

Atividade antioxidante e dosagem de fenólicos de extratos de *Euterpe oleracea* Mart. (açai).

Arruda, D.C.¹; Felippi, R.¹; Mantovani, I. S. B.²; Santos, G. B.²; Gabriel, F. T.²; Sá, A. C. de²; Fernandes, S. B. de O.²; Ribeiro-do-Valle, R. M.¹; Menezes, F. S.²; Ckless, K.³

¹Depto. de Farmacologia, CCS, UFRJ, CEP.: 21.941-590, ²Depto. de Produtos Naturais e Alimentos, Faculdade de Farmácia, CCS, UFRJ, CEP.: 21.941-590, e-mail: fsmenezes@pharma.ufrj.br, ³Depto. de Bioquímica, CCB, UFSC, CEP.: 88040-900, - Florianópolis, SC, e-mail: Ckless@mbox1.ufsc.br;

RESUMO: *Euterpe oleacea* pertence a família Palmae, uma família importante do ponto de vista econômico. Os estudos químicos desta espécie mostraram uma diversificação de componentes químicos abrangem desde ácidos graxos até substâncias fenólicas. Foi demonstrado em vários estudos que plantas são importantes fontes de substâncias com atividade antioxidante (AA). O objetivo deste estudo foi de investigar a AA dos diferentes extratos da palmeira *Euterpe oleracea* nas concentrações de 0,1; 1, 10 e 100 µg/ml, através de ensaios de degradação de desoxirribose, azul de nitro tetrazólio (NBT) teste de redução e inibição de peroxidação. Todos os extratos hidrofílicos testados mostraram a inibição da degradação da desoxirribose até 10 µg/mL. A partição butanólica dos frutos mostrou quase 100% de inibição da degradação da desoxirribose, enquanto partições em acetato de etila de folhas e espigas e butanólicas de espigas e folhas, assim como os extratos etanólicos totais de flores e folhas inibiram em torno de 75%. Os extratos hexânicos de folhas e frutos foram capazes de inibir a degradação da desoxirribose somente em altas concentrações. Entretanto, no teste de redução de NBT o extrato em diclorometano dos frutos foi o mais efetivo, apresentando 71% de capacidade sequestrante do radical ânion superóxido. Os outros extratos testados mostraram cerca de 20% de redução da capacidade sequestrante de radical ânion superóxido nas mais altas concentrações. Como observado para o teste de redução do NBT na lipoperoxidação o extrato com maior efeito foi o extrato hexânico de folhas que mostrou 47% de inibição da peroxidação a 100 µg/mL.

Palavras-Chave: *Euterpe oleracea*, Antioxidantes, Dosagem de Fenólicos, plantas medicinais

ABSTRACT: Antioxidant activity and dosage of phenolics of *Euterpe oleracea* Mart extract. (açai). *Euterpe oleracea* belongs to the family Palmae, important by the economic point of view. The chemical study with this specie showed a great diversification of chemical constituents encompassing since fatty acids to phenolic compounds. Several studies have been demonstrated that plants are an important source of compounds with antioxidant activities (AA). The aim of this study was to investigate the AA of different extracts of *Euterpe* palm in different concentrations (0,1; 1, 10 and 100 µg/mL) by deoxyribose degradation assay, nitro blue tetrazolium (NBT) reduction test and inhibition of peroxidation. All hydrophilic extracts tested showed inhibition of deoxyribose degradation up to 10 µg/mL. Butanolic extract from fruits, ethyl acetate extract from leaves and spikes and ethanolic extract from flowers and leaves as well as butanolic extracts from leaves and spikes were able to inhibit from 100 to 75% of deoxyribose degradation. The lipophilic extracts were able to inhibit deoxyribose degradation only at higher concentration. However, in the NBT reduction test the dichloromethane extract from fruits was the most effective, showing 71% of O₂⁻ scavenger capacity. The other extracts tested showed around 20% O₂⁻ scavenger capacity in the higher concentration. As observed to NBT reduction test in the lipoperoxidation test the more effective extracts were the lipophilic ones, hexane extract from leaves showed 46% of peroxidation inhibition at 100 µg/mL.

