

Atividades Antioxidantes de Moléculas/Extratos de Plantas e Ações em Membrana Modelo e Estrato Córneo

Letícia Sá Oliveira, Antonio Alonso

Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, 74001-970, Brasil

lets_so@hotmail.com, alonso@if.ufg.br

PALAVRAS-CHAVE: **RPE, proteínas, membranas, radicais livres**

1 Introdução

Nos últimos anos tem crescido bastante o número de trabalhos relacionados à atividade de extrato de plantas em sistemas biológicos. O estudo dessas atividades medicinais tem crescido no Brasil devido à grande variedade da flora brasileira, estimada em mais de 40.000 espécies. Plantas produzem uma variedade de compostos antioxidantes, que combatem espécies reativas de oxigênio (EROs) contra danos moleculares. A capacidade antioxidante de um composto, seja quelando íons metálicos como o ferro ou sequestrando radicais livres, pode levar a uma inibição da peroxidação lipídica. Danos oxidativos em membranas dependem de vários fatores, tais como as interações do composto com membranas e proteínas. A avaliação da atividade antioxidante de compostos extraídos de plantas, bem como de alterações em membranas e proteínas tem fornecido informações importantes para alcançar novas formulações medicinais [1,2,3].

EROs, tais como o radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido, são produzidas como subprodutos em organismos aeróbicos, e têm sido envolvidas na patologia de uma série de doenças humanas, tais como câncer, aterosclerose, diabetes melitus, hipertensão, AIDS e no envelhecimento [4,5]. Radicais livres são moléculas instáveis que possuem elétrons desemparelhados e que necessitam adquirir elétrons de outras moléculas para atingirem a estabilidade. Sendo assim, eles reagem facilmente com compostos vizinhos oxidando-os [6]. Nos organismos vivos, a função dos antioxidantes é impedir que os radicais livres (formados a partir de reações das EROs) promovam danos às células e tecidos. Uma maneira, atualmente popular, de avaliar os efeitos antioxidantes de moléculas é baseada no uso de radicais livres estáveis, tais como o DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) [7].

Este método consiste em medir a concentração do radical livre DPPH, em contato com substâncias antioxidantes, por meio da técnica de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) ou da espectroscopia ótica. A medida que o efeito antioxidante é detectado a intensidade do espectro de absorção diminui [7].

Entretanto, o grande interesse pelas pesquisas com compostos extraídos de plantas não se restringe apenas a sua atividade antioxidante. Há um grande número de pesquisas relacionadas ao efeito de substâncias naturais com capacidade de aumentar a permeação da pele, visando viabilizar a liberação de fármacos através deste tecido [8,9]. A camada mais superficial da pele, o Estrato Córneo (EC) é a principal responsável pelo controle seletivo da permeabilidade da pele. Os aumentadores de permeação devem reduzir reversivelmente a barreira física do EC propiciando a passagem do fármaco de modo controlado. Estudos mostraram que os terpenos, compostos derivados de óleos essenciais de plantas, 1,8-cineol e L-mentol, podem promover significativas alterações em membranas de EC, além de aumentar a taxa de permeação do AZT (*Zidovautina*) – primeiro fármaco anti-HIV aprovado – em aproximadamente 100 vezes, o que é quase suficiente para viabilizar o tratamento transdérmico [10,11,12,13].

Estes estudos podem ser feitos usando uma técnica desenvolvida em nosso laboratório, a qual consiste em inserir moléculas marcadas (ou marcadores de spin) diretamente no tecido intacto do EC. Estas moléculas marcadas com o radical nítróxico geram sinais de RPE que permitem obter informações sobre o meio em que se encontram. Há moléculas marcadas específicas para membranas lipídicas, proteínas e outras que se difundem no tecido particionando nas membranas lipídicas. Em trabalho publicado em 2008, foi mostrado que o marcador se spin TEMPO (2,2,6,6-tetrametil-piperidina-1-oxil) o qual pode mimetizar um fármaco, se particiona nas membranas de EC e tanto a partição como o seu movimento rotacional no interior das membranas refletem as transições de fase das membranas. Também foi mostrado que os terpenos aumentam a partição e o movimento do marcador nas membranas e também diminuem as temperaturas de transições de fase.

1.1 Espectroscopia Ótica ou Espectrofotometria

Consiste em usar o espectro radiante para inspecionar sistemas biológicos, especialmente soluções. No procedimento básico, um feixe de energia atravessa a solução, e a sua absorção oferece informações sobre a qualidade e quantidade dos componentes do sistema.

A absorção da luz e tanto maior quanto mais concentrada for a solução por ela atravessada. E também quanto maior for a distância percorrida pelo feixe luminoso através das amostras.

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Sendo A a absorvância para um λ fixo, ϵ uma constante para um λ fixo, c a concentração da solução e l a distância percorrida pelo feixe através da amostra.

1.2 Ressonância Paramagnética Eletrônica

Desenvolvida por Zavoisky (1945), a técnica de RPE vem se mostrando de grande utilidade em estudos de estruturas de materiais devido à sua capacidade de gerar um sinal com intensidade proporcional à quantidade de spins desemparelhados em uma amostra. Destaca-se de outras técnicas de espectroscopia pelo fato de suas medidas serem mais sensíveis e por requerer pouca quantidade de amostra [18].

