



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 (NO₂⁻), 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 (50µL) com adição de 50µL 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 µg/mL e apresentou uma viabilidade celular a partir da dose de 10µg/mL, onde as maiores doses testadas não apresentaram capacidade de manter a viabilidade das células J774. Dessa forma, o valor de CC10 estipulado para o experimento de mensuração de metabólitos do óxido nítrico para os extratos foi de 10µg/mL. O óleo volátil testado frente à capacidade de manter a viabilidade celular de macrófagos J774, apresentou menor citotoxicidade a partir da dose de 62,5µg/mL. Mensuração dos metabólitos do óxido nítrico (NO_x) A mensuração do NO_x foi realizada nas concentrações de 1, 3 e 10µg/mL para o extrato, e 3,9, 7,8, 15,6, 31,25 e 62,5 µg/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 µg/mL) (% de inibição ERFPC: 57,0 ± 7,5, 30,3 ± 2,6, 43,7 ± 0,8). Como esperado, o fármaco de referência dexametasona também foi capaz de inibir a produção desse marcador (% de inibição: 62,3 ± 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 62,5µg/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 µg/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 µg/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 62,5µg/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 µg/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 µg/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.

Realização:



X JORNADA CATARINENSE DE PLANTAS MEDICINAIS

13, 14 E 15 DE SETEMBRO DE 2023

Apoio:



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.