

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO BRUTO DE *Piper alatabaccum*

Amanda Feitosa Cidade¹, Dhessi Rodrigues^{*2}, Emelly B. S. Santos², Elza Paula Silva Rocha¹, Gabriela C. Oliveira², Jamile Macedo Mariano Taborda¹, João Vitor Souza de Oliveira², Jonas Soares de Mesquita², Maria Vitória Dunice Pereira², Minelly Azevedo da Silva¹⁻³, Nilton Fagner de Araújo¹ e Rebeca da Costa Rodrigues².

¹ Pesquisadores do Instituto Federal de Rondônia Campus – Calama, Porto Velho/RO; ²

²Estudantes de IC do Instituto Federal de Rondônia Campus – Calama, Porto Velho/RO;

³Orientadora - Instituto Federal de Rondônia Campus – Calama, Porto Velho/RO

Resumo:

A *Piperaceae* é uma vasta família de plantas que tem sido amplamente utilizada para fins medicinais. O gênero *Piper*, faz parte da família *Piperaceae* e possui mais de 700 espécies, distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo que são usadas na medicina tradicional para tratar doenças diversas, como distúrbios intestinais, psicotrópicos com função antimicrobiana e antioxidante. Este estudo teve como objetivo realizar a prospecção química do extrato e a atividade antioxidante dos extratos brutos das folhas da espécie *Piper alatabaccum*, por meio do método de sequestro de radicais livres, usando 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP).

Palavras-chave: *Piperaceae*; radicais livres; atividade biológica.

Apoio financeiro: Instituto Federal de Rondônia – IFRO; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Introdução:

Os Antioxidantes são compostos capazes de combater radicais livres e são conhecidos por apresentar em sua última camada eletrônica elétrons não-emparelhados, essa característica lhes conferem uma alta reatividade promovida pela retirada de elétrons de outras moléculas. Esse comportamento pode levar a modificações na estrutura molecular. Nesse experimento foi realizado o estudo das possíveis classes de substâncias (prospecção química) presentes no extrato bruto de *Piper alatabaccum* e a realização da atividade antioxidante.

Piper alatabaccum é conhecida popularmente como “João brandinho”, ocasionalmente encontrada na Amazônia, região norte do Brasil, no estado do Amazonas, Amapá, Pará e Rondônia (BFG, 2015; E Silva, 2013). Suas raízes são utilizadas popularmente como anestésico local, possivelmente pela presença de amidas em sua composição química (Santos *et al.*, 2013; Santana, 2012).

As substâncias naturais com ação antioxidante são encontradas em plantas. Dependendo da estrutura química dos componentes bioativos e da concentração dos fitoquímicos (Melo *et al.*, 2006), diferentes extratos de frutas, ervas, especiarias e chás podem apresentar essa capacidade de inibir, prevenir ou retardar a ação dos radicais livres (Mariutti e Bragagnolo, 2007). Os recursos naturais, portanto, continuam sendo importantes fontes de substâncias e precursores com grande potencial terapêutico (Justo *et al.*, 2008).

Portanto, desenvolver pesquisas nessa área é contribuir significativamente para que se obtenha novos agentes antioxidantes naturais que possam ser utilizados tanto para fins industriais como terapêuticos. Ou seja, que se constituam em fontes alternativas ao uso de antioxidantes sintéticos, na conservação de alimentos, e como parte do sistema de defesa do organismo humano, na neutralização de agentes oxidantes e na redução do risco de várias doenças crônicas. Este trabalho teve como objetivo realizar a prospecção química do extrato e avaliar o seu comportamento em relação à atividade antioxidante.

Metodologia:

O material vegetal (folhas) de *P. alatabaccum* foi coletado no município de Buritis – Rondônia, no mês de fevereiro (inverno amazônico). A preparação dos extratos brutos e a atividade antioxidante foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica e Produtos Naturais do IFRO – Porto Velho/Calama.

