Avaliação da Capacidade Antioxidante dos Extratos de Graviola (*Annona Muricata*) e Suas Frações

Autores

Cibeli Ferelli

Orientador

Maria de f tima Nepomuceno Dedalo

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

Inúmeras pesquisas têm relacionado os radicais livres como fator de grande importância em processos fisiopatológicos como câncer, lesões auto imunes, processos inflamatórios, doenças cardiovasculares, processos neurodegenerativos, doença de Parkinson, mal de Alzheimer entre outros (HALLIWELL & GUTERIDGGE, 1989; ARUOMA, 2003). Os organismos aeróbios possuem defesas antioxidantes que visam compensar os efeitos deletérios associados à constante formação dessas espécies reativas de oxigênio oriundas da presença e utilização do oxigênio nos seus tecidos (WILHELM FILHO *et al.*, 2001). Além da proteção endógena contra o estresse oxidativo, a inclusão de antioxidantes vindos da dieta é de extrema importância, uma vez que o consumo de frutas e vegetais está relacionado com a diminuição do risco do desenvolvimento de doenças associadas ao acúmulo de radicais livres (POMPELLA, 1997). A atividade antioxidante dos vegetais deve-se a presença de compostos fenólicos, especialmente os flavonóides. Estudos revelam que uma dieta rica em polifenóis previne uma série de doenças. O interesse pelos antioxidantes naturais teve início diante da comprovação de efeitos maléficos causados por doses elevadas de BHT, BHA e t-BHQ (t-butil hidroquinona) sobre o peso do fígado e marcada proliferação do retículo endoplasmático, entre outras (DURÁN & PADILLA, 1993).

Pesquisas indicam que a graviola possui um novo grupo de fitoquímicos denominados acetogeninas anonáceas. As acetogeninas anonáceas atuam através da depleção dos níveis de ATP ao inibir o complexo I na cadeia de transporte de elétrons nas mitocôndrias, e inibindo a NADH oxidase do plasma de membranas principalmente de células tumorais (ALALI *et al.*, 1999) uma vez que essas células possuem uma alta demanda de ATP (ZAFRA-POLO *et al.*, 1996).

2. Objetivos

O objetivo desse projeto foi avaliar a capacidade antioxidante do extrato de graviola (*Annona muricata*). A atividade antioxidante foi avaliada utilizando diferentes metodologias tais como: determinação do conteúdo fenólico total; capacidade de reduzir radicais estáveis (ABTS); avaliação da peroxidação lipídica (TBARS); análise da capacidade de seqüestrar os radicais hidroxila, de seqüestrar íons FeIII e atividade pró-oxidante; capacidade de seqüestrar íons ferro; capacidade redutora do ferro; capacidade de seqüestrar o anion

superóxido e o peróxido de hidrogênio, com o objetivo de obter um melhor entendimento do mecanismo de ação do extrato da graviola como substância antioxidante.

3. Desenvolvimento

Utilizaram-se as frações metanólica e acetato de etila do extrato das folhas de graviola em concentrações distintas (dependendo do experimento realizado).

3.1 Determinação do conteúdo fenólico total: Determinou-se o conteúdo de compostos fenólicos através do reagente de Folin-Ciocalteu, como o equivalente em ácido gálico e a absorvância foi determinada a 725 nm.

3.2 Determinação de cinética de redução do ABTS: O ABTS FORMA UM RADICAL ESTÁVEL E SUA DECOMPOSIÇÃO PELO EXTRATO FOI ACOMPANHADA ESPECTROFOTOMETRICAMENTE A 660 NM. A CAPACIDADE ANTIOXIDANTE FOI CALCULADA A PARTIR DO TEMPO ZERO E EXPRESSA COMO IA% (ÍNDICE DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE). PARE EFEITO DE COMPARAÇÃO UTILIZOU-SE O TROLOX, UM ANTIOXIDANTE CLÁSSICO.

3.3 Avaliação da peroxidação lipídica: o ácido tiobarbitúrico forma complexos de cor avermelhada com aldeídos de baixa massa molecular (um dos produtos finais da oxidação lipídica derivados da decomposição dos hidroperóxidos), entre eles o malondialdeído (MDA). Esses complexos podem ser determinados espectrofotometricamente a 534nm.

3.4 Análise da Capacidade de Seqüestrar os Radicais Hidroxila, Capacidade de Seqüestrar íons FeIII e Atividade Pró-Oxidante dos Extratos: a desoxirribose pode ser oxidada pelo ferro na presença do ascorbato, pela geração do radical hidroxila e formar malondialdeído, que ao reagir com o ácido tiobarbitúrico forma complexos coloridos que são determinados espectrofotometricamente a 532 nm. Na presença de extratos esse radical hidroxila pode ser seqüestrado. Com essa mesma metodologia, omite-se do meio reacional o EDTA e pode-se avaliar a capacidade do extrato de quelar íons ferro. Na ausência de ascorbato pode-se determinar a atividade pró-oxidante dos extratos.

3.5 Capacidade de Seqüestrar Ferro: foram utilizados tubos de ensaio contendo as concentrações desejadas de cada extrato de graviola na fração acetato, adicionando a cada tubo, 1,0mL de FeSO₄

e 100 µ L de solução de Ferrozina e a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 562 nm. A porcentagem de inibição do complexo formado foi dada pelo IA% (índice de atividade antioxidante).

