



RESÍDUO VEGETAL DA EXTRAÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL DE FOLHAS DE P. CERNUUM: ESTUDO DE CITOTOXICIDADE E MENSURAÇÃO DE METABÓLITOS DO ÓXIDO NÍTRICO

Jenny Sumara Sozo, Angela Malheiros

Área: Usos Terapêuticos e Culinários das Plantas Medicinas, Condimentares e Aromáticas

Introdução: O uso terapêutico de plantas como remédios caseiros para tratamentos e prevenções de doenças é relatado desde os tempos mais antigos. A Piper cernuum, popularmente conhecida como pariparoba, é um arbusto de ocorrência abundante nas regiões tropicais e subtropicais (1; 2). As folhas de Piper cernuum têm sido utilizadas na forma de infusão na medicina popular para fins analgésicos, dores no trato digestivo, problemas hepáticos e renais (2). O óleo volátil apresenta atividade antimicrobiana e antifúngica, tendo em sua composição fitoquímica os terpenoides, monoterpenos e sesquiterpenos. Os compostos majoritários incluem α -pineno, canfeno, β -dihidroagarofurano, 10-epi- γ -eudesmol, 4-epi-cis-dihidroagarofurano (1; 3). O rendimento de extração do óleo volátil das folhas de Piper cernuum por hidrodestilação é de aproximadamente entre 1% e 2%, em que o resíduo de planta, que representa uma parcela considerável de massa orgânica, acaba por ser descartado. Com o intuito de investigar novas potencialidades terapêuticas, o presente estudo investigou o óleo volátil e o resíduo de planta que passou pela extração de óleo volátil, quanto à citotoxicidade e a capacidade de inibição do óxido nítrico, objetivando verificar possível ação anti-inflamatória.

Objetivos: Avaliar atividade citotóxica e a produção de óxido nítrico do óleo volátil e do extrato etanólico do resíduo da extração do óleo de folhas de P. cernuum em modelo experimental in vitro utilizando células de macrófagos J774.

Metodologia: Viabilidade celular (citotoxicidade) O óleo essencial de folhas de Piper cernuum foi obtido por hidrodestilação e o resíduo vegetal foi mantido em maceração etanólica durante sete dias, tendo, posteriormente, o solvente evaporado, gerando um extrato. Para estudar o potencial de citotoxicidade, a viabilidade celular dos macrófagos J774 foi mensurada. Realizou-se o teste fluorescente com Resazurina (4). A Resazurina é um corante redox fracamente fluorescente, que quando reduzido à resorufina, torna-se rosa com altíssima fluorescência em vermelho. Em placas de 96 poços, com uma concentração de 2×10^4 células/poço realizou-se o plaqueamento, tratamento e indução com LPS. O sobrenadante foi coletado e os poços, contendo as células, foram lavados duas vezes com solução tampão de fosfato estéril (PBS). Em seguida, 100 mL da solução de Resazurina (pH 7,4 e concentração final de 1,5mg/mL) foi adicionada em cada poço. Após incubação de incubação (37°C), a placa foi submetida à leitura em 530/590nm em espectrofluorímetro de microplaca Gemini™ XPS (Molecular Devices, CA, EUA) (5). A partir desse teste, foi possível determinar as concentrações de CC10 do extrato e do óleo volátil, ou seja, a concentração capaz de matar 10% da população de células e, conseqüentemente, manter uma viabilidade de 90% (6; 7). Dosagem de metabólitos do óxido nítrico (NOx) A produção de NO foi mensurada indiretamente, sendo quantificada



pela formação de seus metabólitos em nitrito (NO_2^-), através da reação de Griess. Os reagentes empregados apresentam a capacidade de reduzir nitrito, produzindo um composto de cor rósea (8). Cada amostra foi disposta em placa de 96 poços ($50\mu\text{L}$) com adição de $50\mu\text{L}$ do reagente de Griess, seguido por incubação durante 40 minutos (temperatura ambiente ao abrigo de luz). A leitura da densidade óptica foi realizada em 540nm com leitor de ELISA MB-580.

