

TCC

Curso de Farmácia
Trabalho de Conclusão de Curso
2011

Projeto de Pesquisa

1. Título do Projeto de Pesquisa
Atividade biológica dos extratos de folhas, raízes e de amidas pirrolidínicas isoladas de <i>Piper glabratum</i> Kunth.

2. Caracterização do Problema e Hipótese:

A diversidade da flora brasileira apresenta grande potencial para produção de compostos secundários, no entanto, a pesquisa de substâncias ativas derivadas de plantas no Brasil é ainda insipiente. Mesmo assim o estudo de espécies da família *Piperaceae* teve uma participação importante, porém, pesquisas que visam a elucidação das atividades biológicas de metabólitos secundários como os compostos químicos previamente isolados de espécies de determinado gênero como a de *Piper glabratum* encontra-se defasada. Portanto, busca-se verificar a existência de atividade biológica de extratos de folhas e raízes como também de compostos isolados a partir da espécie *Piper glabratum* Kunth.

3. Revisão de literatura:

A pesquisa com plantas medicinais tem sido de grande importância para o desenvolvimento de novas drogas (MESQUITA, et al. 2005), apesar de ainda ser muito insipiente. Estima-se que até o início da década de 80, menos de 1% das espécies da flora brasileira eram conhecidas em seu aspecto químico e farmacológico, mesmo tendo um aumento desse número nas últimas décadas, esse conhecimento é ainda muito insignificante frente à enorme biodiversidade apresentada pelo país (FAZOLIN, et al, 2007).

A família *Piperaceae* compreende mais de mil espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios, sendo representada por plantas herbáceas, arbustos, e menos frequentemente, árvores (ROCHA NETO *et al.*, 1999^a). Distribuída em oito gêneros (SILVA; BASTOS, 2007) sendo o *Piper* o mais representativo (POTZERNHEIM; BIZZO; VIEIRA, 2006).

Quimicamente espécies de *Piper* tem sido amplamente investigadas como fontes promissoras de metabólitos secundários com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*, anti-leishimania, ansiolítico, anticonvulsivante e anti-inflamatória (BARBOSA-FILHO et al., 2006; NAKAMURA et al., 2006; AMORIM et al., 2007). Investigações fitoquímicas de espécies de *Piper* levaram a identificação de classes típicas de compostos tais como amidas, terpenos, derivados do ácido benzóico, carotenos, hidroquinonas além de lignanas, neolignanas e alguns alcaloides (SILVA ilva et al., 2002; POTZERNHEIM et al., 2006; BARBOSA-FILHO et al., 2008; REGASINI et al., 2008).

Os trabalhos desenvolvidos com o gênero *Piper* no Brasil levaram ao isolamento de compostos dos grupos químicos de amidas, aristolactamas, fenilpropanóides, terpenóides, fenilalcamidas e lignóides (FILHO; SOUZA; MATTOS, 1981; ARAÚJO JUNIOR, 1997; CARDOZO JUNIOR, 1998; CARDOZO JUNIOR, 2003). De acordo com Bezerra (2007) espécies que produzem piperartina (alcaloide/amida) são sugestivas à capacidade de suprimir o crescimento de células leucêmicas como também reduzir sua sobrevivência pela ativação de mecanismos de apoptose e necrose celular .

O histórico do gênero *Piper* descrito por Parmar *et al.* (1997), relatou o uso de espécies para o tratamento de algumas enfermidades em diferentes povos. Tal uso levou- o a apresentar elevado valor comercial e medicinal (BEZERRA et al.,2007). *Piper nigrum* L., conhecida popularmente

como pimenta preta, é a espécie mais conhecida da família e tem uma grande importância econômica (FIGUEIREDO; SAZIMA, 2000).

