

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: “Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão”



INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA, ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DE *Harpagophytum procumbens*

Carlos Vinicius Barros Oliveira¹, Dayenni Suyanne Rodrigues Antero²,
Adrielle Rodrigues Costa³, Maria Keliane Alves de Sousa⁴ Daniel Honorato
Neves⁵, Natália Correia Aguiar⁶, Pedro Silvino Pereira⁷, Antônia Eliene
Duarte⁸

Resumo: *Harpagophytum procumbens* é uma planta herbácea perene originária do deserto de Kalahari, das estepes da Namíbia, Botswana e África do Sul. *H. Procumbens* tem sido amplamente utilizada na forma de fitoterápico e exibe inúmeras atividades farmacológicas. Há uma crescente utilização de baratas *Nauphoeta cinerea* pela ciência como organismo modelo aplicado em estudos de toxicologia e neurobiologia. Existem vários métodos para avaliar atividades antioxidantes, sendo um dos mais utilizados, o DPPH. A porcentagem identificada é composta predominantemente, em ordem decrescente de concentração, por: ácido rosmarínico > ácido cafeico > quercetina > ácido gálico. O potencial antioxidante do extrato de *H. procumbens* é relativamente baixo quando comparado ao do antioxidante padrão.

Palavras-chave: Planta herbácea. *Nauphoeta cinerea*. Potencial antioxidante

1. Introdução

Harpagophytum procumbens é conhecida popularmente como “garra-do-diabo” e/ou “unha-do-diabo”, nomes dados em função da aparência ramosa e lenhosa do fruto, provido de barbas semelhantes a garras. Pertencendo à família Pedaliaceae, é uma planta herbácea, perene e originária do deserto de Kalahari, das estepes da Namíbia, Botswana e África do Sul. Tem sido amplamente utilizada como fitoterápico (MOTLHANKA & NTHOIWA, 2013).

Estudos científicos revelaram que *H. Procumbens* exibe atividades analgésica, antioxidante, antidiabética, antiepilética, antimicrobiana e antimalárica, entre outras (GRANT *et al.*, 2004; MNCWANGI *et al.*, 2012). Contudo, pouco se conhece sobre o seu perfil toxicológico em modelos alternativos. Nesse contexto o metabolismo celular pode produzir espécies reativas, as quais causam danos celulares e tecidual, favorecendo o estresse oxidativo (BARREIROS *et al.*, 2006). Esse estresse é uma forma bem

1 Universidade Regional do Cariri, email: viniciusbluesky@gmail.com

2 Universidade Regional do Cariri, email: dayennir19@gmail.com

3 Universidade Regional do Cariri, email: adrielle.arc@hotmail.com

4 Universidade Regional do Cariri, email: kellyanealves15@hotmail.com

5 Universidade Regional do Cariri, email: honoratodaniel1961@gmail.com

6 Universidade Regional do Cariri, email: nataliacorreiaaguiar010201@gmail.com

7 Universidade Federal do Pernambuco, email: pedro.silvino@gmail.com

8 Universidade Regional do Cariri, email: duarte105@yahoo.com.br

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



caracterizada na medicina, onde são relacionados alguns distúrbios com o desenvolvimento de enfermidades, tais como, doenças cardiovasculares, endócrinas e oncológicas (GOTTLIEB *et al.*, 2010, SILVA & JASIULIONIS, 2014). Existem vários métodos para avaliar atividades antioxidantes, e um dos mais utilizados é o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil (MOLYNEUX *et al.*, 2004).

Nauphoeta cinerea pertence à ordem Blattodea e família Blaberidae, é ovovivípara de ciclo reprodutor rápido e de tamanho pequeno (ADEDARA *et al.*, 2015). A ciência faz a utilização de baratas como organismo modelo amplamente aplicada em estudos de toxicologia e neurobiologia, o fácil manuseio, seu sistema nervoso relativamente simples e os fatores éticos são motivos para a utilização dos invertebrados nos ensaios laboratoriais (SILVA *et al.*, 2018).

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Analisar o perfil fitoquímico, antioxidante e toxicológico de *H. procumbens*.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fitoquimicamente o extrato por HPLC-DAD;
- Analisar os parâmetros comportamentais da atividade locomotora de *N. cinerea*;
- Avaliar mortalidade;
- Determinar o potencial antioxidante do extrato de *H. procumbens*;
- Determinar marcadores oxidativos como a glutatona redutase;
- Mensurar o conteúdo do malondialdeído.

3. Metodologia

3.1 Produto natural e análise do extrato seco de *H. Procumbens* por HPLC

Foi utilizado o extrato seco *H. procumbens* DC da marca Vita Hervas[®] que possui o nome comercial de Reumaliv[®], contendo 45 cápsulas no frasco, cada cápsula possui na sua composição 350mg de extrato seco de *H. procumbens* DC e 400mg de Excipiente Lactose q.s.p. de acordo com as informações contidas no frasco do extrato.

