

EFEITO PROTETOR DE EXTRATOS GLICÓLICOS DE *BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA* E *ROSMARINUS OFFICINALIS* CONTRA DANOS OXIDATIVOS INDUZIDOS POR T-BUOOH

Natalia Souza Sandim Guimarães¹; Tiago Rodrigues²

Estudante do Curso de Farmácia; e-mail: na_guimaraes@yahoo.com.br¹
Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail:trodrigues@umc.br²

Área do Conhecimento: Metabolismo e Bioenergética

Palavras-chaves: *Baccharis dracunculifolia*; *Rosmarinus officinalis*; atividade antioxidante; mitocôndrias

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma grande variedade de plantas com potencial farmacológico devido à biodiversidade de sua flora. *Baccharis dracunculifolia*, conhecido como alecrim do campo, e *Rosmarinus officinalis*, alecrim, são muito usados na culinária e na medicina popular, mas existem poucos dados sobre sua ação antioxidante em sistemas biológicos.

Rosmarinus officinalis (Labiatae) é uma espécie originária do Mediterrâneo e foi introduzida no Brasil na época dos primeiros colonizadores, e é largamente utilizada na culinária popular. São descritas inúmeras aplicações farmacológicas para o *Rosmarinus officinalis*, tais como ação tônica, é estimulante, carminativo, desinfetante, anti-séptico, aromático e bactericida.

Baccharis dracunculifolia (Asteraceae) é uma espécie arbustiva e está distribuída entre a região sudeste ao sul do Brasil, estendendo-se até a Argentina, Uruguai, Paraguai e Bolívia. Estudos recentes demonstram que as abelhas, no Brasil, produzem o própolis verde utilizando como base a planta *Baccharis dracunculifolia*. Em toda a Ásia, especialmente no Japão, a própolis é empregada no desenvolvimento de medicamentos hepatoprotetores ou para a inibição do desenvolvimento de tumores.

Inúmeras doenças degenerativas, como câncer, esclerose múltipla e o próprio processo de envelhecimento estão relacionados com a ação de radicais livres formados em nosso organismo, sendo que a descoberta de novos compostos ou substâncias que apresentam atividade antioxidante é considerada de extrema importância e necessária para avanços no tratamento ou cura de tais processos e patologias.

OBJETIVOS

A mitocôndria é uma importante fonte e, ao mesmo tempo, alvo de radicais livres, estando envolvidas em diversos processos patológicos, constituindo assim um interessante sistema para estudos de estresse oxidativo. Neste trabalho, estudamos os efeitos antioxidantes dos extratos glicólicos de *B. dracunculifolia* e *R. officinalis* usando mitocôndrias isoladas de fígado de rato como sistema modelo e *tert*-butilhidroperóxido como indutor de geração de espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo. A caracterização dos efeitos antioxidantes dos extratos vegetais em sistemas biológicos proposta neste projeto é de extrema importância para avaliação do potencial farmacológico destas substâncias e uma possível utilização na Indústria Farmacêutica e Cosmética.

METODOLOGIA

Os extratos foram obtidos pelo método de percolação fracionada segundo a Farmacopeia Brasileira e considerados como 100% para este estudo. 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

Com a finalidade de avaliar a atividade *scavenger* de radicais livres dos extratos, neste trabalho, utilizamos como indutor de estresse oxidativo mitocondrial o *tert*-butilhidroperóxido (*t*-BuOOH), um peróxido orgânico capaz de induzir estresse oxidativo em sistemas biológicos.

Um dos experimentos propostos para caracterizar proteção dos extratos à macromoléculas foi a lipoperoxidação, reação cujo principal produto são aldeídos os quais formam espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como produto final, que pode ser dosado como indicador de danos oxidativos a lipídeos causados por espécies reativas de oxigênio (EROs). Como pode ser observado na **Figura 1**, os extratos de Ba e Ro foram capazes de inibir a LPO da membrana mitocondrial, induzida *t*-BuOOH, onde o máximo de redução da formação de TBARS (equivalente ao controle) foi obtido nas concentrações de 0,05% (v/v) para Ba e para Ro.

Uma vez caracterizado o efeito protetor dos extratos sobre os lipídeos da membrana mitocondrial, passamos a verificar o efeito dos mesmos sobre grupamentos tiólicos de proteínas mitocondriais, uma vez que esses são candidatos preferenciais à oxidação em proteínas. Além disso, a oxidação de grupamentos tiólicos com formação de pontes dissulfeto em proteínas da membrana mitocondrial está associada à transição de permeabilidade mitocondrial e, conseqüentemente, à morte celular (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

Dessa forma, os extratos foram incubados com a suspensão mitocondrial e na presença do indutor *t*-BuOOH, ambos os extratos inibiram de maneira concentração dependente a oxidação desses grupamentos, em 0,05% os extratos de Ba e Ro inibiram 100% a oxidação dos grupos tiólicos, igualando-se ao controle.