Key words: *Euterpe oleracea*, Antioxidants, Dosage of Phenolics, plants medicinals

INTRODUÇÃO

Euterpe oleracea pertence à família Palmae, importante do ponto de vista econômico (Ferreira &

Yokomizo, 1978; Ichimaru & Sales, 1980; Prance *et al.*, 1995). O estudo químico dessa espécie mostrou uma diversificação dos constituintes químicos, englobando desde ácidos graxos até constituintes fenólicos (Santos, 2001). Substâncias fenólicas estão dentre os produtos naturais mais bem distribuí-

Recebido para publicação em 09/06/03
Aceito para publicação em 08/12/03.

dos além de serem encontradas em muitas plantas utilizadas como alimento. Vários estudos têm demonstrado que essas substâncias apresentam atividade antioxidante (Larson, 1988; Vladimirov *et al.*, 1995; Xiong *et al.*, 1996; Afanas'ev *et al.*, 1989). O objetivo desse estudo foi investigar as propriedades antioxidantes de extratos de partes do açaí: extratos etanólico e butanólico de flores (EtOH Flo e BuOH Flo), extrato butanólico de espigas e frutos (BuOH Sp e BuOH Fru), extrato em diclorometano de frutos (CH_2Cl_2 Fru), extrato em acetato de etila de folhas e espigas (AcOEt Flo e AcOEt Sp) e extratos hexânicos de folhas, espigas e frutos (Hex Lea, Hex Sp e Hex Fru).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

Açaí, *Euterpe oleracea* Martius, família Palmae, foi coletada em Imperatriz do Maranhão e identificada pela Professora Terezinha da Universidade do Maranhão e teve uma amostra depositada no herbário "Atipo Ceabra SLS-017213" sob número 179. No dia 24 de fevereiro de 2000 foram coletados folhas, flores, espigas e frutos.

Determinação de Fenólicos Totais

A concentração das substâncias fenólicas totais foi determinada nos extratos pelo método de Folin-Ciocalteu, de acordo com Serafini *et al.*, 1998. As substâncias fenólicas totais foram determinadas através de curva padrão com ácido gálico (5-250mg/mL; $r^2=0,998$) e expressos em equivalentes de ácido gálico em mg/L (AG equivalentes).

Determinação de Danos Oxidativos em Desoxirribose

O sistema gerador de EROs utilizado para detecção de danos oxidativos em desoxirribose foi realizado de Nishida *et al.*, 1991. A detecção dos produtos oxidados (TBARS) foi realizada como descrito em Halliwell & Gutteridge, 1981. Os ensaios foram realizados em triplicata, num volume final de 1,2 mL, em tubos pyrex de 10 mL. O meio de reação consistiu de tampão fosfato de potássio, pH 7,4, na concentração final de 0,01 M. Inicialmente foi realizada uma pré-incubação de 25 mL de solução estoque de FeCl_3 (c.f. 25 μM) e 100mL da solução estoque de NTA (c.f. 100 mM), por 10 minutos à temperatura ambiente, para a formação do quelato. Posteriormente foi adicionado seqüencialmente: água (volume necessário para 1,2 mL), 150 ml de tampão fosfato (c.f. 0,01 M), 100 mL de solução de desoxirribose (c.f. 2,8 mM) e por último, H_2O_2 (c.f. 1,4 mM). Os tubos foram incubados por 20 minutos em banho-maria a 37 °C. Ao final da incubação foram realiza-

