

1.06.01 - Química / Química Orgânica

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DAS ESPÉCIES *Amburana cearensis*(FABACEAE) e *Delonix regia* (FABACEAE) UTILIZANDO O MÉTODO DE SEPARAÇÃO POR DIÁLISE

Luana F. Barbosa¹, Edjane V. Pires ², Iara B. Valentim ³, Antônio E.G Sant'Ana⁴, Kelly B. da Silva⁵
Maiara G. da Silva⁶

1. Estudante de IC do Instituto Federal de Alagoas –IFAL
2. Pesquisadora da Universidade Estadual de Alagoas –UNEAL
3. Pesquisadora do Instituto Federal de Alagoas –IFAL
4. Pesquisador da Universidade Federal de Alagoas-UFAL
5. Estudante de doutorado da Universidade Federal de Alagoas-UFAL
6. Estudante de IC da Universidade Estadual de Alagoas -UNEAL

Resumo:

A utilização de medicamentos à base de plantas conhecidas por seu efeito terapêutico é uma prática comum em todo Brasil. Neste contexto, algumas plantas têm sido estudadas, como fonte rica em substâncias antioxidantes. Estas substâncias são responsáveis por evitar o estresse oxidativo (característico da produção exacerbada de radicais livres) e seus diversos efeitos maléficos para o nosso organismo, incluindo o câncer e o diabetes. A busca por antioxidantes naturais tem crescido na tentativa de eliminar e/ou diminuir o consumo dos antioxidantes sintéticos, que podem trazer prejuízos à saúde humana. Levando em consideração, a vasta biodiversidade do Estado de Alagoas, a realização de pesquisas voltadas para a busca de antioxidantes oriundos de plantas e de uma melhor maneira de extração dos mesmos, pode contribuir significativamente para o progresso científico do estado.

Palavras-chave: química verde; metabólitos secundários; separação por tamanho molecular.

Introdução:

As plantas medicinais são frequentemente apresentadas como um grande potencial para a origem de novos fármacos, sendo uma fonte de novas substâncias bioativas (FAUSTINO et al., 2010). A produção exacerbada de radicais livres pelos processos fisiológicos do organismo pode acarretar em envelhecimento precoce, câncer, aterosclerose, diabetes, cardiopatias, e outras doenças crônico-degenerativas, tornando indispensáveis os estudos voltados à identificação de substâncias capazes de inibir ou diminuir a produção destes radicais (PÉRON et al., 2001; DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004).

Em 2007, Halliwell definiu que um antioxidante é "qualquer substância que retarda, impede ou elimina os danos oxidativos para uma molécula-alvo". As reações de oxidação produzem radicais livres que podem iniciar múltiplas reações em cadeia que, podem causar danos ou morte para a célula. Os antioxidantes removem estes intermediários de radicais livres, e inibem outras reações de oxidação, impedindo assim, que ocorram essas reações em cadeia prejudiciais (SHEBIS et al., 2013).

A diálise pode ser usada para introduzir ou remover moléculas pequenas de uma amostra, dada a sua capacidade de se moverem através de uma membrana semipermeável para uma segunda câmara de líquido (porção externa da membrana) (WALKER, 2009). Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a capacidade antioxidante in vitro. Dentre estes métodos, destaca-se o seqüestro do radical livre estável DPPH*, onde o DPPH* é reduzido formando 2,2-difenil-picril-hidrazina (DPPH-H). Este método está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais DPPH* de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Baseia-se, portanto, na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Os antioxidantes sintéticos fenólicos são amplamente utilizados pela indústria de alimentos como inibidores da lipoperoxidação. Entretanto, estes compostos têm sido relacionados aos possíveis efeitos deletérios à saúde (RÊGO JÚNIOR, N. O. et al., 2011). Por esta razão, o objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da temperatura sobre a capacidade antioxidante de duas espécies de plantas utilizando o método de extração por diálise, visando a busca por antioxidantes naturais que possam ser extraídos por processos mais rápidos e livres do uso exagerado de solventes orgânicos.

Metodologia:

1.Local de coleta

As espécies vegetais *Amburana cearensis* (FABACEAE) e *Delonix regia* (FABACEAE) foram coletadas no Povoado Lagoa dos Porcos, no Município de Estrela de Alagoas, localizado na região agreste do estado.

