

**BUSCA POR SUBSTÂNCIAS COM POTENCIAL ANTIRRADICALAR EM *Hydrocotyle leucocephala***

Suelen A. Moraes<sup>1\*</sup>, Paulete Romoff<sup>2</sup>, Fátima O. S. Buturi<sup>3</sup>, Oriana A. Fávero<sup>4</sup>, Edgard A. Ferreira<sup>5</sup>

1. Escola de Engenharia - Universidade Presbiteriana Mackenzie / Estudante de IC

2. Escola de Engenharia - Universidade Presbiteriana Mackenzie / Professora

3. Faculdade de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade São Judas Tadeu / Professora

4. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde – Universidade Presbiteriana Mackenzie / Professora

5. Escola de Engenharia - Universidade Presbiteriana Mackenzie / Professor - Orientador

**Resumo:**

O processo de formação de radicais livres no organismo é espontâneo e ocorre em equilíbrio com a produção de antioxidantes (antirradicais), espécies químicas que reagem com os radicais livres.

Os antioxidantes têm por finalidade controlar a quantidade de radicais livres no organismo. Quando há um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e espécies antioxidantes, com maior produção de radicais livres, ocorre o que é chamado de estresse oxidativo. Os radicais livres são espécies reativas que provocam danos as células do organismo podendo ocasionar o processo de envelhecimento precoce cutâneo e doenças associadas a grande produção de tais espécies, como câncer e doenças neurodegenerativas. Devido uma maior exposição aos raios solares, produtos industrializados, consumo de tabaco e bebidas alcoólicas há uma tendência ao aumento da formação de radicais livres ocasionando o estresse oxidativo e, como consequência, o aumento do número de casos de doenças associadas a formação de radicais livres em excesso. Assim, torna-se importante a utilização de fontes externas de espécies antioxidantes, no auxílio ao combate dos radicais livres.

As macrófitas aquáticas, estão divididas por mais de 450 gêneros com aproximadamente 2600 espécies. No entanto, são poucos os relatos sobre a composição química e atividade biológica dos extratos e/ou substâncias isoladas, apesar da grande diversidade de espécies. O gênero *Hydrocotyle* pertence à família Araliaceae que compreende 40 gêneros e cerca de 1500 espécies com ocorrência desde os Estados Unidos até a Argentina e Chile. Devido a significativa quantidade de espécies de macrófitas aquáticas e o pouco conhecimento sobre o potencial destas espécies, este estudo buscou avaliar o potencial do extrato da espécie *Hydrocotyle leucocephala* como fonte de substâncias antirradicais. Para tal, foi preparado o extrato em metanol a partir das folhas e caule da espécie vegetal e por partição líquido-líquido a partir deste extrato, as fases em hexano, acetato de etila e butanol foram obtidas. Soluções estoques de cada fase orgânica foram preparadas na concentração de 100,0 mg/mL. A partir destas soluções, outras de menores concentrações de cada fase orgânica foram preparadas por diluição para obter as concentrações de 75,0; 50,0; 25,0; 10,0 e 5,0 mg/mL. A avaliação do potencial antirradicalar foi realizada pela reação entre as soluções geradas e o radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) em placa cromatográfica de camada delgada.

A fase mais ativa foi a butanólica quando comparado com a substância controle quercetina. Assim, foi submetida a um fracionamento cromatográfico em sephadex®, onde a fração 9 quando submetida a análise de Ressonância Magnética Nuclear de <sup>1</sup>H, apresentou sinais característicos de substâncias fenólicas que são conhecidas por sua atividade antirradicalar.

