

# NOVO MÉTODO DE OBTENÇÃO DA RIPARINA III E SUAS ANÁLOGAS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE IN VITRO DAS RIPARINAS A, B, C, D, E, E F.

Paôlla Rodrigues Policarpo (Bolsista PIBITI/UFPI), Prof<sup>o</sup> Dr. Stanley Juan Chavez Gutierrez (Orientador, Depto de Bioquímica e Farmacologia – UFPI), Prof. Dr. Rivellison Mendes de Freitas (Co-orientador – UFPI), Geandra Batista Lima Nunes (Colaboradora, Doutoranda do Programa RENORBIO – UFPI)

## Introdução

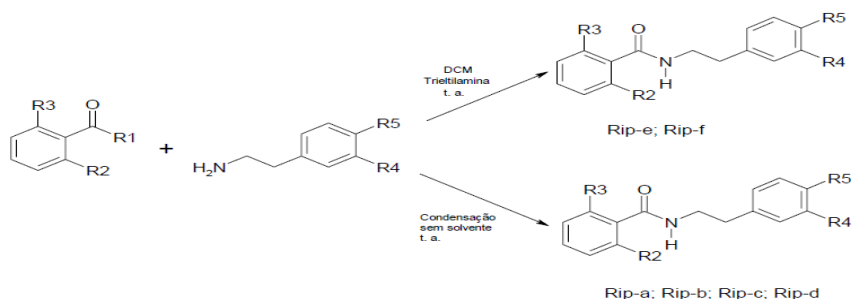
Dos vegetais são extraídas várias substâncias, e grande parte delas responsáveis pela aplicabilidade na alimentação e na saúde. Isto tem sido estímulo ao desenvolvimento do estudo de muitas plantas, dentro do âmbito da química orgânica, objetivando o estudo das estruturas e da química destes compostos que é extremamente ampla e diversificada (SANTOS, 2002).

O gênero *Aniba* pertence à família Lauráceae, popularmente conhecida como “louro”, encontrada na Amazônia central e Guiana. Da espécie *Aniba riparia* (Nees) Mez foram isolados os éteres metílicos de N-benzoiltiramina (Riparina I); N-(2-hidroxibenzoil) tiramina (Riparina II) e N-(2,6-dihidroxibenzoil) tiramina (Riparina III) (BARBOSA-FILHO et al., 1987), estes metiléteres possuem atividade antimicrobiana, porém a sua atividade farmacológica mais importante é como relaxante da musculatura esquelética e lisa. A riparina III apresentou também atividades antiansiolítica e antidepressivas (SOUSA et al., 2004). Tendo em vista a importância das riparinas, em especial a atividade no sistema nervoso central desenvolvida pela riparina III, resolveu-se sintetizar análogos a partir de modificações estruturais e realizar screenings farmacológicos quanto a ação antioxidante para prevenir o dano oxidativo que implica em diversas patologias, como a aterosclerose, diabetes, câncer e transtornos neurodegenerativos (GREEN, BRAND, MURPHY, 2004).

## Material e Método

Na primeira etapa do trabalho obteve-se a riparina III por meio de misturas reacionais de ácido 2,6-dihidroxibenzoico e metanol com ácido sulfúrico concentrado, dentre outros reagentes e processos de extração. Após a obtenção da riparina III sintetizou-se as riparinas A, B, C, D, E, e F através de reações que ocasionaram mudanças estruturais na riparina obtida.

A seguir, resumidamente a preparação das riparinas derivadas da riparina III.



- (Rip-a) R1= Cl; R2 = R3 = R4 = R5 = H  
(Rip-b) R1= Cl; R2 = R3 = H; R4 = R5 = OCH3  
(Rip-c) R1= OCH3; R2 = OH; R3 = R4 = R5 = H  
(Rip-d) R1= OCH3; R2 = OH; R3 = H; R4 = R5 = OCH3  
(Rip-e) R1= OCH3; R2 = R3 = OH; R4 = R5 = H  
(Rip-f) R1= OCH3; R2 = R3 = OH; R4 = R5 = OCH3

**Esquema 1.** Reação geral para a obtenção dos novos derivados das riparinas.

Após a síntese das riparinas análogas a riparina III avaliou-se suas atividades antioxidante através de três metodologias que quantificam a produção de radicais livres prejudiciais a membranas biológicas.

