

Aplicação de uma metodologia de HPCL para avaliação do potencial antioxidante in vitro da planta Croton cajucara Benth a base da Xantina Oxidase

LARISSA SGARIA PACHECO¹
ÉDER MARCOLIN²
DINARA JAQUELINE MOURA³
NORMA ANAIR POSSA MARRONI⁴
JENIFER SAFFI⁵
MARC FRANÇOIS RICHTER⁶

RESUMO

A espécie *Croton cajucara Benth* (Sacaca) vem sendo utilizada popularmente como recurso medicinal no tratamento de várias doenças como Hipercolesterolemia e o Diabete Melittus, indicando uma provável ação antioxidante. O objetivo deste estudo é a aplicação de uma metodologia a base da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para determinar o potencial antioxidante in vitro da Sacaca através do sistema enzimático da Xantina Oxidase, um método rápido, eficaz e sensível. Os radicais hidroxila produzidos no teste, espécies reativas de oxigênio, são derivatizados em produtos estáveis 2,3- e 2,5-DHBA, que são detectados via HPLC. Observa-se uma atividade antioxidante in vitro do chá da casca da Sacaca que

¹Acadêmica do Curso de Farmácia/ULBRA - Bolsista BIC/FAPERGS

²Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia – UFRGS

³Aluna de Pós-Graduação, Departamento de Biofísica – UFRGS

⁴Professora do Curso de Biologia/ULBRA e do Programa de

Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA;

⁵Professora do Curso de Farmácia/ULBRA e do Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Genético e Molecular/ULBRA e Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA

⁶Professor – Orientador do Curso de Medicina/ULBRA e do Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada/ULBRA (marc.richter@ulbra.br)

é dependente da concentração e volume do chá. Estes resultados preliminares demonstram um eminente potencial antioxidante do *Croton cajucara Benth.*

Palavras-chave: *Croton cajucara Benth*, atividade antioxidante in vitro, xantina oxidase, HPLC.

ABSTRACT

Croton cajucara Benth (also called Sacaca) is popularly used as medical resources in several illnesses such as hypercholesterolemia and Diabetes mellitus, suggesting a possible antioxidant action. The aim of this study is to apply the high pressure liquid chromatography (HPLC) method for determination of the in vitro antioxidant activity of Sacaca using a method on the basis of xantine oxidase, a rapid, efficient and sensible test. Hydroxyl-radicals produced in this test, which are reactive oxygen species, are transformed with salicylic acid into two stable products 2,3- e 2,5-DHBA, which are detected by HPLC. An in vitro antioxidant activity of the bark of Sacaca can be observed, which depends on the concentration and amount of the tea. These preliminary results demonstrate a potential and important antioxidant activity of Croton cajucara Benth.

Key words: *Croton cajucara Benth*, in vitro antioxidant activity, xantine oxidase, high performance liquid chromatography.

INTRODUÇÃO

O envolvimento das espécies reativas de oxigênio (ERO) como fatores de lesão da membrana celular, ácidos nucleicos e proteínas constituintes da célula, gerando inúmeras doenças, vem se confirmando através dos atuais estudos (SALVADOR & HENRIQUES, 2004). A geração das Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) ocorre durante os processos de oxidação biológica, dentre os quais, podemos destacar a respiração celular na mitocôndria. A princípio, o oxigênio (O_2) é reduzido até água (H_2O), recebendo elétrons, mas em razão de sua configuração eletrônica, o oxigênio gera compostos intermediários altamente reativos como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\cdot}) (DEL MAESTRO, 1980; MENEGHINI, 1987). Estes radi-

cais livres de oxigênio, só são eliminados do organismo quando reagem com outro radical, ou com um sistema antioxidante (TRAVACIO & LLESUY, 1996).

Muitas plantas são citadas quanto aos seus efeitos antioxidativos (DAY et al., 2001). A espécie *Croton cajucara Benth* (Sacaca) da família Euphorbiaceae, é uma planta arbustiva encontrada frequentemente na região Norte do Brasil e vem representando um recurso medicinal de grande importância no tratamento de várias doenças (DI STASI et al., 1996). A atividade farmacológica do maior componente do extrato de sua casca, a trans-dehidrocrotônina, tem sido muito estudada, mostrando efeitos antiinflamatórios, analgésicos, antiulcerogênico, hipoglicêmico e hipolipidêmico (MACIEL et al., 2001), porém sua ação antioxidante exige maiores estudos e comprovações.