**Palavras-chave:** Macrófitas aquáticas; atividade antioxidante; DPPH.

**Apoio financeiro:** Mackpesquisa, PIBIC Mackenzie

**Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição:** UPM - Mackenzie

**Introdução:**

As substâncias com ação antioxidante (antirradicalar), são aquelas que estão associadas ao processo de retardamento das reações de degradação oxidativa. Este processo está intimamente ligado a formação de radicais livres e é espontâneo, ocorrendo nos sistemas biológicos com a formação de espécies reativas como radicais hidroxila (HO·), peróxido (ROO·), alcóxido (RO·), entre outros. (OLIVEIRA et al., 2014) No entanto, ao longo do progresso e industrialização os níveis de poluição, aumento da incidência da radiação ultravioleta, consumo de tabaco, bebidas alcoólicas e alimentos industrializados aumentaram e com isto as pessoas ficaram mais expostas a substâncias e condições que provocam uma aceleração na produção de radicais livres. A alta produção de radicais livres pode ocasionar o processo de estresse oxidativo, que é um desequilíbrio entre formação de espécies reativas e compostos que agem na inibição de tais espécies reativas. Como consequência, podem ocorrer o envelhecimento precoce e doenças associadas a formação destes radicais livres. (NIMSE, 2015) As substâncias antirradicais são aquelas que são capazes de prevenir ou retardar a oxidação por inativar os radicais gerados pela doação de elétrons ou hidrogênio e com isto formar espécies químicas estáveis.

As plantas são uma importante fonte de moléculas e as substâncias já isoladas e caracterizadas apresentaram grande diversidade estrutural. A grande diversidade estrutural está relacionada as rotas biossintéticas altamente especializadas e enzimas com alta especificidade. Aliado a esta grande diversidade estrutural, muitas destas substâncias apresentam um papel central no tratamento ou prevenção de várias doenças tais como diabetes, câncer e desordens inflamatórias crônicas. (CRAGG e NEWMAN, 2013) Estudos

confirmam uma relação positiva entre o consumo de frutas e legumes ricos em compostos fenólicos e a prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo (OLIVEIRA et al., 2014)

As macrófitas aquáticas são conhecidas popularmente como plantas aquáticas. Ao longo de seu processo evolutivo adaptaram-se ao ambiente aquático de forma muito eficiente. Apresentam aproximadamente 2600 espécies espalhadas por mais de 450 gêneros e estão representadas por sete grandes grupos: cianobactérias, clorófitas, rodófitas, xantófitas, briófitas, pteridófitas e espematófitas (CHAMBERS et al., 2008).

As macrófitas aquáticas apresentam uma grande versatilidade com relação ao seu habitat, assim sete classificações são atribuídas de acordo com suas características adaptativas ao ambiente aquático: anfíbia, emergente, flutuante fixa, flutuante livre, submersa fixa, submersa livre, epífitas. (ESTEVEZ, 2011)

Apesar do grande número de espécies de macrófitas aquáticas, muitos gêneros não apresentam qualquer descrição da composição química ou propriedades biológicas de seus compostos.

O gênero *Hydrocotyle* pertence à família Araliaceae que compreende 40 gêneros e cerca de 1500 espécies com ocorrência desde os Estados Unidos até a Argentina e Chile (SILVA et al., 2010). A medicina popular faz grande uso das espécies do gênero *Hydrocotyle* no tratamento de úlceras de pele, dermatites, reumatismo, tuberculose e eczema (FLORENTINO et al., 2013).

Uma grande diversidade de compostos químicos foram isolados a partir de espécies de *Hydrocotyle*. A partir do extrato metanólico de *H. ranunculoides* foram isolados triterpenos polioxigenados e glicosilados (GRECA et al., 1993). Estudos realizados com *H. sibthorpioides* e *H. bonariensis* revelaram a presença de saponinas glicosiladas (MATSUSHITA et al., 2004; HUANG et al., 2008; TABOPDA et al., 2012). No entanto, no que diz respeito à atividade biológica dos compostos isolados, estes ainda carecem de estudos mais aprofundados.

A espécie *Hydrocotyle leucocephala* é nativa do Brasil e utilizada como planta ornamental para aquários. Na colômbia é utilizada pela medicina popular por suas propriedades diuréticas e no combate de diarreia. (RAMOS et al., 2006).

Devido a significativa quantidade de espécies de macrófitas aquáticas e o pouco conhecimento sobre o potencial destas espécies este estudo buscou avaliar o potencial das fases orgânicas geradas a partir do extrato metanólico das folhas e caules da espécie *Hydrocotyle leucocephala* como fonte de substâncias antirradicais frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH).

