

AValiação ANTIOXIDANTE DE FLAVONOIDES DE *Citrus* sp.

Stephan Oliveira Ribeiro¹; Tânia Toledo de Oliveira²; Ricardo Antônio Zatti³;
Sílvia Ribeiro de Souza e Silva³; Tanus Jorge Nagem⁴

Resumo: *Os antioxidantes são substâncias capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres, antes que esses ataquem os alvos biológicos nas células. Estudos têm indicado o papel importante dos radicais livres como grandes responsáveis pelo envelhecimento e por patologias degenerativas. Dentre as diversas classes de antioxidantes de origem natural, os flavonoides têm recebido muita atenção nos últimos anos, especialmente os provenientes de Citrus sp. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a capacidade antioxidante dos flavonoides naringina, naringenina e rutina. A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, por meio da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. O comportamento cinético da reação do DPPH demonstrou que os níveis de DPPH remanescentes nas amostras de rutina e controle positivo foram inferiores a 15%; naringina, em torno de 80%, e naringenina não apresentaram aumento significativo do consumo. Os resultados descritos estimulam a continuidade dos estudos in vitro e in vivo da ação antioxidante dos flavonoides naringina e rutina e o desenvolvimento de medicamentos, a partir dessas substâncias.*

Palavras-chave: *antioxidantes; flavonoides; naringina; naringenina; rutina.*

Introdução

Nas últimas décadas, vários estudos têm indicado o papel importante dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e por patologias degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares (JEON *et al.*, 2007). Radicais livres desempenham papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando em excesso

¹ Graduando em Farmácia – FACISA – e-mail: ribeiro.stephan@gmail.com; ²
Professora do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular - UFV; ³Laboratório
Biofármacos – UFV; ⁴Professor do Departamento de Química – UFOP

podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações teciduais e até danos ao DNA. A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, que podem ter origem endógena ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Dessas últimas, destacam-se tocoferóis, ácido ascórbico, polifenóis, selênio e carotenóides. Os antioxidantes são substâncias capazes de estabilizar e desativar os radicais livres, antes que esses ataquem os alvos biológicos nas células. Dentre as diversas classes de antioxidantes de origem natural, os flavonoides têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipoxigenase.

Os flavonoides são polifenóis de origem vegetal, responsáveis por diferentes efeitos biológicos: antibacteriano, antiviral, anti-inflamatório, antialérgico, antioxidantes, quelantes de cátions divalentes, carreadores de radicais livres, ações vasodilatadoras, inibição da agregação plaquetária, diminuição da permeabilidade capilar e sobre a atividade de algumas enzimas (OLIVEIRA *et al.*, 1999). Naringina, naringenina e rutina são os principais flavonoides encontrados em espécies de *Citrus* sp. Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos vegetais e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila-DPPH, de coloração púrpura, que absorve a 515 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (R^+), o DPPH é reduzido, formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequente desaparecimento da absorção, podendo essa ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. O objetivo deste trabalho foi o de avaliar a capacidade antioxidante, pelo ensaio de DPPH, dos flavonoides naringina, naringenina e rutina (SOUZA *et al.*, 2007).

Material e Métodos

Foram utilizados solventes e reagentes de grau analítico. O radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), a naringina e naringenina foram adquiridos do Sigma Aldrich, a rutina, da Fluka Biochemika; e o butil-hidroxi-anisol (BHA), da Synth. As medidas da absorção foram feitas usando-se espectrofotômetro UV-Vis Micronal B562.

A avaliação qualitativa foi feita por CCD, usando-se BHA como padrão positivo de comparação. As placas foram eluídas com $CHCl_3$ /

MeOH (9:1) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65:30:5) e, após secagem, foram nebulizadas com solução a 0,4 mmol/L do radical DPPH, em MeOH. As placas foram observadas até o aparecimento de manchas amarelas, sob fundo de coloração púrpura, indicativo de possível atividade antio-xidante. A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo a metodologia descrita na literatura, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, por meio da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Essas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 515 nm, tendo-se como controle positivo o BHA.

