

Investigação da atividade antioxidante do óleo obtido de *Pterodon Pubescens* Benth. (Sucupira)

Jefferson Dias da Silva¹ (IC)*, Monique Ferreira Marques¹ (PQ)

jeff23123@gmail.com

Universidade Estadual de Goiás, Campus Palmeiras de Goiás. Rua S-7, s/n, Setor Sul,
CEP: 76190-000, Palmeiras de Goiás – GO.

Resumo: O uso popular de plantas medicinais e a sua eficácia no tratamento de doenças têm contribuído para evidenciar as vantagens terapêuticas de diversas espécies (MACIEL, *et al.*, 2002). Dentre os milhares de gêneros presentes no Cerrado brasileiro, está o gênero *Pterodon* (Leguminosae), dentro do qual está inserida a espécie *P. pubescens* (sucupira branca). Estudos fitoquímicos realizados com esta espécie indicaram que o óleo extraído de suas sementes é abundante em diterpenos (FASCIO *et al.*, 1976). Produtos naturais podem atuar como antioxidantes, como é o caso do ácido ascórbico (ARRIGONI; TULLIO, 2002), o que pode ser avaliado a partir da reação de uma determinada substância com o radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), uma vez que tal método é simples, rápido, reprodutível e confiável (KOLEVA *et al.*, 2002). Este trabalho tem como objetivo determinar o potencial antioxidante de subfrações do extrato hexânico obtido a partir do óleo das sementes de *P. pubescens* frente ao radical DPPH e determinar qual a subfração mais ativa, a fim de elucidar a estrutura responsável por tal atividade.

Palavras-chave: *Pterodon pubescens*. Sementes. Óleo. Atividade antioxidante. Cromatografia.

Introdução

O estado de Goiás está situado em um dos biomas mais importantes do Brasil, o Cerrado. Dentre os milhares de gêneros presentes no Cerrado brasileiro, está o gênero *Pterodon* (Leguminosae), que é composto por cinco espécies nativas no Brasil: *P. abruptus* Benth, *P. apparicioi* Pedersoli, *P. polygalaeflorus* Benth, *P. emarginatus* Vog. e *P. pubescens* Benth (COELHO *et al.*, 2005). A espécie nativa *P. pubescens*, conhecida como sucupira branca, está distribuída na região central do Brasil, e seus caule, raiz e sementes são utilizados na medicina popular em infusões para o tratamento de dores de garganta, dor e reumatismo (ALMEIDA *et al.*, 1998). Estudos fitoquímicos realizados com *P. pubescens* indicaram que o óleo extraído de suas sementes é abundante em diterpenos (FASCIO *et al.*, 1976).

Por outro lado, radicais livres e espécies reativas de oxigênio são espécies fundamentais no metabolismo celular, seja nos processos de sinalização celular, na

defesa contra patógenos ou na homeostase (DEVASAGAYAM *et al.*, 2004). Na literatura diversos produtos naturais são apresentados como possuindo a capacidade de reduzir o estresse oxidativo, uma vez que atuam como antioxidantes, como é o caso do ácido ascórbico (ARRIGONI; TULLIO, 2002). Um método bastante utilizado para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de uma substância pura ou de um extrato de planta, é o que faz uso do radical estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), uma vez que tal método é simples, rápido, reprodutível e confiável⁶. As espécies reativas de oxigênio (EROs), também conhecidas como radicais livres, são moléculas que contêm um ou mais elétrons desemparelhados na última camada de valência, tornando-os assim altamente reativos e instáveis. São formados a partir da oxidação de um composto e para chegar novamente à estabilidade precisam sofrer uma redução, processo conhecido como oxido-redução (FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

Os principais radicais livres são O_2^- (radical superóxido), HO_2^- (radical hidroperoxila), OH^- (radical hidroxila) e o 1O_2 (oxigênio singlet), eles podem ser encontrados em todos os sistemas biológicos (BIANCHI e ANTUNES, 1999; SCHNEIDER e OLIVEIRA, 2004).

