

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS EM EXTRATOS PADRONIZADOS DE *Alternanthera maritima* OBTIDOS POR TRÊS METODOS DE EXTRAÇÃO

Ana Paula Teixeira¹, Marcos José Salvador^{1,2*}.

¹Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), Curso Farmácia, FCS, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, 12244-000, São José dos Campos – SP, Brasil, mjsalvador1531@yahoo.com.br ²Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal, Curso Farmácia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Cp.6109, CEP 13083-970, Campinas (SP), Brasil

Resumo- Neste trabalho foi realizado o estudo comparativo de três métodos de extração (reator encamisado, ultra-som e maceração) para o preparo de extratos padronizados bioativos de *Alternanthera maritima*. Os extratos foram obtidos utilizando como líquido extrator metanol, hexano ou água e diferentes tempos de extração (30, 60, 720 e 1440 minutos). A avaliação da atividade antioxidante foi realizada empregando-se ensaio DPPH, sendo a leitura realizada em espectrofotômetro ($\lambda=517\text{nm}$). Como controle positivo utilizou-se o flavonóide quercetina. O conteúdo de fenólicos totais solúveis também foi determinado usando o método colorimétrico de Folin-Ciocalteu com a leitura realizada em $\lambda=726\text{nm}$, utilizando-se o ácido gálico como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados mostraram que o emprego do reator encamisado e do ultra-som possibilitou uma otimização do processo de preparo dos extratos de *A. maritima*, apresentando bom rendimento de transferência de massa em menor tempo de extração, quando comparados com a maceração. O conteúdo fenólico dos extratos metanólicos com atividade antioxidante variou de 249,3 a 312,5 mg de AGE/g de extrato em base seca.

Palavras-chave: *Alternanthera maritima*, Métodos de extração, Fenólicos totais, Atividade antioxidante
Área do Conhecimento: Ciências da Saúde – Farmácia.

Introdução

Atualmente, cresce cada vez mais o uso de extratos vegetais em formulações farmacêuticas. Esses extratos devem seguir parâmetros de qualidade que garantem a segurança e a eficácia da formulação. A segurança e a eficácia estão intimamente relacionadas com a escolha do método de extração do material vegetal, firmando então a necessidade de um controle rigoroso destes métodos.

A extração é o primeiro passo para a obtenção e purificação de constituintes químicos de espécies vegetais. Ela pode ser realizada por inúmeros métodos extrativos que podem ser classificados em métodos clássicos, como a maceração e a percolação, e métodos modernos, como extração assistida por ultra-som, fluido supercrítico e extratores ou reatores com controle de temperatura e agitação (SCHINOR et al., 2004; TOMA et al., 2001).

O gênero *Alternanthera* (Gomphreneae, Amaranthaceae) compreende 80 espécies das quais muitas são tradicionalmente utilizadas para o tratamento de infecções ou apresentam propriedades analgésicas, imunomodulatórias ou antimicrobianas (SIQUEIRA, 1987). *Alternanthera maritima* é uma herbácea comumente encontrada nas restingas brasileiras e tem sido utilizada no

combate a infecções (SALVADOR et al., 2004). Estudos químicos prévios têm demonstrado a ocorrência de flavonóides, saponinas e esteróides como ativos majoritários deste vegetal (SALVADOR e DIAS, 2004).

O extrato vegetal pode ser analisado sob diferentes aspectos, como, por exemplo, a constituição química. A constituição química de um vegetal é extremamente complexa, pois nela encontramos uma mistura de substâncias químicas denominadas de metabólitos primários ou secundários. A identificação desses compostos orgânicos, no extrato vegetal, é de grande importância principalmente porque eles podem ser utilizados como uma excelente fonte de produtos farmacêuticos fitoterápicos (JACQUES et al., 2005).

Os flavonóides são metabólitos secundários, polifenólicos e são extremamente diversificados no reino vegetal. Esses compostos têm grande importância econômica, já que apresentam algumas propriedades importantes como: antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, entre outras. Antioxidantes atuam na captura de espécies oxidantes, tais como as espécies reativas de oxigênio, impedindo danos aos tecidos biológicos.

Vários métodos analíticos têm sido propostos para determinar a atividade antioxidante total de extratos, com objetivo de avaliar a capacidade antioxidante total das amostras (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). Entretanto, até o momento, nenhum estudo tecnológico para padronização da matéria-prima de *Alternanthera maritima* foi encontrado. Assim, o presente trabalho descreve a avaliação da atividade antioxidante de extratos de *Alternanthera maritima* bem como a quantificação dos compostos fenólicos presentes.

