AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *ERUCA SATIVA*, BRASSICACEA BIOLOGICAL ACTIVITIES EVALUATION *ERUCA SATIVA*, BRASSICACEA

Vânia Maria BARBOSA¹; Obdulio Gomes MIGUEL¹; Cristina Mayumi Sasaki MIYAZAKI²;
Maria Christina dos Santos VERDAM²; Beatriz Cristina K. HIROTA² Sila Mary Rodrigues
FERREIRA¹

¹Departamento de Nutrição, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, (UFPR), Av. Prefeito Lothario Meissner, 632, Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba-PR, Brasil

²Departamento de Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, (UFPR), Av. Prefeito Lothario Meissner, 632, Jardim Botânico, 80210-170, Curitiba-PR, Brasil

Resumo:

A má alimentação característica dos dias atuais está relacionada com o aumento significativo de doenças crônicas não transmissíveis, sendo a dieta equilibrada, aliada ao consumo de antioxidantes naturais, um objeto para reversão deste quadro. Os metabólitos secundários presentes em vegetais são alternativas de inibidores de radicais livres. Assim, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antioxidante de *Eruca sativa*, a rúcula, utilizando-se o ensaio de redução do radical DPPH e o método de formação do complexo fosfomolibdênio; e avaliar toxicidade frente à *Artemia salina* e investigar a atividade hemolítica. O extrato etanólico de *Eruca sativa* apresentou potencial antioxidante no ensaio de redução do complexo do fosfomolibdênio, não mostrou atividade hemolítica e foi considerado ativo na avaliação de toxicidade frente à *Artemia salina*. Os resultados demonstram a importância de mais testes para avaliação da capacidade antioxidante.

Palavras-chave: *Eruca sativa*; rúcula; atividade antioxidante; toxicidade.

Abstract:

Inadequate supply characteristic in these days is directly related to the significant increase of chronic diseases. A well balanced diet that includes the consumption of natural antioxidants is the tool for this frame. Secondary metabolites present in vegetables are a good alternatives to inhibit that action of free radical. Thus, this study aims to evaluate the antioxidant activity of *Eruca sativa*, rúcula, by using DPPH radical reducing assay and phosphomolibdenium complex formation assay; evaluate preliminary toxicity by *Artemia salina* assay and determine hemolytic activity. The ethanolic extract of *Eruca sativa* results showed that it has antioxidant potential in phosphomolibdenium complex formation assay. The same sample did not show any hemolytic activity and was considered active in the evaluation of preliminary toxicity on *Artemia salina* microcrustaceans. These results can be considered of significant value

for further analysis on toxicity and pharmacology evaluation.

Keywords: *Eruca sativa*; antioxidant activity, toxicity.

1. INTRODUÇÃO

Na atualidade o aumento significativo da incidência de doenças, como as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), está relacionado ao processo de transição nutricional em que os hábitos alimentares mundiais se modificaram e o perfil nutricional da população passou a ser outro. (BATISTA FILHO & RISSIN, 2003)

Escolhas alimentares inadequadas, dentre outros fatores, podem desencadear um quadro de estresse oxidativo, sendo uma das causas mais reportadas na literatura atual do desencadeamento de DCNT. (RAO & AGARWAL, 2000; SOUSA et al., 2007; VANNUCCHI et al., 1998) De acordo com Sies e Stahl (1995), o estresse oxidativo, consiste de um desequilíbrio entre a defesa antioxidante e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), os radicais livres. Estes são produto ou resultado das reações de oxido-redução, cedendo o elétron solitário e tendo por consequência, sua oxidação; ou recebendo outro elétron, reduzindo-se; podendo ser decorrentes tanto do processo de metabolismo celular, ou devido à exposição a fatores exógenos. (CERUTTI, 1991; FERREIRA & MATSUBARA, 1997; HALLIWELL & WHITEMAN, 2004)

A atuação da atividade antioxidante no controle de doenças ocorre pela sua função de bloquear e estabilizar os radicais livres por diferentes meios, agindo diretamente na neutralização de sua ação, ou participando indiretamente de sistemas enzimáticos com esta função. (ANDERSON, 1996; SHAMI & MOREIRA, 2004)