A formação de EROs é essencial e ocorre a todo o momento no organismo, gerando energia através da cadeia de elétrons. Quando a produção está na quantidade adequada viabiliza a geração de energia (ATP), auxilia na defesa do organismo em meio a um xenobiótico, como é o caso do oxigênio singlet, produzido pelos neutrófilos frente a um ataque de bactéria, que tem por finalidade ajudar a destruir a membrana do microrganismo, entre outros benefícios. Por outro lado, o excesso na produção de EROs podem levar ao estresse oxidativo, uma vez que estes conseguem se ligar ao DNA, membrana celular ou proteínas. Em alguns casos essas ligações podem causar doenças, dentre elas aterosclerose, diabetes, doenças neurodegenerativas, etc. Estudos mostram que danos causados no DNA pelos radicais livres, contribuem fortemente no processo carcinogênico e de mutagênese (FLOYD, 1990; BARBOSA *et al.*, 2010). Diante disso, existe uma necessidade no uso de antioxidantes, uma vez que estes atuam de forma a diminuir ou inibir o agente oxidante, o que leva há uma busca contínua para encontrar novos tipos de antioxidantes buscando anular os efeitos do estresse oxidativo (ALMEIDA *et al.*, 2006).

O objetivo do projeto é contribuir para a população na área de produtos naturais mostrando que a utilização de plantas medicinais deve ser atrelada a medicina convencional para a valorização e preservar da flora brasileira.

Material e Métodos

As sementes utilizadas foram coletadas na cidade de Bela Vista (GO) e identificadas taxonomicamente pelo Prof. Dr. Heleno Ferreira, do ICB/UFG. As sementes foram pulverizadas e submetidas a uma extração contínua com etanol comercial, foi utilizado um aparelho do tipo Soxhlet. A solução obtida foi concentrada em evaporador sob vácuo, no qual obtemos um óleo marrom escuro e bastante viscoso.

O óleo obtido das sementes de *P. pubescens* foi solubilizado em metanol, gerando um extrato bruto metanólico, que foi avaliado quanto à sua atividade antioxidante. A este extrato bruto metanólico foi adicionado hexano. Essa mistura foi agitada por 2h e em seguida a fase hexânica (F1) foi separada do resíduo oleoso e evaporada sob vácuo. O resíduo oleoso foi, então, solubilizado em éter etílico (F2) e ambas as frações oriundas do extrato metanólico serão testadas quanto à sua atividade antioxidante. As frações obtidas foram fracionadas em coluna de florisil e após foram analisadas por CCDA e agrupadas de acordo com os perfis cromatográficos. Na fração F1, foram obtidas quatro subfrações derivadas de diferentes proporções dos eluentes hexano/acetato de etila, que foram reunidas pela semelhança do perfil cromatográfico, sendo denominadas subfração **A1**, **A2**, **A3** e **A4**. Procedimento semelhante foi conduzido com a fração F2, o que levou à obtenção de três subfrações, também reunidas de acordo com o perfil cromatográfico, e que foram denominadas subfrações **B1**, **B2** e **B3**.

O presente trabalho reporta os resultados da atividade antioxidante das subfrações A1, A2 e A3, obtidas a partir da fração hexânica do óleo das sementes de *P. pubescens*. As análises das demais frações estão sendo conduzidas por nós e se encontram em fase final da análise dos dados obtidos.

Para a determinação do potencial antioxidante foi utilizado o Método do DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilidrazila). Para a realização do método foi preparada uma solução de DPPH[•] a 0,3 mM em etanol (BRAND-WILIAMS, CUVELIER e BERSSET, 1995).

Na preparação das soluções contendo as amostras A1, A2 e A3 ambas derivadas do óleo das sementes de *P. pubescens*, foram diluídas em água destilada nas seguintes concentrações: 2800, 1600, 800, 400, 200 µg/mL.

Adicionamos 250 µL da solução de DPPH· 0,3 mM em 1,25 mL durante a realização do teste onde cada uma das concentrações das amostras foram testadas e homogeneizadas em vórtex. Foram adicionados 250 µL de etanol em tubos contendo 1,25 mL de cada amostra, o controle foi preparado com 250 µL de DPPH· em 1,25 mL de etanol. As reações foram feitas ao abrigo da luz e temperatura em torno dos 25°C. Após 30 minutos executou-se a leitura das amostras em espectrofotômetro UV no comprimento de onda de 517 nm (BRAND-WILIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

A curva padrão foi feita utilizando solução de trolox. Em ambiente escuro, foi transferida uma alíquota de 50 µL de cada solução de trolox (100 µM, 500 µM, 1000 µM e 1500 µM) para tubos de ensaio os quais receberam 3,0 mL da solução do radical livre DPPH·. Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubos e após 30 minutos foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 520 nm. Para a realização da calibração do aparelho foi utilizado solução de álcool etílico como branco. As concentrações de trolox (µM) foram plotadas no eixo X e as respectivas absorbâncias no eixo Y. A partir do gráfico obtido foi calculada a equação da reta (SÁNCHEZ-MORENO, LARRAURI e SAURA-CALIXTO, 1998; BRAND-WILIAMS, CUVELIER e BERSET, 1995).

