



18º Congresso de Iniciação Científica

**AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE PIPER  
REGNELLII**

**Autor(es)**

---

VANESSA ROVEROTTO BRIZOLA

**Orientador(es)**

---

SANDRA MARIA BOSCOLO BRIENZA

**Apoio Financeiro**

---

PIBIC/CNPQ

**1. Introdução**

---

Os radicais livres apresentam em sua última camada eletrônica elétrons não-emparelhados que lhes conferem uma alta reatividade devido à retirada de elétrons de outras moléculas o que pode levar as modificações na estrutura molecular o que, conseqüentemente pode levar o organismo a estados patológicos. (CIMEN, 2008; SAXENA et al, 2007; JÚNIOR et al, 2005).

Os compostos fenólicos, por sua vez têm um poder antioxidante para combater os processos oxidativos causados pelos radicais livres. Estes podem ser evitados através de modificações das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas (FREITAS, 1999). Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos. (PÓVOA, 1995).

As espécies do gênero *Piper* pertencente à família Piperaceae demonstram que componentes presentes em seus extratos possuem atividade antioxidante, verificando estes efeitos entre as folhas, caules e raízes.

A espécie estudada é *Piper regnellii*, uma planta arbustiva conhecida popularmente como pariparoba. Suas folhas e raízes são usadas na forma de extratos, infusões ou emplastos para o tratamento de feridas, redução de inchaços e irritações na pele (CORRÊA, 1984; PESSINI et al, 2003).

As concentrações dos compostos fenólicos no extrato das folhas da pariparoba foram determinadas através de curva e sua equação. Pode ser observada uma concentração alta de compostos fenólicos, indicando a presença de antioxidantes.

**2. Objetivos**

---

O projeto tem como objetivo quantificar compostos fenólicos nos extratos de folhas e caule da pariparoba, e através dos dados obtidos, determinar o poder antioxidante do mesmo, avaliando assim, a composição e atividades dos extratos de *Piper regnellii*.

### 3. Desenvolvimento

---

Vidrarias de uso comum em laboratório de Química e reagentes de grau analítico foram utilizados. Para as medidas foi utilizado um espectrofotômetro Hitachi, UV-PC.

As soluções utilizadas (PBS pH 7,4, Estoque de Ácido Gálico e Carbonato de sódio 20%) foram preparadas segundo procedimentos rotineiros.

A determinação dos compostos fenólicos foi realizada pela construção de curva padrão com concentrações de 0,025µg/ml, 0,055µg/ml, 0,070µg/ml e 0,100µg/ml e a determinação foi realizada por espectrofotometria.

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada com solução 2,2 -diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), Padrão Trolox (0,01mg/ml; 0,025mg/ml; 0,05mg/ml e 0,1mg/ml) e o extrato de folhas (1mg/ml 0,5mg/ml, 0,25mg/ml, 0,1mg/ml).

Os valores de absorvância obtidos em espectrofotômetro foram convertidos em porcentagens de Atividade Antioxidante (AA%), determinadas pela equação 1:  $AA\% = [(Abscontrole - Absamostra) \times 100] / (Abscontrole)$

Abscontrole é a Absorvância inicial e Absamostra é a Absorvância da mistura reacional.

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.

Também a partir dos espectros obtidos, pode-se calcular a porcentagem de DPPH não decomposto através da equação 2:  $DPPHREM = (Af/Ao) \times 100$

Ao e Af correspondem às Absorvâncias à 520 nm do radical no estado inicial e no estado final da reação, respectivamente.

Para a determinação do conteúdo de Flavonóides, foi usado o padrão Rutina 0,5mg/ml e determinação espectrofotométrica.

A quantidade de flavonóides no extrato foi calculada pela fórmula  $X = (Axmo) / (Ao/m)$  (3). X é o conteúdo de flavonóides expresso em mg/ml em equivalentes de rutina, Ao é a absorvância da solução padrão de rutina, mo é a massa (mg) de rutina na solução padrão, A é a absorvância da solução de extrato acetato e m é a massa (mg) do extrato.

