

AValiação DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE PLANTAS DO CERRADO BRASILEIRO: *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart., *Vochysia elliptica* Mart. e *Miconia ferruginata* DC.

Dayana Barbosa da Cruz^{1*}, Philippe Dias de Ávila Lima², Kellen Celeste Ferreira Santos³, Giulian Cristina de Oliveira⁴, Luiz Elídio Gregório⁵, Ana Paula Rodrigues⁶

¹ Mestranda em Ciências Farmacêuticas pela U.F. dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

² Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UFVJM

³ Estudante de IC do Departamento de Farmácia da UFVJM

⁴ Estudante bolsista PROACE do Departamento de Farmácia da UFVJM

⁵ Pesquisador colaborador da UNIFESP

⁶ Orientadora - Departamento de Farmácia da UFVJM

Resumo

O presente trabalho relata a avaliação da capacidade antioxidante de extratos etanólicos das partes aéreas da *Vochysia elliptica*, *Gomphrena arborescens* e *Gomphrena virgata*, assim como das raízes desta última e das folhas da *Miconia ferruginata*. Tal atividade foi avaliada através de testes *in vitro*, utilizando métodos indiretos mediados pela transferência de elétrons, mensurados por espectrofotometria. Para esses extratos, a referida avaliação é inédita.

As espécies de *Vochysia elliptica* e *Miconia ferruginata* apresentaram maior teor de compostos fenólicos totais, sendo significativamente diferente ($p < 0,001$) das espécies de *G. arborescens* e *G. virgata* (partes aéreas e raízes).

A atividade antioxidante das primeiras foi confirmada pelo alto potencial de captura do radical DPPH*, representado por inibição destes em solução acima de 85%. As espécies do gênero *Gomphrena* demonstram fraco poder antioxidante, tendo porcentagem de inibição inferior a 50%.

Autorização legal

O estudo foi realizado com autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético (CGEN-CNPQ) nº 010476/2012-1 e comprovante de registro para coleta de material vegetal, submetido ao IBAMA/ICMBio/SISBIO sob registro 29793-4.

Palavras-chave: Atividade Antioxidante; DPPH; Fenólicos Totais.

Apoio financeiro: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e UFVJM.

Introdução

Desde os primórdios da história humana, espécies vegetais diversas têm sido utilizadas na cura de injúrias e doenças, mesmo que de maneira empírica¹. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), ainda hoje, cerca de 80% da população de poder aquisitivo reduzido não tem acesso à medicina moderna e medicamentos, recorrendo aos produtos de origem natural como única fonte terapêutica².

Na década de 90 foi evidenciado um aumento significativo nas pesquisas de espécies vegetais com potencial antioxidante devido ao conhecimento das influências benéficas da utilização de produtos naturais, associadas ao decréscimo da atividade oxidante³.

Evidências indicam o papel chave dos radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) no organismo^{4,5}.

Em condições fisiológicas, radicais são produzidos continuamente em processos metabólicos, atuando como mediadores para a transferência de elétrons em reações bioquímicas essenciais como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular⁶.

No entanto o desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e defesas antioxidantes enzimáticas ou não, provoca o aumento de EROs e espécies reativas de nitrogênio circulantes que podem reagir com lipídios, proteínas e com o DNA, conduzindo a dano estrutural e/ou funcional nas células, enzimas e DNA. Esse processo conhecido como estresse oxidativo está relacionado com a etiologia de várias patologias incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, doenças inflamatórias, imunológicas, e relacionadas ao processo de envelhecimento como as doenças de Alzheimer e Parkinson, evidenciando os efeitos danosos da produção em excesso ou

acúmulo desses radicais no organismo⁷.

Para prevenir esse processo e as consequências ocasionadas ao organismo e produtos de consumo passíveis à oxidação, tem-se aumentado a busca de compostos antioxidantes provenientes de fontes exógenas e sua utilização em produtos cosméticos, medicamentos e na indústria alimentícia⁸.

