

ALTERNATIVAS DE PURIFICAÇÃO DO 4-NEROLIDILCATECOL.

SOUSA, Mariana Côrtes de¹; **ASSIS**, Juliana Cipriano de²; **KATO**, Massuo Jorge³
REZENDE, Kênnia Rocha⁴.

Palavras-chave: 4-nerolidilcatecol, *Pothomorphe umbellata*, Sephadex LH20, cromatografia em camada delgada.

1. INTRODUÇÃO

O 4-nerolidilcatecol (4-NRC) é um fenilterpenóide de biossíntese mista presente em raízes e folhas de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq, integrante da família *Piperaceae* (KIJJOA *et al*, 1980). No Brasil, encontram-se apenas duas espécies: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *Pothomorphe peltata* (L.) Miq., denominadas “caaheba” ou “pariparoba-do-sul” e “do norte”, conforme suas localizações. Esta espécie é amplamente empregada em diferentes patologias, com ações antioxidante (superior ao α -tocoferol), fotoprotetora, antimalárica, analgésica, sedativa, antiinflamatória, tranqüilizante, antimicrobiana e citotóxica. Este trabalho visa a otimização do processo de purificação do 4-nerolidilcatecol, empregando cromatografia, para padronização de técnicas preparativas a partir do extrato bruto de folhas e raízes de *P. umbellata*, assim como análises de controle de qualidade da matéria prima vegetal, haja visto seu amplo emprego como fitoterápico. A cromatografia em Sephadex LH20 responde positivamente aos aspectos necessários para um bom fracionamento. Características como pequena porosidade e estabilidade com compostos lipofílicos favorecem o isolamento da molécula de 4-nerolidilcatecol.

2. METODOLOGIA

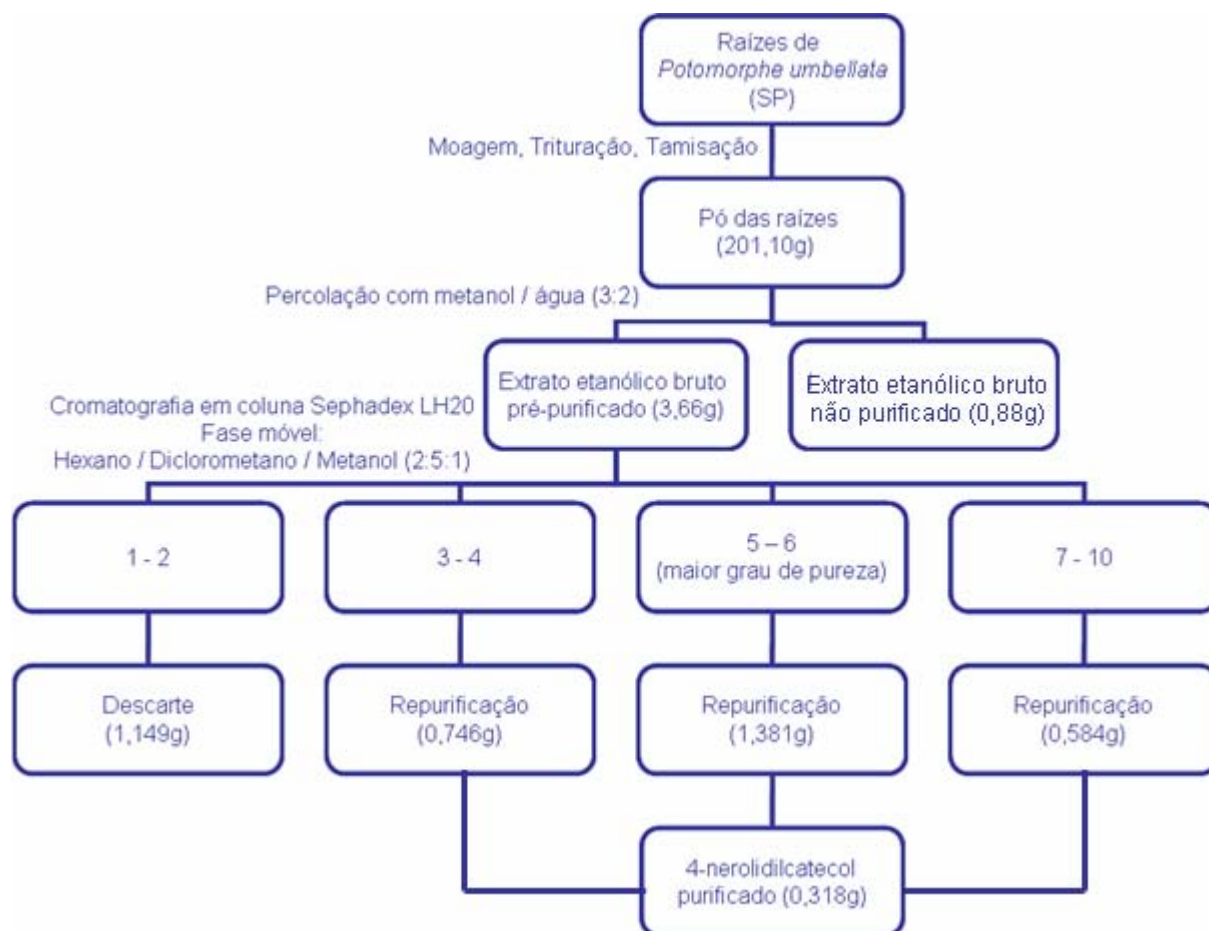
2.1. Obtenção do extrato farmacopéico de São Paulo