A prospecção química visa verificar as possíveis classes de substâncias presentes nos extratos, auxiliando futuramente no fracionamento cromatográfico. A análise foi realizada seguindo as orientações de (Barbosa, 2004) para a verificação da presença de Alcalóides, glicosídeos cardíacos, Catequinas, Flavonóides, Fenóis-Taninos, Saponinas, Triterpenóides, Atividade Antioxidante.

Método DPPH

A atividade antioxidante foi realizada seguindo as orientações de (Scherer & Godoy, 2009). Após o preparo da solução metanólica de DPPH (0,06 mM), foi adicionado 3,9mL da solução metanólica a 0,1mL do extrato bruto nas concentrações de (250; 500; 750 e 1000µg.mL⁻¹). Como controle negativo foi utilizado 0,1mL de MeOH e 3,9mL da solução de DPPH, para o controle positivo foi utilizado butilhidroxitolueno (BHT) em diferentes concentrações (50; 100; 150; 200; e 250µg.mL⁻¹) e quercetina (50; 100; 150; 200 µg.mL⁻¹). As soluções foram acondicionadas por 60 min em uma câmara escura a temperatura ambiente e depois procedidas às leituras das absorbâncias no espectrofotômetro no comprimento de onda de 517nm, as análises foram realizadas em

triplicata. A atividade antioxidante foi avaliada pela capacidade das substâncias presentes na amostra captarem o radical livre DPPH. As atividades sequestrantes de DPPH das concentrações testadas foram expressas em porcentagem, a partir da seguinte fórmula:

$$I (\%) = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_0] \times 100; Abs_0 \text{ é a absorbância do branco e } Abs_1 \text{ é a absorbância da amostra.}$$

A CE₅₀ (quantidade suficiente para 50% de inibição) foi calculado através da equação da reta obtida da curva de calibração (concentração versus o índice DPPH correspondente). A ação antioxidante do extrato foi expressa pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA) a partir da fórmula:

$$IAA = \frac{m_{DPPH}}{CE_{50}} (\mu g \text{ mL}^{-1})$$

$$CE_{50} (\mu g \text{ mL}^{-1})$$

m_{DPPH} = massa do DPPH

CE₅₀ = concentração efetiva

Método FRAP

A atividade antioxidante pelo método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) foi realizada seguindo as orientações de (Brito, Morais, Sampaio, & Saura-calixto, 2006). As soluções foram preparadas e usadas imediatamente. Foram preparadas as amostras do extrato bruto das folhas de *Piper alatabaccum* e dos controles positivos BHT e quercetina nas concentrações de 100 µg.mL⁻¹, o solvente metanol foi utilizado como solvente. As amostras foram mantidas em ambiente escuro. Alíquotas de 90 µL de cada amostra foram transferidas para tubos de ensaio em triplicata. Depois foi acrescentado 270 µL de água destilada e 2,7 mL do reagente de FRAP. As amostras foram homogeneizadas com o uso do agitador e mantidas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. Depois foram realizadas as leituras das absorbâncias em comprimento de onda de 595 nm.

Resultados e Discussão:

Triagem Fitoquímica

O resultado da triagem (Tabela 1) do extrato bruto etanólico demonstrou a presença das seguintes classes de substâncias (Tabela 1).

Tabela 1. Triagem fitoquímica do extrato bruto de *Piper alatabaccum*

Alcaloides	Presença ou Ausência	Coloração
Reagente de Mayer	Negativo	
Reagente de Wagner	Positivo	Laranja claro
Reagente de Dragendorff	Positivo	Laranja forte
Glicosídeos Cardiotônicos		
Reagente de Kedde	Negativo	
Catequinas	Negativo	
Flavonoides	Positivo	Rosa
Fenóis e Taninos		
Fenóis	Positivo	Vermelho
Taninos Hidrolisáveis	Negativo	
Taninos Condensados	Positivo	Verde
Saponinas	Negativo	
Triterpenoides	Positivo	Verde

No estudo químico do extrato bruto das folhas foram isoladas três amidas (piperovatina, 8,9-dihidropiplartina e piplartina) e duas flavonas (5,5',7-trimetoxi-3',4'metilenodioxiflavona e 3',4',5,5',7-pentametoxiflavona) (Facundo, Da Silveira, & Morais, 2005), presentes também na raiz e frutos (Silva, 2009). A prospecção química para flavonoides de *P. alatabaccum* apresentou resultado positivo.

