

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE ESPÉCIES
AMAZÔNICAS DA FAMÍLIA LAURACEAE

Bolsista: Deborah da Silva Braz, CNPQ

MANAUS
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-E/0016/2008
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DE ESPÉCIES
AMAZÔNICAS DA FAMÍLIA LAURACEAE

Bolsista: Deborah da Silva Braz
Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

MANAUS
2009

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Grupo de Pesquisa de Química de Biomoléculas da Amazônia e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida no Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia, onde se caracteriza por promover a geração de biotecnologia na Amazônia por meio da interação transversal entre a química e as áreas de biologia, agronomia e farmacologia, atuando na pesquisa básica e aplicada, com ênfase na formação de recursos humanos de alta qualidade.

RESUMO

A família Lauraceae é uma das mais importantes famílias botânicas na Amazônia, uma vez que tem uma ampla utilização econômica e potencial de produção de importantes classes de metabólitos especiais; principalmente como antioxidantes: substâncias envolvidas na prevenção de desenvolvimento de patologias e retardamento do envelhecimento celular. Extratos de algumas espécies nunca antes estudadas foram quimicamente analisadas quanto a sua atividade antioxidante: inibição frente aos radicais livres DPPH• e ABTS•⁺; e determinação total de compostos fenólicos. Os resultados indicam que as espécies de *Licaria cannella angustata*, *Licaria martiniana*, *Mezilaurus duckeii*, *Mezilaurus itauba*, *Pleurotyrium vasquezii* e *Sextonia rubra* foram as que apresentaram uma alta atividade antioxidante referente a todos os testes aplicados, apresentando, portanto, uma utilização alternativa desta família na prevenção de doenças relacionadas com estresse oxidativo.

Palavras-chave: Lauraceae, antioxidante, estresse oxidativo.

ABSTRACT

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Atividade antioxidante pelo ensaio em CCD.....	10
TABELA 1 – Atividades antioxidantes frente aos Radicais Livres DPPH* e ABTS*+ e concentração de fenólicos totais	11
GRÁFICO 1 – Correlação entre a capacidade antioxidante medida frente ao radical DPPH* x ABTS*+	12

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	8
3. METODOLOGIA	10
3.1 Coleta e extração.....	10
3.2 Ensaio DPPH• Qualitaivo.....	10
3.3 Ensaio DPPH• Quantitativo	10
3.4 Ensaio frente ao radical ABTS•+.....	10
3.5 Determinação de compostos fenólicos totais.....	10
4. RESULTADOS E DISCURSÃO.....	11
5. CONCLUSÕES	14
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	17

INTRODUÇÃO

A busca por espécies florestais pouco conhecidas são fundamentais na identificação de novas substâncias de interesse medicinal. Na região Amazônica, a família Lauraceae destaca-se por apresentar classes de metabólitos que têm demonstrado muita atividade biológica, como neolignanas, flavonóides e taninos (ZSCHOCKE, 2000). Merece destaque também por ser economicamente utilizada nas formas de óleos essenciais (QUINET & ANDREATA, 2002), na culinária, na fabricação de papel, marcenaria, construção civil, na indústria química e na medicina popular (MARQUES, 2001).

A família Lauraceae apresenta uma variedade apreciável de espécies, sendo distribuídas principalmente no Brasil e no sudeste da Ásia (SOUZA, 2005). Em espécies pertencentes a esta família, tem-se mostrado atividades biológicas como vermífugas, antibacterianas, antifúngicas, citotóxicas, inseticidas e antioxidantes (ZSCHOCKE, 2000).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs), são produzidas permanentemente nos organismos aeróbios a partir de fontes externas ou endógenas. São radicais livres importantes nos processos biológicos na produção de energia e fagocitose (BOREK, 1997). Porém, o aumento da concentração dessas substâncias reativas pode causar danos oxidativos - como estresse oxidativo, envelhecimento precoce e danos celulares - sobre componentes celulares e extracelulares, iniciando e promovendo doenças auto-imunes, cardiopatias, câncer, doenças de pulmão, inflamação e muitas outras. Segundo Anderson (2000), o peróxido de hidrogênio é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos às moléculas de DNA.

