



## DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL BASEADA NO CONSUMO DE RADICAIS LIVRES GERADOS POR AAPH

GABRIEL DA SILVA LIMA; LUCAS RAFAEL DE MOURA DOMINGOS; WAILA EVELYN LIMA SANTANA; HORACIO DORIGAN MOYA

### RESUMO

Moléculas altamente reativas, conhecidas como radicais livres, são produzidas durante o metabolismo, em excesso podendo induzir ao estresse oxidativo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças degenerativas, envelhecimento acelerado e morte celular. Nesse contexto, os polifenóis, reconhecidos por sua notável atividade antioxidante, desempenham um papel crucial como inibidores dessas moléculas. Fontes de origem vegetal, como plantas medicinais, apresentam uma diversidade de compostos polifenólicos, os quais desempenham um papel fundamental na capacidade antioxidante dessas amostras. O objetivo deste estudo foi aplicar o método analítico quimioluminescente, baseado na decomposição térmica do dicloridrato de 2,2'-azobis -2-metilpropionamidina (AAPH) na presença de luminol em meio alcalino para quantificar a Capacidade Antioxidante Total (CAT) de extratos de plantas medicinais. Baseada nessa reação foram realizadas curvas analíticas com solução do padrão antioxidante Trolox<sup>®</sup>. Para a análise das amostras, o mesmo procedimento foi realizado, substituindo a solução de Trolox por extratos aquosos das plantas medicinais (CEA), permitindo calcular a CATAAPH dessas amostras (expressa em g Trolox/g de extrato). Os valores de CATAAPH de sete plantas medicinais (*Campomanesia phaea*, *Aniba canelilla*, *Piper scabrum* L, *Hymenaea courbaril* L, *Dialium guinense* (Aubl.) Sandwith, *Ingá alba*, *Lippia grandis* Shauer) foram correlacionados com os valores de CATAAPH obtidos com a metodologia estabelecida pela EMBRAPA (baseada no consumo do radical ABTS<sup>•+</sup>) ( $r = 0,900$ ) e com o teor total de polifenóis (TTP) ( $r = 0,800$ ). A análise estatística dos dados revelou fortes correlações de Spearman com alta significância estatística do método proposto (CATAAPH) com valores de o TTP ( $r = 0,847$ ,  $p < 0,05$ ) e com a CATABTS ( $r = 0,821$ ,  $p < 0,05$ ). Com base nos resultados obtidos, conclui-se que os polifenóis podem ser os responsáveis pela CAT e que o método proposto pode ser utilizado como uma alternativa viável para a quantificação da CAT em extratos de plantas medicinais.

**Palavras-chave:** quimioluminescência; luminescência; polifenóis; plantas medicinais; Trolox<sup>®</sup>

### 1 INTRODUÇÃO

Moléculas altamente reativas, conhecidas como radicais livres, são produzidas durante o metabolismo, em excesso podendo induzir ao estresse oxidativo, contribuindo para o desenvolvimento de doenças degenerativas, envelhecimento acelerado e morte celular. Nesse contexto, os polifenóis, reconhecidos por sua notável atividade antioxidante, desempenham um papel crucial como inibidores dessas moléculas prejudiciais. Fontes vegetais, como plantas medicinais, apresentam uma diversidade significativa de compostos polifenólicos, os quais desempenham um papel fundamental na capacidade antioxidante dessas amostras.

A reação quimioluminescente de interesse analítico utilizada no presente projeto foi a de decomposição térmica (termólise) do dicloridrato 2,2'-azobis-2- metilpropionamidina, a 37°C, gerando dois radicais livres, e que foi usada anteriormente na determinação de capacidade antioxidante total (CAT) de amostras biológicas (KRASOWSKA et al., 2000).

Em 1993, foi estudado a emissão de fluorescência utilizando decomposição de AAPH com a formação de radicais livres na presença de  $\beta$ -ficoeritrina, uma proteína comum em cianobactérias e algas vermelhas que auxiliam a captação de luz (CAO, ALESSIO E CUTLER, 1993). Naquele estudo quantificou-se a capacidade de absorção de espécies reativas de oxigênio por compostos antioxidantes (ex.:  $\alpha$ -tocoferol,  $\alpha$ -caroteno, bilirrubina, ácido ascórbico e ácido úrico) presentes em amostras de soro. Em seguida, a decomposição térmica de AAPH foi utilizada em meio alcalino juntamente com luminol (VISIOLI E GALLI, 1997) ou isoluminol (HIRAYAMA et al., 1997) para quantificar a capacidade antioxidante em amostras de plasma sanguíneo, soro e saliva humana.

