

## Estudo da Atividade Antiespasmódica de Extrato Hidroetanólico de *Piper regnellii* DC sobre o Jejuno Isolado de Rata

Janaina Drawanz PEREIRA, Luciane Cristina VIEIRA e Augusto LANGELOH\*

Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde,  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmento Leite, 500. CEP: 90046-900  
Porto Alegre/RS, Brasil

**RESUMO.** Este trabalho investigou a atividade antiespasmódica *in vitro* (jejuno de rata) do extrato hidroetanólico 70% de *Piper regnellii* DC (EHEPR), espécie conhecida como “pariparoba”. Foram avaliados  $DE_{50}$ ,  $E_{máx}$ ,  $pD_2$ ,  $\rho$ , e os equivalentes de  $pA_2$  e  $pD'_2$ , comparando as ações produzidas em curvas concentração-efeito (CCE) para acetilcolina (ACh) e cloreto de bário ( $BaCl_2$ ) frente ao EHEPR. Os resultados mostraram que EHEPR inibiu de forma concentração-dependente o efeito da ACh e do  $BaCl_2$ , mostrando antagonismo não-competitivo, reduzindo o efeito máximo ( $E_{máx}$ ) das CCE obtidas para ACh e  $BaCl_2$ , com maior atividade contra ACh. O extrato apresentou atividade espasmolítica, justificando o emprego popular da espécie no tratamento de desordens gastrointestinais.

**SUMMARY.** “Study of Antispasmodic Activity of the Hydroethanolic Extract of *Piper regnellii* DC in Isolated Female Rat Jejunum”. The purpose of this study was to investigate the antispasmodic activity *in vitro* (female rat jejunum) of the hydroethanolic extract of *Piper regnellii* DC (EHEPR), species known as “pariparoba”. The actions produced were compared in concentration-effect curves (CEC) for acetylcholine (ACh) and barium chloride ( $BaCl_2$ ) front to EHEPR, evaluating the pharmacological variables  $DE_{50}$ ,  $E_{máx}$ ,  $pD_2$ ,  $\rho$ , and the equivalent of  $pA_2$  and  $pD'_2$ . The results showed that EHEPR inhibited in a concentration-dependent way the effect of ACh and of  $BaCl_2$ , showing no-competitive antagonism, reducing the maximum effect ( $E_{máx}$ ) of CEC obtained for ACh and  $BaCl_2$ , with larger activity against ACh. In the dosages utilized, the extract presented espasmolitic activity, justifying the popular use of the species in the treatment of gastrointestinal disorders.

### INTRODUÇÃO

*Piper regnellii* DC (*Piperaceae*), nativa na América do Sul e sudeste do Brasil <sup>1</sup>, é conhecida pela população no Rio Grande do Sul como pariparoba, sendo utilizada em lugar de *Piper umbellata* (*Piperaceae*) para o tratamento de disfunções hepáticas <sup>2</sup>, atonias estomacais <sup>3</sup>, diarreia <sup>4</sup> e infecções <sup>5</sup>.

A revisão bibliográfica realizada mostrou que existem poucos trabalhos acerca de *Piper regnellii* DC. Há atividade antimicrobiana para o óleo essencial extraído das folhas <sup>6</sup> e de extrato hidroetanólico <sup>5</sup>. Em relação à composição fitoquímica, estão presentes nas raízes desta espécie os fenilpropanóides apiol, dillapiol e miristicina, sete 4',7'-epoxi-8,3'-neolignananas e três 8',9'-dinor-4',7'-epoxi-8,3'-neolignananas <sup>7</sup> e nas folhas

os óleos voláteis linalool (15,90%), mirceno (52,60%), (E)-nerolidol (4,20%), biciclogermacreno (2,90%) e  $\beta$ -cariofileno (8,50%) <sup>6</sup>. Não foram encontrados trabalhos envolvendo dosagens utilizadas nem estudos de toxicidade.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos produzidos por extrato hidroetanólico das folhas de *Piper regnellii* DC (EHEPR) obtido por maceração sobre as contrações induzidas por acetilcolina (ACh) e cloreto de bário ( $BaCl_2$ ) em jejuno isolado de rata.