O solo no Cerrado é distrófico com baixa disponibilidade de nutrientes, baixo pH e alta concentração de alumínio, o que induz a produção de determinados metabólitos e substâncias para proteção das espécies vegetais naturais desse bioma, dentre elas flavonóides, que demonstram grande potencial antioxidante⁹.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante de cinco extratos etanólicos, através da quantificação dos compostos fenólicos totais e pela avaliação da captura do radical DPPH•.

Metodologia

As espécies *Gomphrena arborescens* L.f., *Gomphrena virgata* Mart., *Vochysia elliptica* Mart. e *Miconia ferruginata* DC., foram coletadas no município de Diamantina-MG, e suas exsiccatas foram depositadas no herbário DIAM da UFVJM.

Os extratos brutos foram preparados utilizando etanol como solvente extrator, à temperatura ambiente, por maceração com duração de sete dias, por três vezes consecutivas. Estes foram concentrados em rotaevaporador a 40 °C e cedidos ao laboratório de Hematologia e Citologia da UFVJM, sendo armazenados em dessecador a vácuo.

Soluções estoque a 2000 µg/mL foram preparadas tendo o metanol como solvente e armazenadas a 2-8 °C até o momento do uso.

Determinou-se o conteúdo de compostos fenólicos totais (FT) dos extratos por espectroscopia na região do visível pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (FC) de acordo com metodologia descrita por Singleton e Rossi (1965)¹⁰, com modificações.

Uma alíquota de 12,5 µL de cada concentração dos extratos (1500; 1000; 750; 500; 250 e 100 µg/mL) foi pipetada em microplacas de 96 poços contendo 100 µL de água Milli-Q (pH=7,0) por poço. Adicionou-se 12,5 µL do reagente FC em cada poço e após agitação de 20 segundos, a microplaca deixada em repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 5 minutos. Carbonato de sódio (1M), 125 µL, foi acrescentado aos poços da microplaca que permaneceu em repouso por 90 minutos nas condições

anteriores. A leitura da absorbância foi realizada em 750 nm, utilizando o metanol como branco para zerar o leitor de microplacas (Spectramax®). Ácido gálico (AG) em concentrações conhecidas (200; 100; 75; 50; 25 e 10 µg/mL) foi utilizado como padrão para elaboração da curva de calibração. As absorbâncias obtidas para os extratos foram convertidas em equivalentes de AG (mg EAG/g de extrato), calculadas a partir da equação da reta obtida pela curva de calibração.

O método de sequestro do radical livre DPPH• segundo Yen e Wu (1999)¹¹, foi utilizado para quantificar a atividade antioxidante total dos extratos estudados. Para tanto, em ambiente escuro, transferiu-se uma alíquota de 6 µL de cada diluição dos extratos etanólicos ou padrão AG (nas mesmas concentrações anteriores) para cada poço de uma microplaca de 96 poços, e em seguida foi pipetado 244 µL de radical DPPH• a 60 µM, utilizando-se pipeta multicanal. O controle foi realizado em poços contendo apenas o reagente DPPH•. Após ser mantida em repouso por 30 minutos (a temperatura ambiente, ao abrigo da luz), a placa foi submetida à leitura das absorbâncias do meio reacional em 515 nm, utilizando metanol como branco para zerar o equipamento. Os resultados das absorbâncias foram convertidos em Porcentagem de Inibição do radical DPPH•.

Os experimentos foram realizados em triplicatas (n=3) e os resultados apresentados como média ± desvio padrão da média das repetições. As diferenças entre as médias e entre as espécies foram avaliada por análise de variância (ANOVA One-way), considerando nível de significância 0,05.

Resultados e Discussão

A curva de calibração para determinação de fenólicos totais foi obtida utilizando concentrações conhecidas do padrão AG apresentou coeficiente de determinação R² de 0,998 confirmando a linearidade da equação. A partir da equação da reta, pode-se determinar a concentração dos compostos fenólicos nos extratos em miligramas de FT expressos em EAG/g do extrato (Tabela 1).