As raízes coletadas no dia 02 de março de 2006, na cidade de São Paulo, SP, foram moídas, trituradas e passadas por tamis nº. 20, com massa final de 201,10g de pó das raízes. O pó foi percolado em metanol/água (3:2), até o total esgotamento. Obteve-se o extrato etanólico bruto que foi submetido a rotaevaporação e extraído com clorofórmio (3 a 4 vezes), para total eliminação de água (extrato bruto pré-purificado com 3,66g).

2.2. Condições cromatográficas de purificação

Utilizou-se coluna de vidro (70,0cm x 2,0cm) com gel de exclusão Sephadex LH20 como fase estacionária. A fase móvel utilizada para eluição durante a purificação foi Hexano / Diclorometano / Metanol (2:5:1). Nos intervalos de purificações, a limpeza da coluna cromatográfica foi feita com metanol. O extrato bruto pré-purificado foi aplicado em coluna de Sephadex LH20 e foram obtidas frações de pequeno volume com maior grau de pureza. Os componentes encontrados nas frações da purificação em coluna de Sephadex LH20 foram comparados através de cromatografia em camada delgada (cromatofolhas AL TLC 5x10cm / Sílica gel 60 F₂₅₄ – Merck®). A fase móvel utilizada foi Hexano / Diclorometano / Metanol (2:5:1). As análises cromatográficas comparativas foram realizadas em câmara de UV (λ = 254 e 366nm) e o 4-NRC foi identificado com amostra autêntica, após borrifar o revelador (vanilina-sulfúrica), seguido de aquecimento. Para quantificação de 4-NRC nas frações obtidas através de cromatografia de exclusão, foi utilizado HPLC-UV (modelo ProStar 210, acoplado à Detector UV/Varian® modelo 340), com coluna Phenomenex® Synergi Fusion 4u RP-80A C18 (150mm X 4,6mm) e pré-coluna

Phenomenex® Fusion RP C18 (4,0mm X 3,0mm) com loop de injeção Reodyne® de 20 µL.



2.3. Armazenamento e utilização do 4-nerolidilcatecol purificado

O 4-NRC puro foi obtido a partir da repurificação das frações iniciais do extrato bruto de *Pothomorphe umbellata*. É armazenado em frascos âmbar, sem contato com oxigênio e em baixas temperaturas, evitando degradação. O princípio ativo isolado foi direcionado para pesquisas de toxicidade, formação de complexos de inclusão, análise de metabólitos, dentre outros.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Rendimento do extrato etanólico bruto de raízes de *Pothomorphe umbellata*

Os rendimentos obtidos com as raízes de *P. umbellata* e o extrato bruto purificado até o momento foram significativos. As raízes secas e trituradas (201,10g) foram percoladas, resultando no extrato bruto utilizado até o momento (3,66g). O extrato foi submetido a sucessivas purificações para obtenção de 4-NRC puro (0,318g), apresentando 11,48% de rendimento, o qual é bastante superior aos 3% obtidos em sílica fase normal (dados não publicados).