### Metodologia:

Para a realização do trabalho o material vegetal foi obtido junto a um produtor de plantas aquáticas para aquários localizado na cidade Suzano/SP, visando trabalhar de forma sustentável. Uma excisada foi depositada no herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo sob o registro E.A. Ferreira – 003.

O material vegetal recém obtido (folhas e galhos) foi submetido à secagem em estufa sob ventilação a temperatura de 45°C, visando eliminação total de água. Após esse período, o material vegetal foi moído em liquidificador comercial da marca Walita, modelo RI2094/01/A e uma massa de 265,0 g foi submetido a extração exaustiva com metanol (13 x 500 mL) até esgotamento. As amostras foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida da marca Büchi, modelo R-215, acoplado de controlador de vácuo modelo V-850 e bomba de diafragma modelo V-710 obtendo-se 78,0 g de extrato bruto.

O extrato foi então ressuspendido em funil de separação em uma solução de água/metanol (9:1 / v/v) e então particionado em ordem crescente de polaridade utilizando hexano (11 x 300 mL), acetato de etila (7 x 300 mL) e butanol (6 x 300 mL), dando origem as respectivas fases orgânicas.

Foram preparadas soluções estoques de cada fase orgânica com concentração de 100 mg/mL em seus respectivos solventes de origem, e a partir destes, foram preparadas soluções nas concentrações de 75,0; 50,0; e 10,0 e 5,0 mg/mL por diluição.

As soluções de trabalho foram submetidas ao ensaio da atividade antirradicalar seguindo metodologia descrita por Soler-Rivas e colaboradores (2000), conforme segue.

As soluções foram aplicadas (2 µL) em placa cromatográfica de camada delgada (CCD), com auxílio de pipeta automática na forma de *spot* da maior para a menor concentração na mesma fileira, além da substância controle Quercetina (5,0 mg/mL), reconhecidamente uma substância com potente ação antirradicalar.

Após volatilização do solvente, uma solução do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) de concentração 1,0 mmol/L foi aspergida sobre os *spots*. A solução metanólica de DPPH apresenta coloração purpura e quando entra em contato com uma substância com atividade antirradicalar ocorre a transferência de um átomo de hidrogênio para o radical DPPH, transformando-se na forma molecular e agora com coloração amarela, indicativo da reação entre substância antirradicalar e radical livre.

### Resultados e Discussão:

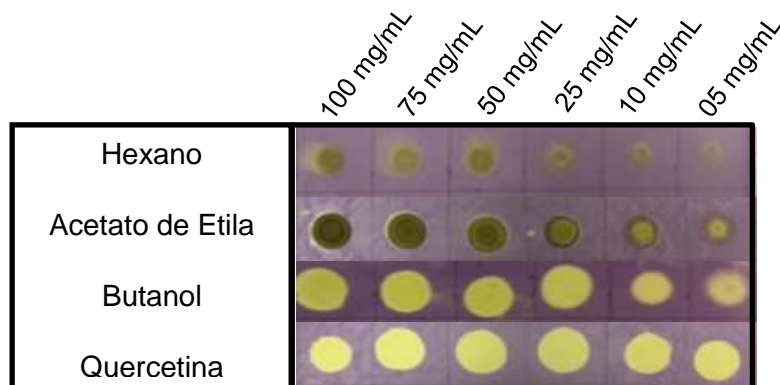
O processo de obtenção do extrato metanólico resultou em uma massa de 78,0 g e a partir deste extrato por partição líquido-líquido que após remoção do solvente foram geradas as fases orgânicas em hexano, acetato de etila e butanol obtendo as massas apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1:** Massas das fases obtidas a partir da partição do extrato bruto metanólico.

Fase	Massa (g)
Hexano	10,60
Acetato de etila	1,85
Butanol	7,70

De posse das fases orgânicas, foram obtidas as soluções estoque e as soluções de trabalho, as quais foram aplicadas na placa cromatográfica (CCD) e aspergidos com a solução de DPPH (Figura 1).