Resultados: Análise de Viabilidade Celular (citotoxicidade) O extrato do resíduo gerado pela extração de óleo volátil das folhas de *Piper cernuum* foi testado nas concentrações de 1, 3, 10, 30 e $100\mu\text{g/mL}$ e apresentou uma viabilidade celular a partir da dose de $10\mu\text{g/mL}$, onde as maiores doses testadas não apresentaram capacidade de manter a viabilidade das células J774. Dessa forma, o valor de CC_{10} estipulado para o experimento de mensuração de metabólitos do óxido nítrico para os extratos foi de $10\mu\text{g/mL}$. O óleo volátil testado frente à capacidade de manter a viabilidade celular de macrófagos J774, apresentou menor citotoxicidade a partir da dose de $62,5\mu\text{g/mL}$. Mensuração dos metabólitos do óxido nítrico (NO_x) A mensuração do NO_x foi realizada nas concentrações de 1, 3 e $10\mu\text{g/mL}$ para o extrato, e 3,9, 7,8, 15,6, 31,25 e $62,5\mu\text{g/mL}$ para os óleos voláteis. O extrato ERFPC demonstrou uma inibição parcial de óxido nítrico, quando comparados ao controle inflamado LPS em todas as concentrações analisadas (10, 3 e $1\mu\text{g/mL}$) (% de inibição ERFPC: $57,0 \pm 7,5$, $30,3 \pm 2,6$, $43,7 \pm 0,8$). Como esperado, o fármaco de referência dexametasona também foi capaz de inibir a produção desse marcador (% de inibição: $62,3 \pm 5,4$) ($p < 0,001$). Já os óleos voláteis derivados da *Piper cernuum* estudados não apresentaram inibição dos parâmetros de óxido nítrico em comparação com os grupos controles.

Considerações finais: O presente estudo mostrou que o óleo volátil testado frente à capacidade de manter a viabilidade celular de macrófagos J774, apresentou menor citotoxicidade a partir da dose de $62,5\mu\text{g/mL}$, não apresentando capacidade de inibir o NO_x . Já para o extrato etanólico do resíduo de folhas que tiveram seu óleo volátil extraído, apresentou toxicidade em concentrações superiores a $30\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). O extrato demonstrou uma inibição parcial de óxido nítrico, quando comparado ao controle inflamado LPS em todas as concentrações analisadas (10, 3 e $1\mu\text{g/mL}$). Os resultados parciais obtidos demonstram a dose segura de uso na linhagem celular testada (macrófagos J774) bem como potencial anti-inflamatório no modelo estudado, sendo um estudo pioneiro na investigação deste resíduo no modelo farmacológico empregado. O presente estudo mostrou que o óleo volátil testado frente à capacidade de manter a viabilidade celular de macrófagos J774, apresentou menor citotoxicidade a partir da dose de $62,5\mu\text{g/mL}$, não apresentando capacidade de inibir o NO_x . Já para o extrato etanólico do resíduo de folhas que tiveram seu óleo volátil extraído, apresentou toxicidade em concentrações superiores a $30\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,001$). O extrato demonstrou uma inibição parcial de óxido nítrico, quando comparado ao controle inflamado LPS em todas as concentrações analisadas (10, 3 e $1\mu\text{g/mL}$). Os resultados parciais obtidos demonstram a dose segura de uso na linhagem celular testada (macrófagos J774) bem como potencial anti-inflamatório no modelo estudado, sendo um estudo pioneiro na investigação deste resíduo no modelo farmacológico empregado.



Financiamento ou apoio: Capes.

Referências

1) CONSTANTIN, M. B. et al. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ^{13}C - NMR. *Planta Medica*, v. 67, p. 771-773, 2001. 2) MARIOT, A.; MANTOVANI, A; REIS, M. S. Uso e conservação de *Piper cernuum* Vell. (Piperaceae) na Mata Atlântica: I. fenologia reprodutiva e dispersão de sementes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 5, n. 2, p. 1-10, 2003. 3) PERIGO, C. V. et al. The chemical composition and antibacterial activity of eleven *Piper* species from distinct rainforest areas in Southeastern Brazil. *Industrial Crops and Products*, v. 94, p. 528-539, 2016. 4) PRABST, K. et al. H. Basic Colorimetric Proliferation Assays: MTT, WST e Resazurin. Em: Gilbert D., Friedrich O. (eds) *Cell Viability Assays. Methods in Molecular Biology*. Humana Press, v. 1601, 2017. 5) MOHR, E. T. B. et al. The anti-inflammatory activity of 2-iminothiazolidines: evidence for macrophage repolarization. *Inflammopharmacology*, p. 1-13, 2022. 6) CHAN, C. et al. Incompatibility of chemical protein synthesis inhibitors with accurate measurement of extended protein degradation rates. *Pharmacology Research & Perspectives*, v. 5, n. 5, p. 1-12, 2017. 7) LUBSCHINSKI, T. L. et al. Effect of Aryl-Cyclohexanones and their Derivatives on Macrophage Polarization In Vitro. *Inflammation*, p. 1-19, 2022. 8) DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.; VOLLMAR, A. M. The Griess assay: suitable for a bio-guided fractionation of anti-inflammatory plant extracts? *Planta Medica*, v. 64, n. 5, p.:423-426, 1998.