

## **AValiação DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DE EXTRATOS VEGETAIS ATRAVÉS DOS MÉTODOS DE SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES (DPPH• e ABTS•<sup>+</sup>)**

Tamiris Alves Rocha<sup>1</sup>; Danielle Feijó de Moura; Dayane de Melo Barros; Silvio Assis de Oliveira Ferreira; Maria Tereza dos Santos Correia

1- Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, tamialvesinsl@gmail.com

**Resumo:** A Caatinga apresenta uma vasta heterogeneidade de espécies vegetais, muitas destas espécies são plantas endêmicas e adaptadas às condições de estresse ambiental. Estudos realizados recentemente indicam algumas plantas da Caatinga como fontes promissoras de biomoléculas de interesse, incluindo compostos com atividade antimicrobiana, antioxidante e anticoagulante. *Pityrocarpa moniliformes* é uma espécie endêmica da caatinga pouco explorada em relação a seu potencial farmacológico, mas estudos recentes revelaram um potencial biológico significativo. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar a capacidade antioxidante de extratos orgânicos das folhas de *Pityrocarpa moniliformis*, frente a métodos de análise *in vitro*. A espécie *Pityrocarpa moniliformis* foi coletada no Parque Nacional do Catimbau (Pernambuco-Brasil), uma exsicata da espécie foi encaminhada para o Herbário do Instituto Agrônomo de Pernambuco. Suas folhas foram submetidas à secagem na estufa de circulação de ar forçado (40-45°C), durante três dias, posteriormente foram trituradas em moinho. Após a trituração o material foi submetido à extração em extrator automático ASE 350 Dionex, utilizando o solvente ciclohexano, acetato de etila e metanol. Para avaliação do potencial antioxidante, os extratos foram submetidos aos ensaios de sequestro dos radicais DPPH e ABTS. Nos ensaios de captura dos radicais DPPH e ABTS, os extratos metanólicos (37,67µg/mL e 285,2µg/mL, respectivamente) apresentaram o melhor IC<sub>50</sub> quando comparados respectivamente com os extratos de hexano (111,6µg/mL e 5206,0µg/mL) e acetato de etila (67,24µg/mL e 797,8µg/mL). Os resultados obtidos mostram que os extratos das folhas *P. moniliformis* apresentam elevada capacidade antioxidante de acordo ensaios *in vitro* avaliados.

**Palavras-chave:** Compostos Orgânicos. Espécies. Folhas. Heterogeneidade. Plantas medicinais.

### **Introdução**

Considera-se antioxidante biológico qualquer composto, que quando presente em concentração mais reduzida é capaz de retardar ou prevenir a oxidação do substrato quando comparado ao substrato oxidável. O papel dos antioxidantes está associado à: diminuição do estresse oxidativo, alterações de DNA, transformações malignas, entre outras medidas de dano celular (GODIC et al., 2014).

Quanto a sua classificação, podem distinguir-se a partir de dois mecanismos de ação: primários e secundários. Os antioxidantes primários funcionam como doadores de prótons e evitam o processo de iniciação ocasionado pelos radicais livres, transformando-os em produtos com maior

estabilidade termodinâmica. Enquanto que, os antioxidantes secundários agem no bloqueio da reação em cadeia por meio da captação de intermediários reativos, tais como: radicais peroxila e alcooxila (NACZK; SHAHIDI, 2004).

Isto é, as substâncias que possuem potencial antioxidante podem agir em diversos níveis frente à proteção dos organismos. Atuam como mecanismo de defesa contra os radicais livres evitando sua formação, especialmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre e são favoráveis na interceptação de radicais livres provenientes do metabolismo celular ou por fontes exógenas, impedindo ação sobre os lipídeos, aminoácidos das proteínas, dupla ligação dos ácidos graxos poli-insaturados e bases do DNA (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes disponíveis incluem também os sintéticos como o Butil-Hidroxianisol (BHA) e o Butil-Hidrotolueno (BHT), amplamente utilizados pela indústria de alimentos e os naturais, substâncias bioativas, como os compostos organossulfurados, fenólicos e terpenos, constituintes de vários alimentos. Vale salientar que, os antioxidantes naturais são originados majoritariamente de plantas sob forma de compostos fenólicos, ácido ascórbico e carotenoides (KITTS, 1994; REDDY et al., 2012).