Outra espécie de relevante valor é a *P. hispidinervum* por apresentar um óleo essencial rico em safrol, muito utilizado nas indústrias de cosméticos e inseticidas (WADT, 2001; BERGO et al., 2005). Recentemente, foi divulgada a atividade larvicida, contra o *Aedes aegypti*, do óleo essencial de quatro espécies de *Piper* da região Amazônica, *P. gaudichaudianum*, *P. permucronatum*, *P. humaytanum* e *P. hostmanianum* (MORAES et al., 2007). *P. falconeri* tem atividade inseticida contra *Musca domestica* e *Aedes aegypti*, (PRASAD, et al. 2005).

Estudos realizados por Parmar et al. (1997) demonstraram que na China, prescrições recomendam o uso das folhas de diversas espécies de *Piper* a *P. futokasura* no tratamento de arritmias cardíacas e da asma. Na Jamaica infusão a partir de *P. anduncum* e *P. hispidum* é utilizada para dores estomacais. No México e no Brasil, utiliza-se *P. amalago* para aliviar dores estomacais e no combate a diversas infecções. Folhas e talos de *P. marginatum* e *P. tuberculatum* são utilizadas contra picadas de cobra e como sedativos (CHAVES et al., 2006; ARAÚJO-JUNIOR et al., 1999). Silva et al. (2007) demonstrou que os extratos das folhas e raízes de *P. aduncum*, apresentaram atividades inseticida sobre *Aetalion SP*, e Cáceres et al. (1995) demonstrou a atividade antigonorreica dos extratos de suas folhas. Os óleos essenciais das folhas dessa espécie apresentaram grandes concentrações do fenilpropanóide dilapiol, o qual foi considerado o responsável pelo efeito inseticida relatado por Maia et al. (1998).

Frutos de espécies de *Piper cubeba* L., são utilizados como especiarias além de ser também utilizada para o tratamento de dores, diarreia, disenterias, gonorréia, enterites e sífilis (EISAI, 1995; SASTROAMIGJOJO, 1997) como também já se comprovou possuir efeito inibitório das proteases do vírus da hepatite C (JANUARIO et al., 2002). Choi and Hwang (2003) demonstraram significativa atividade anti-inflamatória e analgésica de extrato metanólico a partir de frutos de *P. cubeta*.

Conforme Mesquita et al. (2005) o extrato de raízes de *Piper methysticum*, por exemplo, é comercializada na Europa com indicação contra insônia e ansiedade e estudos realizado com o extrato obtido dessa mesma planta apresentaram atividade antifúngica (Locher et al., 1995 sciverse verificar quais fungos)

Piper marginatum, nativa do Brasil, teve atividade antiinflamatória comprovada, *Piper regnelli* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias gram-negativas, gram-positivas e fungos leveduriformes (PESSINI et al. 2003b; NAKAMURA, et al. 2006)., *Piper chaba* é outra

espécie da qual utilizam-se as raízes para o tratamento de estados asmáticos, bronquites, dores abdominais, febre e nas afecções hemorroidais (NAKAMURA, et al.2006).

Pesquisas recentes demonstraram que diferentes extratos e compostos isolados a partir *P.tuberculatum* apresentaram atividade antifúngica (LAGO et al., 2004), antitumoral (BEZERRA et al., 2006), antiagregante plaquetária (FONTENELE et al., 2009), inseticida (POHLIT et. al., 2004) propriedades hipotensivas (DUARTE et al., 2004). Regassini et al.(2009) isolou duas pirrolidinas alcalâmicas das folhas de *P.arboreum* e *P.tuberculatum*, piperilina e 4,5-dihydropiperilina, que apresentaram elevada atividade contra epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

As espécies *Piper glabratum* e *Piper acutifolium* foram analisadas e foram encontrados em sua composição nove novos ácidos benzóicos sendo quatro já conhecidos. (FLORES et al, 2008). In vitro, foi comprovada sua ação anti-parasitária contra promastigotas de *Leishmania spp*, *Trypanosoma cruzi* e *Plasmodium falciparum* (FLORES et al, 2008). E Rahman et al.(1999) testou a atividade de extrato clorofórmio de *P.sarmentosum* frente demonstraram completa inibição de crescimento parasitário contra malária com doses mínimas de 50 mg/ml (RAHMAN et al.,1999).