das as reações com TBA (ácido tiobarbitúrico), onde foi adicionado aos ensaios 1 mL da solução de TBA 1% e 1 mL de TCA (ácido tricloroacético) 2,8%. Os ensaios foram incubados por mais 15 minutos a temperatura de 100 °C para a formação de pigmento e ao final do tempo, resfriados imediatamente em banho de gelo. A absorbância dos ensaios foi medida em espectrofotômetro a 532 nm a temperatura ambiente, contra um branco contendo todos os reagentes, com exceção da desoxirribose. Nos ensaios, um volume de 120 mL das diferentes diluições dos extratos mencionados de açaí (0,1; 1; 10; e 100 mg/mL) ou manitol (1mM) foram adicionadas ao meio de reação, antes da adição de H_2O_2 . A absorbância de cada ensaio foi medida contra um branco, contendo a mesma concentração de extrato utilizada no ensaio. Os resultados foram expressos em percentagens, considerando-se os valores médios da absorbância dos controles como 100% de oxidação.

Preparação de Homogenato de Fígado de Rato

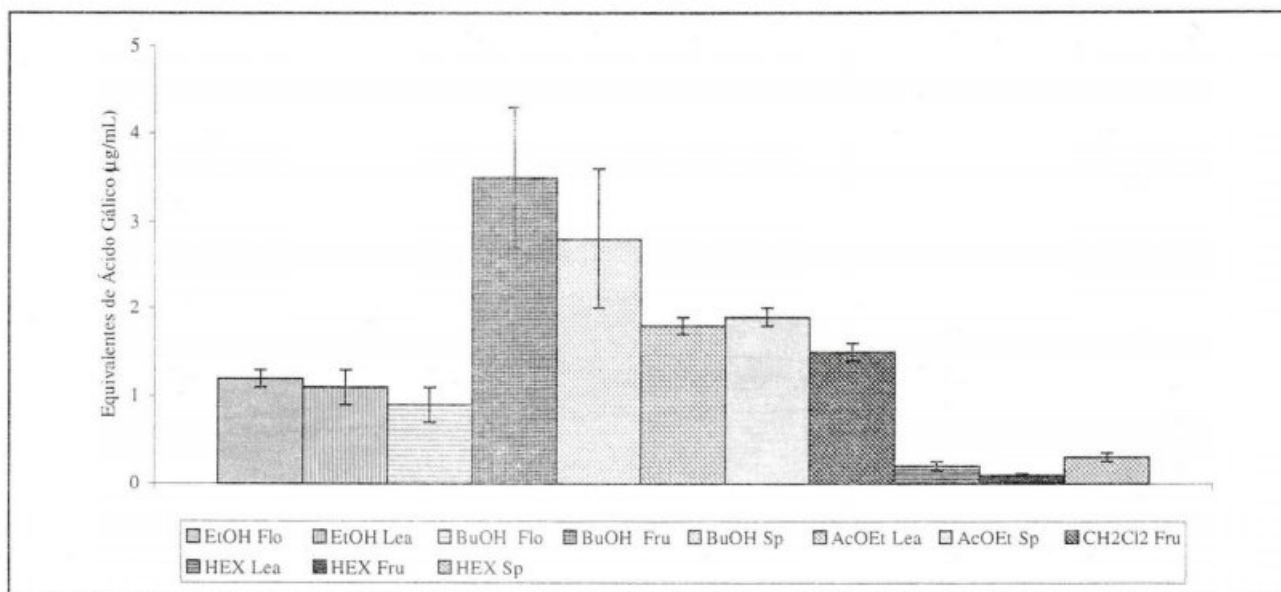
Ratos albinos e sadios foram sacrificados por deslocamento cervical, a cavidade abdominal foi aberta e o fígado foi macerado em solução salina (NaCl 0,9%) logo após a retirada do órgão. Aproximadamente 3 g de fígado foram homogeneizadas em 9 mL de meio de extração (tampão fosfato de potássio 10 mM, pH 7,0 em KCl 140 mM). O homogenato assim obtido foi centrifugado durante 15 minutos a 3500 RPM em centrífuga refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi congelado a -20 °C e utilizado posteriormente para os ensaios de peroxidação lipídica.

