

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA *Mimosa tenuiflora*

Simone Paes Bastos Franco (1); João Gomes da Costa (2); Jessé Marques da Silva Junior Pavão (3); Alan John Duarte de Freitas (4); Julielle dos Santos Martins (5)

(1) Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Alagoas – simone_paes7@hotmail.com;

(2) Centro Universitário Cesmac – joao-gomes.costa@embrapa.br;

(3) Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Alagoas – alan.freitas@ifal.edu.br;

(4) Centro Universitário Cesmac – marquesjjunior@gmail.com;

(5) Centro Universitário Cesmac – juliellemartins4@gmail.com.

Resumo: Introdução: A crescente busca por plantas que apresentem capacidade de captura do radical livre no organismo humano vem merecendo destaque pela minimização de doenças degenerativas e câncer (NEVES E BRANDÃO, 2012). Extratos de espécies vegetais apresentam em sua composição química, diversos metabólitos secundários que são responsáveis por conferirem às plantas várias atividades biológicas merecendo destaque a atividade antioxidante (Silva et al, 2014). A *Mimosa tenuiflora*, uma leguminosa pertencente à família Mimosoideae, popularmente conhecida como jurema preta, é encontrada na região caatinga, apresenta diversos compostos bioativos em sua composição e é muito utilizada na medicina popular (NEVES, 2015). **Objetivo:** Diante do que foi exposto o presente trabalho teve como objetivo determinar a composição de compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante da *Mimosa tenuiflora*. **Metodologia:** Foi realizado uma extração por maceração das folhas de mimosa tendo como solvente extrator o acetato de etila. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo metodologia descrita por Mensor et al (2001). A partir de 0,0025 g do extrato vegetal em 25 mL de etanol foi preparada as soluções para a leitura, que para cada concentração analisada foi retirado uma alíquota de 2,5 mL (em triplicata) e posteriormente a adição de 1,0 mL da solução etanólica de DPPH a 0,3 mM. Para o preparo do branco (em triplicata – para cada concentração), foi adicionado em cada vidro âmbar 2,5 mL da solução teste e 1,0 mL de ETOH 99%. O negativo foi realizado em triplicata e em cada vidro âmbar foi adicionado uma alíquota de 2,5 mL de ETOH 99 % e 1,0 mL da solução etanólica de DPPH. A determinação e quantificação dos compostos fenólicos foi realizada utilizando-se da técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. O equipamento utilizado foi um HPLC Shimadzu. **Resultados:** Na análise cromatográfica, a amostra analisada apresentou diversos compostos fenólicos. Sendo possível observar que o extrato das folhas de *Mimosa tenuiflora* (fração acetanólica) apresentou uma maior diversidade de compostos fenólicos podendo citar o catecol (4,61mg/L), o ácido cafeico (4,70mg/L), a cumarina (0,53mg/L), o ácido salicílico (4,66mg/L), a rutina (1,50mg/L), a quercetina (48,70mg/L) e o kaempferol (2,48mg/L) em relação a outros estudos que apresentaram apenas quantificação de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu igual a 39,8g/100g de extrato (NEVES e BRANDÃO, 2014) e uma quantificação de 261,74mg EAG/g de extrato da espécie *Mimosa hostilis* (CUNHA, 2015). Na avaliação da atividade antioxidante a amostra estudada apresentou atividade antioxidante pelo método DPPH. Sendo possível observar que em uma concentração baixa de 200 µg/mL, a *M. tenuiflora* atingiu um percentual de atividade antioxidante igual a 94,31 %. **Considerações finais:** Diante das análises realizadas, foi possível identificar e quantificar alguns constituintes bioativos que conferem à planta estudada a capacidade de minimizar ou inibir a ação oxidativa de espécies radicalares. Vale ainda ressaltar que o potencial de captura do radical livre DPPH pela espécie apresenta valores significativos e ainda apresenta uma quantidade de compostos fenólicos significativa.

(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

www.conadis.com.br

Palavras-chave: Jurema preta, bioatividade, plantas medicinais, cromatografia líquida.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas para fins terapêuticos desde a antiguidade, sendo uma prática passada de geração em geração. Em virtude dessa tradição, muitos estudos sobre o efeito que as plantas promovem no organismo, uma vez que suas propriedades representam uma forma de tratamento e cura de doenças, estão sendo realizados cada vez mais (CARVALHO; CONCEIÇÃO, 2015).

Grande parte das informações no que diz respeito às plantas medicinais da caatinga que hoje são conhecidas e estudadas, foi obtida através de levantamento etnobotânico com pesquisas que abordaram as práticas de uso como modo de uso e os fins terapêuticos (RIBEIRO *et al*, 2014).