Portanto, a descoberta de novas substâncias com capacidade antioxidativa pode ser de grande relevância na inibição destes radicais livres, promovendo a prevenção terapêutica de doenças relacionadas com o aumento do estresse oxidativo, onde a procura de tais substâncias envolvem os princípios ativos de plantas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de algumas espécies amazônica da Família Lauraceae através de ensaios frente ao radical DPPH[•], ABTS^{•+} e determinação de compostos fenólicos.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As espécies da Família Lauraceae destacam-se entre as demais famílias botânicas pela sua importância econômica. Algumas espécies têm sido utilizadas pelas indústrias para a fabricação de diversos produtos, porém, a maioria das espécies tem seu uso restrito às comunidades tradicionais que detêm o conhecimento empírico da utilização dessas plantas (MARQUES, 2001)

A Lauraceae é uma das famílias mais importantes e também uma das mais difíceis na identificação de suas espécies. Possui distribuição mundial de aproximadamente 1900 espécies, cerca de 400 encontradas no Brasil, contribuindo assim com aproximadamente de 20% da biodiversidade (SHERPHED, 2000).

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva.

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que sofrem oxidação em detrimento de outra substância que seria importante que permanecesse no estado de oxidação natural, e isso se dá pelos mais diferentes mecanismos. Os organismos vivos possuem sistemas antioxidantes endógenos para manter a formação de radicais livres em níveis toleráveis (LONSDALE, 1986; GORDON, 1996).

Os polifenóis estão usualmente presentes em plantas como produtos do seu metabolismo. Entre uma de suas funcionalidades está à capacidade de proteger as plantas contra patógenos e predadores e principalmente contra o estresse fotossintético e formação de espécies reativas de oxigênio (LIMA, *et al*, 2007). Por estarem amplamente distribuídos nas mais diversas espécies de vegetais, os polifenóis constituem-se num importante componente da dieta humana (SCHULZ, *et al*, 2000; CIESLIK, *et al*, 1998). Baseado em sua estrutura química, os polifenóis podem ser divididos em pelo menos dez diferentes classes, sendo que as principais são os flavonóides, taninos, ácidos fenólicos e derivados.

Os flavonóides estão entre os antioxidantes fenólicos mais potentes de origem vegetal (NARAYANA, *et al*, 2001). Podem ser encontrados como agliconas livres ou na forma de O-heterosídeos ou C-heterosídeos. Subdividem-se em flavonas, catequinas, isoflavonas, flavonóis e antocianinas.

Estudos epidemiológicos têm mostrado correlação entre o consumo alto de compostos fenólicos e a redução do risco de enfermidades cardiovasculares, câncer, osteoporose, entre outras (SCHULZ, *et al*, 2006; LIMA, *et al*, 2007). Em geral, considera-se que os polifenóis desempenham efeitos benéficos na saúde através de vários mecanismos que incluem: (i) inibição direta de radicais livres, (ii) proteção e regeneração de outros antioxidantes e (iii) quelação de íons metálicos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1996).

Taninos que são compostos intensamente hidroxilados, insolúveis com carboidratos e proteínas, porém seu derivado, o ácido tânico, tem apresentado atividade antioxidante em reações oxidativas mediadas por íons metálicos (SCHULZ, *et al*, 2000).

Segundo Lima, *et al* (2007), esses polifenóis estão presentes nas plantas para protegê-las contra patógenos, predadores e principalmente contra o estresse fotossintético e formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Tais espécies são altamente instáveis e quimicamente reativas, desempenham papel importantíssimo no metabolismo celular, mas em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações em tecidos responsáveis por diversas doenças, como o câncer.

Em função da limitada capacidade do organismo de anular a atividade oxidativa das substâncias reativas, recomenda-se a ingestão de antioxidantes exógenos de origem alimentar que possam aumentar a proteção dos componentes celulares vitais e preservar assim sua função biológica.

METODOLOGIA

3.1 Coleta e extração das espécies

O material vegetal de algumas espécies da Família Lauraceae foram coletados na Reserva Florestal Adolfo Duck, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia. As partes aéreas foram separadas, limpas, secas trituradas e concentradas em evaporador rotatório, extraídas em etanol sob pressão reduzida, obtendo, portanto, o extrato bruto.

3.2 Ensaio DPPH• Qualitativo

Utilizaram-se para este ensaio o método descrito por Confort *et al.*, (2002), Wagner & Bladt (1996). Foram preparadas as soluções dos extratos etanólicos obtidos e padrão quercetina, em metanol HPLC, obtendo uma concentração de 10mg/mL. Em seguida, foram aplicadas em placas cromatográficas, seguidas da revelação com solução de DPPH• 0,3 mM, observando os extratos que tiveram o mesmo comportamento quando comparados com o padrão quercetina.

