UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Curso de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES MEDICINAIS DA FAMÍLIA
PIPERACEAE: Pothomorphe umbellata (L.) Miq.
E Piper regnellii (Miq.) C. DC.

PAULO CHANEL DEODATO DE FREITAS

Tese para obtenção do grau de
DOUTOR

Orientadora:

Profa. Tit. SILVIA BERLANGA DE MORAES BARROS

SÃO PAULO
1999

PAULO CHANEL DEODATO DE FREITAS

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ESPÉCIES MEDICINAIS DA

FAMÍLIA *PIPERACEAE*: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.

E *Piper regnellii* (Miq.) C. DC.

Comissão Julgadora

**Tese para obtenção do grau de
DOUTOR**

Profa. Tit. Silvia Berlanga de Moraes Barros
Orientadora/Presidente

Prof. Dr. Jayma Antônio Aboin Sertié
1º. Examinador

Prof. Dr. José Carlos Tavares de Carvalho
2º. Examinador

Prof. Dr. José Jorge Neto
3º. Examinador

Prof. Dr. Luiz Antônio Gioielli
4º. Examinador

São Paulo, 09 de março de 1999.

' O amor é paciente; o amor é bondoso; não é invejoso; o amor não é arrogante, nem se ensoberbece; não faz o que é inconveniente, não busca o seu interesse , não se irrita, não toma em conta a ofensa; não tem prazer na injustiça, mas, se alegra com a verdade; ele tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta.

O amor não passa jamais. As profecias, ao contrário, desaparecerão; as línguas cessarão; a ciência desaparecerá. Porque imperfeito é o nosso conhecimento, e imperfeita a nossa profecia. Mas quando vier o que é perfeito, desaparecerá o que é imperfeito. '

Cor. 13, 4-10.

A Deus.
Sempre presente.

A memória de meus pais.

À professora Dra. Sílvia Berlanga de
Moraes Barros. Pela orientação serena,
pelos momentos de reflexão e pelo
exemplo, pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

Aos pós-graduandos, bolsistas e técnicos do laboratório de Patologia do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da FCF-USP, cujo trabalho, às vezes anônimo, se concretiza em oportunidades como esta.

Ao colega e professor Dr. Fernando de Oliveira, responsável pela formação e início de muitos estudos e estudiosos na área da Farmacognosia. Inclusive este.

Aos sempre “colegas e professores” do Bloco 15 da FCF-USP: doutores Roberto Wasicky, Gokithi Akisue, Maria Kubota Akisue (*in memoriam*), Ramon C. Guitian, Elfriede M. Bacchi, Vicente de Oliveira Ferro, Edna T. M. Kato, Dominique C. H. Fischer, por todos estes anos de trabalho em harmoniosa convivência.

Às secretárias do Bloco 15, de modo especial a Elisabete Claro de Souza Paiva. À Celi, Lucilene, Luiz, pela constante atenção e disponibilidade.

À Secretaria da Pós-Graduação: Benê, Elaine, Josi e Jorge pela especial atenção dedicada a nós em todos estes anos.

Ao Dr. Mário G. Cardozo, da empresa Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc., pelo cálculo dos coeficientes de partição dos compostos químicos testados.

Ao Geraldo Alves da Silva, pelo companheirismo, e a Maria Inês de Almeida Gonçalves pelo auxílio na confecção deste trabalho.

À Patrícia Sartorelli do Instituto de Química da USP pelo fornecimento do composto conocarpano.

Aos nossos alunos de Farmácia, de modo especial os da disciplina de Biofarmacognosia que, de um modo ou de outro, constituem o estímulo e a razão do nosso trabalho.

Aos atuais e ex-técnicos e auxiliares do Bloco 15, o nosso muito obrigado.

A todos que de maneira direta ou indireta nos auxiliaram e permitiram a conclusão deste trabalho.

ÍNDICE

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O Oxigênio e os Compostos Antioxidantes na Natureza	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Os Princípios Ativos Naturais	2
2.2 A família Piperaceae Link	18
2.2.1 Aspectos etnobotânicos	18
2.2.2 Aspectos químicos e farmacológicos	20
2.3 Oxidação e Ação Antioxidante	23
2.4 Oxidação, Antioxidantes e Saúde	30
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Material Botânico	34
4.2 Avaliação Preliminar da Atividade Antioxidante	37
4.2.1 Determinação espectrofotométrica <i>in vitro</i> da atividade antioxidante dos diversos extratos hidroalcoólicos (raízes, caules, folhas) no sistema β -caroteno / ácido linoléico	37
4.2.2 Avaliação preliminar da atividade antioxidante dos diversos extratos hidroalcoólicos por cromatografia em camada delgada	38
4.3 Obtenção dos Extratos Vegetais para Testes em Substrato Biológico	40
4.3.1 Medida da capacidade antioxidante dos extratos secos de raízes, caules e folhas de <i>Pothomorphe umbellata</i> e de <i>Piper regnellii</i>	41
4.3.1.1 Obtenção do substrato biológico - homogenato de cérebro	41
4.3.1.2 Medida dos produtos de oxidação que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS)	42
4.3.1.3 Medida da quimiluminescência	43
4.3.1.4 Determinação do $Q_{1/2}$ dos extratos e compostos submetidos à avaliação antioxidante	44
4.4 Fracionamento e purificação do extrato seco de raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i> . Busca do(s) componente(s) ativo(s)	45
4.4.1 Determinação do coeficiente de partição	46
5. RESULTADOS	47

5.1	Avaliação preliminar da atividade antioxidante dos diversos órgãos vegetais - raiz, caule e folhas - de <i>P. regnellii</i> e <i>P. umbellata</i>	47
5.1.2	Cromatografia em camada delgada - revelação com β -caroteno	56
5.2	Medida da capacidade antioxidante dos extratos secos dos diversos órgãos - raiz, caule e folhas - de <i>Piper regnellii</i> e de <i>Pothomorphe umbellata</i> , em homogenato de cérebro	58
5.2.1.	Determinação do $Q_{1/2}$ dos extratos secos dos órgãos vegetais de <i>Piper</i> <i>regnellii</i> e <i>Pothomorphe umbellata</i>	63
5.3	Fracionamento do Extrato Seco de Raízes de <i>Pothomorphe umbellata</i> . Análise das Frações e Determinação do Componente Ativo	64
5.3.1	Caracterização do componente ativo	66
5.4	Avaliação Comparativa da Capacidade Antioxidante de 4-Nerolidilcatecol com α -Tocoferol	70
5.4.1	Inibição da lipoperoxidação e quimiluminescência em homogenato de cérebro	70
5.4.2	Determinação dos valores de $Q_{1/2}$	73
5.5	Coeficientes de Partição do 4-nerolidilcatecol e de Alguns Compostos Químicos Relacionados Determinados pelo Programa $C \log P$ (P).....	74
6.	DISCUSSÃO	75
7.	CONCLUSÕES	95
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1. Resíduo seco dos extratos hidroalcoólicos testados.....	47
Tabela 2. Determinação espectrofotométrica - sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico da raiz de <i>Piper regnellii</i>	48
Tabela 3. Determinação espectrofotométrica – sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico do caule de <i>Piper regnellii</i>	49
Tabela 4. Determinação espectrofotométrica – sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico do folha de <i>Piper regnellii</i>	50
Tabela 5. Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos dos diversos órgãos vegetais de <i>Piper regnellii</i>	51
Tabela 6. Determinação espectrofotométrica – sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico da raiz de <i>Pothomorphe umbellata</i>	52
Tabela 7. Determinação espectrofotométrica - sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico do caule de <i>Pothomorphe umbellata</i>	53
Tabela 8. Determinação espectrofotométrica – sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico da folha de <i>Pothomorphe umbellata</i>	54
Tabela 9. Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos dos diversos órgãos vegetais de <i>Pothomorphe umbellata</i>	55
Tabela 10. Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenado de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato das raízes de <i>Piper regnellii</i>	59
Tabela 11. Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenado de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato dos caules de <i>Piper regnellii</i>	59
Tabela 12. Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenado de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato das folhas de <i>Piper regnellii</i>	59
Tabela 13. Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenado de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato das raízes de <i>Pothomorphe umbellata</i>	61

Tabela 14. Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenado de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato dos caules de <i>Pothomorphe umbellata</i>	61
Tabela 15. Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenado de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato das folhas de <i>Pothomorphe umbellata</i>	61
Tabela 16. Coeficiente de partição dos compostos químico fenólicos calculados segundo o programa ClogP	74

LISTAS DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - <i>Piper regnellii</i> (Miq). C. DC.: exemplar adulto.....	35
Figura 2 - <i>Piper regnellii</i> (Miq). C. DC.: exemplar folhas.....	35
Figura 3 - <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq.: exemplar adulto.....	36
Figura 4 - <i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq.: exemplar folhas.....	36
Figura 5 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da folha de <i>P. regnellii</i>	48
Figura 6 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico do caule de <i>P. regnellii</i>	49
Figura 7 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da folha de <i>P. regnellii</i>	50
Figura 8 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da raiz de <i>P. umbellata</i>	52
Figura 9 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico do caule de <i>P. umbellata</i>	53
Figura 10 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da folha de <i>P. umbellata</i>	54
Figura 11 - Perfil da cromatografia em camada delgada dos extratos de raiz, caule e folha de <i>Pothomorphe umbellata</i> e <i>Piper regnellii</i> . Revelação com β -caroteno e observação após 24 horas.	56
Figura 12 - Perfil da cromatografia em camada delgada da fração clorofórmica obtida do extrato folha de <i>Piper regnellii</i> . Revelação com β -caroteno e observação após 24 horas.....	57
Figura 13 - Perfil da cromatografia em camada delgada da fração clorofórmica obtida do extrato folha de <i>Piper regnellii</i> . Revelação com β -caroteno e observação após 24 horas, com padrão de conocarpano.	57
Figura 14 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea de homogenato de cérebro (TBARS) pelos extratos de raiz, caule e folha de <i>Piper regnellii</i>	60
Figura 15 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea de homogenato de cérebro (TBARS) pelos extratos de raiz, caule e folha de <i>Pothomorphe umbellata</i>	62

Figura 16 - Valores de $Q_{1/2}$ dos extratos de <i>Piper regnellii</i> e <i>Pothomorphe umbellata</i> . Inibição de lipoperoxidação (TBARS) em homogenato cérebro.	63
Figura 17 - Curva de absorção de U.V. da solução etanólica da fração 7 obtida a partir do fracionamento do extrato de raízes de <i>P. umbellata</i>	64
Figura 18 - Curva de absorção de U.V. da solução alcoólica da fração 8 obtida a partir do fracionamento do extrato de raízes de <i>P. umbellata</i>	65
Figura 19 - Espectro de RMN de ^1H a 200 MHz da fração 7 obtida a partir do fracionamento do extrato de raízes de <i>P. umbellata</i>	67
Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H a 200 MHz da fração 8 obtida a partir do fracionamento do extrato de raízes de <i>P. umbellata</i>	68
Figura 21 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (TBARS) e de quimiluminescência (QL) de homogenato cérebro.....	71
Figura 22 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (TBARS) e de quimiluminescência (QL) de homogenato cérebro, pelo composto α -tocoferol.....	72
Figura 23 - Valores comparativos de $Q_{1/2}$ dos compostos 4-nerolidilcatecol e α -tocoferol. Inibição da lipoperoxidação (TBARS) e da quimiluminescência (QL) em homogenato cérebro.....	73
Figura 24 - Regeração da vitamina E pela vitamina C no processo oxidativo dos lipídios de membranas.....	89
Figura 25 - Representação esquemática da difusão do radical peroxila da fase lipídica para a região polar da membrana na direção do antioxidante hidrofílico - Trolox	89
Figura 26 - Etapas da lipoperoxidação e membranas	90

RESUMO

As plantas medicinais constituem importante recurso terapêutico no tratamento da saúde humana, principalmente das nações em desenvolvimento. Servem tanto à conhecida “medicina caseira”, que faz parte da cultura popular destes países, como de matéria prima para elaboração de medicamentos fitoterápicos ou extração de compostos químicos farmacologicamente ativos.

O presente trabalho estuda duas espécies medicinais da família Piperaceae, conhecidas popularmente como pariparoba, e usadas para o tratamento de problemas do fígado: *Piper regnellii* (Miq.) D.C.D. e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., esta inscrita na primeira edição da Farmacopéia Brasileira.

Foram avaliadas, comparativamente, as capacidades antioxidantes dos extratos hidroalcoólicos das folhas, caules e raízes das duas espécies vegetais, utilizando uma combinação de modelos experimentais: 1) co-oxidação de substrato constituído por β -caroteno/ácido linoléico com determinação espectrofotométrica da cinética do processo oxidativo e por cromatografia em camada delgada, utilizando como revelador o carotenóide. 2) inibição da lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro com determinação das substâncias geradas no processo e que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), bem como a medida da inibição da quimiluminescência espontaneamente emitida.

Do extrato das raízes de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. foi isolado e caracterizado o composto fenólico 4- nerolidilcatecol como o responsável pela maior atividade antioxidante deste órgão vegetal. No modelo que utiliza o homogenato de cérebro como substrato, o composto catecólico demonstrou uma capacidade antioxidante aproximadamente 20 vezes superior à do α -tocoferol usado como referência. Complementarmente, as folhas da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.D.C. mostraram-se potencialmente ativas, estimulando a continuidade do trabalho no sentido de caracterizar o(s) componente(s) ativo(s), à semelhança do que foi feito com as raízes de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.

SUMMARY

Medicinal plants are an important therapeutic resource in human health care mainly in developing nations. They are used in herbal medicine, a tradition in those countries, as well as raw material for the manufacture of phytomedicinals and the extraction of pharmacological active compounds.

In this research two medicinal species of the Piperaceae family are studied, known by the popular name *pariparoba* and used in treatment of liver diseases: *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. and *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq., the last one included in the first edition of the Brazilian Pharmacopoeia.

The antioxidant properties of hidroalcoholic extracts of leaves, stems and roots of both species were appraised by means of a combination of experimental models: 1) co-oxidation of β -carotene/ linoleic acid with spectrophotometric determination of the oxidation process kinetic and TLC applying the carotenoid as detection agent 2) inhibition of spontaneous lipoperoxidation in rat brain homogenate, determining thiobarbituric reactants formed in the process (TBARS) and measuring the inhibition of the spontaneous chemiluminescence.

From the root extract of *Pothomorphe umbellata* a phenolic compound, 4-nerolidycathecol, was isolated and found to be the major antioxidant constituent of this plant organ. With the brain-homogenate model it was possible to demonstrate a 20 times higher activity of the catecholic compound when compared with α -tocopherol. In addition the leaves of *Piper regnellii* showed to be potentially active justifying further research to identify active compounds.

INTRODUÇÃO

O Oxigênio e os Compostos Antioxidantes na Natureza

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Oxigênio e os Compostos Antioxidantes na Natureza

Desde o seu aparecimento sobre a superfície terrestre o oxigênio mantém, com os seres vivos, uma relação que melhor se define por convivência: vai da essencialidade para grande parte deles, e por isso chamados de aeróbios, até a letalidade para os anaeróbios. E, cada dia mais, a ciência evidencia que o aparecimento de vários processos vitais, sua evolução e manutenção, foram e são diretamente influenciados pela presença e pelos níveis de oxigênio da atmosfera de nosso planeta:

A vida sobre a terra teve o seu início em uma atmosfera em anoxia, entre 4 e 3 bilhões de anos atrás. Após este período: níveis acentuadamente crescentes de oxigênio, a partir dos 2 bilhões de anos, até atingir o teor de, aproximadamente, 21% há cerca de 400 milhões de anos, patamar que se mantém até os nossos dias (Brasier, 1979; Wayne, 1988).

Dos fenômenos essenciais à vida sobre a terra, a fotossíntese, processo de síntese de matéria orgânica com o aproveitamento da energia solar e auxílio de reações de transferência de elétrons é, sem dúvida, um dos mais importantes. Sendo caracteristicamente anabólico o processo fotossintético exige uma fonte de elétrons que na atmosfera primitiva era representada pelo gás sulfídrico (H_2S) por volta de 2.300 milhões de anos atrás e que foi, posterior e gradativamente, sendo substituída pela água (H_2O) nos organismos fotossintetizantes (Schopf, 1978). A consequência das transformações ocorridas nesta etapa de transição: aproveitamento das moléculas de água na fotossíntese, acopladas ao processo catabólico e oxidativo conhecido por *respiração*, foi o incremento da porcentagem de

oxigênio (O_2) atmosférico ocorrido no período de 500 a 400 milhões de anos conforme anteriormente citado.

Assim, o processo de fotossíntese realizado nos cloroplastos de órgãos vegetais verdes como as folhas e caules, ao envolver o fenômeno de foto-oxidação e a conseqüente liberação de oxigênio, acaba por criar nas proximidades das estruturas onde se processa um micro-ambiente com concentrações mais altas de oxigênio se comparadas ao ambiente externo. Soma-se a isto a incidência dos raios de maior energia da região do U.V. (cujo comprimento de onda é inferior a 400 nm) que constituem em torno de 4% da luz solar e que são potencialmente deletérios a diversas moléculas das estruturas celulares constitutivas dos tecidos vegetais, como os aminoácidos de proteínas essenciais, ácidos nucleicos e lipídios de membranas.

A este complexo Barry Halliwell chama de “*sistema com problemas*”, uma vez que as reações metabólicas envolvendo a transferência de elétrons durante o processo fotossintético constituem potenciais fontes geradoras de átomos, íons e moléculas com estados eletrônicos excitados, às vezes contendo elétrons desemparelhados e denominados radicais livres (Halliwell & Gutteridge, 1989). Se o elemento químico for o oxigênio formar-se-ão as espécies reativas de oxigênio (ERO's), a saber:

- radical ânion superóxido ($O_2 \cdot^-$)
- radical hidroxilo ($HO \cdot$)
- peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e

oxigênio singlete (1O_2)

O peróxido de hidrogênio não é por si só altamente nocivo às moléculas biológicas mais importantes, mas é um precursor intracelular de espécies reativas fortemente oxidantes como o radical hidroxilo.

Uma aproximação da extensão do problema pode ser feita considerando a conclusão de pesquisadores (Dalton, 1997) de que aproximadamente 1% do oxigênio consumido pelas plantas se "transforma" em *espécies reativas*.

Sabe-se que as ERO's podem reagir com macromoléculas orgânicas como proteínas, ácidos nucleicos, carboidratos e lipídios causando lesões a diversas estruturas biológicas. Muitas vezes subtraem prótons, dessas estruturas transformando-as em potenciais e danosas espécies radicalares com elétrons desemparelhados que iniciam reações em cadeia de poder altamente destrutivo. O mais estudado é o fenômeno conhecido por *lipoperoxidação* onde estão envolvidos os ácidos graxos poliinsaturados, constituintes fundamentais das membranas biológicas.

