



## 15º Congresso de Iniciação Científica

### **ESTUDO DA AÇÃO DE EXTRATOS DE PARIPAROBA (PIPER REGNELLI) SOBRE O ESTRESSEOXIDATIVO EM CÉLULAS SADIAS E LINHAGENS TUMORAIS**

#### **Autor(es)**

SÉRGIO LUÍS SILVEIRA SFALCIN

#### **Orientador(es)**

Ana Célia Ruggiero

#### **Apoio Financeiro**

FAPIC

#### **1. Introdução**

Nos últimos anos, a pesquisa por agentes antioxidantes naturais tem sido objeto de grande interesse, tanto para fins terapêuticos como na área de tecnologia de alimentos, uma vez que, os antioxidantes fenólicos sintéticos demonstram ser potencialmente carcinogênicos (ITO et al.,1996), ou seja, são capazes de promover dano genético e/ou promover a instabilidade do DNA, impedindo o seu reparo. Desse modo, vários estudos vem evidenciando que dietas ricas em antioxidantes, direta ou indiretamente, reduzem o risco de doenças degenerativas (ASTLEY, 2003). Radicais livres de fontes endógenas ou exógenas são associados à etiologia de várias doenças degenerativas e o consumo de frutas e vegetais está associado com a diminuição do risco dessas doenças, devido à atividade antioxidante das vitaminas e de outros fitoquímicos presentes nesses alimentos. Nesse sentido, extratos de plantas e a sua atividade antioxidante tem sido alvo de inúmeras pesquisas, visando tanto os efeitos benéficos à saúde como a possível utilização na medicina. Os princípios ativos de extratos de uma grande variedade de plantas, tais como sálvia, cacau, aveia, chás, oliva, alho, entre outros, e uma série de plantas de regiões tropicais e sub-tropicais do mundo tem sido alvo de intensas pesquisas com o objetivo de utilização na medicina complementar (Aruoma, 2003). A maioria dos extratos contém vitaminas importantes, além dos compostos polifenólicos e entre eles, uma grande quantidade de flavonóides (Croft 1998). A utilização de plantas medicinais vem cada vez ganhando mais destaque no mundo, e especialmente na América Latina, na qual vem contribuindo significativamente com o cuidado primário à saúde. Nesse sentido, vem obtendo grande destaque nos últimos anos, devido à flora ser rica em plantas medicinais empregadas para um grande número de doenças. No Brasil, várias plantas utilizadas na medicina popular tem sido alvo de pesquisas e algumas têm demonstrado atividade farmacológica, nas quais estão sendo utilizadas na forma de extratos brutos, infusões ou em outras formas farmacêuticas e muitas delas sem qualquer evidência científica da eficácia. Entre vários exemplos,

poderíamos citar algumas plantas da família Piperaceae, as pariparobas (*Pothomorphe umbellata* L. Miq. E *Piper regnellii*) que são amplamente utilizadas na medicina popular na América Latina e na Índia Ocidental. Na agricultura e na medicina, as plantas da família Piperaceae (gêneros *Piper* e *Photomorphe*) constituem-se como uma ampla fonte de fitoquímicos com extensas atividades biológicas, justificando, assim, o grande potencial para essas áreas (SCOTT et al., 2005). Investigações fitoquímicas revelaram o acúmulo de várias classes de produtos naturais com atividade fisiológica como, alcalóides, pironas, lignanas, fenilpropanóides, di-hidro calchonas (ZHANG et al., 1995), terpenóides, fenóis, ésteres fenólicos, éteres, ácidos além de terpenos, esteróides, flavonas e flavononas (BENEVIDES et al., 1999). Muitos deles são antioxidantes naturais que protegem as células vivas da peroxidação, evitando a formação de radicais livres e espécies reativas ao oxigênio (BENEVIDES, 1999). Com o nome de pariparoba e de capeba é conhecido no Brasil uma série de plantas pertencentes ao gênero *Piper* e *Photomorphe*. Está distribuída, em sua grande maioria, em regiões tropicais e subtropicais. O extrato foliar de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*, espécie popularmente utilizada no tratamento da dor, afecções febris e/ou reumáticas, de feridas, inflamações, irritações da pele e apresenta atividade analgésica positiva (DI STASI, 1987 e PESSINI et al., 2003). Muitas funções biológicas, inclusive proteção contra mutação genética, carcinogênese e outras são atribuídas aos efeitos antioxidantes (PIETTA, 2000), portanto, devido à 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

---

Este trabalho teve como objetivo específico avaliar a capacidade antioxidante do extrato acetato de etila de pariparoba, através de diferentes técnicas, buscando caracterizar o mecanismo de atividade antioxidante, visando contribuir para melhorar a compreensão do mecanismo de ação de fitoquímicos utilizados tradicionalmente na medicina popular, tendo como alvo específico plantas medicinais com ação antioxidante.