**Figura 1:** Avaliação da atividade antirradicalar das fases orgânicas da espécie *H. leucocephala*.

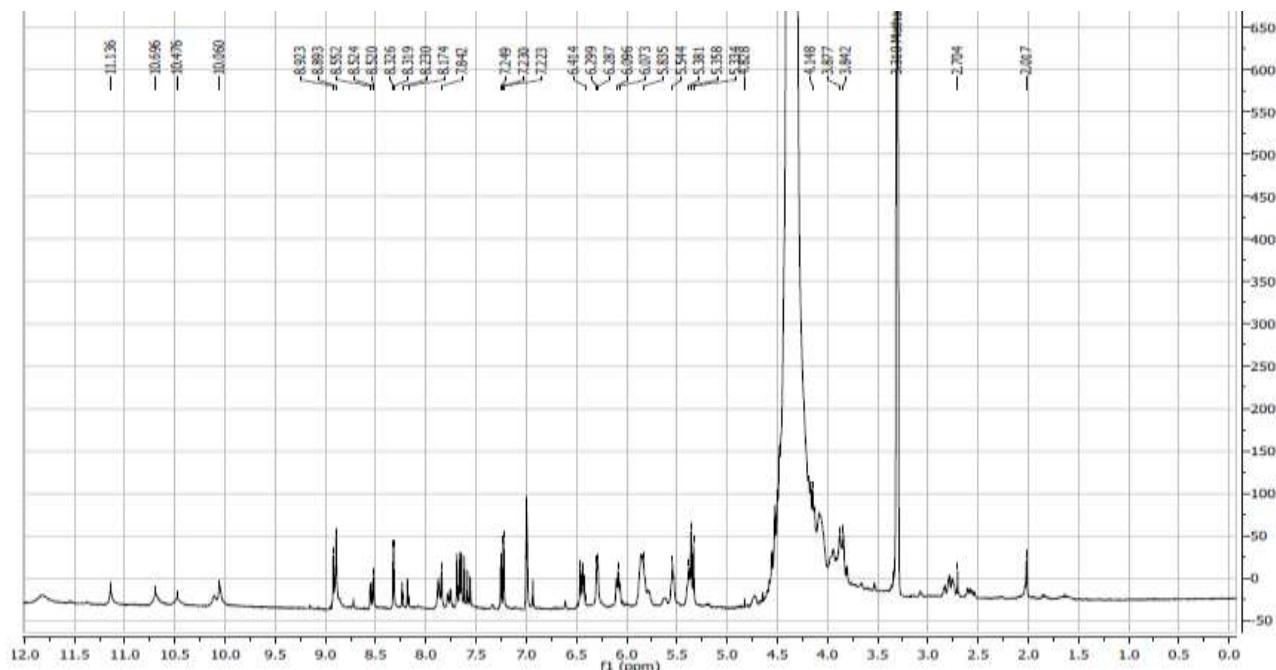


Pela observação da placa cromatográfica, a fase mais polar em butanol, apresentou a maior atividade antirradicalar, tendo em vista que este extrato apresentou forte coloração amarela para todas as concentrações testadas quando comparado a substância controle quercetina.

A partir da observação de que a fase butanólica, apresentou maior atividade frente ao ensaio da atividade antirradicalar optou-se por buscar informações estruturais a respeito dos constituintes químicos presentes nesta fase. Assim, 2,0 g foram submetidos a cromatografia por permeação em gel (Sephadex® LH-20), onde os componentes da mistura são separados baseando-se no tamanho da molécula. A eluição foi realizada com metanol e foram coletas 42 frações com 10,0 mL cada. Estas frações foram agrupadas em 9 frações de acordo com a polaridade baseando-se na análise da cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) utilizando como fase móvel uma solução de metanol e diclorometano (7:3)

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração **9** revelou a presença de sinais entre  $\delta$  8,00 e 6,50 ppm característicos de hidrogênios de anel aromático aliados a presença de sinais entre  $\delta$  11,20 e 10,00 ppm que sugerem a presença de substâncias fenólicas na fase butanólica (Figura 2).