2.Preparo dos extratos aquosos

O material vegetal de cada espécie foi submetido à secagem a sombra, em temperatura ambiente e local ventilado, em seguida picado, pesado e submetido à extração com água destilada, aqui foram obtidos os extratos

brutos de cada espécie. Em seguida, esses extratos foram colocados em contato com água fria e quente. No primeiro, o material vegetal foi colocado em um béquer com adição de 500 mL de água fria destilada (temperatura ambiente 25 °C) e no segundo o material vegetal foi colocado num béquer com adição de 500 mL de água quente destilada (100 °C). Nesta etapa, duas amostras (fria e quente) de cada espécie foram obtidas para a separação por diálise.

3. Separação por diálise

Para realizar a separação dos metabólitos secundários por diálise foram utilizados os dois tipos de extratos obtidos para todas as espécies. A diálise foi realizada com a utilização de membrana sintética, na qual adicionou-se 120 mL dos extratos quente e frio de cada espécie. As amostras (membrana+extrato) foram imersas em 360 mL de água destilada, por um período de 48 horas. Cada amostra foi submetida à secagem por liofilização para posterior realização dos testes antioxidantes. Assim, quatro amostras foram obtidas: frações (fria e quente) interna e externa de cada espécie.

4. Capacidade antioxidante frente ao radical DPPH

A determinação da capacidade antioxidante das amostras foi feita de acordo com Saánchez-Moreno e colaboradores (1999) com algumas modificações. A capacidade antioxidante foi determinada monitorando-se a reação entre o radical livre DPPH e os extratos, através da medida do decréscimo da absorvência a 516 nm, em espectrofotômetro (UV-vis modelo Multispec – 1501 Shimadzu, Japão). Soluções aquosas dos extratos foram preparados de forma que sua concentração final dentro da cubeta fosse 50 µg mL⁻¹. No preparo das misturas reacionais foram utilizados 0,3 mL da solução dos extratos e 2,7 mL da solução metanólica de DPPH (40 µg mL⁻¹) e suas medidas de absorvência foram feitas a 516 nm. Fez-se um controle com 0,3 mL da solução do extrato da amostra e 2,7 mL de metanol para verificar o espectro da amostra.

A percentagem da capacidade sequestradora de radicais (RSA - radical scavenging ability) de cada amostra foi calculada utilizando a equação 1:

$$\% \text{ RSA} = [(Ab_{\text{Scontrole}} - Ab_{\text{Samostra}}) / Ab_{\text{Scontrole}}] \times 100 \quad (1)$$

Ab_{Scontrole} é a absorvência inicial da solução metanólica de DPPH• e Ab_{Samostra} é a absorvência da mistura reacional (DPPH• + amostra). As reações foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos como % RSA média ± desvio padrão.

Resultados e Discussão:

A Tabela 1 apresenta os resultados da capacidade antioxidante pelo método do DPPH• para os extratos de cada espécie de planta e suas frações após extração pelo método de diálise. Nota-se que todas as amostras apresentaram capacidade sequestradora frente ao radical DPPH, sendo o destaque para as frações externa fria e interna quente de umburana com valores acima de 80%. Observa-se para a espécie *Delonix regia* que os valores de RSA foram maiores para as frações internas fria e quente quando comparados aos valores das respectivas frações externas, indicando que a influência da elevação da temperatura não foi tão acentuada e, ainda, que a melhor atividade antioxidante está associada a moléculas maiores nesta espécie vegetal, uma vez que, essas moléculas não são capazes de permear através dos poros e portanto, permanecem na porção interna. Em contrapartida, a mesma observação não pode ser feita para a espécie *Amburana cearenses*, onde a temperatura provoca alterações importantes. Ao observar os extratos brutos fria e quente, nota-se que o extrato bruto quente apresentou valores menores que o extrato frio. Ao aplicar a separação por diálise, observa-se que a fração externa fria apresentou valor de RSA (%) maior em relação a fração interna fria, indicando maior potencial antioxidante das moléculas de menor tamanho, nesta menor temperatura. Já quando aplicado o mesmo método de separação ao extrato bruto obtido a quente ocorreu uma condição inversa, onde as moléculas retidas pela membrana, possuem maior valor de RSA (%), quando comparada com a sua respectiva fração interna quente, isto indica que o método de separação por diálise foi determinante para encontrar a fração mais ativa, independente da temperatura adotada no momento de extração. O tamanho das moléculas potencialmente antioxidantes, podem variar bastante, indo desde ácidos fenólicos com sete átomos de carbono e/ou carotenoides com quarenta átomos de carbono (SCOTTI et al, 2007).

