

Avaliação da Atividade Antioxidante pela Inibição da Peroxidação Lipídica e Quelação de Íon Ferro de Extratos Metanólicos de *Azadirachta indica* (NEEM)

**Maiara Fabiana Peruzzi¹, Amanda Rafaela Luciano Breganó¹, Clara Ruiz de Souza¹,
Fernanda Arduíno¹, José Carlos Duarte¹, Marcela Maria Baracat¹, Rubia
Casagrande¹ e Sandra Regina Georgetti¹**

¹Universidade Estadual de Londrina (UEL) – Departamento de Ciências Farmacêuticas,
Caixa Postal 791 – CEP 86038-350, Londrina – Paraná - E-mail: (maiaraperuzzi@gmail.com)

RESUMO

Azadirachta indica, também conhecida como NEEM, é uma espécie vegetal que tem sua origem na Índia, mas com grande distribuição geográfica incluindo países tropicais. Vários estudos demonstraram que a mesma possui compostos fenólicos, os quais são responsáveis pela sua atividade antioxidante. Levando em consideração que em vários tipos de doenças, estão envolvidos danos oxidativos mediados por espécies reativas de oxigênio (EROS), este trabalho teve como objetivo avaliar e comparar as atividades inibidoras da peroxidação lipídica dependente de Fe⁺² e a queladora de íon ferro dos extratos metanólicos das folhas da *A. indica* obtidos por agitação em shaker e por turboextração.

Palavras-chave: Antioxidante; Radicais livres; Peroxidação lipídica.

INTRODUÇÃO

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs), respectivamente (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

O desequilíbrio entre as EROs e os mecanismos de defesa antioxidantes leva à instalação do estresse oxidativo. Esse processo se caracteriza pela oxidação das biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BARBOSA et al., 2010).

Diante disso, o uso de produtos naturais com potencial antioxidante vem fornecendo novas perspectivas para a prevenção de danos oxidativos mediados pelos radicais livres (MEENA et al., 2012).

Análises fitoquímicas da *A. indica* demonstraram a existência de altas concentrações de compostos fenólicos que são os responsáveis pela variação da atividade antioxidante da planta (MAHMOUND; SHOLIB, 2008).

Este trabalho teve como objetivo, avaliar a atividade inibidora da lipoperoxidação (LPO) induzida por Fe^{+2} , e também, a capacidade queladora de íon ferro, de extratos metanólicos obtidos por agitação em shaker e por turboextração de folhas da *A. indica*, para se compreender com mais detalhes seu mecanismo antioxidante, e assim ter uma possível aplicação terapêutica de seus extratos em patologias relacionadas com danos oxidativos

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção dos extratos metanólicos de Azadirachta indica

As folhas de *A. indica* foram secas em estufa a 40°C e trituradas utilizando-se liquidificador industrial. Em seguida, os extratos metanólicos em diluição (1:10 p/v) foram obtidos por agitação em shaker por 3 dias ou por turboextração. As misturas resultantes foram filtradas à vácuo para a obtenção do extrato metanólico de NEEM obtido por agitação em shaker (ES) e por turboextração (ET) que foram utilizadas para a análise antioxidante.

Determinação da atividade inibidora da peroxidação lipídica induzida por Fe^{+2}

A medida da atividade inibidora de peroxidação lipídica induzida por Fe^{+2} foi determinada pela diminuição da formação de malondialdeído (MDA), um produto secundário da peroxidação lipídica. (CASAGRANDE et al., 2006) Em 1 mL de meio de reação contendo: 130mM de KCl e 10mM de Tris-HCl pH 7,4 (meio I), foram adicionados 10mM de citrato de sódio, 20µL de diferentes concentrações dos extratos, suspensão de mitocôndria extraída de fígado de rato (1mg de proteína/mL de suspensão) e 50µM de sulfato ferroso amoniacal. A reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Para determinação do MDA formado, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 1% (preparado em NaOH 0,05M), 0,1mL de NaOH 10M e 0,5 mL de H_3PO_4 20% foram adicionados, em seguida incubou-se a reação por 20 minutos a 80°C. O complexo MDA-TBA foi extraído com 2 mL n-butanol as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos, e foi medida a absorvância do sobrenadante por espectrofotometria em 535 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Determinação da atividade queladora do íon ferro