A atividade antioxidante foi analisada pelo TBARS assay que é um método usado para quantificar a peroxidação lipídica que corresponde a um dano na membrana celular causado pelo estresse oxidativo. O AAPH, um composto azo hidrossolúvel, é utilizado como gerador de radicais livres. A sua decomposição produz nitrogênio molecular e radicais carbonilas, os quais, por sua vez, reagem com o ácido tiobarbitúrico, resultando na formação de TBARS (ZIN; HAMID; OSMAN, 2002; FITÓ; LA TORRE; COVAS, 2007; MOON; SHIBAMOTO, 2009; SERAFINI et al., 2011).

Outra metodologia bastante empregada para avaliar a atividade antioxidante de uma substância baseia-se na capacidade scavenger de radicais livres formados em espécies menos reativas (HOELZL et al., 2005). Contudo, este método possui uma desvantagem porque muitos antioxidantes também têm propriedade quelante de metais. Assim, é impossível distinguir se a ação da substância foi de fato OH-scavenging ou simplesmente quelante (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Ensaio *in vitro* de remoção de NO também foi utilizado para avaliar o potencial antioxidante das riparinas derivadas. Os íons nitritos têm um forte poder oxidante, reagindo com várias moléculas biológicas, o que leva a danos celulares (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007; GUIMARÃES et al., 2010). Substâncias com ação scavenger de NO competem com o oxigênio, levando à redução na produção de nitritos, caracterizando a atividade antioxidante (AHMADI et al., 2011; SERAFINI et al., 2011).

## **Resultados**

Existe um grande interesse pela descoberta ou modificação de substâncias naturais ou sintéticas para descobrir ou melhorar o tratamento de inúmeras doenças que ainda acometem a humanidade; como por exemplo, o câncer, que é uma das doenças que mais causa mortes hoje em dia (RENNIE; RUSTIG, 1996).

Com a obtenção dos análogos da riparina III (riparinas A, B, C, D, E e F) pretende-se avaliar suas atividades como antioxidante *in vitro*, para realizar uma triagem farmacológica, estudando a relação entre estrutura atividade e para que possamos realizar testes pré-clínicos. Estudos demonstram que os radicais livres e as espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) são espécies químicas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados e que têm sido implicados na patogênese de muitas doenças. São instáveis e podem reagir com diversos compostos celulares. Visto que estas EROS participam de reações essenciais, elas são constantemente formadas e podem se tornar prejudiciais, quando sua produção encontra-se superior ao normal pelos sistemas oxidantes (SANTOS et al., 2008).

Resumidamente, o estresse oxidativo pode comprometer a estrutura celular, danificando-a ou causar morte celular. Com base na literatura revisada, o estresse oxidativo, é uma das condições de dano celular mais estudado atualmente, e tem sido implicado em muitos processos patológicos. Apesar, dessas evidências a atividade antioxidante *in vitro* e o envolvimento das riparinas na remoção das EROs precisa ser investigado e melhor esclarecido. Como também é necessário estudar as possíveis alterações na produção das EROs *in vivo* após a avaliação farmacológica *in vitro*. Todos os

métodos utilizados pesquisaram o potencial efeito antioxidante das moléculas biosintéticas derivadas da riparina III, denominadas riparina A, B, C, D, E, e F.

Os resultados apresentados a partir das riparinas A, B, C, D, E, e F nas doses de 10 – 50 – 100 – 250 – 1000 µg/mL demonstram a capacidade de redução de nitrito em todas as concentrações testadas, conforme Figura 1. O Trolox, um análogo sintético do  $\alpha$ -tocoferol utilizado como antioxidante padrão, diminuiu 40.54± 6.24% da produção de nitrito.

No trabalho, foi averiguado que as riparinas A, B, C, D, E, e F produziram a remoção do radical hidroxil, exibindo uma significativa atividade antioxidante que pode ser capaz de inibir os danos celulares causados por este radical. O trolox (padrão) também reduziu significativamente a quantidade deste radical. Das concentrações a que está relacionada com um menor desempenho na remoção destes radicais foi a de 10 µg/mL, a qual apresentou 86.71% em percentuais de geração de malonaldeído, demonstrando a ocorrência do dano oxidativo através da geração do radical hidroxil.

