

AValiação DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DA RAIZ DE *PFAFFIA GLOMERATA* (SPRENG.) PEDERSEN

Zaiane Meneses Camillo¹; Adriana Miranda de Carvalho²; Tiago Rodrigues³

Estudante do Curso de Biomedicina; e-mail: zaiane_camillo@yahoo.com.br¹

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: adrianamcarvalho@gmail.com²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: tiagorod@yahoo.com.br³

Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chaves: *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 H₂O₂ que normalmente seria eliminado, acumula-se e na presença de Fe²⁺ dando origem ao radical hidroxil (OH•). 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

Como o uso do ginseng brasileiro (*Pfaffia ssp*) no Brasil tem aumentado nos últimos anos e poucos são os estudos realizados com as plantas deste gênero, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as propriedades antioxidantes do extrato hidroalcoólico da raiz de *Pfaffia glomerata*.

METODOLOGIA

O extrato foi obtido pelo método de maceração e em seguida liofilizado. As soluções utilizadas foram preparadas em água. 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 da membrana mitocondrial foi avaliada espectrofotometricamente pela formação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978). A oxidação das membranas mitocondriais foi avaliada pela formação de grupos tiólicos de proteínas mitocondriais e foram dosados usando DTNB (JOCELYN, 1987). A geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) foi avaliada espectrofluorimetricamente utilizando 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFDA) nos comprimentos de onda de 503nm (excitação) e 529nm (emissão) e também espectrofotometricamente, utilizando um sistema de geração de ânion superóxido utilizando xantina/xantina oxidase e redução do composto NBT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados da literatura acerca de *P. glomerata* são extremamente escassos e muitas vezes se confundem com os relatos de *Panax ginseng*, pelo fato das duas plantas serem conhecidas como ginseng. Além disso, o uso popular de *P. glomerata* no Brasil aumentou relativamente nos últimos anos.

Com a finalidade de avaliar a atividade antioxidante do extrato da raiz de *P. glomerata*, utilizamos como indutores de estresse oxidativo mitocondrial neste trabalho o sistema Fe^{2+} /citrato, que promove a catálise de reações de Fenton, e o *t*-butilhidroperóxido (*t*-BOOH), um peróxido orgânico capaz de induzir estresse oxidativo em sistemas biológicos.

O extrato da raiz de *P. glomerata* foi capaz de reduzir o DPPH de forma concentração dependente. Este resultado sugere a presença de substâncias com atividade scavenger de radicais livres presentes neste extrato, embora o efeito seja pequeno se comparado ao efeito do flavonóide isolado quercetin em baixas concentrações. Para avaliar a possível atividade antioxidante do extrato em sistemas biológicos, determinamos a extensão da oxidação de lipídeos da membrana mitocondrial em presença indutores de estresse oxidativo, reação cujo principal produto são aldeídos reativos ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) que podem ser quantificados espectrofotometricamente. O extrato da raiz de *Pfaffia glomerata* não foi capaz de inibir a lipoperoxidação da membrana mitocondrial induzida por Fe^{2+} /citrato. Embora apresente atividade redutora de DPPH, devemos levar em consideração ainda que a ausência de proteção da membrana mitocondrial de danos oxidativos induzidos por Fe^{2+} pelo extrato de *Pfaffia glomerata*, pois as substâncias

presentes no extrato podem ter caráter mais hidrofílico não se particionando adequadamente na membrana que é um ambiente hidrofóbico. Além disso, o extrato não foi capaz de inibir a oxidação de grupamentos tiólicos de proteínas mitocondriais e a oxidação de glutathiona reduzida (GSH) induzidas por *t*-BOOH.

Por outro lado, quando avaliamos o efeito dos extratos sobre a geração mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (EROs) induzida por *t*-BOOH usando o fluoróforo DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) observamos um efeito inibidor da geração EROs pelo extrato. A adição de *t*-BOOH aumenta bruscamente a fluorescência da reação quando comparado ao controle, indicando um aumento da geração de EROS, e a pré-incubação com o extrato da raiz foi capaz de inibir parcialmente a formação de EROs induzida *t*-BOOH. Paralelamente, investigamos os efeitos do extrato sobre a oxidação de nucleotídeos de piridina (NADH e NADPH) mitocondriais induzida por *t*-BOOH. A adição de *t*-BOOH promove a oxidação de GSH à GSSG que é novamente reduzida à custa de NAD(P)H. Desta forma, os nucleotídeos de piridina fazem parte do sistema de defesa antioxidante mitocondrial, atuando indiretamente via GSH na eliminação de peróxidos. A adição de *t*-BOOH oxida instantaneamente NAD(P)H, efeito não observado pela adição apenas do extrato da raiz. A pré-incubação das mitocôndrias com o extrato, seguida da adição do oxidante *t*-BOOH promoveu ligeira inibição da oxidação NAD(P)H, porém esta não foi suficiente para impedir a oxidação e manter os níveis de GSH.

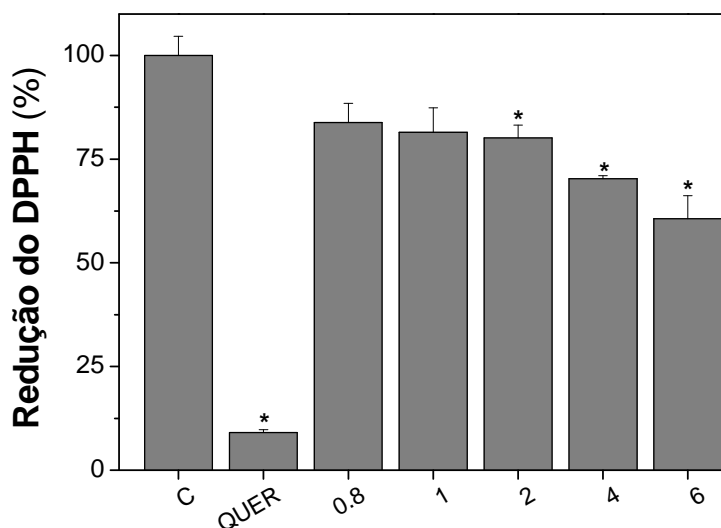


Fig 1 – Redução do DPPH induzida pelo extrato da raiz de *P. glomerata*. Diferentes concentrações do extrato foram incubadas em 1,5mL de tampão acetato de sódio 40 mmol/L, pH 5,5, e 1,0 mL de etanol absoluto, a 30°C com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) 0,1 mmol/L. C: controle (ausência do extrato), QUER: controle positivo (quercetin 10µmol/L). As concentrações do extrato da raiz de *P. glomerata* estão representadas na figura em mg/ml (liofilizado). *Significativamente diferente do controle (C) (P<0,05).

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos concluímos que o extrato da raiz de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen, embora possua uma pequena atividade *scavenger* de radicais livres, atividade quelante de Fe²⁺ e reduza a geração mitocondrial de EROs, não foi capaz de impedir a oxidação de lipídeos e proteínas mitocondriais induzida por Fe²⁺ ou *t*-BOOH, provavelmente pela dificuldade de partição em ambientes hidrofóbicos das substâncias com atividade antioxidante presentes na raiz.

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.

JOCELYN, P. C. Spectrophotometric assay of thiols. *Meth. Enzymol*, v. 143, p. 44-67, 1987.

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 Enzimology*, Academic press, New York, v. 52C, p. 302-310, 1978.