



ESTUDO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS BRASILEIRAS UTILIZANDO O ENSAIO DE ATIVIDADE DO PODER REDUTOR (EAPR)

JÚLIA ORLOVAS GALLARDO; WAILA EVELYN LIMA SANTANA MAIA; HORACIO DORIGAN MOYA

RESUMO

Radicais livres, espécies reativas presentes em nosso organismo, aumentam com fatores ambientais, causando estresse oxidativo. Componentes ativos como vitaminas, carotenoides e polifenóis atuam como antioxidantes, neutralizando esses radicais livres. Plantas medicinais são fontes valiosas de antioxidantes, destacando a relevância da avaliação da Capacidade Antioxidante Total (CAT) em alimentos de origem vegetais. O objetivo deste estudo foi determinar a CAT de extratos de plantas medicinais utilizando o Ensaio de Atividade do Poder Redutor (EAPR). O método EAPR proposto é baseado na redução de Fe(III) a Fe(II) por agentes redutores que na presença de $K_4[Fe(CN)_6]$, origina o composto $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$ de coloração azulada (λ_{max} 700 nm). Sendo assim, curvas analíticas foram obtidas por adição de volumes crescentes de solução do AO padrão ácido ascórbico (AA), 2,5 mL de solução tampão acetato (pH 4,6) e 2,5 mL de $K_3Fe(CN)_6$ 1% em tubo de ensaio. A mistura foi incubada a 50°C por 20 minutos, e em seguida, 2,5 mL da camada superior da solução foi retirada e então adicionada a um novo tubo contendo 5,0 mL de água e 0,5 mL de $Fe_2(SO_4)_3$ $5,95 \times 10^{-3}$ M. As leituras dos valores de absorbância foram realizadas em 700 nm. Para análises das amostras foram preparados extratos aquosos de acordo a Farmacopeia Brasileira e em seguida foi realizado o mesmo procedimento substituindo-se as alíquotas de AA por extratos das amostras. Os dados coletados foram utilizados para cálculo da CAT, expressa em equivalente de AA (AAEQ – mg AA/g material seco) e foram comparados com metodologias já descritas na literatura para quantificação de CAT estabelecida pela EMBRAPA (CATABTS+● – baseada no consumo do radical ABTS⁺●) e teor total de polifenóis (TTP). A análise estatística dos dados obtidos (CATEAPR, CATABTS+●, TTP) para as 8 plantas medicinais apresentou distribuição normal (p-Shapiro Wilk > 0,05), diante disso, forte correlação de Pearson foi encontrada entre os valores de CATABTS+●, ($r = 0,809$, $p < 0,05$) e teor total de polifenóis ($r = 0,727$, $p < 0,05$) com o método proposto. Sendo assim, conclui-se que o método proposto pode ser utilizado para a quantificação da CAT e que os polifenóis são os responsáveis pela CAT dessas amostras.

Palavras chaves: Polifenóis, ervas medicinais, ferrocianeto de ferro (III), radicais livres, azul da prússia.

1 INTRODUÇÃO

Radicais livres, espécie mais reativas que as não radiculares, são gerados e consumidos naturalmente em nosso organismo. A exposição a fatores ambientais, como poluição, tabagismo e radiação, pode resultar em uma produção excessiva de radicais livres, desencadeando estresse oxidativo prejudicial à saúde. Estudo epidemiológico sugere que dietas

ricas em frutas e legumes estão ligadas à redução do risco de doenças cardiovasculares e câncer (DIAS, SIMAS, JUNIOR, 2020). Acredita-se que vitaminas, carotenoides e polifenóis, atuando como antioxidantes, desempenham um papel nesse efeito preventivo, contribuindo para uma vida mais longa.

