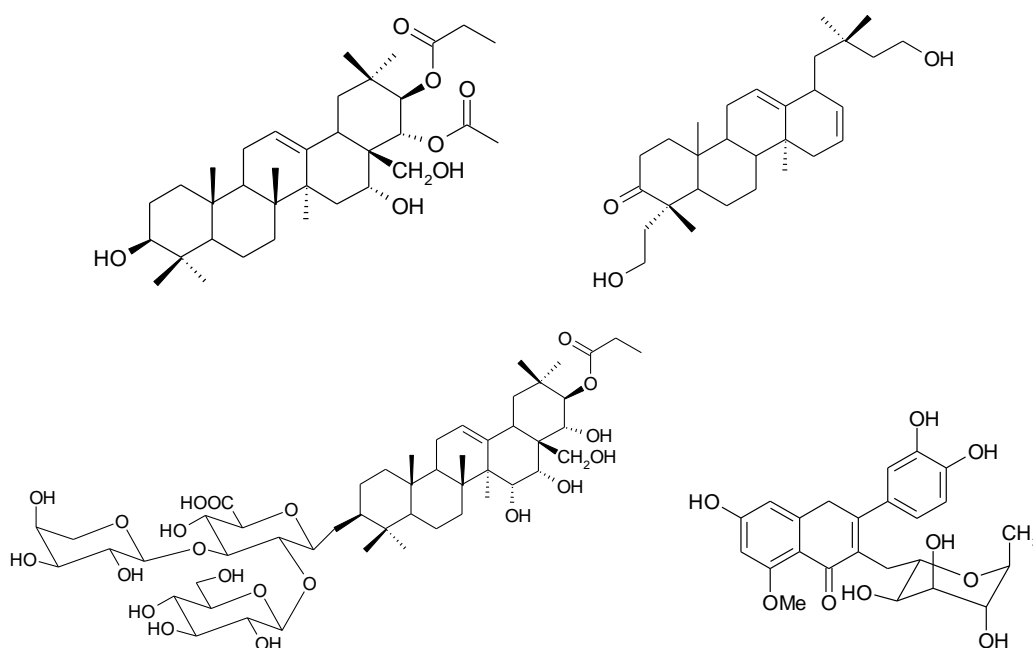
Apesar do grande número de espécies de macrófitas aquáticas, muitos gêneros não apresentam qualquer descrição da composição química ou propriedades biológicas de seus compostos. Assim segue uma breve descrição a respeito do gênero abordado neste projeto.

2.3. Gênero *Hydrocotyle*

O gênero *Hydrocotyle* pertence à família Araliaceae que compreende 40 gêneros e cerca de 1500 espécies com ocorrência desde os Estados Unidos até a Argentina e Chile (SILVA et al., 2010). A medicina popular faz grande uso das espécies do gênero *Hydrocotyle* no tratamento de úlceras de pele, dermatites, reumatismo, tuberculose e eczema (FLORENTINO et al., 2013).

Uma grande diversidade de compostos químicos foi isolada a partir de espécies de *Hydrocotyle*; também a partir do extrato metanólico de *H. ranunculoides* foram isolados triterpenos polioxigenados e glicosilados (GRECA et al., 1993). Estudos realizados com *H. sibthorpioides* e *H. bonariensis* revelaram a presença de saponinas glicosiladas (Figura 3) (MATSUSHITA et al., 2004; HUANG et al., 2008; TABOPDA et al., 2012)

Figura 3: Substâncias isoladas de espécies do gênero *Hydrocotyle*.



No entanto, que diz respeito à atividade biológica dos compostos isolados, estes ainda carecem de avaliação biológica.

A espécie *Hydrocotyle leucocephala* é nativa do Brasil e utilizada mundialmente como planta ornamental para aquários (Figura 4). Na colômbia é utilizada pela medicina popular por suas propriedades diuréticas e no combate de diarreia. (RAMOS et. al., 2006)

Figura 4: Espécie *Hydrocotyle leucocephala*.