A modulação ou controle desses fenômenos pode ser conseguida com a intervenção de substâncias que interagem com tais compostos radicalares reativos. Estas substâncias moduladoras são denominadas de "quelantes" ou "seqüestradoras" de radicais livres por capturá-los mesmo ou inibirem sua ação.

Os próprios vegetais desenvolveram, desta forma, mecanismos específicos de defesa, elaborando compostos químicos de natureza diversa: *proteínas* que passaram a fazer parte de uma primeira linha de defesa, participando de sistemas enzimáticos e outros *compostos* que, servindo como agentes moderadores do *processo oxidativo*, desempenham o papel de antioxidantes.

Dentro do que poder-se-ia denominar como uma primeira linha de defesa destacam-se as enzimas específicas, cujas ações são hoje conhecidas:

- catalase (CAT), que é uma enzima bastante abundante largamente distribuída no reino vegetal (Larson, 1988), catalisa a reação:

- superóxido dismutase (SOD) que acelera a dismutação do íon superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio de acordo com a equação:

A enzima age tendo metais como co-fatores e classificando-se em três tipos, de acordo com a dependência de: cobre e zinco (CuZnSOD); ferro (FeSOD) e manganês (MnSOD) (Banister et al., 1987). As plantas contêm os três tipos de SOD localizadas em diferentes organelas de acordo com a necessidade, sendo que numa célula típica de folha a SOD é mais abundante nos cloroplastos do que no citosol já que a molécula $\text{O}_2^{\cdot-}$ tendo carga elétrica tem grande dificuldade de atravessar as membranas celulares (Larson, 1988).

- sistema glutathiona, ascorbato peroxidase particularmente abundante nos cloroplastos, mas ocorrendo também no citosol, atua no combate a peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos e sua atividade depende do tripeptídeo glutathiona (Dalton et al., 1986).

Fazendo parte de uma linha de defesa intermediária, chamada por alguns autores de *sistema secundário* aparece a glutatona, um tripetídio que na sua forma reduzida apresenta um grupo sulfidril (GSH) sendo, nas plantas, encontrado em altas concentrações nos cloroplastos (Rennenberg, 1982). A glutatona é bastante efetiva no combate aos radicais hidroxilo ($\text{HO}\cdot$), mas exerce também importante função nos organismos vivos como agente "reparador" de estruturas radicalares como mostra a equação:

Atuando numa outra linha de defesa aparece um sistema complementar constituído por um conjunto de compostos originários do metabolismo secundário dos vegetais apresentando, alguns, carácter lipofílico ou hidrofóbico e outros, carácter hidrofílico.

Cabe destacar que algumas destas substâncias incorporaram o oxigênio através de diferentes caminhos biossintéticos acabando por exercer importante papel antioxidante (Gottlieb, 1989): pela via do ácido acético, passando ou não pelo ácido mevalônico, originam-se os compostos *terpenóides* e *carotenóides*; pela via do ácido chiquímico são elaborados os compostos conhecidos por *fenilpropanóides* e seus derivados oxigenados que constituem o importante grupo dos antioxidantes relacionados ao ácido cinâmico e seus *derivados fenólicos*, além daqueles compostos formados pela conjugação dos dois caminhos biossintéticos anteriores - acetato e mevalonato - como no caso dos *tocoferóis* e dos *flavonóides* (Cuppett, 1998).

Via Biossintética do Ácido Chiquímico

Estas vias biossintéticas fazem parte do chamado metabolismo secundário dos vegetais formando, conseqüentemente, os metabólitos secundários (Williams et al., 1989) dentro dos quais se inclui a maioria dos compostos químicos vegetais farmacologicamente ativos e utilizados na terapêutica com o nome de princípios ativos naturais (Evans, 1996). Serão os antioxidantes vegetais princípios ativos naturais?

REVISÃO DA LITERATURA

Os Princípios Ativos Naturais

A família Piperaceae Link

Aspectos etnobotânicos

Aspectos químicos e farmacológicos

Oxidação e Ação Antioxidante

Oxidação, Antioxidantes e Saúde

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os Princípios Ativos Naturais

As plantas, se observadas sob o ponto de vista biossintético, podem ser consideradas como *fabricantes* de tão vasta gama de *compostos químicos* que os estudiosos e pesquisadores sugeriram, até para efeito didático, dividi-los em 2 grandes grupos. De um lado, os constituintes do que se denominou *metabolismo primário* onde são considerados os carboidratos, os lipídios e as proteínas. De outro, os compostos do metabolismo secundário, aparecendo então os alcalóides, os flavonóides, os taninos e assim por diante (Willians et al., 1989). Desta forma, curiosamente, a síntese e função dos compostos enzimáticos, e portanto, do metabolismo primário e até do sistema de defesa antioxidante, constitui alvo das pesquisas mais ligadas aos grupos de estudo de *bioquímica* vegetal. Aqueles dedicados ao estudo do metabolismo secundário estão quase sempre agrupados em torno de uma área conhecida como de *fitoquímica*.

Portanto, a se considerar este último campo - o da investigação fitoquímica - a literatura especializada apresenta poucos trabalhos relacionados com a atividade antioxidante de compostos do metabolismo primário dos vegetais. São citados os aminoácidos como a arginina, alanina, histidina, cisteína e o triptofano testados, especialmente, na área de alimentos (Gopala Krishna, 1994; Larson, 1988). Compreensivelmente, neste setor, as substâncias originárias do metabolismo secundário têm merecido cada vez mais a atenção dos pesquisadores no sentido de se detectar sua ação biológica, inclusive a antioxidante.

Alguns compostos nitrogenados, integrantes do metabolismo secundário, os **alcalóides**, foram ensaiados com este propósito, dentre eles os alcalóides indólicos, a estricnina e a brucina da noz vômica (Gorman et al., 1984); os derivados benzilisoquinólicos como a apomorfina, a boldina, a glaucina demonstraram atividade inibidora a peroxidação lipídica *in vitro* em homogenato de cérebro (Ubeda et al., 1992; Cassels et al., 1995) tendo a boldina sido alvo de muitos estudos visando elucidar o seu modo de ação e utilizando como modelo a peroxidação de membranas eritrocitárias de ratos (Larson & Marley, 1984; Speisky, et al., 1991). O potencial antioxidante da cafeína frente à lipoperoxidação induzida em microsomas de fígado de ratos foi demonstrado por pesquisadores indianos (Devasagayam et al., 1996), o que, em 1991, já tinha sido provado para os alcalóides indólicos β -carbólicos - harmana, harmina, harmol, harmalina e harmalol - (Tse, et al., 1991).

estricnina

brucina

cafeína

boldina

harmana

harmina

harmol

O ácido alfa-lipóico (e sua forma reduzida - ácido dihidrolipóico) é um outro constituinte interessante do metabolismo secundário vegetal contendo átomos de enxofre em sua molécula. Começou a ser melhor pesquisado no final da década de 1950 por prevenir os sintomas da falta das vitaminas C e E em ratos (Rosenberg & Culik, 1959) ocorrendo, também, em outros microorganismos e organismos animais onde age como coenzima e fator de crescimento. Apresentou uma efetiva ação sequestrante de radicais peroxil e sua ação se dá tanto a nível de membrana como na fase aquosa de sistemas antioxidantes mais complexos (Suzuki et al, 1991) chegando a ser chamado de “antioxidante ideal” (Kagan et al., 1992).

O ácido ascórbico ou vitamina C, que em algumas frutas ocorre em níveis de até 1%, é reconhecidamente um agente antioxidante tendo sido demonstrada sua ação sequestrante de espécies reativas de oxigênio singlete (Chou & Khan, 1983) e de radical superóxido (Bendich et al., 1986; Niki, 1991). Estudos mostraram ainda sua ação sinérgica com a vitamina E funcionando como potente agente redutor e regenerador da eficácia antioxidante dos tocoferóis (Bisby & Ahmed, 1989; Buettner, 1993)

Ácido ascórbico (vitamina C)

Dentre a classe dos **carotenóides** que têm reconhecida função na absorção de energia e proteção das clorofilas durante a fotossíntese (Krinsky, 1989), o β -caroteno foi bastante investigado quanto à sua capacidade de inibir os efeitos nocivos das espécies reativas de oxigênio principalmente de oxigênio singlete em reações de lipoperoxidação (Jialal et al., 1991; Conn et al., 1992; Burton & Ingold, 1984; Ozhogina & Kasakaina, 1995), tendo os pesquisadores C. S. Foote e colaboradores iniciado suas pesquisas sobre o tema no final da década de 1960 (Foote & Denny, 1968; Foote et al., 1970).

A eficácia antioxidante do licopeno foi provada por vários pesquisadores, principalmente como agente seqüestrante do oxigênio singlete (DiMascio et al., 1989; Hirayama et al., 1990), tendo sido evidenciado que o aumento do número de insaturações na molécula dos carotenóides melhora o desempenho de sua atividade como antioxidante (Conn et al., 1992).

Outros carotenóides oxigenados: a luteína, a astaxantina, cantaxantina, a zeaxantina, com função álcool, também foram testados e comparados ao β -caroteno quanto à capacidade protetora de lipídios contra a oxidação provocada por radicais livres (Terao, 1989; Lim et al., 1992).

beta-caroteno

luteína

cantaxatina

licopeno

astaxantina

Entretanto, é dentre os **compostos fenólicos** que se encontra a maioria de componentes químicos vegetais com atividade antioxidante (Larson, 1988). Os tocoferóis descobertos há mais de 1970 anos são, sem dúvida, os mais importantes e dentre os oito isômeros possíveis, quatro (α , β , γ e δ) são os mais abundantes na natureza. O α -tocoferol ou vitamina E é o que apresenta maior atividade antioxidante (Shahidi & Wanasundara, 1992; Van Acker, 1993). O mecanismo de ação dos tocoferóis foi exaustivamente pesquisado desde o início da década de 70, estudo que foi aprofundado pelos pesquisadores Burton e Ingold determinando o poder antioxidante dos vários isômeros e estabelecendo a relação estrutura-atividade para a maioria deles (Burton & Ingold, 1981; Burton, Hughes & Ingold, 1983; Van Acker et al., 1993).

Um grupo importante de antioxidantes é constituído pelos compostos denominados **fenilpropanóides**, derivados dos aminoácidos aromáticos fenilalanina e tirosina, ou, em alguns casos, dos intermediários do processo de biossíntese do ácido chiquímico (Robbers et al., 1996). Dentro desta categoria se incluem diversos ácidos fenólicos estudados quanto à sua capacidade de inibir os processos de oxidação (Taira et al., 1992) como o ácido cinâmico, o ácido cumárico (Toda et al., 1991), o ácido cafeíco, o ácido clorogênico, o ácido ferúlico (Graf, 1992; Scott et al., 1993), o ácido sinápico (Yanishlieva & Marino, 1995) e seus derivados. Do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) foi pesquisada a atividade inibidora de lipoperoxidação do componente principal, o fenilpropanóide eugenol e evidenciada sua eficácia na captura de radicais hidroxilo (Taira et al., 1992; Toda, 1994; Nagababu & Lakshmaiah, 1994).

Os produtos do metabolismo secundário das espécies de Piperaceae são oriundos de via biossintética mista (chiquimato/acetato), resultando na produção de amidas, flavonóides, ácidos benzóicos prenilados ou de compostos aromáticos essencialmente fenilpropanóides, inclusive do tipo lignanas e neolignanas (Parman et al., 1997).

Fenilpropanóides do metabolismo secundário de vegetais

eugenol

Os **flavonóides** ocupam lugar de destaque nas pesquisas mais recentes de compostos vegetais antioxidantes, tanto pela abundância nos vegetais onde se encontram como pelo grande número de estruturas flavonoídicas possíveis. Isto se deve à variabilidade dos padrões de substituição das hidroxilas em seus três anéis e dos diferentes estados de oxidação (Rice-Evans et. al., 1995), que acabam por determinar seu poder antioxidante (Arora & Nair, 1998; Lien et al., 1999). Os estudos se iniciaram com os compostos precursores dos flavonóides, as chalconas (Dziedzic & Hudson, 1983) e a correlação de parâmetros estruturais com a ação antioxidante bem como com o mecanismo de ação foram exaustivamente investigados nos últimos anos (Yuting et al., 1990; Javanovic et al., 1994; Rice-Evans, 1995; Van Acker et al., 1996; Croft, 1998).

chalconas

flavonóides

Um pigmento vegetal de cor laranja conhecido por curcumina, presente nos rizomas e de cúrcuma (*Curcuma longa*) apresentou em alguns ensaios *in vitro* potente atividade inibidora de lipoperoxidação catalisada por íons ferro (Jitoe et al., 1992; Sreejayan, 1994).

A capacidade antioxidante de outros **compostos terpênicos** também de natureza fenólica foi determinada por diversos pesquisadores que têm buscado a descoberta de novas moléculas antioxidantes em algumas famílias vegetais, dentre elas, a família Lamiaceae (Chang et al., 1977; Economou et al., 1991) e Apiaceae (Lamaison et al., 1990). Assim, do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e da sálvia (*Salvia officinalis*) foram isolados e avaliados os diterpenos: carnosol, o ácido carnósico, o rosmanol, o isorosmanol (Inatani et al., 1983; Aruoma et al., 1992), do tomilho (*Thymus vulgaris*), o timol e carvacrol (Aeschbach et al., 1994).

carnosol

rosmaridifenol

ácido carnósico

ácido rosmarínico

Outros derivados polifenólicos, os **taninos**, principalmente os derivados do ácido gálico, conhecidos por galitaninos ou taninos hidrolisáveis, demonstraram atividade antioxidante em alguns modelos *in vitro* (Haslam, 1996), sendo este efeito atribuído, em grande parte, ao próprio ácido gálico (Aruoma et al., 1993). Os mecanismos de ação propostos, vão desde complexantes de metais até seqüestrantes de espécies reativas de oxigênio, principalmente, radicais peroxil, como ficou comprovado para os taninos de *Hamamelis virginiana* (Masaki et al., 1995).

O que se pode observar, portanto, é que uma extensa gama de compostos químicos pertencentes às mais diversas funções e estruturas, desde aminoácidos até polifenóis complexos, como os taninos, foram estudados e avaliados por *diferentes parâmetros* quanto a sua capacidade antioxidante. Todas estas constatações e a diversidade dos métodos de pesquisa, apesar de extremamente interessantes sob o ponto de vista de permitir a descoberta de novos agentes potencialmente ativos do reino vegetal, têm tornado evidente a dificuldade de uma racionalização da atividade antioxidante no que diz respeito a mecanismos e locais de ação dos composto testados, seus possíveis agentes sinergistas ou mesmo antagonistas.

2. 2 A família Piperaceae Link

2. 2.1 Aspectos etnobotânicos

A família Piperaceae Link, segundo o sistema de classificação de Cronquist, Takhtajan & Zimmermann (Cronquist, 1981), pertence à divisão Magnoliophyta Cronquist, Takhtajan, Zimmermann; classe Magnoliopsida Cronquist, Takhtajan, Zimmermann; subclasse I. Magnoliidae Takhtajan; ordem 3. Piperales Lindley, sendo citada como uma das famílias primitivas dentre as dicotiledôneas (Cronquist, 1988; Bhattacharyya, 1998).

É formada por cerca de 10 gêneros e um número bastante incerto de espécies, com uma estimativa de estar compreendido entre 1400 a mais de 2000, sendo a maioria pertencente aos dois principais: *Piper* L. e *Peperomia* Ruiz et Pavon, distribuídos principalmente nas regiões tropicais do mundo (Cronquist, 1981). Apresentam-se como plantas na sua maior parte variando de herbáceas a arbustivas, às vezes escandentes, raramente árvores. Muitas espécies apresentam caules tortuosos. Folhas pecioladas, simples, inteiras, às vezes carnosas, alternas, raramente opostas, com estípulas ausentes. Inflorescência densa em forma de espiga. O gênero *Pothomorphe* Miquel, com aproximadamente 10 espécies, é originário da América do Sul (Bhattacharyya, 1998).

Piper nigrum L. (pimenta preta), cujos frutos constituem um dos mais importantes e utilizados condimentos do mundo e, recentemente, foi introduzido na terapêutica moderna o extrato de raízes de kava-kava, como é conhecida *Piper methysticum* Forster, como medicamento ansiolítico constituem, sem sombra de dúvida, os dois exemplos mais famosos da família (Evans, 1996).

No continente sul-americano, e mais especificamente em nosso país, várias espécies da família têm sido usadas medicinalmente, estando incluídas na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (Silva, 1926): *Piper angustifolium* Ruiz et Pavon, de nome vulgar matico ou erva de soldado tendo como partes usadas as folhas. São indicadas como hemostático, adstringente nas hemoptises e tratamento das diarreias e externamente utilizado nas feridas hemorrágicas, úlceras e leucorréias (Coimbra, 1958). De igual forma estão descritos os frutos de *Piper cubeba* L. de uso como estimulante estomacal, como balsâmico e expectorante nas afecções catarrais das vias respiratórias e anti-séptico das vias respiratórias (Angely, 1958) e *Heckeria umbellata* (L.) Kunth [sinonímia de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.] com os nomes vulgares de caapeua, capeba, caena, catajé e aguaxima, tendo como parte usada a raiz. (Silva, 1929). Tem o uso como colagogo, sendo seu emprego mais generalizado nos ingurgitamentos do fígado e do baço (Coimbra, 1958).

Ainda fazendo parte da medicina popular dos países latino-americanos *Piper aduncum* L. é conhecida no Brasil como pimenta de macaco e aperta-ruão, tem uso como estimulante digestivo, no mal estar do estômago, nas afecções das vias urinárias e como antidiarréico, diurético e nas doenças do fígado (Gupta, 1995; Coimbra, 1958). *Piper marginatum* Jacq., por sua vez, é empregada nos casos de hemorragias nasais e em feridas, menorragia, irritação nos olhos e como estimulante digestivo e emenagoga. Além de ser útil nos resfriados, dores de cabeça e como hemostático externo (Gupta, 1995).

Da cultura ameríndia foi herdado o nome de *pariparoba* (amargo que acaba com as feridas) ou *caapeba* (folha grande) dado às espécies vegetais do gênero *Pothomorphe* Miquel (Riedel, 1941). Na parte sul e sudeste do nosso país é mais conhecida a espécie *P. umbellata* (L.) Miq. e na região

norte, a espécie *P. peltata* (L.) Miq. também chamada caapeba do norte (Pio Correa, 1978), tendo as duas o mesmo uso.

No início da década de 40, quase simultaneamente, foram publicados os trabalhos de Waldemar Peckolt do sul de nosso país e de Osvaldo Riedel do nordeste brasileiro sobre o estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth destacando as virtudes da planta no tratamento de problemas do fígado como forte colagogo (Riedel, 1941; Peckolt, 1941).