A RPE consiste em aplicar um campo magnético externo H sobre uma amostra que contenha elétrons desemparelhados, orientando, portanto, os dipolos magnéticos presentes na amostra em uma direção preferencial – mesma direção do campo aplicado (Figura 1).

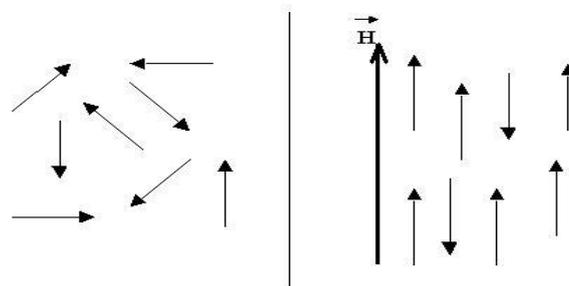


Figura 1. Fenômeno da Ressonância de Spin Eletrônico (ESR): Orientação dos dipolos magnéticos.

Os dipolos orientados no mesmo sentido que o campo têm uma diferença de energia

$$\Delta W = g\beta H \quad (2)$$

em relação a um dipolo equivalente orientado em sentido contrário (dois níveis de energia possíveis). A constante β é chamada de magneto de Bohr e vale, $9,27401 \times 10^{-24}$ J/T; enquanto que o chamado fator g é característico para cada composto ($g = 2,00232$ no caso de um elétron livre).

Além disso, a amostra é submetida à radiação de microondas de frequência ν . Quando a energia dos fótons incidentes na amostra ($h\nu$, onde h é a constante de Planck) for igual à diferença de energia, ocorre a transição do dipolo magnético de um nível para outro (Figura 2). Ao voltar para o estado anterior é liberada uma quantidade de energia em forma de radiação (efeito de relaxação). Assim, mantendo a frequência de radiação constante, e variando o campo magnético, é possível

obter um sinal (linha), na região do espectro onde ocorrem mudanças de níveis (Figura 3).

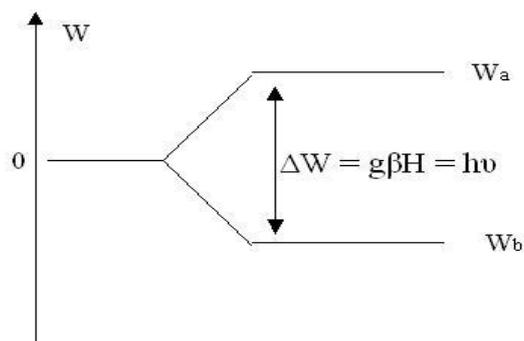


Figura 2. Fenômeno da RPE: Condição para ressonância.

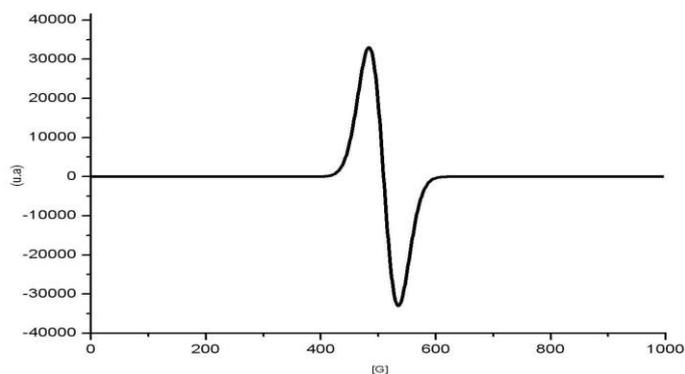


Figura 3. Espectro de RPE do elétron livre.

O elétron pode também sofrer a ação de um campo magnético gerado por núcleos vizinhos (interação nuclear hiperfina), aparecendo então, uma linha para cada momento nuclear (m_I) existente, todas de mesma intensidade. A separação entre as linhas é chamada de constante de desdobramento hiperfino (A), e representa a medida da intensidade da interação entre elétron e núcleo.

O formato da linha e a região do espectro que se encontra o sinal de ressonância são característicos de cada material e depende da natureza das interações presentes. Essa peculiaridade permite utilizar a técnica de ESR na microscopia e caracterização de materiais [17]. Já o estudo da intensidade do sinal de ressonância pode ser usado para a datação de fósseis, rochas e materiais arqueológicos, pelo método de dosimetria de radiações ionizantes e também na análise de radicais livres [17].

Devido à presença de elétrons desemparelhados, os radicais livres apresentam sinais de RPE, sendo possível verificar o comportamento de determinadas substâncias na presença de oxidantes e avaliar o seu efeito antioxidante.

1.3 DPPH

O DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidazina) (Figura 4) é um radical livre com um espectro de absorção característico. Quando a molécula passa do estado oxidado para o reduzido ocorre uma mudança no espectro de absorção, sendo possível monitorar as quantidades oxidadas e reduzidas.

