

Avaliação da Capacidade Antioxidante do Extrato de Pau D'arco (*Tabebuia Avelanadae*) e Suas Frações

Autores

Guilherme Mei Silva

Orientador

Ana Celia Ruggiero

Apoio Financeiro

Fapic

1. Introdução

Inúmeras pesquisas têm colocado os radicais livres como fator primordial em diferentes processos degenerativos que levam ao envelhecimento celular e a várias doenças como: câncer, esclerose múltipla, doença de Parkinson, mal de Alzheimer, lesões auto imunes, processos inflamatórios, demência senil (HALLIWELL & GUTERIDGGE, 1989). Entretanto, os organismos aeróbios, incluindo os seres humanos, possuem defesas antioxidantes que os protegem contra o dano oxidativo, além de enzimas de reparo e sistemas capazes para a remoção de moléculas que sofreram o ataque oxidativo. Esse mecanismo de ação contra os radicais livres nem sempre é tão eficiente, sendo assim uma dieta rica em frutas e vegetais podem evitar doenças cardiovasculares, câncer, diabetes e ainda retardar o processo de envelhecimento, devido à presença de antioxidantes (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999; ROSS & KASUM, 2002). Antioxidantes e fibras adicionadas na dieta humana têm demonstrado ser os principais nutrientes responsáveis por esses efeitos protetores. Os antioxidantes são compostos aromáticos que contém pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT), ou ainda podem ser naturais, possuindo substâncias bioativas tais como organosulfurados, fenólicos e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos alimentos (KITTS, 1994). A ação desses antioxidantes não se restringe somente à inibição da peroxidação lipídica, mas também da oxidação de outras moléculas, como por exemplo, as proteínas e o DNA (MELO & GUERRA, 2002).

2. Objetivos

O objetivo desse projeto foi avaliar a capacidade antioxidante de frações dos extratos de *Tabebuia avellanadae*, conhecida popularmente como Pau d' arco ou ipê-roxo. Diferentes técnicas foram utilizadas buscando identificar o mecanismo da atividade antioxidante das frações dos extratos de ipê roxo como: avaliação da peroxidação lipídica (TBARS); capacidade de reduzir radicais estáveis de ABTS; capacidade de seqüestrar o radical hidroxila; atividade pró-oxidante e capacidade de seqüestrar íons FeIII dos extratos; capacidade de reduzir FeIII a FeII; capacidade de seqüestrar peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e capacidade de seqüestrar o radical ânion superóxido.

3. Desenvolvimento

Com a utilização de diferentes concentrações da fração metanólica da casca de ipê roxo, desenvolveu –se as seguintes metodologias: 3.1 Avaliação da peroxidação lipídica: O ácido tiobarbitúrico (TBA) reage com aldeídos (produto da oxidação lipídica na decomposição do hidroperóxido) formando complexos de cor avermelhada, entre eles o malondialdeído (MDA). Esses complexos podem ser determinados

espectrofotometricamente a 535nm. Tanto para TBARS com indutor hidroperóxido de cumeno quanto peróxido de hidrogênio. 3.2 Determinação de cinética de redução do ABTS: A geração do radical catiônico de ABTS [ácido 2,2-azinobis-(etilbenzotiazolona)-6 sulfônico] é a base para um dos métodos mais sensíveis que tem sido aplicado para a determinação da capacidade antioxidante em diferentes sistemas, como fluidos biológicos, extratos de alimentos e compostos puros. Esse radical é estável e sua decomposição, pelo extrato, foi determinada espectrofotometricamente a 660 nm. O extrato metanólico de casca de ipê roxo foi avaliado no tempo inicial e no final da reação, após 10 minutos. Calculou-se a porcentagem de redução da absorbância (IA%) em relação à absorbância na ausência do extrato. Para efeito de comparação utilizou-se o TROLOX (antioxidante comercial com propriedades antioxidantes conhecida). 3.3 Análise da Capacidade de seqüestrar os radicais hidroxila, Capacidade de seqüestrar íons FeIII e Atividade pró-oxidante dos extratos: A capacidade de seqüestrar o radical hidroxila foi avaliada utilizando-se a desoxirribose, que sofre oxidação pelo radical gerado e produz malondialdeído (MDA). Nessa metodologia o radical hidroxila é gerado pela reação do ascorbato com os íons ferro e este reage com a desoxirribose. Na ausência de EDTA, quelante de íons metálicos, pode avaliar a capacidade quelante dos extratos e, quando realizado na ausência de ascorbato, o potencial pró-oxidante do extrato pode ser avaliado. Utilizando-se outra metodologia, com a ferrozina como indicador da atividade de seqüestrar os íons férricos, todas determinados espectrofotometricamente a 532nm. 3.4 Capacidade redutora do ferro: As diferentes concentrações do extrato da casca de pau d' arco, adicionou-se 0,5 mL de tampão fosfato 0,2 M pH 6,6 e ferrocianeto de potássio [K₂Fe(CN)₆] 1%, após a mistura incubou por 20 minutos à 50°C. Em seguida, foi adicionado 0,5 mL de TCA 10% e a mistura foi centrifugada por 10 minutos em alta velocidade (3000 rpm). A leitura, foi realizada apenas com o sobrenadante da mistura (0,5 mL), adicionando-se 2,0 mL de água destilada e 50 µL de FeCl₃ a 0,1% e determinada a 700nm. A capacidade de doar elétrons para o íon férrico e reduzi-lo a íons Fe II é também um dos mecanismos dos antioxidantes uma vez os íons férricos são catalisadores da produção de espécies radiculares. Dessa forma, a capacidade redutora do extrato de casca de pau d' arco foi avaliada. 3.5 Capacidade de seqüestrar peróxido de hidrogênio: Nas diferentes concentrações, foi adicionado 800µL de extrato + tampão seguido de 100µL de água destilada e 100 µL de H₂O₂ a 0,002%. Os tubos foram levados à incubadora por 10 minutos à 37°C e 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. Os tubos foram Incubados à temperatura ambiente por 15 minutos e adicionado 50µL de NaOH 1,0M. Agitou-os e foram realizadas as leituras a 576 nm. 3.6 Capacidade de seqüestrar o ânion superóxido: O método para determinar a capacidade de seqüestrar o ânion superóxido foi avaliado através do sistema xantina/xantina oxidase, que gera o ânion superóxido, uma das espécies reativas de oxigênio (EROS). Determinou-se a capacidade de sequestrar o radical através da redução do tetrazolium nitroblue (NBT). A absorbância foi determinada à 560nm. A porcentagem de decomposição foi calculada comparando-se os resultados obtidos com os extratos com os controles oxidativos (ausência dos extratos).