Ensaio de Peroxidação Lipídica em Homogenato de Fígado de Rato

A atividade protetora dos extratos contra danos oxidativos provocados ao homogenato de fígado de rato foi determinada através da reação com o ácido tiobarbitúrico, de acordo com algumas modificações do método Chen & Tappel (1996). Neste ensaio o agente oxidante é o peróxido de *t*-butila que abstrai um hidrogênio radicalar dando início ao processo de peroxidação lipídica. O meio de incubação é constituído por tampão fosfato 0,01M (pH 7,4); homogenato de fígado de rato (150 μL); peróxido de *t*-butila (100 μM).

Os extratos mencionados do açaí (0,1; 1; 10; e 100 mg/mL) ou BHT (1 mM) foram adicionados ao sistema de incubação antes da adição do peróxido de *t*-butila. O tempo total de incubação foi de 2 h a 37 °C, com agitação. Após este período foram adicionados aos tubos 1000 μL de ácido tiobarbitúrico 1% (TBA) e 1000 μL de ácido tricloroacético a 2,8% (TCA). Os tubos foram incubados por mais 15 minutos à temperatura de 100°C para a formação de pig-

FIGURA 1 – Conteúdo de fenólicos totais nos extratos de açaí determinado pelo método de Folin-Ciocalteu.



mento e ao final do tempo, resfriados imediatamente em banho de gelo e centrifugados por 5 minutos a 3500 RPM. A absorbância do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 532 nm à temperatura ambiente. Os resultados foram expressos em percentagens, considerando-se os valores médios da absorbância dos controles (sem a presença de antioxidante) como 100% de peroxidação lipídica.

Capacidade Sequestradora do Radical Ânion Superóxido

Para avaliar a capacidade sequestradora de O_2^- dos extratos foi utilizado o sistema gerador deste radical: fenazina-metasulfato-NADH, segundo Robak e Gryglewski (1988). O meio de incubação consistiu de fenazina-metasulfato (10 mM); nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) (78 mM) e azul de nitro tetrazólio (NBT) (25 mM) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,8). Nesse sistema, o O_2^- gerado, reduz o NBT produzindo o formazan. Após 2 minutos de incubação à temperatura ambiente, a reação foi interrompida adicionando-se aos tubos teste 100 ml de HCl 0,1N. Em seguida a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 560 nm contra um branco que não continha fenazina-metasulfato. Foi considerado 100% da redução do NBT a reação sem a presença dos extratos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado referente à dosagem dos fenólicos totais se encontra na Figura 1. Nesse gráfico fica claro que os extratos mais polares (partições em *n*-butanol e em acetato de etila, além dos extratos etanólicos totais) especialmente a partição butanólica

ca de espigas, possuem um maior valor de fenóis totais expressos em equivalentes de ácido gálico. Um resultado surpreendente foi o observado para a partição em diclorometano dos frutos que apresentou um teor de fenólicos considerável.

As Figuras 2-4 evidenciam os resultados obtidos para as atividades antioxidantes nos vários modelos utilizados para concentrações diferentes dos diferentes tipos de extrato.

A Figura 2 mostra a proteção contra a peroxidação lipídica induzida pelo peróxido de *t*-butila em células de fígado de rato para as partições em hexano, em diclorometano, em acetato de etila e em *n*-butanol testadas além dos extratos etanólicos de flores e folhas evidenciando que quanto menos polar, maior a proteção. Pode-se evidenciar 47% de proteção para a partição em hexano das folhas e 10% de proteção para a partição em hexano dos frutos na maior concentração testada (10% de extrato), sendo uma exceção nesse teste o extrato etanólico total de flores com 23% de proteção na maior concentração. Justamente para as flores, não foi testada a partição em hexano, a qual certamente daria uma atividade próxima daquela observada para as folhas. Na Figura 3, pode-se verificar que os extratos mais polares, portanto os mais ricos em substâncias fenólicas apresentaram alta inibição dos danos oxidativos provocados na desoxirribose, principalmente a uma concentração de 100 mg/mL. Dessa forma, a partição butanólica dos frutos teve quase 100% de atividade na maior concentração testada sendo seguida pelas partições em acetato de etila das folhas e das espigas, butanólicas de folhas e espigas e dos extratos etanólicos totais de flores e folhas. A Figura 4 mostra como esses mesmos extratos se comportam frente