## 3. Desenvolvimento

---

As folhas de pariparoba da espécie *Piper regnellii* utilizadas no projeto foram doadas e certificadas pelo prof. Ricardo Ferraz de Oliveira da ESALQ/USP. Já as drogas que utilizadas eram das marcas Sigma e similares, bem como os reagentes provenientes da Merk. Desse modo, podemos garantir o máximo grau de pureza e a confiabilidade dos testes. Todos os valores apresentados representam a média e o desvio padrão, de pelo menos 3 experimentos em duplicata (n=6). O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado através do reativo de Folin-Ciocalteu e utilizando como referência o Ácido Gálico. A partir da elaboração da curva padrão e da utilização da regressão linear da absorbância em função da concentração do padrão, calcula-se a quantidade de compostos fenólicos presentes no extrato de acetato de etila da pariparoba. A quantidade de flavonóides totais foi determinada por meio da fixação com o cloreto de alumínio, utilizando como referência a rutina e a quercetina. A capacidade de doar hidrogênio para radicais estáveis foi avaliada por meio da cinética de decomposição do DPPH (2,2-difenilpicrilhidrazil). Esta técnica consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre DPPH. Por ação de um antioxidante, o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da Absorbância. Já a capacidade de doar elétrons foi medida através da redução direta do  $Fe^{3+}(CN)_6$  a  $Fe^{2+}(CN)_6$  e foi determinada pela Absorbância. A baixa absorbância indica atividade seqüestrante de radicais livres. Avaliou-se ainda a capacidade do extrato de quelar íons ferro, esta técnica é baseada na medida da absorbância do complexo ferro II – ferrozina após o tratamento de uma solução de ferro II como o material a ser testado (extrato). A ferrozina forma um complexo com o  $Fe^{2+}$  livre mas não com o  $Fe^{3+}$  ligado em quelantes, dessa forma uma diminuição na quantidade do complexo ferrozina- $Fe^{2+}$  formado após o tratamento indica a presença de antioxidante quelante. O complexo ferrozina- $Fe^{2+}$  produz um cromóforo vermelho e a sua absorbância pode ser determinada a 562nm.

#### 4. Resultados

A quantidade de compostos fenólicos obtidos no extrato foi de 0,0145 mg/ml na concentração de 1 mg/ml. Este valor representa cerca de 1,45% de compostos fenólicos no extrato, usando como padrão o ácido gálico. Para determinação do conteúdo de flavonóides totais utilizou-se a rutina e a quercetina como padrões. Portanto, o valor de flavonóides totais obtidos, utilizando como padrão a rutina, foi de 0,1561 mg/mL na concentração de 1 mg/mL. E consecutivamente utilizando a quercetina como padrão, encontrou-se o valor de 0,2431 mg/mL na concentração de 1 mg/mL. Com o padrão quercetina a quantidade de flavonóides desse tipo presente no extrato de acetato da pariparoba é de cerca de 24,31%, e aproximadamente 15,61% do tipo rutina. Na cinética de decomposição do DPPH, um radical estável apresenta intensa absorvância e quando um antioxidante doa hidrogênios ocorre uma diminuição na absorvância. É uma metodologia muito útil pois é altamente reprodutível e os resultados obtidos são compatíveis com outras metodologias mais complexas e menos precisas. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, maior será sua atividade antioxidante. Desse modo, as concentrações de 0,5 e 1,0 mg/ml apresentaram seus melhores resultados chegando a uma atividade antioxidante (AA%) de 84,3% e 87,8% respectivamente. Também a partir dos espectros obtidos, foi possível calcular a concentração do extrato capaz de decompor 50% da quantidade inicial de DPPH· (EC50). Assim, o valor obtido de EC50 para o extrato acetato de etila das folhas de paribora foi de 0,115 mg/mL. Esse parâmetro (EC50) é inversamente relacionado à capacidade antioxidante. Quanto menor o valor de EC50 maior a capacidade antioxidante. Esse valor baixo obtido para o extrato demonstra uma alta atividade antioxidante. A habilidade de um composto doar elétrons em uma reação de óxido-redução pode também ser utilizada como uma medida da atividade antioxidante e é verificada através de sua capacidade redutora. Isto ocorre porque a redução de um radical livre o converte a um produto menos reativo. (LE et al. , 2007). A medida da potência redutora de um composto ou extrato pode ser determinada diretamente pela redução do  $Fe^{3+}(CN)_6$  a  $Fe^{2+}(CN)_6$  e a adição de  $Fe^{III}$  livre leva a formação de um composto complexo azul com intensa absorção óptica em 700 nm. Um aumento na absorvância em 700nm da mistura reacional pode indicar um aumento na capacidade redutora devido a um aumento na formação do complexo. O extrato acetato de etila apresentou pequena capacidade redutora, pois não se observa um aumento significativo das absorvâncias em relação ao controle (sem extrato), para todas as concentrações utilizadas o valor não variou além de 0,25 de absorvância. Já a capacidade de quelar íons ferro foi verificada através da medida da absorvância do complexo ferro II – ferrozina após o tratamento de uma solução de ferro II com o material a ser testado (extrato). A ferrozina forma um complexo com o  $Fe^{2+}$  livre mas não com o  $Fe^{2+}$  ligado em quelantes, dessa forma uma diminuição na quantidade do complexo ferrozina- $Fe^{2+}$  formado após o tratamento indica a presença de antioxidante quelante. O complexo ferrozina- $Fe^{2+}$  produz um cromóforo vermelho e a sua absorvância pode ser determinada a 562nm. Essa reação é um ensaio conveniente para avaliar a atividade antioxidante quelante. Portanto, o extrato apresentou atividade quelante em uma reação cinética dependente da concentração não linear. Isso reflete a natureza complexa do extrato que contém diferentes compostos quelantes com diferentes afinidades pelo ferro em competição pela ligação com a ferrozina. Em altas concentrações do extrato ocorre a saturação. Utilizando-se os valores obtidos é possível calcular o EC50, isto é, a concentração de extrato em mg/ml que apresenta o valor de 50% de efeito quelante. O valor obtido foi de 18,25 mg/ml do extrato.

