

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Lippia insignis* Moldenke

**Maíra Meira de Freitas¹; Angélica Maria Lucchese²; Marilene Lopes da Rocha³ e
Horácio Freitas Bomfim⁴**

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mairafreitas_s2@hotmail.com
2. Orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com
3. Co-orientadora, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: mlrochaph@gmail.com
4. Membro do Laboratório de Química de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hfreitasb@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: fitoquímica, metabolitos secundários, dor.

INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais e da fitoterapia encontra-se em expansão no Brasil e no mundo, constituindo um mercado farmacêutico altamente promissor, tendo em vista a utilização das substâncias como protótipos para o desenvolvimento de fármacos, ou ainda, de medicamentos elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais, os fitoterápicos (VIEGAS *et al.*, 2006). Com os avanços tecnológicos e aumento do interesse dos pesquisadores a esse tema, tem crescido a recomendação do uso de plantas medicinais pelos profissionais da saúde com fins curativos (ARNOUS *et al.*, 2005).

Estudos da composição química de espécies de *Lippia* indicam que este gênero é rico em compostos fenólicos e flavonoides, possuindo assim ação antioxidante (AGUIAR e COSTA, 2005). A oxidação é um processo essencial aos organismos aeróbios e ao nosso metabolismo, sendo os radicais livres produzidos naturalmente, como consequência desse processo de oxidação, ou por alguma disfunção biológica. No organismo, os radicais livres desempenham diversos papéis. Entretanto, o excesso deles pode ser responsável por uma série de efeitos deletérios, como, por exemplo, neoplasias, envelhecimento precoce e problemas cardiovasculares, que podem ser evitadas com a ingestão de substâncias com ação antioxidante (BARREIROS *et al.*, 2006). Assim, um dos fatores pela crescente demanda em estudos químicos e de ação biológica com plantas e micro-organismos é a busca por novos fármacos que tenha uma ação antioxidante. Essa área de pesquisa tem um futuro promissor principalmente no território brasileiro que possui uma rica biodiversidade, com variadas espécies endêmicas distribuídas em distintos biomas (NEWMAN *et al.*, 2007).

Quando se trata de fármacos para o tratamento da dor, abre-se uma lacuna no que diz respeito ao regime medicamentoso que pode ser estabelecido, tendo em vista que ainda não dispomos de um fármaco ideal, ou seja, que não promovam efeitos colaterais potenciais. Embora sejam altamente eficazes, os analgésicos de ação central geralmente não estão dissociados de efeitos adversos importantes. Adicionalmente, os analgésicos de ação periférica também apresentam efeitos indesejáveis, tais como lesões do trato gastrointestinal e renal (RANG *et al.* 2012). Assim, tem-se a necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para o combate da dor. Nessa perspectiva, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica. Desta forma este trabalho tem como objetivo investigar a composição química, a atividade antioxidante e antinociceptiva de *Lippia insignis* Moldenke.

MATERIAIS E MÉTODOS

FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO

O extrato metanólico da inflorescência de *Lippia insignis* foi fracionado por partição líquido-líquido para obtenção das frações clorofórmica e hidrometanólica. O extrato bruto (10,67g) foi ressuspenso em metanol:água (7:3 v/v) e extraído com clorofórmio para obtenção da fração clorofórmica (FC) e da fração hidrometanólica (FHM), visando uma semi-purificação das substâncias através de suas polaridades. A FC foi colocada para secar em capela de exaustão, enquanto a FHM teve o metanol retirado no evaporador rotatório e a solução final foi liofilizada (Liofilizador Terrone Enterprise I).

DETERMINAÇÃO DO CONTEUDO DE FENÓLICOS TOTAIS

Foi realizada uma análise do teor de compostos fenólicos através da espectrofotometria no UV-Vis ($\lambda = 750$ nm), pelo método de Peres (2009), utilizando como padrão ácido gálico. Os valores obtidos foram calculados por regressão linear ($R^2 = 0,9993$) através da curva de calibração, onde Y é o valor da absorbância e X o valor da concentração em $\mu\text{gEAG/mL}$.

