

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA**

**TATIANA TAMBORENA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Uncaria  
tomentosa* IN VITRO**

**Uruguiana  
2014**

**TATIANA TAMBORENA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Uncaria tomentosa* IN VITRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências da Natureza - Licenciatura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciada em Ciências da Natureza.

Orientador: Robson Luiz Puntel

Co-orientador: Vanderlei Folmer

**Uruguaiana  
2014**

**TATIANA TAMBORENA**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DE *Uncaria tomentosa* IN VITRO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências da Natureza-Licenciatura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciada em Ciências da Natureza.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 23 de agosto de 2014.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Robson Luiz Puntel  
Orientador  
(Unipampa)

---

Prof. Dr. Daniel Henrique Roos  
(Unipampa)

---

Bel. José Luiz Ribeiro Portela  
(Unipampa)

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, pela força e coragem durante toda esta longa caminhada.

## **AGRADECIMENTO**

Ao Prof. Dr. Robson Luiz Puntel pela paciência na orientação e incentivo que tornaram possível a conclusão desta etapa da minha vida.

Agradeço também a todos os professores que me acompanharam durante a graduação, em especial ao Prof. Vanderlei Folmer pela co-orientação e ao professor Rafael pela atenção, carinho e amizade principalmente nas horas mais difíceis.

À minha família, por sua capacidade de acreditar e investir em mim, seus cuidados e dedicação foram que me deram em alguns momentos a esperança para seguir, sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

Ao Rony, pessoa que amo e partilho a vida. Obrigada pelo carinho, a paciência e por sua capacidade de me trazer paz na correria de cada semestre, principalmente nesta última etapa de incertezas e angustias, aos meus filhos Thiago e Nataly pelas ausências justificadas e sempre compreendida por eles.

Aos meus amigos, colegas de aula e laboratório, em especial Carina, Flavia e Matheus que sempre tinham uma palavra de aconchego nas horas difíceis. Mas não podia deixar de dedicar de forma muito especial a Cacau, Dandara e Geovana pelas alegrias, tristezas e dores partilhadas, por entenderem e me receberem sempre de abraços abertos e carinhos sem medidas nas horas de maior agonia, sem vocês com certeza não teria conseguido, por isso com vocês as pausas entre um parágrafo e outro da produção da minha vida melhora tudo o que tenho produzido. Muito obrigada.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

## RESUMO

Considerando o envolvimento do estresse oxidativo na patogênese de diversas doenças humanas, e da presença de compostos com propriedades antioxidantes nos extratos vegetais, o objetivo desse estudo foi investigar o(s) possível(eis) mecanismo(s) envolvido(s) na capacidade antioxidante da planta *Uncaria tomentosa* em condições *in vitro*. Para tanto, foi analisado o comportamento antioxidante dos extratos em diversas condições experimentais, como atividade inibitória do radical DPPH, degradação da desoxirribose e ensaio de inibição do radical óxido nítrico (NO). A interação dos extratos com a química redox de íons de ferro foi abordado pela capacidade dos extratos de quelar  $Fe^{2+}$  e/ou reduzir  $Fe^{3+}$ . O efeito protetor sobre a peroxidação lipídica (TBARS) foi analisado utilizando fosfolípidios da gema de ovo. Além disso, compostos fenólicos e flavonóides foram determinadas por métodos colorimétricos. Nossos resultados indicam claramente que o extrato aquoso e etanólico de *U. tomentosa* apresentam efeito significativo ( $p < 0,05$ ) na atividade de neutralização de espécies reativas, em diferentes sistemas de geração dos mesmos. Além disso, os extratos estudados apresentaram significativa ( $p < 0,05$ ) capacidade de interação com a reação redox de íons de ferro. O extrato da planta também apresentou significativo ( $p < 0,05$ ) efeito antioxidante contra peroxidação lipídica induzida por  $Fe^{2+}$ . Em geral, o efeito dos extratos de plantas varia dependendo da natureza do extrato (se aquoso ou etanólico), da concentração e do ensaio utilizado. Considerando todos os resultados, sugerimos que, ao menos em parte, as propriedades antioxidante *in vitro* *U. tomentosa* podem estar relacionadas tanto com a sua capacidade de neutralizar diferentes espécies reativas, quanto devido à sua capacidade para interagir com a química redox de íons de ferro, interferindo, assim, com os sistemas de geração dessas espécies reativas.

Palavras-chave: ferro, óxido nítrico, compostos fenólicos, flavonóides.

## ABSTRACT

Considering the relationship between oxidative stress and the pathogenesis of human diseases, and of the presence of compounds with antioxidant activities in vegetable extracts, the objective of the present study was to investigate the mechanism(s) involved in the antioxidant potential of *Uncaria tomentosa in vitro*. For that, the scavenging activity against picrilhidrazil o 1'-1' difenil-2' (DPPH) and nitric oxide (NO) radicals; degradation of deoxyribose; interaction with the chemical redox of iron ions and effect on lipid peroxidation (measured as TBARS) were performed. Furthermore, phenolic compounds and flavonoids were measured by colorimetric methods. Our results clearly indicate that the aqueous and etanolic extracts of *U. tomentosa* present significant ( $p < 0,05$ ) scavenging activity against different free radicals. Moreover, the extracts presented significant ( $p < 0,05$ ) interaction with the redox chemistry of iron ions and prevents  $Fe^{2+}$ -induced lipid peroxidation. In general, the effects of the plant extracts varies depending from the solvent used to prepare the extract (if etanolic or aqueous), the concentration and assay used. Considering our results, we suggest that, at least in part, *U. tomentosa's* antioxidant properties *in vitro* may be related with its ability to scavenge different free radical species and due to its capacity to interact with the redox chemistry of iron ions, thus interfering with the free radical generation systems.

Keywords: iron, nitric oxide, phenolic compounds, flavonoids.



## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	11
2.1 Objetivo geral:.....	11
2.2 Objetivos específicos (todos in vitro): .....	11
<b>3 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	12
3.1 <i>Uncaria tomentosa</i> .....	12
3.1.1 ASPECTOS GERAIS .....	12
3.1.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS .....	12
3.1.3 CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS E BIOLÓGICAS .....	13
3.2.1 ESPÉCIES REATIVAS .....	14
3.3 ANTIOXIDANTES .....	14
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	16
4.1 Regentes .....	16
4.2 Preparo dos extratos .....	16
4.3 Atividade inibidora do radical DPPH .....	16
4.4 Degradação da desoxirribose .....	17
4.5 Atividade inibitória do Óxido Nítrico (NO) .....	17
4.6 Ensaio de quelação do Fe <sup>2+</sup> e redução do Fe <sup>3+</sup> .....	17
4.7 Ensaio de peroxidação lipídica .....	18
4.8 Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos.....	18
4.9 Determinação do conteúdo total de flavonoides.....	19
4.10 Análise Estatística.....	19
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	20
5.1 Resultados.....	20
5.2 Discussões.....	24
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	27
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	28

## 1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é definido como um evento resultante de um desequilíbrio entre a produção de espécies reativas (ERs) e os sistemas de defesa antioxidante celular [1]. As ERs produzidas em excesso durante alguns processos patológicos podem causar alterações importantes no funcionamento celular devido a sua capacidade em oxidar proteínas e lipídios, causar disfunção mitocondrial e danos ao DNA, podendo culminar com a morte celular [2]. Nesse contexto, estudos demonstram que o emprego de agentes antioxidantes é bastante promissor no tratamento das alterações produzidas em diversos modelos animais de toxicidade, em que o estresse oxidativo tenha participação [3].