Por outro lado, é fato bastante comum na medicina popular do Brasil, confundir ou atribuir um mesmo nome vulgar a uma ou mais espécies vegetais, tanto pela semelhança morfológica como pelo seu idêntico uso. É o caso da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C.DC var. *regnellii* que a população também chama de pariparoba ou caapeba (Pio Correa, 1978; Salatino & Silva, 1975) e usa-a de igual forma para os problemas de fígado (Camargo, 1988).

2.2.2 Aspectos químicos e farmacológicos

Sob o ponto de vista químico a família Piperaceae Link é citada pela presença de ésteres e éteres fenólicos, alcalóides pirrolidínicos, óleos voláteis e lignanas (Gibbs, 1974; Evans, 1996). O mais pesquisado é, sem dúvida, o gênero *Piper* L. tendo sido isoladas várias substâncias pertencentes a algum dos grandes grupos como: alcalóides, principalmente os amídicos, (pirrolidínicos e piperidínicos), lignanas, flavonóides, lactonas (kava-lactonas), butenólidos e ciclohexano-epóxidos (Calle-Alvarez, 1983; Burke & Nair, 1986; Sengupta & Ray, 1987).

Das espécies de Piperaceae que constam nas diversas edições de nossa Farmacopéia são muito raros os estudos químico-farmacológicos tendo Bernhard e Thiele, em 1978, isolado o dilapiol das folhas de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth (Bernhard & Thiele, 1978) e dois anos depois, Kijjoa e colaboradores isolaram e identificaram das raízes desta espécie o composto fenólico 4-nerolidilcatecol (Kijjoa et al., 1980). No óleo essencial de *Piper angustifolium* Ruiz et Pavon que exibiu atividade bacteriostática e fungistática foram detectados como principais componentes terpenóides cânfora e canfeno (Tirillini et al., 1996).

A espécie *Potomorphe peltata* (L.) Miq., conhecida no Brasil por capeba do norte, foi pesquisada em 1992 num projeto de triagem de substâncias anticancerígenas e antivirais do Instituto Nacional do Câncer do Estados Unidos, tendo sido isolados três dímeros prenilados de catecol os quais demonstraram atividade anti-HIV, sendo batizados como peltatóis A, B e C. Foi também isolado o composto monomérico, não ativo, o 4-nerolidilcatecol (Gustafson et al., 1992).

A composição química da espécie *Piper regnellii* (Miq.) C. DC, comumente confundida com a pariparoba farmacopeica, e também alvo do nosso trabalho, foi pesquisada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo tendo sido isolados e identificados por métodos espectrométricos mais de 10 neolignanas e compostos fenilpropanóides (Benevides, 1996).

São muito raros os estudos farmacológicos conduzidos com espécies de Piperaceae a não ser *Piper methysticum* Forster (kava-kava) em função de ser matéria-prima para a elaboração de medicamentos fitoterápicos de grandes empresas farmacêuticas e constituírem especialidade indicada para tratamento de estados depressivos (PDR for Herbal Medicines, 1998). Em 1987, pesquisadores brasileiros testaram as duas espécies do gênero *Pothomorphe* Miq.: *P. umbellata* (L.) Miq. e *P. peltata* (L.) Miq. quanto a sua

toxicidade genética frente ao ensaio microssômico de Salmonella de mamíferos (Felzenszwalb, 1987) constatando a ausência de mutagenicidade das duas plantas. Desmarchelier e colaboradores verificaram a atividade antioxidante de diferentes extratos de folhas de *P. peltata* (L.) Miq. por quimioluminescência em homogenato de fígado de ratos e substâncias reativas com ácido tiobarbitúrico concluindo que o extrato metanólico das folhas é o que apresenta melhores resultados (Desmarchelier et al., 1997). Neste mesmo ano evidencia a ação sequestradora de radicais peroxil do composto 4-nerolidilcatecol encontrado nos extratos de *Pothomorphe* spp. usando o modelo de lesão de carboidratos de DNA induzida por íons ferro e a catequina como padrão (Desmarschelie et al., 1997a).

2.3 Oxidação e Ação Antioxidante

O fenômeno da *oxidação*, cujo conceito inicial se restringia à incorporação do oxigênio a uma substância, sofreu uma profunda reformulação, passando a ser entendido de maneira mais abrangente como o *processo de transferência de elétrons* entre entidades químicas. As substâncias que os recebem são denominadas *oxidantes* e as que os doam com conseqüente redução da sua carga de elétrons) denominadas *redutoras* (Atkins, 1989; Halliwell & Gutteridge, 1999).

De modo semelhante o termo antioxidante pode ser entendido de forma muito abrangente tendo Halliwell, no final da década de 1980, procurado uma definição que pudesse englobar sua complexidade como “qualquer substância que, quando presente em baixas concentrações se comparadas àquelas de um substrato oxidável, impede ou diminui significativamente a oxidação daquele substrato” (Halliwell, 1989).

O termo *substrato oxidável* inclui uma ampla gama de substâncias encontradas na natureza e nos tecidos vivos incluindo proteínas, carboidratos, DNA e os lipídios. Os compostos químicos ou agentes que inibem ou bloqueiam a oxidação poderão atuar em diferentes níveis devendo, portanto, ser muito bem caracterizados: 1) o *composto ou substância química*; 2) o *mecanismo de ação*; 3) o *meio ou sistema onde se desenvolve a atividade antioxidante* (Halliwell et al., 1995).

Merece atenção especial a oxidação dos lipídios, alvo principal das espécies reativas de oxigênio (ERO's), cuja reação se desenvolve em cadeia, ou seja, em etapas já bastante estudadas e conhecidas pelo seu caráter seqüencial, a saber: iniciação, propagação e terminação.

Iniciação

Propagação

Terminação

Pelo fato de tal fenômeno ser o mais importante na ação lesiva do oxigênio e de suas espécies oxidantes em contato com as estruturas biológicas, é muitas vezes considerado como *antioxidante* apenas o composto que impede ou inibe a cadeia de reações da lipoperoxidação.

Neste caso, no que se refere aos mecanismos de ação dos compostos envolvidos nesse fenômeno, eles poderiam ser colocados dentro de cinco classes (Halliwell & Gutteridge, 1989):

- por diminuição localizada da concentração de oxigênio como no caso da conservação de substratos facilmente oxidáveis sob atmosfera de nitrogênio;
- prevenindo a reação de iniciação pela captura dos radicais indutores como o radical hidroxilo $\text{HO}^{\bullet}$;

- removendo ou inativando metais de transição e impedindo a geração de espécies reativas que decompõem lipídios peroxidados;
- agindo como consumidores dos peróxidos formados pela sua conversão em compostos não radicalares, inativos, como por exemplo os álcoois;
- pela interrupção da cadeia de autooxidação ligando-se a radicais livres intermediários do processo como, por exemplo, os peróxidos, impedindo a abstração de prótons de outras moléculas lipídicas. Por este mecanismo agem os antioxidantes *fenólicos* e aminas aromáticas.

Os químicos da área de síntese orgânica criaram então várias moléculas inibidoras do processo oxidativo, utilizadas inicialmente para a proteção da borracha, plásticos, combustíveis e depois incorporados à indústria de alimentos como importantes aditivos porém, com uso permitido em baixas e bem definidas concentrações. Os mais importantes são: o butil-hidroxi-anisol (BHA), o butil-hidroxi-toluleno (BHT) e o galato de propila (PG).

BHA

BHT

PG

Considerando as particularidades e, por assim dizer, a complexidade do fenômeno de oxidação, no que diz respeito ao substrato oxidável, subdividido por sua vez em várias etapas, compreende-se a dificuldade de encontrar um método de avaliação completo, ideal, que permita detectar na sua totalidade a capacidade antioxidante de um sistema ou composto químico antioxidante. Tal dificuldade é freqüentemente lembrada por pesquisadores (Smith & Anderson, 1987; Halliwell, 1995), em especial, da indústria alimentícia, já que os fenômenos de oxidação de proteínas e, principalmente, de lipídios, podem diminuir em muito a vida útil de alimentos como massas, gorduras, óleos vegetais e produtos cárneos (Frankel, 1993), além de ser um fenômeno altamente nocivo às estruturas biológicas, uma vez que as membranas que as constituem apresentam-se como bicamadas de lipídios e proteínas (Halliwell & Gutteridge, 1999).

No que se refere à parte de avaliação do processo oxidativo, e conseqüentemente, da eficácia de compostos antioxidantes, poder-se-ia considerar em conjunto os métodos físicos e químicos direcionados: 1) à análise dos substratos oxidáveis, do próprio oxigênio ou mesmo de ácidos graxos não oxidados (no caso da lipoperoxidação); 2) os produtos primários da oxidação e 3) os produtos secundários de oxidação (Gray, 1978; Silva et al., 1999). Nesta linha, nas medidas quantitativas da oxidação lipídica destacam-se os métodos químicos e, pela simplicidade, os ensaios dos peróxidos, bastante difundidos. Assim, no caso da análise de produtos primários de oxidação, uma das determinações clássicas é a do “Índice de Peróxidos” sendo dois os métodos usualmente utilizados: o iodométrico, baseado na oxidação do iodeto de potássio pelos peróxidos e dosagem do iodo liberado (Jessup et al., 1994) e o método colorimétrico que se baseia na oxidação de sais ferrosos e posterior determinação sob a forma de cloreto ou tiocianato férrico (Wolff, 1994). Ainda na análise dos produtos primários de oxidação, a partir do início da década de 1980, pesquisadores sul-americanos e japoneses aplicaram a técnica de medir a emissão de luz

provocada pela excitação de espécies reativas de oxigênio, este fenômeno conhecido por *quimiluminescência*, acompanha os processos oxidativos e mede a energia produzida pela transição dos elétrons do estado excitado ao estado fundamental no decurso da formação de peróxidos (Lissi et al., 1986; Iwaoka et al., 1987; Hirayama et al., 1997).

A determinação espectrofotométrica da absorção na região do U.V. - λ 230-235 nm - devido à oxidação de ácidos graxos insaturados com formação de hidroperóxidos e deslocamento das duplas ligações formando os dienos conjugados, é um método físico também empregado na medida de produtos primários da lipoperoxidação (Gray, 1978).

Os peróxidos, intermediários incolores e instáveis, podem produzir compostos de natureza diversa como os aldeídos, cetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos e outros, genericamente conhecidos por produtos secundários de reação. Para sua dosagem são freqüentemente utilizados alguns testes colorimétricos como o método do ácido tiobarbitúrico ou “teste do TBA” que é um dos mais antigos (Bernheim et al., 1948) e dos mais pesquisados (Janero, 1990). Foi inclusive testado usando-se substratos biológicos como tecidos animais (Uchiyama & Mihara, 1978; Ohkawa et al., 1979; Draper et. al., 1993). É medida a quantidade de substâncias geradas durante a oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, de modo especial os compostos aldeídos, sendo o mais importante e conhecido o malondialdeído (MDA). Reagindo com o ácido tiobarbitúrico, produzem compostos de coloração roxo avermelhada, sendo medida sua absorbância no comprimento de onda de 532 nm. Outro método alternativo para a avaliação da oxidação lipídica é a medida de compostos carbonílicos formados pela degradação dos hidroperóxidos. São efetuadas reações características deste grupo funcional com reativos específicos como hidroxilamina e outros (Gray, 1978).

Técnicas analíticas mais sofisticadas como a combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massa (CG/EM) ou mesmo a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) passaram a ser utilizadas na determinação dos produtos secundários de oxidação, tanto de malondialdeído como outros aldeídos importantes, por exemplo, propanal, 4-hidroxinonenal, hexanal (Holley et al., 1993) e mesmo hidrocarbonetos voláteis como o etano e o pentano (Yamamoto, 1994; Chirico, 1994; Moore & Roberts II, 1998).

A co-oxidação de um substrato como o β -caroteno, como também o acompanhamento da reação oxidativa baseada na sua descoloração, é um método simples, apesar de não específico, introduzido no final da década de 1960 (Marco, 1968) e até hoje bastante usado (Silva et al., 1999). Pode ser feito espectrofotometricamente (leitura a λ 470 nm) na ausência e presença de um antioxidante adicionado a um meio emulsionado com ácido linoléico (Miller, 1971). Pode-se proceder à separação dos constituintes de uma mistura por cromatografia em camada delgada, seguida da pulverização de uma solução de β -caroteno em solvente orgânico e posterior exposição à luz do dia. Após descoloração do fundo amarelo, a persistência de manchas com esta cor indica a presença de compostos com atividade antioxidante (Pratt & Miller, 1984; Duve & White, 1991).

A observação do fenômeno de lipoperoxidação em substratos biológicos (tecidos animais) submetidos à incubação com aeração, bem como a produção de substâncias desconhecidas na época e que reagiam com o ácido tiobarbitúrico, foi feita em 1944 (Kohn & Liversedge, 1944), porém a sua mensuração *in vitro* e a descoberta dos compostos formados durante o processo só começou a ser realizada por pesquisadores japoneses no final da década de 70 (Uchiyama & Mihara, 1978; Ohkawa et al., 1979).

Desta forma, os métodos de avaliação do fenômeno *in vitro* utilizando homogenatos de órgãos animais como do cérebro ou do fígado de ratos ganhou impulso a partir de meados da década de 80 (Lissi et al., 1986; Smith & Anderson, 1987) desenvolvendo-se simultaneamente estudos do fenômeno *in vivo* (Cadenas & Sies, 1984; Pompella et al., 1987), aprofundando-se o entendimento do fenômeno de autooxidação nestes substratos biológicos (Hirayama et al., 1997) principalmente em homogenato de cérebro (Barrier et al., 1998).

Entretanto, a dificuldade de se encontrar um método ideal e completo que permita a avaliação de um composto químico quanto à sua capacidade antioxidante, no seu todo ou por completo, é fato constatado pelos especialistas desde o início das pesquisas na área (Halliwell et al., 1995; Frankel et al., 1994; Huang et al., 1996). Diante disto, tais pesquisadores propõem, sempre que possível, a realização de um conjunto de métodos de modo que cada um contribua com a elucidação de uma parte do complexo fenômeno de inibição da oxidação biológica (Silva et al., 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999).

2.4 Oxidação, Antioxidantes e Saúde

Hoje, são relativamente bem conhecidas as ações lesivas dos radicais livres às várias estruturas biológicas e que várias doenças tem como agravante ou mesmo causa a presença e participação das espécies reativas de oxigênio, sendo relatadas mais de 90 delas como: arteriosclerose, câncer, encefalomielite, glomerulonefrite, displasia bronco-pulmonar, doença de Parkinson, retinopatias, infecções virais, catarata, esclerose múltipla, diabetes, artrite reumatóide entre outras (Halliwell, 1989; Kehrer, 1993; Aruoma, 1994; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Concomitantemente foram se desenvolvendo as pesquisas que determinavam, mais especificamente, os efeitos deletérios da oxidação lipídica (lipoperoxidação) sobre os órgãos, tecidos animais e, principalmente, as membranas biológicas (Logani & Davies, 1980; Sevanian & Hochstein, 1985; Yagi, 1987; Aruoma, 1994; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Por outro lado, estudos epidemiológicos mostraram que o consumo regular de produtos vegetais ricos em substâncias antioxidantes, como no caso do chá verde em cidades japonesas, diminuíram o risco e a incidência de câncer nas populações da região de Shizuoka, uma das maiores produtoras e consumidoras de chá do mundo (Ramarathnam, 1995; Haslam, 1995). Da mesma maneira, no fenômeno que ficou conhecido como “paradoxo francês” foi demonstrado que ingestão sistemática de polifenóis catequínicos presentes no vinho eram os responsáveis pela comprovada diminuição na mortalidade causada por doenças coronarianas nas populações francesas, famosas produtoras e uma das maiores consumidoras de vinho tinto do mundo. Nos Estados Unidos a dieta rica de antioxidantes essenciais como carotenos e vitaminas também diminuíram o

risco de morte por doenças do coração e certos tipos de câncer (Haslam, 1996).

O fígado, como principal órgão no desempenho de funções metabólicas e em especial de biotransformação do nosso organismo, é alvo de cuidados especiais na manutenção de sua vitalidade, tanto na medicina caseira como no que se entende por medicina moderna. Nas duas, o objetivo é o mesmo: tentar proteger o fígado ou melhorar-lhe as funções.

A se considerar, genericamente, doenças do fígado e o uso de produtos naturais no seu tratamento ou proteção, Handa e colaboradores realizaram uma meticulosa revisão da literatura, elencando mais de 125 compostos químicos, como terpenos, fenilpropanóides, saponinas, flavonóides, entre outros, aos quais foram atribuídas ações protetoras do tecido hepático, porém, com as mais variadas propostas de mecanismos de ação (Handa et al., 1986).

Mais recentemente, vários estudiosos realizaram pesquisas no sentido de estabelecer possíveis relações entre a função protetora do tecido hepático com as atividades antioxidantes de extratos vegetais (Yang et al., 1990) ou de princípios ativos vegetais como a silimarina (Cavallini et al., 1978; Valenzuela et al., 1985), a cinarina e ácidos fenólicos da alcachofra (Adzet, et al., 1987), dos terpenos do alecrim (Hoefler et al., 1987), alcalóides da pimenta (Koul & Kapil, 1993), taninos (Lin et al., 1998) ou mesmo vitaminas (Halim et al., 1997).

Na tentativa de combate aos “males do fígado”, a medicina popular lança mão dos recursos que dispõe, e neste caso, a flora medicinal desempenha papel fundamental. Para o tratamento de problemas hepáticos são usadas várias plantas medicinais nas mais diferentes formas: desde os ungüentos, os cataplasmas, os óleos, os decoctos e os chás. Dentre estes

vegetais se encontram: as jurubebas (*Solanum* spp), a alcachofra, os picões (*Galinsoga* spp e *Bidens* spp), o boldo e os falsos boldos (*Coleus* spp) e as pariparobas ou caapebas (*Pothormophe umbellata*, *P. peltata*, *Piper regnelli*) (Coimbra, 1958).

Portanto, a busca sistemática da atividade antioxidante de plantas medicinais, bem como da descoberta de compostos do reino vegetal responsáveis por tal ação, através de modelos experimentais simples e na medida do possível, seguros, viáveis e reprodutíveis, deve ser o objetivo de trabalhos e pesquisas que buscam justificativas e explicações científicas para uso racional de fitoterápicos e fitofármacos como agentes terapêuticos da medicina moderna.

OBJETIVOS

3. OBJETIVO

O trabalho tem por finalidade a avaliação *in vitro* da atividade antioxidante de extratos vegetais de duas plantas medicinais brasileiras da família Piperaceae usadas popularmente para problemas hepáticos. As espécies são conhecidas pelo nome vulgar de *capeba* ou *pariparoba*: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *regnellii*.