Com o crescente interesse em quantificar a capacidade antioxidante total (CAT) de alimentos, bebidas e extratos de plantas medicinais, tem-se utilizado frequentemente métodos baseados no consumo de um radical colorido (ex: ABTS) (RUFINO, *et al*, 2007) ou na redução de um íon metálico em meio de um agente complexante (SANTANA, NUNEZ, MOYA, 2015), (SACCHI, 2019), (Santo, Nunez, Moya 2013)

Essa tendência tem gerado um aumento significativo no interesse em quantificar o conteúdo total de AO presentes nessas amostras, uma vez que as plantas medicinais representam importantes fontes externas desses compostos.

Neste estudo, será empregada uma metodologia espectrofotométrica para mensurar a Capacidade Antioxidante Total (CAT) de extratos de plantas medicinais. O método envolve a redução de Fe (III) a Fe (II) por agentes antioxidantes nas amostras, gerando um complexo azul (λ_{max} 700 nm) com ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), conhecido como azul-de-turnbull ou azul-da-Prússia. Os resultados são expressos em equivalentes de ácido ascórbico.

Os resultados obtidos serão comparados com outra metodologia já estabelecida para quantificação de CAT (utilizado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)) baseado no consumo do radical colorido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), e com o teor total de compostos polifenóis determinado com o reagente de Folin-Denis, usado pela Farmacopeia Brasileira (FB).

O principal objetivo é determinar a capacidade antioxidante total (CAT) de extratos aquosos de plantas medicinais, por meio da reação de redução de Fe(III) a Fe(II) na presença de ferrocianeto de potássio, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, utilizando o método conhecido como Ensaio de Atividade do Poder Redutor (EAPR). Após a determinação da CAT pelo método do EAPR os valores obtidos são comparados com a CAT obtida pelos métodos do consumo do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. Além disso, é realizada uma correlação com os valores de CAT e com o teor total de polifenóis obtidos com o reagente Folin-Denis.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A água obtida por osmose reversa será utilizada em todas as soluções, exceto quando mencionado o contrário.

Solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (Cinética Química, 99%) a 1% foi obtida por dissolução de 1,0 g de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ em água suficiente para 100,0 mL. Solução de $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ $5,95 \times 10^{-3}$ M (Quimis, 99,8%) foi obtida por dissolução de 0,50 g do sal em 10 gotas de ácido sulfúrico (Exodo Científica, 98%) seguida adição de água suficiente para 250 mL de solução. Solução de ácido ascórbico (AA) $5,0 \times 10^{-3}$ M foi obtido por dissolução de 0,881 g de AA em água suficiente para 100 mL de solução. Solução de AA $5,0 \times 10^{-3}$ M foi obtida por adequada diluição em água. Solução tampão acetato de sódio 0,20 M / ácido acético 0,28 M (pH 4,6) foi obtida por adição de 14,3 mL de ácido acético glacial e 8,20 g de acetato de sódio a um balão volumétrico de 0,50 L avolumado com água.

Extrato aquoso das amostras de plantas medicinais *Plantago major* L., *Carapa guianensis* Aubl., *Casaria sylvestris* Sw, *Campomanesia phaea* (O.Berg), *Lippia origanoides* Kunth, *Aniba canelilla*, *Fridericia chica* L.G., *Cordia salicifolia* Cham. foram preparadas de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019).

Determinação do teor total de polifenóis (TTP - expresso em mg ácido pirogálico /100 g (material seco)) de plantas medicinais utilizando o reagente Folin-Denis, foi realizado de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019).

Determinação da capacidade antioxidante total (CAT - (expresso em g de material seco/ μ M trolox)) de plantas medicinais utilizando o reagente ABTS, foi realizada de acordo com o procedimento descrito na literatura da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (RUFINO, et al, 2007).

2.1 Determinação da capacidade antioxidante com Ensaio de Atividade do Poder Redutor (EAPR)

A curva analítica foi obtida por adição de volumes crescentes (0,2- 1,0 mL) de solução AA $5,0 \times 10^{-3}$ M, 2,5 mL de solução tampão acetato 0,2 M (pH 4,6) e 2,5 mL de $K_3Fe(CN)_6$ 1% para um tubo de ensaio.