As plantas medicinais são tradicionalmente usadas no tratamento de várias doenças humanas [3]. Suas propriedades farmacológicas e terapêuticas são atribuídas aos diferentes constituintes químicos presentes nos extratos brutos das mesmas [3]. Relatos da literatura têm demonstrado que tais constituintes têm se mostrado potentes protetores em diversos modelos de doenças degenerativas, de câncer, e de doenças cardiovasculares e neurológicas [4,5-6]. Dessa forma, as propriedades antioxidantes apresentadas por diferentes plantas estimulam o emprego das mesmas no tratamento de patologias humanas [7].

Com o intuito de amenizar estes efeitos no organismo humano, tem-se adotado o uso de plantas como uma forma de terapia alternativa, a qual pode trazer inúmeros benefícios aos usuários. Dentre as plantas utilizadas está a *Uncaria tomentosa* (unha de gato), a qual demonstra ter propriedades antioxidantes, que auxiliam na proteção do organismo à presença de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio [8]. *U. tomentosa* é uma planta lenhosa amplamente encontrada na floresta Amazônica e florestas da América do Sul e Central. Extratos de raiz e casca são usadas na medicina tradicional peruana para o tratamento de câncer, artrite, gastrite e algumas doenças epidêmicas, bem como um contraceptivo [9].

Tendo em vista o uso das plantas medicinais para o tratamento de doenças e que seus efeitos são relacionados a atividade antioxidante apresentada por elas, o objetivo do trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de extratos de *Uncaria tomentosa* em ensaios *in vitro* para tentar esclarecer os mecanismos de atividade antioxidante desses extratos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral:

O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antioxidante de extratos de *Uncaria tomentosa* (Unha de gato) *in vitro*.

### 2.2 Objetivos específicos (todos *in vitro*):

Objetivo do presente estudo foi de investigar alguns mecanismos possíveis envolvido na capacidade antioxidante dos extratos aquoso e etanólico desta planta usadas popularmente (*U. tomentosa*) sob condições *in vitro* sendo analisado as seguintes técnicas:

- A capacidade do extrato na atividade inibidora do radical DPPH
- Degradação da desoxirribose
- Atividade inibitória do Óxido Nítrico (NO)
- Ensaio de quelação do  $Fe^{2+}$  e redução do  $Fe^{3+}$
- Ensaio de peroxidação lipídica em fosfolípido
- Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos
- Determinação do conteúdo total de flavonóides

### **3 REFERENCIAL TEÓRICO**

#### **3.1 *Uncaria tomentosa***

##### **3.1.1 ASPECTOS GERAIS**

A *U. tomentosa* é uma planta conhecida também pelos nomes de *cat's claw* em inglês, e *uña de gato* em espanhol. O seu nome é atribuído a pequenos espinhos que são muito parecidos às unhas dos gatos. É uma planta que se desenvolve na forma de um cipó podendo, às vezes, formar arbustos bem irregulares. É nativa da grande floresta Amazônica, tanto a brasileira quanto a peruana.

A *U. tomentosa* é uma planta já há muito tempo utilizada pelos índios peruanos, existindo evidências que até mesmo os Incas já a empregavam para doenças reumáticas, doenças infecciosas e digestivas. Ainda nos dias atuais, a Unha de gato é popularmente utilizada na medicina alternativa tanto no Oriente quanto no Ocidente. Em vários países inclusive no Brasil foram feitos estudos que comprovaram efeitos benéficos da *Uncaria tomentosa*, pois sua composição é bastante rica, dentre seus principais componentes os glicosídeos do ácido quinóico os quais conferem a esta planta sua atividade anti-inflamatória, no tratamento de amigdalite, artrite, sinusite, bursite e renite [10].

##### **3.1.2 ASPECTOS MORFOLÓGICOS**

A unha-de-Gato é um arbusto trepador lenhoso, que pode atingir vários metros de altura, algo como 20 a 30 m. Apresenta folhas simples, oblongas ovaladas, de coloração verde claro com presença de estípulas e espinhos axilares lenhosos levemente curvados. O caule apresenta uma casca com textura fibrosa-lamina, de coloração mesclada de marrom avermelhada e creme. O caule possui uma peculiaridade, que é a capacidade de armazenar água no seu interior, para satisfazer suas próprias necessidades. Existem poucas informações sobre o cultivo da Unha-de-Gato. Até o momento pesquisas realizadas pela Embrapa tem caminhado para o manejo sustentável dos espécimes existente e da domesticação da espécie. A multiplicação se dá por estacas, em viveiros cobertos com sombrite de 50%. Até o momento observou-se que é uma planta com alta capacidade de rebrota e de enraizamento de estaca, mas cuidados devem ser seguidos para garantir sua

sustentabilidade. Recomenda-se o estabelecimento de ciclos de cortes não inferior a 10 anos e estabelecer um estoque intacto de plantas, ou seja, não coletar mais de cerca de 40% dos indivíduos. Garantir a rebrota da planta, deixando pelo menos 1 metro de tronco para a emissão de brotos é de fundamental importância. A parte mais utilizada é a casca do tronco e raízes. [11]

### **3.1.3 CARACTERÍSTICAS FARMACOLÓGICAS E BIOLÓGICAS**

A *Uncaria tomentosa* tem sido utilizada pelas populações indígenas da América do Sul há séculos para o tratamento de doenças inflamatórias. Sua utilização é proposta para doenças como artrite, úlceras gástricas, reumatismo e várias infecções. Dentre as propriedades farmacológicas de *U. tomentosa* Destaca-se o potencial anti-inflamatório, antineoplásico, antimutagênico, entre outros. Entretanto, os mecanismos moleculares que determinam essas atividades não estão totalmente esclarecidos.

Um dos mecanismos propostos para a atividade anti-inflamatória de *U. tomentosa* é atribuído ao potencial antioxidante da planta. É bem conhecido que atividades inflamatórias se dá pela ativação de células fagocíticas que liberam espécies reativas em grande quantidade causando injúrias celulares e teciduais, envolvidas com o estresse oxidativo. Em virtude das espécies reativas agirem como toxinas e mediadores ou moduladores inflamatórios, esforços têm sido realizados para investigar moléculas antioxidantes com potenciais agentes terapêuticos, como os encontrado na *U. tomentosa*.