Tem ainda por objetivo, a combinação de métodos físicos e químicos de avaliação da atividade antioxidante, no sentido de sistematizar a busca de compostos químicos ativos em plantas medicinais, principalmente, brasileiras.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Botânico

Avaliação Preliminar da Atividade Antioxidante

Determinação espectrofotométrica *in vitro* da atividade antioxidante dos diversos extratos hidroalcoólicos (raízes, caules, folhas) no sistema β -caroteno / ácido linoléico

Avaliação preliminar da atividade antioxidante dos diversos extratos hidroalcoólicos por cromatografia em camada delgada

Obtenção dos Extratos Vegetais para Testes em Substrato Biológico

Medida da capacidade antioxidante dos extratos secos de raízes, caules e folhas de *Pothomorphe umbellata* e de *Piper regnellii*

Obtenção do substrato biológico - homogenato de cérebro

Medida dos produtos de oxidação que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Medida da quimiluminescência

Determinação do $Q_{1/2}$ dos extratos e compostos submetidos à avaliação antioxidante

Fracionamento e purificação do extrato seco de raiz de *Pothomorphe umbellata*. Busca do(s) componente(s) ativo(s)

Determinação do coeficiente de partição

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material Botânico

As espécies vegetais da família Piperaceae: *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. (incluída na 1ª. edição da Farmacopéia Brasileira com seu sinônimo científico: *Heckeria umbellata* Kunth, segundo Truman G. Yuncker e *Piper regnellii* (Miq.) C. DC., comumente confundida e usada no lugar da primeira (Figuras 1, 2, 3 e 4) foram coletadas no *campus* da Universidade de São Paulo, nas proximidades do conjunto das Químicas da Cidade Universitária “Armando Salles de Oliveira”.

A identificação botânica das espécies foi feita por comparação com material de Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (SPF), onde exsiccatas do material foram depositadas sob os números 11 (*Piper regnellii* (Miq.) C. DC.) e 12 (*Pothomorphe umbellata* (L.) Miq.) do coletor.

4.2 Avaliação Preliminar da Atividade Antioxidante

Para a realização de pré-testes indicativos do potencial antioxidante das plantas medicinais foram coletados, separadamente, os órgãos: folhas, caules e raízes, das duas espécies vegetais (*P. umbellata* e *P. regnellii*), secos em estufa com circulação de ar a uma temperatura inferior a 50°C. Após pulverização em moinho de martelo do tipo Wiley e passagem por tamis *mesh* 20, 5,0 g de pó de cada órgão vegetal (raiz, caule, folha) das duas plantas foram extraídos em banho maria a 60°C, com porções de 5 mL cada, de uma mistura de etanol : água (1:1) e agitação por 10 minutos, seguida de filtração por papel de filtro de modo a completar um volume de 25 mL. Dos extratos hidroalcoólicos obtidos, na proporção de 1 parte de droga para 5 partes de líquido extrator, foram determinados os resíduos secos pelo método de perda por dessecação (até peso constante) em estufa a 105°C e desta forma utilizados nos testes preliminares.

4.2.1 Determinação espectrofotométrica *in vitro* da atividade antioxidante dos diversos extratos hidroalcoólicos (raízes, caules, folhas) no sistema β -caroteno / ácido linoléico

De acordo com metodologia empregada por G. I. Marco (Marco, 1968) os extratos anteriormente obtidos foram diluídos na proporção de 1:10 com solução de etanol: água (1:1). De cada uma das soluções foram transferidos 0,2 mL para tubos de leitura de espectrofotômetro (Spectronic 20). Como branco usou-se o álcool diluído a 50% e como padrão uma solução etanólica de BHT (100 ppm). A todos os tubos foram adicionados 5 mL de uma solução de β -caroteno/ácido linoléico preparada conforme descrito a seguir: a 20 mg de β -caroteno dissolvidos em 1 mL de clorofórmio são

adicionados 200 mg de Tween 40. A fase orgânica é evaporada em banho-maria e o resíduo agitado com 50 mL de água destilada saturada de oxigênio, por borbulhamento, durante 30 minutos. Obtendo-se uma solução límpida de cor amarela.

Os tubos são mantidos em banho-maria a 50°C e a medida espectrofotométrica das absorbâncias das soluções é feita de 15 em 15 minutos, durante 2 horas, a um comprimento de onda de 470 nm. Utilizou-se espectrofotômetro Spectronic 20.

Desta forma foram obtidas as curvas de destruição do β -caroteno (descoramento da solução) ou da conservação da sua cor amarela como resultado da ação antioxidante dos extratos.

As porcentagens de inibição da oxidação são calculadas em relação ao controle (sem antioxidante) considerando-se o decaimento da absorbância do mesmo (Abs. contr. inicial - Abs. contr. final) como 100% de oxidação.

4.2.2 Avaliação preliminar da atividade antioxidante dos diversos extratos hidroalcoólicos por cromatografia em camada delgada

A partir dos mesmos extratos hidroalcoólicos já obtidos e usados na determinação espectrofotométrica anteriormente descrita no item 4.2 foi desenvolvida a cromatografia em camada delgada, utilizando-se o sistema cromatográfico descrito a seguir:

Adsorvente: silicagel 60G (Merck) tendo como suporte placas de vidro de 20 x 20 cm de dimensão.

Espessura da camada de 0,25 mm.

Ativação: aquecimento a 110°C por uma hora.

Desenvolvimento: simples, ascendente.

Percurso: 10 cm.

Cuba: de vidro com saturação total.

Fase móvel: 1) clorofórmio : etanol : ácido acético glacial (98:2:2).
2) clorofórmio

Amostras: aplicadas no ponto de partida os extratos hidroalcoólicos de folha, caule e raiz de *Pothomorphe umbellata* e de *Piper regnellii* - cerca de 10 µL cada.

Substância de referência: alfa-tocoferol - solução a 0,3 % em clorofórmio - 5 µL.

Visualização: por nebulização da placa com 20 mL de solução a 0,02% de β-caroteno em mistura de etanol : clorofórmio (2:1) e observação à luz do dia depois de 12 e 24 horas.

As manchas amarelas no cromatograma caracterizam a ação antioxidante das substâncias que protegem o carotenóide da oxidação pela luz, mantendo sua coloração.

4.3 Obtenção dos Extratos Vegetais para Testes em Substrato Biológico

Foram coletadas entre os meses de outubro e novembro as folhas, os caules e as raízes das duas espécies vegetais, cortados em pequenos fragmentos e colocados para secar em estufa com circulação de ar a uma temperatura inferior a 60°C. Cada órgão vegetal foi pulverizado separadamente em moinho de martelos tipo Wiley e os pós obtidos foram classificados através da passagem por tamis de mesh 20.

Pelo processo de percolação segundo a técnica farmacêutica para obtenção de fitoterápicos (Prista et al., 1983) foram elaborados os extratos vegetais, utilizando-se como líquido extrator a mistura de etanol : água (1:1). Deu-se por encerrada a percolação quando foi obtido um volume de extrato de modo a manter a relação droga/extrato de 1/10 (p/v). Os extratos hidroalcoólicos de cada órgão foram concentrados a 1/5 do seu volume inicial em aparelho concentrador rotativo a vácuo da marca Buechi, a temperatura inferior a 60°C. Procedeu-se à liofilização dos concentrados aquosos em aparelho da marca Edwards, modelo L4 KR, usando como temperatura de congelamento - 40°C e com pressão de 0,1 mbar, realizada num período de 24 horas.

Os extratos secos dos diversos órgãos vegetais apresentaram a seguinte relação droga/extrato: 10% para raízes e caules tanto de *P. umbellata* como de *P. regnellii* e 23% e 21%, respectivamente, para as folhas.

Os liofilizados foram acondicionados em frascos de vidro âmbar, mantidos em geladeira (temperatura inferior a 5°C) e deles foram retiradas as amostras para os ensaios.

4.3.1 Medida da capacidade antioxidante dos extratos secos de raízes, caules e folhas de *Pothomorphe umbellata* e de *Piper regnellii*

4.3.1.1 Obtenção do substrato biológico - homogenato de cérebro

Segundo o método empregado por J. Stocks e colaboradores (Stocks, 1974), o homogenato de cérebro de ratos foi usado como substrato de peroxidação espontânea medida pela reação das substâncias do meio com o ácido tiobarbitúrico (TBARS) e ainda pela medida da quimiluminescência emitida. A medida da inibição dos fenômenos é realizada após a adição de diferentes concentrações de substâncias ou misturas supostamente antioxidantes.

Para o ensaio foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar fornecidos pelo biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Dos animais anestesiados com éter foram retirados os cérebros após perfusão com solução de NaCl 0,15M a 4°C. Em banho de gelo, foram triturados com homogeneizador da marca Tecnal - modelo TE-100, após adição de um volume equivalente a 4 vezes o seu peso de solução-tampão NaCl 140 mM, fosfato 40 mM, pH 7,4. O homogenato obtido foi submetido à centrifugação por um período de 15 minutos a uma rotação de 1000 g e temperatura de 4°C em centrífuga refrigerada da marca Hitachi - modelo CR 20B2. Com a mesma solução tampão (pH 7,4), o sobrenadante foi imediatamente diluído ao triplo de seu volume.

4.3.1.2 Medida dos produtos de oxidação que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para cada ensaio, 3,0 mL do homogenato de cérebro diluído foram transferidos para erlenmeyers de 25,0 mL de capacidade e adicionados 50,0 µL de soluções dos extratos/frações a serem testados em diferentes concentrações, bem como do diluente; este último sendo usado como controle. A reação de peroxidação espontânea ao ar foi realizada pela agitação dos frascos em banho de água a 37°C durante uma hora. Imediatamente antes do início da reação (tempo zero - T₀) e após uma hora (tempo de incubação - T₁), 1,0 mL do homogenato é transferido para um tubo de ensaio contendo 1,0 mL de solução aquosa de ácido tricloroacético (TCA) a 5%. Os tubos são centrifugados a 800 g por 5 minutos e a 1,0 mL do sobrenadante obtido é adicionado 1,0 mL de solução aquosa a 0,67% de ácido tiobarbitúrico (TBA). Após 20 minutos em banho-maria fervente os tubos foram resfriados em banho de gelo por 20 minutos seguidos da leitura das absorbâncias em espectrofotômetro Inibrás - modelo MF 20, em comprimento de onda 532 nM.

A capacidade antioxidante (CAOx) corresponde a porcentagem de inibição da lipoperoxidação espontânea em relação ao controle (sem antioxidante) considerado como 100%. Foi calculada da seguinte forma:

$$\text{CAOx TBARS} = 100 \cdot \left[1 - \frac{(A_1 - A_0) \text{ Amostra}}{(A_1 - A_0) \text{ Controle}} \right]$$

onde: A₁ = absorbância após 1 hora de incubação ou reação

A₀ = absorbância antes da incubação

4.3.1.3 Medida da quimiluminescência

A quimiluminescência emitida durante o processo de lipoperoxidação do homogenato de cérebro foi também empregada para avaliar a capacidade antioxidante dos extratos secos dos diversos órgãos vegetais. Para o ensaio, parte do homogenato obtido em 4.3.1.1 foi diluído com solução tampão fosfato - pH 7,4 e usadas alíquotas de 3,0 mL. Às amostras foram adicionadas as soluções dos extratos secos de *Pothomorphe umbellata* Miq. e da sua fração purificada, em concentrações crescentes. A quimiluminescência emitida foi lida durante 30 minutos com intervalos de 5 minutos, em contador de cintilação líquida da marca Packard - modelo 1900 TR, à temperatura de 25°C. O controle refere-se a emissão espontânea dos homogenatos adicionados de diluente.

A curva de emissão foi traçada para as diferentes concentrações testadas e o cálculo da capacidade antioxidante (medida através da quimiluminescência) foi feito aplicando a fórmula :

$$\text{CAOx TBARS} = 100 \cdot \left[1 - \frac{(I_{30} - I_0) \text{ Amostra}}{(I_{30} - I_0) \text{ Controle}} \right]$$

onde : I_{30} = leitura após 30 minutos

I_0 = leitura ao tempo zero

4.3.1.4 Determinação do $Q_{1/2}$ dos extratos e compostos submetidos à avaliação antioxidante

A partir dos dados e curvas obtidas nos ensaios de medida de TBARS e quimiluminescência foram calculados os valores de $Q_{1/2}$ que indicam a quantidade de substância antioxidante capaz de obter 50% do efeito medido, tanto de inibição da lipoperoxidação como da emissão de quimiluminescência.

4.4 Fracionamento e purificação do extrato seco de raiz de *Pothomorphe umbellata*. Busca do(s) componente(s) ativo(s)

O extrato seco liofilizado foi submetido a fracionamento por cromatografia em coluna preparativa conforme o sistema abaixo descrito:

- adsorvente - silicagel G60;
- tamanho de partícula de 70 a 230 mesh (Merck);
- quantidade: 100 g;
- empacotamento: via úmida;
- coluna de vidro - dimensões: 50 cm de comprimento por 3,5 cm de diâmetro;
- relação amostra / adsorvente: 1/100;
- eluentes utilizados: clorofórmio p.a. (250 mL) seguido de igual volume das misturas de etanol:clorofórmio em proporções crescentes do álcool, a saber: 5%, 10%, 20%, 50%;
- velocidade de eluição: 3,0 mL por minuto;
- frações: foram coletadas sucessivamente 20 frações de 50 mL cada.

As frações obtidas foram evaporadas em banho maria a 40°C a 1/5 do seu volume inicial e os concentrados submetidos a cromatografia em camada delgada em microplacas, segundo o sistema acima descrito

(item 4.2.2) para detecção preliminar das frações com atividade antioxidante. Apenas com aquelas que demonstraram atividade frações 7 e 8 deu-se continuidade ao trabalho de evaporação completa do solvente em atmosfera de nitrogênio, obtendo-se um resíduo de cor marrom e aspecto viscoso. Uma alíquota foi dissolvida em etanol e a partir da solução foi obtida a curva de absorção em espectrofotômetro U.V. em comprimento de onda $\lambda_{200} - \lambda_{400}$ nm. O material restante das frações foi enviado para determinação de espectro de ressonância nuclear magnética (RMN) na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

4.4.1 Determinação do coeficiente de partição

A partir da lei da distribuição de Nernst, de um soluto entre dois solventes imiscíveis, a medida da lipofilicidade é definida pelo coeficiente de partição P e definido como $P = [S]_{\text{org.}} / [S]_{\text{aq.}}$ sendo utilizado como solvente orgânico o n-octanol que apresenta características favoráveis como baixa pressão de vapor e boa solubilidade para grande parte de compostos químicos com atividade biológica (Taylor, 1990). Para o cálculo do $\log P$ no sistema n-octanol/água foi utilizado o programa computacional $C \log P$ denominado MedChem (Leo, 1990). Utiliza a linguagem SMILE, a qual codifica a estrutura química em sistema numérico binário e que, na versão 3.54, contém dados de mais de 25.000 compostos incluindo valores experimentais de coeficiente de partição, neste e em outros sistemas solventes, valores de pK_a , podendo-se analisar tridimensionalmente a estrutura do composto estudado (Leo, 1990).

Os cálculos foram gentilmente elaborados pelo Dr. Mário G. Cardozo, da empresa Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc. na filial Ridgefield nos Estados Unidos da América do Norte.

5. RESULTADOS

O registro dos resultados encontrados nos diversos ensaios procura sistematizar a sequência das etapas adotadas como “rotina na busca de compostos antioxidantes em extratos vegetais”, um dos objetivos do trabalho.

5.1 Avaliação preliminar da atividade antioxidante dos diversos órgãos vegetais - raiz, caule e folhas - de *P. regnellii* e *P. umbellata*

Para tal avaliação foram usados extratos obtidos dos órgãos vegetais, conforme descrito no item 4.2, cujo resíduo seco é apresentado na tabela abaixo.

Tabela 1 - Resíduo seco * dos extratos hidroalcoólicos testados.

Plantas	Raiz	Caule	Folhas
<i>P. regnellii</i>	16,70 ± 0,42	18,40 ± 0,87	23,70 ± 0,58
<i>P. umbellata</i>	16,40 ± 0,71	10,10 ± 0,66	25,30 ± 0,95

* os números indicam as porcentagens e os respectivos valores de desvio padrão.

Os extratos hidroalcoólicos foram ensaiados quanto ao seu potencial antioxidante utilizando o método de co-oxidação de substratos, no caso, β -caroteno, induzida pelos produtos da degradação. A medida espectrofotométrica das cinéticas das reações com os diversos extratos são apresentadas nas tabelas e figuras a seguir.

Tabela 2 - Determinação espectrofotométrica - sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico* da raiz de *Piper regnellii*.

Tempo (min)	Absorbância		
	Branco	BHT	Amostra
0	632	627	623
15	552	590	595
30	505	575	587
45	455	563	579
60	411	569	574
75	375	539	560
90	337	527	552
105	305	518	543
120	280	510	536

Os valores de absorbância referem-se a média de duas determinações.

* concentração= 1,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 5 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da raiz de *P. regnellii*.

Tabela 3 - Determinação espectrofotométrica – sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico* do caule de *Piper regnellii*.

Tempo (min)	Absorbância		
	Branco	BHT	Amostra
0	632	627	621
15	552	590	585
30	505	575	573
45	455	563	559
60	411	569	545
75	375	539	536
90	337	527	524
105	305	518	513
120	280	510	505

Os valores de absorbância referem-se a média de duas determinações.

* concentração= 1,9 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 6 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico do caule de *P. regnellii*.

Tabela 4 - Determinação espectrofotométrica – sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico* da folha de *Piper regnellii*.

Tempo (min)	Absorbância		Amostra
	Branco	BHT	
0	632	627	630
15	552	590	569
30	505	575	550
45	455	563	530
60	411	569	509
75	375	539	499
90	337	527	485
105	305	518	479
120	280	510	471

Os valores de absorbância referem-se a média de duas determinações.

* concentração= 2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 7 – Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da folha de *P. regnellii*.

A partir das tabelas e gráficos das figuras apresentados pode-se avaliar comparativamente a capacidade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos dos vários órgãos de *Piper regnellii*. Os resultados percentuais são mostrada na Tabela 5.

Tabela 5 - Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos dos diversos órgãos vegetais de *Piper regnellii*.

Amostra	Quantidade do extrato seco responsável pela atividade antioxidante (µg)	Atividade antioxidante* (%)
raíz	83.6	75
caule	94.0	67
folhas	118.6	52

* a porcentagem de inibição relaciona-se com o decaimento de absorbância obtida com o grupo controle (sem antioxidante) e considerada como 100%.

Tabela 6 - Determinação espectrofotométrica - sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico* da raiz de *Pothomorphe umbellata*.

