

Avaliação da Capacidade Antioxidante do Extrato de Pariparoba (*Piper Regnelli*)

Autores

Paula Nepomuceno Dedalo

Orientador

Ana Celia Ruggiero

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

1. O processo de envelhecimento está relacionado ao aparecimento de uma série de doenças degenerativas que culminam com a morte do indivíduo decorrente das degenerações celulares que podem em parte, ser causados pela ação de radicais livres nos sistemas biológicos. Os organismos apresentam defesas que limitam a média de danos produzidos por radicais livres a um nível tolerável. A pesquisa por agentes antioxidantes naturais que possam ser utilizados tanto para fins terapêuticos como industriais, tem sido objeto de grande interesse nos últimos anos, como fonte alternativa ao uso de antioxidantes fenólicos sintéticos, para retardar o estresse oxidativo, decorrente do ataque dos radicais livres aos sistemas celulares.

Várias plantas brasileiras utilizadas na medicina popular tem sido alvo de pesquisas e algumas têm demonstrado atividade farmacológica. As folhas e raízes de *Piper regnelli* (Miq) tem sido utilizadas na forma de extratos ou infusões no tratamento de ferimentos, edemas e irritações da pele (PESSINI ET AL, 2003).

Α μαιορια δος εξτρατος δεστας πλαντας εμ εστυδο χοντμ πιταμινασ ιμπορταντες (πιταμινασ E, X, β -χαροτενο) ε χομποστοσ πολιφεν (λιχος, εντρε ελεσ, υμα γρανδε θυαντιδαδε δε φλαπων ιδεσ (ΧΡΟΦΤ 1998).

Os polifenóis são compostos ubíquos ao reino vegetal e estruturalmente têm variações no anel C que caracteriza os diferentes tipos denominados: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavanol e antocianinas.

Muitas funções biológicas, inclusive proteção contra mutação genética, carcinogênese e outras são atribuídas aos efeitos antioxidantes (PIETTA, 2000), portanto, devido a alta concentração de antioxidantes presentes no gênero *Piper* esta espécie foi escolhida para avaliação da atividade antioxidante do extrato hidro-alcoólico obtido das folhas.

2. Objetivos

1. O mecanismo da atividade antioxidante de vários compostos fenólicos é controverso e não está totalmente elucidado, embora há alguns anos várias pesquisas nessa linha tentam estabelecer esse mecanismo. Os compostos fenólicos podem agir como quelantes de íons metálicos, como seqüestradores de radicais pela doação de um hidrogênio ou ainda regenerando o a-tocoferol. Além disso, eles podem também agir como pró-oxidantes, produzindo o estresse oxidativo.

O objetivo específico desse projeto foi avaliar a capacidade antioxidante de extratos hidroalcoólicos de folhas de pariparoba por diferentes metodologias.

3. Desenvolvimento

1. Foram utilizadas folhas de pariparoba da espécie *Piper regnellii* certificadas e doadas pelo prof. Ricardo Ferraz de Oliveira da ESALQ/USP. Utilizou-se o extrato hidroalcoólico. O material empregado foi de máximo grau de pureza, garantindo a confiabilidade dos testes.

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado através do reagente de Folin-Ciocalteu, utilizando-se a curva padrão do ácido gálico como referência.

A peroxidação lipídica induzida por hidroperóxidos em suspensões de eritrócitos, foi avaliada pela técnica de TBARS (substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico), onde os produtos finais da peroxidação reagem com o ácido tiobarbitúrico e formam complexos coloridos determinados a 532 nm. Os testes foram submetidos à ação dos oxidantes cumeno e peróxido de hidrogênio.

A determinação da cinética de redução do radical catiônico de ABTS é a base para uma dos métodos mais sensíveis que tem sido aplicados para a determinação da capacidade antioxidante em diferentes sistemas. Uma solução de ABTS foi preparada na presença de H_2O_2 . A mistura reacional foi incubada por 1h à temperatura ambiente (EREL, 2004). DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DO EXTRATO FORAM ADICIONADAS à SOLUÇÃO E A CINÉTICA DE DESAPARECIMENTO DA ABSORBÂNCIA DO RADICAL FOI DETERMINADA EM 660 NM. UTILIZOU-SE O TROLOX (ANTIOXIDANTE COMERCIAL) PARA EFEITO DE COMPARAÇÃO.