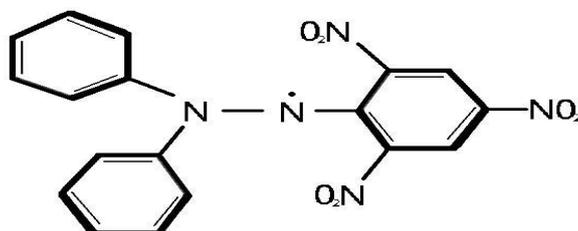


Figura 4. Molécula de 1,1-difenil-2-picrilhidazina (DPPH)

1.4 Membranas Biológicas

As membranas definem o limite externo das células e regulam o trânsito molecular e iônico por meio desse limite. As membranas são flexíveis, auto-selantes e seletivamente permeáveis aos solutos polares. A flexibilidade permite as alterações da forma que acompanham o crescimento celular e a movimentação (como o movimento amebóide). Como a permeabilidade das membranas é seletiva, elas podem reter certos compostos e íons dentro das células e de compartimentos intracelulares específicos, enquanto excluem outras substâncias desses locais.

1.4.1 Composição e Arquitetura das Membranas

As membranas são compostas por proteínas e lipídios polares, que respondem por quase toda a sua massa, e por carboidratos, presentes como parte de glicoproteínas e glicolipídios. As membranas são impermeáveis à maioria dos solutos polares ou eletricamente carregados, mas são permeáveis a compostos não polares.

As evidências combinadas da microscopia eletrônica e de estudos da composição, bem como os estudos físicos da permeabilidade e da mobilidade individual de moléculas de proteínas e lipídios dentro da membrana levaram ao desenvolvimento do **modelo do mosaico fluido** para a estrutura das membranas biológicas (Figura 5).

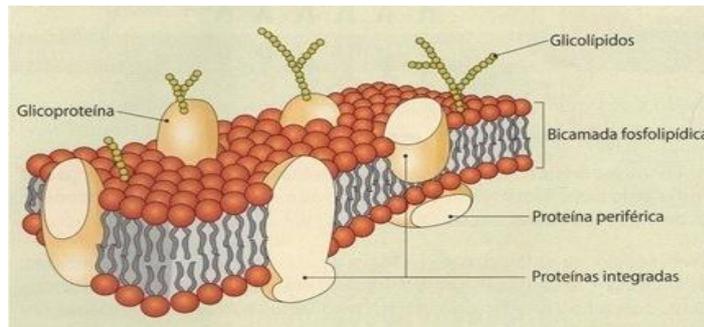


Figura 5. Modelo do mosaico fluido.

Os fosfolípidios formam uma bicamada (bicamada fosfolipídica ou lipídica) onde as regiões não-polares dessas moléculas, em cada uma de suas faces, estão orientadas para o centro da bicamada e os grupos polares para o exterior, interagindo com a fase aquosa em ambos os lados. Moléculas de proteínas estão incrustadas nessa estrutura trilaminar, mantidas por interações hidrofóbicas entre os lipídios da membrana e os domínios hidrofóbicos nas proteínas.

Quando misturados com água, os lipídios anfipáticos podem formar três tipos de agregados (Figura 6). As chamadas **micelas**: estruturas esféricas que são arranjadas com suas regiões hidrofóbicas agregadas no interior, de onde a água é excluída, e com seus grupos-cabeça hidrofílicos na superfície em contato com a água. A **bicamada**: nela duas monocamadas de lipídios (folhetos) formam uma lâmina bidimensional. E o **lipossomo (ou lipossoma)**: as bicamadas perdem suas regiões hidrofóbicas marginais e alcançam estabilidade máxima no ambiente aquoso, envolvendo a água e criando em compartimento aquoso separado.

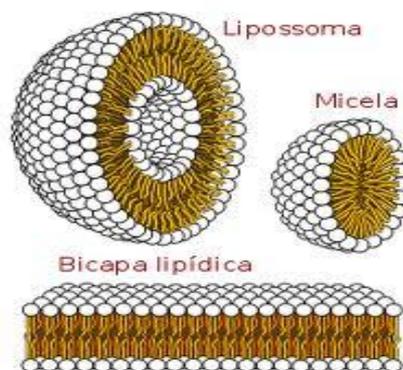


Figura 6. Agregados anfipáticos lipídicos que se formam na água.

1.4.2 Dinâmica das Membranas

Em uma membrana biológica, os lipídios podem estar em dois estados: líquido ordenado ou

líquido desordenado; no último estado, a movimentação térmica das cadeias acila torna fluido o interior da bicamada. A fluidez é afetada pela temperatura, pela composição em ácidos graxos e pelo conteúdo em esteróis.

Na maioria das membranas quando em temperatura fisiológica, a transposição de moléculas lipídicas de uma monocamada para a outra ocorre muito lentamente ou mesmo não ocorre. Essa transposição é chamada de movimentação transbicamada ou *flip-flop* e requer que um grupo-cabeça polar ou carregado deixe seu ambiente aquoso e mova-se para o interior hidrofóbico da bicamada em um processo com variação de energia livre grande e positiva.

Uma família de proteínas, chamadas **flipases**, facilita a difusão *flip-flop* fornecendo uma via através da membrana que é energeticamente mais favorável e muito mais rápida que a transposição não-catalisada.