Os extratos vegetais apresentam substâncias em sua composição reconhecidas principalmente por sua função antioxidante, em especial os flavonoides e taninos, que são fonte de radicais hidroxilas, capazes de reagir com as Espécies Reativas de Oxigênio (EROS) e Espécies Reativas de Nitrogênio (ERN) e, desse modo, são potenciais agentes terapêuticos frente ao tratamento de algumas doenças por prevenir ou retardar significativamente os processos oxidativos (OLIVEIRA et al, 2009; VIEGAS JUNIOR et al., 2006).

Diante desse contexto, a *Pityrocarpa moniliformis* vêm ganhando destaque trata-se de uma planta arbórea do Nordeste do Brasil, que ocorre de forma disjunta em florestas secas da região de Sucre (Venezuela), é conhecida popularmente como Catanduva. A *P. moniliformis* é uma espécie considerada pouco explorada e estudos ligeiramente recentes ressaltam seu potencial antioxidante e antimicrobiano (DA SILVA et al., 2011; DA SILVA et al., 2013).

Pesquisas com extrato de *P. moniliformis* fortaleceram o seu potencial antioxidante, revelando que sua atividade frente à inibição dos efeitos de oxidação está provavelmente associada com a presença de compostos fenólicos e flavonoides (ALVES et al., 2014; SILVA et. al., 2010).

Sabendo-se que há um crescente interesse da comunidade científica em desenvolver substâncias antioxidantes, principalmente a partir de produtos naturais como as plantas, uma das técnicas atualmente mais utilizada para detectar a capacidade antioxidante de compostos, são os

métodos baseados na eliminação dos radicais livres estáveis 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH•) e 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico (ABTS•<sup>+</sup>), estes métodos possuem diversas vantagens, tais como: boa estabilidade na ausência da luz, aplicabilidade, simplicidade e viabilidade (SCHERER; GODOY, 2009; DENG; CHENG; YANG, 2011).

Desse modo, o objetivo do presente estudo, foi avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais através dos métodos de sequestro de radicais livres DPPH• e ABTS•<sup>+</sup>.

## Metodologia

A coleta das folhas de *P. moniliformis* foi realizada no Parque Nacional do Catimbáu, em Buíque, Pernambuco, uma exsicata da espécie foi encaminhada para Herbário IPA (Instituto Agrônomo de Pernambuco), para identificação. Para as extrações, as folhas foram submetidas à secagem na estufa de circulação de ar forçado (40-45°C), durante três dias, posteriormente foram trituradas em moinho. Após a trituração o material foi pesado e submetido à extração em extrator automático ASE 350 Dionex, utilizando o solvente ciclohexano, metanol e acetato de etila, sob temperatura de 40°C durante 15 minutos sob pressão de ±1500 psi e fluxo de solvente de 5mL/min. Após a extração o material obtido foi filtrado, e deixado a temperatura ambiente para obtenção de uma secagem completa dos solventes, após esse processo foram armazenados em vidro âmbar sob temperatura ambiente.

Para o ensaio antioxidante utilizando o método DPPH•, verificou-se a atividade sequestradora de radicais livres dos extratos, medida em termos de doação de hidrogênio onde se utilizou o radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (BLOIS, 1958). Foi misturada 0,25mL da solução de DPPH• (1mM) em 0,04 mL de diferentes concentrações dos extratos metanólico, hexânico e acetato de etila (31,25; 62,5; 125; 500 e 1000µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorbância em 517nm. Ácido Gálico, BHT (Hidroxitolueno Butilado) e Trolox (análogo da vitamina E, solúvel em água) foram utilizados como compostos de referência e o controle foi o DPPH adicionado a 0,04mL de metanol (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH• foi calculada pela fórmula:  $SRL [DPPH\bullet] (\%) = [(Aa - Ac) / Ac] \times 100$ . Onde: Aa = Absorbância da amostra e Ac = Absorbância do controle.