O excesso de radicais livres pode ser combatido por antioxidantes endógenos, e fontes exógenas podem atuar em seu lugar, sendo a dieta grande colaboradora para um aumento da atividade antioxidante. (SHAMI & MOREIRA, 2004) A inserção de produtos vegetais é uma alternativa de antioxidantes naturais, devido aos seus compostos fenólicos que inibem a formação de radicais livres. (DROGE, 2002; MORAIS et al., 2009)

A rúcula (*Eruca sativa*), pertencente a família da Brassicacea, é um exemplar de hortaliça comum nas regiões de colonização italiana no Brasil e originária da Região Mediterrânea e da Ásia Ocidental, apreciada pelo cheiro acentuado e agradável e sabor picante. É consumida em forma de salada, ou em preparações elaboradas, cujo consumo vem crescendo no país. (GOULART & TILLMANN, 2007; SALA et al., 2004) Goulart e Tillmann (2007) citam suas propriedades como sendo grande fonte de ferro, vitaminas A e C, e minerais.

Dentre os métodos para avaliar a atividade antioxidante, estão o método de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) e o método de formação do

complexo fosfomolibdênico. (BRAND-WILLIAMS, CUVELIER & BERSET, 1995; PRIETO, PINEDA, & AGUILAR, 1999) O método de complexação pelo fosfomolibdênio é uma maneira barata e simples de avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos como é o caso de extratos obtidos de plantas, bem como suas frações. (PRIETO, PINEDA, & AGUILAR, 1999) Compostos vegetais que possuem atividade antioxidante interagem com o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila; radical livre e estável) permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre, reduzindo-o. (MENSOR, 2001)

Para avaliar a toxicidade, foram realizados ensaios preliminares como a determinação da atividade hemolítica e teste de toxicidade frente à *Artemia salina*. (MEYER et al., 1982)

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante eo potencial tóxico do extrato etanólico de *Eruca sativa*, utilizando os métodos de redução do radical DPPH e formação do complexo fosfomolibdênico; a toxicidade frente à *Artemia salina* e atividade hemolítica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

A amostra, composta pelas raízes e partes aéreas de *Eruca sativa* orgânica, foi obtida no mês de maio no Mercado de Orgânicos no Mercado Municipal do município de Curitiba, Estado do Paraná.

As raízes e partes aéreas da planta foram secas em estufa de secagem à 60°C, por 48 horas, trituradas, passadas por tamis de 1,4mm e extraído por método de Soxhlet. (CARVALHO, 2009)

2.2 Formação do Complexo Fosfomolibdênico

Foram colocados em tubos de ensaio 1,5 ml do reativo (molibdato de amônio 4 mM, fosfato de sódio 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M), 1,5 ml de água destilada e 0,3 ml de solução amostra na concentração de 200 µg/ml. Os tubos foram parcialmente fechados e colocados em banho-maria a 95°C durante 90 minutos. Após resfriamento a leitura foi feita em espectrofotômetro UV a 695 nm, utilizando como branco 0,3 ml de etanol, 1,5ml de água e 1,5 ml de reativo. Como referências, utilizou-se ácido ascórbico e rutina na concentração de 200 µg/ml. Para o cálculo da Atividade antioxidante foi utilizada a seguinte fórmula de acordo com Prieto, Pineda, & Aguilar, (1999).

$$\text{AAR\%} = [(\text{Abs}_{(\text{amostra})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}) / (\text{Abs}_{(\text{Vit C. ou Rutna})} - \text{Abs}_{(\text{branco})})] \times 100$$

2.3 Avaliação da capacidade de reação com o radical DPPH

Foram preparados 50 ml de solução estoque de DPPH em etanol na concentração de 1 mmol/ml. Foram feitas diluições de 350, 300, 200, 100, 50 mg/ml. Para cada ensaio utilizou-se 2,5 ml de amostra e 1 ml de solução DPPH. Como branco das amostras substituiu-se a solução de DPPH por etanol e como controle a amostra foi substituída apenas por etanol. As leituras foram feitas em espectrofotômetro UV à 518 nm.

A determinação do IC₅₀ foi feita através da fórmula seguinte:

$$\text{AA\%} = 100 - [(\text{Abs}_{(\text{amostra})} - \text{Abs}_{(\text{branco})}) / \text{Abs}_{(\text{controle})}] \times 100$$

Para o cálculo de IC₅₀ foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH. Para cálculo do IC₅₀ das substâncias referências, a rotina foi utilizada nas concentrações de 20 µg/ml; e o ácido ascórbico nas concentrações de 10 µg/ml.