Tais práticas de utilização das plantas levou aos grandes estudiosos pesquisarem as plantas na íntegra para descobrir o que leva a estas possuírem propriedades farmacológicas. Estudos mostram que essas propriedades são obtidas através do metabolismo secundário do vegetal que ocorrem a partir de substratos que são produzidos no metabolismo primário (PES e ARENHARDT, 2015; SANCHA; MADUREIRA; FERREIRA, 2015).

Esses compostos bioativos das plantas assim como os antioxidantes estão sendo cada vez mais estudados devido ao seu potencial farmacológico (AZEVEDO; IGNOATO; CARPES, 2015). Os antioxidantes possuem a capacidade de estabilizar os radicais livres que são moléculas instáveis presentes no organismo capazes de desencadear processos oxidativos que são responsáveis por inúmeras patologias (VIZZOTTO, 2017).

Os antioxidantes naturais estão sendo amplamente pesquisados por apresentarem benefício não somente ao homem mas também ao vegetal como um mecanismo de defesa. Em virtude disso, o presente trabalho teve como objetivo realizar uma análise cromatográfica e avaliar o potencial antioxidante da *Mimosa tenuiflora* que é conhecida popularmente como Jurema Preta, pertence à família *Leguminosae* e é amplamente encontrada na região da Caatinga. Estudos comprovaram seu potencial antioxidante e determinação de compostos fenólicos (AZEVEDO; IGNOATO; CARPES, 2015; CRUZ, 2013).

METODOLOGIA

Obtenção da amostra

Amostras das folhas de *Mimosa tenuiflora* foram coletadas na Região de Arapiraca no município de Alagoas e foram levadas para laboratório onde foram colocadas em estufa a 70° C até atingirem peso constante e posteriormente foram triturados em moinho.

Para a preparação do extrato a amostra vegetal foi macerada em etanol PA com quantidade suficiente para cobrir o material, protegido da luz e com troca de solvente a cada 24h durante 3 dias. Após este período, com auxílio de funil e gaze, o extrato fluido foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório (Fisaton 802D), em temperatura variável de 35 a 40° C e 117 rpms. O extrato vegetal etanólico das folhas (MFE) foi armazenados em frasco hermeticamente fechado, num local fresco e ao abrigo da luz.

Extração líquido-líquido do extrato vegetal etanólico

Foi realizada a extração líquido-líquido do extrato vegetal etanólico MFE para separação de seus compostos e observação de sua atividade antioxidante. O extrato vegetal foi, separadamente, solubilizados em metanol e água (MeOH:H₂O 6:4) e fracionado através do método de extração líquido-líquido (ELL), utilizando o solvente acetato de etila (AcOET).

Primeiramente foi adicionado ao extrato vegetal uma solução de MeOH:H₂O na proporção de 6:4 e depois AcOET. Após separação da fração acetanólica, esta foi concentrada em rotaevaporador e submetida às análises de HPLC e antioxidante.

Quantificação de compostos fenólicos por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Para os padrões (ácido gálico, catecol, ácido vanílico, ácido salicílico, vanilina, seringaldeído, ácido cumárico, ácido clorogênico, cumarina, rutina, quercetina, kaempferol, ácido cafeico) foram preparadas soluções-estoque com concentração de 40 mg L⁻¹ em água/álcool a 30%/70%. O método utilizado para a quantificação foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições de uma solução intermediária, contendo uma mistura de todos os padrões, sendo que esta foi obtida por meio da diluição das soluções-estoque previamente preparadas. Nesta solução intermediária, todos os padrões encontraram-se na concentração de 10 mg L⁻¹. Foram utilizados como fase móvel para a eluição dos compostos analisados a solução de ácido fórmico a 1% em água milli-Q (Solvente A) e metanol (Solvente B). As amostras e os padrões foram eluídos de acordo com

um gradiente que inicia em 7% de metanol e vai aumentando até chegar em 85%, totalizando uma corrida de 80 minutos. O comprimento de onda utilizado foi de 290 nm, numa temperatura de 33°C, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. As amostras e os padrões foram filtrados em membrana de polietileno de 0,45 µm (Milipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico. Cada injeção foi realizada três vezes no sistema CLAE, com a finalidade de se obter a média das concentrações e dos tempos de retenção. Sendo assim, a identidade dos analitos confirmada pelo tempo de retenção, e o perfil dos picos da amostra, comparados aos dos padrões.

Avaliação quantitativa da atividade antioxidante pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila - DPPH

O método para captura do radical livre DPPH baseia-se na transferência de elétrons de uma substância antioxidante ou de uma espécie radicalar. A transferência de elétrons é perceptível pela mudança de coloração, em que o DPPH de coloração púrpura é reduzido a difenil-picril-hidrazina de coloração amarelada, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorado pelo decréscimo da absorbância (NASCIMENTO et al., 2011).