Atividade Antioxidante

Método DPPH

Preparou-se uma curva analítica de DPPH nas concentrações: 250; 500; 750 e 1000 µg.mL⁻¹, obtendo a equação de regressão linear $y = 0,0132x + 0,0036$ e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9995$. O valor correspondente à metade da absorbância da solução de DPPH puro (0,06 mM) foi substituído na equação do DPPH, para encontrar a concentração em µM de DPPH, correspondente a 50% da concentração inicial do radical e, em seguida, transformado para g de DPPH pela Equação:

$$g_{DPPH} = (\mu M \text{ DPPH} / 1.000.000) * 394,3 \text{ (peso molecular do DPPH)}$$

A concentração do DPPH utilizada foi de 23,66 µg.mL⁻¹ para uma solução de 0,06 Mm. A avaliação da atividade antioxidante revelou que o IAA do extrato bruto das folhas praticamente iguala-se ao controle positivo BHT e a quercetina (Tabela 2).

Método FRAP

A curva de calibração do método FRAP foi preparada com a solução de sulfato ferroso nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 µM. As leituras das absorbâncias foram plotadas no eixo Y e as concentrações de sulfato ferroso no eixo X, obtendo-se a Equação da reta $y = 0,0007x - 0,0283$ e o coeficiente de correlação $R^2 =$

0,9996. Os valores médios das absorbâncias das amostras foram substituídos na equação de regressão linear obtida, para se determinar a capacidade das amostras em reduzir o Fe^{3+} presente na solução a Fe^{2+} , e o resultado equivalente a concentração em μM de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Posteriormente, o valor encontrado foi convertido em mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ /extrato, e o resultado final expresso em mg de Fe^{2+} / extrato (Tabela 4). O extrato bruto das folhas apresentou potencial antioxidante.

Tabela 2. Resultados da atividade antioxidante do extrato.

AMOSTRAS	Método DPPH			Método FRAP
	Inibição (%) \pm DP	$\text{CE}_{50} \pm$ DP ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	IAA	(mg de Fe^{2+} / grama de extrato) \pm DP
Extrato Bruto das folhas de <i>Piper alatabaccum</i>	95,04 \pm 0,13	4,27 \pm 0,016	5,54	118,49 \pm 3,10
BHT	68,48 \pm 1,09	4,19 \pm 0,046	5,64	126,59 \pm 1,93
Quercetina	95,45 \pm 0,55	2,03 \pm 0,032	11,65	167,85 \pm 2,86

DP (desvio padrão); IAA (Índice de Atividade Antioxidante); BHT (butilhidroxitolueno); Concentrações para determinar o percentual de inibição (%): Extrato Bruto (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$); BHT (250 $\mu\text{g}/\text{mL}$); Quercetina (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

Conclusões:

Os testes indicaram que o extrato bruto de *Piper alatabaccum* apresenta potencial antioxidante, isso pode ser justificado pela possível presença de compostos fenólicos que foram identificados na triagem fitoquímica do extrato bruto. Futuramente objetiva-se avaliar o efeito das condições climáticas na composição das frações dos extratos, isolar os constituintes fixos dos extratos das espécies para reproduzir os experimentos.

