

ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DO ÓLEO DAS SEMENTES DE *Azadirachta indica*

Paloma Caroline Ribeiro¹; Tiago Rodrigues²

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: paloma_caroline88@hotmail.com¹
Professor da Universidade Federal do ABC; e-mail: trodrigues@umc.br²

Área de conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chaves: Óleo de Neem, Mitocôndria, Lipoperoxidação.

INTRODUÇÃO

Azadirachta indica (A. de Jussieu), popularmente conhecida como Neem ou Nim, é uma árvore de médio porte, da família Meliaceae. Originária da Índia e disseminada por todo o continente asiático e africano, atualmente seu cultivo estende-se por regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo. As primeiras pesquisas com *A. indica* foram estimuladas ao ser observado que esta planta mantinha-se intacta durante migrações destruidoras de gafanhotos nas regiões da África, despertando interesse científico sobre suas propriedades repelentes e inseticidas.

Esta planta, muito utilizada no sudeste asiático por mais de 2000 anos, destaca-se pelo seu amplo espectro de propriedades biológicas e terapêuticas, entre elas antiinflamatória, antipirética, analgésica, hipoglicemiante, imunoestimulante, fungicida, bactericida, antimalárica, eficaz no controle do câncer. Em 1942, o primeiro composto a ser isolado da *A. indica* foi a nimbina e hoje, mais de 135 compostos provenientes de diversas partes da planta são conhecidos.

Substâncias antioxidantes podem atuar retardando ou prevenindo a formação de radicais livres por meio de mecanismos enzimáticos ou não-enzimáticos, reduzindo os danos causados por esses compostos. Assim, o estudo da atividade antioxidante de extratos vegetais e substâncias isoladas a partir desses extratos é extremamente relevante e pode contribuir significativamente para o desenvolvimento de fitofármacos para prevenção e tratamento para muitas doenças.

Diversas atividades biológicas das folhas de Neem já foram reportadas, no entanto poucos estudos científicos foram conduzidos com o óleo das sementes, embora seja relativamente comum seu uso popular para redução da hiperglicemia. Uma vez que o diabetes mellitus está associado a disfunções e estresse oxidativo mitocondrial, neste trabalho investigamos os efeitos do óleo de Neem sobre mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

OBJETIVOS

Este estudo tem como objetivo estudar as propriedades antioxidantes do óleo da semente de *Azadirachta indica* A. de Jussieu em mitocôndrias isoladas de fígado de rato, para elucidar os mecanismos moleculares da ação antioxidante observada. Para a indução do estresse oxidativo, utilizaremos indutores de estresse oxidativo classicamente descritos na literatura, tais como Fe^{2+} e *t*-butil hidropéroxido (*t*-BOOH).

METODOLOGIA

O óleo da semente de *Azadirachta indica* foi adquirido comercialmente e é resultante da primeira prensagem a frio das sementes e filtrado em papel de filtro. Este óleo, considerado como 100%, foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) para utilização nos ensaios. 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). A lipoperoxidação foi avaliada através da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978). O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias energizadas foi analisado polarograficamente, a 30 °C, em um oxígrafo Hansatech (Hansatech Instr., Norfolk, Inglaterra) equipado com um eletrodo tipo Clark (Gilson Medical Eletronics, USA), e os parâmetros respiratórios foram determinados de acordo com CHANCE & WILLIANS (1956). O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) foi avaliado espectrofluorimetricamente utilizando a Rodamina 123 nos comprimentos de onda de 505 e 535nm, excitação e emissão respectivamente (IMBERTI *et al.*, 1993). A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada espectrofluorimetricamente utilizando 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) nos comprimentos de onda de 503nm de excitação e 529nm de emissão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Avaliamos os efeitos do óleo da semente de *Azadirachta indica* sobre a oxidação de lipídeos da membrana mitocondrial induzida por Fe^{2+} /citrato, com o objetivo de caracterizarmos sua atividade antioxidante. A lipoperoxidação é um fenômeno oxidativo que pode ocorrer devido ao ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs) à membrana mitocondrial. Uma forma de verificar a oxidação de lipídeos da membrana é quantificar substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que são aldeídos resultantes dos danos oxidativos ocorridos aos lipídeos. Assim, o estresse oxidativo foi induzido pela adição de Fe^{2+} /citrato à suspensão mitocondrial que é capaz de catalisar reação de Fenton na presença de ânions superóxido e peróxido de hidrogênio e peróxidos lipídicos, formando radicais hidroxil, altamente reativos. Como resultado, o óleo de Neem foi capaz de proteger a membrana mitocondrial de forma concentração-dependente da oxidação induzida por Fe^{2+} /citrato. Além disso, o óleo de Neem, na ausência de oxidante (Fe^{2+} /citrato), não é capaz de causar lipoperoxidação.

Uma das hipóteses que justificaria tal proteção baseia-se na idéia de que o óleo de Neem seja primeiramente oxidado, ao invés da membrana mitocondrial. Ou ainda, por ser um óleo, o óleo de Neem é composto, principalmente, por ácidos graxos, os quais, segundo dados da literatura, atuam como desacopladores (TERADA, 1990), levando a uma diminuição na geração de EROs.