A absorbância das amostras foram convertidas em porcentagem de atividade antioxidante (AA%) utilizando a fórmula:

$$AA\% = 100 - \left\{ \frac{[(Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100}{Abs_{controle}} \right\}$$

Na fórmula acima, Abs_{controle} é a absorbância inicial da solução etanólica de DPPH· e Abs_{amostra} é a absorbância da mistura reacional.

Resultados e Discussão

Para caracterizar as subfrações A1, A2 e A3, utilizamos a ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H , em colaboração com a Prof. Msc. Carolina di Medeiros da Universidade Estácio de Sá (Figuras 1 a 3). As subfrações analisadas apresentam um perfil semelhante característico da presença de diterpenos.

Para continuação do trabalho, as demais subfrações obtidas serão analisadas pela técnica de RMN de ^1H e todas serão avaliadas quanto às suas atividades antioxidantes, utilizando o método DPPH. As subfrações que se mostrarem mais ativas serão purificadas e por cromatografia em coluna, para que assim possamos obter a substância responsável pela atividade antioxidante.

O espectrofotômetro foi utilizado para a leitura da atividade antioxidante das amostras testadas em concentrações de 2800 ppm, 1600 ppm, 800 ppm, 400 ppm e 200 ppm.

Os valores obtidos nas absorbâncias dos ensaios das amostras A1, A2 e A3 estão apresentados na Tabela 1.