Inúmeros métodos vêm sendo aplicados para determinação do potencial antioxidante de compostos em ensaios laboratoriais (KARATAS et al., 2002) e uma tecnologia que vem sendo cada vez mais incorporada às rotinas científicas devido à sua apurada sensibilidade e eficiência é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC – High Performance Liquid Performance) (COLLINS et al., 1993).

Dentre as inúmeras enzimas envolvidas na geração de ERO, a xantina oxidase destaca-se como catalisadora da reação que converte a hipoxantina em xantina e, tendo por fim, a formação de ácido úrico. Neste processo, observa-se a produção de altos níveis de radicais livres (OWEN et al., 1996, 2000).

A testagem farmacológica, também chamada de “screening biológico”, envolve a observação dos efeitos induzidos pelos extratos de plantas ou pelos compostos purificados destes extratos em modelos *in vitro* e também em animais, seguida por uma análise mais detalhada de uma dada atividade (SCHULZ et al., 2002). Neste caso, é realizada uma série de ensaios biológicos direcionados para verificar uma determinada atividade biológica que é desejada. Alguns exemplos de “screening” farmacológico são: verificação de atividade anticâncer, atividade anti-inflamatória e atividade antioxidante. No presente projeto de pesquisa, o “screening” é baseado na busca de atividades antioxidantes *in vitro*, utilizando uma técnica a base da enzima xantina oxidase.

Durante o processo de hidroxilação da hipoxantina, que é transformado em xantina e depois em ácido úrico, a enzima xantina oxidase transforma o oxigênio em íons superóxido ($O_2^{\cdot-}$), além de transformar água em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), conforme esquema da Figura 1. Na presença de $Fe(2+)$, o íon superóxido reduz o $Fe(3+)$ à $Fe(2+)$, que reage numa segunda etapa com o peróxido de hidrogênio para formar os radicais hidroxila (OH^{\cdot}). Os radicais hidroxila formados neste ensaio são moléculas muito reativas (com uma meia vida curta) e suas concentrações poderiam dificilmente ser medidas diretamente. A metodologia para determinar a concentração destes radicais hidroxila é, portanto, indireta, baseada na reação dos radicais hidroxila com o ácido salicílico (Figura 2). No processo de hidroxilação do ácido salicílico, são formados dois compostos estáveis: 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5-DHBA) (Figuras 1 e 2), que podem facilmente ser medidos via HPLC utilizando um sistema de detecção UV. No ensaio padrão, adiciona-se um extrato de planta ou um composto puro, que (se possuir atividade antioxidante) competirá com o ácido salicílico na inativação de radicais livres. Assim, um menor número de radicais livres remanescentes reagirá com o ácido salicílico, existindo um princípio de competição entre o antioxidante do extrato e o ácido salicílico.

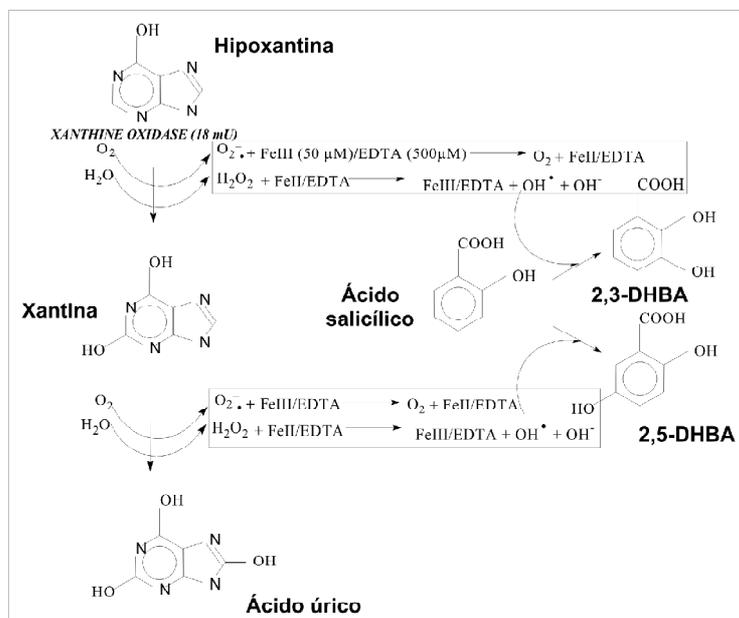


Figura 1 – Esquema da formação dos radicais hidroxila, baseado na hidroxilação da hipoxantina e a reação destes com o ácido salicílico (OWEN et al., 1996).