3.3 Ensaio DPPH• Quantitativo

Os extratos etanólicos e a quercetina, utilizada como substância padrão, foram diluídos em metanol HPLC, obtendo uma solução estoque a 1 mg/mL obtendo uma solução padrão de 1mg/mL, realizando, em seguida, diluições sucessivas de 1:1. As amostras diluídas foram lidas em leitor de microplaca a 517 nm para a obtenção do branco. Em seguida, foram submetidas à adição do reagente DPPH (0,3 mM), incubando a reação por 30 minutos em ambiente escuro. Os valores obtidos das absorbâncias foram convertidos em CS_{50} .

3.4 Ensaio frente ao radical ABTS•+

Os extratos etanólicos e o ácido ascórbico, utilizado com substância padrão, foram diluídos em metanol HPLC, obtendo uma solução padrão de 1mg/mL, realizando, em seguida, diluições sucessivas de 1:1. As diluições obtidas foram lidas em leitor de microplaca a 660 nm para a obtenção do branco. Após isto, foram submetidas ao reativo ABTS, realizando uma incubação por 7 minutos em ambiente escuro. Os valores obtidos após uma nova leitura em leitor de microplaca foram convertidos em percentual de atividade antioxidante.

3.5 Determinação de compostos fenólicos totais

Foram preparadas soluções em metanol HPLC com concentrações de 0,5 a 0,03125 μ g/mL do padrão ácido gálico e com os extratos apenas uma solução de 10 μ g/mL. As soluções foram submetidas à adição do reativo Folin-Ciocalteu e cinco minutos após, a adição da solução de bicarbonato de sódio. As leituras da reação foram realizadas após 90 minutos em espectrofotômetro UV a 724 nm. A concentração de fenóis totais foi obtida através da curva padrão do ácido gálico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O ensaio qualitativo de atividade antioxidante por cromatografia em camada delgada possibilitou a visualização de quais extratos possuem atividade frente ao radical DPPH, quando comparados com dois padrões: a quercetina (**bioflavonóides**) e o ácido gálico (**tanino hidrolisável**). O DPPH é um radical cromóforo que simula as espécies reativas de oxigênio (EROs), assim ele pode aceitar um eletrón ou radical hidrogênio para se tornar uma molécula estável. De acordo com BOILS (1958) possui uma coloração violeta intenso e quando aplicado em placa cromatografia em forma de solução alcoólica, ela adquire uma coloração amarelo ouro que caracteriza a presença de substâncias com atividade antioxidante (CONFORT *et, al*, 2002 e WAGNER e BLADT, 1996).