Os reagentes usados foram de grau analítico. Metanol, ácido acético, ácido gálico, ácido rosmarínico e ácido cafeico foram adquiridos à Merck (Darmstadt, Alemanha). Catequina, rutina e quercetina foram da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A cromatografia líquida de alta eficiência, em inglês HPLC-DAD) foi realizada em aparelho Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) (Shimadzu, Japão), com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT conectadas a um desgaseificador DGU 20A5 com um CBM 20A integrador, detector de arranjo de diodos SPD-M20A e software LC 1.22 SP1.

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



3.2 Quantificação de compostos por HPLC-DAD

O extrato de *H. procumbens* foi injetado na coluna Phenomenex C18 de fase reversa (4,6 mm x 250 mm) contendo partículas de 5 µm de diâmetro. As fases móveis A e B foram água Milli-Q, acidificadas para pH 2,0 com 1% de ácido acético e metanol, correspondentemente, foi utilizado o gradiente de solvente como se segue: 0-10 min, 5% B; 10-25 min, 15% de B; 25-40 min, 30%; 40-55 min a 50% de B; 50-65 min 70% de B; 65-80 min, 100% B. O extrato de *H. procumbens* foi analisado a uma concentração de 15 mg/mL, o caudal foi de 0,6 mL/min, o volume de injeção 40 µL. A amostra e a fase móvel foram filtradas através de um filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e depois foram desgaseificadas por banhos de ultra-som antes de serem utilizadas. Soluções estoque de referências de padrões foram preparadas no metanol em uma faixa de concentração de 0,020 - 0,500 mg/mL. As quantificações foram realizadas pelo método padrão externo, ácido gálico (270 nm); catequina (280 nm); ácido cafeico e ácido rosmarínico (325 nm); e quercetina e rutina (366 nm). Os picos de cromatografia foram confirmados comparando seu tempo de retenção com os padrões de referência e pelo espectro DAD (200 a 600 nm). As operações foram realizadas em triplicata. Curva de calibração para ácido gálico: $Y = 11853x + 1295,7$ ($r = 0,9999$); catequina: $Y = 13076x + 1217,4$ ($r = 0,9991$); ácido rosmarínico: $Y = 10845x + 1084,9$ ($r = 0,9998$); ácido cafeico: $Y = 13269x + 1058,0$ ($r = 0,9996$); rutina: $Y = 12732x + 1349,9$ ($r = 0,9991$) e quercetina: $Y = 11084x + 1149,3$ ($r = 0,9999$).

3.3 Avaliação da Atividade Antioxidante pelo Ensaio do DPPH

A atividade de eliminação de radicais livres do extrato de *H. procumbens* foi medida com o radical DPPH como descrito por Kamdem *et al.* (2012). Uma solução de DPPH (0,3 mM) foi preparada em etanol e 200 µL desta solução foi adicionada a 60 µL de extrato isolado a diferentes concentrações (120, 240, 480 µg/mL). O ácido ascórbico (5 – 520 µg/mL) foi utilizado como controle positivo.

3.4 Análise estatística

Os dados foram expressos como a média ± EPM (erro padrão da média) e então analisados por análise de variância (One way ANOVA) seguida do teste de comparação múltipla de Turkey quando apropriado. A diferença significativa foi obtida com $p < 0,05$.

4 Resultados parciais

4.1 Análise de HPLC

A composição de impressão digital de HPLC do extrato de *Harpagophytum procumbens* revelou a presença do ácido gálico (tempo de retenção - tR = 9,83 min; pico 1), catequina (tR = 14,39 min; pico 2), ácido cafeico (tR = 27,51 min; pico 3), ácido rosmarínico (tR = 35,06 min; pico 4), rutina (tR = 44,09 min; pico 5) e quercetina (tR = 52,23 min; pico 6) (Tabela 1).

Tabela 1 – Composição do extrato seco de *Harpagophytum procumbens*

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA

XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino, pesquisa e extensão"



Compostos	<i>H. procumbens</i>	
	mg/g	%
Ácido gálico	4.19 ± 0.02 a	0.41
Catequina	1.93 ± 0.01 b	0.19
Ácido cafeico	5.08 ± 0.04 c	0.50
Ácido rosmarínico	9.17 ± 0.03 d	0.91
Rutina	0.81 ± 0.03 e	0.08
Quercetina	4.23 ± 0.01 a	0.42

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas de letras diferentes diferem pelo teste de Tukey em $p < 0,05$.