De forma semelhante foi realizada a determinação do conteúdo de Flavonóis, porem com rutina na concentração de 0,17mg/ml.

A quantidade de flavonóis no extrato foi calculada pela mesma fórmula para a determinação de flavonóides.

Para a determinação do conteúdo total de Tanino foi prepara solução de extrato hidroalcoólico a 100µg/ml (S1.). A solução S2 foi preparada com 10ml da solução S1, diluída para 10µg/ml, misturada com 100mg de caseína e filtrada (S2). A diferença entre as leituras de absorvâncias S1 e S2 corresponde à concentração de tanino absorvido pela caseína na amostra. O conteúdo total de tanino absorvido pela caseína é expresso como o número de equivalentes de ácido gálico.

### 4. Resultado e Discussão

---

Os compostos fenólicos englobam desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização. Esses compostos têm um poder antioxidante para combater os processos oxidativos causados pelos radicais livres.

Os processos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reações oxidativas.

Os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos: o primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxila e peroxila, através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia.

Com os resultados obtidos através do espectrofotômetro, pode-se obter a absorvância de cada concentração e destas pode-se tirar as médias e construir um gráfico da curva padrão.

Através dos resultados do espectrofotômetro para o extrato da folha, pode-se obter a absorvância das concentrações.

Com a equação 4:  $y = ax + b$  e as concentrações do extrato pode-se calcular e determinar as concentrações de compostos fenólicos nas amostras. Onde y é absorvância encontrada, x é a concentração dos compostos fenólicos, a o coeficiente angular e b o coeficiente linear da reta.

A avaliação da Atividade Antioxidante foi realizada através da Cinética de Decomposição do DPPH (2,2 - difenil - 1 - picrilhidrazil). O DPPH é um radical estável artificial, não é produzido em seres vivos, mas essa técnica é útil para avaliar a atividade antioxidante de compostos isolados e também de extratos e alimentos. A técnica utiliza o DPPH? que tem máximo de absorvância em 517 nm. A adição de um antioxidante resulta em uma diminuição na absorvância proporcional à concentração e à atividade antioxidante dos compostos ou extratos. Os radicais livres DPPH, que inicialmente apresentam cor roxa por possuírem elétron livre, perdem esta cor quando um radical hidrogênio doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, diminuindo-se, assim, a absorvância. É uma metodologia muito útil, pois é altamente reprodutível e os resultados obtidos são compatíveis com outras

metodologias mais complexas e menos precisas (VILLANO et al, 2007).

No gráfico 1, cinética de decomposição do DPPH? na presença de diferentes concentrações de TROLOX, que é um derivado hidrossolúvel da vitamina E é utilizado frequentemente como padrão de comparação para avaliação da capacidade antioxidante de compostos isolados e também de extratos.

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.

Também a partir dos espectros obtidos, foi possível calcular a porcentagem de DPPH não decomposto como descrito em Materiais e Métodos. Os valores obtidos para o TROLOX em função do tempo de reação são apresentados. O TROLOX é muito efetivo e, portanto a reação está praticamente finalizada em 5 minutos, a partir desse tempo a absorvância é mínima e, portanto considerou-se que o tempo de 5 minutos como final da reação. A porcentagem de DPPH não decomposto é apresentada em função da concentração de TROLOX, observa-se que a reação é um decaimento exponencial de primeira ordem e a partir da regressão não linear foi possível determinar a seguinte equação 5:  $y_0 + A1 \times e^{-x/t1}$

Utilizando essa equação é possível calcular o parâmetro EC50, que expressa a quantidade de antioxidante necessária para diminuir 50% a concentração inicial do radical DPPH. O valor do parâmetro (EC50) é inversamente relacionado à capacidade antioxidante, isto é, quanto menor o valor de EC50 maior a capacidade antioxidante. O valor obtido para o TROLOX foi de 0,003564 mg.mL<sup>-1</sup>.

O extrato de pariparoba foi avaliado nas mesmas condições e os valores que forem obtidos, foram comparados com os valores obtidos para o padrão TROLOX.