Materiais e métodos

Coleta e classificação do material vegetal

Partes aéreas de *Alternanthera maritima* (Mart.) St. Hil. foram coletadas pelos Doutores Diones Aparecida Dias e Marcos José Salvador no seu habitat natural, Restinga de Marica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, em dezembro de 1998 sendo identificada pelo Dr. Josafá Carlos de Siqueira (Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Uma amostra da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP, Brasil, sob número de registro SPFR 02968.

Preparo dos extratos

Os extratos foram preparados por meio de três métodos de extração: maceração, ultra-som e reator encamisado.

a) Maceração

Para o método de maceração foi utilizado 1,0 g de pó do vegetal e 20mL de solvente (hexano, metanol ou água destilada). A mistura foi deixada em repouso por 720 ou 1440 minutos de extração, à temperatura ambiente, em frasco fechado. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

b) Ultra-som

No método de sonificação, foram utilizadas as mesmas quantidades de pó e solventes extratores, sendo a mistura deixada em banho de ultra-som, com frequência de 40 kHz, por 30 ou 60 minutos de extração à temperatura de 30°C, em frasco fechado. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

c) Reator encamisado

No método que utiliza o sistema de extração composto por um agitador magnético, um extrator encamisado e um banho de aquecimento, foram utilizadas as mesmas quantidades de pó e

solventes extratores, sendo a mistura deixada no reator com agitação constante (100 rpm), por 30 ou 60 minutos de extração à temperatura de 30°C, em frasco fechado. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Em cada processo de extração citado, após homogeneização, filtragem (em funil de vidro contendo algodão) e evaporação do solvente sob fluxo de ar, os extratos foram pesados, determinando-se a eficiência de extração em termos de massa (g) e submetidos ao ensaio antioxidante. Todos os procedimentos foram realizados em triplicata.

Preparo das amostras para o método DPPH

Para o método DPPH foi pesado 2600µg de extrato (metanólico, hexânico e aquoso) para cada metodologia (reator, ultra-som, 30 e 60 minutos e maceração 720 e 1440 minutos). As amostras pesadas foram diluídas em 1mL de etanol, preparando-se as seguintes concentrações: 2600, 1300; 650; 325; 162,50 e 81,25µg/mL.

Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A atividade antioxidante das diferentes concentrações do extrato de *Alternanthera maritima* foi determinada pelo ensaio DPPH (2,2-difenil-2-picril-hidrazila). Esse ensaio consiste em avaliar a capacidade de captura do radical livre DPPH pelo antioxidante presente no material vegetal (HUANG et al., 2005).

Foram utilizados 100µL de solução tampão fosfato (250µM), 150µL etanol, 50µL de solução DPPH (250µM), 10µL das amostras dos extratos ou 10µL dos controles. O flavonóide Quercetina foi utilizado como controle positivo nas concentrações de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL e como controle negativo utilizou-se o diluente (etanol).

Os reagentes e amostras foram inseridos em uma microplaca de 96 poços, ao passo que as concentrações finais das amostras analisadas foram: 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,125µg/mL.

Após o tempo de incubação de 30 minutos a temperatura ambiente, foi medida a absorbância das amostras. As medidas foram feitas por espectrofotometria, sendo a leitura realizada em 570nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A porcentagem de redução do radical DPPH de cada amostra foi calculada da seguinte maneira:

$$\% \text{ de redução} = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs negativo}) \times 100}{(\text{Abs positivo} - \text{Abs negativo})}$$

Onde Abs amostra é absorvância da amostra, Abs negativo é a absorvância do controle negativo (etanol) e Abs positivo é a absorvância do controle positivo (flavonóide quercetina).

Preparo das amostras para o método Folin-Ciocalteu

Foi utilizado 2600µg de extrato metanólico a partir de cada um dos métodos de extração (reator e ultra-som, 30 e 60 minutos e maceração 720 e 1440 minutos). As amostras pesadas foram diluídas em 1mL de etanol.

Quantificação de compostos fenólicos

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos metanólicos foi feita por meio do método Folin-Ciocalteu (HUANG et al., 2005). Uma alíquota de 26µL de cada amostra foi inserida em uma microplaca de 96 poços junto com 26µL do reagente Folin-Ciocalteu. Passado três minutos, foi adicionado 26µL de carbonato de sódio. Após sete minutos foi acrescentada água destilada.