DETERMINAÇÃO DO CONTEUDO DE FLAVONOIDES TOTAIS

O teor de flavonoides foi também determinado através da espectrofotometria no UV-Vis ($\lambda = 425$ nm), pelo método de Banov (2006), utilizando como padrão quercetina. Os valores obtidos foram calculados por regressão ($R^2 = 0,9922$) através da curva de calibração, onde Y é o valor da absorbância e X o valor da concentração em $\mu\text{gEQ/mL}$:

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante das frações do extrato metanólico foi determinada pelo método do sequestro de radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•), segundo Sousa (2007) com algumas adaptações. O valor da absorbância do DPPH• foi ajustado para 1,005 em um comprimento de onda de 517 nm, e com uma concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ da solução preparada. Amostras do extrato metanólico foram preparadas em concentrações entre 15 e 75 $\mu\text{g/mL}$ para determinação da atividade. O percentual de inibição das amostras foi calculado pela fórmula que segue: % Inibição = $[\text{Abs DPPH} - (\text{Abs da Amostra} - \text{Abs Controle da Amostra}) \times 100] / \text{Abs DPPH}$

O valor de CE_{50} (concentração de antioxidante necessária para seqüestrar 50% dos radicais livres de DPPH) foi calculado a partir de regressão linear ($R^2 = 0,9902$) pela fórmula que segue, ($Y = 0,5907X - 7,6892$). Ácido ascórbico e Trolox foram usados como padrões.

TESTE PARA AVALIAR A COORDENAÇÃO MOTORA (ROTA ROD)

Durante a execução deste teste, camundongos *Mus musculus*, machos, adultos, pesando entre 25 e 30 gramas, obtidos da colônia do Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana, foram colocados em um cilindro que gira a uma velocidade constante, a fim de verificar se são capazes de se equilibrarem sobre o mesmo (MATTEI; FRANCA, 2006). Para evitar uma interpretação equivocada dos resultados devido a uma incapacidade natural dos animais em manter o equilíbrio e a movimentação na barra giratória, 24h antes da realização do teste foi feita um pré-teste para uma seleção dos animais (sem administração de substâncias), na qual foram considerados aptos a participarem aqueles animais que permaneceram na barra giratória (com velocidade de 7 r.p.m.) durante 180 segundos, em até 3 tentativas (MENDES et al., 2002). Para tal, os extratos de folha e inflorescência de *Lippia insignis* foram administradas nos animais nas doses de 75, 150 ou 300 mg/kg antes que eles fossem submetidos a barra. Um grupo submetidos ao controle (NaCl 0,9% 0,1mL/10g, v.o.) e outro ao padrão (Diazepam 5,0 mg/Kg).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato metanólico das inflorescências foi selecionado para fracionamento, pois resultados anteriores demonstraram ser este órgão o mais promissor para a busca de antioxidantes (FREITAS et al., 2015). O rendimento das frações, e os teores de fenólicos e flavonoides totais estão reunidos na Tabela 01.

Tabela 01. Rendimento (RE), fenólicos e flavonoides totais das frações do extrato metanólico de inflorescência de *Lippia insignis*

| INFLORESCÊNCIA | Média ±DP mg EAG/g | Média ±DP mg EQ/g | RE |
|------------------------|-----------------------|----------------------|---------|
| Fração Hidrometanólica | 210,88±37,86 | 13,90±3,54 | 56,42 % |
| Fração Clorofórmica | 89,36±13,76 | 45,16±0,77 | 33,74 % |

EAG - equivalente em ácido gálico); EQ - Equivalente em Quercetina; DP - Desvio Padrão

Os compostos fenólicos, além de proporcionar atividade antioxidante que prolongam o armazenamento de produtos, têm demonstrado importante atividade “in vivo” e podem ser benéficos no controle de diversas doenças relacionadas à formação excessiva de radicais livres que excedem a capacidade de defesa antioxidante do corpo humano como aterosclerose, cataratas e câncer (JARDINI et. al., 2007). O teor de compostos fenólicos e flavonoides totais observados na Tabela 1 indicam o potencial de *Lippia insignis* como fonte de compostos antioxidantes. Por comparação entre as frações obtidas do extrato bruto podemos sugerir que a polaridade do solvente interfere na extração dessas substancia mostrando que quanto mais polar for o sistema maior é a probabilidade de esses componentes serem extraídos

Os dados de atividade antioxidante, avaliada pelo sequestro do radical livre DPPH, estão representados pelo CE₅₀ obtido pela média das triplicatas das frações do extrato metanólico de inflorescência, calculados por regressão linear. A média dos valores de EC₅₀ dos extratos e dos controles positivos (ácido ascórbico e Trolox) estão apresentados na tabela 2

Tabela 2. Valores médios de CE₅₀ das frações do extrato metanólico de inflorescência de *Lippia insignis*, do ácido ascórbico e Trolox em µg/mL

| <i>Lippia</i> /Padrão | Inflorescência FC Média ±DP | Inflorescência FHM Média ±DP | Trolox Média ±DP | Ácido Ascórbico Média ±DP |
|-----------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------|---------------------------------|
| *CE ₅₀ | 110,62±5,4 | 31,10±3,5 | 9,49±0,67 | 7,12±0,66 |

Trolox/Ácido Ascórbico (Padrões Utilizados); DP - Desvio Padrão; CE₅₀ - concentração de antioxidante necessária para sequestrar 50% dos radicais livres de DPPH; FC - Fração Clorofórmica; FHM - Fração Hidrometanólica.