Um método espectrofotométrico, menos sensível, utilizando a reação de decomposição do AAPH, foi desenvolvido para quantificação da CAT das amostras de cervejas utilizando ácido linoleico como padrão (LIÉGEOIS, LERMUSIEAU E COLLIN, 2000). Métodos quimioluminescentes para o estudo da oxidação de triptofano e tirosina (ASPÉE E LISSI, 2000) e para a quantificação de conservantes utilizados em alimentos (ex.: BHA e BHT) também foram desenvolvidos baseando-se a reação de decomposição do AAPH (KRASOWSKA et al., 2000). Dresch e outros pesquisadores otimizaram um método utilizando AAPH/luminol e estabeleceram parâmetros para a amplificação do sinal analítico e aperfeiçoando o procedimento experimental com a estabilização do emissor de radicais livres AAPH (DRESCH et al., 2009). VANAJA et al (2013) utilizaram o mesmo sistema AAPH/luminol para comparar o sinergismo da ação antioxidante de resveratrol com outras vitaminas antioxidantes em lipossomos, baseando-se na diminuição da emissão da intensidade de luminescência causada pela inibição da produção de espécies reativas de oxigênio em leucócitos (VANAJA et al., 2013). Stobiecka e colaboradores (2016) foram pioneiros ao usar AAPH para quantificar a capacidade antioxidante de terpenos e compostos não-fenólicos (ex.: linalol) presentes em alimentos e cosméticos (odorizantes). Os parâmetros para a inibição da peroxidação de membranas dos glóbulos vermelhos induzidas por AAPH foram estudadas em 2017 (ZARGOOSH et al, 2017). A atividade antioxidante e a afinidade por água foram avaliadas utilizando como fluoróforo o composto dietil-2-(ciclo-hexilamino)-5-[(E)-2-fenil-1-etenil]-3,4- furandicarboxilato.

Considerando o reagente AAPH na presença de luminol em meio alcalino, desenvolveu-se uma metodologia analítica sensível, baseado nas emissões de radicais livres deste reagente para a quantificação da CAT de 7 amostras de plantas medicinais, as quais tiveram os seus valores comparados com metodologia já estabelecida na literatura pela EMBRAPA- baseada no consumo do radical  $ABTS^{\bullet+}$  (RUFINO, et al, 2007). e com o teor total de polifenóis utilizando o reagente Folin-Denis (ANVISA, 2019).

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### *Reagentes e Soluções*

Todos os reagentes utilizados são de grau analítico e todos os padrões de referência possuem pureza superior a 98%. Água ultrapura foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q.

Solução aquosa de dicloridrato de 2,2'-azobis (2-amidinopropano)  $4,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , foi preparada por dissolução de 0,2712 g do reagente (AAPH,  $C_8H_{18}N_6 \times 2HCl$ , Sigma-Aldrich,) em balão volumétrico de 25,0 mL com água. Solução aquosa de hidróxido de sódio  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$  (NaOH, Quimex, Brasil), foi preparada por dissolução de 2,0 g da base em balão

volumétrico de 50,0 mL. Solução de trabalho  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> foi obtida por adequada diluição em água. Solução aquosa de luminol (3-aminofthalhidrazida, 5-amino-2,3-di-hidro-1,4-ftalazinodiona, C<sub>8</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich, Estados Unidos)  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>, foi preparado transferindo-se 0,0177 g do reagente para um balão volumétrico de 100,0 mL e completando-se o volume com solução de NaOH  $1,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>. Solução aquosa de tris(hidroximetil)aminometano 1,0 mol L<sup>-1</sup>, pH 8,0, foi preparada por dissolução de 6,06 g (Tris, NH<sub>2</sub>C(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub>, Sigma, Estados Unidos) em balão volumétrico 50,0 mL.

#### *Preparação dos extratos de origem vegetal*

Extrato aquoso das amostras de plantas medicinais *Campomanesia phaea* (folha), *Aniba canelilla* (tronco), *Piper scabrum* L (folha), *Hymenaea courbaril* L (tronco), *Dialium guinense* (Aubl.) *Sandwith* (folha), *Ingá alba* (folha), *Lippia grandis* Shauer (folha), foram preparadas de acordo com o procedimento descrito na Farmacopeia Brasileira (ANVISA, 2019).

