

POTENCIAL ANTIOXIDANTE IN VITRO DAS FOLHAS DE IPOMOEA CAIRICA L. SWEET

Caroline Borges Weiler*, Janaina Kieling Frohlich*, Aline Augusti
Boligon**, Vanessa Janovik*, Margareth Linde Athayde***

Universidade Federal de Santa Maria

RESUMO: O presente trabalho descreve a avaliação da atividade antioxidante e o doseamento de polifenóis totais das frações acetato de etila (AcOEt) e diclorometano (CH_2Cl_2) das folhas de *Ipomoea cairica* L. Sweet, uma planta pertencente à família Convolvulaceae. Essa espécie é conhecida popularmente como corda-de-viola e é utilizada na medicina popular brasileira, como anti-inflamatório e antirreumático. A atividade antioxidante foi determinada pelo método do DPPH e cada fração teve o IC_{50} calculado. O IC_{50} apresentou valores de 43,06 $\mu\text{g/mL}$ para a fração CH_2Cl_2 e de 45,43 $\mu\text{g/mL}$ para a fração AcOEt. O conteúdo de polifenóis foi determinado através da utilização dos padrões de ácido pirogálico e ácido gálico. Nesse trabalho não foi possível estabelecer uma relação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante desempenhada pelas frações acetato de etila e diclorometano, uma vez que ambas apresentaram comportamentos semelhantes frente ao DPPH, mas distintos na quantificação de compostos fenólicos.

Descritores: *Ipomoea cairica*; Corda-de-viola; DPPH; Atividade antioxidante; compostos fenólicos; Folhas.

IN VITRO ANTIOXIDANT POTENTIAL CONTENTS OF IPOMOEA CAIRICA L. SWEET LEAVES

ABSTRACT: This work describes the antioxidant activity evaluation and determination of polyphenols of ethyl acetate (EtOAc) and dichloromethane (CH_2Cl_2) fractions of the leaves of *Ipomoea cairica* L. Sweet, a plant belonging to the family Convolvulaceae. This species is popularly known as corda-de-viola and is used in Brazilian folk medicine as anti-inflammatory and antirheumatic. The antioxidant activity was determined by DPPH and each fraction was the IC_{50} calculated. The IC_{50} showed values of 43.06 $\mu\text{g/mL}$ for CH_2Cl_2 fraction and 45.43 $\mu\text{g/mL}$ for the EtOAc fraction. The polyphenol content was determined using the patterns pyrogallol and gallic acids. From this work was not possible to establish a positive relationship between amount of phenolics compounds and antioxidant activity performed by ethyl acetate and dichloromethane fractions. Both showed similar DPPH front, but distinct in the quantification of phenolics compounds.

Descriptors: *Ipomoea cairica*; Corda-de-viola; DPPH; Antioxidant activity; Phenolics compounds; leaves.

* Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

**Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

*** Professora Adjunta do Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, RS.

Introdução

A família Convolvulaceae possui cerca de 59 gêneros, com mais de 1800 espécies. A literatura descreve o isolamento de diversas classes de fitoconstituintes nessa família, dentre os quais podem ser citados terpenóides, esteróides, flavonóides, xantonas, alcalóides, lignanas e, mais recentemente, glicolipídeos e ésteres de oligossacarídeos.¹⁻³ O gênero *Ipomoea* é o mais representativo da família, compreendendo cerca de 700 espécies que aparecem em regiões tropicais e temperadas. De modo geral, as espécies de *Ipomoea* são utilizadas na medicina popular no tratamento das mais diversas enfermidades, tais como reumatismo, artrite, hipertensão, furúnculos, doenças renais, desordens digestivas e disenterias. Em estudos anteriores com outras espécies do gênero *Ipomoea* foram observadas diversas atividades biológicas, entre estas, insulínogênica, hipoglicêmica e anticancerígena.^{4,5}

Ipomoea cairica L. Sweet, conhecida popularmente como corda-de-violão, é considerada uma espécie invasora,⁶ mas existem vários relatos da sua utilização na medicina popular brasileira.¹⁻³ A infusão feita com as folhas é utilizada popularmente no tratamento de erupções cutâneas, especialmente aquelas acompanhadas por febre.⁷ Remédios preparados com as raízes, além de serem utilizados para as condições clínicas citadas, também são usados na hepatite e, tanto as folhas quanto as raízes de *I. cairica*, possuem uma ação purgativa,⁸ havendo também relatos da utilização dessa espécie como antidiarréico e antissifilítico^{8,9}, anti-inflamatório¹⁰ e antirreumático.¹⁻³ Embora *I. cairica* seja amplamente utilizada na medicina popular, não existem informações na literatura sobre determinação de compostos fenólicos e estudos relativos à atividade antioxidante.

