

CARACTERIZAÇÃO DAS PROPRIEDADES ANTIOXIDANTES DE EXTRATOS GLICÓLICOS DE *AZADIRACHTA INDICA* EM MITOCÔNDRIAS ISOLADAS

Guilherme de Oliveira Lopes¹; Juliana Paiva²; Tiago Rodrigues³

Estudante do Curso de Ciências Biológicas; e-mail: guioliveira.lobes@yahoo.com.br¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: julianap@umc.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: trodrigues@umc.br³

Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chave: *Azadirachta indica*; Radicais Livres; Mitocôndria; Folhas; Extrato

INTRODUÇÃO

Historicamente, a medicina tem usufruído de produtos naturais como uma fonte virtualmente infinita para o tratamento de diversas moléstias e, apesar do grande avanço tecnológico que sobreveio no que diz respeito à síntese de substâncias com potencial farmacológico, estudos indicam que das 847 moléculas farmacologicamente ativas conhecidas, 5 % são extraídas diretamente de fontes biológicas, aproximadamente 27 % são derivadas destas fontes, as chamadas drogas semi-sintéticas e, das 572 restantes, 262 são moléculas sintéticas análogas às encontradas em plantas e outros organismos. Pesquisas sugerem que de todas as drogas prescritas atualmente, 25 % provenham exclusivamente de plantas, o que indica um potencial farmacológico sobressalente em relação a outros organismos, tais compostos utilizados pela indústria farmacêutica desempenham um papel fisiológico no metabolismo secundário das plantas, atuando como sinalizadores intercelulares e protegendo-as contra herbivoria e estresse oxidativo por irradiação intensa (NEWMAN & CRAGG, 2007).

Neem (*Azadirachta indica* A. Juss, Meliaceae) é uma planta de porte arbóreo originária da Índia onde é popularmente utilizada para o tratamento de diversas doenças. Dados da literatura mostram que as folhas de Neem são atóxicas e não-mutagênicas, além de possuir atividade anticarcinogênica supostamente por auxiliar os sistemas de defesa antioxidantes celulares (BISWAS *et al*, 2002).

A cadeia transportadora de elétrons na membrana mitocondrial é a principal fonte de ATP em células de mamíferos, fato pelo qual a torna essencial à vida. Durante a fosforilação oxidativa uma pequena fração de todo o oxigênio consumido pela mitocôndria sofre redução incompleta gerando radicais livres que podem atacar a própria organela, motivo pelo qual a mitocôndria é um excelente modelo para estudos de estresse oxidativo. Radicais livres são átomos ou moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados, seja no orbital atômico ou molecular. Podem ser classificados em espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs), sendo ambas produzidas durante o metabolismo celular normal. Ao serem formadas, estas espécies reativas reagem rapidamente com outro radical ou com outra molécula por vários mecanismos, sendo que a velocidade e a especificidade dessas reações dependem da concentração do radical, de sua reatividade e da localização do elétron desemparelhado (VALKO *et al*, 2007).

OBJETIVOS

Nossos estudos anteriores mostraram que o extrato propilenoglicólico das folhas de Neem possui potente antioxidante, por conta de uma somatória de sua capacidade *scavenger* de radicais livres e quelante de Fe^{2+} , impedindo que este íon catalize reações tipo Fenton. Assim, o objetivo deste trabalho é avaliar o potencial antioxidante de extratos das folhas de Neem obtidos com a utilização de solventes com diferentes polaridades, a fim de refinarmos os possíveis grupos de substâncias responsáveis por tal efeito

METODOLOGIA

Os extratos foram obtidos por percolação fracionada utilizando acetato de etila, metanol, hexano ou diclorometano como solventes. Todo o solvente foi então removido por evaporação em um sistema de baixa pressão para então se obter o extrato puro. A padronização do extrato foi feita pela dosagem de fenóis e flavonóides totais presentes, substâncias produzidas por plantas em geral e que desempenham papéis fisiológicos, entretanto estão sujeitas a variações nas concentrações circulantes por conta de fatores ambientais como o clima, condições do solo e exposição a pragas.

As mitocôndrias utilizadas foram obtidas de fígado de ratos e isoladas por centrifugação diferencial. A oxidação de lipídios das membranas mitocondriais foi avaliada por um ensaio espectrofotométrico em que são quantificadas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978). Será verificada a capacidade do extrato em neutralizar EROs gerados pela mitocôndria em condições de estresse oxidativo, utilizando a sonda DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato), molécula que sofre clivagem por EROs, gerando DCF que é capaz de emitir fluorescência.

A atividade *scavenger* dos extratos foi avaliada pela redução do radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que todos os extratos com diferentes polaridades das folhas de Neem foram são capazes de inibir a oxidação dos lipídeos das membranas mitocondriais em condições de estresse oxidativo gerado pela incubação com Fe^{2+} /citrato. A oxidação lipídica é um dos muitos fenômenos que podem ocorrer na membrana mitocondrial decorrente do ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs), que em condições de estresse pode levar a perda das funções mitocondriais.