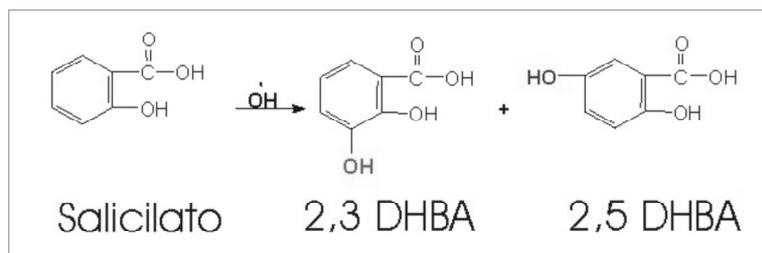


Figura 2 – Reação do ácido salicílico com os radicais hidroxila, resultando na formação dos dois produtos estáveis 2,3- e 2,5-DHBA.

Este ensaio foi descrito pela primeira vez por Owen e colaboradores (1996, 2000), para determinar o potencial antioxidante *in vitro* de compostos fenólicos e squaleno em óleo de oliva. Recentemente, o mesmo ensaio foi utilizado para avaliar a atividade antioxidante de compostos fenólicos em *Anacardium occidentale*, popularmente também chamado de caju (TREVISAN et al., 2006). Tra-

ta-se de um teste relativamente fácil, que pode ser utilizado em um “screening biológico” para a busca de extratos brutos e frações de plantas com forte atividade antioxidante *in vitro*.

O presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante da planta *Croton cajucara* Benth através de metodologia *in vitro* a

base da enzima xantina oxidase, por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), tornando-se um método rápido, eficaz e reprodutível.

MATERIAL E MÉTODOS

Os solventes metanol e ácido acético foram obtidas da empresa Merck (Rio de Janeiro). Os compostos hipoxantina, ácido salicílico, 2,3- e 2,5-dihidroxi-ácido-benzóico (2,3-DHBA e 2,5-DHBA) e ácido úrico, foram compradas na empresa Sigma (São Paulo), e EDTA foi adquirida da empresa Merck (Rio de Janeiro). A enzima xantina oxidase também foi comprada na empresa Sigma (São Paulo).

A planta *Croton cajucara* Benth foi obtida de Santarém, Amazonia, Brasil. Os extratos aquosos (EA) foram obtidos pela fervura por 10 min da casca triturada do *Croton cajucara* Benth em água Milli-Q e posterior filtragem por filtro de papel. Foram preparados. Após o extrato foi colocado no gelo, até posterior uso no teste antioxidante *in vitro*.

Para a realização do ensaio da atividade antioxidante *in vitro*, utilizou-se o método enzimático da Xantina Oxidase, segundo descrito por Owen et al. (1996, 2000).

Este ensaio antioxidante consiste na incubação de um mix, contendo hipoxantina, Fe(III), EDTA e de ácido salicílico, e da enzima xantina-oxidase (4 μ l), em tubos eppendorf dentro de um banho-maria de 37 °C durante 3 horas, na presença do extrato ou chá da planta de interesse. Acrescentou-se o extrato aquoso da Sacaca em concentrações de 1%, 2%, 4%, 5% e 10% e volumes de 25, 50, 100, 250 e 400 μ l. Como

amostras controles foram utilizadas 1) mix com enzima, sem extrato aquoso da planta, 2) mix sem enzima, sem extrato aquoso da planta e 3) amostras com mix e extrato aquoso da planta, mas sem enzima.

Foram analisados, via HPLC constituído por um módulo de separação 2695 e detector 2487 (Waters), 30 μ l de cada amostra. Utilizou-se uma coluna de fase reversa μ Bondapack C18 (300 x 3,9 mm – 4 μ m, Waters), um pré-filtro de fase reversa (10 x 3,9 mm – 4 μ m, Waters) e a análise foi feita utilizando um gradiente a base dos solventes água/ácido acético (95:5) e metanol, com fluxo de 1 ml/min durante 21 minutos. A detecção do 2,3-DHBA e do 2,5-DHBA procedeu-se em 325 nm. Em paralelo, as amostras foram analisadas em um comprimento de onda de 278 nm para monitorar e determinar a quantidade de ácido úrico, o produto da reação enzimática, o que comprova ação enzimática. Assim, foram obtidas as áreas dos compostos de interesse e os respectivos tempos de retenção. Ressalta-se que, quanto maior a área de um pico (representando um determinado composto), maior sua quantidade na amostra que foi analisada via HPLC.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através das análises cromatográficas (Figura 3) podemos observar a dos compostos 2,5-DHBA e 2,3-DHBA através dos picos específicos com tempos de retenção de 9,478 min e 11,912 min, respectivamente (Figura 3B). Para afirmar que os picos apresentados são relativos aos compostos DHBA's foram realizadas cromatografias utilizando-se os