A quelação do íon ferro pelos ES e ET foi determinada utilizando a batofenantrolina (BPS) um forte quelador de íon ferro. Para a medida da atividade queladora, 20 µL de cada extrato em diferentes concentrações e 10 µL de sulfato ferroso amoniacal 50 µM foram adicionadas em 2 mL de meio I. Após 15 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 10 µL de BPS 0,2 mM. A reação foi incubada novamente por 15 minutos à temperatura ambiente e a absorvância foi determinada pela mudança colorimétrica em 530 e 700 nm (UYEMURA, 2007). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

Análise estatística dos resultados

As concentrações dos extratos de *Azadirachta indica* que inibem o processo oxidativo em 50% (IC_{50}) foram estimadas pelo software GraphPad Prism®, versão 4.00 de abril de 2003, utilizando uma curva hiperbólica (one site binding hyperbola). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão médio (EPM).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entre os alvos biológicos do estresse oxidativo, os lipídios estão entre as principais biomoléculas envolvidas (UYEMURA, 2007). A inibição da LPO foi concentração dependente

para ambos os extratos. A linearidade do ES e do ET apresentou-se entre 0,04 e 3,0 $\mu\text{L/mL}$, com valores de IC_{50} de 0,972 $\mu\text{L/mL}$ e 1,035 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente. As porcentagens máximas de inibição da LPO foram de 91,5 % para o ES e de 93,27% para o EOT utilizando a concentração de 6,0 $\mu\text{L/mL}$ no meio reacional. Para a atividade queladora de Fe^{2+} a linearidade encontrada foi de 0,5-5,0 $\mu\text{L/mL}$ para ES e de 0,5- 2,5 $\mu\text{L/mL}$ para ET. Em adição, ambos os extratos apresentaram atividade concentração-dependente com valores de IC_{50} de 3,17 $\mu\text{L/mL}$ e 2,15 $\mu\text{L/mL}$ para ES e ET, respectivamente. Estes resultados demonstram que ambos os extratos foram eficientes na diminuição dos produtos finais da lipoperoxidação e na quelação de ferro. Os resultados também demonstraram que houve diferença de atividade entre os extratos dependendo da metodologia antioxidante avaliada, indicando que o método de preparo pode influenciar no tipo e quantidade de compostos presentes no extrato gerando diferente ação antioxidante.

CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que a atividade antilipoperoxidativa apresentada pelos extratos metanólicos de NEEM pode ocorrer por sequestro de radicais livres que são formados durante a peroxidação, como também, pela capacidade dos extratos em reduzir a disponibilidade do íon ferro, prevenindo a formação dos radicais lipídicos e a propagação da peroxidação lipídica. Em adição, verificou-se que o método de obtenção do extrato pode influenciar na atividade antioxidante da planta. Assim sendo, o mesmo apresentou uma possível aplicação em patologias relacionadas com a peroxidação lipídica.

Agências de Fomento: Fundação Araucária e CNPq.

REFERÊNCIAS

- BARBOSA, K.B.F; COSTA, N.M.B; ALFENAS, R.C.G; DE PAULA, S.O; MINIM, V.P.R; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, 23, p.629-643, 2010.
- BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.M; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, 29, p.113-123, 2006.
- CASAGRANDE, R.; GEORGETTI, S.R.; VERRI, W.A., JR; JABOR, J.R.; SANTOS, A.C.; FONSECA, M.J.V. Evaluation of functional stability of quercetin as a raw material and in different topical formulations by its antilipoperoxidative activity. **AAPS PharmSciTech**, 7,p.E1-E8, 2006.
- MAHMOUD, M.F.; SHOEIB, M.A. Sterilant and oviposition deterrent activity of neem formulations on Peach fruit fly *Bactrocera Zonata* (Saunders) (Diptera: Tephritidae). **Journal of Biopesticides**, 1, p.177-181, 2008.
- MEENA, H.; PANDEY, K.H.; PANDEY, P.; ARYA, M.C.; AHMED, Z. Evaluation of antioxidant activity of two important memory enhancing medicinal plants *Baccopa monnieri* and *Centella asiatica*. **Indian Journal of Pharmacology**, 44, p.114-117, 2012.
- UYEMURA, V. T. **Efeito do extrato de *Tamarindus indica* L. sobre a transição da permeabilidade de membrana em mitocôndrias isoladas de fígado de rato e atividade antioxidante *in vitro***. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, Brasil, 2007.