

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA

CLAUDIA ALVES ORTIZ GULARTE

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS AQUOSO E
ETANÓLICO DE *Phyllanthus niruri* IN VITRO**

**Uruguaiiana
2014**

CLAUDIA ALVES ORTIZ GULARTE

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS AQUOSO E
ETANÓLICO DE *Phyllanthus niruri* IN VITRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciada em Ciências da Natureza.

Orientador: Robson Luiz Puntel

Coorientador: Vanderlei Folmer

**Uruguaiiana
2014**

CLAUDIA ALVES ORTIZ GULARTE

**AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS AQUOSO E
ETANÓLICO DE *Phyllanthus niruri* IN VITRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciada em Ciências da Natureza.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: __/__/____

Banca examinadora:

Prof. Dr. Robson Luiz Puntel
Orientador
UNIPAMPA

Prof. Dr. Daniel Henrique Roos
UNIPAMPA

Bel. José Luiz Ribeiro Portela
UNIPAMPA

Dedico este trabalho à Dandara, à Geovana e à Tati. Ah, e ao Matheus. Por tudo que vivenciamos até aqui.

AGRADECIMENTO

Aos professores Robson e Vanderlei que me deram a primeira oportunidade de trabalhar no laboratório de bioquímica como aluna de iniciação científica. Obrigada pelos ensinamentos e amizade ao longo de toda essa caminhada.

Aos colegas de curso que tiveram que conviver e aguentar meus humores e maus temperamentos na maior parte do tempo. Obrigada pela parceria. Em especial às garotas Dandara, Geovana e Tati, que muito além de colegas, se tornaram amigas inseparáveis e pessoas muito importantes para mim. Meninas, levo vocês pra sempre na minha vida e no meu coração, suas lindas.

Aos colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para minha formação. Em especial ao Matheus, que com certeza foi o que mais contribuiu, das mais diversas formas. E também porque foi quem mais sofreu com meus maus modos. Obrigada por me aturar.

Aos professores do curso que, se não conseguiram me ensinar o que fazer, souberam ensinar muito bem o que não devo fazer, afinal, até um mau exemplo é um exemplo. Obrigada à todos. Agradeço em especial ao Rafa pela amizade.

À UNIPAMPA, CAPES, CNPq e FAPERGS pelas bolsas de auxílio e iniciação científica ao longo da graduação.

A todos que cruzaram meu caminho nesse período e que, de uma forma ou de outra, contribuíram para que o esforço se tornasse significativo. Muito obrigada.

RESUMO

As plantas medicinais são amplamente utilizadas pela população desde a antiguidade e na medicina tradicional pelos seus efeitos terapêuticos e benefícios para a saúde. Sabe-se, hoje em dia, que esses efeitos são devidos a compostos constituintes dos vegetais, como os compostos fenólicos e flavonóides, substâncias com comprovada ação antioxidante. Dentre estes vegetais, a *Phyllanthus niruri* é uma planta conhecida popularmente como “quebra-pedra” e utilizada na forma de chás e infusões para o tratamento de diversas desordens, no entanto, não são bem esclarecidos os mecanismos envolvidos na ação dos extratos desta planta, principalmente nos ensaios *in vitro*. Assim, foram investigados os mecanismos de ação antioxidante de extratos aquosos e etanólicos de *P. niruri* frente à geração de diversas espécies radicais e peroxidação lipídica sob condições *in vitro*. Foram avaliadas a atividade inibitória do radical DPPH, o efeito protetor no ensaio de degradação da desoxirribose e a inibição do radical óxido nítrico. Foi testada também a interação dos extratos com íons de ferro pela habilidade dos extratos em quelar Fe^{2+} e reduzir Fe^{3+} , assim como o efeito protetor na peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} no ensaio de TBARS. Foi também avaliada a quantidade de compostos fenólicos e flavonóides presentes em cada extrato. Os resultados obtidos mostram que os extratos possuem significativa ($p < 0,05$) atividade inibitória frente a diversos sistemas de geração de radicais. Os extratos também interagem significativamente ($p < 0,05$) na quelação e redução de íons de ferro, assim como são capazes de reduzir significativamente ($p < 0,05$) a peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} em fosfolipídios, contribuindo para a hipótese de que os extratos podem estar atuando na química redox de íons de ferro. Adicionalmente, foram quantificados o conteúdo de compostos fenólicos e flavonóides presentes nos extratos, compostos aos quais é conferido o potencial antioxidante da planta. Em geral, os resultados demonstram que os extratos testados possuem atividade antioxidante dependente de concentração, da natureza do extrato (se aquoso ou etanólico) e do ensaio avaliado. A partir disso, sugerimos que as propriedades antioxidantes dos extratos podem estar relacionadas com a ação inibitória de diferentes espécies radicais e interação com a química redox de íons de ferro, interferindo nos sistemas de geração de radicais livres.

Palavras-chave: estresse oxidativo, antioxidantes, produtos naturais

ABSTRACT

Medicinal plants are widely used by people since ancient and in folk medicine due its therapeutics effects and benefits to health. We know today that these effects are due to constituents of plant compounds, such as phenolics compounds and flavonoids, substances with proven antioxidant activity. Among these vegetables, *Phyllanthus niruri* is a plant popularly known as “stone-breaker” and used in teas and infusions for the treatment of several disorders; however, are not well understood the mechanisms involved in the action of extracts of this plant, especially in *in vitro* assays. Thus, the mechanisms of antioxidant activity of aqueous and ethanolic extracts of *P. niruri* against the generation of several radical species and lipid peroxidations under *in vitro* conditions were investigated. The inhibitory activity of DPPH radical, the protective effect in the deoxyribose degradation assay and inhibition of nitric oxide radical were evaluated. Also tested the interaction of iron ions with extracts for the ability of the extracts to chelate Fe^{2+} and Fe^{3+} reduction, as well as the protective effect on Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in TBARS assay. We also evaluated amount of phenolic compounds and flavonoids present in each extract. The results show that the extracts have significant ($p < 0.05$) inhibitory activity against various radical generating systems. The extracts also interact significantly ($p < 0.05$) in the chelation and reduction of iron ions as well as are capable to reduce significantly ($p < 0.05$) Fe^{2+} -induced lipid peroxidation in phospholipids, contributing to the hypothesis that extracts may be acting on the redox chemistry of iron ions. Additionally, we quantified the content of flavonoids and phenolic compounds present in the extracts, compounds which is given the antioxidant potential of the plant. In general, the results demonstrate that the extracts have been antioxidant activity, but this activity is dependent from tested concentration, by the nature of the extract (aqueous or ethanolic) and the evaluated essay. From this, we suggest that the antioxidant properties of the extracts may be related to the inhibitory action of different radical species and interaction with the redox chemistry of iron ions by interfering with the generation of free radicals systems.