compostos 2,3 e 2,5-DHBA padrão (substância pura) previamente, definindo de antemão seus tempos de retenção que são praticamente invariáveis, tendo apenas variação

de área de gráfico devido a ação das substâncias antioxidantes. Já uma amostra sem a adição de enzima não leva a formação dos respectivos compostos (Figura 3A).

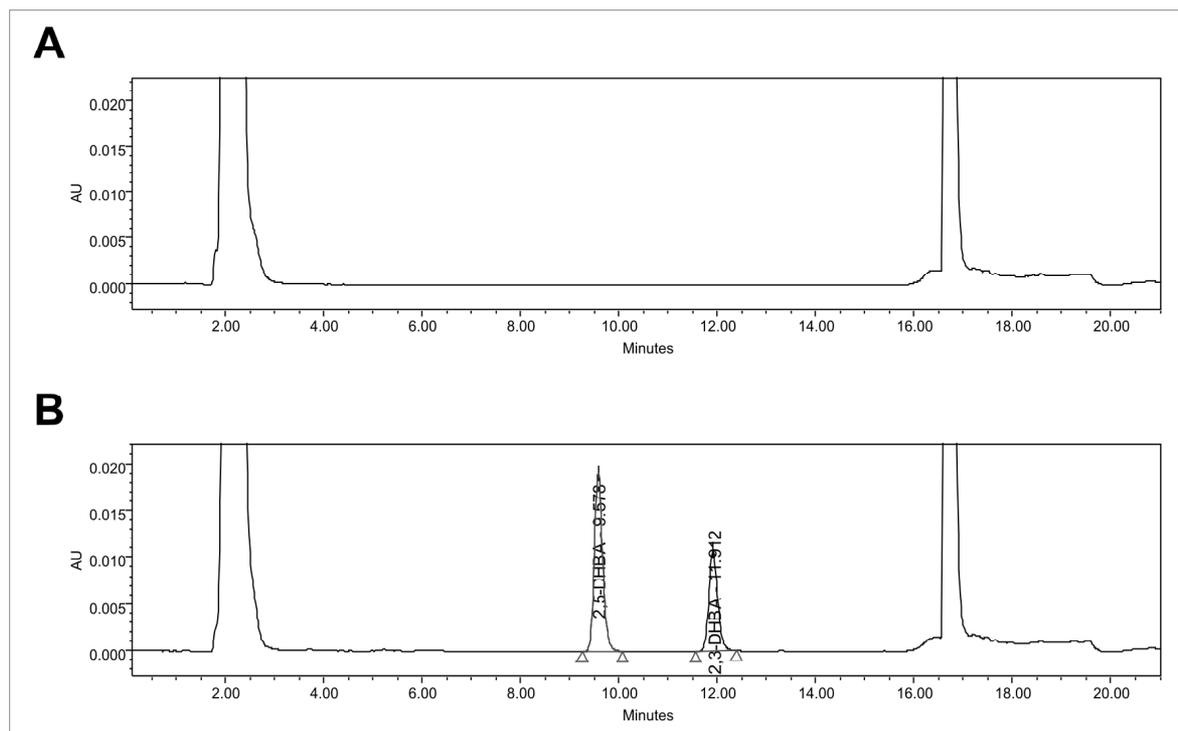


Figura 3 (A-B) – Cromatogramas das amostras: (A) Mix sem enzima, e sem extrato; (B) mix com enzima, e sem extrato. Neste cromatograma podem ser visualizados os dois picos representando os compostos 2,5-DHBA e 2,3-DHBA, respectivamente, com os tempos de retenção de 9,478 min e 11,912 min, respectivamente.