O Thomas et al.⁷ estudaram o óleo essencial dessa espécie e encontraram propriedades larvicidas contra larvas de *Culex tritaeniorhynchus*, *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex quinquefasciatus*. As lignanas isoladas da espécie, trachelogenina e arctigenina, apresentaram inibição da replicação do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1; cepas HTLV IIIB) *in vitro*.¹¹ A arctigenina apresentou uma significativa atividade neuroprotetora *ex vivo* contra toxicidade induzida por glutamato em cultura de células corticais de ratos.^{12,13}

Os organismos vivos possuem sistemas antioxidantes endógenos para manter a formação de radicais livres em níveis toleráveis.¹⁴ Estes sistemas não são 100% eficientes, e quando os danos a biomoléculas são excessivos, pode haver alterações de funções e morte celular. Isso está relacionado com várias patologias, particularmente com as degenerativas associadas à idade, como doenças cardiovasculares, neuropatias e câncer.¹⁵ Por isso, o consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas ao estresse oxidativo.¹⁶

O melhor método de prevenção do estresse oxidativo é através de alimentação rica em antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E. A busca por substâncias antioxidantes naturais vem aumentando nos últimos anos, motivo pelo qual os centros de pesquisa e indústrias farmacêuticas têm investido cada vez mais neste tipo de pesquisa.¹⁴ Considerando a importância de prevenir e combater os danos causados pelos radicais livres, a importância das fontes naturais de antioxidantes e a ausência de estudos sobre a espécie em questão, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade antioxidante e o teor de compostos fenólicos nas frações CH_2Cl_2 e AcOEt das folhas *Ipomoea cairica*.

Material e métodos

Materiais

Os solventes (etanol, diclorometano e acetato de etila) empregados foram de procedência Merck (Darmstadt, Germany), especificação pró-análise ou então purificados por destilação. O etanol utilizado no processo extrativo foi de grau comercial. A água destilada empregada em todos os procedimentos foi obtida por destilação no próprio laboratório. Reagente de Folin-Ciocalteu 2N, DPPH e carbonato de sódio foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

Coleta e extração do material vegetal:

As folhas de *Ipomoea cairica* foram coletadas em maio de 2008, em São Francisco de Assis, Rio Grande do Sul. O material foi identificado pelo Prof. Dr. Renato Záchia, do Departamento de Biologia da UFSM. O material testemunho está depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM catalogado sob o número de registro SMDB 12.268.

O material vegetal (192 g) foi seco ao ar livre, moído e triturado. A droga triturada foi macerada a temperatura ambiente com etanol 70% (EtOH:H₂O 7:3, v/v), sendo que o macerado foi armazenado em frascos âmbar e submetido a agitações diárias por um período de sete dias. Ao final desse período o conteúdo foi filtrado em algodão, seguindo-se de concentração em evaporador rotatório, à temperatura inferior a 40°C. Após a eliminação do etanol, o extrato bruto foi particionado através da extração sequencial utilizando como solventes diclorometano (CH₂Cl₂) e acetato de etila (AcOEt).

Avaliação da atividade antioxidante – DPPH:

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotocolorimétrico do DPPH (2,2-difenil,1-picrihidrazila), segundo Choi et al.¹⁷ Foram avaliadas as frações CH₂Cl₂ e AcOEt nas concentrações de: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL em etanol (2,5 mL). A 2,5 mL de cada amostra, foi adicionado 1 mL da solução de DPPH 0,3 mM em etanol. Após 30 minutos à temperatura ambiente, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (Shimadzu-UV-1201) a 518 nm, onde o radical DPPH apresenta o máximo de absorção. Solução de DPPH (1mL; 0,3 mM) em etanol (2,5 mL) foi usada como controle negativo e uma curva de ácido ascórbico nas mesmas concentrações das frações foi utilizada como padrão (controle positivo).