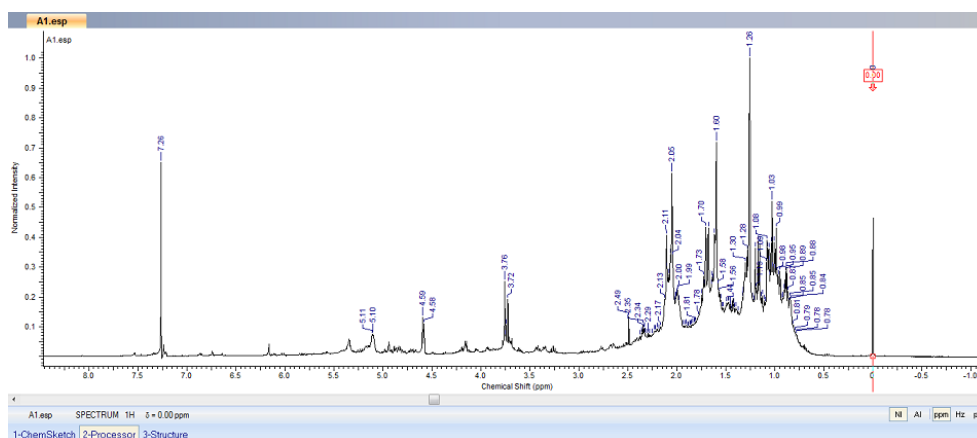


Figura 1: Espectro de RMN de ^1H da subfração A1

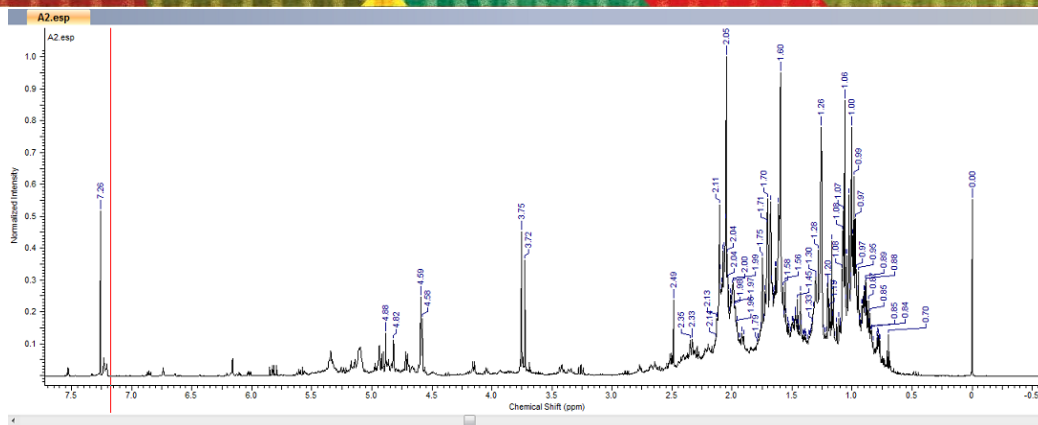


Figura 2: Espectro de RMN de ^1H da subfração A2

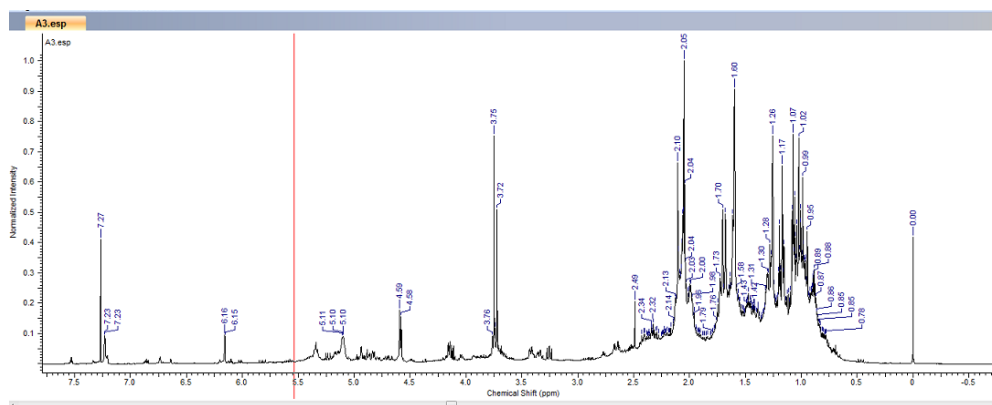


Figura 3: Espectro de RMN de ^1H da subfração A3

Tabela 1: Valores de absorvância obtidos para as amostras A1, A2 e A3.

	A1		A2		A3	
Conc ($\mu\text{g/mL}$)	Abs (nm)	%	Abs (nm)	%	Abs (nm)	%
2800	0,220	28%	0,471	31%	0,233	31%
1600	0,227	21%	0,479	27%	0,277	30%
800	0,253	13%	0,486	24%	0,301	28%
400	0,261	10%	0,493	19%	0,309	26%
200	0,269	8%	0,497	14%	0,315	23%

O gráfico de absorvância das subfrações A1, A2 e A3 foram utilizados para encontrar a equação da reta em comparação com a equação do Trolox e com isso

correlacionar os estudos lineares das atividades antioxidantes como demonstrado nas Figuras 1 e 2. Para obter a equação da reta foi usado o programa Excel do pacote Office.

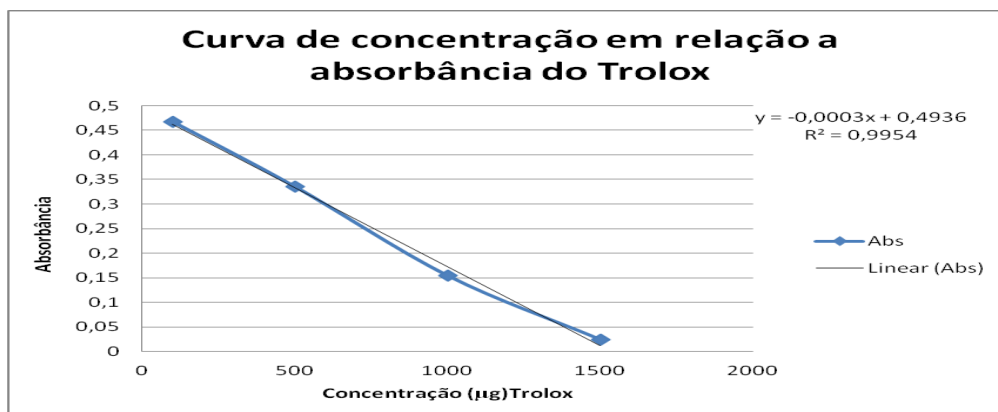


Figura 4 - Gráfico da concentração (µg) em relação a absorbância do Trolox.