### MATERIAIS E MÉTODOS

#### Material Botânico

Para a confecção do extrato hidroetanólico, folhas de *Piper regnellii* (Miq) DC foram coletadas na cidade de Gravataí - RS, em maio de

**PALAVRAS-CHAVE:** Atividade antiespasmódica *in vitro*, Acetilcolina, Cloreto de bário, Curvas concentração-efeito, Jejuno de rata, Pariparoba, *Piper regnellii* DC.

**KEY WORDS:** Antispasmodic activity *in vitro*, Acetylcholine, Barium chloride, Concentration-responses curves, Female Rat Jejunum, Pariparoba, *Piper regnellii* DC.

\* Autor para correspondência: E-mail: langeloh@vortex.ufrgs.br

2003. Uma exsicata foi separada e registrada no herbário do Departamento de Botânica da UFRGS, sob número ICN 125098, após identificação pelo biólogo Daniel Ruschel.

### **Preparação do extrato hidroetanólico de *Piper regnellii* DC (EHEPR)**

O extrato hidroetanólico de *Piper regnellii* DC (EHEPR) foi preparado pelo método de maceração, utilizando 300 g de folha fresca picada para 3000 mL de solvente hidroetanólico (30% de água destilada e 70% de etanol). Durante um período de 48 a 72 h foram realizadas agitações ocasionais. O processo foi repetido 3 vezes, sendo suficientes para o esgotamento completo de substâncias coradas da planta. O macerado obtido foi concentrado em rotavapor, a uma temperatura de 55 °C, até que todo solvente fosse evaporado. Posteriormente, o EHEPR foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração a uma temperatura de 4 °C até a execução dos experimentos.

### **Determinação do resíduo seco**

A determinação do resíduo seco foi realizada aquecendo-se seis alíquotas do extrato hidroetanólico, de 1 mL cada, em estufa a 100 °C até que a diferença entre as medidas (realizadas em balança analítica) fossem constantes. Os resultados foram expressos pela média das determinações, em mg/mL.

### **Animais**

Foram utilizadas ratas Wistar, com idade de 120 dias e pesando entre 180 e 225 g, criadas no CREAL (Centro de Reprodução e Experimentação Animal) e mantidas no Biotério do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS, em sala sob temperatura (20-25 °C) e umidade controladas, obedecendo a um ciclo claro escuro de 12 h, com livre acesso à água e ração. Antes da realização dos experimentos os animais eram deixados em jejum de 24 h.

### **Avaliação da resposta farmacológica de jejuno isolado de rata à acetilcolina e cloreto de bário frente ao extrato hidroetanólico de *Piper regnellii* DC (EHEPR)**

Após um jejum prévio de 24 h, os animais foram sacrificados e segmentos de 2-3 cm de jejuno foram removidos, limpos e montados em cuba de vidro contendo 10 mL de solução de Tyrode, aerada e aquecida a 37 °C. O registro das contrações isotônicas foi feito em papel es-

fumaçado com alavanca de inscrição tangencial, usando-se uma carga de 1,0 g e uma ampliação de seis vezes.

Decorridos 30 min, tempo necessário para o relaxamento e estabilização do órgão, foram obtidas curvas concentração-efeito (CCE) controles pelo método das doses cumulativas<sup>8</sup> para acetilcolina e cloreto de bário, utilizando a técnica dos parênteses ou "bracketing"<sup>9</sup>, em intervalos de 20 min. Assim que respostas regulares eram obtidas, realizou-se novas CCE para ACh e BaCl<sub>2</sub> em presença de concentrações crescentes do EHEPR. Após a execução da última CCE na presença do extrato, o órgão foi lavado três vezes e depois de um repouso de 20 min repetiu-se as CCE controles para verificar a reversibilidade do efeito<sup>10</sup>.

Os resultados foram representados em percentual do efeito máximo ( $E_{m\acute{a}x}$ ) observado em relação às CCE controles. A afinidade do agonista ( $pD_2$ ) foi determinada graficamente através do logaritmo da concentração que produziu 50% do  $E_{m\acute{a}x}$ . O parâmetro responsividade relativa ( $\rho$ )<sup>11,12</sup> foi calculado através da razão entre o efeito máximo produzido por um antagonista total e o efeito máximo obtido da preparação.

