

# CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *PF AFFIA GLOMERATA* (SPRENG.) PEDERSEN: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE EXTRATOS DE FOLHAS, FLORES E RAIZ

Zaiane Meneses Camillo<sup>1</sup>; Tiago Rodrigues<sup>2</sup>

Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: zaiane\_camillo@yahoo.com.br<sup>1</sup>

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: tiagorod@yahoo.com.br<sup>2</sup>

**Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética**

**Palavras-chave: *Pfaffia glomerata*; Espécies Reativas de Oxigênio; Mitocôndrias**

## INTRODUÇÃO

Medicamentos fitoterápicos são aqueles elaborados exclusivamente à base de extratos vegetais. Sua elaboração é de grande importância na área farmacêutica visto que as substâncias ativas presentes nestes produtos podem também ser utilizadas como fonte de modelos para novos fármacos (SCHENKEL *et al*, 2001).

O gênero *Panax* (família *Araliaceae*), tradicionalmente conhecido como ginseng asiático, é um dos mais descritos na literatura atualmente. Diferentes espécies também denominadas de ginseng, entre elas *Panax ginseng* C. A. Meyer, *Panax quinquefolius* e *Eleutherococcus senticosus* encontram-se distribuídas na Coreia, América do Norte e Sibéria, respectivamente (KIEFER & PANTUSO, 2003).

No Brasil, o uso do ginseng asiático vem sendo substituído, nos últimos anos, pelas espécies da família *Amaranthaceae*, em particular, aquelas do gênero *Pfaffia ssp.*, como a *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen, *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze, *Pfaffia eresinoides* Sprengel. Entretanto, existem poucos estudos científicos sobre as plantas do gênero *Pfaffia*, também conhecido como ginseng brasileiro (RATES *et al*, 1993).

O ginseng brasileiro tem sido empregado como tônico, cicatrizante, para o aumento de apetite, redução das perturbações do sono, melhora da memória, aumento de ânimo, melhora na turgescência superficial da pele (MARQUES *et al*, 2004). Além disso, há relatos do uso em pacientes com Diabetes Mellitus, distúrbios gastrintestinais, labirintites, reumatismo, artrite e úlcera varicosa (OTOFUJI, 2005; ZIMMER *et al*, 2006).

Estudos realizados mostram que a *Pfaffia glomerata*, promove melhora significativa na memória declarativa e de curto prazo e na memória de voluntários idosos tratados (SOUZA *et al*, 1997; MARQUES *et al*, 2004).

Em condições fisiológicas, a mitocôndria produz de 1 a 2 % de EROs, e esta possui um eficiente sistema de defesa antioxidante composto por superóxido dismutase, (SOD), glutatona peroxidase (GPx), glutatona redutase (GRd), glutatona reduzida (GSH) e NAD(P)H.

Entretanto, em algumas situações, a geração de EROs pode estar aumentada o suficiente para superar a capacidade de defesa antioxidante e/ou essa capacidade pode estar diminuída. Assim, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que normalmente seria eliminado, acumula-se e na presença de Fe<sup>2+</sup> dando origem ao radical hidroxil (OH<sup>•</sup>). As EROs podem atacar macromoléculas biológicas induzindo a oxidação de lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, levando a uma situação conhecida como estresse oxidativo, ocorrendo a perda de seletividade da membrana mitocondrial interna .

Uma vez que diversas patologias, tais como, câncer, diabetes, infarto do miocárdio, doenças neurodegenerativas, envelhecimento, entre outras, contam com o envolvimento de EROs gerados pelas mitocôndrias, o estudo das propriedades antioxidantes de substâncias extraídas de plantas é extremamente importante para a avaliação do seu potencial farmacológico e possível desenvolvimento de um produto com aplicação na saúde humana ou animal.

## OBJETIVOS

Neste projeto decidimos investigar a atividade antioxidante contra o estresse oxidativo induzido por  $\text{Fe}^{2+}$  de outras partes da planta que, em teoria, devem apresentar maior quantidade de metabólitos secundários, como folhas e flores, uma vez que, ao contrário dos resultados da literatura que demonstram que o extrato da raiz de *Panax ginseng* apresenta atividade antioxidante, nossos resultados demonstraram que, embora o extrato hidroalcoólico da raiz de *P. glomerata* apresente pequena atividade quelante de  $\text{Fe}^{2+}$  e pequena atividade *scavenger* de radical livre estável DPPH, o mesmo não foi capaz de proteger lipídeos da membrana mitocondrial de danos oxidativos induzidos por  $\text{Fe}^{2+}$ /citrato.