Através das absorbâncias adquiridas é possível determinar o porcentual de atividade antioxidante (AAO%), que consiste basicamente na quantidade de DPPH consumido por uma determinada substância com ação antioxidante na captura do radical e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. Desta forma, também pode ser avaliada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀), onde quanto maior for o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o resultado do CE₅₀ e maior o seu potencial antioxidante (RODRIGUES et al., 2013).

O teste quantitativo foi realizado segundo metodologia descrita por Mensor et al (2001). A partir de 0,0025 g do extrato vegetal em 25 mL de etanol. Em seguida foi preparada as soluções para a leitura, que para cada concentração analisada foi retirado uma alíquota de 2,5 mL (em triplicata) e posteriormente a adição de 1,0 mL da solução etanólica de DPPH a 0,3 mM. Para o preparo do branco (em triplicata – para cada concentração), foi adicionado em cada vidro âmbar 2,5 mL da solução teste e 1,0 mL de ETOH 99%. O negativo foi realizado em triplicata e em cada vidro âmbar foi adicionado uma alíquota de 2,5 mL de ETOH 99 % e 1,0 mL da solução etanólica de DPPH.

O teste foi realizado com um auxílio de um espectrofotômetro UV-VIS com um comprimento de onda de 518 nm, no qual foi realizado a leitura das soluções e assim a obtenção das absorvâncias, que foram convertidas em potencial antioxidante através da equação 1.

Equação 1:

$$AAO\% = \frac{100 - (ABSA - ABSB \times 100)}{ABSC}$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quantificação de compostos fenólicos por HPLC

As amostras foram injetadas no HPLC e a partir da comparação do tempo de retenção dos padrões de polifenóis, os compostos foram identificados e quantificados. Os resultados obtidos estão dispostos na tabela 1 que segue.

Tabela 1- Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC em *Mimosa tenuiflora*

| Compostos Fenólicos | Concentração |
|---------------------|--------------|
| Catecol | 4,61mg/L |
| Ácido Cafeico | 4,70mg/L |
| Cumarina | 0,53mg/L |
| Ácido Salicílico | 4,66mg/L |
| Rutina | 1,50mg/L |
| Quercetina | 48,70mg/L |
| Kaempferol | 2,48mg/L |

Fonte: Dados do autor.

Diante dos resultados obtidos, é possível observar que a espécie estudada apresenta uma vasta diversidade de compostos fenólicos em sua estrutura com quantificações significativas. Cunha (2015) estudou uma espécie da mesma família, a *Mimosa hostilis*, e obteve uma quantificação de fenóis totais de 261,74mg EAG/g de extrato. Contudo, esse estudo foi através do método de quantificação de fenóis totais utilizando o reagente Folin-Ciocalteau, assim como Neves; Brandão (2014), no entanto, encontraram uma quantificação de 39,8g/100g de extrato. Isso mostra a importância de se utilizar dessa técnica de cromatografia líquida, uma vez que ela

oportuniza a separação dos constituintes presentes nas amostras além de conseguir quantificá-los.

Avaliação quantitativa da atividade antioxidante pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila - DPPH

Através do método de captura do radical livre DPPH e após a obtenção das absorbâncias em espectrofotômetro seguida da conversão destas em potencial antioxidante, foi possível observar que a espécie *Mimosa tenuiflora* extraída de acetato de etila apresenta um potencial antioxidante significativo, pois em uma baixa concentração de 200 µg/mL, esta apresentou um percentual antioxidante de 94,31 % como mostra a tabela 2.

Tabela 2- Percentual antioxidante de *Mimosa tenuiflora*

| AMOSTRA | CONCENTRAÇÃO | PERCENTUAL |
|--------------------------|---------------------|-------------------|
| <i>Mimosa tenuiflora</i> | 200 µg/mL | 94,31 % |

Fonte: Dados do autor.

Através desse resultado é possível observar que a espécie analisada apresenta quase 100% de atividade antioxidante em uma concentração baixa. Essa atividade está atrelada à gama de compostos fenólicos que essa espécie apresenta e que foram identificados nesse mesmo estudo (SILVA *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Nascimento (2013) comparando a casca com as folhas, revelou que as folhas apresentam um potencial antioxidante superior à casca.

CONCLUSÃO

Diante das análises realizadas, foi possível identificar e quantificar alguns constituintes bioativos que conferem à planta estudada a capacidade de minimizar ou inibir a ação oxidativa de espécies radiculares. Vale ainda ressaltar que o potencial de captura do radical livre DPPH pela espécie apresenta valores significativos e ainda apresenta uma quantidade de compostos fenólicos significativa.

REFERÊNCIAS

AZEVEDO, M. B.; IGNOATO, M. C.; CARPES, S. T. **Avaliação da Atividade Antioxidante do Extrato Etanólico das Folhas da Espécie *Drimys brasiliensis* Miers (WINTERACEAE)**. Pato Branco, 2015. 44 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

CARVALHO, A. P. S.; CONCEIÇÃO, G. M. Utilização de Plantas Medicinais em uma Área da Estratégia de Saúde da Família, Caxias, Maranhão. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v. 11, n. 21, p. 3477, 2015.