**Figura 2:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração **9** (300 MHz, MeOD) do extrato em butanol.



### Conclusões:

As macrófitas aquáticas constituem uma importante parte da flora em termos de quantidade de espécies vegetais. No entanto, o potencial destas espécies como fonte de substâncias bioativas é muito pouco explorado e carece de estudos. O estudo realizado com as fases orgânicas da espécie *H. leucocephala* demonstrou o potencial da espécie diante da avaliação da atividade antirradicalar frente o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH). A fase em butanol, foi a mais ativa evidenciado pela comparação com a substância controle quercetina e pela possível presença de substâncias fenólicas que apresentam reconhecida atividade antirradicalar.

### Referências bibliográficas

- CHAMBERS, P. A., LACOUL, P., MURPHY, K. J., THOMAZ, S. M. Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater. **Hydrobiologia**, v. 595, p. 9-26, 2008.
- CRAGG, G. M., NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.
- ESTEVEZ, F. A. (2011). **Fundamentos de limologia**, Ed. Interciência 3 ed., 790.
- FLORENTINO, I. F., NASCIMENTO, M. V. M., GALDINO, P. M., BRITO, A. F. D., ROCHA, F. F. D., TONUSSI, C. R., LIMA, T. C. M. D., PAULA, J. R. D., COSTA, E. A. (2013). Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Hydrocotyle umbellata* L., Araliaceae (acariçoba) in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, p. 987-997.
- GRECA, M. D., FIORENTINO, A., MONACO, P., PREVITERA, L. Polyoxygenated oleanane triterpenes from *Hydrocotyle ranunculoides*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 201-204, 1993.
- HUANG, H.-C., LIAW, C.-C., ZHANG, L.-J., HO, H.-U., KUO, L.-M. Y., SHEN, Y.-C., KUO, Y.-H. (2008). Triterpenoidal saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1597-1603, 2008.
- MATSUSHITA, A., SASAKI, Y., WARASHINA, T., MIYASE, T., NOGUCHI, H., VANDER VELDE, D. (2004). Hydrocotylosides I-VII, New Oleanane Saponins from *Hydrocotyle sibthorpioides*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 384-388, 2004.
- NIMSE S. B.; PAL D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, p. 27986-28006, 2015.
- OLIVEIRA, S.; GLALCI, A. S.; ECKET C. R.; SILVA, T.A.; SOBRAL, E. S.; FÁVERO, O. A.; FERREIRA, M. J. P.; ROMOFF, P.; BAADER, W. J. Evaluation of antiradical assays used in determining the antioxidant capacity of pure compounds and plant extracts. **Química Nova**, v. 3, p. 497-503, 2014.
- OLIVEIRA, L. L.; CARVALHO, M. V.; MELO, L. Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. **Revista Ceres**, v. 64, p. 764-779, 2014.
- RAMOS, F., TAKAISHI, Y., KAWAZOE, K., OSORIO, C., DUQUE, C., ACUÑA, R., FUJIMOTO, Y., SATO, M., OKAMOTO, M., OSHIKAWA, T., AHMED, S. U. Immunosuppressive diacetylenes, ceramides and cerebroside from *Hydrocotyle leucocephala*. **Phytochemistry**, v.67, 1143-1150, 2006.
- SILVA, C. B., CÂNDIDO, A. C. S., SIMIONATTO, E., FACCENDA, O., SCALON, S. D. P. Q., PERES, M. T. L. P. Atividade alelopática, antioxidante e teor de fenóis totais de *Hydrocotyle bonariensis* Lam. (Araliaceae). **Technology Acta Scientiarum**, v.32, 413-420, 2010.
- SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. An Easy and Fast Test to Compare total Free Radical scavenger Capacity of Foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, p. 330-338, 2000.
- TABOPDA, T. K., MITAINE-OFFER, A.-C., MIYAMOTO, T., TANAKA, C., MIRJOLET, J.-F., DUCHAMP, O., NGADJUI, B. T., LACAILLE-DUBOIS, M.-A. (2012). Triterpenoid saponins from *Hydrocotyle bonariensis* Lam. **Phytochemistry**, v.73, p. 142-147, 2010.