As riparinas A, B, C, D, E, e F, em todas as concentrações testadas, foram capazes de prevenir a peroxidação lipídica, inibindo a quantidade de TBARS formado. Resultado semelhante foi obtido com o trolox, um análogo sintético do  $\alpha$ -tocoferol, usado como padrão antioxidante. Este resultado sugere que as riparinas A, B, C, D, E, e F podem exercer efeito antioxidante que protege as biomoléculas lipídicas (SERAFINI et al., 2011).

### **Conclusão**

A partir dos métodos utilizados *in vitro*, demonstrou-se que as riparinas A, B, C, D, E, e F, moléculas inéditas derivadas da riparina III, foram capazes de reduzir a produção de radicais livres induzida por estes métodos, em todas as concentrações testadas, apresentando bons resultados em comparação com o trolox, um análogo sintético do alfa-tocoferol, usado como padrão antioxidante.

### **Referências**

AHMADI, A.; EBRAHIMZADEH, M.A; ASHRAFIA, A. S.A; KARAMI, M.; MAHDAVI, M.R.; SARAVI, S.S.S. Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H2 receptor antagonists. **Fundamental & Clinical Pharmacology.**, v. 25, n.1, p. 72-79, 2011.

BARBOSA-FILHO, J.M. ; YOSHIDA, M. ; GOTTLIEB, O. R. ; BARBOSA, R. C. S. B. C. ; GIESBRECHT, A. M. ; YOUNG, M. C. M. . Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, Reino Unido, v. 26; n. 9; p. 2615-2617; 1987.FITÓ, M.; LA TORRE, R.; COVAS, M.I. Olive oil and oxidative stress. **Mol Nutr Food Res.**, v. 51, n.1 p. 1215-1224, 2007.

GREEN, K.; BRAND, M. D; MURPHY, M.P. Prevention of mitochondrial oxidative damage as a therapeutic strategy in diabetes. *Diabetes*. v. 1, n. 53, p.110-118, 2004.

GUIMARÃES AG, OLIVEIRA GF, MELO MS, CAVALCANTI SC, ANTONIOLLI AR, BONJARDIM LR, SILVA FA, SANTOS JPA, ROCHA RF, MOREIRA JCF, ARAÚJO AA, GELAIN DP, QUINTANS-JÚNIOR LJ: Bioassay-guided Evaluation of Antioxidant and Antinociceptive Activities of Carvacrol. **BASIC CLIN PHARMACOL TOXICOL**. 107:949-957, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. *Free Radicals in Biology and Medicine*. **Oxford University Press.**, v.1, n. 1, p. 851, 2007.

HOELZL C, BICHLER J, FERK F, SIMIC T, NERSESYAN A, ELBLING L, EHRLICH V, CHAKRABORTY A, KNASMULLER S: Methods for the detection of antioxidants which prevent age related diseases: a critical review with particular emphasis on human intervention studies. **Journal of physiology and pharmacology**. 56:49-64, 2005.

HUANG, D. J., OU, B. X., PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Jour of Agricul and Food Chemistry**, 53(6), 1841–1856, 2005.

RENNIE, J.; RUSTIG, R.; **Sci. Am.**; v. 275; p. 55-59; 1996.

SANTOS, E. M. Florística Etnobotânica e Tipagem Fitoquímica de espécies medicinais de uso popular nos cerrados dos municípios de Caxias e Timon, Maranhão. **Seminário de Iniciação Científica da UEMA**, 2002.

SERAFINI MR, SANTOS RC, GUIMARÃES AG, SANTOS JPA, SANTOS ADC, ALVES IA, GELAIN DP, NOGUEIRA PCL, QUINTANS-JÚNIOR LJ, BONJARDIM LR, ARAÚJO AAS: Morinda citrifolia Linn Leaf Extract Possesses Antioxidant Activities and Reduces Nociceptive Behavior and Leukocyte Migration. **J Med Food** 1-8, 2011.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (Morinda citrifolia L.) root, fruit and leaf. **Food Chem.**, v. 78, n. 1, p. 227–231, 2002.

**Palavras-chave:** Riparina. Dano oxidativo. Antioxidante.