CRUZ, M. P. et al. **Avaliação do potencial antioxidante in vitro de plantas do semi-árido da Bahia selecionadas por levantamento etnofarmacológico**. Salvador, 2013. 205 f. Dissertação (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química/Universidade Federal da Bahia.

CUNHA, A. L. **Análise do potencial antioxidante de três espécies da família FABACEA**. Arapiraca, 2015. 52 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Química) – Universidade Estadual de Alagoas.

FEITOSA, A. F., et al. Quantificação de Flavonóides e Fenóis do Extrato do Feijão Bravo. In: I Congresso Internacional da Diversidade do Semiárido, Setembro, 2016, Maceió. **Anais eletrônicos**. Alagoas, 2016. Disponível em:< http://www.editorarealize.com.br/revistas/conidis/trabalhos/TRABALHO_EV064_MD4_SA14_ID1485_24102016234300.pdf>. Acesso em: Ago/2018.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 2, p. 127-130. 2001. Disponível em:< http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000118&pid=S0100-2945201400020001800019&lng=en >. Acesso em 16 Out. 2018.

NASCIMENTO, J. C., et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, Belo Horizonte, v. 92, n. 4, p. 327-332, Set./Nov. 2011. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2011-92-4-14-327-332.pdf>>. Acesso em: 16 Out 2018.

NASCIMENTO, M. S. **Abordagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante e anti-inflamatória do extrato e frações da entrecasca da *Mimosa hostilis* Benth.** São Cristóvão- SE, 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Sergipe.

NEVES, M. S. **Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anticolinesterásica de extratos da casca da raiz da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret.** Feira de Santana, 2015. 95f. Dissertação (Mestrado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Estadual de Feira de Santa. Disponível em: < <http://tede2.uefs.br:8080/bitstream/tede/226/2/68-maiane-neve-dissertacao-completa-30-06-2015.pdf>>. Acesso em: 16 Out. 2018.

NEVES, M.S.; BRANDÃO, H.N. Estudo fitoquímico biomonitorado da *Mimosa tenuiflora* (willd.) poir. (jurema-preta) pela atividade antioxidante. In: XVI Seminário de Iniciação Científica, 16., 2014. Feira de Santana. **Anais...** Feira de Santana: UEFS, 2012. p. 1417-1420. Disponível em: < <http://www.xvisemic.esy.es/arquivos/sessao-v/maiane-dos-santos-neves.pdf>>. Acesso em: 16 Out. 2018.

PES, L. Z.; ARENHARDT, M. H. **Fisiologia Vegetal.** 1 ed. Santa Maria: Rede e-Tec Brasil, 2015.

RIBEIRO, D. A.; MACÊDO, D. G.; OLIVEIRA, L. G. S.; SARAIVA, M. E.; OLIVEIRA, S. F.; SOUZA, M. M. A.; MENEZES, I. R. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 4, p. 912-930, 2014.

RODRIGUES, A. C. F., et al. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Maceió, v. 10, n. 3, p. 43 – 53. 2013. Disponível em: <<https://revistas.ufg.br/REF/article/viewFile/26913/15406>>. Acesso em: 08 Maio 2016.

SANCHA, S. A. R.; MADUREIRA, A. M.; FERREIRA, M. J. U. **Avaliação da Atividade Antimicrobiana de Metabólitos Secundários Isolados a Partir de uma Planta usada na medicina Tradicional Africana.** Lisboa, 2015. 145 f. Tese (Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica) - Universidade de Lisboa.

SILVA, G. J. A. M., et al. Plantas Forrageiras da Caatinga. **Revista Centauro**, Rio Grande do Norte, v. 7, n. 1, p. 1-16, 2016.

SILVA, J. A.; OLIVEIRA, F. F.; GUEDES, E. S.; BITTENCOURT, M. A. L.; OLIVEIRA, R. A. Atividade antioxidante de *Piper arboreum*, *Piper dilatatum* e *Piper divaricatum*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 16, n. 3, p. 700-706. 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3s1/10.pdf>>. Acesso em: 16 Out. 2018.

SILVA, D. J. M.; ENDO, L. H.; DIAS, T. L. A.; SILVA, A. G.; SANTOS, H. M.; SILVA, A.P. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpinuifolia* Benth. (*Mimosaceae*). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, Natal, v. 33, n. 2, p. 267-274. 2012. Disponível em: <<http://www.abq.org.br/cbq/2014/trabalhos/7/5795-18910.html>>. Acesso em: 02 Out. 2018.

VIZZOTTO, E. **Radicais livres e mecanismos de proteção antioxidante**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017.