2 Objetivos

Este trabalho tem como objetivo estudar por RPE a atividade antioxidante de moléculas extraídas de plantas ou de extratos de plantas de diversas regiões do Brasil, bem como suas atividades antioxidantes em membranas e proteínas do Estrato Córneo. Os compostos testados são: SF-1 (estrifnosídeo-F), Glaziovianina A, Chikusetsusaponina Iva, Solamargina, Solasonina, Guatambuina+Olivacina, Esmilagenina, Tigogenina + Hecogenina, Diosgenina, Gitogenina, Ácido oleanólico, D. Delicata. Alguns desses compostos já foram testados por outros pesquisadores em células cancerígenas, como a Glaziovianina, por exemplo. Nessa etapa visamos obter informações que auxiliem na seleção de novas substâncias com funções medicinais. Em uma segunda etapa, nosso objetivo é selecionar moléculas com possíveis princípios ativos e estudar os seus efeitos sobre a pele, usando a técnica de marcadores de spin em membranas lipídicas, proteínas do Estrato Córneo e em membranas artificiais de DMPC. Tentando assim descobrir novas moléculas que atuem como facilitadoras de permeação da pele. Um objetivo paralelo é desenvolver metodologias usando a espectroscopia de RPE para analisar efeitos sobre moléculas ou extratos de plantas, especialmente plantas do cerrado, sobre sistemas biológicos como membranas lipídicas, proteínas ou tecidos.

3 Metodologia

Todos os experimentos foram realizados no Laboratório de Biofísica do Instituto de Física da Universidade Federal de Goiás.

3.1 Atividades Antioxidantes

Foram testadas as atividade antioxidantes de soluções contendo moléculas extraídas de plantas em etanol. Nessa etapa, alíquotas de 40 μ L de solução contendo 1mM de DPPH em etanol, foram misturadas com 40 μ L de soluções contendo as moléculas antioxidantes. A solução resultante foi então agitada por cerca de 10 s. Para o controle, medidas de soluções contendo as moléculas extraídas de plantas foram substituídas por etanol (40 mL). A atividade antioxidante foi determinada por comparação com a amostra controle. A absorbância da solução foi lida em 515 nm e está convertida em unidades de concentração.

3.2 Efeitos em membranas lipídicas e proteínas do Estrato Córneo

A primeira parte dessa etapa consistiu em preparar membranas de Estrato Córneo a partir de ratos da raça Wistar com menos de 24h de vida, cedidos pelo Biotério da UFG. Seguindo o procedimento descrito por Queiroz e co-autores [15]. O tecido foi marcado com marcadores de spin lipídicos (derivados do ácido esteárico). Os marcadores de spin são moléculas paramagnéticas (contendo um elétron desemparelhado), geralmente o nitróxido que gera um sinal de RPE que reporta o comportamento do microambiente onde ele está inserido. A análise dos efeitos causados pelos diferentes compostos na dinâmica e na partição desses marcadores nas membranas e proteínas do Estrato Córneo foi feita a partir das análises espectrais de RPE, utilizando um programa de simulação de espectros, o *Non Linear Least Square* (NLLS).

3.3 Efeitos em membranas lipídicas artificiais

Foram preparadas membranas modelos de fosfolipídios dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) que foram marcadas com marcadores de spin lipídicos. As modificações promovidas pelos compostos extraídos de plantas, nas propriedades biofísicas das membranas, foram avaliadas por RPE.

4 Resultados

4.1 Atividade Antioxidante Analisada por Espectrofotometria

Os gráficos 1 e 2 mostram a atividade antioxidante dos compostos sobre o radical livre DPPH. Há uma redução na concentração desse radical para a maioria dos compostos, exceto para os

compostos: Chikusetsu e Guacitambuina. Nesses o efeito foi o contrário ao esperado, a concentração de DPPH aumentou.