Foi utilizado como referência o ácido gálico nas concentrações de 100 a 3,125 µg/mL. A absorvância das amostras e da substância referência foi determinada em espectrofotômetro, sendo a leitura realizada no comprimento de onda de 726nm e os resultados expressos em termos de miligramas de ácido gálico equivalente (GAE) por grama de extrato em base seca (mg de AGE/g de extrato).

Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios foram calculados estatisticamente pela análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Os valores de P<0, 05 foram considerados significativos.

Resultados

Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

O ensaio DPPH[•] (2,2-difenil-2-picrilhidrazil) utiliza o radical livre disponível comercialmente para evidenciar a eficiência do antioxidante, contido no extrato vegetal, em remover o radical livre.

Nas figuras 1, 2 e 3 estão apresentados as porcentagem de redução dos extratos metanólicos obtidos nos três diferentes métodos de extração (extrator, ultra-som e maceração) em comparação com o padrão comercial quercetina.

Extratos metanólicos 25µg/mL

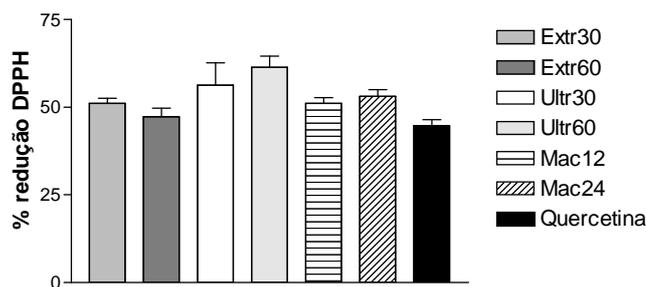


Figura 1 – Porcentagem de redução dos extratos metanólicos de *Alternanthera maritima* na concentração de 25 microgramas por mililitros e padrão quercetina.

Extratos metanólicos 50µg/mL

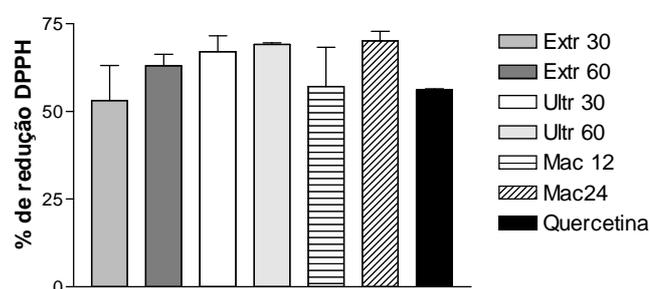


Figura 2 – Porcentagem de redução dos extratos metanólicos de *Alternanthera maritima* na concentração de 50 microgramas por mililitros e padrão quercetina.

Extratos metanólicos 100µg/mL

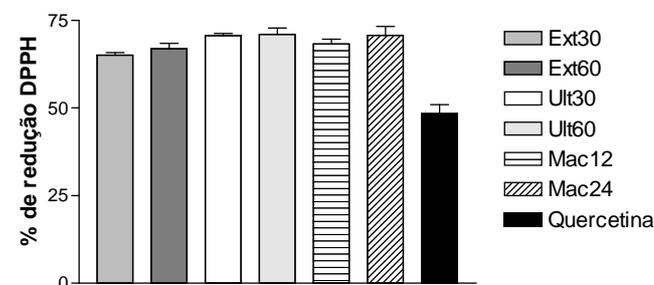


Figura 3 – Porcentagem de redução dos extratos metanólicos de *Alternanthera maritima* na concentração de 100microgramas por mililitros e padrão quercetina.

Quantificação dos fenólicos totais

A quantificação dos fenólicos totais solúveis foi avaliada pelo método colorimétrico Folin-Ciocalteu. A tabela 1 mostra a capacidade em acumular fenóis das amostras obtidas pelos três diferentes métodos de extração.

Tabela 1: Conteúdo de compostos fenólicos solúveis totais dos extratos padronizados de *Alternanthera maritima*

Amostra	Conteúdo fenólico ^a (GAE/g do extrato) ^b
Extratos metanólicos	
Extrator (30 minutos)	276,01
Extrator (60 minutos)	249,32
Ultra-som (30 minutos)	274,60
Ultra-som (60 minutos)	276,01
Maceração (12 horas)	312,46
Maceração (24 horas)	273,19

^a Média do ensaio em triplicata.