Keywords: oxidative stress, antioxidants, natural products.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	REFERENCIAL TEÓRICO	10
2.1	Estresse Oxidativo	10
2.1.1	Espécies reativas	10
2.1.2	Peroxidação lipídica	10
2.2	Antioxidantes	11
2.2.1	Compostos fenólicos	11
2.2.2	Flavonóides	12
2.3	<i>Phyllanthus niruri</i>	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1	Reagentes	14
3.2	Preparo dos extratos	14
3.3	Atividade inibitória do radical DPPH	14
3.4	Ensaio de degradação da desoxirribose	15
3.5	Atividade inibitória do radical óxido nítrico (NO)	15
3.6	Ensaio de quelação de Fe²⁺ e redução de Fe³⁺	15
3.7	Ensaio de peroxidação lipídica em fosfolipídios	16
3.8	Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos	16
3.9	Determinação do conteúdo total de flavonóides	16
3.10	Análise estatística	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	24
	REFERÊNCIAS	25

1 INTRODUÇÃO

Recentemente, as plantas medicinais têm sido amplamente estudadas em razão de seus efeitos benéficos para a saúde humana e seus efeitos farmacológicos no tratamento e prevenção de diversas doenças. Historicamente, as plantas foram consumidas como agentes terapêuticos da cultura popular e como medicamento na medicina tradicional, devido sua grande disponibilidade e baixo custo, com mínimos efeitos adversos (Sarkar, 2009). Atualmente sabe-se que o efeito farmacológico das plantas se deve a um conjunto de compostos produzidos pelo metabolismo secundário dos vegetais. Dentre estes compostos, encontram-se compostos fenólicos e flavonóides, moléculas com comprovada ação antioxidante (Saeidnia, 2013).

As espécies reativas são produzidas como produtos da atividade metabólica normal dos organismos e possuem funções fisiológicas fundamentais para o funcionamento celular, no entanto, o excesso dessas espécies nos sistemas biológicos pode resultar em danos às moléculas biológicas em razão de suas características oxidantes (Halliwell, 2007; Halliwell 2010). Antioxidante, por sua vez, é todo composto capaz de doar elétrons e reduzir espécies reativas a moléculas inertes, sem a capacidade de danificar biomoléculas, sendo eficientes, assim, em inibir potenciais efeitos deletérios que as espécies reativas venham a ocasionar (Halliwell, 2010).

Os organismos possuem defesas antioxidantes que impossibilitam as espécies reativas de causar danos, mas se por alguma razão o organismo não consiga equilibrar a razão espécies reativas/defesas antioxidantes é desencadeado um processo denominado estresse oxidativo. A ocorrência desse fenômeno pode acarretar desequilíbrios nas estruturas celulares que muitas vezes estão relacionados no desenvolvimento de situações patológicas (Saeidnia, 2013).

Sendo assim, faz-se a necessidade de antioxidantes de origem exógena, caso o organismo não seja capaz de combater o estresse oxidativo. A busca de compostos antioxidantes dos alimentos, principalmente os encontrados nas plantas medicinais, são uma alternativa para o tratamento e prevenção desses processos que estão associados ao desencadeamento de patologias graves como câncer e doenças neurodegenerativas.

Dentre as plantas comumente utilizadas para fins medicinais, a *Phyllanthus niruri* é conhecida popularmente como “quebra-pedra” por sua ação em doenças do trato urinário, principalmente cálculos renais, o que confere o nome popular dado à planta. Na literatura há relatos de seus efeitos antiinflamatórios, doenças gastrointestinais e hepatoproteção no

combate a hepatites virais (Colpo 2014; Couto,2012; Shakil, 2008; Sprenger, 2013). No entanto, os mecanismos de ação da *P. niruri* não são totalmente esclarecidos.

Partindo-se então do pressuposto que o estresse oxidativo está envolvido no desencadeamento de diversas doenças e que a população tradicionalmente consome produtos naturais com comprovada atividade antioxidante e que a ação de tais compostos ainda não são completamente conhecidas, se faz necessário estudos que tentem elucidar os mecanismos de ação de tais compostos a fim de se utilizá-los com propósitos terapêuticos. Dessa forma, nosso trabalho tem como objetivo avaliar o perfil e os mecanismos antioxidantes de extratos aquoso e etanólico de *Phyllanthus niruri*, em diferentes concentrações, sua ação antioxidante contra diversos radicais, assim como o seu potencial protetor contra a peroxidação lipídica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo é uma situação que pode ocorrer como origem ou consequência de diversas doenças. Acontece no organismo quando há um desequilíbrio entre as espécies reativas produzidas e a capacidade antioxidante dos organismos, acarretando em danos para biomoléculas e para as células. Normalmente aparecem associados a processos de envelhecimento, inflamatórios, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Saeidnia, 2013).

2.1.1 Espécies reativas

São espécies moleculares altamente reativas caracterizadas principalmente pela sua capacidade de oxidação de biomoléculas, que geralmente acarretam em danos que desencadeiam o estresse oxidativo. As espécies reativas podem ser tanto de nitrogênio (ERN) como de oxigênio (ERO). As principais ERNs são o óxido nítrico (NO) e peroxinitrito (ONOO^-), enquanto entre a EROs estão o radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxil (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). As espécies reativas radicalares (que possuem elétrons desemparelhados) são também conhecidas como radicais livres. As espécies reativas podem ser neutralizadas pelas defesas antioxidantes do organismo ou por antioxidantes exógenos provenientes da alimentação. Apesar dos efeitos deletérios causados pelo excesso de espécies reativas, em baixas concentrações elas possuem efeitos fisiológicos fundamentais para o funcionamento celular. As EROs são produzidas como produto da atividade mitocondrial e atuam como sinalizadores moleculares, assim como são capazes de defender o organismo de ataques patógenos (Halliwell, 2010).