Tempo (min)	Absorbância		
	Branco	BHT	Amostra
0	632	644	641
15	539	604	597
30	478	582	583
45	433	568	571
60	395	556	560
75	369	547	553
90	338	536	543
105	314	526	537
120	292	517	531

Os valores de absorbância referem-se a média de duas determinações.

* concentração= 0,6 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 8 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da raiz de *P. umbellata*.

Tabela 7 - Determinação espectrofotométrica – sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico* do caule de *Pothomorphe umbellata*.

Tempo (min)	Absorbância		
	Branco	BHT	Amostra
0	632	644	645
15	539	604	557
30	478	582	531
45	433	568	502
60	395	556	482
75	369	547	470
90	338	536	451
105	314	526	438
120	292	517	425

Os valores de absorbância referem-se a média de duas determinações.

* concentração= 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 9 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico do caule de *P. umbellata*.

Tabela 8 - Determinação espectrofotométrica - sistema β -caroteno/ácido linoleico do extrato hidroalcoólico* da folha de *Pothomorphe umbellata*.

Tempo (min)	Absorbância		
	Branco	BHT	Amostra
0	632	644	662
15	539	604	569
30	478	582	544
45	433	568	514
60	395	556	496
75	369	547	483
90	338	536	464
105	314	526	449
120	292	517	436

Os valores de absorbância referem-se a média de duas determinações.

* concentração= 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Figura 10 - Cinética da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico da folha de *P. umbellata*.

A partir das tabelas e gráficos das figuras apresentados pode-se avaliar comparativamente a capacidade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos dos vários órgãos de *P. umbellata*. Os resultados percentuais são mostrada na Tabela 9.

Tabela 9 - Atividade antioxidante dos extratos hidroalcoólicos dos diversos órgãos vegetais de *Pothomorphe umbellata*.

Amostra	Quantidade do extrato seco responsável pela atividade antioxidante (µg)	Atividade antioxidante* (%)
raíz	31,74	68
caule	19,86	35
folhas	24,67	33

* a porcentagem de inibição relaciona-se com o decaimento de absorbância obtida com o grupo controle (sem antioxidante), considerada como 100%.

5.1.2 Cromatografia em camada delgada - revelação com β -caroteno

Os perfis cromatográficos obtidos a partir de cromatografia em camada delgada dos extratos etanólicos dos diversos órgãos vegetais, raiz, caule e folha das duas espécies - *Pothomorphe umbellata* e *Piper regnellii*, reveladas com β -caroteno (após descoloração por 24 horas à luz do dia), apresentaram para os extratos da primeira planta uma mancha amarela a um R_f 0,6 de fraca intensidade para o caso das folhas e caules e muito intensa para o caso da raiz. Para os extratos de *P. regnellii* puderam ser observadas manchas de intensidade muito fraca a um R_f de 0,65, intensidade fraca a um $R_f = 0,9$ para os três órgãos testados e um pouco mais intensa para o caso das raízes. A vitamina E usada como referência apresentou forte coloração amarelada a um $R_f = 0,92$. A figura 11 mostra estes resultados.

Figura 11 - Perfil da cromatografia em camada delgada dos extratos de raiz, caule e folha de *P. umbellata* e *P. regnellii*. Revelação com β -caroteno e observação após 24 horas.

Figura 12 - Perfil da cromatografia em camada delgada da fração clorofórmica obtida dos extratos de raiz, caule e folha de *Piper regnellii*. Revelação com β -caroteno e observação após 24 horas.

Figura 13 - Perfil da cromatografia em camada delgada da fração clorofórmica obtida dos extratos de raiz, caule e folha de *Piper regnellii*. Revelação com β -caroteno e observação após 24 horas, com padrão de conocarpano.

5.2 Medida da capacidade antioxidante dos extratos secos dos diversos órgãos - raiz, caule e folhas - de *Piper regnellii* e de *Pothomorphe umbellata*, em homogenato de cérebro

Foram realizados ensaios espectrofotométricos de medida dos produtos de oxidação que reagem com ácido tiobarbitúrico (TBARS) como avaliação da capacidade de antioxidante dos extratos secos dos diversos órgãos vegetais tanto de *Piper regnellii* como de *Pothomorphe umbellata*. As tabelas e os gráficos das figuras a seguir apresentam os resultados encontrados.

TABELA 10 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenato de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato das raízes de *Piper regnellii*.

$\mu\text{g/ml}$	66,7	58,3	50,0	42,0	33,3	25,0	16,7	8,3
CAOX	96,6	94,4	94,0	83,8	67,3	47,2	29,9	19,4
(%)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
s.d.	1,2	0,4	2,3	2,7	3,1	3,3	5,5	3,2

[os valores indicam a média de 5 determinações; s.d. = desvio padrão]

TABELA 11 - Cinética da inibição da lipoperoxidação espontânea (%) em homogenato de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato dos caules de *Piper regnellii*.

$\mu\text{g/ml}$	66,7	58,3	50,0	42,0	33,3	25,0	16,7	8,3
CAOX	94,5	95,4	68,6	53,1	40,2	41,8	27,8	23,5
(%)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
s.d.	0,5	1,6	3,7	4,3	4,4	3,9	5,9	2,5

[os valores indicam a média de 4 determinações; s.d. = desvio padrão]

TABELA 12 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenato de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato das folhas de *Piper regnellii*.

$\mu\text{g/ml}$	66,7	58,3	50,0	42,0	33,3	25,0	16,7	8,3
CAOX	98,1	95,5	95,8	94,4	88,6	86,1	57,8	36,1
(%)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
s.d.	1,5	2,2	2,3	2,2	1,4	4,7	8,7	6,8

[os valores indicam a média de 5 determinações; s.d. = desvio padrão]

CAOX (%)

Figura 14 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea de homogenato de cérebro (TBARS) pelos extratos de raiz, caule e folha de *Piper regnellii*.

* $\mu\text{g/mL}$ =concentração expressa em μg de extrato seco por mL de meio de reação.

TABELA 13 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenato de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato das raízes de *Pothomorphe umbellata*.

$\mu\text{g/ml}$	66,7	33,3	16,7	8,3	4,2	2,1
CAOX	99,2]	98,9	97,8	86,3	46,4	19,8
(%)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
s.d.	0,7	0,8	2,3	15,8	13,0	4,3

[os valores indicam a média de 3 determinações; s.d. = desvio padrão]

TABELA 14 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenato de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato dos caules de *Pothomorphe umbellata*.

$\mu\text{g/ml}$	66,7	33,3	16,7	8,3	4,2
CAOX	95,3	88,9	37,6	9,6	5,6
(%)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
s.d.	3,3	2,2	4,7	3,1	2,8

[os valores indicam a média de 3 determinações; s.d. = desvio padrão]

TABELA 15 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (%) em homogenato de cérebro, através da medida de TBARS, pelo extrato das folhas de *Pothomorphe umbellata*.

$\mu\text{g/ml}$	66,7	33,3	16,7	8,3	4,2	2,1
CAOX	78,8	42,6	22,4	11,5	5,4	6,2
(%)	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$	$\pm$
s.d.	4,1	3,7	5,2	3,7	3,4	2,5

[os valores indicam a média de 4 determinações; s.d. = desvio padrão]

CAOX (%)

Figura 15 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea de homogenato de cérebro (TBARS) pelos extratos de raiz, caule e folha de *Pothomorphe umbellata*.

* µg/mL=concentração expressa em µg de extrato seco por mL de meio de reação.

5.2.1. Determinação do $Q_{1/2}$ dos extratos secos dos órgãos vegetais de *Piper regnellii* e *Pothomorphe umbellata*

Os valores de $Q_{1/2}$ foram calculados a partir dos gráficos apresentados nas figuras 14 e 15.

Figura 16 - Valores de $Q_{1/2}$ dos extratos de *Piper regnellii* e *Pothomorphe umbellata*. Inibição de lipoperoxidação (TBARS) em homogenato cérebro.

* os números indicam a concentração de cada extrato em $\mu\text{g/mL}$ no meio de reação.

$Q_{1/2}$ representa a concentração que produz 50% do efeito medido.

5.3 Fracionamento do Extrato Seco de Raízes de *Pothomorphe umbellata*. Análise das Frações e Determinação do Componente Ativo

Com o fracionamento do extrato seco em coluna foram coletadas 20 frações. Após concentração parcial as mesmas foram avaliadas comparativamente quanto a sua capacidade antioxidante, pelo método de cromatografia em camada delgada em microplacas, usando com revelador o β -caroteno, conforme descrito no item 4.2.2. Mostraram atividade as frações de nº 7 e nº 8. Após a evaporação do solvente o resíduo foi retomado em etanol absoluto e obtidas as curvas de absorção no espectro U.V. (aparelho Beckman DU-70) apresentadas nas Figuras 17 e 18.

Figura 17- Curva de absorção de U.V. da solução etanólica da fração 7 obtida a partir do fracionamento do extrato de raízes de *P. umbellata*.

Figura 18 - Curva de absorção de U.V. da solução alcoólica da fração 8 obtida a partir do fracionamento do extrato de raízes de *P. umbellata*.

Por análises cromatográficas em camada delgada com diferentes fases móveis foi constatado que as frações 7 e 8 tratavam-se de uma mesma substância.

5.3.1 Caracterização do componente ativo

Os resíduos obtidos pela evaporação das frações 7 e 8 foram submetidos à análise espectrométrica de ressonância nuclear magnética (RMN) em aparelho da marca Bruker AC 200 F da Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, fornecendo os espectros apresentados nas Figuras 19 e 20.

Figura 20 - Espectro de RMN de ^1H a 200 MHz da fração 8 obtida a partir do fracionamento do extrato de raízes de *P. umbellata*.

A análise comparativa dos espectros no U.V. e de RNM de prótons utilizando como referência dos dados e trabalhos da literatura especializada (Kijjoa et al., 1980; Gustafson et al., 1992), permitiram confirmar que a estrutura química da substância trata-se do composto químico denominado 4-nerolidilcatecol.

5.4 Avaliação Comparativa da Capacidade Antioxidante de 4-Nerolidilcatecol com α -Tocoferol

5.4.1 Inibição da lipoperoxidação e quimiluminescência em homogenato de cérebro

Após a caracterização do 4-nerolidilcatecol como o composto responsável pela atividade antioxidante do extrato das raízes de *P. umbellata*, seu isolamento levou à comparação com o antioxidante padrão α -tocoferol, usando-se o mesmo modelo de inibição da lipoperoxidação espontânea em homogenato de cérebro.

As curvas da inibição percentual do fenômeno oxidativo, medido por quimiluminescência e TBARS, respectivamente para 4-nerolidilcatecol e α -tocoferol, são apresentadas nas Figuras 21 e 22.

CAOX (%)

Figura 21 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (TBARS) e de quimiluminescência (QL) em homogenato cérebro pelo composto 4-nerolidilcatecol.

* μM =concentração expressa em $\mu\text{moles/L}$ de meio de reação.

Figura 22 - Cinética da inibição de lipoperoxidação espontânea (TBARS) e de quimiluminescência (QL) em homogenato cérebro, pelo composto α -tocoferol .

* μM =concentração expressa em $\mu\text{moles/L}$ de meio de reação.

5.4.2 Determinação dos valores de $Q_{1/2}$ de 4-nerolidilcatecol e de α -tocoferol

A partir das curvas de inibição de lipoperoxidação e quimiluminescência apresentadas nas Figuras 21 e 22 foram calculados os valores de $Q_{1/2}$ do 4-nerolidilcatecol e do α -tocoferol para cada um dos ensaios realizados. Os resultados são apresentados na Figura 23.

Figura 23 - Valores comparativos de $Q_{1/2}$ dos compostos 4-nerolidilcatecol e α -tocoferol. Inibição da lipoperoxidação (TBARS) e da quimiluminescência (QL) em homogenato cérebro.

* os números indicam a concentração expressa em $\mu M/L$ de meio de reação.
 $Q_{1/2}$ representa a concentração que produz 50% do efeito medido.

5.5 Coeficientes de Partição do 4-nerolidilcatecol e de Alguns Compostos Químicos Relacionados Determinados pelo Programa *C log P* (P)

Conforme o explicado o programa fornece os dados do coeficiente de partição:

$$P = \frac{[\text{comp.}]_{\text{n-octanol}}}{[\text{comp.}]_{\text{água}}}$$

Tabela 16 - Coeficientes de partição dos compostos químicos fenólicos calculados segundo o programa ClogP (Leo, 1990).

Composto	P
Ácido cafeíco	0,755
Catecol	0,808
Nerolidol	4,400
Farnesol	4,620
4-nerolidilcatecol	6,032
α -tocoferol	12,198#

(# a determinação do $P_{(\alpha\text{-tocoferol})}$ apresentou dificuldades por se tratar de substância de alta lipossolubilidade e tendo um valor muito alto, o programa acusa como de "natureza irreal").

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Fazendo parte da cultura popular brasileira, mais especificamente da *medicina caseira*, é comum a indicação e o uso de plantas medicinais para tratamento de afecções ou “males do fígado”, como curiosa e genericamente são referidas as doenças hepáticas em diversos *manuals de saúde* ou livros de caráter popularesco, comuns em nosso país desde o início do século (Balbachas, 1956; Guertzenstein, 1971). Dentre algumas das plantas mais indicadas para tal finalidade constam: as jurubebas, nome popularmente atribuído a várias espécies do gênero *Solanum*, sendo a mais famosa, *S. paniculatum* L.; os boldos (no Brasil, vulgarmente, dá-se o nome de “boldo do Chile” tanto à espécie farmacopeica *Peumus boldus* Mol. como a algumas espécies do gênero *Coleus*) e, também, as pariparobas ou caapebas dos gêneros *Piper* e *Pothomorphe*, estas últimas, alvo do presente estudo.

Pretendendo-se entender melhor os mecanismos desta propalada ação protetora de plantas medicinais sobre o fígado, nosso trabalho foi iniciado com os extratos aquosos das plantas acima mencionadas através de testes *in vivo*. Foi escolhido o modelo experimental adotado por vários pesquisadores do mundo, o de provocar uma lesão hepática com administração de tetracloreto de carbono em ratos, seguida da medida e avaliação de enzimas séricas no plasma dos animais tratados (Adzet et al., 1987; Lexa et al., 1990; Halim et al., 1997). Causou-nos estranheza a variabilidade dos resultados encontrados na padronização da metodologia. Tal dificuldade induziu-nos à busca de métodos não invasivos *in vitro* que permitissem avaliar a possível atividade antioxidante dos extratos, considerando-se o mecanismo de ação hepatotóxica do tetracloreto de carbono associado ao estresse oxidativo (Hoefer et al., 1987; Halim et al., 1997).

Nesta linha, a consulta à literatura especializada mostra que a correlação entre o uso de plantas medicinais para problemas do fígado com a capacidade de alguns de seus compostos químicos inibirem os fenômenos oxidativos, principalmente, a lipoperoxidação, começou a ser feita por alguns pesquisadores europeus e sul-americanos já no final da década de 70. Nesta época apareceram trabalhos relacionando à proteção promovida pela substância denominada silimarina de *Silybum marianum* Gaertn com a sua comprovada ação anti-peróxidos (Cavallini et al., 1978) agindo, também, contra a peroxidação de lipídios hepáticos induzida por etanol (Valenzuela et al., 1985). De igual forma, a atividade colerética e hepatoprotetora dos extratos de *Rosmarinus officinalis* foi correlacionada com o seu efeito antioxidantes (Hoefer et al., 1987). Esta mesma linha de investigação trilhou, com relativo sucesso, Speisky e colaboradores no início desta década (Speisky et al., 1991) em trabalhos com o alcalóide boldina de *Peumus boldus*, planta há muito utilizada no tratamento das afecções gerais do fígado e estimulante das funções hepáticas. Este, mais de perto, serviu de exemplo para a proposta de desenvolvimento do presente trabalho, qual seja, a de procurar nas plantas utilizadas para o tratamento de problemas hepáticos, substâncias com atividade antioxidante. Por outro lado, o critério de escolha devia contemplar as plantas utilizadas popularmente, não só pelas suas propriedades coleréticas e colagogas, mas, principalmente, pela sua indicação como protetora do fígado, caso das pariparobas e caapebas (Balbachas, 1956; Coimbra, 1958).

Silimarina

No que tange à metodologia de estudo da ação de compostos que desempenham uma função antioxidante em organismos vivos, a área de bioquímica mostrou-se extremamente proeminente e eficaz, de modo especial após a proposta da presença de radicais livres nos sistemas biológicos na década de 50, iniciando um novo campo de investigação bioquímica que busca a explicação das funções metabólicas e mesmo das ações farmacológicas destes compostos. Foram tão importante tais fatos que suscitaram a criação de publicações altamente especializada sobre o assunto como "Free Radical and Biology Medicine", de Nova York e "Free Radical Research Communication", de Londres.

Nos centros de pesquisa do mundo inteiro foram aprimorados métodos para o estudo sistemático da atividade antioxidante dos sistemas biológicos, tanto da primeira linha de defesa do nosso organismo, o sistema enzimático como, por exemplo, a superóxido dismutase (SOD), a catalase e outras peroxidases, como da segunda linha, constituída pelos compostos orgânicos de menor peso molecular como a glutathione, o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (Halliwell, 1995; Cadenas & Packer, 1996; Halliwell & Gutteridge, 1999).

Vários modelos foram desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diversos sistemas biológicos. Entre eles destacam-se os que empregam homogenatos de tecidos animais submetidos a estresse oxidativo *in vitro* (Uchiyama & Mihara, 1978; Smith & Anderson, 1987), sendo melhor estudados os homogenatos de fígado (Ohkawa et al., 1979) e de cérebro (Stocks et al., 1974; Lissi et al., 1986; Barrier et al., 1998). Estes meios são usados, principalmente, para a investigação do fenômeno da auto-oxidação espontânea dos lipídios dispersos nestes meios biológicos (Stocks, et al., 1974; Ohkawa et al., 1979; Moore & Roberts II, 1998; Barrier et al., 1998).

Como substrato biológico para avaliação da atividade de compostos químicos potencialmente antioxidantes, estes homogenatos foram utilizados algumas vezes (Lissi & Anderson, 1987; Rajakumar & Rao, 1993; Desmarchelier et al., 1997).

De igual forma, a oxidação de estruturas biológicas é, também, preocupação constante da área e da indústria alimentícia, uma vez que tal fenômeno pode limitar, em muito, a vida útil dos alimentos (Ragnarsson & Labuza, 1976). Pesquisadores e tecnólogos de alimentos dedicaram grande parte dos seus estudos aos testes *in vitro* de avaliação do fenômeno de lipoperoxidação que ocorre nos alimentos contendo óleos e gorduras (Gray, 1978; Halliwell et al., 1995).