### **3.2 ESTRESSE OXIDATIVO**

O estresse oxidativo é uma condição que se caracteriza pelo desequilíbrio entre a produção de espécies reativas e as defesas antioxidantes do organismo. Além disso, o estresse oxidativo é tido como estando envolvido em várias desordens patofisiológicas como inflamações, câncer e doenças neurodegenerativas.

### 3.2.1 ESPÉCIES REATIVAS

As ERO e ERN são geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção fisiológica ou proveniente do metabolismo basal. As principais ERO se distribuem em radicais: hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), superóxido ( $\text{O}_2\cdot^-$ ), peroxila ( $\text{ROO}\cdot$ ) e alcóxila ( $\text{RO}\cdot$ ); e os não-radicalares: peróxido de hidrogênio e ácido hipocloroso. Dentre as ERN estão o óxido nítrico ( $\text{NO}\cdot$ ), óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e peroxinitritos ( $\text{ONOO}^-$ ) [12]. No organismo os radicais livres encontram-se envolvidos em várias atividades fisiológicas, mas quando produzidas em grande quantidade podem gerar estresse oxidativo, causando efeitos prejudiciais tais como peroxidação lipídica, agressão às proteínas dos tecidos e membranas, carboidratos e DNA, estando frequentemente relacionados a várias doenças, tais como Alzheimer, doença de Parkinson, aterosclerose, envelhecimento precoce, entre outras [13]. As espécies radicalares, ou radicais livres, são moléculas ou átomos altamente instáveis que contêm em sua última camada eletrônica um número ímpar de elétrons, sendo este não emparelhamento de elétrons o motivo de sua alta instabilidade. Os radicais livres são produzidos de forma contínua durante os processos metabólicos, atuando como mediadores para a transferência de elétrons [14]. Geralmente encontram-se centrados nos átomos de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). No organismo, encontram-se envolvidos na fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes.

### 3.3 ANTIOXIDANTES

Antioxidantes previnem o estresse oxidativo nas células e são muito úteis no tratamento de muitas doenças humanas, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares e doenças inflamatórias. A literatura revela que antioxidantes provenientes dos produtos naturais representam uma potencial fonte de antioxidantes, sendo uma alternativa para os antioxidantes sintéticos no processamento de alimentos industrializados e para uso na medicina preventiva.

O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação prejudicial das espécies reativas. Estas ações podem ser realizadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação destas espécies pró-oxidantes (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses

(sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) [15]

Os antioxidantes endógenos podem ser enzimáticos, como as enzimas: glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione reductase, enzimas de reparo [16], ou não enzimáticos, como a glutathione reduzida (GSH) e ácido úrico, entre outros. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza também aqueles provenientes da dieta como o *α*-tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), e de origem vegetal como os compostos fenólicos onde se destacam os flavonóides e poliflavonóides [17,18]

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Regentes

Tris-HCl, ácido tiobarbitúrico (TBA), 1'-1' diphenyl-2'picrylhydrazyl (DPPH), quercetina, ácido gálico e desoxirribose obtidos da Sigma (St. Louis, MO,USA). Todos os reagentes utilizados são produtos comerciais de padrão analítico.

### 4.2 Preparo dos extratos

As plantas foram obtidas de fontes comerciais. Extratos butanólicos, hexanólicos e etanólicos foram obtidos através de 0,9g de material vegetal. A planta foi deixada sobre fusão no escuro por 7 dias em 10 mL de solvente. Ao término dos 7 dias, os extratos foram filtrados, evaporados e ressuspensos em 10 mL de água destilada. Os extratos aquosos foram preparados todos os dias imediatamente antes do uso, a partir de uma infusão de 0,9g de planta em 10mL de água destilada a 95°C.

### 4.3 Atividade inibidora do radical DPPH

A atividade antioxidante dos extratos butanólico, hexanólico, etanólico e aquoso foram avaliados pelo monitoramento de sua habilidade em neutralizar o radical livre estável DPPH conforme descrito previamente [19]. Cada extrato (em concentração final de 10 a 1000µg/mL) foi misturado com 200µL de uma solução de DPPH com concentração de 0,3mM. Como branco foram utilizados 800µL de água destilada e 200µL de DPPH. A absorbância foi mensurada a 518nm após 30 minutos de reação a temperatura ambiente. A solução de DPPH foi preparada diariamente em ausência de luz. As atividades relativas foram calculadas por curva de calibração de L-ácido ascórbico como controle positivo. A capacidade inibitória foi calculada em percentual (IC%) através da equação:

$$IC\% = 100 - [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \times 100 / Abs_{controle}]$$



Onde:  $Abs_{amostra}$  será a absorvância obtida na presença de diferentes concentrações de extratos e  $Abs_{controle}$  foi obtida na ausência de extrato. As análises (n=5) foram realizadas em triplicatas.

#### **4.4 Degradação da desoxirribose**

A habilidade dos extratos da planta em prevenir a decomposição da desoxirribose induzida por  $Fe^{2+}/H_2O_2$  foi realizada utilizando o método descrito anteriormente por [20]. Primeiramente, os extratos (10-1000  $\mu g/mL$ ) foram adicionados a um sistema de reação contendo (concentrações finais): 3 mM de desoxirribose, 50 mM de tampão fosfato, 1mM de peróxido de hidrogênio e 0,025 mM de  $FeSO_4$ . O sistema foi incubado a 37° C por 30 minutos e a reação foi parada pela adição de 0,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético em concentração de 2,8%, seguida pela adição de 0,4 mL de uma solução de TBA em concentração de 0,6%. Os tubos foram então incubados em banho-maria por 60 minutos e 95° C. A absorvância foi medida em 532 nm no espectrofotômetro. Os dados foram expressos em percentual de inibição em relação ao controle (sem o extrato).

#### **4.5 Atividade inibitória do Óxido Nítrico (NO)**

A atividade inibitória do radical NO foi realizada pela incubação dos extratos com diferentes concentrações (10-1000  $\mu g/ml$ ) do extrato com nitroprussiato de sódio a 5mM em tampão fosfato na presença de luz. Após 120 minutos de incubação as amostras foram misturadas com 0,5 mL de reagente de Griess por 10 minutos. Logo após, a absorvância foi mensurada em 550 nm. Os valores foram comparados ao controle para determinar a porcentagem de inibição do NO [21].