Referências bibliográficas

- Angelo, P. M.; Jorge, N. (2007). Phenolic compounds in foods – A brief review. Revista Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v 66 (1): p 232-240.
- Brito, E. S. De, Morais, S. M. De, Sampaio, C. D. G., & Saura-calixto, F. D. (2006). on line, 3–6. Ci, B. A. C. D. E., Farmac, N., De, U. P., Naturais, E. M. P., Bioativos.
- Cechinel V.F.; Yunes R.A.; Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Revista Química Nova. Vol. 21. 1997.
- Da Silva, J. K. R., Pinto, L. C., Burbano, R. M. R., Montenegro, R. C., Guimarães, E. F., Andrade, E. H. A., & Maia, J. G. S. (2014). Essential oils of Amazon Piper species and their cytotoxic, antifungal, antioxidant and anti-cholinesterase activities. Industrial Crops and Products, 58, 55–60. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.04.006>
- Facundo, V. A., Da Silveira, A. S. P., & Morais, S. M. (2005). Constituents of Piper alatabaccum Trel & Yuncker (Piperaceae). Biochemical Systematics and Ecology, 33(7), 753–756. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2004.09.003>
- Guilherme, J., Pq, S. M., Helena, E., Pq, A. A., Pq, E. F. G., & Helio, M. (2001). Um tipo químico rico em miristicina de Piper hispidinervum C. DC., com ocorrência no Mato Grosso, 1993.
- Gutierrez, Y. V., Yamaguchi, L. F., de Moraes, M. M., Jeffrey, C. S., & Kato, M. J. (2016). Natural products from Peperomia: occurrence, biogenesis and bioactivity. Phytochemistry Reviews, 15(6), 1009–1033. <https://doi.org/10.1007/s11101-016-9461-5>
- Henriques, A. T.; Danielli, L. J.; Apel, M. A. (2016) Óleos essenciais: Importância e perspectivas terapêuticas. Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia / Valdir Cechinel Filho, Rosendo Augusto Yunes (Org) – 5 ed., rev. E ampl. – Itajaí, SC: Univali. pp 269-321
- Mariutti, L. R. B.; Bragagnolo, N. (2007). Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. Braz. J. Food Technol., v. 10, n. 2, p. 96-103, abr./jun.
- Melo, E. A.; Maciel, M. I. S.; Lima, V. L. A. G.; Leal, F. L. L.; Caetano, A. C. S.; Nascimento, R. J. (2006). Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. Ciênc. Tecnol. Aliment. v. 26, n. 3, p. 639-644.
- Nascimento, K. M. (2011) Composição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais de espécies de Piper frente a cepas de Candida spp. Dissertação de Mestrado da Universidade Estadual do Ceará. Disponível em: <http://www.uece.br/ppgcv/dmdocuments/kalinenascimento.pdf>. Acesso realizado em 09 de novembro de 2017, às 21h25min

Prakash, B., Shukla, R., Singh, P., Kumar, A., Mishra, P. K., & Dubey, N. K. (2010). Efficacy of chemically characterized Piper betle L. essential oil against fungal and aflatoxin contamination of some edible commodities and its antioxidant activity. *International Journal of Food Microbiology*, 142(1–2), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.011>

Rond, R. D. E. ([s.d.]). Território vale do jamari.

Santana, H. T. (2012) Estudo fitoquímico de *Piper alatabaccum* Trel & Yunck, 1950 e avaliação da atividade larvívica sobre *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762 (Diptera: culicidae) em condições de campo simulado. Dissertação apresentada a Universidade Federal de Rondônia. Disponível em: [http://www.pgbioexp.unir.br/downloads/2807_estudo_fitoquimico_de_piper_alatabaccum_\(hiamani_santana_&_valdir_alves_facundo\).pdf](http://www.pgbioexp.unir.br/downloads/2807_estudo_fitoquimico_de_piper_alatabaccum_(hiamani_santana_&_valdir_alves_facundo).pdf). Acesso realizado em 09 de novembro de 2017, às 22h32min

Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, 112(3), 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026>

Schindler, B. (2015). Óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* Kunth: RENDIMENTO, COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE FUNGITÓXICA in vitro.

Silva, A. L., Chaves, F. C. M., Lameira, R. C., & Bizzo, H. R. (2014). Rendimento e composição do óleo essencial de *Piper aduncum* L. cultivado em Manaus, AM, em função da densidade de plantas e épocas de corte. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(SUPPL. 1), 670–674. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000500007>

Singh, S., Kapoor, I. P. S., Singh, G., Schuff, C., De Lampasona, M. P., & Catalan, C. A. N. (2013). Chemistry, antioxidant and antimicrobial potentials of white pepper (*Piper nigrum* L.) essential oil and oleoresins. *Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B - Biological Sciences*, 83(3), 357–366. <https://doi.org/10.1007/s40011-012-0148-4>