O método do ABTS•<sup>+</sup> (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico) foi realizado com base em RE, et al. (1999) adaptado. Uma solução estoque do radical ABTS•<sup>+</sup> foi preparada por dissolução de 7nM de ABTS•<sup>+</sup> com 2,45mM de persulfato de potássio, e reservada durante 16 horas

antes do uso. A solução de trabalho foi preparada por diluição da solução de estoque em etanol até obtenção da absorbância de  $0,700 \pm 0,02$ nm. 0,01mL dos extratos na concentração de 1mg/mL foram adicionados a 1mL da solução de trabalho e analisados após 6 minutos da reação em espectrofotômetro a 734nm. Foi utilizado trolox em diferentes concentrações (0 – 2000 $\mu$ M) para comparação da atividade e obtenção da curva de calibração. Os resultados foram expressos em Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox (TEAC), onde obteve-se a equação da curva de calibração do Trolox ( $Y = -0,0003x - 0,6367$ ,  $R^2 = 0,9886$ ) e em porcentagem de inibição onde foi calculada através da equação Inibição do ABTS $\bullet^+$  (%) =  $[(Ac - Aa) / Ac] \times 100$ . Onde: Ac = Absorbância do controle e Aa = Absorbância da amostra.

Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram organizados em média  $\pm$  DP. As análises estatísticas e o IC<sub>50</sub> foram calculadas pelo GraphPad Prism 5.0.

## Resultados e Discussão

As atividades de eliminação de radicais DPPH e ABTS dos extratos das folhas de *P. moniliformis* estão expressos na Tabela 1. Na atividade de eliminação de radicais DPPH foram observadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os extratos avaliados. O extrato metanólico obteve melhor atividade com Concentração Inibitória Máxima (IC<sub>50</sub>) de 37,67 $\mu$ g/mL, em relação aos extratos hexânico e acetato de etila que apresentaram IC<sub>50</sub> de 111,6 $\mu$ g/mL e 67,24 $\mu$ g/mL, respectivamente (Tabela 1). O ácido gálico, BHT e Trolox, com valores de IC<sub>50</sub> de 0,0011, 26,24 e 50,01  $\mu$ g/mL, respectivamente, foram utilizados como controle positivo.