O valor de  $pD'_2$ , que corresponde ao logaritmo negativo da concentração molar do antagonista que produz uma redução de 50% do efeito máximo, foi calculado pelo gráfico de Schild-modificado. Porém, como a composição precisa dos constituintes (massa molecular) do extrato não é conhecida, ao invés do  $pD'_2$  utilizou-se a Concentração Inibidora do Efeito Máximo do agonista em 50%, representado pela sigla CIEM50, determinado através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados<sup>13</sup>. Após, calculou-se o antilog deste valor.

### **Análise estatística**

A análise estatística das variáveis farmacológicas resultantes da mensuração da atividade antiespasmódica do EHEPR foi feita com auxílio do teste t-Student no programa Microsoft<sup>®</sup> EXCEL 97<sup>®</sup> (Microsoft Corporation). Foram consideradas significativas diferenças com  $p < 0,05$ . Os cálculos das retas de regressão, coeficientes de correlação e demais variáveis foram feitos com auxílio do mesmo programa.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Determinação do resíduo seco**

Foi encontrado para o EHEPR o valor de resíduo seco  $16,7 \pm 1,19$  mg/mL (média das deter-

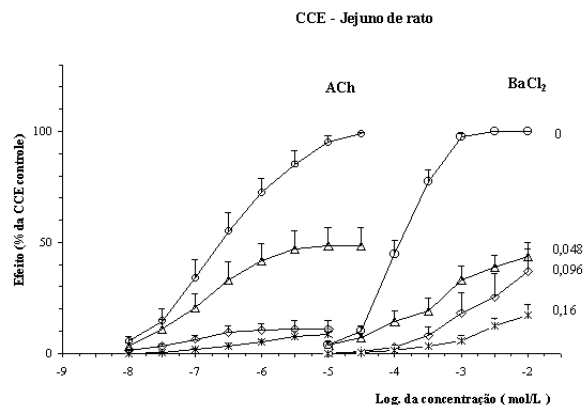
minações ± desvio padrão). O valor do resíduo seco é necessário para o cálculo das variáveis farmacológicas avaliadas. Para a realização dos experimentos, o EHEPR foi diluído para uma concentração de 16 mg/mL.

**Avaliação da resposta farmacológica de jejuno isolado de rata à acetilcolina e cloreto de bário frente ao extrato hidroetanólico de *Piper regnellii* DC (EHEPR)**

O EHEPR revelou-se um antagonista do tipo não-competitivo inespecífico, pois houve redução de efeito máximo para o cloreto de bário e para a acetilcolina, conforme pode-se observar na Figura 1. A realização de novas CCE controles após os experimentos demonstrou que o efeito provocado pelo EHEPR é parcialmente reversível em relação aos agonistas utilizados, já que não houve total recuperação do padrão inicial de contração.

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados encontrados para as variáveis farmacológicas analisadas: número de experimentos, os valores de afinidade do agonista ( $pD_2$ ), dose efetiva 50% ( $DE_{50}$ ), efeito máximo ( $E_{máx}$ ) e redução de sensibilidade ( $\text{antilog } \Delta pD_2$ ) para acetilcolina e cloreto de bário, respectivamente. Foi observada diferença significativa para a redução do efeito máximo ocorrida nas concentrações de 0,048, 0,096 e 0,16 mg/mL para as CCE de cloreto de bário e acetilcolina. Apesar de diferença significativa ter ocorrido para os valores de  $pD_2$  na concentração 0,096 mg/mL nas CCE de acetilcolina, um antagonismo competitivo não pode ser evidenciado, pois a redução de sensibilidade não foi concentração-dependente. O parâmetro  $\rho$  mostrou-se significativamente diferente nas concentrações de 0,096 e 0,16 mg/mL, demonstrando que o EHEPR possui uma afinidade maior em relação à acetilcolina.