Dessa forma, testamos os efeitos do óleo de Neem sobre a respiração mitocondrial, determinando o consumo de oxigênio pelas mitocôndrias isoladas de fígado de rato no estado basal (estado 4), energizadas com substrato respiratório de sítio II (succinato), na presença de inibidor de sítio I (rotenona). O resultado foi uma estimulação, de maneira concentração-dependente, do consumo basal de oxigênio após a adição do óleo de Neem, sugerindo um possível desacoplamento da fosforilação oxidativa.

Para comprovarmos essa hipótese, o efeito do óleo de Neem foi avaliado sobre o potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi$) utilizando um marcador fluorescente específico para mitocôndrias, a rodamina 123. Assim que elétrons são doados por substratos oxidáveis à cadeia respiratória ocorre formação de um gradiente eletroquímico e, simultaneamente, a rodamina 123 é captada, diminuindo, então, sua

emissão de fluorescência. Com isso, a formação do gradiente eletroquímico é indicado pela diminuição da fluorescência de rodamina 123, enquanto que a dissipação desse gradiente é representado pelo aumento da fluorescência. O óleo de Neem foi capaz de promover dissipação do potencial transmembrana, confirmando seu efeito desacoplador. Avaliamos também o comportamento do óleo de Neem sobre a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), utilizando como indicador da geração de EROs, a sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFDA). DCFDA é uma molécula capaz de atravessar facilmente as membranas biológicas, onde será hidrolisada por esterases liberando um composto não fluorescente (DCFH). Este composto, na presença de EROs, é rapidamente oxidado e transforma-se então em DCF, apresentando um alto rendimento quântico de fluorescência quando excitado em 503 nm. Dessa forma, a fluorescência observada aumenta proporcionalmente à produção de EROs pelas mitocôndrias. Neste ensaio, o óleo de Neem diminuiu, novamente, de forma concentração-dependente a geração mitocondrial de EROs.

Entretanto, na presença de soroalbumina bovina (BSA), conhecida por apresentar atividade quelante de ácidos graxos de cadeia longa, o estímulo do estado 4 respiratório pelo óleo de Neem é impedido e, também, seu efeito inibitório sobre a lipoperoxidação é parcialmente anulado, como pode ser observado na **Figura 1**.

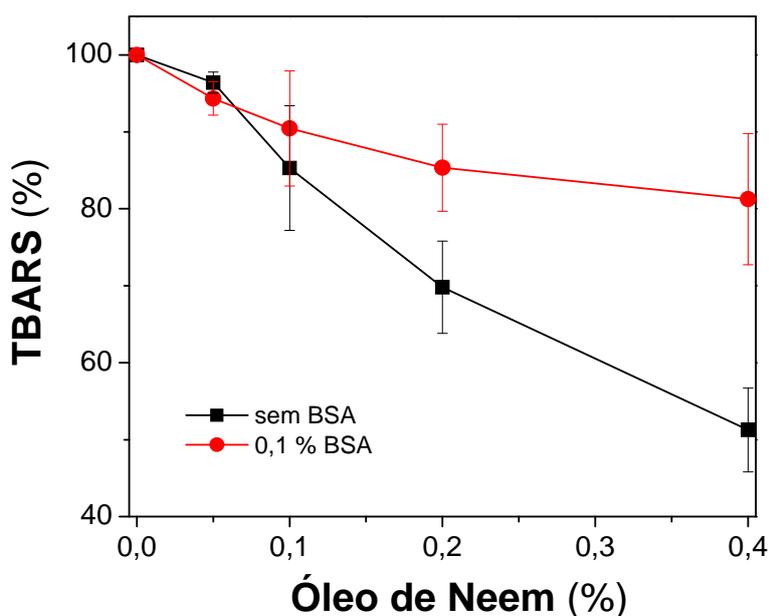


Fig. 1 Comparação da inibição da lipoperoxidação das membranas mitocondriais induzida por Fe^{2+} /citrato pelo óleo de Neem em presença e ausência de BSA 0,1%. A lipoperoxidação foi avaliada espectrofotometricamente através da formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) induzida por $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 50 μM /citrato 2 mM em tampão HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4; na presença e ausência de BSA 0,1%. O controle negativo (C -) foi conduzido na ausência de Fe^{2+} /citrato e óleo de Neem e na presença e ausência de BSA 0,1%, enquanto que o controle positivo (C +) foi avaliado com somente Fe^{2+} /citrato e presença e ausência de BSA 0,1%. A quantidade de TBARS determinada foi expressa em porcentagem.

CONCLUSÕES

O óleo da semente de Neem confere proteção aos lipídeos de membrana de mitocôndrias submetidas a condições de estresse oxidativo, sendo que esse efeito é promovido, pelo menos em partes, pelo desacoplamento provocado por ácidos graxos presentes no óleo, que reduz a geração de EROs mitocondrial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUEGE, J.A.; AUST, S.D.; GLEISCHER, S.; PACKER, L. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, v.52, p. 302-310, 1978.

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.

CHANCE, B.; WILLIAMS, G.R. The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Advances in enzymology and related subjects biochemistry*, v. 17, p. 65 – 134, 1956.

IMBERTI, R.; NIEMINEN, A-L.; HERMAN, B.; LEMASTERS, J.J. Mitochondrial and glycolytic dysfunction in lethal injury to hepatocytes by t-butylhydroperoxide: protection by fructose, cyclosporin A and trifluoperazine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, Baltimore, v. 265, p. 392-400, 1993.

TERADA, H. Uncouplers of Oxidative Phosphorylation. *Environmental Health Perspectives*, Tokushima, v. 87, p. 213-218, 1990.