#### **4.6 Ensaio de quelação do $Fe^{2+}$ e redução do $Fe^{3+}$**

A habilidade dos extratos em quelar o  $Fe^{2+}$  foi determinada utilizando-se do método descrito por [22-23]. Resumidamente, 150  $\mu L$  de solução de 0,5 mM de  $FeSO_4$  (preparada no momento de uso), foi adicionada a um sistema contendo 168  $\mu L$  de 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), 218  $\mu L$  de solução salina e os extratos das plantas

(10-1000 µg/mL), incubados por 10 minutos. A mistura obtida foi incubada por mais 5 minutos após a adição de 20 µL de 10-phenantroline (0,25 %). Subsequentemente, a absorbância foi mensurada a 510 nm em espectrofotômetro. Os valores foram comparados ao controle para determinar a porcentagem de quelação pelos diferentes extratos. A habilidade do extrato em reduzir o Fe<sup>3+</sup> foi determinada pela incubação de 150 µL de uma solução 0,5 mM de FeCl<sub>3</sub> no lugar de FeSO<sub>4</sub>, em ensaio semelhante ao utilizado na quelação do ferro descrito acima. O ensaio da 10-fenantrolina é capaz de detectar apenas íons de Fe<sup>2+</sup>, não identificando íons de Fe<sup>3+</sup>. Dessa forma, identifica-se a redução de íons de Fe<sup>3+</sup> se houver a identificação pelo reagente de cor de íons Fe<sup>2+</sup>. A habilidade relativa dos extratos em reduzir o Fe<sup>3+</sup> foi calculada por curva padrão de solução de ácido L-ascórbico sob mesmas condições experimentais.

#### **4.7 Ensaio de peroxidação lipídica**

A peroxidação lipídica foi determinada pela mensuração das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) como descrito previamente [24] com pequenas modificações. Para amostra biológica foi pesado 1g de gema de ovo e diluída em 100mL de 100 mM Tris-HCl, pH 7.4. Alíquotas de 100µL foram incubadas por 60 minutos em um meio contendo 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 na ausência ou presença de extrato (10-1000 µg/mL) ou extratos/Fe<sup>2+</sup> (10 µmol/l). Os sistemas foram incubados a 37°C por 60 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 0,5 mL de tampão ácido acético (pH 3.4) e os produtos da peroxidação lipídica foram mensurados pela adição de 0,6mL de TBA 0,6%. A reação de cor foi obtida pela incubação dos tubos em banho-maria por 1 hora a 97°C, após esse tempo 200µL de SDS foram adicionados. O sobrenadante foi retirado e a absorbância foi mensurada a 532 nm em espectrofotômetro. Os dados foram expressos como percentual em relação ao seu respectivo controle (sem o extrato).

#### **4.8 Determinação do conteúdo total de compostos fenólicos**

O conteúdo total de fenóis foi determinado pela mistura dos extratos com 50 µL de uma solução 0,5N do reagente de Folin-Ciocalteu, seguido pela adição de 1,0 mL de carbonato de sódio a 2%. Ácido gálico foi utilizado como padrão para os

compostos fenólicos. O conteúdo total de compostos fenólicos foi expresso em miligramas de equivalentes de ácido gálico/g de planta. [25].

#### **4.9 Determinação do conteúdo total de flavonoides**

O conteúdo total de flavonoides foi medido pelo ensaio do cloreto de alumínio [26]. As soluções padrões ou os extratos foram misturados com 5% de nitrito de sódio e incubados por 5 minutos a 37°C. Seguidamente, 15 µL de uma solução 10% de cloreto de alumínio foram adicionados e o sistema incubado por mais 6 minutos a 37°C. Por fim, 100 µL de NaOH e água foram adicionados. O cloreto de alumínio foi substituído pelo mesmo volume de água destilada nos brancos. Após a incubação a temperatura ambiente por 5 minutos a absorbância da reação foi mensurada a 510nm. Soluções padrão de quercetina (10-1000 µg/mL) foram utilizadas como padrão. O conteúdo total de flavonoides foi expresso em miligramas equivalentes de quercetina/g de planta seca.

#### **4.10 Análise Estatística**

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância ANOVA de uma via (one-way) seguido por pós-teste de Duncan quando apropriado. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0.05$

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Resultados

O extrato aquoso e etanólico, obtidos a partir de *U. tomentosa* inibiram igualmente, e de forma significativa ( $p < 0,05$ ), a oxidação do radical DPPH em concentrações mais elevadas (100-1000  $\mu\text{g/mL}$ ) (fig. 1). Em contraste, os extratos butanólico e hexanólico praticamente não tiveram efeito neste ensaio. Tendo em vista estes resultados, nos próximos experimentos foram utilizados apenas o extrato aquoso e etanólico.

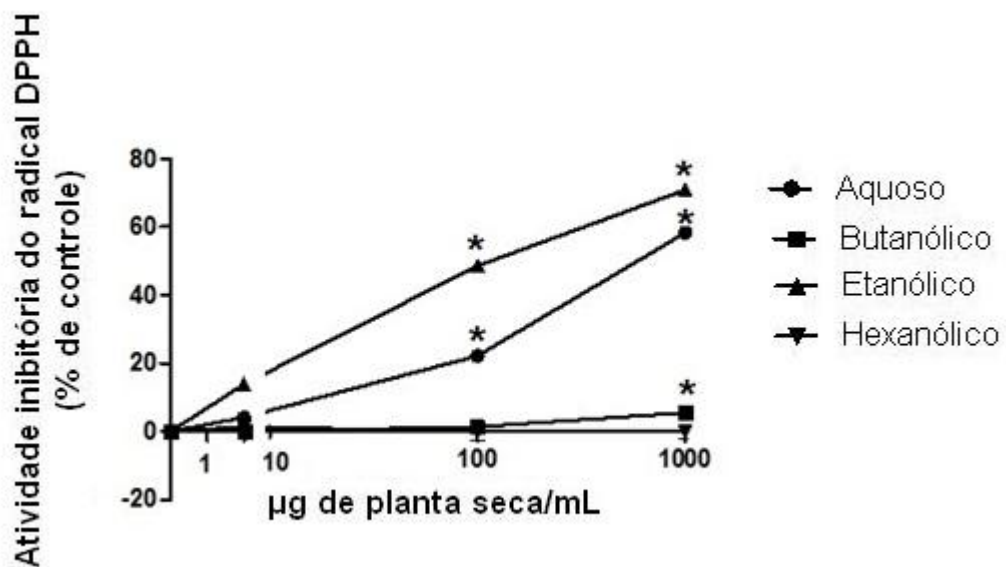


Figura 1. Atividade inibitória do radical DPPH pelos extratos de *Uncaria tomentosa*. Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

O extrato etanólico de *U. tomentosa* inibiu significativamente ( $p < 0,05$ ) a degradação da desoxirribose na concentração 1000 $\mu\text{g/mL}$  (50% de inibição; Fig. 2), enquanto que o extrato aquoso não apresentou nenhum efeito significativo.