2.4 Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*

200mg de ovos de *A. salina* foram colocados para eclodir em 400 ml de salina, durante 48 horas sob aeração contínua, exposição à luz diurna, temperatura entre 27 e 30°C e pH 8,0 – 9,0, nas seguintes concentrações do extrato bruto: 10, 100 e 1000 µg/ml. O ensaio foi realizado em triplicata, tendo como parâmetro de avaliação o número de náuplios mortos e vivos, realizada após 24 horas. A análise estatística foi realizada usando-se o programa Probitos. (MEYER et al., 1982)

2.5 Determinação da atividade hemolítica

O ensaio foi realizado utilizando sangue de carneiro NEWPROV® lavado 3 vezes com tampão fosfato e a partir do qual foi preparada uma solução de eritrócitos 2%. O extrato vegetal testado foi preparado em concentrações decrescentes de 1000,

500, 200 e 100 µg/ml com tampão fosfato pH 7,4 e suspensão de sangue (2%). O material foi colocado em tubos de ensaio, deixado em repouso por 30 minutos e agitado delicadamente para se evitar a formação de espuma. Após esse tempo o material permaneceu em repouso por 150 minutos e foi levado a centrifugação 3000 rpm por 5 minutos. Foram observadas a formação de depósito de eritrócitos e a coloração da solução, sendo considerada ausência de atividade hemolítica o tubo com solução clara, límpida e com depósito de eritrócito, e considerado presença de atividade hemolítica os tubos com solução avermelhada. O controle positivo foi realizado com tampão fosfato e o controle negativo com água destilada.

3. RESULTADOS

3.1 Formação do Complexo Fosfomolibdênico

A atividade antioxidante do extrato etanólico de *Eruca sativa* foi calculada em relação à vitamina C e rutina, sendo essas consideradas 100%. Resultado pode ser visualizado na Tabela 1.

TABELA 1 – Atividade Antioxidante pela Redução do Complexo do Fosfomolibdênio

Amostra	Atividade antioxidante em relação à rutina (%)	Atividade antioxidante em relação à vitamina C (%)
Extrato <i>Eruca sativa</i>	376,49	109,81

Assim, o extrato apresenta atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio, podendo ser considerada um antioxidante em potencial, apresentando 100% da atividade da vitamina C e quando comparado à rutina, 400% da atividade.

O Gráfico 1, visualiza a porcentagem de inibição do complexo fosfomolibdênio, considerando a vitamina C como 100%.

GRÁFICO 1- Porcentagem de Inibição do Complexo do Fosfomolibdênio

3.2 Avaliação da capacidade de reação com o radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Foi calculada a porcentagem da atividade antioxidante relativa e através da equação da reta, o IC_{50} , cujos valores apresentam-se nos Gráficos 2, 3 e 4.

GRÁFICO 2 - Curva da Vitamina C pela redução do radical DPPH

GRÁFICO 3 - Curva da Rutina pela redução do radical DPPH

GRÁFICO 4 – Curva do Extrato Etanólico pela redução do radical DPPH

O valor de IC_{50} da amostra foi comparada com os padrões, vitamina C e rutina, e para verificar diferença entre as amostras aplicou-se o teste de Tukey ($p < 0,05$), e diferença estatística Anova. A Tabela 2 apresenta os resultados de IC_{50} e classificação segundo teste de Tukey.

TABELA 2 - Resultado de IC_{50} e Teste de Tukey para Redução do DPPH

Amostra	Valores de IC_{50} em $\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$	Classificação segundo Teste de Tukey
VITAMINA C	$4,2766 \pm 0,0310$	a1
RUTINA	$6,6502 \pm 0,0260$	a2
EXTRATO ETANÓLICO	$532,5588 \pm 0,1085$	a3

O extrato apresentou valor de IC_{50} superior ao da vitamina C e rutina, sendo consideradas menos ativas que os padrões analisados, pois uma quantidade maior da amostra é necessária para reduzir 50% da concentração inicial do radical DPPH.