2.1.2 Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é definida por Tappel *apud* Halliwell (2007) como a “deterioração oxidativa de lipídios poliinsaturados”. Ácidos graxos poliinsaturados são lipídios que contém mais de duas duplas ligações entre os carbonos que constituem suas cadeias. Sendo as membranas que rodeiam as células e organelas celulares compostas majoritariamente por esses tipos de lipídios, elas são alvos fáceis para oxidação pelas espécies

reativas e ao estresse oxidativo, o que pode resultar em prejuízos para as funções celulares. A avaliação da peroxidação lipídica é amplamente utilizada para a avaliação de estresse oxidativo.

2.2 Antioxidantes

Antioxidante é todo composto capaz de doar elétrons a espécies reativas, neutralizando seus efeitos danosos e não gerando novas espécies reativas.

Os organismos possuem defesas antioxidantes endógenas, provenientes de seu próprio sistema de defesa, que regula os níveis de espécies reativas e impede a ocorrência do estresse oxidativo em situações metabólicas normais. Esses sistemas de defesas antioxidantes podem ser de origem enzimática, como as enzimas superóxido dismutase e catalase, ou não enzimáticos, como a glutatona reduzida (GSH) e o ácido ascórbico (vitamina C). É possível também aos organismos adquirirem antioxidantes de origem exógena através da alimentação, pelo consumo de alimentos de origem vegetal que possuam compostos antioxidantes (Bhattacharjee, 2007).

2.2.1 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são compostos aromáticos que possuem grupos $-OH$ como substituintes dos átomos de hidrogênio (Saeidnia, 2013). Polifenóis, por sua vez, são compostos fenólicos com mais de dois grupos hidroxila presentes em seus anéis. São altamente distribuídos nas plantas frutos do metabolismo secundário destas (Carvalho, 2010). Entre os principais compostos fenólicos presentes nas plantas estão os flavonóis, as antocianidinas, os tocoferóis e os tocotrienóis. Grande parte dos compostos fenólicos apresentam atividade antioxidante *in vitro* e inibem a peroxidação lipídica. Também possuem ação neutralizante de espécies reativas como OH , NO_2 , N_2O_3 , $ONOOH$ e $HClO$ (Halliwell, 2007; Saeidnia, 2013; Carvalho, 2010). Compostos fenólicos possuem a importante propriedade de complexação com metais de transição (especialmente ferro e cobre). A complexação com metais de transição desempenham importante papel biológico na prevenção de possíveis danos oxidativos a biomoléculas causados por radicais $-OH$, que são gerados na interação dos metais com o peróxido de hidrogênio, apresentando assim forte proteção antioxidante (Carvalho, 2010).

2.2.2 Flavonóides

Os flavonóides compõem uma classe bastante importante de polifenóis de relativa abundância entre os metabólitos secundários originados das plantas. São compostos fenólicos ou polifenólicos, com substituintes hidroxilados em seus anéis aromáticos. Pela sua ampla distribuição no reino vegetal infere-se que desempenhem importantes função nas plantas superiores, e embora sejam muito consumidos pelos seres humanos não há comprovação que sejam imprescindíveis para a alimentação humana (Zuanazzi, 2010). Vegetais contendo flavonóides são bastante empregados para fins terapêuticos e estudos sugerem que alguns flavonóides são responsáveis por ação antitumoral, antiviral, antihemorrágica, antiinflamatórias e antioxidantes (Carvalho, 2010; Zuanazzi, 2010).

2.3 *Phyllanthus niruri*

A *Phyllanthus niruri* pertence à família Euphorbiace, e o gênero *Phyllanthus* é constituído por uma ampla variedade de plantas que chegam a somar mais de 500 espécies ao redor do planeta (Shakil, 2008). De pequeno porte, é uma herbácea que pode chegar a pequenos arbustos de 80 cm de altura, amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais com climas chuvosos, presente na América do Sul, sudeste da Ásia, Índia e China (Sprenger, 2013; Markom, 2007). Possui um vasto histórico de uso na Medicina Tradicional Chinesa, e seu uso na Índia já remonta a 2000 anos.

É bastante utilizada na forma de chás e infusões e conhecida popularmente por “quebra-pedra” pelo seu efeito terapêutico em casos de cálculos renais. Estudos comprovam que o extrato aquoso é efetivo na prevenção da formação de cristais de oxalato de cálcio (Bagalkotkar, 2006) Também é utilizada para tratamento de disfunções gastrointestinais, infecções urinárias e desinteria. A literatura reporta seus efeitos antiinflamatórios (Couto, 2012) hepatoprotetor na hepatite B viral (Shakil, 2008) e inibição na replicação e transcriptase reversa do HIV (Qian-Cutrone, 1996), entre diversos outros.

Há vários estudos que analisam/caracterizam os compostos presentes em diversas formas de extratos sendo relatado a presença de flavonóides, alcalóides, glicosídeos, ligninas, tepenóides, taninos, cumarinas e saponinas (Bagalkotkar, 2006) e a eles são atribuídos os efeitos farmacológicos dos extratos da planta. Segundo a Farmacopéia Brasileira (2010), as partes aéreas da planta contém, no mínimo, 6,5% de taninos totais e 0,15% de ácido gálico.

Entre as classes de compostos com presença identificada na *P. niruri* estão:

- Flavonóides: quercetina, rutina, quercetrina, astragalina, catequina entre outros.
- Terpenos: limoneno, p-cineme e lupeol.
- Cumarinas: ácido elágico,
- Ligninas: phillantina e hipophillantina

Os compostos fitoquímicos presentes em *P. niruri* apresentam diferentes características estruturais e efeitos farmacológicos: enquanto as ligninas possuem excelentes propriedades antivirais e hepatoprotetora, os terpenos exibem ação anticarcinogênica e antimicrobiana. Os flavonóides apresentam atividade antioxidante e os alcalóides atividade antiespasmódica. E o mais importante entre todos os dados é que não foram identificados efeitos adversos ou de toxicidade nas pesquisas sobre esta planta, abrindo uma vasta gama de possibilidades para a sua utilização (Bagalkotkar, 2006).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Tris-HCl, ácido tiobarbitúrico (TBA), 1'-1' difenil-2' picrilhidrazil (DPPH), quercetina, ácido gálico e desoxirribose foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Todos os demais reagentes utilizados eram produtos comerciais de padrão analítico.