FIGURA 2- Efeitos dos extratos de açaí testados sobre a degradação de lipídios induzida pelo peróxido de *t*-butila.
 * $P < 0,001$ diferença em relação ao controle (sem a presença das substâncias teste) (ANOVA, complementado pelo teste Tukey).

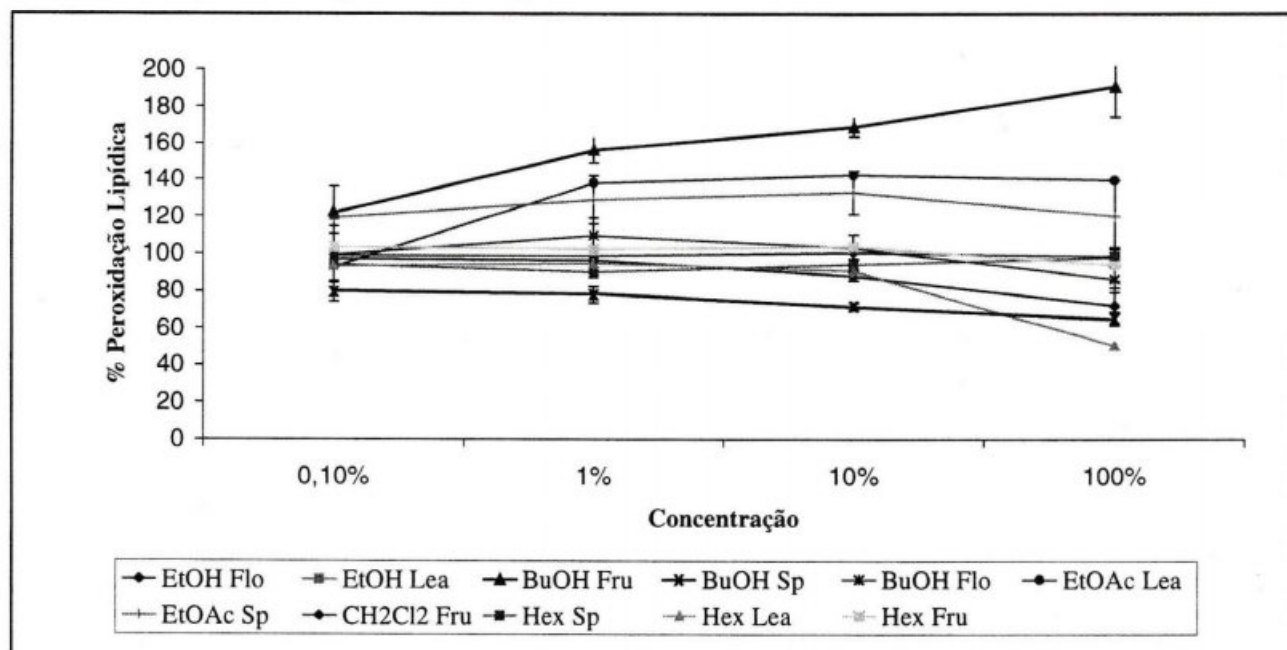


FIGURA 3 - Efeitos de extratos de açaí sobre a degradação de desoxirribose (sistema Fe^{3+} -NTA- H_2O_2). * $P < 0,05$ diferença em relação ao controle (sem a presença de substâncias teste) (ANOVA, complementado pelo teste Tukey).