Tabela 1 – Conteúdo de compostos fenólicos totais

Amostras	mg EAG/g extrato
<i>V. elliptica</i> (Pa)*	1350,25 ^a
<i>M. ferruginata</i> (folhas)	1039,28 ^b
<i>G. virgata</i> (Pa)	309,88 ^c
<i>G. arborescens</i> (Pa)	208,09 ^c
<i>G. virgata</i> (R)**	93,98 ^d

Letras diferentes correspondem a resultados estatisticamente diferentes (ANOVA one-way, $p < 0,001$). *Pa-partes aéreas, **R-raiz.

Os extratos das partes aéreas da *V. elliptica* e das folhas da *M. ferruginata* apresentaram os maiores teores de compostos fenólicos totais, sendo estatisticamente diferentes, considerando nível de significância de 0,001. As espécies do gênero *Gomphrena* apresentaram menor quantidade de FT, sendo que o extrato das raízes da *G. virgata* apresenta o menor equivalente em AG, 93,98 mg EAG/ g extrato.

Foi demonstrado por diversos autores^{12,13} que a atividade antioxidante está diretamente relacionada à presença de composto fenólicos nos extratos, comprovando o potencial antioxidante em extratos cujos teores de FT encontrados foram acima de 60 mg de FT em EAG/g de extrato.

No ensaio de captura do radical DPPH• as absorbâncias foram convertidas em porcentagem de inibição das amostras (Gráfico 1).

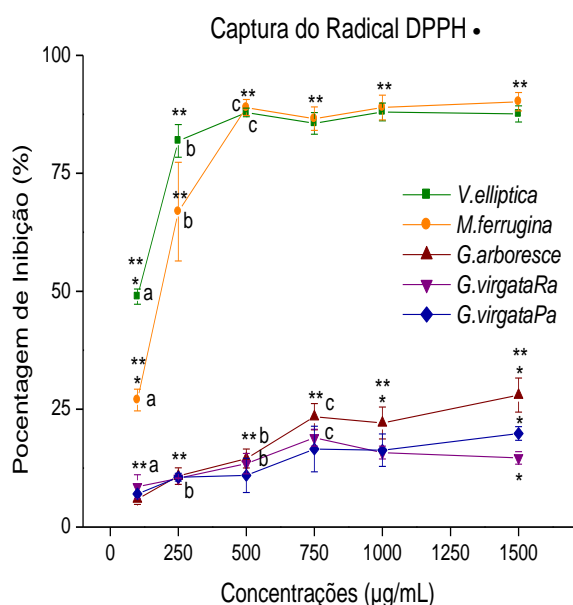


Gráfico 1 – Porcentagem de inibição do radical DPPH•. Letras diferentes demonstram concentrações do mesmo extrato que apresentam diferença estatisticamente significativa (ANOVA, one-way $p < 0,05$). *Diferença estatística entre mesmas concentrações de extratos diferentes ($p < 0,05$); **Diferença estatística entre mesmas concentrações de extratos diferentes ($p < 0,001$).

O ensaio de captura do radical DPPH• mede a capacidade das amostras de doação de hidrogênio para estabilizar os radicais em solução.

Pode-se verificar que os extratos brutos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* apresentaram maior capacidade inibitória do radical DPPH• quando comparados as espécies do gênero *Gomphrena*. Para as primeiras, as respostas apresentam perfil concentração-dependente até 500 µg/mL, quando atingem um platô (85,58%), indicando a concentração mínima capaz de atingir o máximo de inibição dos radicais.

Segundo uma classificação proposta por pesquisadores em 2008, que avaliaram a capacidade antioxidante de frutas *in natura* utilizando a mesma metodologia¹⁴, tem-se forte poder antioxidante, quando a captura de radicais DPPH• for superior a 70%; moderado, quando capturavam entre 50 e 70% e fraco, para captura menor que 50%.