Estudos fitoquímicos envolvendo a espécie *Hydrocotyle leucocephala* revelaram a presença de diacetilenos, ceramidas e cerebrosídeos a partir do extrato em metanol (Figura 5). (RAMOS et al., 2006)

Figura 5: Substâncias isoladas de espécies do gênero *Hydrocotyle leucocephala*.

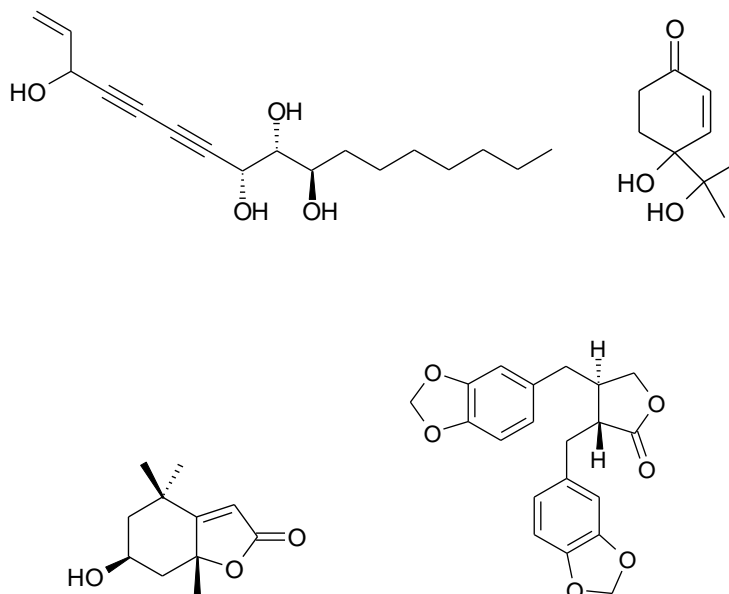
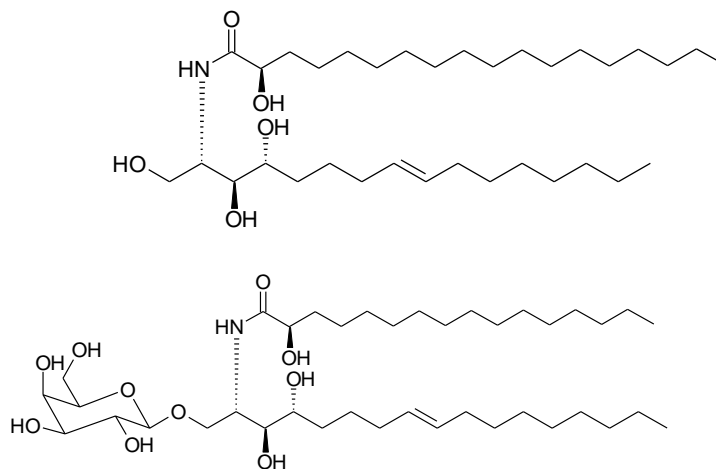


Figura 5: Substâncias isoladas de espécies do gênero *Hydrocotyle leucocephala* (Continuação).



3. METODOLOGIA

3.1. Equipamentos

A moagem das folhas da espécie vegetal foi realizada em liquidificador comercial da marca Walita, modelo RI2094/01/A, 110-220V ~ 60Hz, 600-750W.

A concentração do extrato e fases orgânicas foram realizadas em evaporador rotatório da marca Büchi, modelo R-215, acoplado de controlador de vácuo modelo V-850 e bomba de diafragma modelo V-710.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H foram registrados no espectrômetro Ultrashield 300 Bruker Avance III, operando a 300 MHz ICAQF – UNIFESP, utilizando metanol deuterado (MeOD) como solvente.

3.2. Solventes e reagentes

Para os processos de extrações, eluições cromatográficas foram utilizados solventes de grau PA da marca Labyrinth[®] (metanol, hexano, acetato de etila e butanol).