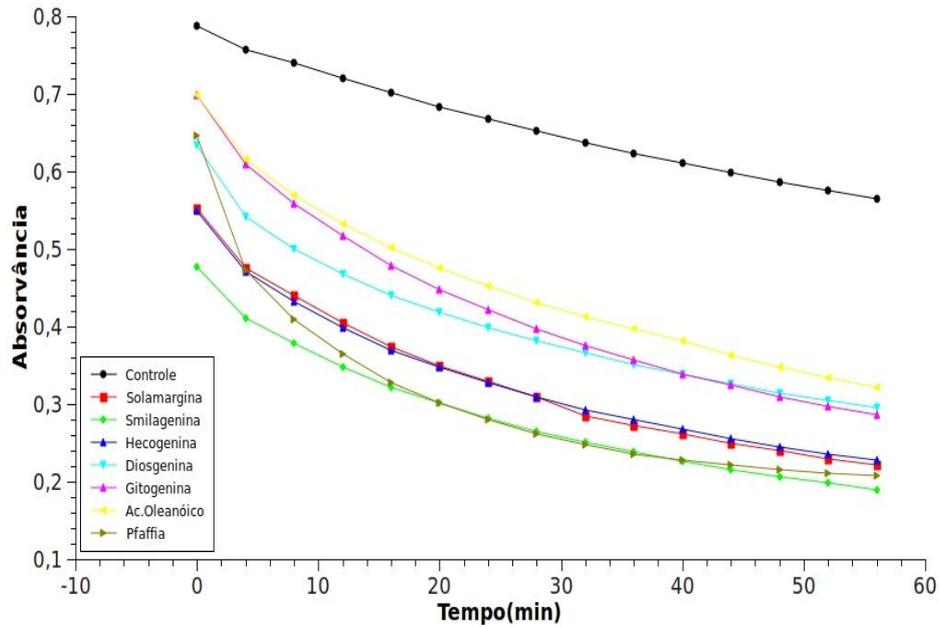


Figura 7. Atividade antioxidante dos compostos: Solamargina, Smilagenina, Hecogenina, Diosgenina, Gitogenina, Ac.Oleanólico e Pfaffia.

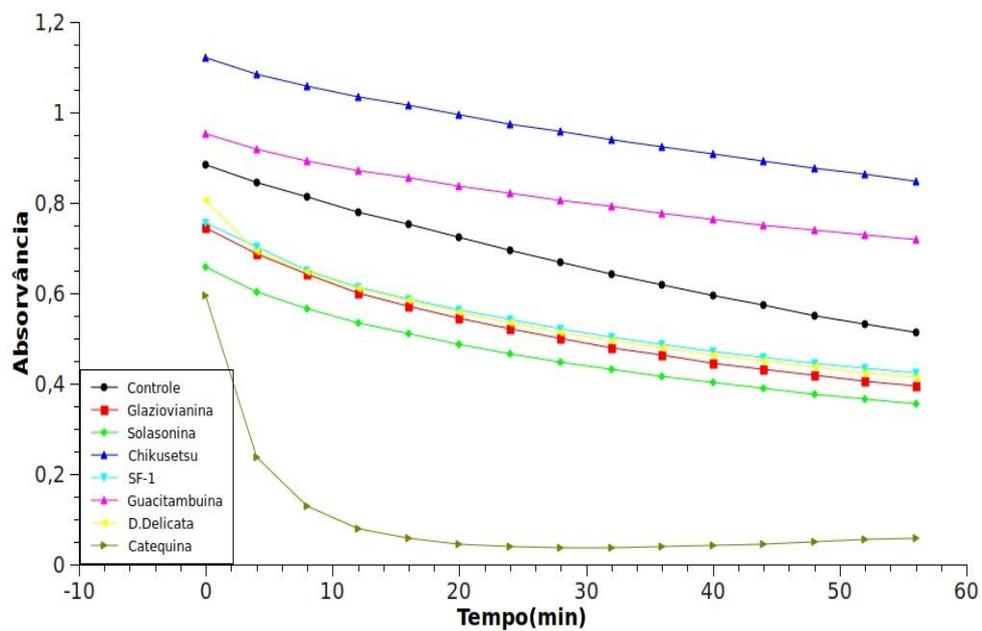


Figura 8. Atividade antioxidante dos compostos: Glaziovianina, Solasonina, Chikusetsu, SF-1, Guacitambuina, D. Delicata e Catequina.

O gráfico abaixo mostra a percentagem de neutralização de cada composto sobre o radical livre.

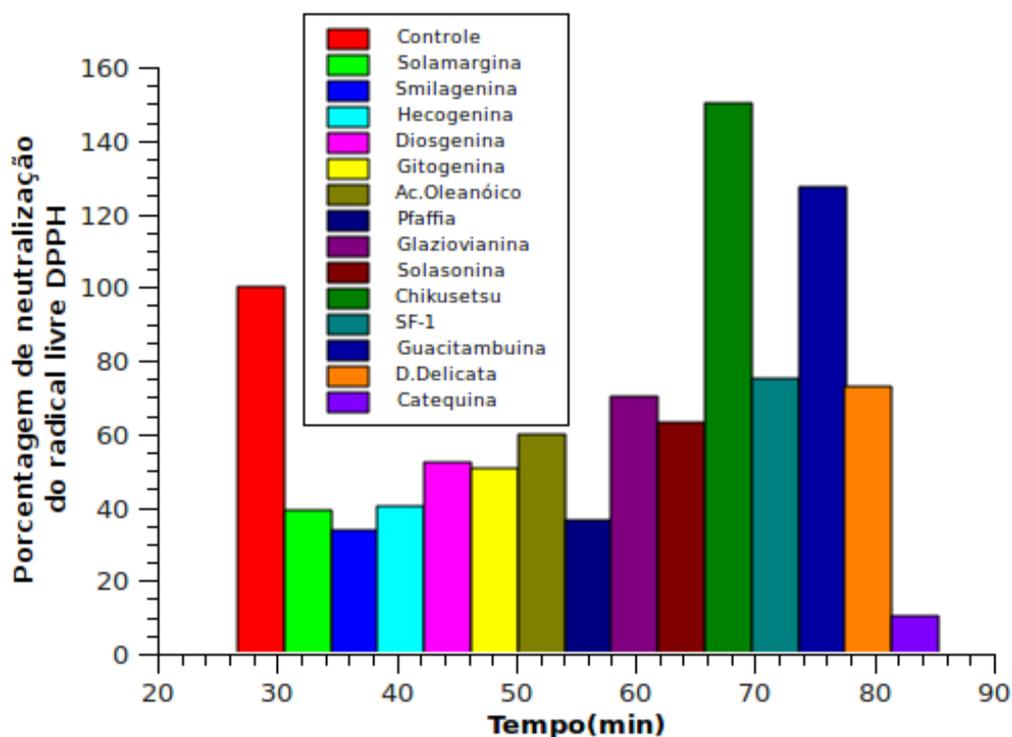


Figura 9. Comparação da percentagem de neutralização do DPPH entre os compostos.

