

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.lopes@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-chaves: *Azadirachta indica*; Radicais Livres; Mitocôndria

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 secundário no metabolismo 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 atuar auxiliando 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, através da fosforilação oxidativa. Durante este processo, cerca de 1 a 2 % 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 contém 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

Neste trabalho investigamos as propriedades antioxidantes do extrato glicólico das folhas de Neem contra danos oxidativos induzidos por Fe^{2+} /citrato ou *t*-BuOOH em mitocôndrias isoladas de fígado de rato.

METODOLOGIA

O extrato foi obtido por percolação fracionada utilizando propilenoglicol como solvente, sendo então liofilizado para obtenção do extrato puro considerado como 100%. 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 á pragas.

As mitocôndrias utilizadas foram obtidas de fígado de ratos e isoladas por centrifugação diferencial. Avaliamos a oxidação de lipídios das membranas mitocondriais através de um ensaio espectrofotométrico em que são quantificadas substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (BUEGE & AUST, 1978), enquanto a oxidação de grupos tiólicos de proteínas mitocondriais foi espectrofotometricamente avaliada utilizando o ácido 5,5-ditiobis-nitrobenzóico (DTNB) (JOCELYN, 1987). Verificamos os níveis de glutatona na forma reduzida, num ensaio espectrofotométrico utilizando o fluoróforo *o*-ftalaldeído.

Afim de elucidar os mecanismos pelo qual o extrato age realizamos um ensaio espectrofotométrico que determina a capacidade *scavenger* do extrato utilizando o radical livre estável 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH), ainda avaliamos o potencial quelante de íons Fe (II) também através de um ensaio espectrofotométrico, utilizando o indicador ácido dissulfônico da batofenantrolina (BPS).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que o extrato glicólico das folhas de Neem é um potente inibidor da oxidação dos lipídeos das membranas mitocondriais observada em condições de estresse oxidativo gerado pela incubação com Fe^{2+} /cittrato. 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.

Por estarem presentes em grandes quantidades na membrana mitocondrial, as proteínas também são alvos favoráveis ao ataque de EROs. Quando avaliamos o dano oxidativo em grupos tiólicos de resíduos cisteína na presença de um indutor, observamos que o extrato é capaz de impedir a oxidação dos mesmos.

Somado a isso verificamos que o extrato também foi capaz de impedir a oxidação de glutatona, um tripeptídeo componente do sistema de defesa antioxidante mitocondrial, induzida por *t*-BuOOH.

Como a oxidação lipídica mitocondrial foi induzida por Fe^{2+} /cittrato supomos que o extrato poderia ligar-se a estes íons impedindo que atravessassem as membranas mitocondriais ou mesmo participassem na geração de EROs no interior da mitocôndria. Para testar esta hipótese, fizemos um ensaio competitivo pela quelação de Fe^{2+} entre o extrato e o ácido dissulfônico da batofenantrolina, um indicador metalocrômico que quantificar a presença destes íons. Nossos resultados mostraram que o extrato é capaz de quelar Fe^{2+} em solução, o que explica em partes a atividade antioxidante observada.

Ainda por conter grandes quantidades de flavonóides, substâncias com conhecida capacidade antioxidante por atuarem, dentre outros modos, como *scavenger* de radicais livres, 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, o extrato de *A. indica* reduz o DPPH, apresentando grande potencial *scavenger* de radicais livres. É importante notar a correlação entre a atividade *scavenger* de radicais DPPH e a inibição da oxidação de lipídeos da membrana mitocondrial.

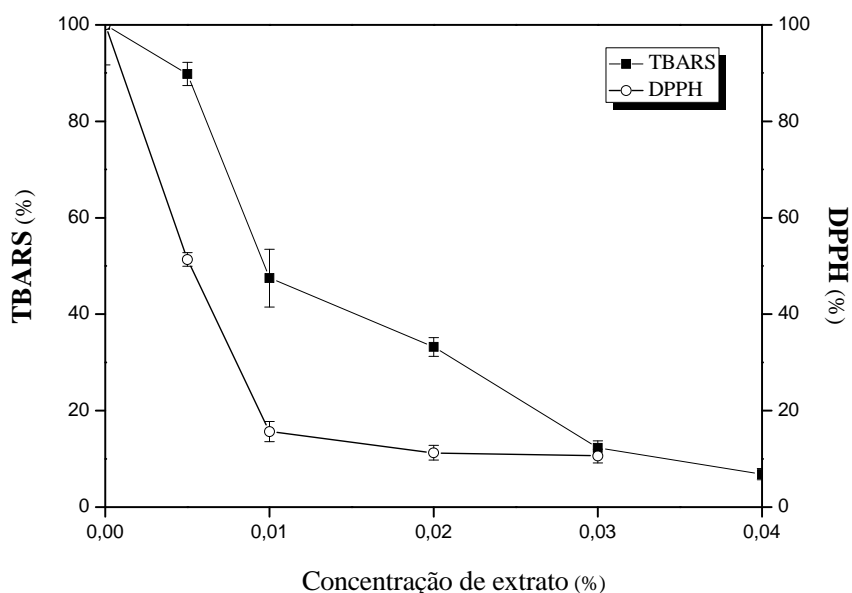


Fig. 1 – Inibição da oxidação de lipídios das membranas mitocondriais e capacidade *scavenger* do extrato de *A. indica*. A oxidação lipídica foi avaliada espectrofotometricamente com ácido tiobarbitúrico (TBA) usando, como indutor de estresse oxidativo, $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$ 50 μM /citrato 2 mM em tampão HEPES-KOH 10 mM, pH 7,4. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da formação de TBARS. A atividade *scavenger* do

CONCLUSÕES

Nossos resultados mostraram que o extrato glicólico das folhas de *A. indica* apresenta alto conteúdo de flavonóides e fenóis totais, substâncias com conhecido potencial antioxidante. Foi observada potente atividade antioxidante para este extrato, sendo que tal efeito é decorrente de uma somatória das atividades *scavenger* de radicais livres e quelante de Fe^{2+} , apresentando potencial para utilização no tratamento de patologias associadas ao estresse oxidativo e doenças de acúmulo de Fe^{2+} .

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.

JOCELYN, P.C. Spectrophotometric assay of thiols. *Methods in enzymology*, v. 143, p.44-67, 1987.

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.