Na análise da capacidade de seqüestrar os radicais hidroxila, capacidade de seqüestrar íons Fe^{III} e atividade pró-oxidante dos extratos, utilizou-se a oxidação da desoxiribose pelo ferro na presença do ascorbato. Pela geração do radical hidroxila e formação de malondialdeído a partir da desoxiribose, que ao reagir com o ácido tiobarbitúrico forma complexos coloridos, avaliou-se a capacidade do extrato em seqüestrar os radicais gerados, espectrofotometricamente a 532 nm. Com essa mesma metodologia, ao se omitir do meio reacional o EDTA pode-se avaliar a capacidade do extrato, de quelar íons ferro. Na ausência de ascorbato pode-se determinar a atividade pró-oxidante dos extratos.

O teste usado para determinar a capacidade de quelar íons ferro do extrato hidroalcoólico da *Piper regnellii* foi baseada no método de Dinis, Madeira e Almeida (1994). Utilizou-se a ferrozina (2,0mM), $FeSO_4$ (1,6 mM) e diferentes concentrações do extrato, manteve-se o conjunto sob agitação e após incubação, determinou-se a absorvância a 562 nm.

A potência redutora da fração hidroalcoólica do extrato de *Piper regnellii* foi determinada de acordo com o método de Oyaizu (1986) com pequenas modificações. Em diferentes concentrações do extrato, foram adicionados tampão fosfato (pH 6,6) e $K_2Fe(CN)_6$ (1%). A mistura foi incubada, e posteriormente adicionou-se TCA 10%. A mistura foi centrifugada e ao sobrenadante, adicionou-se $FeCl_3$ 0,1%. A absorvância foi determinada a 700nm e o aumento na absorvância indica aumento no poder de redução do ferro.

Para avaliar a capacidade de seqüestrar peróxido de hidrogênio, foi preparada uma solução de H_2O_2 (0,002%) em tampão fosfato (pH 6,2). Em diferentes concentrações adicionou-se o extrato e os tubos foram incubados por 10 minutos à 37°C, a seguir adicionou-se vermelho de fenol (sal sódico) e HPRase (Horseradish peroxidase) 0,5M 1. Após Incubação e adição de NaOH (1,0M), agitou-se os tubos e realizou-se a leitura a 576 nm. Este teste foi baseado na metodologia de Ruch, Cheng, e Klauning (1989).

Para avaliar se o extrato seqüestra ânion superóxido, foi utilizado o método de redução do tetrazolium nitroblue (NBT). O ânion superóxido foi gerado à partir do sistema xantina/xantina oxidase e a mistura racional em tampão carbonato (pH 10,5) contendo xantina, EDTA, BSA 15% e NBT, foi adicionada aos extratos. As amostras foram incubadas à 25°C por 10 min, e então foi adicionado a xantina oxidase e HCl

2,0M para breçar a reação. A absorvância foi determinada à 560 nm. A porcentagem de decomposição de superóxido foi calculada comparando-se os resultados obtidos com os extratos com os controles oxidativos.

4. Resultados

Para o extrato hidroalcoólico de Pariparoba, o valor de compostos fenólicos obtidos foi 0,032 mg/mL na concentração de 1,0 mg/mL. Isso corresponde a 3,2% de compostos fenólicos no extrato hidroalcoólico de folhas de Pariparoba;

O extrato não apresentou atividade contra a peroxidação lipídica induzida por hidroperóxido de cumeno. Como o cumeno inicia a peroxidação lipídica na região lipofílica da bicamada lipídica da membrana, ampliando após o ataque inicial o dano oxidativo, os componentes do extrato provavelmente não atuam nessa região da membrana.

Quando a peroxidação lipídica foi induzida pelo hidroperóxido de hidrogênio, que é hidrofílico, facilmente atravessa a membrana iniciando o dano oxidativo pela reação com a hemoglobina e que só depois atinge a bicamada lipídica, observa-se efeito protetor do extrato. Esse efeito é dependente da concentração.

Na decomposição do radical de ABTS, pôde-se observar que a capacidade antioxidante do extrato está também relacionada à concentração de extrato.