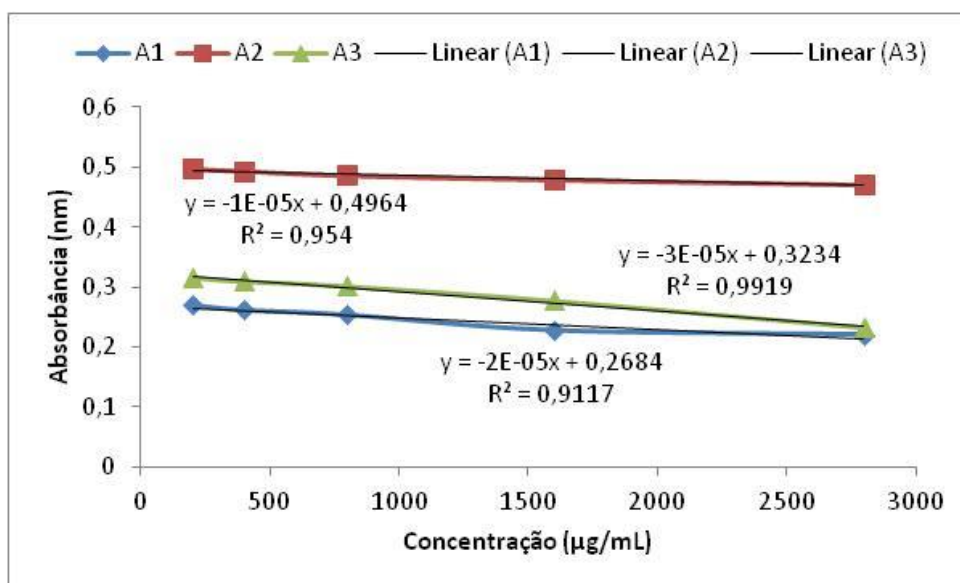


Figura 5 - Gráfico da concentração (µg) em relação à absorbância das amostras A1, A2 e A3.

A capacidade antioxidante de equivalência ao trolox (TEAC) foi expressa em µmol TEAC/g. Os valores encontrados foram 56465 µmol TEAC/g para a amostra A1, 98410 µmol TEAC/g para a amostra A2 e 52896 µmol TEAC/g para a amostra A3. Levando-se em consideração o valor encontrado de TEAC das amostras, verificamos uma atividade antioxidante menor da subfração A2 e valores bastante semelhantes para as amostras A1 e A3.

A CE_{50} (Concentração Efetiva 50%) foi utilizada para calcular a concentração das subfrações A1, A2 e A3 capazes de eliminar 50% do radical livre $DPPH^{\cdot}$. Os resultados da CE_{50} foram obtidos pelo programa GraphPad Prism (Figuras 3, 4 e 5). Para a subfração A1, o resultado obtido foi de 78,6 $\mu\text{g/mL}$. A seguir, a subfração A3 apresentou um valor de 82,7 $\mu\text{g/mL}$. Por ultimo, a subfração A2, apresentou um valor de 156,9 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados comprovam que a subfração A2 possui uma menor atividade antioxidante quando comparada às subfrações A1 e A3. O raciocínio a ser seguido neste ponto nos indica que quanto maior o consumo de $DPPH^{\cdot}$ pela amostra em questão, menor será a CE_{50} , o que representa uma maior atividade antioxidante desta amostra.