As análises espectroscópicas de RMN foram preparadas utilizando metanol deuterado (MeOD) da Cambridge Isotops Laboratories[®].

O radical livre utilizado para o ensaio da atividade antirradicalar, 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) da Sigma-Aldrich. Uma solução do radical livre foi preparada em balão volumétrico de 50 mililitros utilizando 19,970 miligramas de DPPH (solução 0,5% em massa) em metanol grau P.A.

3.3. Materiais Cromatográficos

Para as colunas cromatográficas gravitacionais foi utilizado a fase estacionária Sephadex LH-20 (partículas de 25-100 μm – Amersham Pharmacia Biotech).

Para as cromatografias em camada delgada (CCD), foram utilizados como fase estacionária cromatofolhas de sílica gel 60, com indicador de fluoresceína F₂₅₄ sob suporte de alumínio, nas dimensões de 20x20 cm, 0,10 mm de espessura da Merck®.

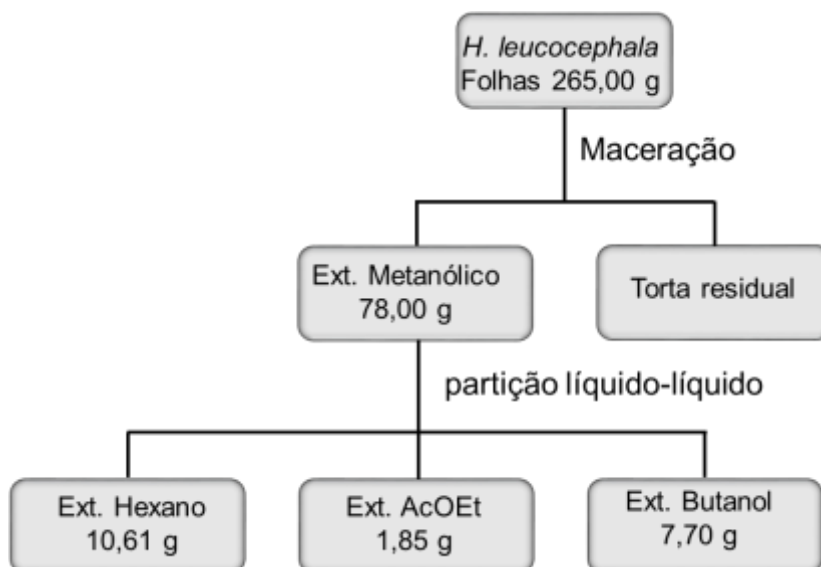
3.4. Métodos

3.5.1. Material vegetal

O material vegetal foi obtido junto a um produtor de plantas aquáticas para aquários e lagos artificiais localizado na cidade Suzano/SP. Uma exsicata foi depositada no herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo sob o registro E.A. Ferreira – 003. A seleção da espécie teve como base o porte da planta para que fosse gerada a maior quantidade biomassa seca necessária ao estudo utilizando a menor quantidade possível de plantas.

3.5.2. Obtenção do extrato bruto e fases de partição

Folhas e caules da espécie vegetal *H. Leucocephala* foram mantidas em estufa a 45°C, por 24h. Após a secagem, o material foi moído em liquidificador comercial fornecendo 265,0 g de material seco e moído. A continuidade do trabalho se deu através da extração exaustiva do material com metanol (13 X 500 mL), gerando um extrato bruto de massa 78,0 g. O extrato metanólico foi ressuscitado em uma solução hidroalcolica de MeOH:H₂O (v/v 1:9) e submetido a partição líquido-líquido com hexano (11 X 300 mL), seguido com acetato de etila (7 X 300 mL) e finalmente butanol (6 x300 mL). Em seguida, os solventes foram evaporados sob pressão reduzida em evaporador rotatório, a 40°C, fornecendo 10,61 g da fase hexânica, 1,85 g da fase em acetato de etila e 7,70 g da fase butanólica (Figura 6).

