AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DE FRAÇÕES DE *Euphorbia umbellata* (PAX) BRUYNS E FÁRMACOS ANTIÚLCERA: INVESTIGAÇÃO DO EFEITO SINÉRGICO

Caroline Emerick Moreira (PIBIC/CNPq/UEPG), Priscileila Colerato Ferari (Orientadora) email: priscileila@hotmail.com, Bruno Rodrigo Minozzo (Co-orientador) email: brunominozzo@outlook.com, Flávio Luís Beltrame (Co-autor) flaviobeltra@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Ciências Farmacêuticas.
Área: Farmácia e subárea: Farmacotecnica.

Palavras-chave: extrato vegetal, úlcera gástrica, omeprazol, ranitidina, liberação controlada.

Resumo

O estresse oxidativo é um dos mecanismos aceitos no processo de desenvolvimento de úlceras gástricas. Até o momento são poucos os estudos a respeito de efeito antioxidante de fármacos antiulcerosos e de associações com extratos vegetais ou a outras substâncias sintéticas usadas no tratamento de úlceras gástricas. Dessa forma, buscou-se investigar a ação *scavenger* da associação de frações do extrato de cascas de *Euphorbia umbellata* e omeprazol ou ranitidina. O efeito *scavenger* foi avaliado através do método *in vitro* do radical DPPH$^{\bullet}$. A fração metanólica associada ao omeprazol demonstrou melhor resultado entre as concentrações testadas.

Introdução

Os fatores desencadeantes das úlceras gástricas são vários, entre eles destacam-se a ação de EROs (espécies reativas de oxigênio), infecção pelo *Helicobacter pilory* e processos inflamatórios (WANG et al., 2015). Diversas são as classes farmacológicas atualmente disponíveis para o tratamento de úlceras gástricas, entre tanto, nenhuma delas aborda a ação de antioxidantes (MINOZZO et al., 2016).
Extratos fitoquímicos corriqueiramente apresentam compostos com grupos hidroxil ativos (polifenois entre eles flavonoides), que constituem potentes agentes *scavengers* (HIDAYAT; FITRI; KUSWANDI, 2017). Nesse contexto, a *Euphorbia umbellata*, popularmente conhecida como “leitosinha”, é empregada pela população sul brasileira em várias ações etnofarmacologicas, a exemplo de distúrbios gástricos (MINOZZO et al., 2016). Nessa lógica, o atual projeto propôs avaliar a ação antioxidante de extratos de *E. umbellata* e associação a fármacos (omeprazol ou ranitidina) buscando um efeito sinérgico, com o desejo de despertar o interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos, com mecanismos e/ou formas farmacêuticas multifacetadas (ex.: de liberação controlada), no tratamento de úlceras gástricas.

Materiais e Métodos

A obtenção do extrato bruto (hidroalcoólico) das cascas de *E. umbellata* se deu por metodologia de Soxhlet (refluxo de 24 horas). Subsequentemente, as frações metanólica e acetato de etila foram obtidas pela mesma metodologia. Finalizado o processo, as frações foram concentradas em rotaevaporador e armazenadas em

recipiente a 0 ± 4 °C, até uso. A ação *scavenger* contra o radical DPPH$^{\bullet}$ foi feita em placa de 96 poços, nos quais as amostras foram testas frente a 300 µM do radical DPPH$^{\bullet}$ e solubilizados em etanol absoluto (SOARES et al., 1997). O meio reacional foi composto de amostras de padrão positivo quercetina (Sigma-Aldrich®) ou frações (metanólica ou acetato de etila) nas concentrações entre 0,1 e 50 µg.mL^{-1} ou ainda fármacos antiúlceros (omeprazol e ranitidina) de 0,1 a 500 µg.mL^{-1} (ambos solubilizados em metanol), solução de DPPH$^{\bullet}$ e completados com etanol absoluto até 1000 µL. A mistura foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz, sendo que o resultado foi avaliado pelo decréscimo da absorbância à λ = 517. Os resultados foram determinados em triplicatas e expressos em porcentagem de inibição pela formula: Inibição (%) = ((ABS$_{controle}$ – ABS$_{amostra}$)/ABS$_{controle}$) x 100.