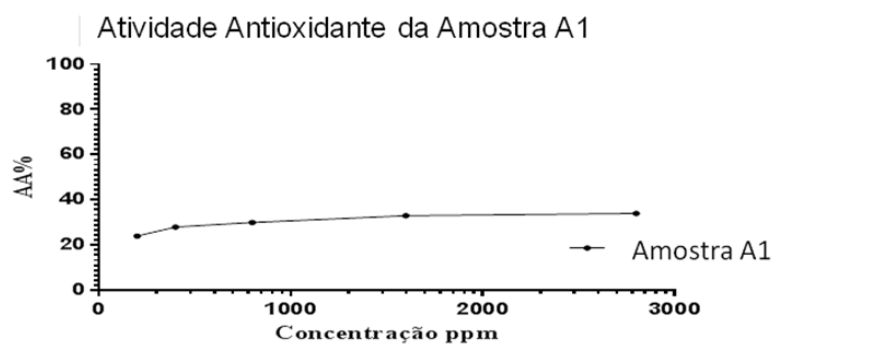


Figura 6 – Porcentagem de absorbância *versus* concentração da Subfração A1

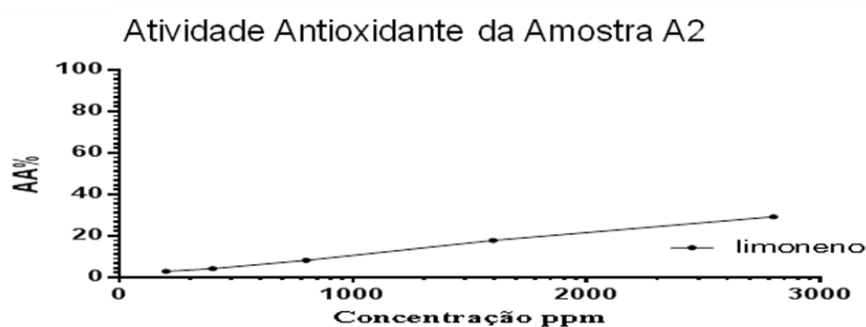


Figura 7 – Porcentagem de absorbância *versus* concentração da Subfração A2

Atividade Antioxidante da Amostra A3

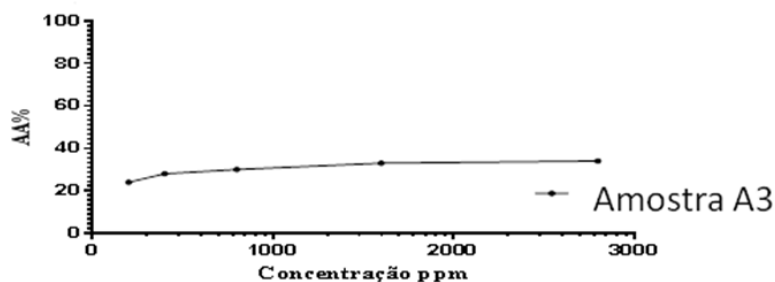


Figura 8 – Porcentagem de absorbância versus concentração da Subfração A3

Considerações Finais

O objetivo do projeto é de contribuir com a formação de recursos humanos na área de Produtos Naturais, além de possibilitar a valorização do recurso natural utilizado, no caso, a espécie *P. pubescens*, levando a um melhor conhecimento da flora do Cerrado brasileiro bem como para a sua preservação. Além disso, este trabalho abre portas para novas pesquisas na área de investigação de atividade antioxidante.

Para continuação do trabalho propusemos analisar as demais subfrações obtidas da fração F2 (subfrações B1, B2 e B3), na qual serão avaliadas quanto às suas atividades antioxidantes assim como as demais.

Agradecimentos



Referências

ALMEIDA, J. M. D.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. **Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais dpph•**. Rev. Ciência e Tecnologia e alimentos. n. 26, p. 446-452, abr./2006.

- ALMEIDA, S. P., PROENÇA, C. E. B., ENO, S. S., RIBEIRO, J.F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Embrapa, Planaltina, DF, p. 464, 1998.
- ARRIGONI, O.; TULLIO, M. C. Ascorbic acid: much more than just an antioxidant. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1569, p. 1, 2002.
- BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta**. Rev. de Nutrição. n. 12, p. 123-130, maio/1999.
- BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Food Science and Technology. v. 28, p. 25-30, 1995.
- COELHO, L. P., REIS, P.A., CASTRO, F. L. de, GAYER, C. R. M., LOPES, C. S., SILVA, M. C. da C.; SABINO, K. C. C.; TODESCHINI, A. R.; COELHO, M. G. P. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 109, 2005.
- DEVASAGAYAM, T. P. A.; TILAK, J. C.; BOLOOR, K. K.; SANE, K. S., GHASKADBI, S. S.; LELE, R. D. Free Radicals and Antioxidants in Human Health: Current Status and Future Prospects. **Journal of Association of Physicians of India**, v. 52, p. 796, 2004.
- FASCIO, M., MORS, W. B., GILBERT, B., MAHAJAN, I. R., MONTEIRO, M. B., FILHO, D. D. S., WICHNEWISKI, V. Diterpenoid furans from *Pterodon* species. **Phytochemistry**, v. 15, p. 201, 1976.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. **Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo**. Rev. da Associação Médica Brasileira. n. 43, p. 61-68, 1997.
- FLOYD, R. A. **Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia**. The Faseb Journal. v.4, n.2, p.587-97, jun./1990.
- KOLEVA, I.I.; van BEEK, T.; LINSSEN, J. P.; de GROOT, A.; EVSTATIEVA, L. N. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v.13, p. 8, 2002.
- SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. **A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols**. Journal of the Science of Food and Agriculture. v.76, p.270-276, 1998.