#### *Determinação do teor total de polifenóis*

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 ABTS*

Determinação da capacidade antioxidante total (CAT - (expresso em g de material seco/ $\mu$ M trolox)) de plantas medicinais utilizando o radical ABTS<sup>•+</sup>, foi realizada de acordo com o procedimento descrito na literatura da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (RUFINO, et al, 2007).

#### *Curvas analíticas com solução de Trolox®*

Curva analítica com solução do padrão Trolox®  $1,0 \times 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup> (TR), foram obtidas a partir da adição de 25  $\mu$ L de tampão Tris 1,0 mol L<sup>-1</sup> (pH 9,0), 25  $\mu$ L de luminol  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> e 25  $\mu$ L de AAPH  $4,0 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> a tubos de análises. Em seguida a mistura foi levada para incubação em banho ultra termostático, a 37°C por 30 minutos, por fim, logo após incubação, foi adicionado de 30 – 100  $\mu$ L da solução TR. O volume final nos tubos foi completado com água suficiente para 250  $\mu$ L de solução. Mistura obtida sem adição de solução de TR foi utilizada como “branco reagente”.

#### *Curvas analíticas com as amostras de origem vegetal*

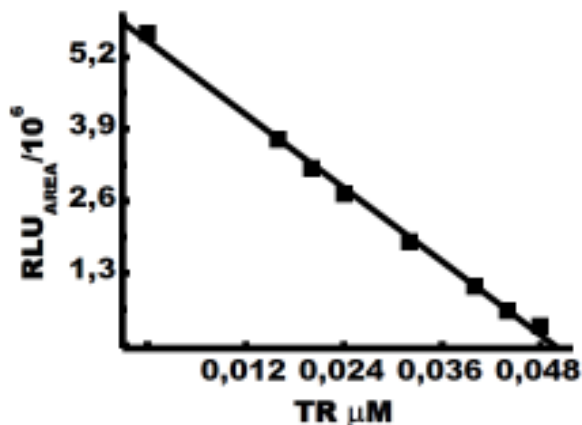
Para determinação da capacidade antioxidante total de amostras de origem vegetal foi realizado o mesmo procedimento descrito no item acima. substituindo-se as alíquotas de TR por soluções diluídas dos extratos de origem vegetal (EA). Mistura obtida sem adição de solução de EA foi utilizada como “branco amostra”. Os valores de RLUAREA obtidos foram então relacionadas com as respectivas concentrações dos extratos aquosos vegetais (CEA) possibilitando, a partir dos gráficos originados (RLUAREA vs. CEA, em g L<sup>-1</sup>), a realização dos cálculos para determinação da capacidade antioxidante dessas amostras (expressa em g trolox/g de extrato).

### **3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Na figura 1, ocorre a adição de volumes crescentes de Trolox® (TR), que promoveu a diminuição dos valores de RLUAREA, devido ao consumo dos radicais livres gerados pela decomposição do AAPH. Uma típica curva de calibração fornece a equação da reta dos valores

de RLUÁREA vs. tempo igual a  $RLUÁREA = 5,487 - 110,4 \times CTR$  ( $r = 0,998$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 8$ ), Figura 1, na qual CTR é a concentração de TR em  $\mu M$ . Os valores de limite de detecção ( $0,0044 \mu M$ ) e de quantificação ( $0,0147 \mu M$ ) foram calculados de acordo com a literatura (HARRIS, 2005). Os valores de CV % para 3 medições de RLUAREA em três níveis de concentrações de TR ( $0,012$ ;  $0,032$ ;  $0,040$ )  $\mu M$  foram (1,1; 4,1; 5,1) %, respectivamente. Os valores de sensibilidade e reprodutibilidade foram obtidos com 10 curvas de calibração ( $b = -107,6 \pm 5,7$ ; CV 5,3 %;  $n = 10$ ). Essas figuras de mérito sugerem que TR, um análogo solúvel da vitamina E, é uma boa escolha para ser utilizado como composto padrão para expressar valores de capacidade antioxidante (CRETR).