## METODOLOGIA

O extrato de raiz foi obtido pelo método de maceração seguido de liofilização. Os extratos de folhas e flores foram obtidos pelo método de percolação fracionada (Brazilian Pharmacopoeia) e considerada 100%. As mitocôndrias isoladas de fígado de rato foram obtidas por centrifugação diferencial e a quantificação de proteínas foi feita pelo método do Biureto (CAIN & SKILLETER, 1987). Oxidação lipídica foi avaliada com o uso ácido tiobarbitúrico (TBARS) para determinação do MDA (BUEGE & AUST, 1978) e atividade *scavenger* foi testada pela redução de DPPH.

Avaliamos a atividade quelante do íon  $\text{Fe}^{2+}$  pelo uso de ácido dissulfônico da batofenantrolina (BPS).

A quantificação de fenóis totais foi realizada a partir de uma solução de derivados fenólicos de acordo com o método Folin-Ciocalteu e os flavonóides foram determinados espectrofotometricamente. A análise estatística foi realizada utilizando o software Microcal Origin 6.0 (Microcal™ Software, Inc).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho realizamos um estudo comparativo entre extratos de folhas, flores e raiz da *Pfaffia glomerata*. Foi avaliado se os extratos da *Pfaffia glomerata* possuem atividade *scavenger* de radicais livres, utilizando o ensaio de redução do DPPH, que é um radical livre por possuir um elétron desemparelhado, mas é estável em soluções etanólicas, absorvendo luz na região de 520 nm. Quando a molécula de DPPH é reduzida pela presença de substâncias com atividade *scavenger* ela deixa de absorver luz neste comprimento de onda, sendo que a diminuição da sua coloração característica é proporcional a sua redução. Neste ensaio foi utilizado como padrão o quercetin, um flavonóide clássico descrito em estudos antioxidantes na literatura (DORTA *et al*, 2005; SANTOS *et al*, 1998).

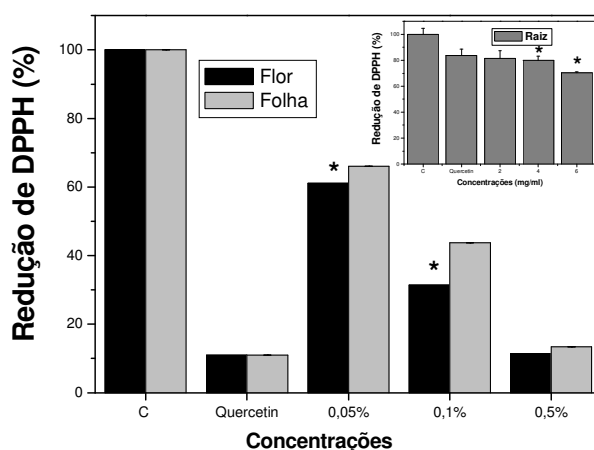
Como pode ser observado na Fig. 1, os extratos de folhas, flores e raiz de *Pfaffia glomerata* foram capazes de reduzir de forma concentração-dependente o DPPH demonstrando que os extratos possuem atividade *scavenger* de radicais livres, porém apenas os extratos glicólicos de folhas e flores, ambos na concentração de 0,5% apresentaram atividade *scavenger* semelhante ao quercetin 10  $\mu\text{mol/L}$ , que possui potente atividade *scavenger* já descrita na literatura. O extrato da raiz apresentou baixa

atividade *scavenger* apenas nas maiores concentrações testadas (4 e 6 mg/ml), não se mostrando um bom *scavenger* de radicais DPPH.

A lipoperoxidação (LPO) da membrana mitocondrial é um dos principais danos oxidativos a macromoléculas biológicas provocadas por EROs, levando a perda da morfologia e da função da membrana. São formados diversos produtos derivados da oxidação dos lipídeos de membrana, sendo que esses produtos podem ser quantificados usando o ácido tiobarbitúrico (TBA) como indicador de danos oxidativos a lipídeos causados por EROs. Os extratos de folhas e flores de *Pfaffia glomerata* foram capazes de inibir a lipoperoxidação da membrana mitocondrial induzida por  $Fe^{2+}$ /citrato, sendo que o extrato da folha da *P. glomerata* apresentou maior inibição a lipoperoxidação em relação ao das flores. No entanto, o extrato da raiz não apresentou atividade inibitória significativa. Uma vez que foi observada pequena atividade redutora de DPPH com o extrato da raiz, uma hipótese possível para a ausência do efeito protetor sobre a lipoperoxidação, é que as substâncias presentes no extrato da raiz de *P. glomerata* com possível atividade *scavenger* de radicais livres possuam caráter hidrofílico, não se particionando adequadamente nas membranas mitocondriais que formam um ambiente relativamente hidrofóbico.