Figura 6: Fluxograma de obtenção das fases orgânicas a partir do extrato em metanol.

3.5.3. Preparo das soluções de trabalho

As soluções de trabalho foram obtidas pelo preparo de uma solução de 100 mg/mL de cada fase orgânica obtida (hexano, acetato de etila e butanol) em seus respectivos solventes de origem. Soluções de menores concentrações foram obtidas a partir da diluição das soluções estoque (100 mg/mL) em seus respectivos solventes de origem, nas concentrações de 75,0; 50,0; e 10,0 e 5,0 mg/mL.

3.5.4. Ensaio da atividade antirradicalar em placa cromatográfica por aspersão de solução de DPPH

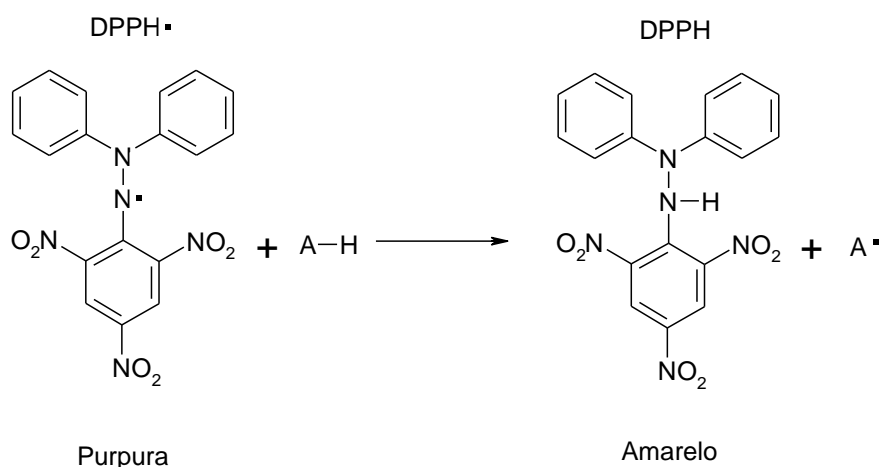
O ensaio da atividade antirradicalar foi realizado a partir das soluções de trabalho de acordo com metodologia descrita por Soler-Rivas e colaboradores (2000).

As soluções foram aplicadas em um volume de 2 μ L em placa cromatográfica de camada delgada (CCD), com auxílio de pipeta automática em forma de *spot* da maior para a menor concentração na mesma fileira, além da substância controle quercetina (5,0 mg/mL), reconhecidamente uma substância com potente ação antirradicalar.

Após volatilização do solvente, a solução do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) de concentração 1,0 mmol/L foi aspergida sobre os *spots*. A solução metanólica de DPPH apresenta coloração púrpura e quando entra em contato com uma substância com atividade antirradicalar ocorre a transferência de um átomo de hidrogênio para o

radical DPPH, transformando se na forma molecular e agora com coloração amarela, indicativo da reação entre substância antirradicalar e radical livre (Figura 7).

Figura 7: Reação entre DPPH• e substância antirradicalar.



3.5.5. Fracionamento cromatográfico da fase butanólica

A fração em butanol (2,0 g) foi submetida a um fracionamento cromatográfico por permeação em gel (Sephadex[®] LH-20) utilizando como eluente metanol, onde os componentes da mistura são separados baseando-se no tamanho da molécula. A eluição foi realizada com metanol e foram coletas 42 frações com 10,0 mL cada. Estas frações foram agrupadas em 9 frações de acordo com a polaridade baseando-se na análise da cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) utilizando como fase móvel uma mistura de metanol e diclorometano (7:3).

As frações foram submetidas a análise de Ressonância Magnética Nuclear de ¹H com o intuito de obter informações estruturais a respeito dos constituintes químicos presentes na fase butanólica.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

4.1. Obtenção dos extratos e fases orgânicas

O processo de maceração exaustiva de 265,0 g das partes aéreas (folhas e caules) da espécie *Hydrocotyle Leucocephala* resultou em uma massa de 78,0 g de extrato bruto.