4. Resultados

O extrato metanólico apresentou efeito protetor significativo contra a peroxidação lipídica induzida apenas nas concentrações mais baixas, ou seja, cerca de 40 % nas concentrações de 0,05 e 0,10 mg/mL e em concentrações mais altas, o efeito foi menor. Na concentração de 0,50 mg/mL o valor observado chegou próximo do zero, indicando que nessa concentração não há mais efeito protetor. Quando a peroxidação foi induzida por peróxido de hidrogênio o extrato não apresentou atividade, onde as absorbâncias possuem valores próximos, cerca de 0,100. O extrato metanólico apresentou significativa atividade antioxidante avaliada pela decomposição do radical estável de ABTS e a concentração do extrato. O TROLOX é freqüentemente utilizado como padrão, por ser um antioxidante clássico. O extrato na concentração de 1,0 mg/mL apresenta atividade antioxidante semelhante à do TROLOX na concentração de 10 mM. o extrato metanólico de casca de pau d' arco não apresentou capacidade de seqüestrar os radicais OH⁻, pois as absorbâncias mantiveram-se maiores que a do controle para todas as concentrações do extrato. Por outro lado, ao avaliar-se a capacidade pró-oxidante do extrato observa-se um aumento na absorbância, o que caracteriza esse potencial. Esse efeito dependente da concentração. O extrato também não apresentou capacidade quelante, uma vez que as absorbâncias foram maiores que a obtida para o controle, zero, determinada na ausência do extrato. Com a ferrozina como indicador da atividade de seqüestrar os íons férricos comprovou-se que o extrato de casca de pau d'arco não apresentou atividade quelante, em

nenhuma das concentrações utilizadas. O extrato metanólico de casca de ipê-roxo apresentou capacidade redutora pois observou-se um aumento na absorvância. O extrato metanólico de ipê roxo não apresentou capacidade de seqüestrar o H₂O₂ e também não foi capaz de seqüestrar o radical ânion superóxido.

5. Considerações Finais

A partir dos resultados obtidos com o extrato de ipê roxo na peroxidação lipídica induzida por hidroperoxido de cumeno, pode-se concluir que houve proteção de 40% nas concentrações mais baixas (0,05 mg/mL e 0,10 mg/mL). Já para o teste de peroxidação lipídica com o indutor peróxido de hidrogênio não se observou proteção. Na decomposição do radical de ABTS a fração metanólica do extrato de cascas de pau d'arco apresentou capacidade antioxidante nas concentrações mais elevadas, atingindo cerca de 70% de proteção para a concentração de 2,0 mg/mL. Na concentração de 1,0 mg/mL a capacidade antioxidante do extrato é equivalente a 10 mM de TROLOX. O extrato não apresentou capacidade de seqüestrar os radicais hidroxila e ânion superóxido, de seqüestrar o peróxido de hidrogênio e nem apresentou atividade como quelante. Observou-se atividade redutora e em concentrações mais elevadas, capacidade pró-oxidante. Dessa forma pode-se concluir que os componentes do extrato metanólico de casca de pau d'arco atuam como antioxidante reduzindo os radicais formados.

Referências Bibliográficas

HALLIWELL, B & GUTTERIDGE. Free radicals in biology and medicine. New York: Oxford University. 1999.
HALLIWELL, B. GUTTERIDGE, J.M. Superoxide and hydrogen peroxide in mitochondria. In: Free Radicals in Biology. New York, Academic V.5, p. 65-77, 1989. KITTTS, D.D. Bioactive substance in food: identification and potencial use. Canadia Journal of the Physiology and Pharmacology, v. 72, p. 423-434, 1994. MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. In: Boletim da Sociedade Brasileira de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas. v. 36(1), p. 1-11, 2002. ROSS, J.A.; KASUM.C.M. Dietary Flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety. Ann. Rev. Nutr. 22:19-34, 2002.