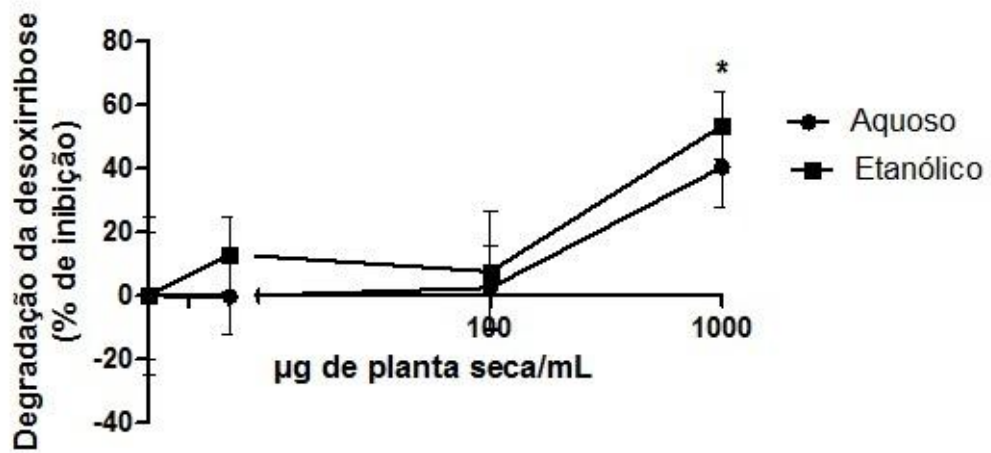


Figura 2. Efeitos dos extratos de *Uncaria tomentosa* na degradação da desoxirribose induzida pela reação de Fenton. Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Ambos os extratos de *U. tomentosa* tiveram efeito significativo ( $p < 0,05$ ) no teste de inibição do radical NO na concentração de  $1000 \mu\text{g/mL}$  (30 - 40% de inibição; Fig. 3)

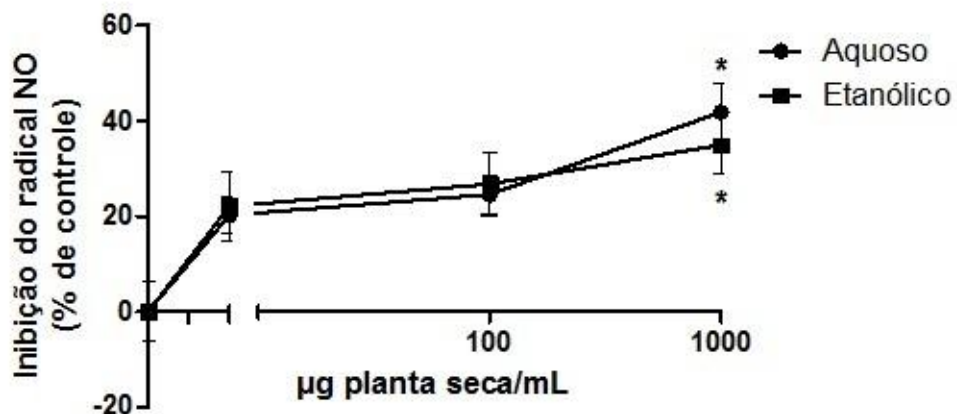


Figura 3. Atividade inibitória do radical NO pelos extratos de *Uncaria tomentosa*. Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Apenas extrato aquoso de *U. tomentosa* apresentou um efeito significativo ( $p < 0,05$ ) na capacidade de quelação de  $\text{Fe}^{2+}$  (30 % em  $1000 \mu\text{g/mL}$ ; Fig. 4).

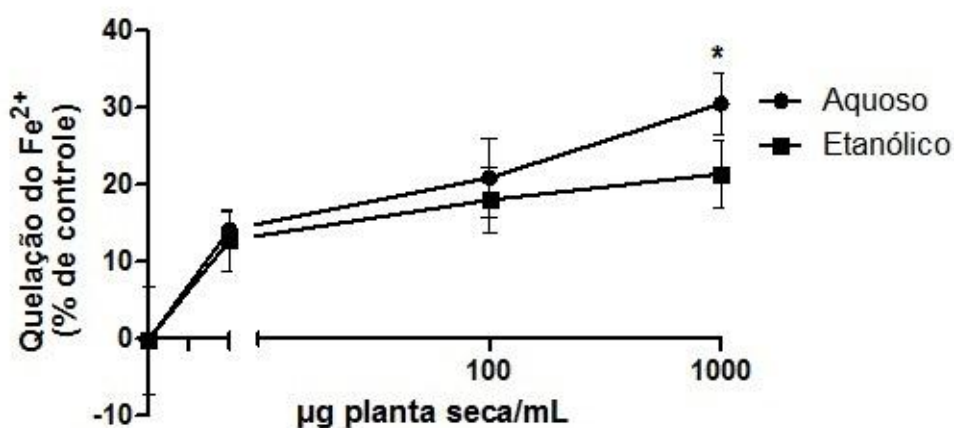


Figura 4. Capacidade quelante de  $Fe^{2+}$  dos extratos de *Uncaria tomentosa*. Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Ambos, o extrato aquoso e etanólico de *U. tomentosa* causaram uma significativa redução de  $Fe^{3+}$  ( $p < 0,05$ ). Os resultados apresentados demonstram claramente que os extratos da planta estudada foram capazes de reduzir o  $Fe^{3+}$  em comparação com o ácido ascórbico (Fig. 5).

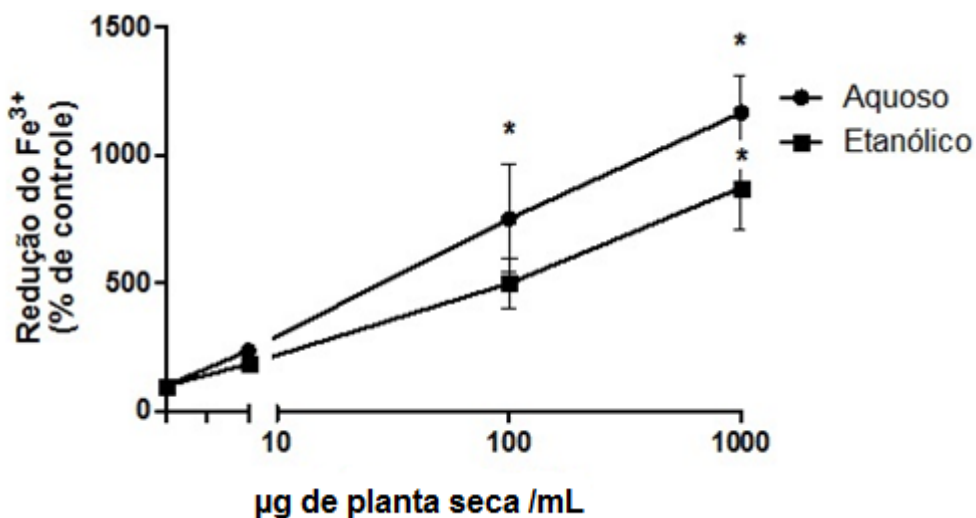


Figura 5. Capacidade dos extratos de *U. tomentosa* em reduzir  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ . Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

O extrato aquoso de *U. tomentosa* (Fig. 6) inibiu significativamente a produção de TBARS induzido  $Fe^{2+}$  na concentração de 1000  $\mu g/mL$ .