A partir deste extrato foram obtidas as fases orgânicas em hexano, acetato de etila e butanol por partição líquido-líquido que estão sumarizadas na tabela 1.

Tabela 1: Massas das fases obtidas a partir da partição do extrato bruto metanólico.

Fase	Massa (g)	Relação ao extrato MeOH
Hexano	10,61	13,59 %
Acetato de etila	1,85	2,37 %
Butanol	7,70	9,87 %

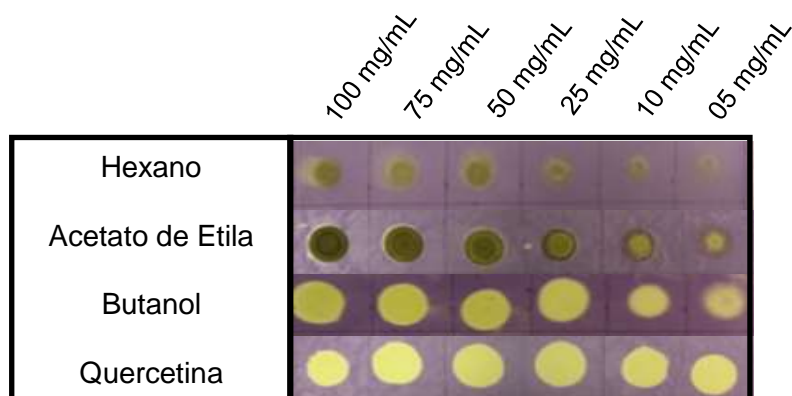
A fase que obteve maior porcentagem em relação a massa do extrato bruto foi a fase em hexano, indicando uma grande quantidade de substâncias apolares, enquanto a menor porcentagem foi referente a fase em acetato de etila com a menor quantidade de substâncias de média polaridade.

A maior parte da massa do extrato bruto metanólico submetido a partição (57,84 g) constitui-se de substâncias de elevada polaridade, como açúcares, permanecendo na solução metanol/água.

4.2. Avaliação da atividade antirradicalar das fases orgânicas de *H. leucocephala*

De posse das fases orgânicas, foram obtidas as soluções estoque e as soluções de trabalho, as quais foram aplicadas na placa cromatográfica (CCD) e aspergidos com a solução de DPPH (Figura 8).

Figura 8: Avaliação da atividade antirradicalar das fases orgânicas da espécie *H. leucocephala*.



Pela observação da placa cromatográfica a fase mais polar em butanol, apresentou a maior atividade antirradicalar, tendo em vista que esta fase apresentou forte coloração amarela para todas as concentrações testadas quando comparado a substância controle quercetina.

4.3. Fracionamento da fase butanólica de *H. Leucocephala*

A partir da observação de que a fase butanólica, apresentou maior atividade frente ao ensaio da atividade antirradicalar optou-se por buscar informações estruturais a respeito dos constituintes químicos presentes nesta fase. Assim, 2,0 g foram submetidos a cromatografia de permeação em gel (Sephadex® LH-20), onde os componentes da mistura são separados baseando-se no tamanho da molécula. A eluição foi realizada com metanol e foram coletadas 42 frações com 10,0 mL cada. Estas frações foram agrupadas em 9 frações de acordo com a polaridade baseando-se na análise da cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) utilizando como fase móvel uma mistura de metanol e diclorometano (7:3) (Tabela 2).

Tabela 2: Frações coletadas e reunidas na coluna de permeação em gel Sephadex LH-20 no extrato em butanol.