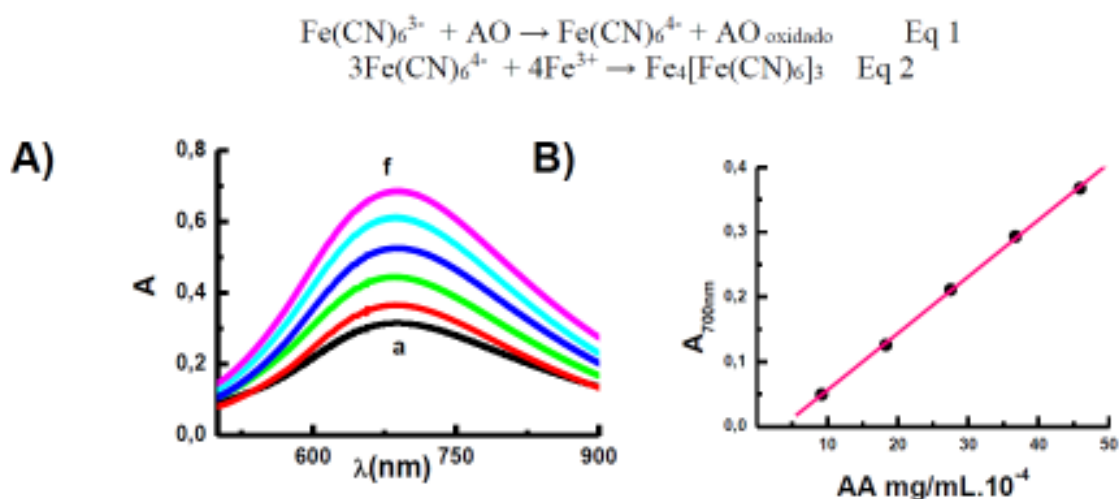
A mistura foi incubada a $50^\circ C$ por 20 minutos, após incubação 2,5 mL da camada superior da solução foi retirada e então adicionada a um novo tubo contendo 5,0 mL de água e 0,5 mL de $Fe_2(SO_4)_3$ $5,95 \times 10^{-3}$ M. As leituras dos valores de absorbância foram realizadas em 700 nm (A_{700nm}).

Para análises das amostras foram preparados extratos aquosos e em seguida foi realizado o mesmo procedimento substituindo-se as alíquotas de AA por extratos das amostras.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma curva de calibração obtida com o padrão antioxidante (AA) ácido ascórbico, para faixa linear $0,917 - 4,59 \times 10^{-3}$ mg/mL (Figura 1), foi realizada com base nas equações 1 e 2. Observa-se um aumento claro na absorbância (λ_{max} 700 nm) à medida que as concentrações do antioxidante AA são incrementadas, indicando simultaneamente o aumento proporcional na formação do complexo $Fe_4[Fe(CN)_6]_3$.

Figura 1. A. Espectro de absorção de uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ $3,9 \times 10^{-3}$ M, Tampão acetato de sódio 0,026 M/ ácido acético 0,036 M pH 4,6, $Fe_2(SO_4)_3$ $5,6 \times 10^{-4}$ M. AA (10^{-3} mg/mL): a) branco reagente b) 0,917;



c) 1,83; d)2,75; e)3,67 e f) 4,59. Medições de absorbância em 700 nm usando água como referência. B. Curva analítica obtida a partir do espectro de absorção sucessiva da figura A. Equação da reta: $A = -0,031 + 87,456 \times [AA]$.

Como metodologia de cálculo, foi suposto uma concentração teórica de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de AA. Calculou-se, utilizando a equação $A_{700nm} = a + b \times CAA$, o valor teórico de A_{700nm} correspondente a essa concentração. Substituiu-se esse valor de A_{700nm} na equação da reta

obtida com os extratos ($A_{700nm} = a + b \times CMS$) encontrando-se a concentração da solução de material seco, CMS, também em $mg\ mL^{-1}$. Esse valor corresponde, matematicamente, à concentração da solução do extrato aquoso que equivale a capacidade antioxidante de uma solução de AA $1,0\ mg\ mL^{-1}$.