Foram feitos os mesmos procedimentos de análise do padrão Trolox® para o extrato acetato de folhas, para que pudesse ser feita uma comparação do poder antioxidante deste.

No gráfico 2, cinética de consumo do DPPH para o extrato é mais lenta que a observada para o TROLOX.

O extrato acetato de folhas de pariparoba exerceu efeito significativo na decomposição do DPPH como pode ser observado na porcentagem de inibição da absorvância em relação ao tempo zero, início da reação.

Calculou-se a porcentagem de DDPH remanescente para as diferentes concentrações do extrato a partir da equação que foi descrita em Materiais e Métodos e os valores obtidos são apresentados no gráfico 3.

A cinética de consumo do DPPH para as diferentes concentrações do extrato é também de primeira ordem e utilizando-se os valores obtidos para o final de reação, tempo 30 minutos, construiu-se a curva em função da concentração de extrato.

O parâmetro EC50 foi calculado para o extrato acetato e o valor obtido foi 0,513 mg.mL<sup>-1</sup>. Comparando-se esse valor com o obtido para o TROLOX (0,003564 mg.mL<sup>-1</sup>) observa-se que a atividade antioxidante do extrato é menor que a do padrão utilizado para comparação.

A avaliação do conteúdo dos compostos fenólicos foi feita através da determinação de flavonóides totais, flavonóis e tanino.

Os flavonóides, possuem estrutura ideal para o seqüestro de radicais, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. A atividade antioxidante dos flavonóides depende da sua estrutura. Quanto maior o número de hidroxilas, maior a atividade como agente doador de H e de elétrons (BARREIROS et al., 2000).

Através dos resultados obtidos no espectrofotômetro e da equação 3, descrita em Materiais e Métodos, pode-se determinar o conteúdo de flavonóides totais que foi de 2,4%. Mesmo tendo um conteúdo baixo no extrato de folhas, pode-se perceber através da análise da atividade antioxidante que ela possui um poder antioxidante relativamente alto, com uma concentração de 1mg/ml.

Os flavonóis possuem uma estrutura básica formada por C6-C3-C6, sendo os compostos mais diversificados do reino vegetal. Neste grupo encontram-se as antocianidinas, flavonas, flavonóis e, com menor frequência, as auronas, calconas e isoflavonas, dependendo do lugar, número e combinação dos grupamentos participantes da molécula (SOARES, 2002).

No extrato de folhas, pode-se perceber uma grande concentração, 68,83% do conteúdo de flavonóis pertencentes ao grupo dos flavonóides.

Os taninos pertencem a um grupo de compostos fenólicos provenientes do metabolismo secundário das plantas (BUTLER et al., 1984) e são definidos como polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas (HASLAM, 1989). Os taninos são compostos de alto peso molecular, que conferem ao alimento a sensação de adstringência, e classificam-se em dois grupos, baseados em seu tipo estrutural: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os primeiros contêm um núcleo central de glicose ou um álcool poliídrico, esterificado com ácido gálico ou elágico, e são prontamente hidrolisáveis com ácidos, bases ou enzimas. (SOARES, 2002). Os taninos são encontrados principalmente nos vacúolos das plantas. Nestes locais eles não interferem no metabolismo da planta, somente após lesão ou morte das plantas eles agem e têm metabolismo eficiente (CANNAS, 1999).

O conteúdo de taninos no extrato foi obtido através da diferença da solução padrão e solução do extrato, descrita em Materiais e Métodos. Os taninos hidrolisáveis encontrado foi de 3%. Os taninos são geralmente encontrados em folhas de plantas e ajudam no seqüestro de radicais livres

## 5. Considerações Finais

---

O extrato de folhas de Pariparoba apresenta cerca de 2,4% de flavonóides; 68,83% de flavonóis e 3% de tanino, que são compostos

fenólicos capazes de inibir a oxidação de radicais livres.

A cinética de consumo do DPPH para o extrato é mais lenta que a observada para o Trolox®, sua inibição foi de aproximadamente 70% para a concentração de 1,0mg/ml do extrato.