Os gráficos de Schild-modificado para o clo-



**Figura 1.** Curvas concentração-efeito de acetilcolina (ACh) e cloreto de bário ( $BaCl_2$ ) na presença de concentrações crescentes do EHEPR, representadas por curvas de  $BaCl_2$ . Os dados são expressos como média e as barras verticais representam o erro padrão da média. O número de experimentos para ACh e  $BaCl_2$  estão indicados nas Tabelas 1 e 2.

reto de bário e acetilcolina estão representados na Figura 2. Nos respectivos gráficos, estão expostos os parâmetros equação de reta que melhor representa os pontos, o coeficiente de correlação da mesma e os valores de CIEM50 calculados a partir das equações. Embora tenha ocorrido a diminuição significativa de  $E_{máx}$  e de  $pD_2$  para as CCE de cloreto de bário, o que caracterizaria um antagonismo do tipo misto, a análise do gráfico de Schild demonstrou que não ocorreu antagonismo do tipo competitivo.

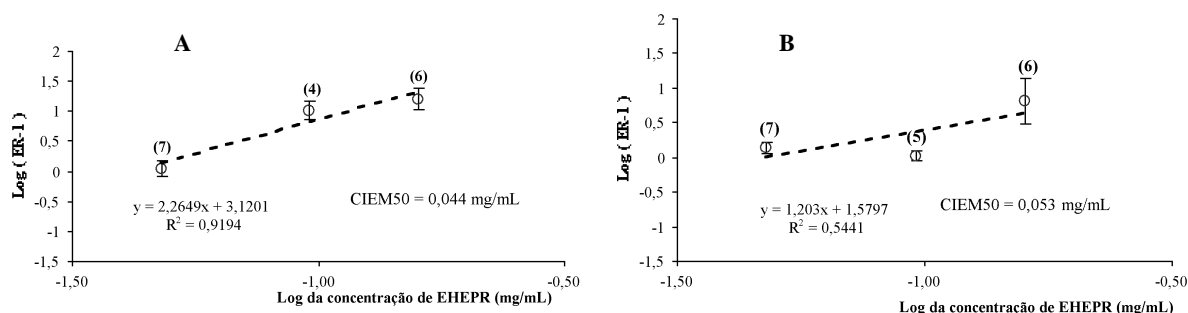
A análise da reta de regressão no gráfico de Schild-modificado reforça a conclusão de que houve maior atividade contra a ACh, uma vez que o coeficiente de correlação da reta para o  $BaCl_2$  não foi significativo ( $p < 0,05$ ), ao contrário do que ocorreu com o da ACh. Outra variável que deve ser analisada é o coeficiente linear (ou inclinação da reta). Entretanto, a teoria dos receptores estabelece que a inclinação deve ser unitária e só a reta de regressão calculada com o  $BaCl_2$  é que se aproxima deste valor. Pode-se

Concentração do EHEPR (mg/mL)	n	Acetilcolina				
		$E_{máx}$ (mm)	$DE_{50}$ (mol.L <sup>-1</sup> )	$pD_2$	Redução de sensibilidade	$\rho$ #
0 (Controle)	7	61,79 ± 5,46	3,5x 10 <sup>-7</sup>	6,45 ± 0,15	—	1,05 ± 1,12
0,048	7	30,71 ± 6,21*	1,4 x 10 <sup>-7</sup>	6,85 ± 0,20*	2,5*	1,13 ± 0,14
0,096	4	6,50 ± 2,56*	0,65 x 10 <sup>-7</sup>	7,21 ± 0,11*	5,75*	0,37 ± ,16*
0,16	6	4,83 ± 1,36*	5,7 x 10 <sup>-7</sup>	6,24 ± 0,18	1,6*	0,56 ± ,16*
Recuperação	8	13,38 ± 3,79*	6,9 x 10 <sup>-7</sup>	6,16 ± 0,36*	1,9*	0,46 ± ,09*

**Tabela 1.** Variáveis farmacológicas avaliadas em CCE cumulativas completas para a acetilcolina frente ao extrato hidroalcoólico de *Piper regnellii* DC (EHEPR). Os valores estão representados pela média dos experimentos ± epm. \* teste t-Student  $p < 0,05$ . #  $\rho = E_{máx}^{ACh} / E_{máx}^{BaCl_2}$ .