3.2 Preparo dos extratos

O material vegetal utilizado para o preparo de todos os extratos foi obtido de fonte comercial. Extratos butanólicos, hexanólicos e etanólicos foram obtidos através de 0,9 g de material vegetal, que foram primeiramente macerados e depois mantidos no escuro por 7 dias em 10 mL de solvente. Após 7 dias, os extratos foram filtrados, evaporados e ressuspensos em 10 mL de água destilada. Os extratos aquosos foram preparados todos os dias imediatamente antes do uso, a partir de uma infusão de 0,9 g de planta em 10 mL de água destilada a 95 °C.

3.3 Atividade inibitória do radical DPPH

A atividade antioxidante dos extratos butanólico, hexanólico, etanólico e aquoso foram avaliados pelo monitoramento de sua habilidade em inibir o radical livre estável DPPH, como descrito por Choi (2002), com pequenas modificações. Cada extrato (em concentrações finais de 10 a 1000 µg de planta seca/mL) foram misturados com 200 µL de uma solução de DPPH com concentração de 0,3 mM. Como branco foram utilizados 800 µL de água destilada e 200 µL da solução de DPPH. A absorvância foi mensurada a 518 nm após 30 minutos de reação a temperatura ambiente na ausência de luz. As atividades relativas foram calculadas por curva de calibração de L-ácido ascórbico como controle positivo (nas mesmas condições experimentais). A capacidade inibitória foi calculada em percentual (IC%) através da equação:

$$IC\% = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 / Abs_{controle}]$$

onde: $Abs_{amostra}$ consistiu na absorvância obtida na presença de diferentes concentrações de extratos e $Abs_{controle}$ foi obtida na ausência de extrato. As análises (n=5) foram realizadas em triplicatas.

3.4 Ensaio da degradação da desoxirribose

A habilidade dos extratos da planta em prevenir a decomposição da desoxirribose induzida por $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$ (reação de Fenton) foi realizada utilizando o método descrito anteriormente por Halliwell (1981). Primeiramente, os extratos (10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionados a um sistema de reação contendo (concentrações finais): 3 mM de desoxirribose, 50 mM de tampão fosfato, 0,5 mM de peróxido de hidrogênio e 0,05 mM de FeSO_4 . O sistema foi incubado a 37 °C por 30 minutos e a reação foi interrompida pela adição de 500 μL de uma solução de ácido tricloroacético em concentração de 2,8%, seguida pela adição de 400 μL de uma solução de TBA em concentração de 0,6%. As amostras foram então incubadas em banho-maria por 60 minutos a 95°C. A absorbância foi avaliada a 532 nm em um espectrofotômetro. Os dados estão expressos em percentual de inibição em relação ao controle (sem o extrato).

3.5 Atividade inibitória do radical óxido nítrico (NO)

A atividade inibitória do radical NO foi realizada pela incubação dos extratos em diferentes concentrações (10-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) com nitroprussiato de sódio a 5mM e tampão fosfato na presença de luz. Após 120 minutos de incubação as amostras foram misturadas com 500 μL de reagente de Griess e após 10 minutos a absorbância foi mensurada a 550nm. Para determinar a porcentagem de inibição do radical NO os valores foram comparados ao controle (Green, 1982).

3.6 Ensaios de quelação de Fe^{2+} e redução de Fe^{3+}

A habilidade dos extratos em quelar o Fe^{2+} foi determinada utilizando-se do método descrito por Marcocci (1994) e Minotti (1987).Resumidamente, 150 μL de solução de 0,5 mM de FeSO_4 (preparada no momento de uso) foi adicionada a um sistema contendo 168 μL de 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 218 μL de solução salina e os extratos das plantas (10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$), e incubados por 10 minutos. A reação foi incubada por mais 5 minutos após a adição de 20 μL de 10-fenantrolina (0,25%). Subsequentemente, a absorbância foi mensurada a 510 nm em espectrofotômetro. Os valores foram comparados ao controle para determinar a porcentagem de quelação pelos diferentes extratos. A habilidade dos extratos em reduzir Fe^{3+} foi determinada pela incubação de 150 μL de uma solução 0,5 mM de FeCl_3 (preparada no

momento do uso) no mesmo procedimento experimental descrito. A habilidade relativa de redução de Fe^{3+} foi calculada pela curva padrão de ácido L-ascórbico nas mesmas condições experimentais.

3.7 Ensaio de peroxidação lipídica em fosfolipídios

A peroxidação lipídica foi determinada pela mensuração das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como descrito previamente Ohkawa (1979) com pequenas modificações. Foi pesado 1 g de gema de ovo e diluída em 100 ml de 100 mM Tris-HCl, pH 7.4, o qual foi utilizado como amostra. Alíquotas de 100 μL foram incubadas por 60 minutos em um meio contendo 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 na ausência ou presença de extrato (10-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou extratos/ Fe^{2+} (10 μM). Os sistemas foram incubados a 37 °C por 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 500 μL de tampão ácido acético e os produtos da peroxidação lipídica foram mensurados pela adição de 600 μL de TBA e 600 μL de ácido acético (pH 3.4). Após a incubação em banho-maria por 1 h a 97 °C, 200 μL de SDS foram adicionados. O sobrenadante foi retirado e a absorbância mensurada a 532 nm em espectrofotômetro. Os dados estão expressos como percentual do controle (sem extrato).

3.8 Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos

O conteúdo total de fenóis foi determinado pela mistura dos extratos com 50 μL de uma solução 0,5 N do reagente de Folin-Ciocalteu, seguido pela adição de 1000 μL de carbonato de sódio a 2%. Ácido gálico foi utilizado como composto padrão para a curva de calibração dos compostos fenólicos (Singleton, 1999). O conteúdo total de compostos fenólicos está expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico/g de planta.