**Tabela 1.** Atividade antioxidante dos extratos orgânicos obtidos das folhas de *P. moniliformis*.

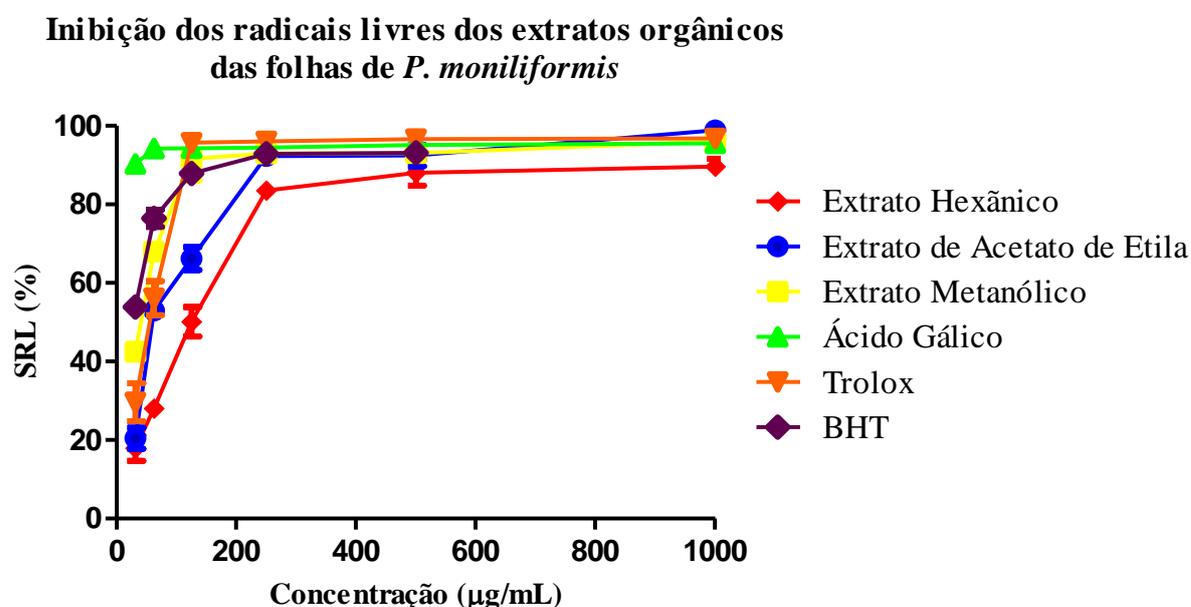
Extratos	DPPH (IC <sub>50</sub> em $\mu$ g/mL) **	ABTS (IC <sub>50</sub> em $\mu$ g/mL) **
Hexânico	111,6 99.29 - 125.4	5206 2587 - 10475
Acetato de etila	67,24 60.77 - 74.40	797,8 662.8 - 960.3
Metanólico	37,67 33.94 - 41.80	285,2 239.0 – 340.5
Ácido Gálico	0,001166 1.364x10 <sup>-5</sup> - 0.09973	-----
BHT	26,24 23.27 - 29.58	1366,0 1098.0 – 1700.0

<b>Trolox</b>	50,01 45.62 - 54.82	250,8 228.9 - 274.7
---------------	------------------------	------------------------

\*\*Os resultados são expressos como média ± Intervalo de confiança.

Conforme mostrado na Figura 1, observou-se que os valores de % de inibição, testados na concentração de 1000 µg/mL, foram maiores para o extrato metanólico (96,05%), comparados com o extrato hexânico (89,66%) e o extrato de acetato de etila (92,45%). Os resultados obtidos mostraram que o tipo de solvente utilizado influenciou na atividade antioxidante.

**Figura 1.** Ensaio de atividade antioxidante pelo método de inibição do radical DPPH dos extratos orgânicos obtidos das folhas de *P. moniliformis*.