Depois de corrigidas as diluições, encontra-se a massa do material seco responsável por essa capacidade antioxidante na amostra analisada expressando-se o valor em $g\ MS/g\ AA$ (g material seco/ g de ácido ascórbico).

Para as 8 amostras analisadas (Tabela 1), foi feito teste estatístico que apresentou distribuição normal (p -Shapiro Wilk $> 0,05$), sendo assim, fortes correlações de Pearson positivas foram encontradas entre os valores de TTP e CAT com os métodos $ABTS^{\bullet+}$ ($r = 0,969$, $p < 0,05$, Figura 2A) e EAPR ($r = 0,727$, $p < 0,05$, Figura 2B). Isso indica que provavelmente, os polifenóis são os responsáveis pela CAT das amostras analisadas, além disso, forte correlação de Pearson positiva, ($r = 0,809$, $p < 0,05$, Figura 2C), também foi encontrada para os valores de CAT entre os métodos EAPR e $ABTS^{\bullet+}$, indicando que o método aplicado pode ser utilizado para determinação de CAT em extratos de plantas medicinais.

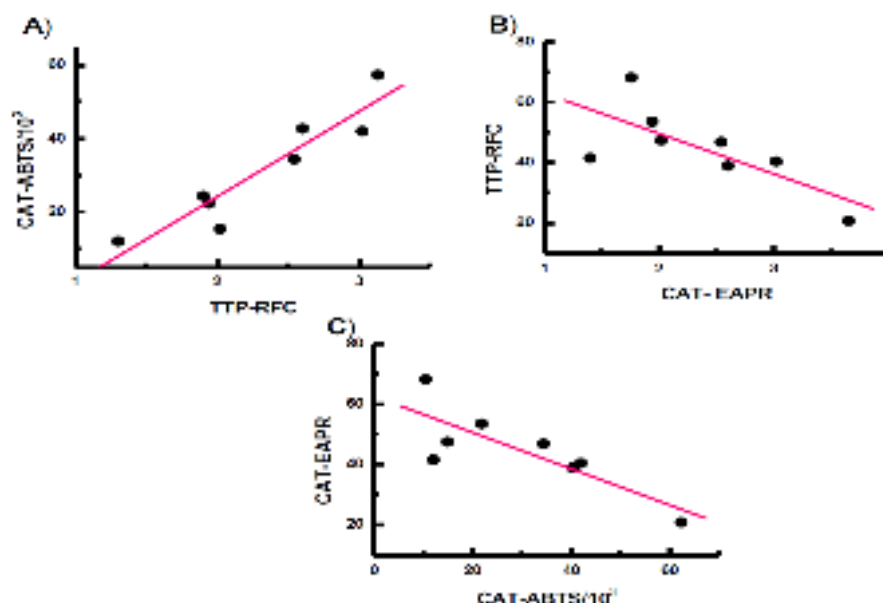
Vale ressaltar que o procedimento proposto apresenta como vantagem a não utilização de solventes orgânicos para obtenção dos extratos de plantas medicinais, diferentemente do método proposto pela EMBRAPA, radical $ABTS^{\bullet+}$, que utiliza metanol e acetona.

Tabela 1. Valores de teor total de polifenóis determinado com o reagente de Folin-Denis e capacidade antioxidante total obtidas com os métodos ABTS, EAPR das espécies de plantas medicinais analisadas.