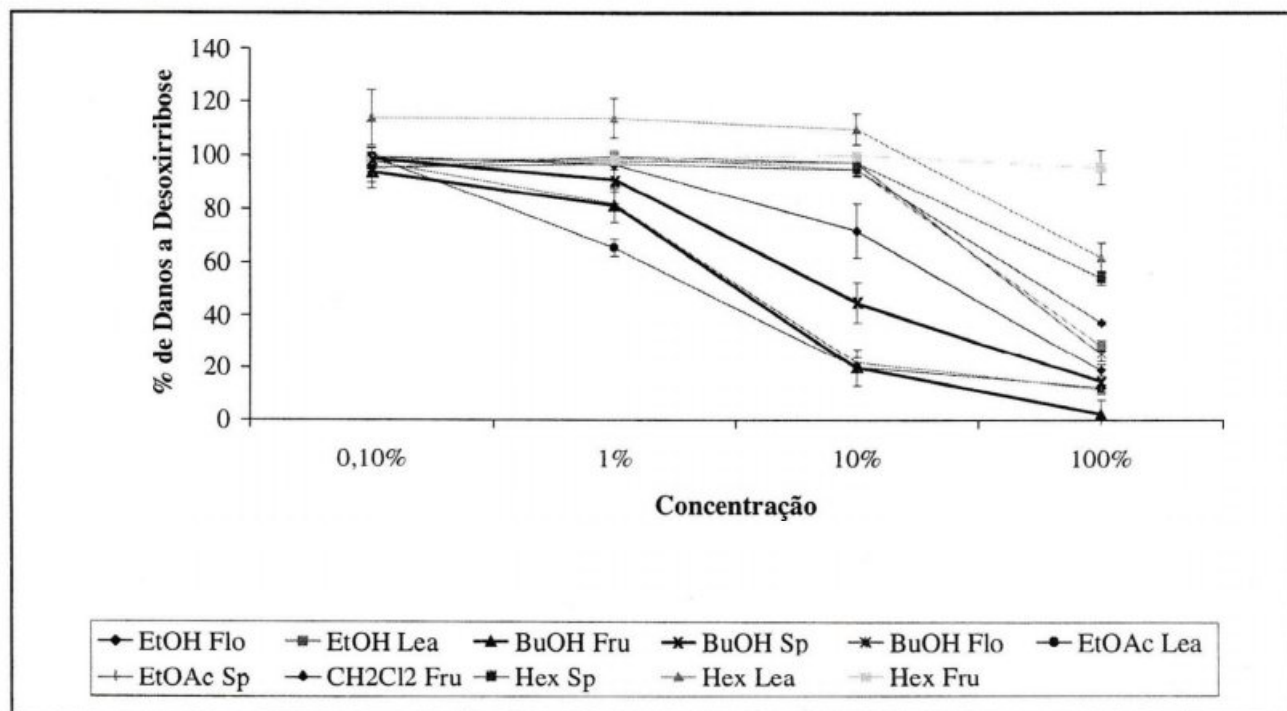
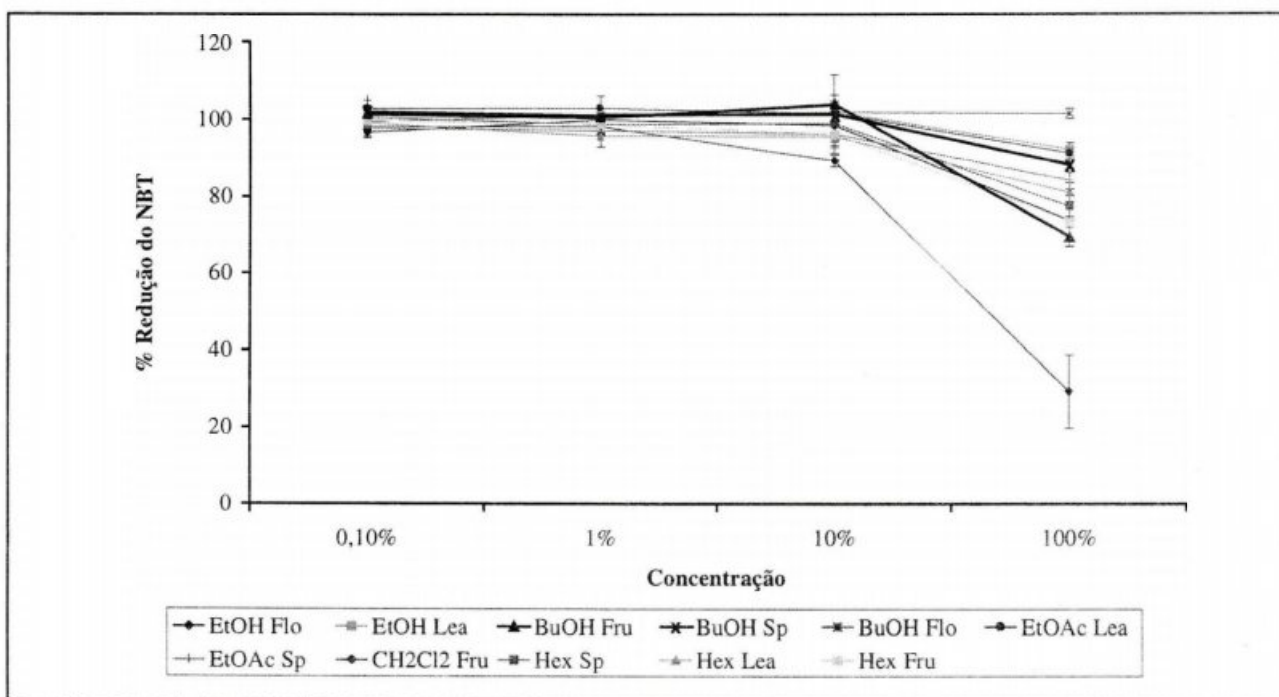