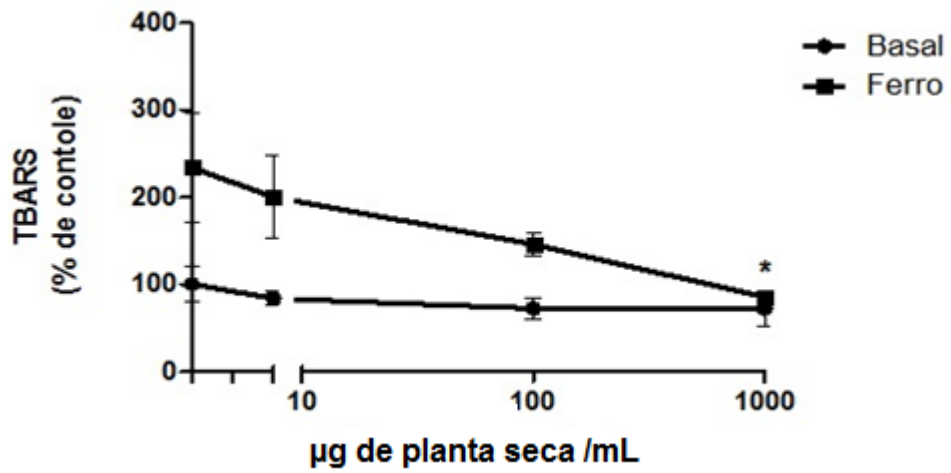


Figura 6. Efeitos do extrato aquoso de *Uncaria tomentosa* produção de TBARS induzida por  $Fe^{2+}$  em fosfolípidios. Valores considerados significativos quando  $p < 0,05$ .

Em contraste, o extrato etanólico de *U. tomentosa* (Fig. 7) não impediu a produção de TBARS nas situações estudadas.

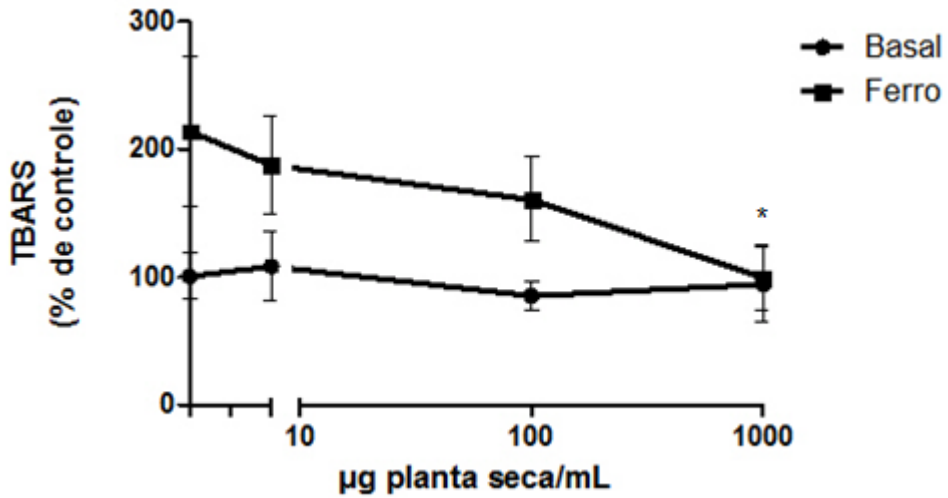


Figura 7. Efeitos do extrato etanólico de *Uncaria tomentosa* a produção de TBARS induzida por  $Fe^{2+}$  em fosfolípidios.

A quantidade de compostos fenólicos e flavonóides encontrados apresentam valores semelhantes entre o extrato aquoso e etanólico (Tabela 1)

**Tabela I.** Total polifenóis e flavonóides .

<b>Conteúdo total de polifenóis (nmol GA/g de planta)</b>	<b>Extrato aquoso</b>	<b>Extrato etanólico</b>
	44.61 ± 3.42	53.98 ± 2.47
<b>Conteúdo total de flavonóides (nmol de quercetina/g de planta)</b>		
	12.54 ± 0.52	9.67 ± 0.20

## 5.2 Discussões

Apesar de várias ações farmacológicas de *U. tomentosa* terem sido previamente relatadas, os mecanismos envolvidos nas propriedades terapêuticas, especialmente em efeito antioxidante dessa planta são mal compreendidos. Assim, no presente estudo, avaliamos o efeito dos extratos aquosos e etanólico dessa planta, utilizando de diferentes sistemas de geração de espécies reativas *in vitro*, de modo a investigar possíveis mecanismos envolvidos na sua atividade antioxidante. Nossos resultados demonstram claramente que os extratos da planta estudada possuem capacidade antioxidante nas nossas condições de ensaio analisadas. No entanto, o efeito varia dependendo do extrato (se aquoso ou etanólico) e do ensaio considerado. Além disso, determinamos a quantidade de compostos fenólicos totais e conteúdo de flavonóides em extratos das plantas para estabelecer uma possível relação com a atividade antioxidante. Em suma, verificou-se que o teor de fenólicos totais e flavonóides presentes nos dois extratos se mostraram semelhantes.

Os compostos fenólicos são um dos maiores e mais onipresentes grupos de metabólitos de plantas e há interesse atual em suas propriedades antioxidantes, antimutagênica, neuroprotetora, anticarcinogênica e atividade anti-inflamatória [27-28]. De fato, muitos pesquisadores relataram correlação positiva entre a atividade de eliminação de radicais livres e compostos fenólicos totais [27-29]. De particular importância, há várias características moleculares que conferem a capacidade de um dado flavonóide para doar elétrons prontamente e reduzir as espécies reativas como a presença de grupos hidroxilo ligados a anéis fenólicos [27,30-31]. Assim, as



posições e, mais importante ainda, as quantidades de grupos hidroxila presentes no esqueleto polifenólico se correlaciona com a sua capacidade de doar elétrons aumentando assim a sua capacidade para neutralizar espécies reativas [30,31-32]. No entanto, não encontramos aqui qualquer correlação entre o teor de compostos fenólicos e os efeitos antioxidantes. Além disso, mais estudos são necessários para melhor caracterizar o perfil fitoquímico dos extratos da planta em estudo, a fim de estabelecer os possíveis compostos candidatos para os resultados apresentados.