Na capacidade de seqüestrar os radicais hidroxila e atividade pró-oxidante, e capacidade de seqüestrar íons Fe_{III} dos extratos, foi observado que na ausência de ascorbato os componentes do extrato podem estar gerando o radical hidroxila, agindo portanto como pró-oxidante. Há um aumento progressivo da absorvância em função da concentração de extrato, comprovando a sua atividade pró-, -oxidante, mesmo em baixas concentrações. Ocorreu também um aumento da formação de TBARS com o aumento da concentração do extrato. Esse é um indicativo de atividade pró-oxidante do extrato e essa atividade pode ser atribuída ao Fe^{3+} que foi reduzido a Fe^{2+} pelos compostos presentes no extrato e isso estimula a formação do radical hidroxila.

Avaliou-se a decomposição da desoxirribose na ausência de EDTA, que é um quelante clássico de ferro, para determinar a capacidade dos componentes do extrato em seqüestrar os íons férricos do meio. Os resultados obtidos mostraram que o extrato de folhas de pariparoba não tem atividade quelante. A capacidade quelante dos extratos foi também avaliada utilizando-se a ferrozina, que é decomposta por de íons férricos. Na presença de substâncias quelantes, a ferrozina não é decomposta pelos íons e não ocorre a sua transformação e conseqüentemente não há aumento na absorvância determinada a 562nm.

Na capacidade de reduzir Fe_{III} a Fe_{II} , foi possível observar que o extrato hidroalcoólico de *Piper regnellii* possui capacidade de reduzir o íon Fe^{3+} a Fe^{2+} e que essa capacidade é dependente da concentração do extrato.

O extrato não apresentou capacidade de seqüestrar peróxido de hidrogênio pois não demonstrou variações nos valores de absorvância das concentrações analisadas em comparação com o controle.

O teste realizado com o extrato de Pariparoba mostrou que ele também não possui a propriedade de seqüestrar o ânion superóxido, pois todos os valores de absorvância obtidos com o extrato foram semelhantes ao obtido na ausência do mesmo.

5. Considerações Finais

O extrato hidroalcoólico de Pariparoba apresenta cerca de 3,0% de compostos fenólicos; não protege contra a peroxidação lipídica induzida por hidroperóxido de cumeno; protege contra a peroxidação lipídica induzida por H₂O₂; na cinética de redução do ABTS apresentou índice de cerca de 30% na concentração de 1mg/mL comparável a 10mM de Trolox; não foi capaz de seqüestrar os radicais hidroxila e ânion superóxido; não apresentou atividade quelante e apresentou atividade redutora. Portanto, o possível mecanismo pelo qual os compostos presentes no extrato de pariparoba atuam como antioxidante é doando hidrogênios ou elétrons para os radicais formados, mecanismo evidenciado pelos resultados observados com a cinética de decomposição do radical estável de ABTS e com a capacidade de reduzir os íons Fe³⁺; e a ação pró-oxidante do extrato pode ocorrer em função de sua baixa capacidade de quelar metais e sua capacidade de doar elétrons (capacidade redutora).

Referências Bibliográficas

CROFT, K.D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. **Annals N.Y. Acad. Sci.**, 1998.

DINIS, T.C.P., MADEIRA, V.M.C., & ALMEIDA, L. M. Action of phenolic derivaes (acetoaminophen, salyeilate and 5-aminosalyeilate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxy radical scavengers, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 315, 161-169, 1994.

EREL, O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clin. Biochem.** 37:277-285, 2004.

OYAIZU, M. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. **Japanese Journal of Nutrition**, 44, 307-315. 1986.

PESSINI, G. L. DIAS FILHO, B.D.; NAKAMURA, C.V.; CORTEZ, D.A.G. ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF EXTRACTS AND NEOLIGNANS FROM *PIPER REGNELLII* (MIQ) C.DC. VAR. *PALLESCENS* (C.DC.) YUNCK. **MEM. INST. OSWALDO CRUZ**, 98:1115-1120, 2003.

PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, 63:1035-1042, 2000.

RUCH, R.J., CHENG, S.J., & KLAUNING, J.E. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea. **Carcinogenesis**, 10, 1003-1008., 1989.