Como o indutor de estresse oxidativo utilizado neste projeto foi  $Fe^{2+}$ /citrato, foi avaliado se os extratos de *P. glomerata* foram capazes de quelar  $Fe^{2+}$ , impedindo assim que este catalise reações tipo Fenton. A quantificação de  $Fe^{2+}$  foi feita por um método colorimétrico utilizando um indicador específico para íons ferroso, a batofenantrolina (BPS), quando coordenada a este apresenta absorção em 530 nm. Assim, um ensaio competitivo entre BPS e os extratos pela ligação com  $Fe^{2+}$  foi realizado. Os extratos de folhas, flores e raiz foram capazes de diminuir a absorbância em 530nm da batofenantrolina (BPS) incubada com 50  $\mu$ M de  $Fe^{2+}$  em relação ao controle na ausência dos extratos, indicando que os extratos de *Pfaffia glomerata* são capazes de quelar  $Fe^{2+}$ . Porém os extratos de folhas e flores apresentaram maior atividade quelante de  $Fe^{2+}$  em relação à raiz que apresentou uma pequena atividade quelante de  $Fe^{2+}$ , o que está de acordo com a sua fraca capacidade em inibir a LPO.

Os flavonóides são metabólitos secundários produzidos por algumas plantas com reconhecida atividade antioxidante (DORTA *et al*, 2005; MARTÍNEZ-FLORES, 2002). A quantificação de fenóis e flavonóides revelou que os extratos das folhas, flores apresentam grandes quantidades dessas substâncias, o que explica de certa forma atividade *scavenger* observada. Porém a raiz não apresentou quantidades significativas dessas substâncias o que explica sua pequena atividade *scavenger*.



**Fig. 1 – Redução do DPPH induzida pelos extratos de folhas, flores e raiz de *P. glomerata*.** Diferentes concentrações dos extratos foram incubadas em 1,5 mL de tampão acetato de sódio 40 mmol/L pH 5,5, 1,0 mL de etanol absoluto e 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 0,1 mmol/L a 30°C. C: controle (ausência do extrato), QUER controle positivo: (quercetin 10µmol/L). As concentrações dos extratos de folhas e flores da *P. glomerata* estão representadas na figura em % (em relação ao extrato bruto considerado como 100%) e as concentrações do extrato da raiz de *P. glomerata* estão representadas no enxerto em mg/ml (liofilizado) ou % (em relação ao extrato bruto). \* Significativamente diferente do controle (C) (P<0,05).

## CONCLUSÕES

Os resultados parciais obtidos até o momento indicam que os extratos glicólicos de folhas e flores de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen possuem significativa atividade antioxidante, pois inibiu a oxidação de lipídeos de membrana mitocondrial dos danos oxidativos induzidos por Fe<sup>2+</sup>/citrato devido a uma somatória de mecanismos (atividade *scavenger* de radicais livres e quelante de Fe<sup>2+</sup>), porém o extrato da raiz de *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen embora possua pequena atividade *scavenger* de DPPH e quelante de Fe<sup>2+</sup>, não é capaz de proteger lipídeos da membrana mitocondrial dos danos oxidativos induzidos por Fe<sup>2+</sup>/citrato.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

OTOFUJI, G.M. Vias Envolvidas No Mecanismo De Ação Do Efeito Gastroprotetor Das Raízes Da *Pfaffia Glomerata* (Spreng) Pedersen. 2005. 167f. Dissertação (Mestrado Em Farmacologia) – Setor De Ciências Biológicas, Universidade Federal Do Paraná, Curitiba.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Protection against oxidants in biological systems: The superoxide theory of oxygen toxicity. In: Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. Free Radical in Biological and Medicine. Clarendon Press, 1989, p.86.

CAIN, K.; SKILLETER, D. N. Preparation and use of mitochondria in toxicological research. In: SNELL, K.; MULLOCK, B. (eds.), *Biochemical Toxicology*, Oxford, IRL Press, p.217-254, 1987.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. Gleischer, S.; Packer, L. In: *Methods in Enzymology*, Academic press, New York, v. 52C, p. 302-310, 1978.

DORTA D.J.; PIGOSO A.A.; MINGATTO F.E.; RODRIGUES T.; PRADO I.M.; HELENA A.F.; UYEMURA S.A.; SANTOS A.C.; CURTI C. The interaction of flavonoids with mitochondria: effects on energetic processes. *Chem Biol Interact*, 15;152(2-3):67-78, 2005.