\* SRL- Sequestro de radicais livres

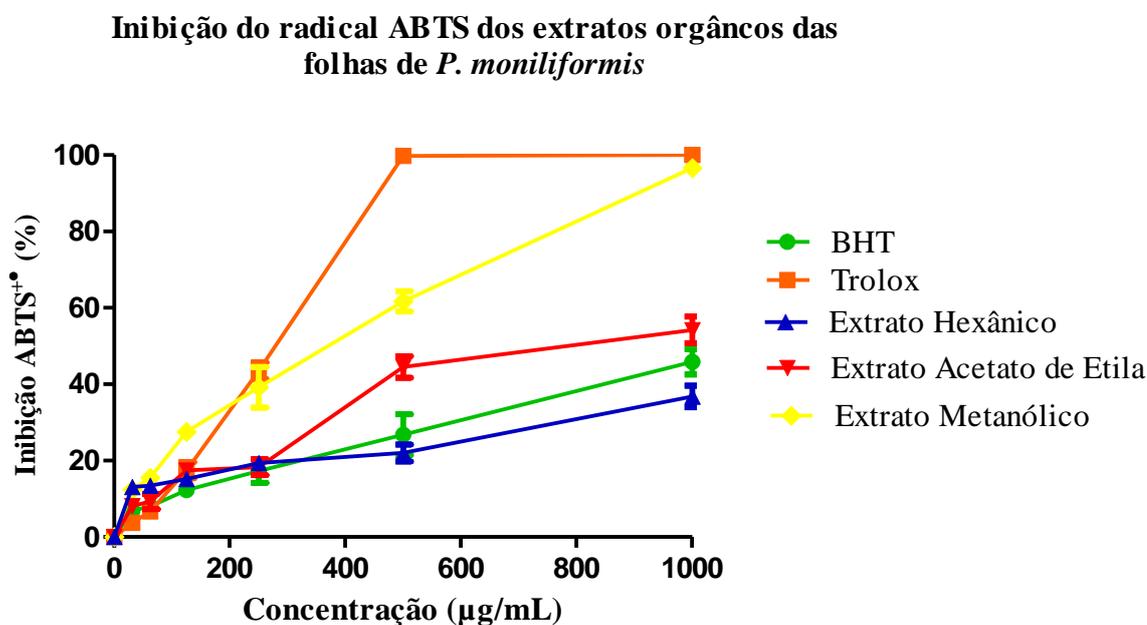
Esta elevada atividade antioxidante dos extratos orgânicos obtidos de *P. moniliformis* pode estar relacionada aos compostos fenólicos presentes na planta, que apresentam capacidade de eliminação dos radicais livres e doação de átomos de hidrogênio ou elétrons (DA SILVA et al., 2011). A estrutura dos compostos fenólicos é uma determinante chave da sua eliminação de radical e atividade quelante de metais. A posição e o número do grupo hidroxila dos compostos fenólicos e flavonoides determinam a capacidade das moléculas para doar um elétron e estabilizar os radicais livres (AYALA-ZAVALA, et al., 2012; ALIBOUDHAR; TIGRINE-KORDJANI, 2014). Do

mesmo modo, a atividade antioxidante dos compostos fenólicos tem sido relacionada principalmente por sua propriedade redox que permite-os atuarem como agentes redutores, doadores de hidrogênio e neutralizadores de oxigênio (RICE-EVANS, 1995).

O ensaio ABTS é semelhante ao método de DPPH, onde ambos trabalham com a redução dos radicais presentes, porém o radical ABTS é formado no início da análise, ao contrário do DPPH que já é adquirido na sua forma radicalar. Salienta-se que, a principal diferença entre os dois radicais, é devido ao radical DPPH ser solúvel em solventes orgânicos, enquanto o ABTS é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise das amostras tanto a nível hidrofílico como lipofílico (RUFINO et al., 2007; DI et al., 2017; WANG, et al., 2017).

Conforme mostrado na Tabela 1, os extratos de *P. moniliformes* apresentaram efeitos significativos na capacidade de eliminação do radical ABTS, exibindo o melhor resultado de IC<sub>50</sub> para o extrato metanólico (285,2µg/mL), este valor se aproximou bastante do padrão Trolox (antioxidante sintético, análogo à vitamina E) já conhecido na literatura por apresentar relevante atividade antioxidante. Mediante a figura 2, pode-se observar que mais uma vez o extrato metanólico exibiu melhor atividade, com porcentagem de inibição de 96,61% na concentração de 1000 µg/mL, quando comparado aos extratos hexânico (36,78%) e acetato de etila (54,24%).

**Figura 2-** Ensaio de atividade antioxidante pelo método inibição do radical ABTS dos extratos orgânicos obtidos das folhas de *P. moniliformes*.



Sendo assim, os dados obtidos demonstram elevada atividade antioxidante dos extratos de *P. moniliformes*, de modo que, os compostos com maior atividade são extraídos através da utilização do metanol como solvente.

## Conclusões

Os extratos metanólicos de *P. moniliformis* analisados apresentaram atividade antioxidante, por meio dos métodos *in vitro* de sequestro de radicais livres (DPPH• e ABTS•<sup>+</sup>), revelando melhores resultados quando extraídos com metanol. Tendo em vista, os dados analisados, esta planta oferece importante capacidade farmacológica levando em consideração a eliminação de radicais livres, além disso, é uma espécie que possui biomoléculas com potencial atividade antioxidante.