Estudos realizados por Vieira et al. (2010) levou ao isolamento de duas amidas pirrolidínicas (2'-metoxi-4', 5'-metilenedioxi-*trans*-cinamoilpirrolidina, e 2'-metoxi-4', 5'-metilenedioxi-*cis*-cinamoilpirrolidina) presente em extratos diclorometânico de raízes de *Piper glabratum* Kunth, que por ora ainda não se estudou sua elucidação farmacológica ,portanto busca-se dar continuidade à pesquisa reproduzindo o isolamento dessas mesmas substâncias, para tornar-se possível a realização de testes de atividade biológica com o intuito de desvendar possíveis novas fontes de substâncias que apresentem atividade farmacológicas.

4. Justificativas e Relevância do Estudo:

Apesar da importância do gênero *Piper*, poucas informações foram encontradas sobre espécies de *Piper* nativas do Paraná na literatura especializada sobre química e farmacológica de produtos naturais. Os estudos com *Piper glabratum* Kunth no Brasil, ainda são poucos frente à diversidade e possibilidades químicas e farmacológicas dessa espécie. Espera-se durante o desenvolvimento deste trabalho identificar a atividade farmacológica dos metabolitos secundários produzida pela espécie a fim de aumentar o conhecimento de sua terapêutica e chegar a moléculas de interesse biológico que possam ser exploradas economicamente.

5. Objetivos:

5.1. Objetivo Geral:

Realizar testes de atividades biológicas de extratos, frações e de amida pirrolidinica obtidos a partir de folhas e raízes de *Piper glabratum* Kunth.

5.2. Objetivos Específicos:

Isolar amidas(**2'-metoxi-4', 5'-metilenedioxi-trans-cinamoilpirrolidina**, e **2'-metoxi-4', 5'-metilenedioxi-cis-cinamoilpirrolidina**). dos extratos diclorometânico de raízes de *Piper glabratum* Kunth

Realizar ensaios de atividade biológica de atividade moluscicida de extratos de folhas e raízes de *Piper glabratum* Kunth.

Determinação da atividade biológica da amida isolada

6. Metodologia:

- *Coleta e tratamento do material botânico:*

A coleta da amostra será realizada no AIRE Cabeça do Cachorro PR. Serão coletadas separadamente 1,5kg de folhas e raízes e preparada exsicata, enviada para identificação e denominação no Herbário da Pontifícia Universidade Católica (PUC/PR). E efetuada a secagem e trituração do material das folhas e raízes. (VIEIRA J.A.C., LOPES J.F., CARDOZO JUNIOR, E.L., 2009)

- *Extração e isolamento dos constituintes químicos:*

O extrato será fracionado através de cromatografia em coluna utilizando-se como metodologia o estudo desenvolvido por VIEIRA (2010) onde será utilizado como adsorvente sílica-gel 60 Art. 7733 e como eluentes misturas de Diclorometano, Hexano, Acetato de Etila e Metanol em grau crescente de polaridade. Os solventes empregados serão das marcas Merck[®], Reagen[®] e Vetec[®], purificados quando necessário.

Nas preparações para cromatografia de adsorção em coluna, com finalidade de isolar constituintes químicos, será utilizado como adsorvente sílica-gel 60 Art. 7733 (0,2-0,5 mm) e Art. 7734 (0,063-0,200 mm), e para cromatografia em coluna rápida sob vácuo será usado como adsorvente sílica-gel 60 H Art. 7736, todas da Merck[®].

As placas para cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) nas dimensões de 5x20 cm, 10x20 cm e 20x20 cm, serão preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica-gel (60 GF₂₅₄ Art. 7749 - Merck[®]) em água destilada na proporção de 1:2 (P/V) sobre placas de vidro, mantendo-se uma espessura de 0,25 mm. Após a aplicação serão secas ao ar livre e ativadas em estufa a 110°C por uma hora. As placas para cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) serão confeccionadas de maneira semelhante ao citado anteriormente, mantendo-se a espessura de 1,00 mm.