		Teor total de polifenóis e capacidade antioxidante total		
Espécies				
Ervas medicinais Nomes científicos		TTP	$ABTS^{\bullet+}$	EAPR
Andiroba	<i>Carapa guianensis</i> Aubl.	$2,60 \pm 0,20$	42687 ± 2389	37 ± 2
Cambuci	<i>Campomanesia phaea</i> (O.Berg)	$3,13 \pm 0,52$	57297 ± 5064	20 ± 1
Guaçatonga	<i>Casaria sylvestris</i> Sw	$1,90 \pm 0,14$	24373 ± 1854	70 ± 2
Salva de marajó	<i>Lippia origanoides</i> Kunth	$1,94 \pm 0,11$	22309 ± 443	55 ± 2
Tanchagem	<i>Plantago Major</i> L.	$2,02 \pm 0,98$	15401 ± 518	46 ± 2
Pariri	<i>Fridericia chica</i> L.G.	$2,54 \pm 0,118$	334417 ± 6245	47 ± 10
Casca preciosa	<i>Aniba canelilla</i> (Kunth) Mez	$3,02 \pm 0,65$	42021 ± 4127	40 ± 3
Porangaba	<i>Cordia salicifolia</i> Cham	$1,30 \pm 0,10$	12022 ± 182	42 ± 3

TTP=Teor total de polifenóis, expresso em mg ácido pirogálico/ $100\ g$ (material seco); CAT = Capacidade antioxidante total obtidos pelos métodos: ABTS: Radical expresso em g de material seco/ μM trolox, e EAPR: Ensaio de Atividade do Poder Redutor expresso em g material seco/ g AA.

Figura 2. Gráficos de correlação: A) Valores de CAT obtidos com o método do radical ABTS (g de material seco / μM trolox) com Valores TTP obtidos com o reagente Folin-Denis (mg ácido pirogálico/ $100\ g$ material seco), $r = 0,969$, $p < 0,05$; B) Valores TTP obtidos com o reagente Folin-Denis (mg ácido pirogálico/ $100\ g$ material seco) com valores de CAT obtidos com o método EAPR (g material seco / g AA /103), $r = 0,727$, $p < 0,05$; C) Valores de CAT obtidos com o método EAPR (g material seco / g AA /103) e com método do radical ABTS (g de material seco / μM trolox), $r = 0,809$, $p < 0,05$



4 CONCLUSÃO

A avaliação da capacidade antioxidante de extratos aquosos de plantas medicinais usando o Ensaio de Atividade do Poder Redutor (EAPR) revelou-se eficaz. A comparação com outros métodos de quantificação da capacidade antioxidante total e a correlação com o teor de polifenóis destacam o potencial antioxidante desses extratos. Esses resultados fortalecem a importância das plantas medicinais como fontes de antioxidantes, destacando a utilização do método EAPR na avaliação desse poder antioxidante.

Referências Bibliográficas

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA); **Farmacopeia Brasileira, Monografia de Plantas Medicinais**; Diário Oficial da União (DOU), Brasília, 6ª Ed, Vol. 2, PM051-00, PM039-00, PM028-00, PM013-00, 2019.

DIAS, Sharlene. Santana.; SIMAS, Luisa.; JUNIOR, Luiz Cezar Lima. Alimentos Funcionais Na Prevenção E Tratamento De Doenças Crônicas Não Transmissíveis. **Boletim de Conjuntura (BOCA)**, Boa Vista, v. 4, n. 10, p. 54–61, 2020.

RUFINO, Maria Do Socorro Moura. et al, Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. **Comunicado Técnico EMBRAPA**, p. 128, 2007.

SACCHI, Rafaela et al, A procedure for assessment of the reducing capacity of plants-derived beverages based on the formation of the FeII/2,2'-bipyridine complex, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2019.

SANTANA, Waila Evelyn L.; NUNEZ, Cecília Verônica; MOYA, Horacio D., Antioxidant Activity and Polyphenol Content of Some Brazilian Medicinal Plants Exploiting the Formation of the Fe(II)/2,2'-bipyridine Complexes, **Natural product communication**, v. 10, n. 11, p. 1821-1824, 2015.

SANTO, Monica Gabriela; NUNEZ, Cecilia Veronica; MOYA, Horacio Dorigan. A new method for quantification of total polyphenol content in medicinal plants based on the reduction of Fe (III)/1, 10-phenanthroline complexes *Advances in Biological Chemistry*, v. 3, p. 525-535, 2013.