No teste de DPPH, encontramos que o extrato aquoso e etanólico apresentaram atividade significativa na captura dos radicais DPPH nas concentrações estudadas (100-1000µg/mL de planta seca; Figura 1). Em contraste, outros extratos (butanólico e hexanólico) foram quase ineficazes contra radical DPPH. O ensaio radical DPPH tem sido amplamente utilizado para testar a capacidade de eliminação de radicais livres de vários produtos naturais [33] e tem sido aceito como um modelo para os radicais livres originários de lipídios [34]. Assim, ambos os extratos obtidos a partir de *U. tomentosa* exibem atividade significativa no DPPH, indicando o potencial destes extratos da planta, como neutralizadores de radicais livres. Outros estudos já relatam os efeitos positivos de extratos de *U. tomentosa* na inibição do radical DPPH, suportando, assim, os nossos resultados. [35,36-37]

No ensaio de desoxirribose, encontramos que apenas o extrato etanólico de *U. tomentosa* (1000µg/mL de planta seca; figura 2) apresentou efeito significativo neste teste. Assim, considerando que os extratos de plantas não apresentaram atividade "catalase -like" (não interage com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; dados não mostrados), sugerimos que os nossos extratos são capazes de interagir, pelo menos em parte, com o radical hidroxila. Além disso, a degradação de desoxirribose é resultante, pelo menos em parte, do ataque dos radicais hidroxilo geradas pela reação de Fenton, o que resulta na formação de fragmentos de carbonil [38-39]. Assim, pode-se sugerir que o teste do efeito antioxidante de extratos de plantas (atividade de radical hidroxil) baseia-se na reação competitiva de desoxirribose e dos constituintes das plantas, com os radicais hidroxil reativos [38-39].

Nossos dados também suportam as interações de extratos de plantas com a química redox de íons de ferro (Figuras 4 e 5). De fato, os nossos dados demonstram claramente que o extrato aquoso de *U. tomentosa* (1000µg/mL de planta seca; Figura 4) foi capaz de quelar Fe<sup>2+</sup>, sob as nossas condições de ensaio.

Além disso, ambos os extratos de *U. tomentosa* (1000 µg/mL de planta seca e a figura 5) foram capazes de doar elétrons ao Fe<sup>3+</sup>, reduzindo-o a Fe<sup>2+</sup>. Levando-se em conta os resultados apresentados, sugere-se que os extratos de *U. tomentosa* podem estar interagindo com íons ferro (química redox de ferro) e assim, contribuindo para a atividade antioxidante aqui relatada. De fato, muitos metabolitos de plantas apresentam grupos que são importantes para a complexação de ferro [40].

Assim, com base no exposto e nos resultados aqui apresentados (Figuras 2 - 7), especula-se que os metabolitos das plantas, presentes nos extratos, podem ter interagido com a química redox de íons de ferro, assim, interferindo com o ciclo de redox neste metal. Nossa suposição, é ainda, apoiada pelos resultados de TBARS. De fato, verificou-se aqui que os extratos da planta apresentaram atividade antioxidante frente a peroxidação lipídica induzida por Fe<sup>2+</sup> em fosfolipídios isolados (Figuras 6 e 7), sendo sem efeito contra geração basal de TBARS. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores em ensaios de peroxidação lipídica. [35,36-37]

Além de sua capacidade de interagir com a química redox de íons de ferro, o extrato de *U. tomentosa* também mostrou-se capaz de neutralizar os radicais NO. De fato, ambos os extratos de *U. tomentosa* (1000 µg/ mL de planta seca; Figura 3) foram capazes de neutralizar o radical NO. Como assinalado anteriormente, a inibição de radical NO também é considerada uma medida da atividade antioxidante [29], uma vez que os antioxidantes inibem a formação de nitrito (nitrito é um resultado da reação de nitroprussiato de sódio com oxigênio), competindo diretamente com o oxigênio [29-41].

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, encontramos neste estudo que o extrato aquoso e/ou etanólico de *U. tomentosa* apresentam atividade antioxidante em condições *in vitro*. No entanto, o efeito antioxidante relatado aqui varia, dependendo do ensaio utilizado. No entanto, a ampla gama de atividade antioxidante do extrato da *U. tomentosa* indica o potencial uso da mesma como fonte de antioxidantes naturais com potencial aplicação para reduzir os níveis de ROS e, consequentes benefícios para a saúde. Considerando os resultados, sugerimos que os compostos fenólicos encontrados na planta são os principais contribuintes para a atividade antioxidante relatada aqui. Além disso, a presença de compostos fenólicos e flavonóides no extrato estudado sugerem que o mesmo poderia oferecer vários benefícios para a saúde, uma vez que os flavonóides foram ligados a benefícios na redução do risco de certos tipos de câncer [42-43] e doenças cardiovasculares [44,45-46].

## 7 REFERÊNCIAS

1. HALLIWELL, B. e GUTTERRIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**: Oxford University Press. 2003
2. HALLIWELL, B. **Role of free radicals in the neurodegenerative diseases: therapeutic implications for antioxidant treatment**. *Drugs Aging*, 18: 685-716. 2001.
3. PEREIRA, R.P., et al., **Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus***. *Neurochem Res*, 2009. **34**(5): p. 973-83.
4. JANKUN, J., et al., **Why drinking green tea could prevent cancer**. *Nature*, 1997. **387**(6633): p. 561
5. TIJBURG, L.B., et al., **Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review**. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1997. **37**(8): p. 771-85
6. CUI, K., LUO, X. L., XU, K. Y., MURTHY, M. R. V. **Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants**. *ProgNeuropsychopharmacolBiol Psychiatry*, 28: 771–799. 2004
7. SILVA, C. G., HERDEIRO, R. S., MATHIAS, C. J., PANEK, A. D., SILVEIRA, C. S., RODRIGUES, V. P., RENNO, M. N., FALCÃO, D. Q., CERQUEIRA, D. M., MINTO, A. B. M. **Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants**. *Pharm Res* 52:229–233. 2005.
8. KIRAKOSYAN, A; **Antioxidant Capacity of poliphenolic Extracts from Leaves of *Crataeguslaevigata*and *Crataegusmonogyna*(Hawthorn) Subjected to Drought and Cold stress**. *J. Agric. FoodChem*.2003
9. RIZZI, R. et al. **Mutagenic and antimutagenic activities of *Uncaria tomentosa* and its extracts**. *Journal of Ethnopharmacology*, 38 (1993) 63-77
10. AQUINO, R. et al. **New polyhydroxylated triterpenes from *Uncaria tomentosa*** .*Journal of Natu-ral Products*, S.I., v. 53, n. 3, p.559-564, may. / jun. 1990.
11. BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. Vol. 2. / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