3.2. Cromatogramas de extrato bruto de Goiânia

O cromatograma obtido da amostra de raízes e folhas de Goiânia é apresentado na figura 1. A análise de pureza das frações purificadas em Sephadex LH20 em relação ao extrato bruto é exemplificada na Figura 2.

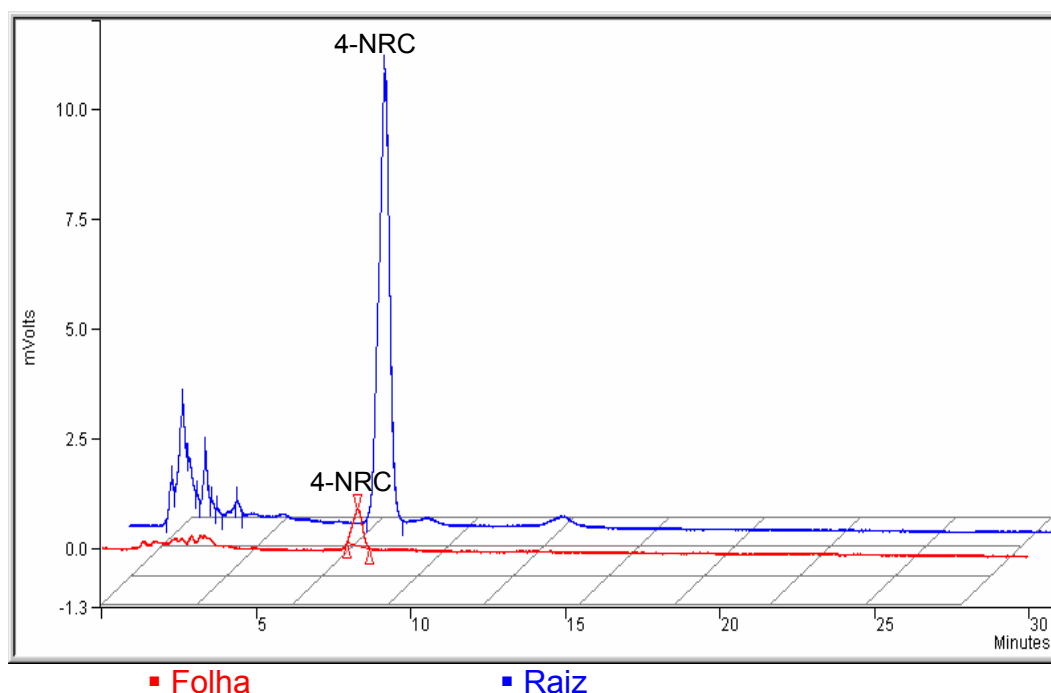


Figura 1. Cromatograma do extrato bruto de folhas e raízes de *Pothomorphe umbellata* – Goiânia – GO (Tempo de Retenção (min) x Amplitude (mV)).