A formação dos dois compostos derivatizados de interesse (2,3- e 2,5-DHBA), visualizados através dos respectivos picos no cromatograma na presença do extrato aquoso (EA) da casca do *Croton cajucara* Benth e o seu potencial antioxidante podem ser observados na Figura 4. Na primeira parte desta figura (Figura 4A), observamos o cromatograma padrão da amostra com enzima e sem o EA, sendo utilizado para conhe-

cer o tempo de retenção de ambos compostos de interesse. A ausência de picos (relativos a moléculas detectadas) na região de interesse, que interfeririam nas análises dos picos de interesse, pode ser visualizada na Figura 4B. Já a Figura 4C, que tem a presença da enzima e a presença de extrato (250 μ l de uma solução de 4% de chá da casca da Sacaca) enzima, mostra a formação dos dois produtos de interesse (2,3- e 2,5-

DHBA). Observa-se uma área reduzida para estes dois picos, comparada com os picos da Figura 4A, na qual não se adicionou EA.

Analisando todos os resultados das áreas dos picos obtidos a partir dos cromatogramas dos ensaios enzimáticos da Xantina Oxidase com EA

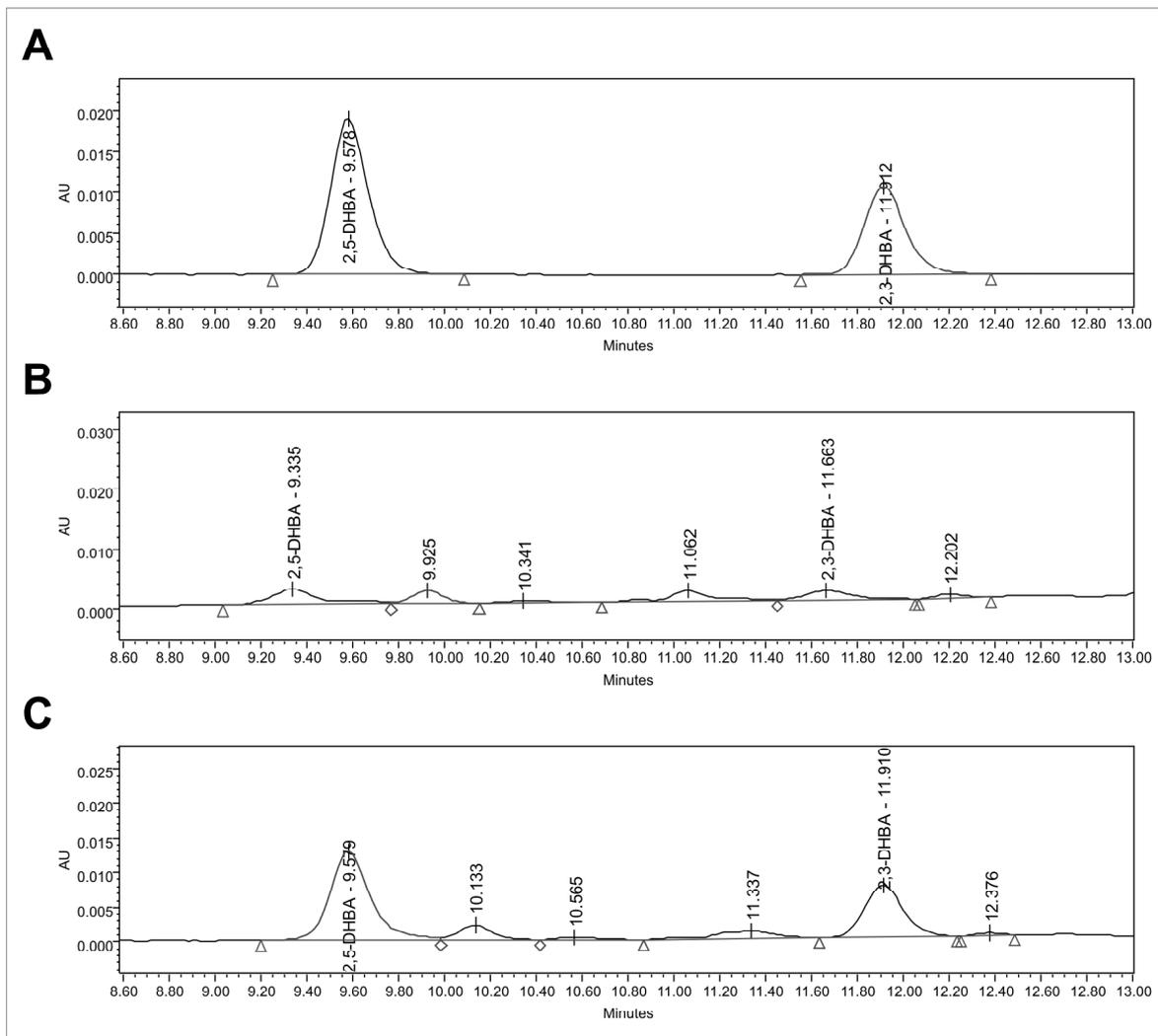


Figura 4 (A-C) – Cromatogramas das amostras: (A) Mix com enzima, e sem extrato; (B) mix sem enzima, e com extrato como controle. A indicação de 2,3- e 2,5-DHBA neste cromatograma é feito automaticamente pelo programa de gerenciamento Em-Power, e não poder ser removido manualmente. Nestas amostras, com a falta da enzima não tem é produzido 2,3- e 2,5-DHBA ; (C) mix com enzima, e com extrato.