Atendendo a estes objetivos de avaliação mais rápida da atividade antioxidante, um método simples e prático foi desenvolvido e proposto por G. J. Marco no final da década de 60 (Marco, 1968) e posteriormente aprimorado por H. E. Miller em 1971 (Miller, 1971). Nele pode-se medir, para cada substância química testada, a capacidade de proteger o β -caroteno emulsificado em óleo contra o fenômeno da oxidação. Este mesmo princípio (inibição da oxidação de β -caroteno) foi aplicado, com sucesso, na cromatografia em camada delgada, por Pratt e Miller em 1984, e por Duve e White em 1991, em pesquisa de substâncias antioxidantes em cereais. Apesar da tendência de se empregar métodos mais complexos e sofisticados na determinação da atividade antioxidante de um composto químico, os métodos que usam como indicador o carotenóide demonstraram ter grande utilidade, principalmente, nos casos de utilizá-lo numa triagem prévia, como desenvolvido neste trabalho.

Desta forma, no presente trabalho foi proposta e realizada a combinação de alguns métodos de avaliação de atividade antioxidante, iniciando-se pelo espectrofotométrico e pelo cromatográfico em camada

delgada, como uma abordagem preliminar de busca e detecção de compostos inibidores do processo oxidativo presentes nos extratos hidroalcoólicos dos diversos órgãos vegetais, raízes, caules e folhas – tanto de *Pothomorphe umbellata* como de *Piper regnellii*.

O resultado da avaliação espectrofotométrica de proteção do β -caroteno emulsionado em ácido linoleico que é mostrada nas tabelas e gráficos das figuras do item 5.1, indica-nos uma maior atividade dos extratos das raízes das duas espécies quando comparadas com seus respectivos caules e folhas. E entre as duas espécies o poder antioxidante da raiz de *Pothomorphe umbellata* é bem superior ao de *Piper regnellii*, ou seja, para uma atividade percentual em torno de 70%, é necessário quase o triplo de extrato de uma em relação a outra, conforme mostram as tabelas 5 e 9.

Este resultado pode ser parcialmente confirmado pelo perfil cromatográfico obtido a partir dos extratos submetidos à cromatografia em camada delgada, seguida da revelação com o β -caroteno. Neste caso, foi usada a vitamina E como substância antioxidante padrão. As manchas amarelas -- indicativas da proteção do carotenóide -- são muito mais intensas para os extratos de *P. umbellata*, aparecendo em valores de R_f em torno de 0,6, quando comparadas àquelas dos extratos de *P. regnellii* que aparecem em R_{fs} próximos de 0,65 e 0,9. Esta última observação nos mostra a presença de uma substância antioxidante de menor polaridade no extrato de *P. regnellii*. Para desfazer dúvidas quanto à(s) substância(s) ativa(s) de R_{fs} próximos de 0,65 e 0,9, foi desenvolvida nova cromatografia em camada delgada para os extratos hidroalcoólicos de *Piper regnellii* utilizando como fase móvel o clorofórmio. Este experimento pode evidenciar que dentre os três órgãos vegetais, destacam-se as folhas como as mais ativas. Estas apresentam, pelo menos, 3 substâncias que inibiram a oxidação do β -caroteno com os seguintes valores de R_{fs} : 0,20; 0,60; 0,90 conforme a Figura 12. Estas 3 substâncias foram identificadas quando da

obtenção da fração clorofórmica a partir do extrato hidralcoólico, seguida da concentração e cromatografada usando o clorofórmio como fase móvel. O α -tocoferol utilizado como padrão apresentou R_f igual a 0,95. A neolignana denominada conocarpano, isolada das raízes de *Piper regnellii* pelo setor de Produtos Naturais do Departamento de Química Orgânica (Instituto de Química da Universidade de S. Paulo), também aplicada, apresentou R_f 0,6 coincidente com uma mancha com atividade antioxidante e presente em nosso extrato de folhas conforme apresentado na Figura 13. Tal resultado nos leva a crer que esta substância deva, muito provavelmente, ser a lignana acima citada, isolada por Benevides (1996).

Na mesma modalidade de experimento -- cromatografia em camada delgada -- chamou-nos atenção a intensidade da mancha (de R_f = 0,60 quando utilizado a fase móvel 1 e R_f = 0,35 quando usada a fase móvel 2) obtida a partir do extrato das raízes de *Pothomorphe umbellata*, evidenciando uma grande atividade antioxidante deste extrato e, em particular, desta(s) substância(s).

Após esta primeira abordagem de atividade, já sinalizando para os extratos mais ativos, foram empregados ensaios *in vitro* de inibição do processo de oxidação espontânea em homogenato de cérebro, conforme metodologia aplicada por pesquisadores sul-americanos e europeus (Stocks et al., 1974; Lissi et al., 1986). Para isto, foram elaborados extratos secos liofilizados, partindo-se dos extratos hidroalcoólicos dos diversos órgãos -- raízes, caules e folhas -- das duas espécies vegetais.

Estes extratos submetidos aos ensaios de avaliação de sua capacidade antioxidante em homogenato de cérebro, conforme metodologia descrita no item 4.3.1.2, apresentaram as curvas de inibição de lipoperoxidação espontânea mostradas nas tabelas e gráficos das figuras apresentadas no item 5.2. Estes resultados demonstram, também neste

modelo, um efeito acentuadamente superior da espécie vegetal *Pothomorphe umbellata*. Uma melhor visualização destes resultados pode ser feita pela comparação dos valores de $Q_{1/2}$ (TBARS). Para *Pothomorphe umbellata* 4,4; 19,3; 38,5 ($\mu\text{g/mL}$) -- para raiz, caule e folha, respectivamente, e para *Piper regnellii* 13,3; 26,0; 64,4 ($\mu\text{g/mL}$) -- para folha, raiz e caule, respectivamente.

Pode-se perceber, no caso de *Piper regnellii*, que a eficácia dos extratos secos decresce na seguinte ordem: folhas > raízes > caules, sendo que os caules e as raízes apresentam atividades, respectivamente, 5 e 2 vezes menores que a apresentada pelas folhas. Para a espécie vegetal *Pothomorphe umbellata* a seqüência de eficácia é a seguinte: raízes > caules > folhas, sendo o efeito das raízes cerca de 4,5 e 9 vezes mais potente que os caules e folhas, respectivamente. Se considerados apenas os órgãos vegetais de cada uma das espécies que demonstraram melhor atividade, verifica-se que a ação das raízes de *P. umbellata* apresenta-se cerca de 3 vezes superior à das folhas de *P. regnellii*. A partir dos resultados obtidos nestes ensaios, pode-se destacar a atividade antioxidante apresentada pela raiz de *Pothomorphe umbellata* confirmando o anteriormente obtido nos ensaios de proteção do β -caroteno tanto no método espectrofotométrico quanto no de cromatografia em camada delgada.

A combinação destes resultados levou-nos à escolha do extrato seco desta parte do vegetal -- qual seja a raiz de *Pothomorphe umbellata* -- para a realização uma investigação mais apurada na tentativa de se buscar os componentes ou o principal componente químico responsável pela eficácia demonstrada pelo extrato da droga vegetal inscrita na primeira edição de nossa farmacopéia, fato que também pesou em nossa decisão.

Vale lembrar que a Farmacopéia Brasileira na sua primeira edição (Silva, 1929) inscreve as raízes de pariparoba como droga vegetal para elaboração de extrato fluido e tintura vegetais. A indicação terapêutica dos fitoterápicos é dada por Raul Coimbra como colagogo empregado nos ingurgitamentos do fígado e do baço citando ainda sua ação benéfica em epilepsia e outras nevroses (Coimbra, 1958). Entretanto, vulgarmente, são empregadas tanto as folhas como as raízes, utilizadas na forma de cozimento para uso interno no tratamento de afecções, obstrução e inflamação do fígado (Riedel, 1941).

Outro fato importante e curioso é a confusão gerada pelo nome vulgar “pariparoba” havendo mesmo troca de uma espécie por outra, *P. umbellata* por *P. regnellii* e vice-versa, fato este registrado tanto em levantamentos da cultura popular de nosso país (Camargo, 1988), como em relatórios de análises de identificação de drogas vegetais destinadas ao uso farmacêutico (Salatino & Silva, 1975) e, ainda, em trabalhos de cunho científico, como o realizado em 1935 por Waldemar Peckolt da Secção de Botânica Médica do Instituto Butantan e dado à publicação 7 anos depois, já após sua morte (Peckolt, 1941). Por outro lado, já vêm ao encontro da busca de resolução deste problema, os estudos farmacognósticos realizados por pesquisadores brasileiros com a droga vegetal - raízes de pariparoba -- inscrita na 1.ª edição da Farmacopéia Brasileira (Riedel, 1941; Moraes et al., 1985), bem como com os fitoterápicos obtidos a partir dela (Moraes et al., 1984). Contribuem, também, os trabalhos de morfodiagnose feito com as folhas das duas espécies: *P. umbellata* (Moraes et al., 1986/87) e *P. regnellii* (Salatino & Silva, 1975).

Assim sendo, a partir do extrato bruto das raízes de *P. umbellata* procedeu-se ao fracionamento por cromatografia de adsorção em coluna fechada -- via úmida -- utilizando-se como eluente uma mistura de clorofórmio e etanol, conforme descrito no item 4.4. O resultado da análise

das diferentes frações submetidas à cromatografia em camada delgada/ β -caroteno foi a caracterização de uma substância obtida nas frações 7 e 8 eluídas da coluna e para qual levantou-se hipótese de se tratar de um derivado fenólico isolado pela primeira vez em 1980 no Instituto de Química da Universidade de São Paulo por Kijjoa e colaboradores (Kijjoa et al., 1980).

Sendo, primeiramente, feita a curva de absorção em U.V. a substância foi a seguir à análise espectrométrica de ressonância nuclear magnética de prótons. O espectro de ressonância nuclear magnética apresenta os sinais correspondentes aos deslocamentos químicos que seguem: RMN (200 MHz, CDCl_3 , δ): 1,20-2,05 (m, 20H); 4,97-5,11 (m, 4H); 5,91-6,02 (dd, 1H); 6,71-6,93 (m, 3H), confirmando os dados da literatura (Kijjoa et al., 1980; Gustafson et al., 1992) que indicam se tratar da estrutura abaixo, qual seja do composto denominado 4-nerolidilcatecol.

O isolamento do composto químico catecólico, caracterizado como o mais ativo presente no extrato de *Pothomorphe umbellata*, permitiu seu estudo empregando-se os modelos já propostos: inibição da lipoperoxidação espontânea [medida de TBARS e quimiluminescência (QL)] do homogenato de cérebro. Pode, então, ser feita a determinação comparativa com o mais

importante composto antioxidante que atua na terminação da reação de lipoperoxidação, o composto α -tocoferol, utilizado como referência.

As curvas de inibição da lipoperoxidação e da quimiluminescência obtidas a partir dos ensaios são mostradas nas Figuras 21 e 22. Os valores de $Q_{1/2}$ nos dois modelos (TBARS = $0,75 \mu\text{M} \times 14,4 \mu\text{M}$ e QL = $0,68 \mu\text{M} \times 10,9 \mu\text{M}$ para 4-nerolidilcatecol e α -tocoferol, respectivamente) em favor do composto catecólico demonstram uma eficácia antioxidante de, aproximadamente, 20 vezes maior do composto 4-nerolidilcatecol em relação ao α -tocoferol. O resultado bastante interessante põe em destaque o derivado fenólico, também encontrado por pesquisadores americanos em outra espécie do gênero: *Pothomorphe peltata*, a caapeba do norte (Gustafson et al., 1992).

Infelizmente, é irrisório o número de estudos químico-farmacológicos feitos com estas duas espécies de Piperaceae. Em relação à *Piper regnellii* a literatura especializada traz apenas o registro da detecção dos terpenóides cariofileno, limoneno, linalol e geraniol no óleo essencial das suas folhas (Salatino & Silva, 1975). O estudo químico mais completo da espécie foi realizado no Instituto de Química da Universidade de São Paulo, tendo sido isolados das raízes do vegetal vários compostos fenilpropanóides e neolignanas nas proporções de 0.025% e 0,2%, respectivamente (Benevides, 1996). Dentre as neolignanas, a que ocorre em maior proporção é o composto conocarpano a seguir apresentado que em nosso trabalho foi detectado como um dos componentes ativos do extrato de folhas de *Piper regnellii* (Figura 13).

conocarpano

Entretanto, o bom desempenho antioxidante apresentado pelo extrato das folhas de *Piper regnellii* parece começar a ter explicação pelos trabalhos da ação de neolignanas desenvolvidos por pesquisadores chineses e japoneses. Foi demonstrada uma extraordinária atividade antioxidante sobre a lipoperoxidação das neolignanas -- magnolol e honokiol -- isoladas de plantas do gênero *Magnolia*, da mesma primitiva subclasse Magnoliidae, segundo Cronquist (Lo et al, 1994; Haraguchi et al., 1996). O efeito antiperoxidante das lignanas nestes ensaios chega a ser 1000 vezes superior ao do α -tocoferol (Lo et al., 1994). Estes resultados, no mínimo, encorajadores, abrem uma grande perspectiva para a continuidade do estudo desta Piperaceae brasileira.

honokiol

magnolol

Quanto à espécie *Pothomorphe umbellata*, apenas um trabalho de pesquisadores suíços no final da década de 70 relata o isolamento do componente dilapiol (Bernhard & Thiele, 1978). Sem dúvida, o estudo químico mais completo foi, também, desenvolvido no Instituto de Química da Universidade de S. Paulo por Kijjoo e colaboradores, que isolaram do vegetal, dentre outros, o composto 4-nerolidilcatecol. No estudo, o percentual relatado foi de 0,05% (Kijjoo et. al., 1980).

Os extratos secos liofilizados das raízes de *P. umbellata* produzidos nos laboratórios da disciplina de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de S. Paulo apresentaram teores em torno de 2,3% (Röpke, 1999). A se considerar esta média de presença de 4-nerolidilcatecol nos extratos liofilizados de raízes, pode-se deduzir que o extrato bruto apresenta uma atividade relativa maior que a do composto puro, sendo a razão do efeito cerca de 2 : 1 em favor do extrato bruto.

Tal fato demonstra que, apesar de um composto (no caso, o 4-nerolidilcatecol) ser o maior responsável pela atividade antioxidante das raízes de *P. umbellata*, conforme observado pelo método cromatográfico em camada delgada, a presença de outros componentes ativos no extrato sugerem uma ação sinérgica ou potencializadora do efeito encontrado. Semelhante resultado encontrou Desmarchelier e colaboradores quanto à maior ação seqüestradora de radicais peroxila do extrato das raízes quando comparada à do composto isolado (Desmarcelier et al., 1997). Este fato é bastante comum em preparações fitoterápicas, onde a atividade farmacológica é determinada por um conjunto de substâncias conhecidas como “fitocomplexo vegetal” (Penso, 1993; Schulz et al., 1998).

Além disso, a explicação do fato da substância isolada da raiz de *P. umbellata* apresentar, no modelo de homogenato de cérebro, um poder antioxidante 20 vezes superior ao α -tocoferol está, muito provavelmente,

relacionada com a estrutura dos dois compostos, que apresentam uma natureza anfifílica -- uma parte da molécula apresentando caráter hidrofílico, e outra, caráter lipofílico, apresentando, diferentes coeficientes de partição, a saber, 12,0 para o α -tocoferol e 6,0 para o nerolidilcatecol (Tabela 16).

Os estudos que relacionam estas características com a ação inibidora da peroxidação e o meio em que tais compostos agem tiveram seu maior desenvolvimento a partir de meados da década de 80 com pesquisas de antioxidantes relacionados entre si, como os tocoferóis e derivados e antioxidantes fenólicos (Castle & Perkins, 1986; Niki, 1987; Porter et al., 1989). As pesquisas se intensificaram e se tornaram mais completas a partir dos trabalhos desenvolvidos pelos pesquisadores Edwin N. Frankel e Shu-Wen Huang da Universidade da Califórnia e seus colaboradores, investigando a ação de compostos inibidores do processo oxidativo em emulsões (Huang et al., 1994; Frankel et al., 1994; Schwarz et al., 1996).

Nestes estudos, a análise do efeito antioxidante continua a ser feita a partir de um *composto ativo*, porém, frente a seu *alvo* localizado em um *meio*, onde se processa o fenômeno. Passam a ser muito melhor analisados, além dos meios monofásicos (oleoso ou aquoso), os meios heterofásicos (bi-fásicos nos casos de emulsões óleo/água) ou mesmo os multifásicos nos casos de micelas e lipossomas (Frankel et al., 1994; Iwatsuki et al., 1994; Huang et al., 1996). É destacada a sua influência sobre a atividade antioxidante de compostos caracteristicamente lipofílicos como o α -tocoferol, quando comparadas com seus derivados ou mesmo, compostos relacionados de características hidrofílicas, como o trolox. (Huang, et al., 1996a). Estes pesquisadores chegaram à conclusão que antioxidantes de características lipofílicas são mais efetivos em emulsões óleo em água do que só em meio de óleo puro, enquanto o oposto é verdadeiro para os antioxidantes mais hidrofílicos. As diferenças observadas na eficiência dos antioxidantes poderiam ser explicadas pelo

fator de mobilidade ou difusão dos antioxidantes e compostos oxidáveis no meio de reação (Niki, 1985; Buettner, 1992; Barclay & Vinqvist, 1994).

Trolox

Para uma busca de entendimento e explicação da atividade antioxidante de compostos hidro/lipossolúveis relacionados utilizou-se muito a dupla formada pelo α -tocoferol (lipossolúvel) e o trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametil-2-cromano carboxílico) seu derivado hidrossolúvel. A evolução das propostas desta linha de pesquisa pode ser melhor visualizado pelos modelos apresentados pelos estudiosos do tema no decorrer dos últimos anos e mostradas nas Figuras 26,27 e 28. Segundo os autores, não deve ser considerada apenas a capacidade antioxidante *per se*, mas igualmente o local da ação, com destaque para os fenômenos de interface, que ocorrem nas membranas biológicas, especialmente a difusão e a mobilidade do composto.

Figura 24 - Regeração da vitamina E pela vitamina C no processo oxidativo dos lipídios de membranas (de acordo com Niki, 1987).

Figura 25 - Representação esquemática da difusão do radical peroxila da fase lipídica para a região polar da membrana na direção do antioxidante hidrofílico - Trolox (segundo Barclay & Vinqvist, 1994).

Figura 26 - Etapas da lipoperoxidação em membranas: a) iniciação; b) reação com oxigênio produzindo um radical peroxila; c) partição de uma porção do radical peroxila na interface membrana-água; d) regeneração do radical peroxila pela vitamina E com formação do radical tocoferila; e) regeneração do radical tocoferila pela vitamina C na interface da membrana-água com a regeneração do radical ascorbato pelo sistema enzimático (de acordo com Buettner, 1993).