A quantidade de antioxidante necessária para diminuir 50% a concentração inicial do radical livre foi de 0,513mg/ml, sendo uma concentração maior que o Trolox®, que obteve 0,003564mg/ml.

Através desses resultados, pode-se perceber que o extrato de folhas de Pariparoba, apresenta uma excelente atividade antioxidante protetora contra a oxidação, mesmo tendo uma cinética de consumo mais lenta que o antioxidante Trolox®.

## Referências Bibliográficas

---

BARREIRO, AL.B.S.; DAVID, J. P.; DAVID, J.M.; Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, p.113-123, 2006.

BUTLER, L.G.; RIELD, D.J.; LEBRYK, D.J; BLYTT, H.J.. Interaction of proteins with sorghum tannin: mechanism specificity and significance. **Journal of American Oil Chemistry Society**, v.61, n.5, p. 916-920, 1984.

CANNAS, A. **Tannins**: fascinating but sometimes dangerous molecules. Itaka, 1999. Disponível em: .

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. In: PESSINI, G. L. et al. Neolignanas e análise do óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 3, p. 199-204, jul/set 2005.

FREITAS, Paulo Chanel Deodato de Freitas. **Atividade antioxidante de espécies medicinais da família Piperaceae**: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq e *Piper regnellii* (Miq) C. DC. São Paulo: 1999. 115 p.

HASLAM, E. **Plant polyphenols-vegetable tannins revisited**. Cambridge: Cambridge University Press, 1989.

JÚNIOR, D. R. A. et al. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 31, jan. / fev. 2005.

PESSINI, G. L. et al. **Antibacterial activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var *pallescens* (C. DC.) Yunck**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 98, n. 8, p. 1115-1120, dec. 2003.

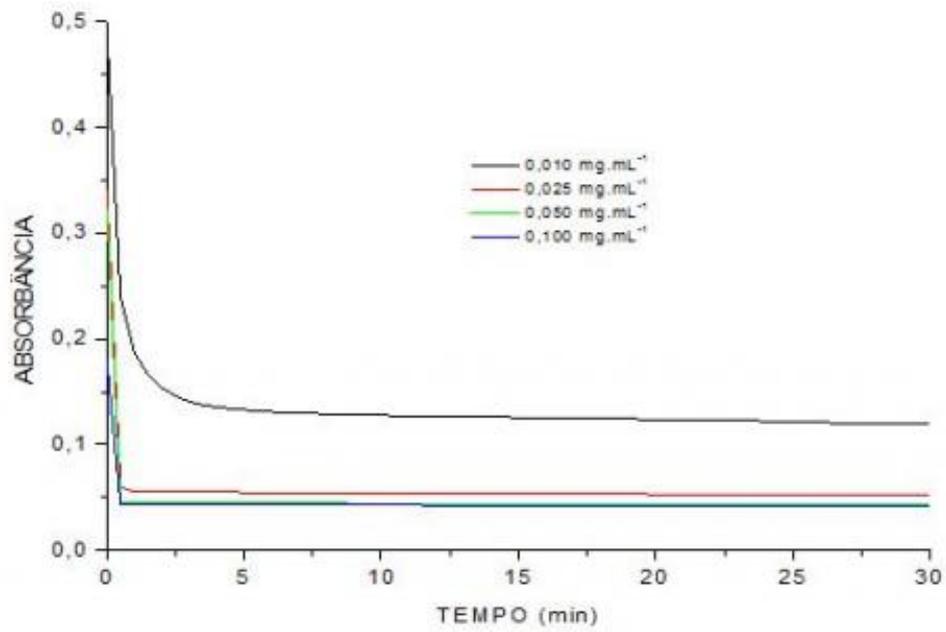
PÓVOA, Helion. **Radicais Livres em Patologia Humana**. Rio de Janeiro: Imago Ed., 1995. p.416

SAXENA, R. et al. Antioxidant activity of commonly consumed plant foods of Índia: contribution of their phenolic content. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, Inglaterra, v. 58, n. 4, p. 250-260, jun. 2007.