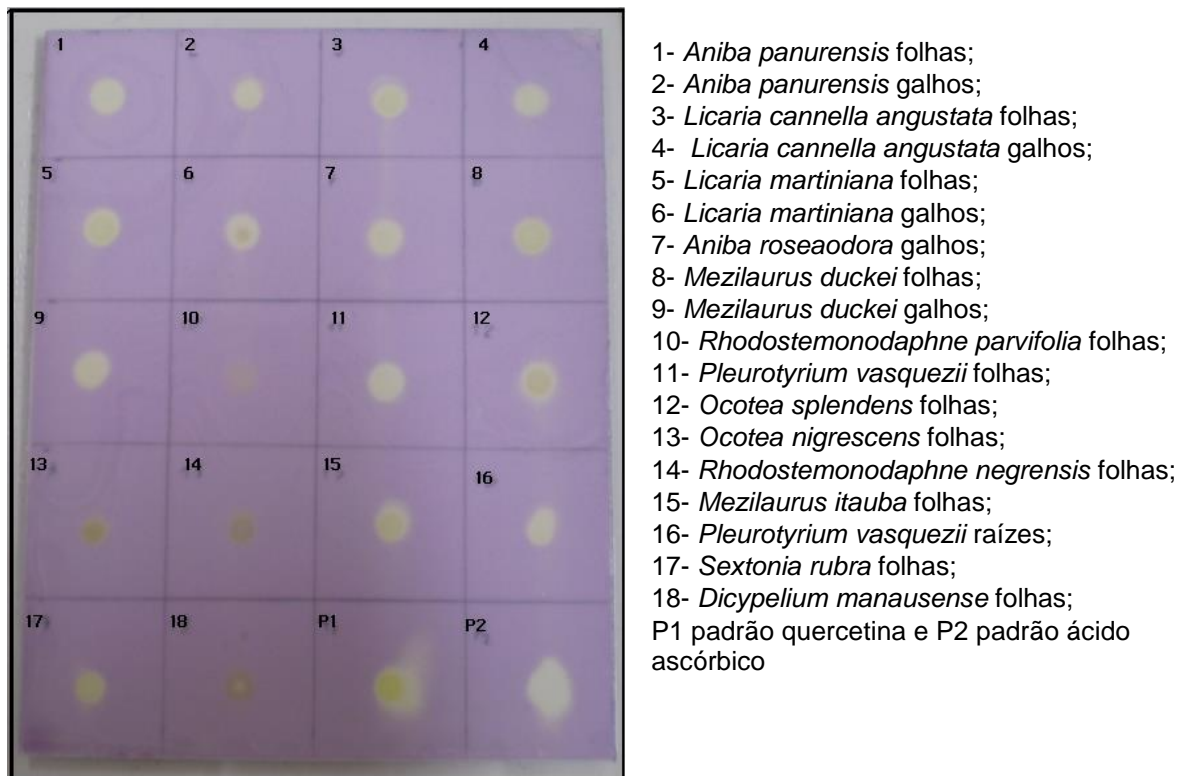


Figura 2 – Atividade antioxidante pelo ensaio de cromatografia em camada delgada

De acordo com a figura 1, observa-se a presença de substâncias com atividade antioxidante nos extratos etanólicos testados, comparados com os padrões. Todos os extratos possuem grande potencial antioxidante, exceto os extratos dos gêneros *Rhodostemonodaphne*, *Dicypelium* e *Ocotea*.

A tabela 1 possui os dados obtidos pelos ensaios quantitativos frente aos radicais DPPH^{*}, ABTS^{**} e determinação de compostos fenólicos.

Tabela 1: Atividades antioxidantes frente aos Radicais Livres DPPH^{*} e ABTS⁺ e concentração de fenólicos totais para extratos etanólicos de espécies de Lauraceae

Espécies	DPPH [*]	ABTS ⁺	Fenóis totais
	(CS ₅₀) ¹ µg/mL ± DP	(AA%) ² µg/mL ± DP	(mgEAG/g) ³ ± DP
<i>Aniba panurensis</i> - folhas	14,37 ± 0,096	20,489 ± 0,600	90,289 ± 19,064
<i>Aniba panurensis</i> - galhos	27,585 ± 2,199	15,512 ± 0,850	110,525 ± 8,242
<i>Aniba roseaeodora</i> - galhos	2,209 ± 0,189	11,261 ± 0,298	89,465 ± 10,424
<i>Dicypellium manauense</i> - folhas	23,670 ± 1,475	59,145 ± 3,114	70,723 ± 7,626
<i>Licaria cannella angustada</i> - folhas	15,029 ± 0,361	12,686 ± 1,537	127,105 ± 5,003
<i>Licaria cannella angustada</i> - galhos	29,349 ± 0,249	35,136 ± 0,114	72,422 ± 4,746
<i>Licaria martiniana</i> - folhas	11,168 ± 1,416	10,954 ± 0,480	135,344 ± 7,702
<i>Licaria martiniana</i> - galhos	XXXXXXX	5,274 ± 0,279	184,82 ± 3,3453
<i>Mezilaurus duckei</i> - folhas	23,253 ± 0,556	12,096 ± 0,772	135,808 ± 18,641
<i>Mezilaurus duckei</i> - galhos	13,494 ± 0,484	13,212 ± 0,904	116,550 ± 10,209
<i>Mezilaurus itauba</i> - folhas	10,739 ± 0,240	7,406 ± 0,184	144,561 ± 8,080
<i>Ocotea nigrescens</i> - folhas	168,726 ± 21,798	59,949 ± 1,467	45,492 ± 3,843
<i>Rhodostemonodaphne parvifolia</i> - folhas	238,542 ± 5,699	151,885 ± 4,328	34,421 ± 2,595
<i>Pleurothyrium vasquezii</i> - folhas	XXXXXXX	7,529 ± 0,254	224,733 ± 3,554
<i>Pleurothyrium vasquezii</i> - raízes	XXXXXXX	20,931 ± 0,735	90,547 ± 9,886
<i>Sextonia rubra</i> - folhas	10,043 ± 0,317	16,499 ± 0,639	129,268 ± 7,626
<i>Sextonia rubra</i> - cascas	8,105 ± 1,152	6,972 ± 0,323	xxxxxx

Obs.: ¹CS₅₀: capacidade de seqüestro de radicais livres DPPH a 50% da amostra; ²AA%: Percentual de atividade antioxidante contra o radical ABTS; ³mgEAG/g: miligrama equivalente ao ácido gálico por grama de extrato.