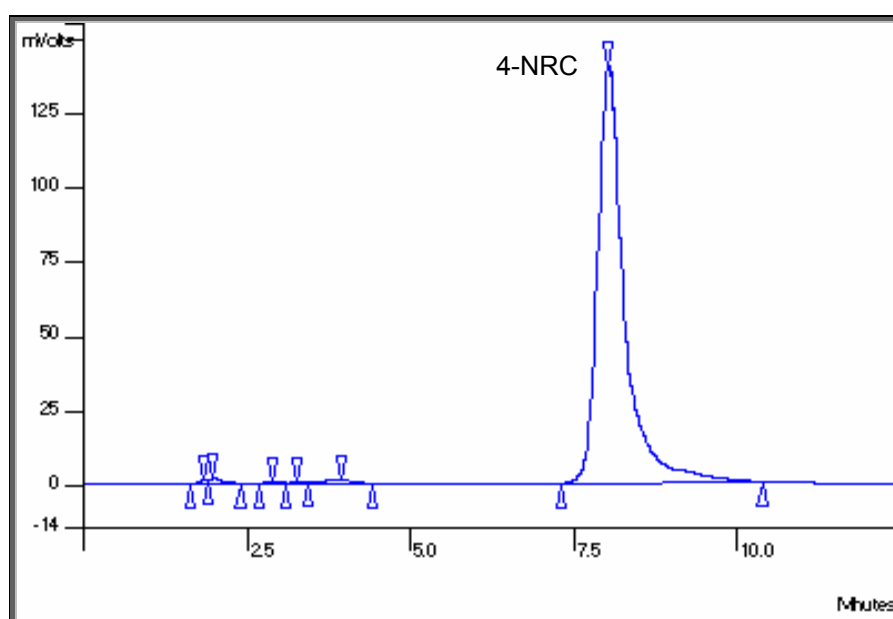


Figura 2. Cromatograma da fração F6 da coluna Sephadex LH20 (XXXII) para análise de pureza (Tempo de Retenção (min) x Amplitude (mV)).

A comparação dos cromatogramas revela a presença do 4-NRC nas amostras do extrato e frações purificadas no tempo de retenção de, aproximadamente, 8,25 minutos (fase móvel MeOH:ACN:TFA-0,1% 62:20:18, fluxo de 1mL/min e $\lambda=282\text{nm}$). Na Figura 2, a amostra analisada foi purificada em Sephadex LH20, com pico significativo de apenas 4-NRC. Na Figura 1, a amostra analisada foi apenas filtrada em membrana de 0,22 μm , apresentando picos expressivos de algumas impurezas mais hidrossolúveis (primeiros picos), retiradas durante a cromatografia

em gel de exclusão. Neste cromatograma destaca-se a baixa diversidade metabólica desta espécie vegetal.

4. CONCLUSÃO

Neste trabalho avaliamos o rendimento dos procedimentos de extração por percolação e purificação do 4-NRC a partir do extrato etanólico a 60% de raízes de *Pothomorphe umbellata*. O rendimento da extração a partir da percolação das raízes moídas foi de 1,8%, rendimento este inferior ao processo de maceração (4,4%) obtidos por Gustafson et al (1992). No entanto, o rendimento da purificação, a partir do extrato etanólico foi de 8,7%, muito superior aos 3,1% conseguido pelo mesmo autor. Tal fato comprova a eficácia do método de purificação empregado (Gustafson, 1992), embora a obtenção do extrato deva ser otimizada. A filtração do extrato bruto em membrana de 0,22µm para pré-purificação melhorou os resultados, obtendo-se frações totalmente puras em um menor período de tempo. Em HPLC, a determinação do grau de pureza do 4-NRC em frações consideradas puras foi superior a 97,0%, reforçando a eficiência dos métodos de purificação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARROS, S. M., TEIXEIRA, D. S., AZNAR, A. E., MOREIRA JR., J. A., ISHII, I., FREITAS, P. C. D., Antioxidant activity of ethanolic extracts of *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq (pariparoba). *Ciênc. Cult.*, v.48, n.1/2, p. 114-117, 1996.

GUSTAFSON, K. R.; CARDELLINA II, J. H.; MCHAHON, J. B.; PANNEL, L. K.; CRAGG, G. M.; BOYD, M. R. The peltatolls, nove HIV – inhibitory catechol derivatives from *P. peltata* (1992). *Jornal of Organic Chemistry*.

SILVA, R. A D. (1926) *Farmacopéia do Estados Unidos do Brasil* – 1ª Ed. São Paulo, Companhia da Editora nacional, p. 649.

Financiamento: CNPQ/SECTEC

¹ Bolsista de iniciação científica. Faculdade de Farmácia – Laboratório de Farmacocinética de Produtos Naturais, nani.cortes@gmail.com

² Estagiária. Faculdade de Farmácia - Laboratório de Farmacocinética de Produtos Naturais, juju_cipriano@hotmail.com

³ Professor colaborador. Instituto de Química – USP-SP majokato@iq.usp.br

⁴ Orientadora/Faculdade de Farmácia/UFG, kennia@gmail.com