A ação sinérgica foi avaliada, primeiramente, pela seleção da fração (metanólica ou acetato de etila) com melhor atividade frente DPPH$^{\bullet}$ ao com base no resultado de CI$_{50.}$ Após, esta foi testada nas concentrações entre 2 e 50 µg.mL^{-1} associadas ao omeprazol ou ranitidina (20 e 50 µg.mL^{-1}) contra o mesmo radical.

Os valores de CI$_{50}$ foram obtidos plotando-se os dados de porcentagem de inibição e concentração final de cada amostra em *software* GraphPad Prism® 5, versão 5.01. Os cálculos de porcentagem de inibição foram realizados em Microsoft Excel (versão 2007) e a analise estatística foi expresso com média ± desvio padrão.

Resultados e Discussão

Primeiramente as frações metanólica (FM) e acetato de etila (FAE) foram comparadas ao padrão positivo (quercetina), em triplicata. Entretanto, a FAE não demonstrou resultado de inibição do radical DPPH$^{\bullet}$ satisfatório nas concentrações inicialmente testadas, não sendo possível calcular CI$_{50}$. Dessa forma, a FAE foi então concentrada à 200, 150 e 100 µg.mL^{-1} para obtenção da CI$_{50}$ (37,57 ± 4,35 µg.mL^{-1}). Este valor apresentou-se melhor do que o resultado descrito por Mahomoodaly et al. (2012) que estudou a fração acetato de etila do extrato de *Antidesma magadascariense* Lam (CI$_{50}$ 99,53 ± 7,53 µg.mL^{-1}). A ação *scavenger* da FM mostrou uma CI$_{50}$ 21,57 ± 1,61 µg.mL^{-1}, acima das encontradas por Minozzo et al. (2016) (8,91 ± 1.77 µg.mL^{-1}) e abaixo das encontradas por Amoo et al. (2014) (55,7 µg.mL^{-1} ± 0,35). Com base nesses dados, foi então escolhida a FM para prosseguir o estudo de avaliação da ação *scavenger* associada aos fármacos antiulcerosos.

Preliminarmente, omeprazol e ranitidina foram testados individualmente a fim de propor CI$_{50}$ e prosseguir o estudo, contudo, não houve atividade destes nas concentrações testadas contra o DPPH$^{\bullet}$.

No teste de atividade individual, a quercetina (5 µg.mL^{-1}) rendeu uma inibição de 42,52% e a concentração máxima (50 µg.mL^{-1}) uma inibição de 93,64%. Já a FM revelou uma inibição de 28,02% (10 µg.mL^{-1} e concentração mais próxima da CI$_{50}$) e inibição máxima de 92,52% (próxima ao padrão). Fixaram-se então as concentrações de 50 e 20 µg.mL^{-1}, de omeprazol ou de raditidina e associaram-se as concentrações acima testadas da quercetina ou FM. Os resultados da porcentagem de inibição dessas associações aos fármacos estão demonstrados na tabela 1 (concentração de 50 µg.mL^{-1} dos fármacos) e na tabela 2 (20 µg.mL^{-1}).

Tabela 1: Ação *scavenger* da quercetina ou fração metanólica associada a 50 µg.mL^{-1} de omeprazol ou ranitidina sobre o DPPH$^{\bullet}$

Porcentagem de inibição (%)				
Concentração (µg.mL^{-1})	**Quercetina + ranitidina**	**Quercetina + omeprazol**	**FM + ranitidina**	**FM + omeprazol**
50	96,79 ± 0,427	94,82 ± 0,492	90,28 ± 0,783	90,78 ± 0,318
20	96,37 ± 0,367	94,81 ± 0,506	69,32 ± 2,157	72,89 ± 2,357
10	63,64 ± 1,385	93,57 ± 0,563	40,74 ± 4,787	33,85 ± 2,206
5	39,27 ± 2,193	79,14 ± 1,887	15,91 ± 4,183	10,35 ± 3,564
2	16,04 ± 2,104	38,01 ± 1,634	6,06 ± 4,188	0,00

Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão (*n=3*)

Tabela 2: Ação *scavenger* da quercetina ou fração metanólica associada a 20 µg.mL^{-1} de omeprazol ou ranitidina sobre o DPPH$^{\bullet}$