3.9 Determinação do conteúdo total de flavonóides

O conteúdo total de flavonóides foi medido pelo ensaio do cloreto de alumínio segundo Kosalec (2004). As soluções padrões ou os extratos foram misturados com 5% de nitrito de sódio e incubados por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente, 15 μL de uma solução 10% de cloreto de alumínio foram adicionados e o sistema incubado por mais 6 minutos a 37 °C. Por fim, 100 μL de NaOH e água foram adicionados. O cloreto de alumínio foi substituído pelo mesmo volume de água destilada no branco. Após a incubação à temperatura ambiente

por 5 minutos a absorvância da reação foi mensurada a 510 nm. Soluções padrão de quercetina foram utilizadas como padrão. O conteúdo total de flavonóides está expresso em miligramas equivalentes de quercetina/g de planta seca.

3.10 Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA de uma via (one-way) seguido por um *post hoc* de Duncan quando necessário. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0.05$. Os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão e os experimentos foram repetidos num total de $n = 5$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O conteúdo total de compostos fenólicos encontrados no extrato etanólico foi duas vezes maior do que no extrato aquoso. Entretanto, o conteúdo de flavonóides no extrato aquoso apresenta valores maiores do que o extrato etanólico. Os valores obtidos nos ensaios são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Conteúdo total de compostos fenólicos e flavonóides presente nos extratos de *Phyllanthus niruri*. Os valores são apresentados em média \pm desvio padrão.

	Extrato Aquoso	Extrato Etanólico
Conteúdo total de polifenóis (mgEq GA/g planta)	46.64 \pm 1.32	90.53 \pm 2.50
Conteúdo total de flavonóides (mgEq quercetina/g planta)	31.76 \pm 1.00	11.12 \pm 0.60

Foram testadas três concentrações (10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$) de cada um dos extratos (aquoso, etanólico, butanólico e hexanólico) de *P. niruri*. Os resultados obtidos no ensaio de inibição do radical DPPH mostram que apenas os extratos aquoso e etanólico nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram efeitos significativos ($p < 0,05$) na inibição do radical (Figura 1). Os extratos butanólicos e hexanólicos não apresentaram valores significativos na maioria das concentrações testadas. A partir destes resultados, foram utilizados apenas os extratos aquosos e etanólicos para todos os outros ensaios realizados posteriormente.

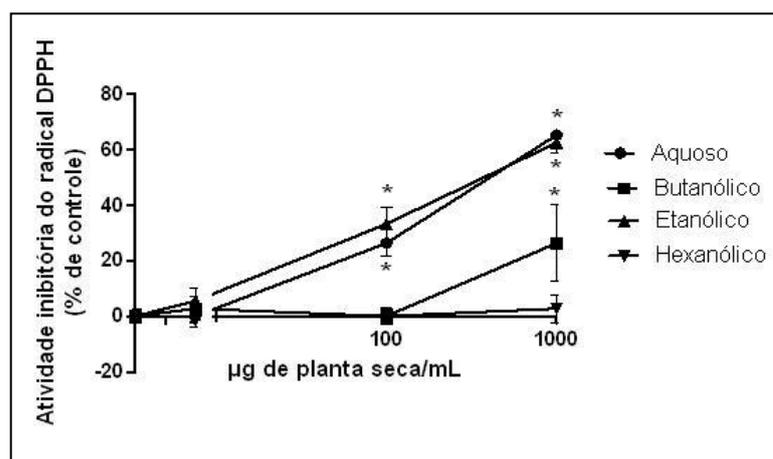


Figura 1. Atividade inibitória do radical DPPH pelos extratos de *Phyllanthus niruri*. Valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

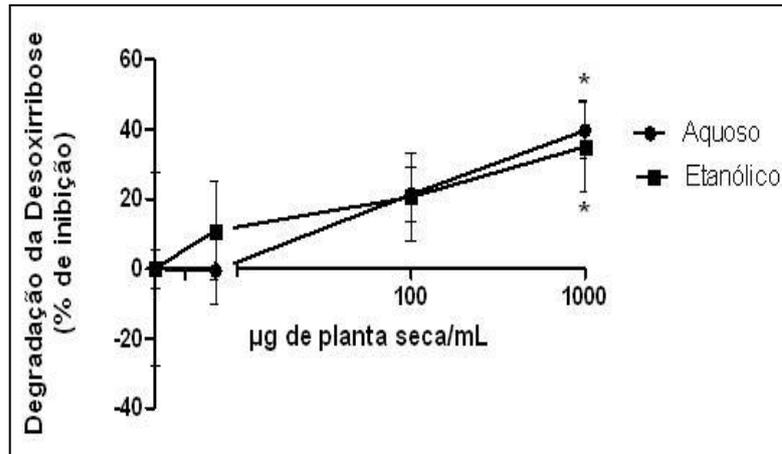


Figura 2. Efeitos dos extratos de *Phyllanthus niruri* na degradação da desoxirribose induzida pela reação de Fenton. Valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

Ambos os extratos testados (aquoso e etanólico) foram capazes de proteger a desoxirribose da degradação (30-40%) pelos radicais gerados na reação de Fenton na maior concentração testada (1000 µg/mL). As demais concentrações não apresentaram resultados significativos (Figura 2).

O extrato etanólico na concentração de 1000 µg/mL foi capaz de inibir, pouco (20%) mas significativamente ($p < 0,05$), o radical NO. As outras concentrações testadas do extrato etanólico e o extrato aquoso não apresentaram resultados significativos (Figura 3).