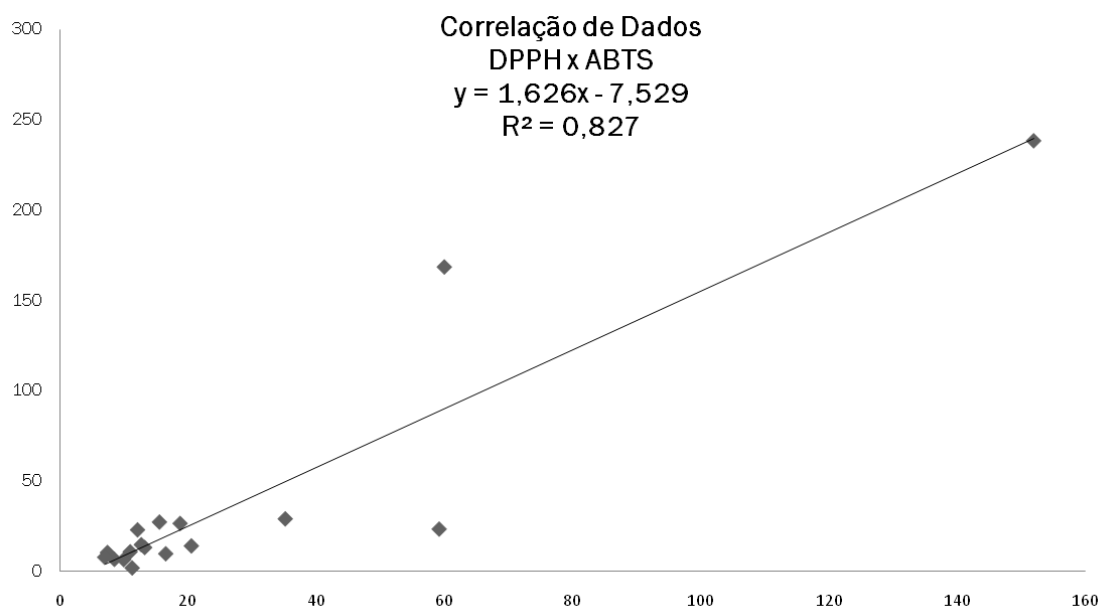
Quanto ao valores de capacidade de seqüestro, nota-se que os valores mais altos de CS₅₀ foram encontrados para os seguintes extratos etanólicos: *Rhodostemonodaphne parvifolia* folhas (238,542) e *Ocotea nigrescens* folhas (168,726), apresentando uma menor atividade antioxidativa, confirmando o ensaio qualitativo realizado anteriormente. A atividade antioxidante foi maior (isto significa um menor valor de CS₅₀) para os extratos da *Aniba panurensis*, *Sextonia rubra* e *Licaria martiniana*.

Para a o percentual de atividade antioxidante encontrado pelo ensaio frente ao radical ABTS⁺, foram utilizadas as mesmas interpretações que o método DPPH^{*}: quanto menor a concentração encontrada, maior o seu percentual de atividade antioxidante. Considerando no que diz a respeito na literatura (até 100 µg/mL considera-se um bom precursor de atividade antioxidante), tem-se que quase todos os extratos etanólicos apresentaram um bom percentual antioxidativo, tendo destaque para a espécie de *Licaria martiniana*.

A quantificação de fenóis totais presente nas amostras dos extratos etanólicos foi feita por meio na espectroscopia na região do visível pelo método de Folin-Ciocalteu com algumas modificações. O teor de fenóis totais foi determinado com a interpolação da absorbância das amostras contra a curva de calibração construída com padrão ácido gálico e foi expresso por mg/EAG (equivalente ácido gálico) por g de extrato. A equação de calibração obtida foi de $C = 6,472x + 0,019$, onde C é a concentração equivalente de ácido gálico na amostra, x absorbância lida em 724nm e o coeficiente de correlação de $R^2 0,9998$.