de Sacaca nas concentrações de 1%, 2%, 4%, 5% e 10% e nos volumes de 25, 50, 100, 250 e 400 μl , podemos verificar que o *Croton cajucara* Benth apresenta atividade antioxidante *in vitro*, de forma dose-resposta, ou seja, dependente de volume e da concentração utilizados. Como exemplo, pode-se observar na Figura 5E, que em uma concentração de 10% e volume de 400 μl houve uma redução na formação de espécies

reativas de aproximadamente 80%, comprovando sua ação antioxidante do tipo “scavenger”.

A varredura de radicais livres de oxigênio com as diferentes concentrações e volumes de EA de Sacaca podem ser observadas individualmente e inter-relacionadas nas Figuras 5 e 6, respectivamente. Cada ponto, nestes diagramas, é a média de três experimentos independentes.

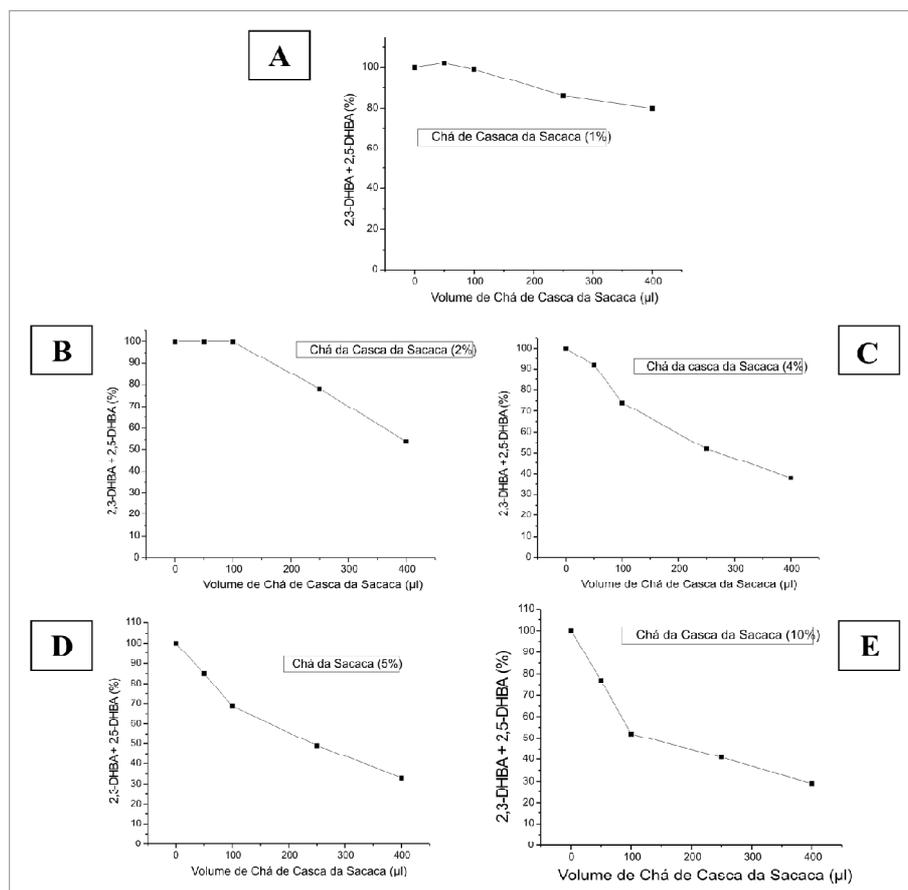


Figura 5 (A-E) – Potencial antioxidante do *Croton cajucara* Benth: (a) de uma solução de 1% da casca da Sacaca; (b) de uma solução de 2% da casca da Sacaca; (c) de uma solução de 4% da casca da Sacaca; (d) de uma solução de 5% da casca da Sacaca; (e) de uma solução de 10% da casca da Sacaca. Para cada tipo de chá forma testado volumes de 50, 100, 250 e 400 μl dentro de um volume total de 1 ml.