**Figura 1.** Curva analítica com solução padrão de Trolox® em solução contendo Tris 0,1 M (pH 8,0), luminol  $1,0 \times 10^{-4}$  M, AAPH  $4,0 \times 10^{-3}$  M, para a faixa linear de ( $0,012 - 0,048$ )  $\mu M$ . Tempo total de medição 120,0 s. Água utilizada como referência;  $y = 5,487 - 110,4 \times X$ ;  $r = -0,998$ ;  $p < 0,0001$ ;  $n = 8$ .



A variação da concentração do agente redutor (extrato de planta medicinal) foi obtida pela diminuição do sinal de quimioluminescência em uma solução contendo AAPH na presença de luminol (Tris, pH 8,0). Essa relação também foi linear e representada pela integração da área sob a curva RLU vs tempo. Em seguida esses valores foram relacionados com a concentração de TR (agente redutor padrão) e então utilizados em um tratamento matemático para quantificar a capacidade antioxidante das amostras vegetais investigadas. Como essa reação é fortemente afetada pela temperatura e tempo de medição do sinal de quimioluminescência (RLUÁREA), estes dois parâmetros foram rigidamente controlados a fim de se obter medições desde o início da reação.

Os valores da CAT foram expressos mg/L e calculados com base em metodologia descrita na literatura (Apak, et al., 2004; Nakamura, et al., 2013).

A tabela 1 apresenta os valores de CAT obtidos a partir da reação de consumo do cátion radical  $ABTS^{\bullet+}$  (expressos em mM de trolox/ g de material seco) e pela reação de consumos dos radicais gerados pelo AAPH (expressos em g de trolox/ g extrato). Os valores de teor total de polifenóis obtidos com o reagente Folin-Denis também estão descritos na tabela 1 e expressos em p de ácido pirogálico/ 100 g de material seco.

Para análise estatística (*Jamovi*® 2023) dos dados obtidos foi realizado um teste de normalidade (Shapiro-Wilk) o qual indicou que a variável CAT com AAPH não apresenta distribuição normal ( $p$  Shapiro-Wilk = 0,006), sendo assim para correlação dos dados foi realizado o teste de correlação de Spearman. Forte correlação com alta significância estatística ( $r = 0,821$ ,  $p < 0,05$ ) foi encontrada entre os valores de CAT obtidos com o método AAPH e cátion radical  $ABTS^{\bullet+}$ , indicando a reação proposta pode ser utilizada como uma alternativa

para quantificação da CAT em amostras de plantas medicinais. Forte correlação ( $r = 0,847$ ,  $p < 0,05$ ) também foi encontrada entre os valores de CAT obtidos com o cátion radical  $ABTS^{\bullet+}$  e o teor total de polifenóis indicando que nestas amostras os polifenóis podem ser os reesposáveis pela capacidade antioxidante.

É crucial destacar que o método sugerido possui a vantagem de não requerer o uso de solventes orgânicos na preparação dos extratos de plantas medicinais, em contraste com a abordagem da EMBRAPA, que emprega metanol e acetona.

**Tabela 1-** Valores de capacidade antioxidante total e teor total de polifenóis para as amostras de plantas medicinais.

| Nome popular        | Nome Científico                          | AAPH                 | ABTS        | RFD        |
|---------------------|------------------------------------------|----------------------|-------------|------------|
|                     |                                          | CAT×10 <sup>-3</sup> |             | TTP        |
| Cambuci             | <i>Campomanesia phaea</i>                | 5,93 ± 0,22          | 57,3 ± 5,10 | 3,1 ± 0,5  |
| Casca preciosa      | <i>Aniba Canelilla</i>                   | 2,84 ± 0,52          | 42,0 ± 1,69 | 3,5 ± 0,2  |
| Aperta Ruão         | <i>Piper scabrum L</i>                   | 3,32 ± 0,25          | 12,6 ± 0,50 | 1,9 ± 0,2  |
| Casca de Jatobá     | <i>Hymenaea courbaril L</i>              | 3,82 ± 0,36          | 24,4 ± 1,85 | 1,2 ± 0,1  |
| Piranheira do Xingu | <i>Dialium guinense (Aubl.) Sandwith</i> | 20,9 ± 1,68          | 83,6 ± 2,64 | 4,0 ± 0,6  |
| Ingá Vermelha       | <i>Ingá alba</i>                         | 26,7 ± 6,42          | 95,6 ± 1,63 | 8,0 ± 0,4  |
| Salva de Marajó     | <i>Lippia grandis Shauer</i>             | 27,7 ± 0,32          | 22,3 ± 0,44 | 1,9 ± 0,10 |

RFD: Reagente Folin-Denis; TTP (teor total de polifenóis): expresso em g PG/ 100g MS; CAT: Capacidade antioxidante total (CAT- ABTS): □M trolox/g extrato; Capacidade antioxidante total (CAT- AAPH): g trolox/g extrato.