Para a construção da curva de calibração do DPPH, foram preparados 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol, na concentração de 40 mg/mL, mantida sob refrigeração e protegida de luz. Foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 mg/mL. A curva de calibração foi construída, a partir dos valores da absorbância, a 515 nm de todas as soluções, medidas em cubeta de vidro com percurso óptico de 1 cm, tendo-se como branco o metanol. As medidas de absorbância foram feitas em triplicata e em intervalos de 1 minuto entre cada medida. Soluções dos flavonoides e do controle positivo em metanol foram diluídas nas concentrações 250, 200, 150, 100 e 50 mg/mL. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL de solução amostras ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH, na concentração de 40 mg/mL) foram feitas a 515 nm, no primeiro minuto e cada dez minutos, até completar 1 hora. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes.

Resultados e Discussão

A avaliação preliminar qualitativa dos flavonoides rutina, naringina e naringenina por CCD, em sílica gel, revelada com solução metanólica a 0,4 mmol/L do radical DPPH, sugeriu a existência de atividade antioxidante, evidenciada nos cromatogramas, pela presença de manchas amarelas, sob fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH.

Os resultados da avaliação quantitativa da rutina, naringina, naringenina e do controle positivo, nas concentrações 250, 200, 150, 100 e

50 mg/mL, determinada pelo ensaio do DPPH, estão apresentados na Figura 1, mostrando que os flavonoides rutina e naringina evidenciaram atividade sequestradora do radical DPPH; contudo, a naringenina foi o menos reativo nas cinco concentrações.

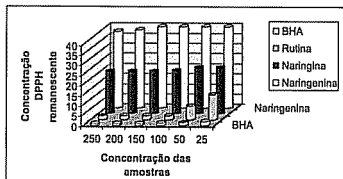


Figura 1 – Concentração de DPPH remanescente nas amostras de rutina, naringenina, naringina e controle (BHA), no tempo de reação com DPPH (30 min).

O comportamento cinético da reação do DPPH com cada flavonoide e com o controle, na concentração 100 mg/mL, é apresentado na Figura 2, por meio da curva dose resposta, relativa ao decréscimo de porcentagem remanescente do DPPH, em razão do tempo (min.). Observou-se que a amostra de rutina e o controle positivo apresentaram cinética rápida, atingindo praticamente o máximo de consumo de DPPH nos primeiros 10 minutos; a naringina demonstrou porcentagem de DPPH remanescente, em torno de 80%; e a naringenina não mostrou aumento significativo do consumo de DPPH, nem mesmo no longo do tempo total de observação (60 minutos).

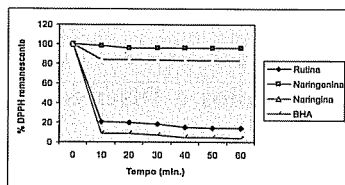


Figura 2 – Comportamento cinético dos flavonoides rutina, naringenina e naringina, na concentração 100 µg/mL, frente ao DPPH.

Conclusões

Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos, para avaliar a ação antioxidante dos flavonoides, em especial rutina e naringina.

Os flavonoides contribuem com importante potencial antioxidante para dieta. Embora outras pesquisas sejam necessárias, principalmente acerca ao mecanismo de ação, absorção, metabolização, excreção e toxicidade, os dados obtidos reforçam a importância dos flavonoides como antioxidantes, tanto em dietas como em terapias de suplementação antioxidante.

Referências Bibliográficas

JEON, S. M. *et al.* Hypcholesterolemic and antioxidative effects of naringenin. **Translational Research**, v. 149, n. 1, p. 16-21, 2007.

OLIVEIRA, T. T. *et al.* Ação antioxidante de flavonóides modificados. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 5, p. 879-883, 1999.

SOUZA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