Nesta linha poderíamos, por analogia com a molécula do α -tocolferol, estabelecer as possíveis estruturas fenólicas que estabilizam e caracterizam a ação antioxidante do composto 4-nerolidilcatecol:

A importante influência do coeficiente de partição dos compostos envolvidos, sua determinação e conseqüente correlação com as diferenças de afinidades entre as interfaces de ar/óleo (no caso dos sistemas oleosos) e as interfaces óleo/água no caso das emulsões e sistemas micelares mais complexos, só começou a aparecer nos trabalhos relativamente recentes de meados da década de 90 (Huang et al., 1994; Schwarz et al., 1996; Priyadarsini et al., 1998).

No presente estudo, parte da explicação do melhor desempenho da substância isolada das raízes de *Pothomorphe umbellata*, o 4-nerolidilcatecol, em relação à vitamina E, poderia ser dada pela comparação dos coeficientes de partição determinados para os dois antioxidantes: maior que 12 para o caso do alfa-tocoferol, demonstrando uma altíssima lipossolubilidade e 6,03 para o caso do derivado catecólico isolado. Esta maior hidrossolubilidade -- ou menor lipofilicidade -- do 4-nerolidilcatecol em relação à vitamina E poderia, assim, estar contribuindo para sua ação antioxidante por ter facilitada a sua distribuição no meio de reação e um melhor desempenho nos fenômenos de interface.

A complexidade do fenômeno de oxidação, principalmente, da lipoperoxidação, e a análise mais aprofundada de todos os fatores envolvidos durante o processo, têm levado os pesquisadores, inclusive da área de alimentos, a proporem, para estudo e busca de compostos antioxidantes, modelos que utilizem sistemas heterofásicos submetidos a oxidação o mais próximo possível da auto-oxidação espontânea, ocorrendo a temperaturas não superiores a 37°C (Frankel et al; 1996). Destacam-se vantagens de que os ácidos graxos poli-insaturados do material biológico ocorrem em grande parte na forma de complexos com proteínas ou complexos parcialmente hidrofílicos. Além disso, o substrato biológico contém vários tipos de substâncias: ions metálicos, ácidos orgânicos como o ácido ascórbico, peptídios, compostos sulfurados e outros que criam ou

modificam o potencial oxidante/antioxidante do meio, diferentemente do que ocorre em simples emulsão de lipídios em água (Stocks et al., 1974; Barrier et al., 1998)

Desta forma, o emprego de um método que utilize como meio um substrato biológico -- como o homogenato de cérebro contendo o conjunto de compostos protéicos e lipídicos envolvidos no processo oxidativo -- pareceu-nos o mais adequado para o estudo dos extratos vegetais e princípios ativos naturais. Há necessidade, porém, em razão do elevado número de princípios ativos vegetais que já se conhece, e que cresce a cada dia, de ter-se um critério ou método de escolha prévia daqueles potencialmente antioxidantes. Podemos, com a eleição e combinação de métodos de triagem e métodos de avaliação mais efetiva da capacidade antioxidante (em substratos biológicos), estar otimizando a busca destes compostos.

Finalizando -- e procurando um elo de ligação ou uma correlação entre os vegetais da família Piperacea e outras da mesma ordem; sua constituição química; sua atividade antioxidante e suas ações farmacológicas -- parece-nos pertinente uma última observação do fato de que várias plantas, extratos ou substâncias que apresentam efeito antioxidante terem usos relacionados, ainda que popularmente, aos problemas do sistema nervoso central. Exemplo marcante desta assertiva é o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), com grande atividade antioxidante, usado na medicina caseira nos casos de nervosismo, histeria (Cruz, 1982), bem como no esgotamento intelectual (Coimbra, 1958). A *Melissa officinalis* é outro exemplo representativo e de igual forma é citado o uso da pariparoba (*Pothomorphe umbellata*) pela sua "ação neurótica, com bons resultados na epilepsia e outras nevroses" (Coimbra, 1958). No Congo, esta planta é utilizada como sedativo e estudos laboratoriais feitos em ratos demonstrou ação diminuidora da atividade motora espontânea (Bioka &

Abena, 1990). Como último, exemplo tem-se as kavapironas -- lactonas biossintetizadas por *Piper methysticum* pela mesma via do ácido chiquímico, (comum na ordem Piperales, que engloba todos estes gêneros) -- e foram recentemente colocadas no mercado na forma de extrato padronizado dos rizomas da planta. É indicado como calmante, ansiolítico e psico-relaxante (*Laitan*®). Pesquisas realizadas com as lignanas de várias espécies do gênero *Magnolia*, que na África são usadas nos problemas de distúrbios neuronais e depressores do sistema nervoso central, vêm sendo estudadas pelas suas propriedades antiperoxidativas (Watanabe et al., 1983; Lo et al., 1994; Haraguchi et al., 1997).

Isto nos parece mostrar a extrema inter-relação entre as diversas áreas das ciências químico-farmacológicas que poderia, sem dúvida, ser considerado objeto de estudo de uma Farmacognosia moderna, como também, nos aponta e nos indica as enormes possibilidades de pesquisa a serem conduzidas tanto com as raízes de *P. umbellata* (L.) Miq. como com as folhas de *Piper regnellii* (L.) C. D.C.

Laitan® - nome de especialidade farmacêutica comercializada por Byk Química

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Pode-se apresentar como conclusões do presente trabalho o seguinte:

7.1 - É possível, necessária e válida a combinação de diferentes métodos de análise na avaliação da capacidade antioxidante *in vitro* de extratos vegetais e compostos químicos de origem vegetal.

7.2 - A eleição e combinação dos métodos, a saber: - 1) co-oxidação de substrato (β -caroteno/ácido linoleico) e 2) lipoperoxidação espontânea de homogenato de cérebro - para a detecção e medida da atividade antioxidante de extratos e substâncias vegetais, mostrou-se viável e adequada.

7.3 - Os extratos vegetais hidroalcoólicos das raízes, caules e folhas das espécies vegetais *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. e *Piper regnellii* (L.) C. DC. da família Piperaceae, apresentam atividade antioxidante *in vitro*.

7.4 - Para a espécie *Pothomorphe umbellata* as raízes demonstraram possuir o maior efeito antioxidante em relação aos outros órgãos vegetais. Para *Piper regnellii* as folhas demonstraram ser a parte mais ativa.

7.5 - O componente do extrato das raízes de *P. umbellata* que apresenta maior atividade antioxidante é o composto químico 4-nerolidilcatecol.

7.6 - Pela metodologia utilizada o composto 4-nerolidilcatecol apresenta uma capacidade antioxidante, aproximadamente, 20 vezes superior à apresentada pelo composto α -tocoferol.

7.7 - A espécie *Piper regnellii* apresenta grande potencial para futuro estudo da atividade antioxidante, principalmente, suas folhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADZET, T., CAMARASA, J., LAGUNA, J. C. - Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v. 50, p. 612-7, 1987.
- AESCHBACH, R., LOLIGER, J., SCOTT, B. C., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B., ARUOMA, O. I.- Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerole, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v.32, p.31-36, 1994.
- AMORIM, C. Z., FLORES, C. A., GOMES, B. E., MARQUES, A. D., CORDEIRO, R, S. - Screening for antimalarial activity in the genus *Phothomorphe*. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 24, p. 101-6, 1988.
- ARORA, A.; NAIR, M.G.- Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic. Biol. Med.*, New York, v.24, p. 1355-63, 1998.
- ARUOMA, O. I. - Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food. Chem. Toxic.*, Oxford, v.32, n. 7, p. 661-83, 1994.
- ARUOMA, O. I., HALLIWELL, B., AESCHBAH, R., LOLIGERS, J.- Antioxidant and pro-oxidant properties of active rosemary constituents: carnosol and carnosic acid. *Xenobiotica*, London, v.22, p.257-68, 1992.
- ARUOMA, O. I., MURCIA, A., BUTLER, J., HALLIWELL, B. - Evaluation of the antioxidant and prooxidant actions of gallic acid and its derivatives. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 41, p.1880-5, 1993.
- ATKINS, P. W. - *General Chemistry*. New York: Scientific American Books, 1989. p.96-105.
-

- BARCLAY, L. R. C., VINQVIST, M. R. - Membrane peroxidation: inhibiting effects of water-soluble antioxidants on phospholipids of different charge types. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 16, p. 779-88, 1994.
- BARRIER, L., PAGE, G., FAUCONNEAU, B., JUIN, F., TALLINEAU, C. - Autoxidation of rat brain homogenate: evidence for spontaneous lipid peroxidation. Comparison with the characteristics of Fe^{2+} and ascorbic acid-stimulated lipid peroxidation. *Free Rad Res.*, New York, v. 28, p. 411-22, 1998.
- BENDICH, A., MACHLIN, L., J., SCANDURRA, O., BURTON, G. W., WAYNER, D. D. M. - The antioxidant role of vitamin C. *Adv. Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 2, p.419-44, 1986.
- BENEVIDES, J. P. C. - *Estudo químico e biossintético de Piper regnellii* Miq. (Piperaceae). São Paulo, 1996. 170p. [Dissertação de mestrado. Instituto de Química - Universidade de São Paulo].
- BERNHEIM, F., BERNHEIM, M. L. C., WILBUR, K. M. - The reaction between thiobarbituric acid and the oxidation products of certain lipides. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 74, p.257-64,1948.
- BHATTACHARYYA, B., JOHRI, B. M. - Flowering plants. Taxonomy and phylogeny. Berlin: Springer Verlag. 1998. p. 175-7.
- BIOKA, D., ABENA, A. - Psychopharmacologic profile of na aqueous extract of *Piper umbellatum*. *Encephale*, v. 13, p. 205-8, 1990. Apud: MEDLINE [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> [oct. 10,1999].
- BRASIER, M. D. - The early fossil record. *Chemistry in Britain*, London, v.15, p.588-92, 1979.
-

- BUETTNER, G.- The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alfa-tocoferol, and ascorbate. *Arch.Bioch. Biophys.*, New York, v.300, p.535-43, 1993.
- BURKE, B., NAIR, M. - Phenylpropene, benzoic acid and flavonoid derivatives from fruits of jamaican *Piper* species. *Phytochemistry*, Oxford, v. 25, p. 1427-30, 1986.
- BURTON, G. W., HUGHES, L., INGOLD, K. U.- Antioxidant activity of phenols related to vitamin E. Are the chain-breaking antioxidants better than α -tocoferol? *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.105, p.5950-1, 1983.
- BURTON, G. W., INGOLD, K. U. - β -Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science*, Washington, v.224, p.569-73, 1984.
- BURTON, G. W., INGOLD, K. U.- Autooxidation of biological molecules. I. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidants in vitro. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.103, p. 6472-7, 1981.
- BYSBY, R. H., AHMED, S. - Transverse distribution of α -tocopherol in bilayer membranes studied by fluorescence quenching. *Free Radic. Biol. Med.*, New York, v. 6, p. 231-9, 1989.
- CADENAS, E., PACKER, L. - *Handbook of oxidants*. New York: Marcel Dekker, 1996. 602 p.
- CADENAS, E., SIES, H.- Low-level chemiluminescence as an indicator of singlet molecular oxygen in biological systems. *Method. Enzymol.*, New York, v. 105, p. 221-231, 1984.
-

- CALLE-ALVAREZ, J. - Contribucion al estudio de algunas especies de la familia Piperaceae. *Rev. Col. Quím. Farm.*, Bogotá, v. 4, p. 47-57, 1983.
- CAMARGO, M. T. L. A. - *Plantas medicinais e de rituais afro-brasileiros I*. São Paulo: ALMED, 1988. 97p.
- CASSELLS, B. K., ASECIO, M., CONGET P., SPEISKY, H., VIDELA, L. A., LISSI, E. A. - Structure-antioxidative activity relationships in benzyloquinoline alkaloids. *Pharmacol. Res.*, London, v.31, p.103-7, 1995.
- CASTLE, L., PERKINS, M. J. - Inhibition kinetics of chain-breaking phenolic antioxidants in SDS micelles. Evidence that intermicellar diffusion rates may be rate-limiting for hydrophobic inhibitors such as α -tocopherol. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v. 108, p. 6381-2, 1986.
- CAVALLINI, L., BINDOLI, A., SILIPRANDI, N. - Comparative evaluation of antiperoxidative action of silymarin and other flavonoids. *Pharmacol. Res. Comm.*, London, v. 10, p. 133-6, 1978.
- CHANG, S. S., OSTRIC-MATIJESEVIC, B., HSIEH, O. A., HUANG, C.- Natural antioxidants from rosemary and sage. *J. Food Sci.*, Chicago, v.42, p.1102-6, 1977.
- CHIRICO, S. - High-performance liquid chromatography-based thiobarbituric acid tests. *Methods in Enzymology*, New York, v. 233, p. 314-8, 1994.
- CHOU, P. T., KHAN, A. U. - L-Ascorbic acid quenching of singlete delta molecular oxygen in aqueous media: generalized antioxidant property of vitamin C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, New York, v. 115, p.932-7, 1983.
-

- CONN, P. F., LAMBERT, C., LAND, E. J., SCHALCH, W., TRUSCOSTT, T. G. - Carotene-oxygen radical interations. *Free Radical Res. Commun.*, London, v.16, p.401-8, 1992.
- CROFT, K. D. - The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 854, p. 435-42, 1998.
- CRONQUIST, A. - An integrated system of classification of flowering plants. New York: Columbia University Press, 1981. p. 17-23, 80-89.
- CRONQUIST, A. - The evolution and classification of flowering plants. 2nd ed. Bronx: New York Botanical Garden. 1988. 555p.
- CRUZ, G. L. - Dicionário das plantas úteis do Brasil. 2.a ed., Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1982. 599 p.
- CUPPETT, S. - Plant production of biochemical compounds. *Inform*, Champaign, v.9, p.588-95, 1998.
- DALTON, D. A. - Antioxidant defenses of plants and fungi. In: AHMAD, S., ed.- *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. New York: Chapman & Hall., 1997. p. 288-355.
- DALTON, D. A., RUSSEL, S. A., HANUS F. J., PASCOE, G. A., EVANS, H. J. - Enzimatic reactions of ascorbate and glutathione that prevent peroxide damage in soybean root nodules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, New York, v. 83, p. 3811-5, 1986.
- DESMARCHELIER, C., MONGELLI, E., COUSSIO, J., CICCIA, G. - Inhibition of lipid peroxidation and iron (II)-dependent DNA damage by extracts of *Pothomorphe peltata* (L.) Miq. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 30, p. 85-91, 1997.
-

- DESMARCHELIER, C., BARROS, S., REPETTO, M., LATORRE, L. R., KATO, M., COUSSIO, J., CICCIA, G. - 4-Nerolidylcatechol from *Pothomorphe* spp. scavenges peroxy radicals and inhibits Fe(II)-dependent DNA damage. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 63, p.561-3, 1997a.
- DEVASAGAYAM, T. P., KAMAT, J. P., MOHAN, H., KESAVAN, P. C., - Caffeine as an antioxidant: inhibition of lipid peroxidation induced by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v.1282, n.1, p.63-70, 1996.
- DIMASCIO, P., KAISER, P., SIES, H. - Lycopene as the most efficient biological carotenoid oxygen quencher. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v. 274, p. 532-8, 1989.
- DUVE, K. J., WHITE, P. J.- Extraction and identification of antioxidants in oats. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v.68, p.365-70, 1991.
- DZIEDZIC, S. Z., HUDSON, B. J. F.- Polyhydroxy chalcones and flavanones as antioxidants for edible oils. *Food Chem.*, Barking, v.12, p.205-12, 1983.
- ECONOMOU, K. D., OREPOULOU, V., THOMOPOULOS, C. D.- Antioxidant activity of some plant extracts of the family Labiatae. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, Champaign, v.68, p.109-13, 1991.
- FELZENSZWALB, I., VALSA, J. O., ARAÚJO, A. C., ALCANTARA-GOMES, R. - Absence of mutagenicity of *Pothomorphe umbellata* and *Pothomorphe peltata* in the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity assay. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, Ribeirão Preto, v. 20, p. 403-5, 1987.
- FOOTE, C. S., DENNY, R. W.- Chemistry of singlet oxygen.VII. Quenching by β -carotene. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v.90, p.6233-5, 1968.
-

- FOOTE, C. S., DENNY, R. W., WEAVER, Y., CHANG, Y., PETERS, J.-
Quenching of singlet oxygen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 171,
p.179-84, 1970.
- FRANKEL, E. N., HUANG, S. W., KANNER, J., GERMAN, J. B.- Interfacial
phenomena in the evaluation of antioxidants: bulk oils vs emulsions. *J.
Agric. Food. Chem.*, Washington, v. 42, p.1054-9, 1994.
- GIBBS, R. D. - Chemotaxony of flowering plants. v. III. London: McGill-Queen's
University Press. 1974. p. 1532-7.
- GOPALA KRISHNA, A. G., PRABHAKAR, J. V. - Antioxidant efficacy of amino
acids in methyl linoleate at different relative humidities. *J. Am. Oil Chem.
Soc.*, Champaign, v.71, p.645-7, 1994.
- GORMAN, A. A., HAMBLETT, I., SMITH, K., STANDEN, M. C. - Strychnine: a
fast physical quencher of singlet oxygen. *Tetrahedron Lett.*, Oxford, v.25,
p.581-84, 1984.
- GOTTLIEB, O. R. - The role of oxygen in phytochemical evolution towards
diversity. *Phytochemistry*, Oxford, v.28, p.2545-58, 1989.
- GRAF, E.- Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad. Biol. Med.*, New York,
v.13, p.435-48, 1992.
- GRAY, J. I.- Measurement of lipid oxidation: a review. *J. Am. Oil Chem. Soc.*,
Champaign, v.55, p.539-46, 1978.
- GUSTAFSON, K. R., CARDELLINA II, J. H., McMAHON, J. B., PANNELL, L. K.,
CRAGG, G. M., BOYD, M. - The peltatols, novel HIV-inhibitory catechol
derivatives from *Pothomorphe peltata*. *J. Org. Chem.*, Washington, v. 57, p.
2809-11, 1992.
-

- HALIM, A. B., AHAMDY, O., HASSAB-ALLAH, S., ABDEL-GALIL, F., HAFEZ, Y., DARWISH, A. - Biochemical effect of antioxidants on lipids and liver function in experimentally-induced liver damage. *Ann. Clin. Biochem.*, London, v. 34(pt 6), p. 656-63, 1997.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. - *Free Radicals in Biology and Medicine*. 2nd. ed., Oxford: Claredon Press, 1989. 574p.
- HALLIWELL, B. - Free radicals, reactive oxygen species and human disease: a critical evaluation with special reference to atherosclerosis. *Br. J. Exp. Path.*, London, v. 70, p. 737-57, 1989.
- HALLIWELL, B., AESCHBACH, R., LÖLIGER, J., ARUOMA, O.I. - The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxic.*, Oxford, v. 33, p. 601-17, 1995.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J. M. C. - *Free Radicals in Biology and Medicine*. 3rd. Edition, Oxford: University Press, 1999. 936p.
- HANDA, S. S., SHARMA, A., CHAKRABORTI, K. K. - Natural products and plants as liver protecting drugs. *Fitoterapia*, Milano, v. 57, p. 307-51, 1986.
- HASLAM, E.- Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v. 59, p.205-15, 1996.
- HOEFLER, C., FLEURENTIN J., MORTIER, F., PELT, J. M., GUILLEMAIN, J. - Comparative choleretic and hepatoprotective properties of young sprouts and total plant extracts of *Rosmarinus officinalis* in rats. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 19, p. 133-43, 1987.
-