FIGURA 4 - Efeito dos extratos de Açaí testados sobre a redução do NBT, induzida pelo sistema fenazina-NADH. *P<0,001, significativo com relação aos controles (ANOVA, complementado pelo teste Tukey).



a uma outra metodologia de avaliar a atividade antioxidante que é a capacidade sequestradora do radical ânion superóxido. Mais uma vez fica claro que a redução do NBT é impedida principalmente pelos extratos mais polares, o que está de acordo com os testes químicos realizados com o DPPH (Santos, 2001). Nesse teste porém, a partição em diclorometano dos frutos foi a que deu a maior atividade (71%) na maior concentração testada o que corrobora com a alta concentração de fenólicos encontrados para essa partição. A diferença dos comportamentos dos extratos e partições dependendo da metodologia utilizada tem a ver com a polaridade dos mesmos e também se o teste é realizado em espaço polar (hidrofílico) ou apolar (hidrofóbico). Vale mencionar que o estudo químico do açaí realizado por Santos (2001) e posteriormente complementado por Menezes *et al.* 2003, revelou que os extratos e partições apolares apresentam uma grande riqueza em misturas complexas e diversas de ácidos graxos, apresentando também esteróides, as partições em diclorometano apresentam esteróides normais e glicosilados, as partições em acetato de etila apresentam flavonóides identificados pelo perfil em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e as partições em *n*-butanol apresentam derivados antocianidínicos, determinados por HPLC, evidenciando derivados de cianidina, pelargonidina e delphinidina em concentrações variadas e dependendo da parte da palmeira utilizada para obtenção do perfil cromatográfico.

CONCLUSÃO

Os extratos testados mostraram inibição da degradação de desoxirribose nas concentrações mais elevadas (100 µg/mL), sugerindo uma capacidade antioxidante *in vitro*, com exceção de Hex Fru. Os resultados obtidos para o teste de inibição da capacidade sequestradora de radical ânion superóxido demonstraram um perfil diferente daquele observado no ensaio da desoxirribose, onde CH₂Cl₂ Fru foi capaz de inibir a redução de NBT. No sistema lipídico, somente Hex Lea e EtOH Flo foram capazes de inibir a degradação de metil linoleato, induzida por CuSO₄, em taxas consideráveis.