Concentração do EHEPR (mg/mL)	Cloreto de bário				
	n	E <sub>máx</sub> (mm)	DE <sub>50</sub> (mol.L <sup>-1</sup> )	pD <sub>2</sub>	Redução de sensibilidade
0 (Controle)	7	58,834 ± 48,85	1,41x 10 <sup>-4</sup>	3,85 ± 0,19	–
0,048	7	25,86 ± 2,72*	7,4 x 10 <sup>-4</sup>	3,27 ± 0,27*	5,2
0,096	4	17,25 ± 4,25*	13,2 x 10 <sup>-4</sup>	2,88 ± 0,29*	9,3
0,16	6	9,83 ± 2,6*	13,8x 10 <sup>-4</sup>	2,86 ± 0,18*	9,7
Recuperação	8	25,38 ± 3,70*	9,3 x 10 <sup>-4</sup>	3,03 ± 0,21*	6,6

**Tabela 2.** Variáveis farmacológicas avaliadas em CCE cumulativas completas para o cloreto de bário frente ao EHEPR. Os valores estão representados pela média dos experimentos ± epm. \* teste t-Student p < 0,05.



**Figura 2.** Gráficos de Schild-modificado para o EHEPR frente à acetilcolina (A) e ao cloreto de bário (B). As barras verticais representam o erro padrão da média (epm). Junto a cada ponto é apresentado o número de experimentos para aquela concentração.

sugerir que o(s) componente(s) responsável(is) pela atividade antagonista não-competitiva do extrato aquoso e do extrato hidroetanólico de *P. regnellii* atua melhor quando a contração do jejuno isolado de rata é provocada pela ACh do que pelo BaCl<sub>2</sub>.

## CONCLUSÕES

À partir dos resultados obtidos pode-se concluir que *Piper regnellii* DC, na forma de extração e concentrações estudadas, mostrou atividade antiespasmódica *in vitro* frente à acetilcolina e cloreto de bário em jejuno de ratas, através de um antagonismo não-competitivo. O efeito espasmolítico revelou-se mais importante em relação às CCE de acetilcolina e esta ação não foi totalmente revertida após uma única lavagem da preparação. Desta forma, o uso desta espécie pela população para tratar distúrbios gastrointestinais é justificado, porém devido a inexistência de estudos de toxicidade acerca de *Piper regnellii* DC não há comprovação que esta utilização seja segura.

**Agradecimentos.** Os autores agradecem a Daniel Ruschel pelo auxílio prestado e caracterização do material vegetal e à Prof. Dra. Lillian Auler Mentz pela ajuda na identificação da espécie estudada.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Yuncler, T.G. (1972) *Hoehnea* **2**: 19-336.
- Barros, S.B.M.; D.S. Teixeira; A.E. Aznar; J.A.M. Moreira Jr; I. Ishii & P.C.D. Freitas (1996) *Free Radical Res. Latin Amer.* **48**: 114-6.
- De Albuquerque, J.M. (1989) "Plantas Mediciniais de Uso Popular", ABEAS, Brasília, pág. 21.
- Hammer, M.L.A. & E.A. Johns (1993) *J. Ethnopharmacol.* **40**: 53-75.
- Holetz, F.B.; G.L. Pessini; N.R. Sanches; D.A.G. Cortez; C.V. Nakamura B. Prado Dias Filho (2002) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 1027-31.
- Constantin, M.B.; P. Sartorelli; R. Limberger; A.T. Henriques; M. Steppe; M.J.P. Ferreira; M.T. Ohara; V.P. Emerenciano & M.J. Kato (2001) *Planta Med.* **67**: 771-7.
- Benevides, P.J.C.; P. Sartorelli, & M.J. Kato (1999) *Phytochemistry* **52**: 339-43.
- Van Rossum, J.M. & F.G. Van Den Brink (1963) *Arch. Int. Pharmacodyn.* **143**: 240-6
- Furchgott, R.F. (1967) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **139**: 553-70.
- Da Silva, F.A.; P.R. Petrovick, & A. Langeloh (2001) *Acta Farm. Bonaerense* **20**: 47-52.
- Jurkiewicz, A., N.H. Jurkiewicz, G.S.G. Barros & J.R. Valle (1969) *Pharmacology* **2**: 89-99.
- Jurkiewicz, A., N.H. Jurkiewicz, G.S.G. Barros & J.R. Valle (1967) *Ciência e Cultura* **19**: 408.
- Ariens, E.J. & J.M. Van Rossum (1957) *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **110**: 275-9.