Como controle negativo das soluções amostra, empregaram-se soluções preparadas de modo idêntico, porém sem adição de DPPH. Etanol foi usado como branco. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo da porcentagem de inibição da captação de radicais livres pelo DPPH seguiu a equação:

$$\% \text{ inibição} = 100 - \frac{[(\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}) \times 100]}{\text{Abs}_{\text{controle}}}$$

Onde: Abs_{amostra} é a absorvância da fração; Abs_{branco} é a absorvância das frações sem adição do DPPH e Abs_{controle} é a absorvância da solução de DPPH em etanol.

Após o cálculo, foi construído um gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração das frações.

Determinação de polifenóis

A determinação de conteúdos fenólicos totais foi realizada pelo método do Folin-Ciocalteu¹⁵. 2 mL de Na₂CO₃ 20% foi adicionado a um 1 mL de cada amostra (0,15 mg/mL), a mistura foi deixada em repouso por 5 min antes da adição de 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 2N. Após 10 minutos as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 730 nm, em triplicata. O conteúdo de polifenóis totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido pirogálico por grama de planta seca (mg AP/g PS) e miligramas equivalentes de ácido gálico por grama de planta seca (mg AP/g PS). A equação obtida para a curva padrão do ácido pirogálico foi $y = 42,181x + 0,0454$ ($r = 0,9981$) e do ácido gálico foi $y = 15,635x + 0,0194$ ($r = 0,9996$).

Resultados e discussões

Os rendimentos das frações das folhas de Ipomoea cairica foram determinados, o valor obtido para a fração AcOEt foi de 1,14% e para a fração CH₂Cl₂ 0,94%.

Para a determinação da atividade antioxidante, foi analisada a capacidade das frações CH₂Cl₂ e AcOEt em inibir a formação de radicais livres. Esta medida se dá pela verificação da descoloração da cor violeta da solução etanólica de DPPH em 518nm. Na presença de atividade considerável contra radicais livres ocorre descoloração da solução que passa à cor amarela.^{17,18} A atividade antioxidante medida pelo DPPH pode ser relacionada a compostos fenólicos presentes.¹⁹

Como padrão, para o ensaio do DPPH, foi utilizado o ácido ascórbico que possui atividade antioxidante comprovada. Sendo assim, ele pode ser usado como parâmetro para a comparação das atividades encontradas para as frações analisadas.²⁰ Em todas as concentrações analisadas, as frações CH₂Cl₂ e AcOEt apresentaram comportamento semelhante, sendo que nas concentrações de 125 e 250 µg/mL as mesmas apresentaram comportamento similar ao padrão ácido ascórbico (Fig. 1).

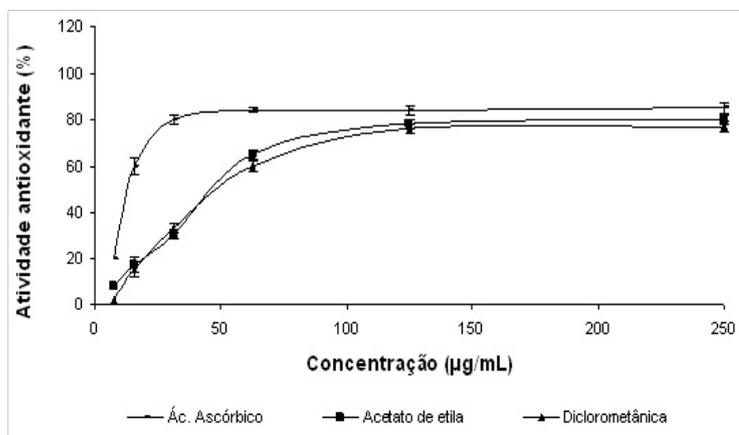


Figura 1 — Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão) e das frações CH₂Cl₂ e AcOEt das folhas de I. cairica, avaliada pelo método do DPPH.

Como as frações diclorometano e acetato de etila, e o padrão ácido ascórbico apresentaram uma atividade dose-dependente significativa, ou seja, as maiores concentrações das amostras apresentaram um maior percentual de inibição do radical DPPH, foi possível calcular IC₅₀ (concentração capaz de inibir 50% da atividade do DPPH). O cálculo do IC₅₀ das frações e do padrão ácido ascórbico foi realizado através de cálculos matemáticos, resultando numa concentração igual a 43,06µg/mL para a fração diclorometânica, 45,43µg/mL para a fração acetato de etila e 12,66µg/mL para o padrão (Tabela 1). A partir dos valores encontrados no cálculo do IC₅₀ é possível observar que as frações apresentam atividades antioxidantes semelhantes, porém estas se mostram diminuídas em relação ao padrão ácido ascórbico.