## Agradecimentos

Os autores expressam agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Pernambuco- FACEPE pelo auxílio financeiro para a execução deste trabalho.

## Referências

ALIBOUDHAR, H.; TIGRINE-KORDJANI, N. Effect of extraction technique on the content and antioxidant activity of crude extract of *Anacyclus clavatus* flowers and their essential oil composition. **Nat. Prod. Res.**, 28, 2140-2149, 2014.

ALVES, M. J.; KENNED SILVA, A.; MURATORI, L.; FERREIRA, E. J.; SOUSA, G. M.; JESUS, N. D.; LOPES, A. M. G. Teor de fenóis totais e flavonoides, atividade antioxidante e citotóxica das folhas, frutos, cascas dos frutos e sementes de *Piptadenia moniliformis* Benth (Leguminosae-Mimosidae). **Blacpma**, v. 13, n. 5, p.466-476, 2014.

AYALA-ZAVALA, J.F.; SILVA-ESPINOZA, B. A.; CRUZ-VALENZUELA, M. R.; VILLEGAS-OCHOA, M. A.; ESQUEDA, M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; CALDERÓN-LÓPEZ, Y. Antioxidant and antifungal potential of methanol extracts of *Phellinus* spp. from Sonora, Mexico. **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 29, p.132-138, 2012.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes a dieta. **Revista de Nutrição**, v.12, n. 2, p.125-130, 1999.

BLOIS, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical, **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.

DA SILVA, L.C.N.; SILVA-JÚNIOR, C.A.; SOUZA, R.M.; MACEDO, A.J.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Comparative analysis of the antioxidant and DNA protection capacities of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.2222–2228, 2011.

DA SILVA, M. F. S. Estudo Químico e Avaliação da Atividade Antibacteriana de *Pityrocarpa moniliformis* (BENTH) LUCKON & R. W. JOBSON (Fabaceae), Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido da Universidade Federal do Vale do São Francisco, **Mestrado em Recursos Naturais Do Semiárido**, Petrolina - PE, p.147, 2013.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v.125, n. 4, p.1430-1435, 2011.

DI, T.; CHEN, G.J.; SUN, Y.; OU, S.Y.; ZENG, X.X.; YE, H. Antioxidant and immunostimulating activities in vitro of sulfated polysaccharides isolated from *Gracilaria rubra*. **J. Funct. Foods**, 28, 64–75, 2017.

GODIC, A.; POLJSAK, B.; ADAMIC, M.; DAHMANE, R. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment. **Oxid. Med. Cell. Longev**, v. 5, p. 6, 2014.

KITTS, D.D.; Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 423-434, 1994.

NACZK, M.; SHAHIDI, F.; Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

OLIVEIRA, A. C. DE; VALENTIM I, B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, I. C.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p.689-702, 2009.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay, **Free Radic Biol. Med.** 26, 1231–1237, 1999.

REDDY, G.M.; RAO, V.; SARMA, D.; REDDY, T.K.; SUBRAMANYAM, P.; NAIDU, M.D.; Evaluation of antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl method of 40 medicinal plants. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 24, p. 4082-4086, 2012.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; BOLWELL, P.; BRAMLEY, P.; PRIDHAM, J. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radic. Res.**, v.22, p.375–83, 1995.

RUFINO, M.S.M; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; JIMENEZ, J.P.; CALIXTO, F.D.S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH, **Comunicado Técnico Embrapa**, v.127, p.1-4, 2007.

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method., **Food Chemistry**, v. 112, n. 3, p. 654-658, 2009.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais, **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

VIEGAS, J.R., C.; BOLZANI, V.S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna, **Química Nova**, v. 29, p 326-337, 2006.

WANG, X.; ZHANG, Y., LIU, Z., ZHAO, M., LIU, P. Purification, Characterization, and Antioxidant Activity of Polysaccharides Isolated from Cortex Periplocae, **Molecules**, v.31, p.1-15, 2017.