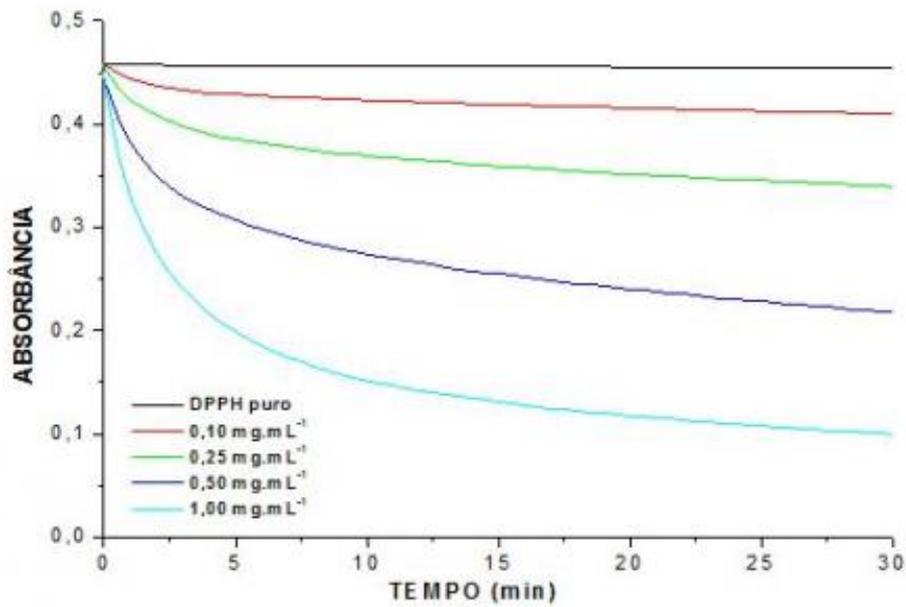
SOARES, S.E., 2002, Ácidos fenólicos como antioxidantes; **Revista de Nutrição, Campinas**, 15(1)71-81

## Anexos

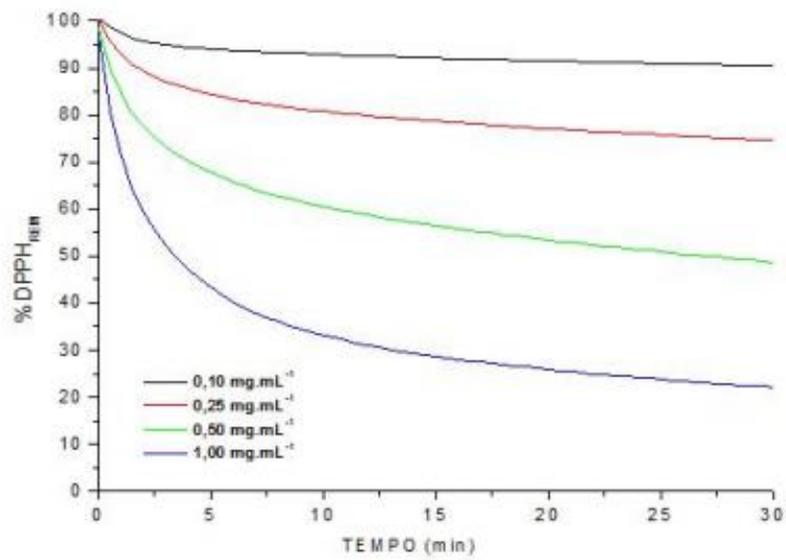
---



**Gráfico 1:** Cinética de decomposição do DPPH na presença de diferentes concentrações de Trolox®, indicadas no gráfico.



**Gráfico 2:** Cinética de decaimento da absorbância do DPPH\* em função do tempo para as concentrações de extrato indicadas no gráfico.



**Gráfico 3:** Porcentagem de DPPH remanescente (%), determinados com a equação [2] em função do tempo de reação inicial para diferentes concentrações de extrato de folhas, indicadas no gráfico.