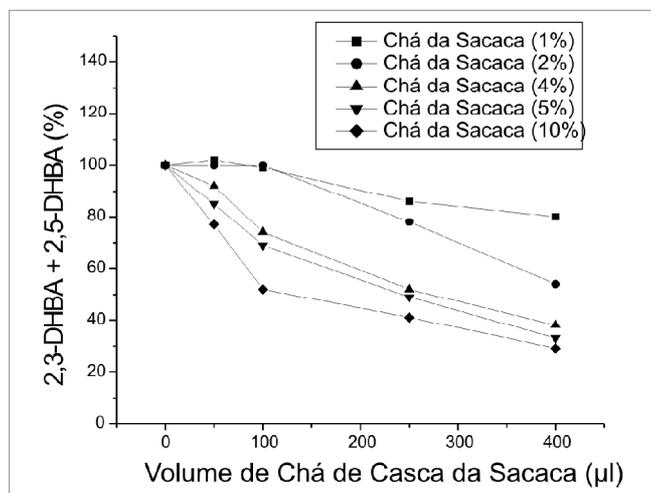


Figura 6 – Comparação do potencial antioxidante do *Croton cajucara* Benth de soluções de 1, 2, 4, 5 e 10% chás da Sacaca.

CONCLUSÕES

Os resultados apresentados indicam que o ensaio *in vitro* enzimático da Xantina Oxidase trata-se de uma metodologia fácil, aplicável e sensível para determinar atividades antioxidantes de extratos e/ou chás de plantas utilizando um equipamento fidedigno como o HPLC. A outra grande vantagem dessa técnica é o uso de quantidades muito pequenas de amostras, o que se torna de grande interesse nos estudos com produtos naturais. O extrato de *Croton cajucara* Benth mostrou claramente uma atividade antioxidante *in vitro*, sendo dependente tanto em concentração como em volume.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas: Unicamp, 1993. 270p.

DAY, A. et al. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. **Free Radicals Research**, v. 35, p. 941-952, 2001.

DEL MAESTRO, R.F. An approach to free radicals in Medicine and Biology. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 492, p. 153-168, 1980.

DI STASI, L.C. Plantas medicinais: arte e ciência. In: DI STASI, L.C. (Org.). **Plantas medicinais: arte e ciência**. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, 1996. p.9-14.

KARATAS, F.; KARATEPE, M.; BAYSAR, A. Determination of free malondialdehyde in human serum by high-performance liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 311, p. 76-79, 2002.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VIEGA, V.F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.

25, p. 429-438, 2001.

MENEGHINI, R. A. Toxicidade do Oxigênio. **Ciência Hoje**, v. 5, n. 28, p. 45-49, 1987.

OWEN, R.W.; WIMONWATWATEE. T.; SPIEGELHALDER, B. A high performance liquid chromatography system for quantification of hydroxyl radical formation by determination of dihydroxy benzoic acids. **European Journal of Cancer Prevention**, v. 5, p. 233-240, 1996.

OWEN, R.W.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSCH, H. Generation of reactive oxygen species by the faecal matrix. **Gut: An International Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 46, p. 225-232, 2000.

SALVADOR, M.H.; HENRIQUES, J.A.P. (Org). **Radicais livres e a resposta celular ao estresse**

oxidativo. Canoas. Ed. ULBRA, 2004. 200p.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. Agentes que aumentam a resistência a doenças. In: **FITOTERAPIA Racional – um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. 4. ed. São Paulo: Ed. Manole, 2002. p.783.

TRAVACIO, M.; LLESUY, S. Antioxidant enzymes and their modification under oxidative stress conditions. **Ciência e Cultura – Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 48, p. 9-13, 1996.

TREVISAN, M.T.S. et al. Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p.188-197, 2006.