^b Dados de fenóis expressos como miligrama de ácido gálico equivalente por grama do extrato.

Discussão

Do ponto de vista biológico, pode-se definir antioxidantes como compostos que protegem sistemas biológicos contra os efeitos potencialmente danosos de processos ou reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou estruturas celulares (OGA, 2003).

A atividade antioxidante dos extratos obtidos de *A.maritima* foi comparada com o padrão quercetina e observou-se que os extratos metanólicos apresentam atividade seqüestradora do radical DPPH. Essa capacidade de redução do radical DPPH nas amostras de concentração de 50 µg/mL e 100µg/mL foi superior a 60%, com porcentagem de redução do radical DPPH superior àquela do controle positivo quercetina quando avaliados nas mesmas concentrações. Os extratos hexânicos e aquosos não apresentaram atividade antioxidante considerável. O emprego do ultra-som otimizou o processo de obtenção de extratos de *A.maritima* com atividade antioxidante superior quando comparados com os métodos de maceração (método clássico) e reator encamisado (emprega agitação). Isso se deve ao fato do ultra-som utilizar a vibração para facilitar a dissolução dos compostos presentes no material vegetal, pelo metanol (TOMA et al., 2001). Os extratos metanólicos obtidos pelo método de maceração apresentaram maior quantidade de compostos fenólicos, seguidos dos extratos metanólicos obtidos com o auxílio de ultra-som. Os valores de fenólicos solúveis totais estimados variam de 249,3 a 312,5mg AGE/g de extrato. Estes resultados estão de acordo com relatos da literatura que correlacionam a efetividade antioxidante de produtos naturais às substâncias fenólicas presentes na biomassa (HUANG et al., 2005).

Conclusão

Os resultados mostraram que a metodologia de extração empregando reator encamisado e a ultrassonificação otimizaram o processo quando comparados ao método clássico de maceração. Verificou-se também que variáveis como polaridade do solvente extrator e tempo podem influenciar diretamente o rendimento do processo de extração e conseqüentemente na atividade antioxidante destas preparações farmacêuticas. Os extratos metanólicos de *A. maritima* obtidos pelos três métodos de extração apresentaram promissora atividade antioxidante *in vitro* e esta atividade mostrou correlação com o conteúdo de fenólicos solúveis totais.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Josafá Carlos de Siqueira pela identificação do material vegetal e à FAPESP e ao CNPq pelo suporte financeiro.

Referências

- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chem.*, 53: 1841-1856, 2005.
- JACQUES, R.A.; FREITAS, L.S.; PÉREZ, V.F; DARIVA, C.; OLIVEIRA, A.P.; OLIVEIRA, J.V.; CARAMÃO, E.B. The use of ultrasound in the extraction of *Ilex paraguariensis* leaves: A comparison with maceration. *Ultrasonics Sonochemistry*
- OGA, S. Fundamentos de toxicologia. São Paulo, Atheneu, 2003, 474 páginas
- SALVADOR, M.J.; DIAS, D.A. Flavone C-glycosides from *Alternanthera maritima* (mart.) St. Hil. (Amaranthaceae). *Biochemical Systematic and Ecology*, v.32, p.107-110, 2004.
- SALVADOR, M.J.; ZUCCHI, O.L.A.D.; CANDIDO, R.C.; ITO, I.Y.; DIAS, D.A. In vitro antimicrobial activity of crude extracts and isolated constituents of *Alternanthera maritima* (Amaranthaceae). *Pharmaceutical Biology*, v.42, p.138-148, 2004.
- SCHINOR, E.C.; SALVADOR, M.J.; TURATTI, I.C.; ZUCCHI, O.L.A.D.; DIAS, D.A. Comparison of classical and ultrasound-assisted extractions of steroids and triterpenoids from three *Chresta* spp. *Ultrasonics Sonochemistry*, v.11, p. 415-421, 2004.
- SIQUEIRA, J.C. Importância alimentícia e medicinal das Amaranthaceae do Brasil. *Acta Biológica Leopoldence.*, v.9, p.5-22, 1987.
- SIMÕES, C.M.O.; GUERRA, M.P...[et al.]. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª ed. rev. ampl., primeira reimpressão – Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. 1102p.
- TOMA, M.; VINATORU, M.; PANIWNYK, L.; MASON, T.J. Investigation of the effects of ultrasound on vegetal tissues during solvent extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 8, p. 137-142, 2001.