Os extratos obtidos utilizando metanol e acetato de etila foram os mais eficientes em neutralizar as EROs geradas pela mitocôndria sem situação de estresse oxidativo gerado tanto pela incubação com Fe^{2+} /citrato quanto pela incubação com *t*-BuOOH, ambos chegaram a inibir até 98,61% a fluorescência de DCF. Os extratos obtidos com a utilização de diclorometano e hexano mostraram eficiência menor que 85% nas mesmas condições.

A quantificação de flavonóides e fenóis totais mostrou que todos os extratos apresentam grandes quantidades destas substâncias. Fenóis e flavonóides possuem uma atividade antioxidante muito bem documentada e atuam, dentre outros modos, como *scavenger* de radicais livres (MARTÍNEZ-FLORES, 2002). Nesse sentido resolvemos testar apenas a capacidade *scavenger* de radicais livres do extrato. Para isso usamos o radical livre estável (DPPH) que, ao ser reduzido, muda de cor o que torna possível quantificar através de uma análise espectrofotométrica. Como pode ser observado na Fig. 1, apenas o extrato metanólico de *A. indica* é capaz de reduzir o DPPH, apresentando grande potencial *scavenger* de radicais livres. Isto explica parte dos resultados observados com relação à neutralização de EROs pelo extrato metanólico, mas não explica a grande

capacidade exibida pelo extrato obtido com acetato de etila levando-nos a crer que atue de outros modos que não como *scavenger* de radicais livres.

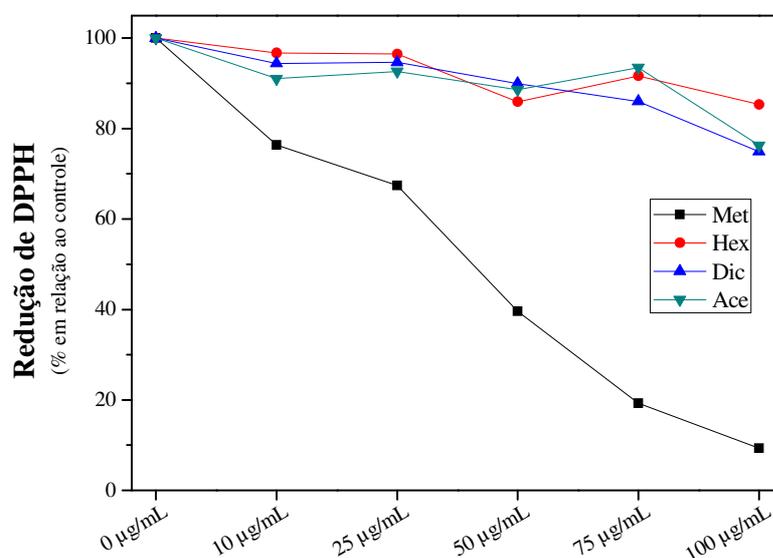


Fig. 1 - Redução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) por diferentes concentrações dos extratos de *A. indica* em diferentes concentrações. O controle (C) foi conduzido com DPPH $50 \mu\text{mol} \times \text{L}^{-1}$ na ausência de extrato. Met: metanol, Hex: Hexano, Dic: Diclorometano, Ace: Acetato de Etila nas concentrações indicadas. Os valores são exibidos em porcentagem referente ao padrão, atribuído como 100 %.

CONCLUSÕES

Os resultados mostram que os extratos das folhas de *A. indica* obtidos com a utilização de metanol e acetato de etila são os que apresentam maior potencial antioxidante em sistemas biológicos, verificado por meio de inibição da oxidação de lipídeos de membrana mitocondrial e da inibição da geração de EROs. O efeito exibido pelo extrato metanólico é decorrente, pelo menos em parte, de sua atividade *scavenger* de radicais livres enquanto o mecanismo de ação exibido pelo extrato com acetato de etila carece de explicações até o momento e poderia ser testado com a realização de ensaios que avaliem sua interferência nos sistemas de defesa antioxidantes da mitocôndria. Observamos que não existe uma relação direta entre os níveis de flavonóides e compostos polifenólicos e a atividade antioxidante, já que os extratos com diclorometano e acetato de etila, apesar de apresentarem altas concentrações destas substâncias, não são capazes de atuarem como antioxidantes proporcionalmente.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BISWAS, K.; CHATTOPADHYAY, I.; BANERJEE, R.; BANDYOPADHYAY, U. Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*). *Current Science*, v. 82, n. 11, p.1336-1345, junho 2002.

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

MARTINEZ-FLORES, S.S. O Neem – *Azadirachta indica*: natureza, usos múltiplos, produção. 1ed. Londrina: Iapar. Instituto agrônomo do Paraná, 2002

NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. *Journal of Natural Products*, v. 70, p. 461-477, 2007.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M.T.D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 39, p.44-84, 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao meu professor e orientador Dr. Tiago Rodrigues.

Aos colegas de trabalho do laboratório.

Ao suporte de FAPESP, FAEP, CNPq e UMC.