#### 5. Considerações Finais

Pode-se concluir que na avaliação do extrato de acetato de etila das folhas da pariparoba encontrou-se cerca de 0,0145 mg/ml de compostos fenólicos na concentração de 0,1 mg/ml, representando cerca de 1,45% de compostos fenólicos no extrato, também encontrou-se na concentração de 1 mg/ml, um valor de 0,1561 mg/ml de flavonóides do tipo rutina e 0,2431 mg/ml de flavonóides do tipo quercetina, representando cerca de 15,61% e 0,2431% respectivamente. Os resultados obtidos também permitem concluir que os compostos apresentam atividade antioxidante doando hidrogênio, e nas concentrações 0,5 e 1,0 mg/ml a porcentagem de atividade antioxidante chegou a 84,3% e a 87,8%. Observou-se também uma pequena capacidade redutora, assim, uma baixa capacidade em doar elétrons para radicais formados. Desse modo,

pode-se verificar que o extrato de acetato de etila das folhas da pariparoba atua como antioxidante principalmente doando hidrogênio. Por outro lado, o extrato apresentou baixa capacidade redutora, provavelmente por se tratar de fração com polaridade intermediária e os componentes dessa fração terem um poder limitado de doar elétrons. O extrato acetato apresentou ainda significativa atividade quelante.

## Referências Bibliográficas

---

ARUOMA, O. I. **Methodological considerations for characterizing potencial antioxidant actions of bioactive components in plant foods**. Mutation Research, 523-524: 9-20,2003.

ASTLEY, S. B. **Dietary antioxidants** – past , present and future? Trends Food Tech. 14:93-98, 2003.

BENEVIDES, P. J.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. **Phenilpropanóids and neolignans from piper regnelli**. Phytochemistry, 52: 339 - 343, 1999.

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

DI STASI, L.C. **Triagem farmacológica de plantas medicinais com atividade analgésica**. Dissertação de mestrado. Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1987.

ITO, N. Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food Chem.Toxic**, 24:1071-1082, 1986.

LE, Kim; CHIU, Francis; NG, Ken. Identification and quantification of antioxidants in *Fructus lycii*. **Food Chem..** Science Direct. p. 1-11, 2007.

PESSINI, G. L.; FILHO, B. P. 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, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, 2003.

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

SCOTT, I. M.; PUNIANI, E.; JENSEN, H.; LIVESEY, J. F.; POVEDA, L.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; DURST, T.; ARNASON, J. T. **Analysis of Piperaceae germplasm by HPLC and LCMS: a method for isolating and identifying unsaturated amides from Piper spp extracts**. J. Agric. Food Chem. n. 53, p. 1907-1913, 2005.

ZHANG, L.; WU, F. McLAUGHLIN, J. L. **Annohexocin, a novel mono-THF acetogenin with six hydroxyls, from Annona muricata (Annonaceae)**. Bioorg. Med. Chem. Letters. 5(16), 1865-1868,1995