3.6 Capacidade Redutora do Ferro: Em diferentes alíquotas do extrato da graviola, foram adicionados 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,6 e ferrocianeto de potássio [K₂Fe(CN)₆] 1%. A mistura foi incubada por 20 minutos à 50°C. Após incubação, foi adicionado 0,5 mL de TCA 10% e a mistura foi centrifugada por 10 minutos em alta velocidade (3000 rpm). Para leitura, retirou-se o sobrenadante da mistura (0,5 mL), adicionou-se 2,0 mL de água destilada mais 50 µL de FeCl₃ a 0,1%. A absorvância foi determinada a 700nm.

3.7 Capacidade de Seqüestrar Peróxido de Hidrogênio: em diferentes concentrações, foram adicionados 800µL de extrato + tampão seguido de 100µL de água destilada mais 100 µL de H₂O₂ a 0,002%. Os tubos foram incubados por 10 minutos á 37°C, adicionou-se 1,0 mL da solução de Vermelho de

Fenol (sal sódico) 7,5mM com HPRase (Horseradish peroxidase) 0,5M na proporção de 2 para 1. Após Incubação á temperatura ambiente por 15 minutos e adição de 50µL de NaOH 1,0M, agitou-se os tubos e realizou-se a leitura a 576 nm; utilizando como branco a solução tampão.

3.8 Capacidade de seqüestrar o ânion superóxido: o ânion superóxido foi gerado à partir do sistema xantina/xantina oxidase e determinada pelo método de redução do tetrazolium nitroblue (NBT). . A absorbância foi determinada à 560 nm. A porcentagem de decomposição de superóxido foi calculada comparando-se os resultados obtidos com os extratos com os controles oxidativos (ausência dos extratos).

4. Resultados

Na determinação do conteúdo fenólico total observou-se que a concentração de 1,0 mg/mL apresentou 0,143 mg/mL de compostos fenólicos, o que representa cerca de 14%.

O extrato acetato da graviola não apresentou atividade antioxidante significativa na decomposição do radical de ABTS quando comparado ao Trolox (antioxidante clássico), pois o máximo valor do índice de atividade antioxidante ficou em torno de 10% para todas as concentrações do extrato.

A fração acetato do extrato de folhas de graviola apresentou atividade em sequestrar a radical hidroxila sendo que a capacidade é dependente da concentração, na concentração de 0,25 mg/mL observou-se o melhor resultado, cerca de 50% de índice de atividade antioxidante (IA%), nas concentrações mais altas, observa-se uma diminuição na atividade. O extrato acetato de folhas de graviola apresentou atividade de quelar os íons ferro em todas as concentrações do extrato, sendo que a partir de 0,10 mg/mL o índice de atividade (IA%) é de cerca de 80%. O extrato acetato apresentou ainda, atividade pró-oxidante, o resultado é também dependente da concentração sendo que na concentração mais baixa utilizada aqui observou-se 50% de índice de atividade.

Pode-se observar que o extrato acetato apresentou um pequeno efeito na capacidade de sequestrar o radical superóxido, com valor de cerca de 15% na concentração de 0,5 mg/mL. Em concentrações maiores não se observou efeito.

O extrato acetato apresentou ainda capacidade redutora significativa, mesmo em baixas concentrações.

Em nenhuma das concentrações utilizadas o extrato apresentou capacidade de sequestrar o H_2O_2 , todos os valores de absorbância obtidos foram semelhantes ao observado para o controle, na ausência do extrato.

Avaliou-se o efeito do extrato metanólico na peroxidação lipídica induzida por peróxido de hidrogênio (2,5 mM) e pode-se observar que nas concentrações de 0,25 e 0,50 mg/mL o extrato apresentou efeito protetor significativo (cerca de 60%) contra a peroxidação lipídica induzida.

5. Considerações Finais

Após realização dos experimentos e tratamento estatístico dos dados obtidos foi possível observar que o extrato de graviola na fração acetato apresentou cerca de 14% de compostos fenólicos, baixa atividade na decomposição do radical estável de ABTS, capacidade de seqüestrar o radical hidroxila em baixas concentrações (0,10-0,50 mg/mL), capacidade de quelar os íons férricos, atividade pró-oxidante, baixas capacidade de seqüestrar os radicais superóxido, atividade redutora e não apresentou capacidade de seqüestrar o peróxido de hidrogênio. O extrato metanólico apresentou efeito protetor na peroxidação lipídica induzida por peróxido de hidrogênio principalmente nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg/ml quando o indutor da peroxidação foi o peróxido de hidrogênio, devido semelhança de polaridade.

Referências Bibliográficas

ALALI, F. Q. et al. Annonaceous acetogenins: recent progress. **J. Nat. Prod.** 62 (3):504-540, 1999.

ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potencial antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research.** 523-524: 9-20, 2003.

DURÁN, R.M.; PADILLA, R.B. Actividad antioxidant de los compuestos fenólicos. **Grasas y Aceites.**, v. 44, n. 2, p. 101-106, 1993.

HALLIWELL, B & GUTTERIDGE. **Free radicals in biology and medicine.** New York: Oxford University. 1999.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of vitamin and nutrition Research.**,67(5): 289-297, 1997.

WILHELM FILHO, D. et al. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: Importância e prespectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A., CALIXTO, J. B. (editores). **Plantas Medicianais: sob a ótica da química medicinal moderna.** Argos Editora. p. 319-334, 2001.