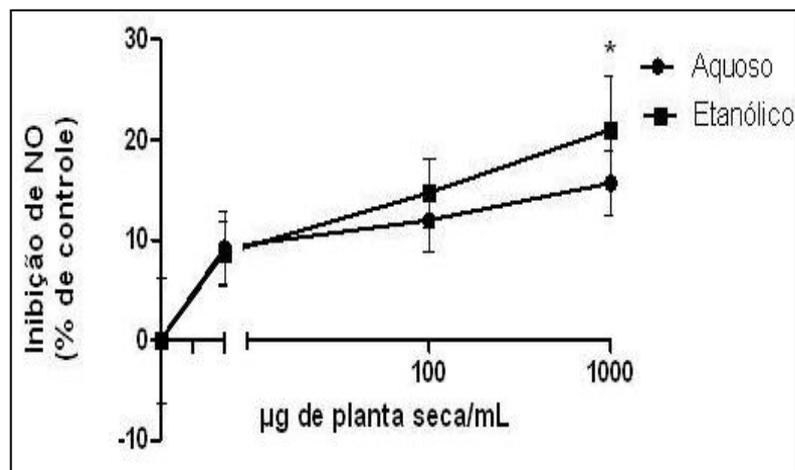


Figura 3. Atividade inibitória do radical NO pelos extratos de *Phyllanthus niruri*. Valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

Os extratos aquoso e etanólico de *P. niruri* apresentaram também pouca (aproximadamente 25%) mas significativa ($p < 0,05$) capacidade de quelar Fe^{2+} , na concentração máxima de 1000 µg/mL (Figura 4). O extrato aquoso nas concentrações de 100

$\mu\text{g/mL}$ e $1000 \mu\text{g/mL}$ e o extrato etanólico na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ foram capazes de reduzir Fe^{3+} significativamente ($p < 0,05$). As demais concentrações testadas não apresentaram resultados estatisticamente significativos (Figura 5).

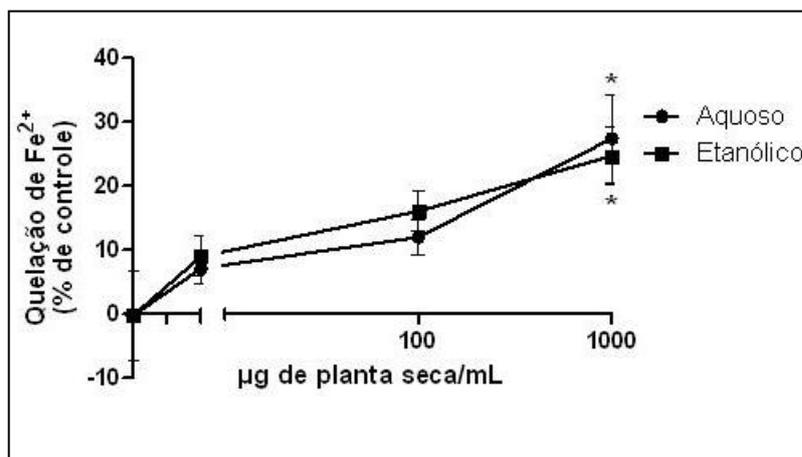


Figura 4. Capacidade quelante de Fe^{2+} dos extratos de *Phyllanthus niruri*. Valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

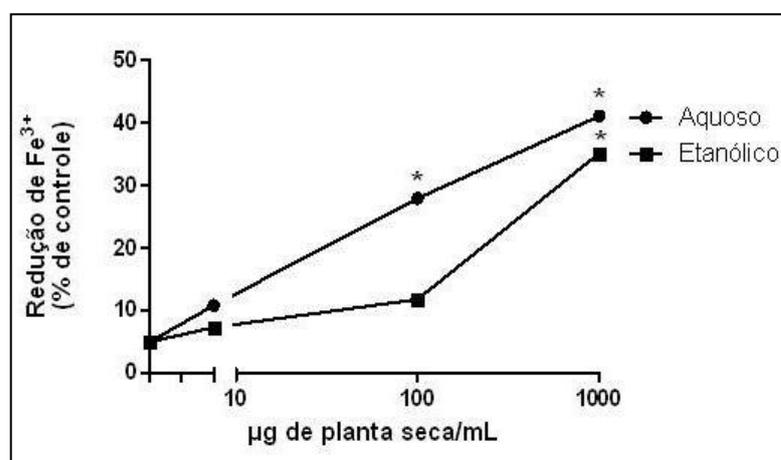


Figura 5. Capacidade redutora de Fe^{3+} dos extratos de *Phyllanthus niruri*. Valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

O extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* na concentração de $1000 \mu\text{g/mL}$ foi capaz de inibir significativamente ($p < 0,05$) a produção de TBARS induzida por Fe^{2+} em fosfolipídios (Figura 6). O extrato etanólico em sua maior concentração ($1000 \mu\text{g/mL}$) apresentou uma tendência de redução a níveis basais, porém os valores não foram significativos, assim como nas demais concentrações deste extrato (Figura 7).

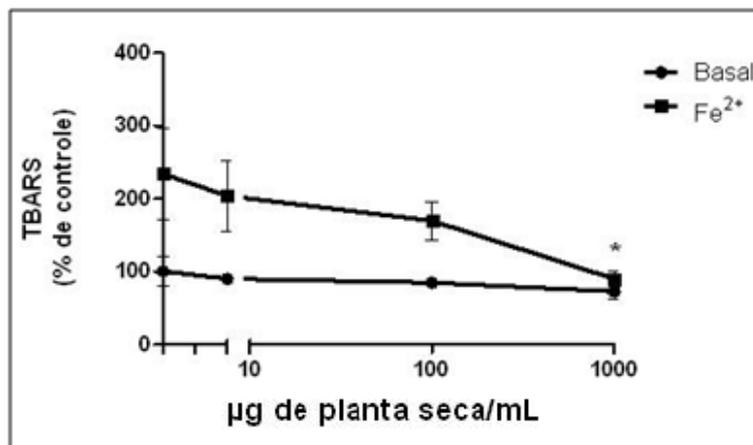


Figura 6. Efeitos do extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* sobre a produção de TBARS induzida por Fe²⁺ em fosfolípidios. Valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