4.2 Eliminação de Radicais DPPH pelo Extrato de *H. procumbens*

Na Figura 1, têm-se que as concentrações testadas do extrato (120 – 480 µg/mL) apresentaram uma inibição do radical DPPH superior a 20%, como o ácido ascórbico (5 – 520 µg/mL). Porém, o último apresentou uma atividade quase três vezes maior, com $IC_{50} = 16,85$ µg/mL vs. $IC_{50} = 178,0$ µg/mL.

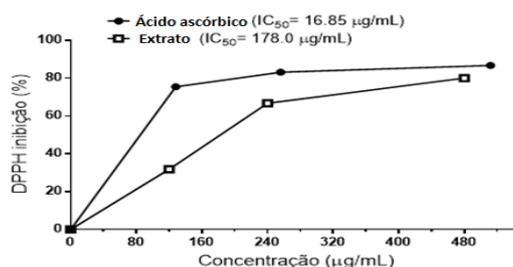


Figura 1. Capacidade antioxidante do extrato de *H. procumbens* comparada com a do ácido ascórbico.

5 Conclusão

Os resultados obtidos indicam certa dificuldade na identificação da composição do extrato seco de *H. procumbens*. A porcentagem identificada é composta predominantemente, em ordem decrescente de concentração, por: ácido rosmarínico > ácido cafeico > quercetina. O potencial antioxidante do extrato é relativamente baixo quando comparado ao do antioxidante padrão. Testes bioquímicos e comportamentais serão realizados em *Nauphoeta cinerea* para elucidar mais propriedades biológicas dessa espécie vegetal.

6 Agradecimentos

Agradecemos ao órgão de fomento CNPq pelo fornecimento da bolsa de iniciação científica – Processo 121563/2020-0 – utilizada para o financiamento da presente pesquisa e à Universidade Regional do Cariri - URCA.

7 Referências

ADEDARA, I. A.; ROSEMBERG, D. B.; SOUZA, D. O.; KAMDEM, J. P.; FAROMBI, E. O.; ASCHNER, M.; ROCHA, J. B. T. **Biochemical and**

V SEMANA UNIVERSITÁRIA DA URCA
XXIII Semana de Iniciação Científica

07 a 11 de Dezembro de 2020

Tema: "Os impactos e desafios da pandemia COVID no ensino,
pesquisa e extensão"



behavioral deficits in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea* model of methylmercury exposure. Toxicology Research, v.4(2), p.442–451, 2015.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M. **Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química Nova, São Paulo, v. 29, p. 113-123, 2006.

DA SILVA, C. S.; DE CÁSSIA, G. L. R.; ELEKOFEHINTI, O. O.; OGUNBOLUDE, Y.; DUARTE, A. E.; ROCHA, J. B. T.; KAMDEM, J. P. **Caffeine-supplemented diet modulates oxidative stress markers and improves locomotor behavior in the lobster cockroach *Nauphoeta cinerea*.** Chemico-Biological Interactions, v.282, p.77–84, 2018.

SILVA, C. T. da; JASIULIONIS, M. G. **Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer.** Ciência e Cultura, v. 66(1), p. 38-42, 2014.

GOTTLIEB, D. J.; YENOKYAN, G.; NEWMAN, A. B.; O'CONNOR, G. T.; PUNJABI, N. M.; QUAN, S. F.; REDLINE, S.; RESNICK, H. E.; TONG, E. K.; WEST, M. D.; SHAHAR, E. prospective Study of Obstructive Sleep Apnea and Incident Coronary Heart Disease and Heart Failure. Circulation, v.122(4), p. 352-360, 2010.

GRANT, L.; MCBEAN, D. E.; FYFE, L.; WARNOCK, A. M. **A review of the biological and potential therapeutic actions of *Harpagophytum procumbens*.** Phytotherapy research, v.21(3), p. 199-209, 2007.

KAMDEM, J. P.; STEFANELLO, S. T.; BOLIGON, A. A.; WAGNER, C.; KADE, I. J.; PEREIRA, R. P.; PRESTE A. DE S.; ROOS D H.; WACZUK, E. P.; APPEL, A. S.; ATHAYDE, M. L.; SOUZA, D. O.; ROCHA, J. B T. ***In vitro* antioxidant activity of stem bark of *Trichilia catigua* Adr. Juss.** Acta Pharmaceutica, v.62(3), p. 371-382, 2012.

MNCWANGI, N.; CHEN, W.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M.; GERICKE, N. **Devil's Claw—A review of the ethnobotany, phytochemistry and biological activity of *Harpagophytum procumbens*.** Journal of ethnopharmacology, v.143(3), p. 755-771, 2012.

MOLYNEUX, P. **The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity.** Songklanakarin J. sci. technol, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOTLHANKA, D. M. T.; NTHOIWA, G. P. **Ethnobotanical survey of medicinal plants of Tswapong north, in eastern Botswana: a case of plants from Mosweu and Seolwane villages.** European Journal of Medicinal Plants, v. 3, p. 10-24, 2013.