A Tabela 1 apresenta o conteúdo de polifenóis nas frações CH₂Cl₂ e AcOEt das folhas de *I. cairica* determinado através dos padrões de ácido pirogálico e ácido gálico. As substâncias com núcleo fenólico apresentam destaque especial como eficientes captadoras de radicais livres. Por isso, muitos autores descrevem a relação positiva entre conteúdos fenólicos e atividade antioxidante utilizando DPPH e Folin-Ciocalteu como avaliações analíticas.^{15, 21} No presente estudo, não foi possível estabelecer uma relação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e a atividade antioxidante desempenhada pelas frações acetato de etila e diclorometânica. Este resultado foi semelhante ao obtido por Matthäus (2002)²², que investigou a atividade antioxidante e compostos fenólicos de extratos obtidos a partir de diversas oleaginosas com base em diferentes métodos para a avaliação da atividade antioxidante e de fenólicos totais, incluindo o método DPPH e do Folin-Ciocalteu. Uma das razões para a fraca relação entre a quantidade de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante é, provavelmente, o fato de que o método de Folin-Ciocalteu determina a soma de compostos fenólicos, enquanto que os compostos fenólicos individualmente possuem respostas diferentes sobre o reagente Folin-Ciocalteu e têm diferentes contribuições para a atividade antioxidante.

Visando esse aspecto, também comparamos o modo de expressar os resultados de fenóis totais com dois padrões diferentes, o ácido gálico e o ácido pirogálico. A quantidade de fenóis expressa em ácido gálico foi inferior quando comparada com a quantificação expressa em ácido pirogálico (Tabela 1). É difícil escolher padrões adequados para a quantificação de fenóis totais em extratos de plantas devido à diversidade do grupo dos compostos fenólicos e suas diferentes respostas aos métodos de determinação destes. Assim, só é possível se chegar a equivalentes da presença de compostos fenólicos. Para uma explicação mais aprofundada dos efeitos das frações sobre os métodos que dosam compostos fenólicos, primeiro seria necessário caracterizar os compostos fenólicos individualmente e, segundo, escolher o melhor padrão a ser usado no método de Folin-Ciocalteu.²²

Tabela 1 — Doseamento de fenóis e IC₅₀ das frações das folhas de *Ipomoea cairica*

Frações/Extrato	Fenóis (mg AP/g PS)	Fenóis (mg AG/g PS)	IC ₅₀ (µg/mL)
Ácido ascórbico	-	-	12,66 ± 1,30a
CH ₂ Cl ₂	46,60	38,21	43,06 ± 0,71b
AcOEt	37,44	13,47	45,43 ± 0,24c

IC₅₀ = concentração necessária para inibir 50% da atividade oxidante, resultados expressos em média ± desvio padrão. Letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey p < 0,005.

AP = Ácido pirogálico, AG = Ácido gálico, PS = planta seca.

Os resultados encontrados em nosso estudo indicam que essa espécie possui substâncias químicas antioxidantes capazes de capturar radicais livres. Estas substâncias são promissoras para estudos que visam à prevenção de doenças decorrentes do estresse oxidativo. No entanto, o teste do DPPH não permite uma precisa definição dos efeitos antioxidantes por se tratar de uma metodologia *in vitro*²³. Sabendo-se que a atividade de extratos de plantas não pode ser avaliada somente por um método,¹⁷ torna-se necessário um estudo *in vivo* para determinar se esta planta medicinal poderá ser utilizada para este fim com eficácia.

Conclusão

As frações AcOEt e CH₂Cl₂ das folhas de *Ipomoea cairica* apresentaram atividade antioxidante semelhantes entre si, sendo que as frações nas maiores concentrações testadas (250 e 125 µg/mL) apresentaram atividade similar ao padrão ácido ascórbico. O doseamento de polifenóis mostrou que as duas frações apresentam compostos fenólicos e que eles estão em maior concentração na fração diclorometano. Com base nesta informação, pode-se dizer que na fração acetato de etila existem outros compostos que apresentam ação antioxidante e assim, elevam sua atividade, tornando-a semelhante à encontrada para a fração diclorometano pelo método do DPPH. *I. cairica* é promissora quanto a sua utilização para fins antioxidantes, porém, necessita de mais estudos a seu respeito a fim de garantir a segurança do seu uso.