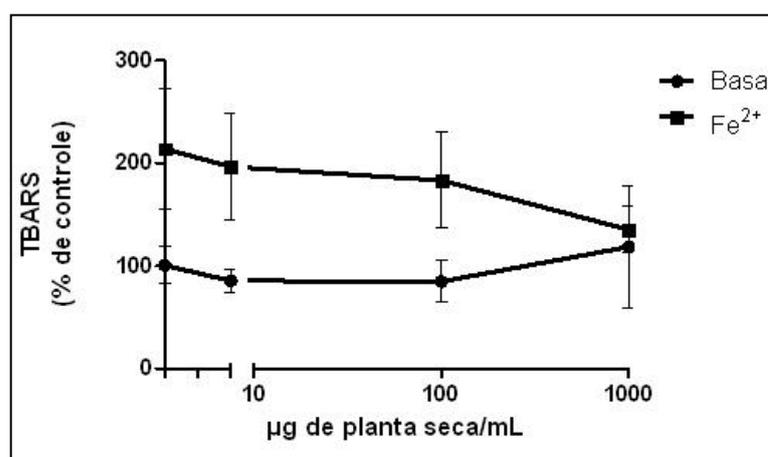


Figura 7. Efeitos do extrato etanólico de *Phyllanthus niruri* sobre a produção de TBARS induzida por Fe²⁺ em fosfolípidios.

Diversos estudos nos relatam amplamente os benefícios da utilização de produtos naturais para o tratamento de diversas doenças (Saeidnin, 2013). No que diz respeito à *Phyllanthus niruri*, são bem reconhecidos seus efeitos em disfunções dos tratos gastrointestinal e urinário, em especial no que se refere ao tratamento de cálculos renais, o que levou a planta a ser conhecida popularmente pelo nome de “quebra-pedra” (Couto, 2012). Neste mesmo sentido outra variedade de estudos têm atribuído os efeitos antioxidantes e farmacológicos da *P. niruri* a uma série de compostos presente em seus extratos, como compostos fenólicos, flavonóides, glicosídeos, ligninas e proteínas de baixo peso molecular (Sprengrer, 2013; Markom 2007; Shakil, 2008). No entanto, os mecanismos de atuação de seus efeitos antioxidantes ainda não estão esclarecidos. Desta forma, o presente estudo busca elucidar alguns dos possíveis mecanismos da ação antioxidante de extratos aquoso e etanólicos de *P. niruri* através de diferentes sistemas de geração de radicais livres. Nossos

resultados mostram que os extratos testados possuem atividade antioxidante, mas seus efeitos dependem da natureza do extrato (se aquoso ou etanólico) e da concentração testada. Foram também avaliados o conteúdo de compostos fenólicos totais e flavonóides presentes nos extratos a fim de tentar estabelecer uma relação entre a quantidade destes compostos presente nos extratos e sua ação antioxidante.

O ensaio do radical DPPH tem sido amplamente utilizado como modelo para testar a habilidade de neutralização de vários produtos naturais (Kedare, 2011) e têm sido aceito como um composto para modelo de radicais livres (Yasuda, 2000). Nossos resultados apresentam inibição significativa do radical DPPH pelos extratos aquosos e etanólicos, indicando a potencial ação redutora de radicais livres destes extratos. Harish (2006) e Sabir (2008) em estudos utilizando o mesmo radical apresentam resultados semelhantes. A pouca ou nenhuma habilidade de inibição dos extratos apolares estão de acordo com resultados anteriormente encontrados por Markom (2007), aos quais relatam maior solubilidade e afinidade de compostos presentes na *P. niruri* em soluções aquosas e hidroalcoólicas do que em solventes polares.

De forma semelhante, a inibição do radical NO é considerada como um marcador da atividade antioxidante (Amaeze, 2011). Sabir (2008) mostra em seu trabalho que extratos de *P. niruri* foram capazes de reverter a peroxidação lipídica induzida por nitroprussiato de sódio (gerador de radical NO e outras espécies reativas de nitrogênio) em tecidos de fígado e cérebro. Os resultados demonstram então que, em parte, o potencial antioxidante do extrato etanólico pode estar envolvida com a neutralização desse radical.

Evidencia-se também a proteção dos extratos no ensaio de degradação da desoxirribose. Considerando que os extratos testados não apresentam atividade semelhante à da catalase, ou seja, não interagem com peróxido de hidrogênio (dados prévios não apresentados neste trabalho), podemos sugerir que nossos extratos são capazes de interagir, ao menos em parte, com o radical $\cdot\text{OH}$ (hidroxila) gerado na reação de Fenton. A degradação da desoxirribose supostamente se dá como resultado da interação dos radicais $\cdot\text{OH}$ gerados. Desta forma, o teste do efeito antioxidante dos extratos, pela atividade redutora de radicais $\cdot\text{OH}$ se baseia na reação competitiva desses radicais com os compostos presentes nos extratos (Halliwell, 1987; Cheeseman, 1988; Perjesi, 2011).

Considerando-se os resultados apresentados para a quelação de Fe^{2+} e redução de Fe^{3+} e o ensaio TBARS, é possível sugerir que os extratos analisados podem interagir com íons de ferro, o que pode contribuir para a atividade antioxidante apresentada pelos mesmos. Vários metabólitos de plantas apresentam grupos funcionais importantes para a complexação do ferro

(Chobot, 2010). O ferro é um elemento imprescindível para todos os organismos, presente em biomoléculas complexas como a hemoglobina, mioglobina, citocromos e inúmeras enzimas. Em condições de estresse oxidativo essas moléculas podem gerar ferro livre, o que pode ser um importante fator para iniciar a geração de radicais de oxigênio. O radical hidroxil é formado pela reação de peróxido de hidrogênio com íons de ferro (reação de Fenton) e é normalmente considerado como um dos principais mecanismos de danos causados por radicais livres, como a peroxidação lipídica (Halliwell, 2007, Bhattacharyya, 2013). Relatos na literatura demonstram que compostos derivados de *P. niruri* são capazes de reverter toxicidade e a peroxidação lipídica induzida por ferro em hepatócitos (Bhattacharyya, 2013; Sabir, 2008). A partir dos resultados e de dados da literatura pode-se relacionar que os compostos presentes nos extratos podem interagir com a química redox do ferro interferindo com o ciclo redox desse metal. Como consequência, sugerimos que os constituintes da planta podem interferir com a geração de radicais livres mediada pelo ciclo redox do ferro. Ademais, essa sugestão vai ao encontro com os resultados do ensaio de TBARS onde pode ser observada atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} .