12. HALLIWELL, B.; *MULAT. Res.* **1999**, *443*, 37; CHATGILIALOGLU, C.; O'NEILL, P.; *Exp. GERONTOL.* **2001**, *36*, 1459; WISEMAN, H.; KAUR, H.; HALLIWELL, B.; *Cancer Lett.* **1995**, *93*, 113; CADET, J.; DELATOUR, T.; DOUKI, T.; GASPARUTTO, D.; POUGET, J. P.; RAVANAT J. L.; SAUVAIGO, S.; *Mutat. Res.* **1999**, *424*, 9.
13. SORG O 2004. **Oxidative stress: a theoretical model or biological reality?** *C R Biol* 327: 649-662.
14. PERSSONELLE JG. **Cosmiatria, a ciência da beleza.** São Paulo: Revinter; 2004. 244p.
15. KOURY JC, DONANGELO CM. **Zinco, estresse oxidativo e atividade física.** *Rev Nutr.* 2003; 16(4):433-41. doi: 10.1590/S1415-52732003000400007.
16. SIES, H. **Strategies of antioxidant defence.** Review. *European Journal of Biochemistry*, Berlin, v.215, n.2, p.213-219, 1993. 9
17. PIETTA, P.; *J. Nat. Prod.* 2000, *63*, 1035.
18. HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H.; *FEBS Lett.* **2000**, *486*, 10; Babior, B. M.; *Am. J. Med.* **2000**, *109*, 33.
19. CHOI CW, et al., **Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison.** *Plant Sci* 2002. **153**: p. 1161-1168.
20. HALLIWELL, B. and J.M. Gutteridge, **Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals.** *FEBS Lett*, 1981. *128*(2): p. 347-52.
21. GREEN, L.C., et al., **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids.** *Anal Biochem*, 1982. **126**(1): p. 131-8.
22. MARCOCCI, L., et al., **The nitric oxide-scavenging properties of Ginkgo biloba extract EGb 761.** *Biochem Biophys Res Commun*, 1994. **201**(2): p. 748-55.
23. MINOTTI, G. and S.D. Aust, **An investigation into the mechanism of citrate-Fe<sup>2+</sup>-dependent lipid peroxidation.** *Free Radic Biol Med*, 1987. **3**(6): p. 379-87.
24. OHKAWA, H., N. Ohishi, and K. Yagi, **Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction.** *Anal Biochem*, 1979. **95**(2): p. 351-8.

25. SINGLETON VL, Orthofer R, and L.-R. RM, **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent.** Meth Enzymol, 1999. **299**: p. 152–178.
26. KOSALEC, I., et al., **Quantitative analysis of the flavonoids in raw propolis from northern Croatia.** Acta Pharm, 2004. **54**(1): p. 65-72.
27. PEREIRA, R.P., et al., **Antioxidant effects of different extracts from *Melissa officinalis*, *Matricaria recutita* and *Cymbopogon citratus*.** Neurochem Res, 2009. **34**(5): p. 973-83.
28. A.K. ATOUI, A.M., G. Boskou, P. Kefalas, **Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile.** Food Chemistry, 2005. **89**: p. 27-36.
29. AMAEZE, O.U., et al., **Evaluation of antioxidant activity of *Tetracarpidium conophorum* (Mull. Arg) Hutch & Dalziel leaves.** Oxid Med Cell Longev, 2011. **2011**: p. 976701.
30. FRANCO, J.L., et al., **Structure-activity relationship of flavonoids derived from medicinal plants in preventing methylmercury-induced mitochondrial dysfunction.** Environ Toxicol Pharmacol, 2010. **30**(3): p. 272-278.
31. WAGNER, C., et al., **Comparative study of quercetin and its two glycoside derivatives quercitrin and rutin against methylmercury (MeHg)-induced ROS production in rat brain slices.** Arch Toxicol, 2010. **84**(2): p. 89-97.
32. RICE-EVANS, C.A., N.J. Miller, and G. Paganga, **Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids.** Free Radic Biol Med, 1996. **20**(7): p. 933-56.
33. KEDARE, S.B. and R.P. Singh, **Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay.** J Food Sci Technol, 2011. **48**(4): p. 412-22.
34. YASUDA, T., et al., **Urinary metabolites of gallic acid in rats and their radical-scavenging effects on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical.** J Nat Prod, 2000. **63**(10): p. 1444-6.
35. GONÇALVES, C. DINIS, T. BATISTA, M. T. **Antioxidant properties of proanthocyanidins of *Uncaria tomentosa* bark decoction: a mechanism for anti-inflammatory activity.** Phytochemistry 66 (2005) 89–98.
36. DREIFUSS, A.A. et al. **Antitumoral and antioxidant effects of a hydroalcoholic extract of cat's claw (*Uncaria tomentosa*) (Willd. Ex Roem. &**

Schult) in an in vivo carcinosarcoma model. *Journal of Ethnopharmacology* 130 (2010) 127–133.

37. SANDOVAL, M. et al. **Anti-inflammatory and antioxidant activities of cat's claw (*Uncaria tomentosa* and *Uncaria guianensis*) are independent of their alkaloid content.** *Phytomedicine* 9: 325–337, 2002

38. HALLIWELL, B., J.M. Gutteridge, and O.I. Aruoma, **The deoxyribose method: a simple "test-tube" assay for determination of rate constants for reactions of hydroxyl radicals.** *Anal Biochem*, 1987. **165**(1): p. 215-9.

39. PERJESI, P. and Z. Rozmer, **Kinetic analysis of some chalcones and synthetic chalcone analogues on the fenton-reaction initiated deoxyribose degradation assay.** *Open Med Chem J*, 2011. **5**: p. 61-7.

40. CHOBOT, V. and F. Hadacek, **Iron and its complexation by phenolic cellular metabolites: from oxidative stress to chemical weapons.** *Plant Signal Behav*, 2010. **5**(1): p. 4-8.

41. BABU, B.H., B.S. Shylesh, and J. Padikkala, **Antioxidant and hepatoprotective effect of *Acanthus ilicifolius*.** *Fitoterapia*, 2001. **72**(3): p. 272-7.

42. DREOSTI, I.E., M.J. Wargovich, and C.S. Yang, **Inhibition of carcinogenesis by tea: the evidence from experimental studies.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1997. **37**(8): p. 761-70.

43. WISEMAN, S.A., D.A. Balentine, and B. Frei, **Antioxidants in tea.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1997. **37**(8): p. 705-18.

44. PIETROVSKI, E.F., et al., **Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16beta-trihydroxylup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice.** *Pharmacol Biochem Behav*, 2006. **83**(1): p. 90-9.

45. KONO, S., et al., **Relation of green tea consumption to serum lipids and lipoproteins in Japanese men.** *J Epidemiol*, 1996. **6**(3): p. 128-33.

46. TIBURG, L.B., et al., **Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review.** *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1997. **37**(8): p. 771-85.