4 CONCLUSÃO

A reação de no consumo dos radicais livres produzidos pela reação de termodecomposição do dicloridrato de 2,2'-azobis -2-metilpropionamidina (AAPH) pode ser utilizada como alternativa para quantificação da capacidade antioxidante total em plantas medicinais.

REFERÊNCIAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopéia Brasileira Monografia de Plantas Medicinais, PM051-00, Vol. 2, 6ª. Ed. Brasília, 2019.

APAK, R., GÜÇLÜ, K., ÖZYÜREK, M., KARADEMIR, S.E. Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC Method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52, 2004, 7970-7981.

ASPÉE, A., LISSI, E.A. Kinetics and mechanism of the chemiluminescence associated with the free radical-mediated oxidation of amino acids. **Luminescence**, 15(5), 2000, 273-282.

CAO, G., ALESSIO, H.M., CUTLER, R.G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**, 14(3), 1993, 303-311.

DRESCH, M.T.K.; ROSSATO, S.B.; KAPPEL, V.D.; BIEGELMEYER, R.; HOFF, M.L.M.; MAYORGA, P.; ZUANAZZI, J.A.S.; HENRIQUES, A.T.; MOREIRA, J.C.F. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**, 385(1), 2009, 107–114.

Harris, D.C. Análise Química Quantitativa, 6ª Edição, LTC - Livros Técnicos e Científicos. Capítulo 5, p. 82-92. Editora S.A., Rio de Janeiro, 2005.

HIRAYAMA, O., TAKAGI, M., HUKUMOTO, K., KATOH, S. Evaluation of Antioxidant Activity by Chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, 247(2), 1997, 237-241.

KRASOWSKA A., ROSIAK D., SZKAPIAK K., LUKASEWICZ M. Chemiluminescence detection of peroxy and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds. **Current Topics in Biophysics**, 24(2), 2000, 89-95.

LIÉGEOIS, C., LERMUSIEAU, G., E COLLIN, S. Measuring antioxidant efficiency of wort, malt, and hops against the 2,2'-Azobis(2-amidinopropane) Dihydrochloride-induced oxidation of an aqueous dispersion of linoleic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 48(4), 2000, 1129-1134.

NAKAMURA, T., SILVA, F.S., SILVA, D.X., SOUZA, M.W., MOYA, H.D. Determinação da atividade antioxidante e do teor total de polifenol em amostras de chá de ervas comercializadas em sachets. **ABCS Health Sciences**, 38, 2013, 8-16.

RUFINO, M.S.M., ALVES R.E., BRITO E.S., MORAIS S.M., SAMPAIO C.G., JIMÉNEZ J.P., CALIXTO F.D.S. Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS. **EMBRAPA**, 2007, 128:1-4

STOBIECKA, A., SIKORA, M., BONIKOWSKI, R., & KULA, J. Um estudo exploratório da atividade de eliminação de radicais peróxil-2,6-dimetil-5-hepten-2-ol e seus análogos heterocíclicos. **Journal of Molecular Structure**, 1107(1), 2016, 82-90.

VANAJA, K., WAHL, M. A., BUKARICA, L., HEINLE, H. Liposomes as carriers of the lipid soluble antioxidant resveratrol: Evaluation of amelioration of oxidative stress by additional antioxidant vitamin. **Life Sciences**, 93(24), 2013, 917-923.

VISIOLI, F., GALLI, C. Evaluation of antioxidant capacity by chemiluminescence. **Analytical Biochemistry**, 249(2), 1997, 244-246.

ZARGOOSH, K., TABIBI, A., KIANFAR, A. H., DOSTANI, M., QANDALEE, M., & NADERI, G. A. Quenching-free chemiluminescence method for ranking the antioxidants and inhibition of AAPH-induced membrane peroxidation of red blood cells using new aminophenol derivative. **Journal of Luminescence**, 192, 2017, 582-589.