A Figura 9 mostra que os compostos Solamargina, Smilagenina, Hecogenina, Diosgenina, Gitogenina, Ac.Oleanólico, Pfaffia, Glaziovianina, Solasonina, SF-1, D.Delicata e Catequina reduzem a concentração de DPPH em, respectivamente: 60,7%, 66,4%, 60,0%, 48,0%, 40,0%, 63,4%, 30,0%, 37,0%, 25%, 27,0% e 90,0%. Já os compostos Chikusetsu e Guacitambuina aumentam essa concentração em respectivamente, 50% e 27,2%.

4.2 Efeitos em membranas lipídicas e proteínas do Estrato Córneo

Na Figura 10 serão analisados os espectros de RPE do marcador de spin 5-doxil estearato (5-DS) inserido nas membranas lipídicas de Estrato Córneo sem tratamento e tratado com o composto Diosgenina. O parâmetro $2T//$, desdobramento hiperfino máximo do espectro, é dado pela separação em Gauss entre o pico da primeira linha de ressonância e a depressão da última linha. Quanto menor o $2T//$ maior é a fluidez. Isto indica que o composto Diosgenina causa um grande aumento de fluidez do Estrato Córneo.

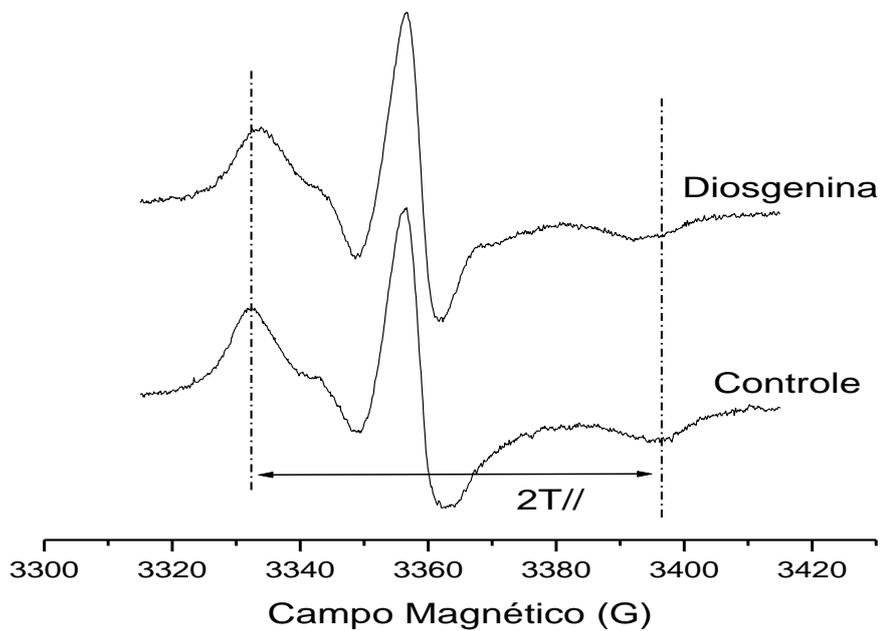


Figura 10. Espectros da amostra de Estrato Córneo não tratado (controle, painel A) e tratado com o composto Solamargina (painel B). O parâmetro $2T_{//}$ está indicado na figura.

Na Figura 11 está apresentada uma comparação entre todos os compostos medidos neste trabalho. O único composto que aumentou a fluidez foi a Diosgenina. Vários compostos tornaram a membrana um pouco mais rígida (o erro experimental neste parâmetro é de 0.5G).