Porcentagem de inibição (%)				
Concentração (µg.mL^{-1})	**Quercetina + ranitidina**	**Quercetina + omeprazol**	**FM + ranitidina**	**FM + omeprazol**
50	96,24 ± 0,240	94,59 ± 0,287	90,86 ± 0,620	90,78 ± 0,424
20	96,37 ± 0,074	94,37 ± 0,345	68,69 ± 1,136	75,23 ± 2,573
10	67,55 ± 2,585	93,33 ± 1,791	35,86 ± 0,971	33,46 ± 2,623
5	43,11 ± 5,196	76,55 ± 0,923	15,53 ± 1,223	8,17 ± 1,538
2	15,03 ± 4,939	36,12 ± 0,943	12,12 ± 3,958	0,00

Os resultados foram expressos pela média ± desvio padrão (*n=3*)

Com base nos resultados exposto nas tabelas acima, verifica-se que ação *scavenger* das associações de padrão-fármaco ou fração metanólica-fármaco mostraram-se eficientes. A associação quercetina-ranitidina 50 µg.mL^{-1} apresentou uma CI_{50} 7,77 µg.mL^{-1} , a associação quercetina-ranitidina 20 µg.mL^{-1} a CI_{50} foi de 6,55 µg.mL^{-1}, já para o fármaco omeprazol a associação quercetina-omeprazol 50 µg.mL^{-1} CI_{50} 3,95 µg.mL^{-1}, quercetina-omeprazol 20 µg.mL^{-1} CI_{50} 4,00 µg.mL^{-1}. Pode-se dizer que nesse aspecto, a associação que apresentou melhor ação *screvenger* foi a quercetina-omeprazol 50 µg.mL^{-1}, resaltando que sua CI_{50} foi 0,6 vezes menor que a quercetina isolada.

A ação *scavenger* do omeprazol foi melhorada pela associação com FM, independente da concentração do final do fármaco, uma vez que a variação da concentração de omeprazol pouco alterou a CI_{50} (12,55 e 12,11 µg.mL^{-1}), sendo que a concentração de 10 µg.mL^{-1} da FM associada a 20 µg.mL^{-1} resultou em uma inibição de 33,46% e que a concentração máxima (50 µg.mL^{-1}) apresentou uma inibição de 90,78%. Além disso, a associação da fração metanólica com a ranitidina também levou a uma melhora da ação *scavenger* do fármaco.

Por fim, a investigação de novos *desings* de fármacos para o tratamento e prevenção de úlceras gástricas, é algo promissor. Pois, estes podem reduzir efeitos colaterais de fármacos atualmente disponíveis no mercado.

Conclusões

Concluiu-se que entre as frações acetato de etila e metanol, do extrato de *E. umbellata*, a fração metanólica foi a que apresentou melhor CI_{50} quando testada frente ao radical DPPH$^{\bullet}$. Em relação ao estudo da ação sinérgica dos fármacos (omeprazol ou ranitidina), o omeprazol revelou melhor ação sinérgica quando associado à fração metanólica. Entretanto, trata-se ainda de resultados preliminares

e que merecem investigação mais aprofundada, por meio de ensaios *in vivo* a fim de comprovar os resultados e entender os mecanismos de ação da associação.

Agradecimentos
Ao CNPq e a Universidade Estadual de Ponta Grossa pelo financiamento e apoio.

Referências

AMOO, S. O. *et al*. Antioxidant and acetylcholinesterase-inhibitory properties of long-term stored medicinal plants. **Complementary and Alternative Medicine**. v. 12, p. 87-96, 2012.

HYDAIAT, M. A.; FRITI, A.; KUSWANDI, B. Scanometry as microplate reader for high throughput method based on DPPH dry reagent for antioxidant assay. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 7, n. 3, p. 395-400, 2017.

MAHOMOODALLY, F. M. et al. Antioxidant, antiglycation and cytotoxicity evaluation of selected medicinal plants of the Mascarene Islands. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**. v. 12, n. 1, p.165-177, 2012.

MINOZZO, B. R. et al. Anti-ulcer mechanisms of polyphenols extract of *Euphorbia umbellata* (Pax) Bruyns (Euphorbiaceae). **Journal of Etnopharmacology**. v.191, p. 29-40, 2016.

WANG, Y. Multipathway integrated adjustment mechanism of *Glycyrrhiza* triterpenes curing gastric ulcer in rats. **Pharmacognosy Magazine**. v. 13, n. 50, p. 209-215, 2017.