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo nos demonstra que os extratos aquosos e etanólicos de *P. niruri* apresentam atividade antioxidante sob condições *in vitro*. Em geral, nossos resultados não apontam para um único mecanismo de ação antioxidante para os extratos de *P. niruri* testados, sendo estes dependentes da análise realizada e da forma de extração utilizada. Desta maneira, é possível sugerir que o potencial antioxidante dos extratos se deve ao conjunto de mecanismos de ação antioxidantes apresentados frente às diversas espécies de radicais testados. Atribuindo-se a ação antioxidante dos extratos aos compostos fenólicos e flavonóides derivados da planta, os mecanismos mais detalhados devem ser averiguados testando-se os compostos isolados. Para isso, se faz necessário também a análise e caracterização fitoquímica detalhada dos constituintes dos extratos. Por fim, a atividade antioxidante dos extratos da planta aqui testados nos indica a *P. niruri* como uma fonte natural de antioxidantes com potencial aplicação para fins terapêuticos, na redução do estresse oxidativo e conseqüentemente com benefícios para a saúde.

REFERÊNCIAS

- AMAEZE, O.U. et al. Evaluation of antioxidant activity of *Tetracarpidium conophorum* (Mull. Arg) Hutch & Dalziel leaves. **Oxid Med Cell Longev**, 2011. 2011: p. 976701.
- BAGALKOTKAR, G. et al. Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2006. 58: 1559-1570.
- BHATTACHARJEE, R. SIL, P.C. Protein isolate from the herb, *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae), plays hepatoprotective role against carbon tetrachloride induced liver damage via its antioxidant properties. **Food and Chemical Toxicology**, 2007. 45: 817–826
- BHATTACHARYYA, S.; PAL, P.B.; SIL, P. C. A 35 kD *Phyllanthus niruri* protein modulates iron mediated oxidative impairment to hepatocytes via the inhibition of ERKs, p38 MAPKs and activation of PI3k/Akt pathway. **Food and Chemical Toxicology**, 2013. 56:119–130
- BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**, volume 2 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.
- CARVALHO, J.C.T.; GROSSMAN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos *in*: **Farmacognosia: da planta ao medicamento** / organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões...[et al] – 6 ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.
- CHOBOT, V.; HADACEK, F. Iron and its complexation by phenolic cellular metabolites: From oxidative stress to chemical weapons. **Plant Signal Behav**, 2010. 5(1).
- CHOBOT, V.; HADACEK, F. Iron and its complexation by phenolic cellular metabolites: from oxidative stress to chemical weapons. **Plant Signal Behav**, 2010. 5(1): p. 4-8.
- CHEESEMAN, K.H.; BEAVIS, A.; ESTERBAUER, H. Hydroxyl-radical-induced iron-catalysed degradation of 2-deoxyribose. Quantitative determination of malondialdehyde. **Biochem J**, 1988. 252(3): p. 649-53.
- CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, 2002. 153: p. 1161-1168.
- COLPO, E. et al. Antioxidant effects of *Phyllanthus niruri* tea on healthy subjects. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 2014. 113-118
- COUTO, A. et al. Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 2013. 23(1): 124-131.
- GREEN, L.C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, 1982. 126(1): p. 131-8.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals. **FEBS Letters**, 1981. 128(2): p. 347-52.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology na medicine**. Oxford University Press, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, March 2011, Vol. 32, No. 3

HARISH, R.; SHIVANANDAPPA, T. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, 2006 95:180–185

KEDARE, S.B. SINGH, R.P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **J Food Sci Technol**, 2011. 48(4): p. 412-22.

KOSALEC, I. et al. Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia. **Acta Pharm**, 2004. 54(1): p. 65-72.

MARCOCCI, L. et al. The nitric oxide-scavenging properties of *Ginkgo biloba* extract EGb 761. **Biochem Biophys Res Commun**, 1994. 201(2): p. 748-55.

MARKOM, M. et al. Extraction of hydrolysable tannins from *Phyllanthus niruri* Linn.:Effects of solvents and extraction methods. **Separation and Purification Technology**, 2007. 52: 487–496

MINOTTI, G., AUST, S.D. An investigation into the mechanism of citrate-Fe²⁺-dependent lipid peroxidation. **Free Radic Biol Med**, 1987. 3(6): p. 379-87.

OHKAWA, H.; OHISHI, N., YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analitycal Biochemistry**, 1979. 95(2): p. 351-8.

PERJESI, P. ROZMER, Z. Kinetic analysis of some chalcones and synthetic chalcone analogues on the fenton-reaction initiated deoxyribose degradation assay. **Open Med Chem J**, 2011. 5: p. 61-7.

QIAN-CUTRONE, J. et al. Niruriside, a New HIV REV/RRE Binding Inhibitor from *Phyllanthus niruri*. **J. Nat. Prod.**, 1996. 59:196-199

SARKAR, M.K. et. al. Purification and characterisation of a novel antioxidant protein molecule from *Phyllanthus niruri*. **Food Chemistry**, 2009. 114:1405–1412

SABIR, S.M. ROCHA. J.B.T. Water-extractable phytochemicals from *Phyllanthus niruri* exhibit distinct in vitro antioxidant and in vivo hepatoprotective activity against paracetamol-induced liver damage in mice. **Food Chemistry**, 2008. 111:845–851

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Meth Enzymol**, 1999. 299: p. 152–178.

SHAKIL, N. A. et al. Nematicidal prenylated flavanones from *Phyllanthus niruri*. **Phytochemistry**, 2008. 69:759–764

SPRENGER, R. F.; CASS, Q. B. Characterization of four *Phyllanthus* species using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 2013. 1291: 97– 103

SAEIDNIA S.; ABDOLLAHI, M. Toxicological and pharmacological concerns on oxidative stress and related diseases. **Toxicology and Applied Pharmacology**, 2013. 273: 442–455

YASUDA, T. et al. Urinary metabolites of gallic acid in rats and their radical-scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Journal of Natural Products**, 2000. 63(10): p. 1444-6.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.B. Flvonóides *in*: **Farmacognosia**: da planta ao medicamento / organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões...[et al] – 6 ed. – Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.