3.3 Avaliação de toxicidade frente à *Artemia salina*

A toxidade frente à *Artemia salina* foi estimada através da concentração média letal (DL_{50}). Os resultados do cálculo da DL_{50} foram submetidos ao teste estatístico Probitos, e encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3 – DL₅₀ e Mortalidade da *A. salina*

Amostra	Mortalidade/ Concentração				DL ₅₀ (µg/ml)	Int.de Confiança de 95%
	C	10 µg/ml	100 µg/ml	1000 µg/ml		
Extrato etanólico	0	0	0	10	<1000	--
	0	0	0	10	<1000	--
	0	0	0	10	<1000	--

Legenda: C – Controle; DL₅₀ – Concentração média letal

As frações podem ser consideradas ativas, pois a partir do teste estatístico, a DL₅₀ foi de 316,23 µg/ml e 95% de intervalo de confiança, ou seja, menor que 1000 µg/ml como preconiza a metodologia.

3.4 Determinação da atividade hemolítica

Em relação à determinação da atividade hemolítica, os resultados foram negativos, não apresentando rompimento das hemácias e o extravasamento de seu conteúdo. Garantindo uma base confiável para posteriores testes de toxicidade.

4. CONCLUSÃO

Através dos resultados do método de redução do complexo do fosfomolibdênio, pode-se considerar o extrato etanólico de *Eruca sativa* um antioxidante em potencial quando comparado à vitamina C e rutina. Porém não apresentou resultados expressivos na avaliação da capacidade de reação com o radical 2,2 difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), sendo necessária uma concentração maior da amostra para reduzir 50% do radical DPPH inicial. A diferença entre os resultados demonstra a importância de se submeter as amostras testadas a outras metodologias para melhor avaliar sua capacidade antioxidante.

Em relação à determinação da atividade hemolítica, o resultado negativo do teste preliminar realizado, indica que a amostra não apresentou capacidade de romper as hemáceas. E o extrato etanólico de *Eruca sativa* foi considerado ativo na avaliação de toxicidade frente ao microcrustáceo *A. salina*. Considera-se assim estes resultados de significativo valor para análises posteriores em ensaios de toxicidade e farmacologia.

5. REFERÊNCIAS

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, n.1, p.103-108, 1996.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública**, vol.19 (1 Supl):181-191, 2003.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

CARVALHO, J. L. S.; **Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2009.

CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, Oxford, v.21, n.1, p.1-5, 1991.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, vol. 82, n.1, p. 47-95, 2002.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, vol.43, n.1., 1997.

GOULART, L. S.; TILLMANN, M. A. A. Vigor de sementes de rúcula (*Eruca sativa* L.) pelo teste de deterioração controlada. **Rev. bras. Sementes**, vol.29, n.2, p. 179-186, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **Br J Pharmacol**, v. 142, p. 231-55, 2004.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoterapy Research**, v.15, p.127-130, 2001.

MEYER, B. N. ; N. R., FERRIGNI ; L. B., JACOBSEN; D. E., NICHOLS; J. L., MCLAUGHLIN. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, p.31-34, 1982.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M.O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev. bras. farmacogn.**, vol.19, n.1b, 2009.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.

RAO, A.V.; AGARWAL, S. Role of antioxidant lycopene in cancer and heart disease: A review. **J. Am. Coll. Nutr.**, v.19, n.5, p.563-569, 2000.

SALA, F. C.; ROSSI, F.; FABRI, E. G.; RONDINO, E.; MINMI, K.; COSTA, C. P. Caracterização varietal de rúcula. In: Anais do 44º Congresso Brasileiro de Olericultura. **Horticultura Brasileira**, Campo Grande, v.22, n.2, jul. 2004.

SHAMI, N. J. I. E., MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Rev. Nutr.**, vol.17, n.2, 2004.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SOUSA, C. M. M. ; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S., CHAVE M. H. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova**, vol.30, n.2, p. 351-355, 2007.

VANNUCCHI, H.; MOREIRA, E.A.M.; CUNHA,D.F.; JUNQUEIRA-FRANCO, M.V.M.; BERNARDES, M.M.; JORDÃO JR, A. Papel dos nutrientes na peroxidação lipídica e no sistema de defesa antioxidante. **Medicina**, Ribeirão Preto v.31, p.31-44, 1998.