Sendo assim, podemos classificar os extratos brutos de *V. elliptica* e *M. ferruginata* como forte poder antioxidante, e os extratos do gênero *Gomphrena* como fraco poder antioxidante.

A captura de radicais DPPH• é coerente com os resultados obtidos para teores de compostos fenólicos totais, uma vez que a literatura comprova que extratos vegetais contendo quantidade importante de FT possuem relevante atividade antioxidante.

Conclusões:

Foram testados cinco extratos etanólicos brutos de espécies vegetais utilizadas na cultura popular da região do Vale do Jequitinhonha.

Destas, foi demonstrado que as espécies de *V. elliptica* e *M. ferruginata* são as que possuem maior teor de compostos fenólicos totais, conhecidos por sua ação antioxidante. Tal potencial é confirmado pelo ensaio de captura do radical DPPH•, no qual essas espécies apresentaram alta porcentagem de inibição dos radicais em solução ou seja, forte poder antioxidante.

Entre os extratos de *G. virgata*, observou-se que as partes aéreas contêm maior teor fenólicos totais, portanto maior capacidade de captura de radicais em solução. No entanto, as espécies do gênero *Gomphrena* apresentam fraco poder de captura de radicais DPPH•, o que é explicado pelo seu baixo teor de compostos FT.

Referências bibliográficas

- 1- Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **2007**. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre, Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC.
- 2- Devienne, K.F.; Raddi, M.S.G.; Pozetti, G.L. **2004**. Das Plantas Medicinais aos Fitofármacos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 6: 11-14.
- 3- Tomei, R.R.; Salvador, M.J. **2007**. Metodologias analíticas atuais para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. *Anais do XI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica, e VII Encontro Latino Americano de Pós-Graduação*, Campinas. 1: 1963-1967.
- 4- Melo, C.M.T.; Costa, L.A.; Bonnas, D.S. **2011**. Compostos Fenólicos e Capacidade Antioxidante de Pimentas *Capsicum chinense* (bode), *Capsicum baccatum* variedade praetermissum (cumari) e *Capsicum frutescens* (malagueta). *Enciclopédia Biosfera*. 7:1-6.
- 5- Herdeiro, R.S.; Silva, C.G; Mathias, C.J. *et al.* **2005**. Evaluation of antioxidant activity of Brazilian plants. *Pharmacological Research*. 52: 229–233.
- 6- Alves, C.Q.; David, J.M.; David, J.C.; Bahia, M.V.; Aguiar, R.M. **2010**. Métodos para determinação de Atividade antioxidante *in vitro* em Substratos orgânicos. *Quim. Nova*. 33: 2202-2210.
- 7- Barreiros, A.L.B.S; David, J.M. **2006**. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim. Nova*. 29: 113-123.
- 8- Andrade, C.A.; Costa, C.K.; Bora, K.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G.; Kerber, V.A. **2007**. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 17: 231-235.
- 9- Neri, A.V.; Neto, J.A.A.M.; Silva, A.F.; Martins, S.V.; Junior, A.W.S. **2007**. Composição Florística de uma Área de Cerrado Sensu Stricto no Município de Senador Modestino Gonçalves, Vale do Jequitinhonha (Mg) e Análise de Similaridade Florística de Algumas Áreas de Cerrado em Minas Gerais. *Revista Árvore*. 31: 1109-1119.
- 10- Singleton, V.L.; Rossi, J.A.Jr. **1965**. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic 38 - Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*. 16: 144-158.
- 11- Yen G, WU J. **1999**. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chem*. 65: 375-379.
- 12- Sá, P.G.S.; Guimarães, A.L.; Oliveira, A.P. *et al.* **2012**. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*. 33: 561-566.
- 13- 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.; Chaves, M.H. **2007**. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. Nova*. 30: 351-355.
- 14- Melo, E.A.; Maciel, M.I.S.; Lima, V.L.A.G.; Nascimento, R.J. **2008**. Capacidade antioxidante de frutas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 44(2).