Frações	Massa (g)	Frações Reunidas
Fração 1-9	0,09221	1
Fração 10-11	0,10083	2
Fração 12-17	0,25283	3
Fração 18-19	0,04553	4
Fração 20	0,03519	5
Fração 35-36	0,01178	6
Fração 37	0,00325	7
Fração 38-42	0,00906	8
Fração 43-60	0,01000	9

As frações provenientes do fracionamento cromatográfico foram submetidas a análise de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e a partir do espectro de RMN de ^1H da fração **9**, foi observado a presença de sinais entre δ 8,00 e 6,50 ppm característicos de hidrogênios de anel aromático aliados a presença de sinais entre δ 11,20 e 10,00 ppm sugerem a presença de substâncias fenólicas na fase butanólica (Figuras 9 e 10).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As macrófitas aquáticas constituem uma importante parte da flora em termos de quantidade de espécies vegetais. No entanto, o potencial destas espécies como fonte de substâncias bioativas é muito pouco explorado e carece de estudos. O estudo realizado com as fases orgânicas da espécie *H. leucocephala* demonstrou o potencial da espécie diante da avaliação da atividade antirradicalar frente o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A fase em butanol, foi a mais ativa evidenciado pela comparação com a substância controle quercetina e pela possível presença de substâncias fenólicas que apresentam reconhecida atividade antirradicalar.

6. REFERÊNCIAS

- CHAMBERS, P. A., LACOUL, P., MURPHY, K. J., THOMAZ, S. M. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. *Hydrobiologia*, v. 595, p. 9-26, 2008.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1830, 3670-3695, 2013.
- CUNICO, W.; CARVALHO, S.; GOMES, C.; MARQUES, G. Fármacos antimalariais - história e perspectivas. *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, 89 (1): 49-55, 2008.
- ESTEVES, F. A. Fundamentos de limologia. *Ed. Interciência* 3 ed., 790, 2011.
- FLORENTINO, I. F., NASCIMENTO, M. V. M., GALDINO, P. M., BRITO, A. F. D., ROCHA, F. F. D., TONUSSI, C. R., LIMA, T. C. M. D., PAULA, J. R. D., COSTA, E. A. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae (acariçoba) in mice. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 85, 987-997, 2013.
- GRECA, M. D., FIORENTINO, A., MONACO, P., PREVITERA, L. Polyoxygenated oleanane triterpenes from *Hydrocotyle ranunculoides*. *Phytochemistry* 35, 201-204, 1993.
- HUANG, H.-C., LIAW, C.-C., ZHANG, L.-J., HO, H.-U., KUO, L.-M. Y., SHEN, Y.-C., KUO, Y.-H. Triterpenoidal saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Phytochemistry* 69, 1597-1603, 2008.
- MATSUSHITA, A., SASAKI, Y., WARASHINA, T., MIYASE, T., NOGUCHI, H., VANDER VELDE, D. Hydrocotylosides I-VII, New Oleanane Saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. *Journal of Natural Products* 67, 384-388, 2004.

RAMOS, F., TAKAISHI, Y., KAWAZOE, K., OSORIO, C., DUQUE, C., ACUÑA, R., FUJIMOTO, Y., SATO, M., OKAMOTO, M., OSHIKAWA, T., AHMED, S. U. Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebrosides from *Hydrocotyle leucocephala*. *Phytochemistry* **67**, 1143-1150, 2006.

SILVA, C. B., CÂNDIDO, A. C. S., SIMIONATTO, E., FACCENDA, O., SCALON, S. D. P. Q., PERES, M. T. L. P. Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). *Technology Acta Scientiarum* **32**, 413-420, 2010.

TABOPDA, T. K., MITAINE-OFFER, A.-C., MIYAMOTO, T., TANAKA, C., MIRJOLET, J.-F., DUCHAMP, O., NGADJUI, B. T., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* Lam. *Phytochemistry* **73**, 142-147, 2012.

TOBERT, J. A. Lovastatin and beyond: The history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nature Reviews* **2**, 517-526, 2003.

Contatos: suelen.moraes@hotmail.com e edgard.ferreira@mackenzie.br