Para revelação das placas cromatográficas analíticas e preparativas, será utilizada luz ultravioleta com lâmpada de luz UV Chromat UVE (comprimentos de onda de 254-366 nm), e/ou

vapores de iodo. Serão considerados quatro sistemas cromatográficos na determinação da pureza das substâncias isoladas.

- *Avaliação da atividade moluscicida:*

O ensaio moluscicida será realizado utilizando-se de caramujos de tamanho uniforme onde os mesmos serão mergulhados em amostras previamente diluídas em água filtrada do aquário, sem cloro, com o auxílio de DMSO nas concentrações desejadas em temperatura ambiente. Cada caramujo ficará separadamente, em contato com 50 ml dessa solução. Será utilizada uma prova em branco apenas com o DMSO e como controle positivo a niclosamida. Se realizará leituras em 6 e 24 h e após esse tempo observando então a mortalidade dos caramujos.

7. Referências Bibliográficas:

AMORIM, M.F.D. et al. The controvertible role of kava (*Piper methysticum* G. Foster), an anxiolytic herb, on toxic hepatitis. **Rev Bras Farmacogn**, v.17 p.448-454, 2007.

ARAÚJO JÚNIOR, J.X. et al. Piperdardine, a piperidine alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 559-56, 1997.

ARAÚJO-JUNIOR, J.X. et al. Cepharanone B from *Piper tuberculatum*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 325-327,2007.

ARGONDIZO, F. et al. Constituintes químicos de *Piper glabratum* Kunth (Piperaceae). In: **30a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2007

Barbosa-Filho, J.M.et al. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Rev Brasileira Farmacognosia**, v.16,p.109-139,2006.

Barbosa-Filho, J.M. et al. Sources of alpha-, beta-, gamma-, delta- and epsilon-carotenes: A twentieth century review. **Rev Bras Farmacogn**, v.18, p. 135-154, 2008.

Barrett, B. Medicinal plants of Nicaragua's Atlantic Coast. **Economic Botany**, v.481 p.8-20, 1994.

Bergo, C.L., Mendonça H. A., Silva M.R. Efeito da época e frequência de corte de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) no rendimento de óleo essencial. **Acta Amazonica**, v.35(2), p. 111-117, 2005.

CARDOZO JUNIOR, E.L. **Elucidação estrutural de constituintes químicos das raízes de *Piper tuberculatum* JACQ. Var. *Tuberculatum* e *Piper caldense* C. DC. e screening farmacológico do extrato de *Piper caldense* C. DC.** 1998. Tese de Mestrado, João Pessoa.

CARDOZO JUNIOR, E. L.; CHAVES, M. C. O. Caldensis, a New Natural N-Methyl-Aristolactam from *Piper caldense*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 03, p. 216-218, 2003.

Chaves, M.C.O., Oliveira, A.H., Santos, B.V.O. Aristolactams from *Piper marginatum* Jacq. (Piperaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.34 p. 75-77, 2006

FAZOLIN, M. et al. Propriedade inseticida dos óleos essenciais de *Piper hispidinervum* C. DC.; *Piper aduncum* L. e *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum sobre *Tenebrio molitor* L., 1758. **Ciência e agrotecnologia**, vol.31, n.1, p. 113-120, 2007.

FIGUEIREDO, A.;SAZIMA,M. Pollination Biology of Piperaceae Species in Southeastern Brazil . **Annals of Botany**, v. 85, p. 455- 460, 2000.

FILHO, R.B.; DE SOUZA, M.P. & MATTOS, M.E. O. Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 345-346, 1981.