Quanto menor é a CE₅₀ de uma amostra, maior é a sua atividade antioxidante, já que a mesma necessita de concentrações menores para um maior consumo de DPPH*. Conforme demonstra a tabela 02, as frações do extrato de inflorescência do gênero *Lippia insignis* apresentaram atividade em sequestrar o radical livre DPPH*, entretanto, inferiores ao antioxidante sintético, ácido ascórbico e o trolox. A fração hidrometanólica foi a que apresentou melhor atividade antioxidante (CE₅₀ = 31,10) o que pode estar relacionado com o teor de fenólicos presentes neste órgão. Outras espécies de *Lippia* tiveram seu potencial antioxidante avaliado pelo mesmo método, como para *Lippia graveolens*, com valores de CE₅₀ entre 152 a 207 µg/mL (MARTINEZ et al., 2008). Por comparação com estes dados podemos sugerir que a espécie *Lippia insignis* é promissora na busca de novos agentes antioxidantes.

TESTE PARA AVALIAR A COORDENAÇÃO MOTORA (ROTA ROD)

Devido a boa atividade antioxidante, os extratos brutos de folhas e inflorescências (FREITAS et al., 2015) foram selecionados para ensaios *in vivo* de dor e inflamação. Inicialmente, para avaliar se os extratos da espécie possuíam uma possível interferência sobre a coordenação motora dos roedores, foi utilizado o teste da barra giratória (rota-rod). Não houve diferença

significativa entre os animais do grupo controle daqueles tratados com as frações em nenhum dos tempos (60 minutos e 120 minutos) nas doses citadas acima. Como esperado, o padrão (Diazepam 5,0 mg/Kg) utilizado como droga depressora do SNC, diferiu significativamente do controle, diminuindo muito mais o tempo de permanência dos camundongos no aparelho, quando comparados ao grupo controle.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os teores de compostos fenólicos e flavonoides, bem como os dados de sequestro do radical livre DPPH, sugerem que esta espécie possui potencial na busca de novas substâncias com atividade antioxidante, com destaque para a fração hidrometanólica. A purificação desta fração, que se mostrou mais promissora, deve ser conduzida visando o isolamento dos metabólitos com atividade antioxidante. A avaliação dos extratos brutos de folha e inflorescência de *Lippia insignis* revelou, através do teste de *rota Rod*, que a espécie não possui uma possível interferência sobre a coordenação motora dos roedores, possibilitando assim que os testes posteriores de dor e inflamação sejam conduzidos.

REFERENCIAS

- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D. *Lippia alba* (Mill) N.E. Brown (Verbenaceae): levantamento de publicações nas áreas química, agrônômica e farmacológica, no período de 1979 a 2004. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 8, n. 1, p. 79-84, 2005.
- ARNOUS, A.H; Santos A.S, BEINNER, R.P.C. Plantas Mediciniais De Uso Caseiro: Conhecimento Popular e Interesse Por Cultivo Comunitário. **Revista Espaço Para a Saúde**. v.6, n.2, p 1-6, jun.2005.
- BANOV, D. *et al.* Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulação de uso tópico. **Acta Form. Bonaerense** 25(2) : 219-24
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim Nova**. 2006;29(1):113-23.
- JARDINI, F.A.; MARCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos de polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.1, p.137-147, 2007.
- MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia: fundamentos práticos. 1. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, cap. 12, p. 138-142, 2006.
- MARTÍNEZ-ROCHA, A. *et al.* Antioxidant and Antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). **plant foods for human nutrition**. 2008.
- MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, p. 462-471, 2002.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**. v. 70, p. 461-477, 2007.
- PERES, M. T. L. P *et al.* Estudos químicos e biológicos de micrograma (Larsal Fisch.) Copel (Polypodiaceal). **Química Nova**, v. 32, n.4, p. 897-901.
- RANG HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. **Farmacologia**. 7ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2012. 808.pp
- SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.