- HOLLEY, A. E., WALKER, M. K., CHEESMAN, K. H., SLATER, T. F. - Measurement of *n*-alkanals and hydroxyalkenals in biological samples. *Free Rad Biol. Med.*, New York, v. 15, p. 281-9, 1993.
- HUANG, S. W., FRANKEL, E. N., GERMAN, J. B. - Antioxidant activity of α - and γ -tocopherols in bulk oils and in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, Whashington, v. 42, p. 2108-14, 1994.
- HUANG, S., HOPIA, A., SCHWARZ, K., FRANKEL, E. N., GERMAN, J. B.- Antioxidant activity of α -tocoferol and trolox in diferent lipid substrates: bulk oils vs oil-water-emulsions. *J. Agric. Food. Chem.*, Washington, v. 44, p. 444-52, 1996.
- HUANG, S., FRANKEL. E. N., SCHWARZ, K., GERMAN, J. B. - Effect of pH on antioxidant activity of α -tocopherol and trolox in oil-in-water emulsions. *J. Agric. Food Chem.*, Washigton, v. 44, p. 2496-502, 1996a.
- HYRAYAMA, O., TAKAGI, M., HUKUMOTO, K., KATOH, S. - Evaluation of antioxidant activity by chemiluminescence. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v. 247, p. 237-41, 1997.
- HYRAYAMA, O., NAKAMURA, K., HAMADA, S., KOBAYASI, Y. - Singlet oxygen quenching ability of naturally occurring carotenoids. *Lipids*, Champaign, v. 29, p. 149-50, 1994.
- INATANI, R., NAKATANI, N., FUWA, H. - Antioxidative effect of the constituents of Rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and their derivatives. *Agric. Biol. Chem.*, Tokyo, v. 47, p. 521-8, 1983.
- INDU, B. K., KAPIL, A. - Evaluation of the liver protective potencial of piperine, an active principle of black and long peppers. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 59, p. 413-7, 1993.
-

- IWAOKA, T., TABATA, F., TAKAHASHI, T.- Lipid peroxidation and lipid peroxide detected by chemiluminescence. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v.3, p.329-33, 1987.
- IWATSUKI, M., TSUCHIYA, J., KOMURO, E., YAMAMOTO, Y., NIKI, E. - Effects of solvents and media on the antioxidant activity of α -tocopherol. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1200, p. 19-26, 1994.
- JANERO, D. R.- Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v.9, p.515-40, 1990.
- JESSUP, W., DEAN, R. T., GEBICKI, J. M. - Iodometric determination of hydroperoxides in lipids and proteins. *Methods in Enzymology*, New York, v. 233, p. 289-302, 1994.
- JITOE, A., MASUDA, T., TENGAH, I. G. P., SUPRAPTA, D. N., GARA, I. W., NAKATANI, N.- Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *J. Agric. Food. Chem.*, Washington, v.40, p.1337-40, 1992.
- JOVANOVIC, S. V., STEEKEN, S., TOSIC M., MARJANOVIC, B., SIMIC, M. G.- Flavonoids as antioxidants. *J. Am. Chem. Soc.*, Washington, v. 116, p.4846-51, 1994.
- KAGAN, V., SHVEDOVA, A., SERBINOVA, E., KHAN, S., SWANSON, C., POWELL, R., PACKER, L. - Dihydrolipoic acid - a universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 44, p. 1637-49, 1992.
- KEHRER, J. P. - Free Radicals as Mediators of Tissue Injure and Disease. *Crit. Rev. Tox.*, Cleveland, v.23, p.21-48, 1993.
-

- KOHN, H., LIVERSEDGE, M. - A new aerobic metabolite whose production by brain is inhibited by apomorphine, emetine, ergotamine, epinephrine and menadione. *J. Pharmacol Exp. Ther.*, Baltimore, v. 83, p. 292-300, 1944.
- KRINSKY, N. - Antioxidant functions of carotenoids. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 7, p. 617-35, 1989.
- LAMAISSON, J. L., PETITJEAN-FREYTET, C., CARNAT, A. - Rosmarinic acid, totalhydroxycinnamic derivatives and antioxidant activity of Apiaceae, Boraginaceae and Lamiaceae medicinals. *Ann. Pharm. Fr.*, Paris, v. 48, p. 103-8, 1990.
- LARSON, R. A. - The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, Oxford, v.27, n.4, p.969-78, 1988.
- LARSON, R. A., MARLEY, K. A. - Quenching of singlet oxygen by alkaloids and related nitrogen heterocycles. *Phytochemistry*, Oxford, v.23, p.2351-4, 1984.
- LEO, A. J. - Methods of calculating partition coefficients. In: HANSCH, C., SAMMES, P. G., TAYLOR, J. B., eds. - *Comprehensive medicinal chemistry*. Oxford: Pergamon Press, 1990. v.4, p. 295-319.
- LEXA, A., FLEURENTIN, J., YOUNOS, C.- Study of antihepatotoxicity of *Eupatorium cannabinum* L. in mice. An adequate method of screening *in vivo* antihepatotoxicity natural principles. *Phytother. Res.*, Succex, v.4, p.148-51, 1990.
- LIEN, E.J., REN, S. J., BUI, H. Y. H., WANG, R. B. - Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 26, p. 285-94, 1999.
-

- LIM, B. P., NAGAO, A., TERAOKA, J., TANAKA, K., SUZUKI, T., TAKAMA, K.- Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochim. Biophys. Acta*, Amsterdam, v. 1126, p.178-84, 1992.
- LIN, C. C., HSU, Y. F., LIN, T. C., HSU, F. L., HSU, H. Y. - Antioxidant and hepatoprotective activity of punicalagin and punicalin on carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v. 50, p. 789-94, 1998.
- LISSI, E. A., CÁCERES, T., VIDELA, L. A.- Visible chemiluminescence from rat brain homogenates undergoing autoxidation. I. Effect of additives and products accumulation. *J. Free Rad. Biol. Med.*, New York, v.2, p.63-9, 1986.
- LOGANI, M. K., DAVIES, R. E. - Lipid oxidation: biologic effects and antioxidants - a review. *Lipids*, Champaign, v. 15, p. 485-95, 1980.
- MARCO, G. I. - Rapid method for evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 45, p. 594-8, 1968.
- MASAKI, H., ATSUMI, T., SAKURAI, H.- Peroxyl radical scavenging activities of hamamelitannin in chemical and biological systems. *Free Radic. Res.*, London, v. 22, p. 419-30, 1995.
- MASUDA, T., JITO, A., ISOBE, J., NAKATANI, N., YONEMORI, S.- Anti-oxidative and anti-inflammatory curcumin-related phenolics from rhizomes of *Curcuma domestica*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 32, p.1557-60, 1993.
- MILLER, H. E. - A simplified method for the evaluation of antioxidants. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Champaign, v. 48, p. 91, 1971.
- MOORE, K., ROBERTS II, L. J. - Measurement of lipid peroxidation. *Free Rad Res.*, London, v. 28, p. 659-71, 1998.
-

- MORAES, M. S., AKISUE, M. K., OLIVEIRA, F., AKISUE, G. - Caracterização cromatográfica da droga e do extrato fluido de *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. - *An. Farm. Química*, S. Paulo, v. 24, p. 1-9, 1984.
- MORAES, M. S., OLIVEIRA, F., AKISUE, M. K., AKISUE, G., MANCINI, B. - Morfodiagnose da droga pariparoba *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. - *Rev. Cienc. Farmac.*, São Paulo, v. 7, p. 27-37, 1985.
- MORAES, M. S., OLIVEIRA, F., MANCINI, B., AKISUE, M. K., AKISUE, G. - Morfodiagnose das folhas e sumidades floridas da droga pariparoba - *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. *Rev. Ciênc. Farm.*, São Paulo, v. 8/9, p. 77-90, 1986/1987.
- NAGABABU, E., LAKSHMAIAH, N.- Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. *Free Rad. Res.*, London, v. 20, p.253-66, 1994.
- NIKI, E. - Antioxidants in relation to lipid peroxidation. *Chem. Phys. Lipids*, Shannon, v. 44, p. 227-53, 1987.
- NIKI, E. - Action of ascorbic acid as a scavenger of active and stable oxygen radicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 54, p.119-124S, 1991.
- OHKAWA, H., OHISHI, N., YAGI, K.- Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v. 95, p.351-8, 1979.
- OZHOGINA, O. A., KASAKAINA, O. T. - β -Carotene as an interceptor of free radicals. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 19, p.575-81, 1995.
- PARMAR, V. S., JAIN, S. C., BISTHT, K. S., JAIN, R., TANEJA, P., JHA, A., TYAGY, D., PRASAD, A. K., WENGEL, J., OLSEN, C. E., BOLL, P. M. -
-

Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, Oxford, v. 46, p. 597-673, 1997.

PECKOLT, W. - Contribuição à matéria médica vegetal do Brasil. Estudo farmacognóstico de *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. *Mem. Inst. Butantan.*, São Paulo, v. 15, p. 59-69, 1941.

PENSO, G. - *Piante medicinali nella terapia medica*. 3.a ed., Milano: OEMF, 1993. p. 5-9.

POMPELLA, A., MAELLARO, E., CASINI, A. F., FERRALI, M., CICCOLI, L., COMPORTI, M.- Measurement of lipid peroxidation in vivo: a comparisson of different procedures. *Lipids*, Champaign, v. 22, p. 206-11, 1987.

PORTER, W. L., BLACK., E. D., DROLET, A. M. - Use of polyamide oxidative fluorescence test on lipid emulsions: contrast in relative effectiveness of antioxidants in bulk versus dispersed systems. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v. 37, p. 615-24, 1989.

PRATT, D. E., MILLER, E. E.- A flavonoid antioxidant in spanish peanuts. *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, Champaign, v. 61, p. 1064-7, 1984.

RAGNARSSON, J. O., LABUZA, T. P. - Accelerated shelf-life testing for oxidative rancidity in foods - a review. *Food Chem.*, Barking, v. 2, p. 291-308, 1977.

RAJAKUMAR, D. V., RAO, M. N. A. - Dehydrozingerone and isoeugenol as inhibitors of lipid peroxidation and as free radical scavengers. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 66, p. 2067-72, 1993.

RAMARATHNAM, N., OSAWA, T., OCHI, H., KAWAKISHI, S.- The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Sci. Techn.*, Amsterdam, v. 6, p. 75-82, 1995.

- RENNENBERG, H. - Glutathione metabolism and possible biological roles in higher plants. *Phytochemistry*, Oxford, v. 21, p. 2771-81, 1982.
- RICE-EVANS, C. A., MILLER, N. J., BOLWELL, P. G., BRAMLEY, P. M., PRIDHAM, J. B.- The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. *Free Rad. Res.*, London, v.22, p.375-83, 1995.
- RIEDEL, O. O.- Subsídios para o estudo farmacognóstico da *Heckeria umbellata* (L.) Kunth. *Trib. Farmac.*, Curitiba, v.9, p.269-83, 1941.
- ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. - *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p. 131-143.
- RÖPKE, C. D. - Avaliação da atividade antioxidante de *Pothomorphe umbellata* Miq. na pele. São Paulo, 1999. 83 p. [Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP].
- ROSENBERG, H. R., CULIK, R. - Effect of α -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, v. 80, p.86-93, 1959.
- SALATINO, A., SILVA, J. B. - Anatomia e óleo essencial das folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *regnellii*. *Bol. Botânica Univ. S. Paulo*, v.3, p. 95-106, 1975.
- SCHOPF, W. - The evolution of the Earliest Cells. *Sci. Am.*, New York, v. 239, p. 85-102, 1978.
- SCHULZ, V., HÄNSEL, R., TYLER, V. E. - Rational phytotherapy. Berlin: Springer-Verlag, 1998. p. 1-23.
-

- SCHWARTZ, K., FRANKEL, E. N., GERMAN, J. B.- Partition behavior of antioxidativ phenolic compounds in heterophasic systems. *Fett/Lipid*, v.98, p.115-21, 1996.
- SCOTT, B. G., BUTLER, J., HALLIWELL, B., ARUOMA, O. I.- Evaluation of the antioxidant actions of ferulic acid and catechins. *Free Rad. Res. Commun.*, London, v. 19, p.241-5, 1993.
- SENGUPTA, S., RAY, A. B. - The chemistry of Piper species: a review. *Fitoterapia*, Milano, v. 58, p. 147-66, 1987.
- SEVANIAN, A., HOCHSTEIN, P. - Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. *Annu. Rev. Nutr.*, Palo Alto, v. 5, p. 365-90, 1985.
- SHAHIDID, F., WANASUNDARA, P.K.J.P.D.- Phenolic antioxidants. *Crít. Rev. Food Sci. Nutr.*, Cleveland, v. 32, p.67-103, 1992.
- SILVA, A. M. F., BORGES, M. F. M., FERREIRA, M. A. - Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, São Paulo, v. 22, p. 94-103, 1999.
- SMITH, C. V., ANDERSON, R. E. - Methods for determination of lipid peroxidation in biological samples. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 3, p. 341-4, 1987.
- SMITH, M. T., THOR, H., HARTZELL, P., ORRENIUS S. - The measurement of lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 31, p. 19-26, 1982.
- SPEISKY, H., CASSELS, B. K., LISSI, E. A., VEDALIA, L. A. - Antioxidant properties of the alkaloid boldine in systems undergoing lipid peroxidation
-

and enzyme inactivation. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v.41, p.1575-81, 1991.

SREEJAYAN, R. M. N.- Curcuminoids as potent inhibitors of lipid peroxidation. *J. Pharm. Pharmacol.*, London, v.46, p. 1013-6, 1994.

STOCKS, J., GUTTERIDGE, J. M. C., SHARP, R. J., DORMANDY, T. L.- Assay using brain homogenate for measuring the antioxidant activity of biological fluids. *Clin. Sci. Molec. Med.*, London, v.47, p.215-22, 1974.

SUZUKI, Y. J., TSUCHIYA, M., PACKER, L. - Thioctic and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Rad. Res. Commun.*, London, v. 15, p.255-63, 1991.

TAIRA, J., IKEMOTO, T., YONEDA, T., HAGI, A., MURAKAMI, A., MAKINO, K.- Essential oil phenylpropanoids: useful as •OH scavengers? *Free Radical Res. Commun.*, London, v. 16, p.197-204, 1992.

TAYLOR, P. J. - Hydrophobic properties of drugs. In: HANSCH, C., SAMMES, P. G., TAYLOR, J. B., eds. - *Comprehensive medicinal chemistry*. Oxford: Pergamon Press, 1990. v. 4, p. 241-294.

TERAO, J.- Antioxidant activity of β -carotene-related carotenoids in solutions. *Lipids*, Champaign, v.24, p.659-61, 1989.

TODA, S., KUMURA, M., OHNISHI, M.- Effects of phenolcarboxylic acids on superoxide anion and lipid peroxidation induced by superoxide anion. *Planta Med.*, Stuttgart, v.57, p.8-10, 1991.

TODA, S., OHNISHI, M., KIMURA, M., TODA, T.- Inhibitory effects of eugenol and related compounds on lipid peroxidation induced by reactive oxygen. *Planta Med.*, Stuttgart, v.60, p.282, 1994.

- TSE, S. Y. H., MAK, I. T., DICKENS, B. F. - Antioxidative properties of harmane and beta-carboline alkaloids. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v.42, p.459-64, 1991.
- UBEDA, A., MONTESINOS, C., PAYA, M., TERCENIO, C., ALCARAZ, M. J., - Antioxidant action of benzyloquinoline alkaloids. *Free Rad. Res Commun.*, London, v.18, p.167-75, 1992.
- UCHIYAMA, M., MIHARA, M.- Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, Baltimore, v.86, p. 271-8, 1978.
- VALENZUELA, A., LAGOS, C., SCHMIDT, K., VIDELA, L. A.- Silymarin protection against hepatic lipid peroxidation induced by acute ethanol intoxication in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, Oxford, v. 34, p. 2209-2212, 1985.
- VAN ACKER, S. A. B. E., KOYMANS, L. M. H., BAST, A.- Molecular pharmacology of vitamin E: structural aspects of antioxidant activity. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 15, p.311-28, 1993.
- VAN ACKER, S. A. B. E., VAN DEN BERG, D., TROMP, M. N. L., GRIFFIOEN, D. H., VAN BENNEKOM, W.P., VAN DER VIJGH, W. J. F., BAST, A.- Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v. 20, p. 331-42, 1996.
- WAINE, R. P. - Origin and evolution of the atmosphere. *Chem. Brit.*, London, v. 24, p.225-30, 1988.
- WATANABE, K., WATANABE, H., GOTO, Y., YAMAGUCHI, M., YAMAMOTO, N., HAGINO, K. - Pharmacological properties of magnolol and honokiol
-

extracted from chinese herb *Magnolia officinallis*: central depressant effects. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 49, p. 103-8, 1983.

WILLIAMS, D. H., STONE, M. J., HAUCK, P. R., RAHMAN, S. K. - Why are secondary metabolites (natural products) biosynthesized?. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v. 52, p. 1189-208, 1989.

WOLFF, S. P. - Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, New York, v. 233, p. 182-88, 1994.

YAMAMOTO, Y. - Chemiluninescence-based high-performance liquid chromatography assay of lipid hydroperoxides. *Methods in Enzymology*, New York, v. 233, p. 319-23, 1994.

YANG, X. W., GU, Z. M., WANG, B. X., HATTORI, M., NAMBA, T. - Comparison of anti-liperodidative effects of the underground parts of *Notopterygium incisum* and *N. forbesii* in mice. *Planta Med.*, Stuttgart, v. 57, p. 399-402, 1991.

YAGI, K. - Lipid peroxides and human diseases. *Chem. Phys. Lipids*, Shannon, v. 45, p. 337-51, 1987.

YANISHLIEVA, N.V.; MARINO, E. M. - Effects of antioxidant stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil. *Food Chem.*, Barking, v. 54, p. 377-82, 1995.

YUTING, C., RONGLIANG, Z., ZHONGJIAN, J., YONG, J.- Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants. *Free Rad. Biol. Med.*, New York, v.9, p.19-21, 1990.