- FLORES, N. et al. **Benzoic Acid Derivatives from *Piper* Species and Their Antiparasitic Activity.** *Journal of Natural Products*, v. 71 (9), p. 1538–1543, 2008.
- JANUARIO, A.H. et al. Antimycobacterial physalins from *Physalis angulata* L. (Solanaceae). *Phytotherapy Research*, v.16, p.445-448, 2002.
- Maia, J.G.S. et al. Constituents of the essential oil of *Piper aduncum* L. growing wild in the amazon region. *Flavour and Fragrance Journal*, v.13(4), p. 269-272, 1998 .
- MORAIS, S.M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from *Piper* species. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35 p. 670-675, 2007.
- MESQUITA, J.M.O. et al. Estudo comparativo dos óleos voláteis de algumas espécies de Piperaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15 (1), p. 6-12, 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*, v. 16, p. 61-66, 2006.
- Navickiene H.M.D.et al. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry*, v.55 p. 621-626, 2000.
- PARMAR, V.S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, v.46(4), p.597-673, 1997.
- ZERRA, P.D. et al. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicol in vitro*, v. 21(1) p. 01-08, 2007.
- POTZERNHEIM, M. C. L.; BIZZO, H.R.; VIEIRA, R.F. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16(2), p. 246-251, 2006.
- PRASAD, A. K. et al. Investigations toward new lead compounds from medicinally important plants. *Pure Appl. Chem*, v. 77, p. 25–40, 2005.
- REGASINI, Luis Octávio et al . Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Rev. bras. farmacognosia*, João Pessoa, v. 19, n. 1b, Mar., 2009.
- Regasini L.O. et al. Radical scavenging capacity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Lat Am J. Pharm*, v. 27, p. 900-903, 2008.
- Rocha Neto O.G.da et al. **Recomendações básicas para o cultivo da pimenta longa(*Piper hispidinervum*) no Estado do Pará.** Belém:Embrapa Amazônia Oriental,dfid.9p.Apostila do Curso de Manejo Fitotécnico de Pimenta Longa ,1999
- SILVA, D.M.N.H., BASTOS,C.N. Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais de Espécies de *Piper* Sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira*, v. 32(2), p. 143-145, 2007.

Silva, W.C., Ribeiro, J.D"Arc, Souza, H.E.M., Corrêa, R.S. Atividade inseticida de *Piper aduncum* L. (Piperaceae) sobre *Aetalion sp.* (Hemiptera: Aetalionidae), praga de importância econômica no Amazonas. **Acta Amazonica**, v.37(2) p. 293-298, 2007.

Silva, R.V. et al. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**; v.59 p. 521-527, 2002.

VIEIRA, J.A.C.; LOPES, J.F.; CARDOZO JUNIOR, E.L. Estudo químico de *Piper glabratum* Kunth nativa do Estado do Paraná. In: 7º Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 2009, Maringá. **Anais do 7º Simpósio Brasileiro de Farmacognosia**. Maringá: UEM, 2009, CD-ROM.

Wadt, L.H. de O. **Estrutura genética de populações naturais de pimenta longa (*Piper hispidinervum* C.DC.), visando seu uso e conservação.** Tese *Doutorado*, Piracicaba: ELSAQ, 5pp, 2001

8. Cronograma (Etapas):	Meses											
	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
Preparo dos extratos	X	X	X									
Obtenção da amida				X								
Identificação dos constituintes químicos				X	X	X						
Testes de atividade biológica							X	X	X	X		
Apresentação de artigo final											X	

9. Recursos Necessários:

9.1 – Recursos Humanos

Auxiliares de Laboratório.

9.2 – Recursos Físicos:

A – Instalações:

- Laboratório de Farmacognosia.

B - Materiais Permanentes:

- Placas de Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck®;
- Cubas;
- Estufa;
- Reveladores;
- Solventes;
- luz ultravioleta (lâmpada de luz UV Chromat UVE) comprimentos de onda de 254-366 nm.
- Colunas de vidro;

C - Materiais de Consumo:

- Sílica Gel 60 GF₂₅₄ Merck®;
- Solventes;
- Reveladores.

Local e data:

Assinatura do Professor Orientador

14. Parecer da Coordenação:

Coordenador

Data: / /