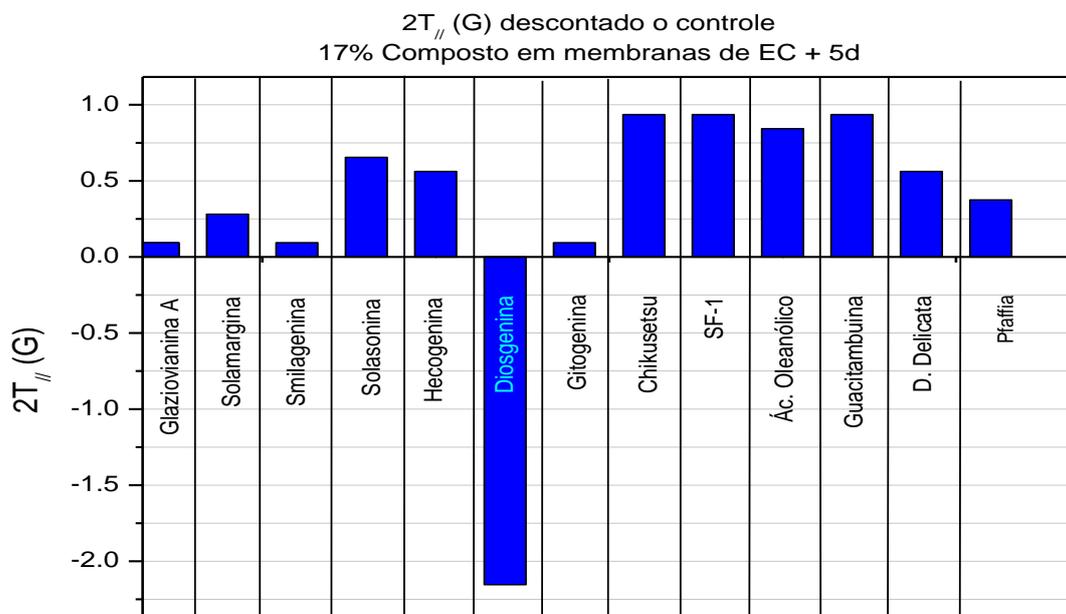


Figura 11. Ação de todos os compostos utilizados sobre a membrana de Estrato Córneo.

4.3 Efeitos em membranas lipídicas artificiais

Na Figura 12 está mostrado o espectro do marcador 5-DS em DMPC e na Figura 12 estão comparados os valores obtidos do parâmetro $2T_{//}$.

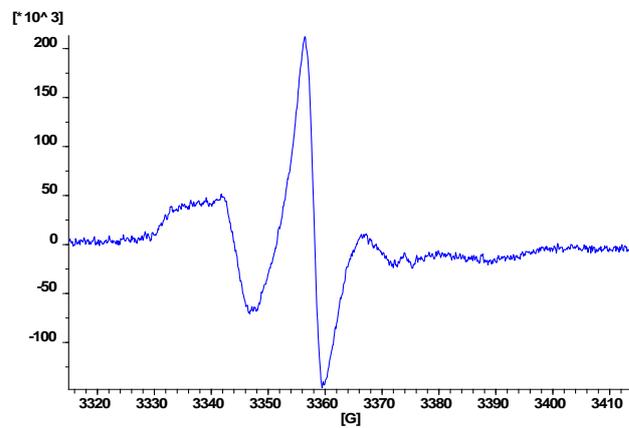


Figura 12. Espectro do marcador de spin 5-DS em DMPC a 22°C

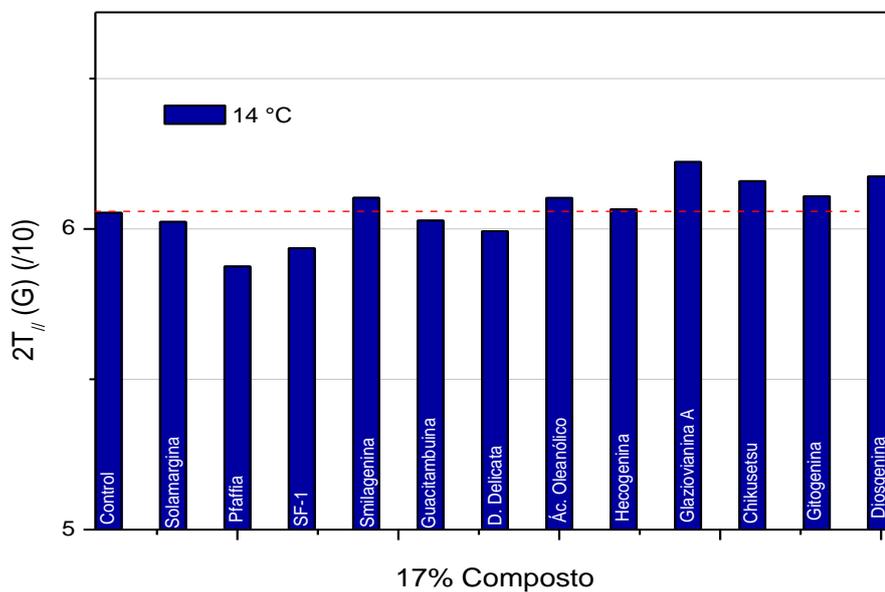


Figura 13. Ação de todos os compostos sobre a membrana artificial DMPC.

O gráfico acima mostra que o composto que mais aumentou a fluidez da membrana de DMPC foi a Pfaffia. O composto que mais enrijeceu essa membrana foi a Glaziovianina. Também se observa que o composto Diosgenina aumenta a rigidez da membrana de DMPC, contrariamente ao efeito observado sobre a membrana de Estrato Córneo.

5 Conclusões

Este trabalho apresentou uma comparação da atividade antioxidante de extratos vegetais sobre o radical livre DPPH utilizando a técnica de espectrofotometria.

Os compostos que apresentaram melhor atividade antioxidante sobre o DPPH foram: Solamargina, Smilagenina, Hecogenina e o Ac. Oleanólico. Os compostos Guacitambuina e Chikusetsu aumentaram a concentração do DPPH.