Uma vez caracterizado o efeito protetor sobre a oxidação de macromoléculas biológicas, tanto lipídeos quanto proteínas, de ambos os extratos, passamos a investigar os mecanismos moleculares responsáveis por tal efeito antioxidante.

O DCFDA (2',7'-diclorofluoresceína diacetato) é uma molécula não fluorescente utilizada para detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs), pois torna-se fluorescente quando oxidada por tais espécies em DCF, de tal forma que quanto maior for a produção de EROs no sistema maior a fluorescência. Como resultado, os extratos foram capazes de inibir a formação de EROs sendo que a maior concentração testada (0,05%) apresentou quase inibição total, igualando-se ao controle para ambos os indutores.

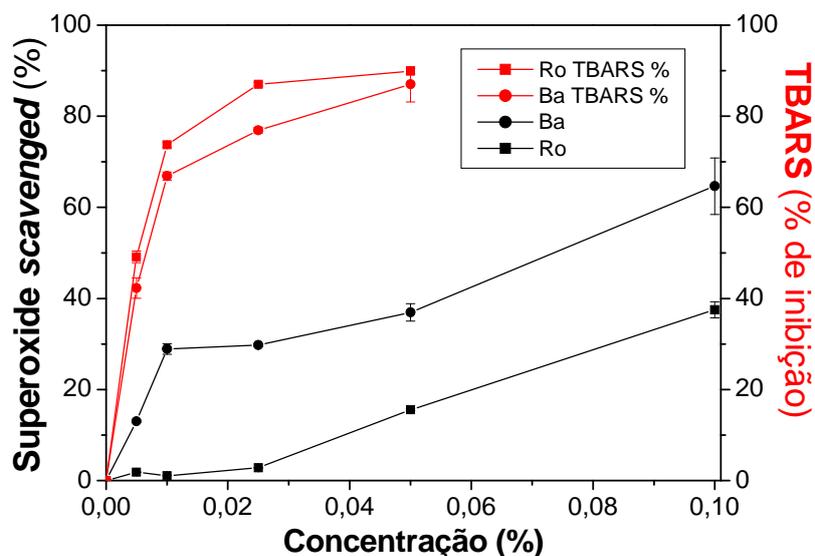


Fig. 1 – Efeito dos extratos glicólicos de *B. dracunculifolia* (Ba) e *R. officinalis* (Ro) sobre a oxidação de lipídeos da membrana mitocondrial e a atividade *scavenger* de superóxido. As mitocôndrias (1mg/mL) foram incubadas com os extratos em diferentes concentrações e a porcentagem de inibição da geração de TBARS pelos extratos foi calculada em relação a *t*-BuOOH 0,6 mM considerado como 100 %. A atividade *scavenger* de ânions superóxido foi determinada espectrofotometricamente, através da redução do NBT, incubando-se os extratos em um sistema composto por hipoxantina/xantina oxidase. O controle realizado na ausência dos extratos foi considerado como 100% de superóxido gerado, ou seja, 0% de inibição. (■) *Rosmarinus officinalis* e (●) *Baccharis dracunculifolia*.

Para avaliarmos hipóteses acerca do mecanismo de ação antioxidante dos extratos, dessa forma, para testarmos se os extratos atuam como *scavenger*, de ânions superóxido, utilizamos um teste *in vitro*, ou seja, sem mitocôndrias, utilizando xantina oxidase para geração do superóxido. Utilizamos como indicador, o composto tetrazolium nitroblue (NBT), que é oxidado pelo ânion superóxido gerado à partir do sistema hipoxantina/xantina oxidase apresentando alterações espectrais características que na sua forma reduzida torna-se azul, e absorve luz num comprimento de onda de 540nm, e a porcentagem de *scavenger* de superóxido foi calculada comparando-se os resultados obtidos com o controle. Os extratos mostraram-se capazes de neutralizarem o superóxido gerado de forma concentração-dependente. Sendo assim, os extratos mostraram-se eficazes, sendo que para Ba a inibição de TBARS foi maior, mas para a atividade *scavenger* de ânion superóxido, Ro, foi quem apresentou maior atividade

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que os extratos glicólicos de *Baccharis dracunculifolia* e *Rosmarinus officinalis*, ricos em flavonóides e compostos fenólicos, apresentam potente atividade antioxidante, caracterizada pela inibição da oxidação de macromoléculas biológicas (lipídeos e proteínas). Tal atividade é resultante da atividade *scavenger* de radicais livres. A ausência de citotoxicidade em células em

cultura associada à atividade antioxidante demonstrada aponta para o grande potencial cosmético e cosmeceútico destes extratos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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.

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, p.86, 1989.

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

KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine*, Campinas, v. 26, n. 3/4, p. 463-471, 1999.