Os valores, representados na tabela 2, indicam um elevado teor compostos fenólicos confirmando o ensaio de DPPH quantitativo. Espécies como *Aniba panurensis* e *Licaria cannella angustata* confirmaram a existência de algum composto antioxidante que contribui particularmente e eficientemente no sequestro de radicais livres.

O gráfico 1 representa a correlação de dados entre a capacidade antioxidante medida frente ao radical DPPH[•] x ABTS^{•+}



Os compostos presentes em cada composto etanólico influenciam na atividade antioxidante e favorecem para respostas diferentes de acordo com a metodologia utilizada. Nos experimentos realizados, observou-se uma correlação entre os métodos DPPH e ABTS, encontrando $R^2=0,827$. Segundo Abe et.al. (2007), a variação no perfil dos compostos fenólicos pode resultar em diferentes respostas biológicas. Dessa forma, outros compostos podem estar agindo sinergicamente, contribuindo para os efeitos benéficos associados ao consumo dos extratos estudados.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos confirmam os estudos da literatura sobre a família Lauraceae, onde espécies pouco conhecidas desta família demonstraram grande atividade biológica, servindo para o desenvolvimento de novos medicamentos. Diante dos resultados obtidos, pode-se verificar que as espécies *Licaria cannella angustata*, *Licaria martiniana*, *Mezilaurus duckei*, *Mezilaurus itauba*, *Pleurotyrium vasquezii* e *Sextonia rubra* foram as que apresentaram uma alta atividade antioxidante referente a todos os testes aplicados. Além disso, a espécie de *Rhodostemonodaphne parvifolia* apresentou resultado negativo referente a todos os ensaios realizados. Diante dos testes apresentados, a atividade frente ao radical ABTS^{•+} foi o que melhor comprovou as atividades antioxidantes presente nos extratos estudados. Pode-se verificar também que os melhores resultados foram obtidos em amostras de folhas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABE, L. T. et al. Compostos fenólico e capacidade antioxidante de uvas *Vitis labrusca* e *Vitis vinifera* L. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v.27, n.2, p.394-400, 2007.
- CIESLIK, E.; GRE DA, A.; ADAMUS, W.; Contents of polyphenols in fruit and vegetables. *Food Chem.* 2006, 94, 135-142. ⁷Bravo, L.; Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 1998, 56, 317-333.
- BOREK, C. Antioxidants and cancer. *Science and Medicine*, v.4, p.52, 1997.
- FOLIN, O., CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophan determinations in proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, v.73, p.627, 1927.
- GORDON, M.H. Dietary antioxidants in disease. prevention. *Natural Products Report*, v.4, p.265-72, 1996.
- LIMA, S.M.V.; FONSECA, M.O.G.; DE FRANÇA, J.B.M.; MANFREDINI, V.; DA SILVEIRA, M.B.; TATSUO, L.; Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quim. Nova.* 2007, 30(5), 1323-1338.
- LONSDALE, D. Free oxygen radicals and disease. In: *A year in nutritional medicine*. 2. ed. Connecticut: Keats Publishing, 1986. p.1-29.
- MARQUES, C. A. *Importância Econômica da Família Lauraceae*. *Floresta e Ambiente*, Viçosa, v. 8, n.1, p.195-206, Jan./Dez., 2001.
- MENSOR, L. L. Serening of brazilian plant extract for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method *Phytother. Res.* 16,127, 2001.
- NARAYANA, M.; REDDY, S.; CHALUVADI, M.R.; KRISHNA, D.R.; Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology.* **2001**, 33, 2-16.

QUINET, A.; ANDREATA, R. H. P. *Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil*. Rodriguésia, Rio de Janeiro, v.53, n.82, p.59–121, 2002.

SCHULZ, J.B.; LINDENAU, J.; SEYFRIED, J.; DICHGANS, J.; Glutathion, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur. J. Biochem.* 2000, 267, 4904.

SHEPHERD, G. J.; *Conhecimento de Diversidade de Plantas Terrestres do Brasil*, Ed. Unicamp: São Paulo, 2000, p. 19.

SOUZA, V. C. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II/ Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

ZSCHOCKE, S.; DREWES, S.E.; BAUER, R.. *J. of Ethnopharmacology*, 2000,7, 1219-230.