O trabalho também apresentou a atividade desses extratos sobre membranas de Estrato Córneo e membrana artificial de DMPC usando a técnica de RPE. Esses ensaios tiveram como objetivo investigar a influência desses compostos sobre a fluidez das membranas, tendo como objetivo encontrar um facilitador da permeação de fármacos na pele.

Para a membrana de Estrato Córneo foi obtido um único resultado significativo: o composto Diosgenina aumentou bastante a fluidez da membrana.

Para a membrana artificial DPPC, o melhor resultado foi do composto Pfaffia. Porém a fluidez da membrana não sofreu uma ação muito grande. Podemos destacar também que para essa membrana o composto Diosgenina teve efeito contrário ao da membrana de Estrato Córneo, tornando a membrana de DPPC mais rígida.

Algumas dificuldades foram encontradas porque os compostos não estavam puros e pela dificuldade de dissolução.

Assim, concluímos que estudos mais aprofundados devem ser realizados, bem como o uso de novas técnicas e utilização de outros solventes a fim de obter informações mais seguras da ação desses extratos sobre membranas.

6 Referências Bibliográficas

1. CHAUDHURI, S. et al. Interaction of flavonoids with red cell membrane lipids and proteins: Antioxidant and antihemolytic effects. **Internacional Journal of Biological Macromolecules**, 4, 1 June 2007. 42-48.
2. ATKINSON, J.; EPAND, R. F.; EPAND, R. M. Tocopherols and tocotrienols in membranes: A critical review. **Free Radical Biology and Medicine**, 44, 1 March 2008. 739-764.
3. SALVI, A. et al. Structural damage to proteins caused by free radicals: assessment, protection by antioxidants, and influence of protein binding. **Biochemical Pharmacology**, 61, 15 May

2001. 1237-1242.
4. GOW-CHIN, Y.; HUI-YIN, C. Antioxidant Activity of Various Tea Extracts in Relation to Their Antimutagenicity. **J. Agric. Food Chem.** 43 (1), January 1995. 27-32.
 5. PING-CHI, H.; YUELIANG, L.G. Antioxidant nutrients and lead toxicity. **Toxicology**, 180, 30 October 2002. 33-44.
 6. SANCHEZ-MORENO, C. Review: Methods Used to Evaluate the Free Radical Scavenging Activity in Foods and Biological Systems. **Food Science and Technology International**, 8, 10 June 2002. 121-137.
 7. ADEVAULTON, B. D. S. et al. Antioxidant Properties of Plant Extracts: an EPR and DFT Comparative Study. **J. Braz. Chem. Soc.**, 20, 5 October 2009. 1483-1492.
 8. WILLIAMS, A. C.; BARRY, B. W. Penetration enhancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 56, 2004, 603-618.
 9. PANKAJ, K.; JAIN, A.; MITRAGOTRI, S. Discovery of transdermal penetration enhancers by highthroughput screening. **Nature Biotechnology**, 22, 4 January 2004.192-197.
 10. SUNIL, T. K. N.; RAMESH, P. Transdermal delivery of zidovudine: effect of terpenes and their mechanism of action. **Journal of Controlled Release**, 95, 24 March 2004.367-379.
 11. JORGE LUIZ, V. D. A.; DIÓSGENES, D, S. N.; ANTONIO, A. Effects of 1,8-cineole on the dynamics of lipids and proteins of stratum corneum. **Internacional Journal of Pharmaceutics**, 345, 10 December 2007. 81-87.
 12. JORGE LUIZ, V. D. A.; DIÓSGENES, D, S. N.; ANTONIO, A. Effects of ethanol/1-menthol on the dynamics and partitioning of spin-labeled lipids in the stratum corneum. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 67, September 2007. 406-412.
 13. SUNIL, T. K. N.; RAMESH, P. Effect of L-menthol and 1,8-cineole on phase behavior and molecularorganization of SC lipids and skin permeation of zidovudine. **Journal of Controlled Release**, 102, 20 January 2005. 59-70.
 14. QUEIRÓS, W. P.; SOUSA NETO, D.; ALONSO, A. Dynamics and partitioning of spin-labeled stearates into the lipid domain of stratum corneum. **Journal of Controlled Release**, 106, 2 September 2005. 374-385.
 14. SANTOS, A. B. D.; BAFFA FILHO, O. Atividade Antioxidante de Extratos Vegetais da Flora Brasileira: Estudo com Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) e Teoria do Funcional da Densidade (TDF). Adevailton Bernardo dos Santos. Ribeirão Preto, 2006.

15. IKEYA, 1993. M. Ikeya, *New Applications of Electron Paramagnetic Resonance — Dating, Dosimetry and Microscopy*, Scientific World, New Jersey (1993), pp. 70–72.
16. FIGUEIREDO, M. S.; BAFFA, O.; NETO, J. B.; ZAGO, M.A. (1993). Liver injury and generation of hydroxyl free radicals in experimental secondary hemochromatosis. **Research in Experimental Medicine**, 193, 27-37.
17. SARACENO A. J., FANALE D. T. and COGGESHALL N. D. (1961). An electron parametric resonance investigation of vanadium in petroleum oils.