Referências Bibliográficas

1. Lima OOA, Braz-Filho R. Dibenzylbutyrolactones lignans and coumarins from *Ipomoea cairica*. J Braz Chem Soc 1997; 8: 235-238.
2. Pereda-Miranda R, Hernández-Carlos B. HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. Tetrahedron 2002; 58: 3145-3154.
3. Pereda-Miranda R. Biodynamic oligosaccharides from Convolvulaceae: Isolation, structural elucidation and biological activities. Rev Latinoamer Quím 1997; 25: 97-101.
4. Cao S, Guzza RC, Wisse JH, Miller JS, Evans R, Kingston DGI. J Nat Prod 2005, 68: 487-492.
5. Meira M, David JM, David JP, Araújo SV, Regis TL, Giullietti AM, Queiroz LP. Constituintes químicos de *Ipomoea subincana* Meisn. (Convolvulaceae). Quím Nova 2008, 31 (4): 751-754.
6. Procópio SO, Ferreira EA, Silva EAM, Silva AA, Rufino RJN, Santos JB. Estudos anatômicos de folhas de espécies de plantas daninhas de grande ocorrência no Brasil. III. *Galinsoga parviflora*, *Crotalaria incana*, *Conyza bonariensis* e *Ipomoea cairica*. Planta Daninha 2003, 21 (1): 1-9.
7. Thomas TG, Rao S, Lal S. Mosquito larvicidal properties of essential oil of an indigenous plant, *Ipomoea cairica* Linn. Jpn J Infect Dis 2004, 57 (1): 176-177.
8. Ferreira AA, Oliveira PM, Evangelista EA, Alves RB, Pizziollo VR, Brasileiro BG, Rodrigues FMO, Silveira D, Raslan DS. Atividades biológicas das partes aéreas de *Ipomoea cairica* (Convolvulaceae). RBPM 2006, 8 (2): 14-18.
9. Pio Correa M. Dicionário da plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, Ministério da Agricultura, IBDF, 1978. 1926p.

10. Franco IJ, Fontana VL. Ervas & plantas: a medicina dos simples. Erechim: Livraria Vida, 1997. 177p.
11. Schroder HC, et al. Differential in vitro anti-HIV activity of natural lignans. *Zeitschrift für Naturforschung* 1990, 45: 1215-1221.
12. Jang YP, Kim R, Choi HY, Kim J, Kim SG, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. Arctigenin protects cultured cortical neurons from glutamate-induced neurodegeneration by binding to kainate receptor. *J Neur Res* 2002, 68 (2): 233-240.
13. Cho-Minkyung MK, Janga YP, Kima YC, Kima SG. Arctigenin, a phenylpropanoid dibenzylbutyrolactone lignan, inhibits map kinases and AP-1 activation via potent MKK inhibition: the role in TNF α inhibition. *International Immunopharmacology* 2004, 10/11: 1419-1429.
14. Gordon M H. Dietary antioxidants in disease prevention. *Nat Prod Rep* 1996; 4: 265-272.
15. Chandra S, Meija EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in comparison to *Mate* (*Ilex paraguariensis*) and *Green* (*Camellia sinensis*) Teas. *J Agric Food Chem* 2004; 52: 3583-3589.
16. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 2002; 82: 47-95.
17. Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 2002; 163: 1161-1168.
18. Kulisic T, Radonic A, Katanilic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 2004; 85: 633-640.
19. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20(7): 933-956.
20. Duarte-Almeida JM, Santos RJ, Genovese MI, Lajolo, FM. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. *Ciênc Tecnol Aliment* 2006; 26(2): 446-452.
21. Boligon AA, Magoga BR, Feltrin AC, Janovik V, Athayde ML. Potencial antioxidante invitro, conteúdo de fenóis e flavonóides nos ramos de *Scutia buxifolia* Reissek. *Revista Saúde* 2009, 35 (1): 34-38.
22. Matthäus B. Antioxidant Activity of Extracts Obtained from Residues of Different Oilseeds. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3444-3452.
23. Ursini F, Maiorino M, Marazzoni P, Roveri A, Pifferi G. A novel antioxidant flavonoid (idb 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Rad Biol Med* 1994; 16(5): 547-553.

Aline Agusti Buligon — Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, Prédio 26, sala 1411, Santa Maria/RS. Telefone:(55) 3220-9618

E-mail: alineboligon@hotmail.com,

Recebido em 03 de fevereiro de 2011.

Aceito em 16 de junho de 2011.