Baseado nesses resultados pode-se concluir que a habilidade de proteger as macromoléculas de danos oxidativos, assim como, capturar o radical superóxido, está relacionado com aspectos importantes: o pró-oxidante usado (sistema metálico ou não), a polaridade do sistema (hidrofílico ou lipofílico), a polaridade das substâncias antioxidantes presentes nos extratos e finalmente, o conteúdo fenólico.

Os resultados obtidos indicam que no sistema lipídico, a inibição da peroxidação não foi associada ao conteúdo fenólico, mas sim à alta concentração de ácidos graxos não saturados. Em sistemas aquosos, a atividade antioxidante poderia estar relacionada com a presença de substâncias fenólicas (derivados de cianidina, pelargonidina e delphinidina).

AGRADECIMENTO

Apoio Financeiro: FAPERJ, FUJB, PRONEX

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- AFANAS'EV, I.B., DOROZHKO, A.I., BRODSKII, A.V. *et al.* Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical Pharmacology**, V.38, N.11, P.1763-9, 1989.
- FERREIRA, V.L.P., YOKOMIZO, Y. Possible use of the heart of the *Euterpe* palm as a human food. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.9, p.27-41, 1978.
- HALLIWELL, B., GUTERRIDGE, J.M.C. Formation of a thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts. **FEBS Letters**, v.128, p.347-52, 1981.
- ICHIMARU, D.L., SALES, AM. Comparison of four methods for the determination of tryptophan in foods. **Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v.17, n.3, p.297-307, 1980.
- LARSON, R.A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v.27, n.4, 969-78, 1988.
- MENEZES, F.S.; FALCÃO, D.Q.; MENDONÇA FILHO; R.F.W. *et al.* Chemical and pharmacological survey on Brazilian medicinal plants using ethnopharmacology information as a tool. **The third world congress on medicinal and aromatic plants for human welfare, WOCMAPIII**, Abstract book, p.40, 2003.
- NISHIDA, Y.; YOSHIZAWA, K.; AKAMATSU, T. Preparation of iron (III) complex with nitrilotriacetic acid and origin of its unique reactivity. **Chemical Letters**, v.9, 1521-1524, 1991.
- PRANCE, G.T., BALÉE, W. BOOM, B.M., CARREIRO, R.L. **Quantitative ethnobotany and the case of conservation in Amazonia**. In: *Ethnobotany: Evolution of a Discipline*. Ed. Richard Evans Schultz e Siri von Reis, Dioscorides Press. Theodore R. Dudley, Ph.D., General Editor, Portland, Oregon, USA, 157-174. 1995.
- SANTOS, G.B. **Açaí (*Euterpe oleracea*): aspectos químicos e farmacológicos**. 2001, 151p. Dissertação (mestrado) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- SERAFINI, M., MAIANI, G., FERRO-LUZZI, M. Effect of ethanol on red wine tannin-protein (BSA) interactions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V45, n.8, p.3148-51, 1998.
- VLADIMIROV, Y.A.; SHAROV, V.S.; DRIOMINA, E.S. *et al.* Coumarin derivatives enhance the chemiluminescence accompanying lipid peroxidation. **Free Radical Biology and Medicine**, v.18, n.4, p. 739-45, 1995.
- XIONG, Q., KADOTA, S., TANI, T., *et al.* Antioxidative effects of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.19, n.12, p.1580-5, 1996.
- CHEN, H., TAPPEL, AL. Protection of multiple antioxidants against heme protein oxidation and lipid peroxidation induced by CBrC13 in liver, lung, kidney, heart and spleen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, n.3, p.854-8, 1996.