Tabela 1: Valores da percentagem da capacidade sequestradora de radicais RSA (%) de cada amostra.

Amostras	<i>D. regia</i>	<i>A. cearenses</i>
	RSA (%)	RSA (%)
EXTBFrio	31,3 ± 1,2	31,9 ± 0,3
EXTBQuente	30,6 ± 0,1	19,3 ± 1,9
FREXTERFrio	30,7 ± 1,6	85,8 ± 13,7
FREXTERQuente	31,2 ± 1,1	37,1 ± 2,5
FRINTERFrio	44,8 ± 2,7	12,3 ± 1,7
FRINTERQuente	40,7 ± 1,5	82,4 ± 0,1

EXTBFrio – extrato bruto a frio; EXTBQuente – extrato bruto a quente; FREXTERFrio – fração externa a frio; FREXTERQuente – fração externa a quente; FRINTERFrio - fração interna a frio; FRINTERQuente – fração interna a quente.

Conclusões:

Os resultados obtidos neste trabalho, revelam que as espécies *D. regia* e *A. cearenses* possuem capacidade antioxidante. Maiores atividades estão associadas as frações internas no caso da *D. regia*, com pouca influência da temperatura sobre a ação antioxidante. No caso da *A. cearenses*, as amostras obtidas a quente demonstram maior atividade na fração interna com moléculas maiores, enquanto as amostras obtidas a frio demonstram maior ação na fração externa com moléculas menores.

Referências bibliográficas

- DEGÁSPARI, C. H; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades Antioxidantes De Compostos Fenólicos. **Universidade Tuiuti do Paraná**. 2004.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema b-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.
- FAUSTINO, T.; ALMEIDAR, B.; ANDREATI, R. Plantas medicinais no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada: uma revisão dos estudos clínicos controlados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v.32, n.4, p.429-436, 2010.
- HALLIWELL, B. "Biochemistry of Oxidative Stress," **Biochemical Society Transactions**, Vol. 35, No. 5, pp. 1147-1150. 2007
- PERÓN, J.M.R.; LÓPEZ, J.R.M.; LÓPEZ, Y.T. Radicales libres em la biomedicina y estrés oxidativo. **Revista Cubana de Medicina Militar**. v. 30, p. 36-44, 2001.
- RÊGO JÚNIOR, N.O; FERNANDEZ, L.G; CASTRO, R.D; SILVA, L.C; GUALBERTO, S.A; PEREIRA, M.L.A da SILVA, M.V. Bioactive compounds and antioxidant activity of crude extracts of brushwood vegetable species. **Braz. J. Food Technol.**, Campinas, v. 14, n. 1, p. 50-57, 2011.
- SANCHEZ-MORENO, C., A. LARRAURI, J., SAURA-CALIXTO, F., 1999. Free radical scavenging capacity and inhibition of lipid oxidation of wines, grape juices and related polyphenolic constituents. **Food Res. Int.** 32, 407–412.
- SCOTTI, L; SCOTTI, M.T; CARDOSO, C; PAULETTI, P; CASTRO-GAMBOA, I; BOLZANI, V.S; VELASCO, M.R; DE SOUZA MENEZES, C.M; FERREIRA, E.I. Modelagem molecular aplicada ao desenvolvimento de moléculas com atividade antioxidante visando ao uso cosmético. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 43, n. 2, 2007.
- SHEBIS, Y; ILUZ, D; KINEL-TAHAN, Y, DUBINSKY, Z; YEHOOSHUA, Y. Natural Antioxidants: Function and Sources **Food and Nutrition Sciences**, 4, 643-649, 2013.
- WALKER JM. 2009. **Protein Protocol Manual**. Third edition. Springer-Verlag New York, LLC