

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO EXTRATO DE *Sechium edule* (CHUCHU)

Danielle Menezes Martins, Alex Sebastião Borges Paixão, Eduardo Frizzera Meira, Juliana Aparecida Severi.

Universidade Federal do Espírito Santo, Departamento de Farmácia e Nutrição, Alto Universitário, S/N, 29.500-000 - Guararema, Alegre/ES – Brasil, danielle.m.martins@edu.ufes.br, alexopaixao2@gmail.com, eduardo.meira@ufes.br, juseveri@yahoo.com.br

Resumo

O fruto de *Sechium edule*, popularmente conhecido como chuchu, exhibe notável versatilidade no âmbito do consumo nutricional, tendo a presença de compostos fitoquímicos, como flavonóides, ácidos fenólicos, cumarinas e carotenóides. Estes componentes mostram propriedades antioxidantes notáveis, despertando um considerável interesse para eventuais avanços no desenvolvimento de agentes farmacológicos relacionados com a capacidade antioxidante. Nesse sentido, objetivamos explorar o potencial e a concentração dessas substâncias, no qual destacam-se alguns métodos *in vitro*, que incluem DPPH, ABTS e Fenóis Totais. Os resultados, expressos em termos de absorbância possibilitaram o cálculo de Fenóis Totais, indicando uma concentração relativamente baixa. No que diz respeito ao teste DPPH calculou-se as concentrações efetivas de padrão e de amostra para capturar 50% do radical DPPH. Para o teste ABTS, os resultados foram semelhantes, mostrando que foi preciso uma maior concentração de extrato para capturar os radicais. Isso implica em uma atividade antioxidante *in vitro* em concentrações relativamente baixas para o extrato de *Sechium edule* (chuchu).

Palavras-chave: *Sechium edule*. DPPH. Fenóis Totais. ABTS. Antioxidante.

Área do Conhecimento: Farmácia - Farmacognosia

Introdução

O chuchuzeiro (*Sechium edule* Swartz) é uma planta da família *Cucurbitaceae*, originária do México e da América Central, com cultivo em países de clima quente, regiões tropicais e subtropicais (Leon, 1968). O chuchu está entre as dez hortaliças mais consumidas no Brasil, e entre os 30 produtos mais comercializados na CEAGESP (Companhia de Entrepósitos e Armazéns Gerais de São Paulo). As plantas constituem um vasto reservatório de substâncias químicas, tanto orgânicas quanto inorgânicas, apresentando diversos potenciais passíveis de serem explorados pelo ser humano. Frequentemente, são empregadas como complemento terapêutico em conjunto com tratamentos estabelecidos, seja por influência de práticas ancestrais ou por recomendação de familiares e pessoas próximas ao longo de várias gerações. (Machado *et al.*, 2014; Jutte *et al.*, 2017; Szerwieski *et al.*, 2017; Wegener, 2017).

No corpo humano, a atividade metabólica normal gera radicais livres constantemente. Essas moléculas produzidas *in vivo*, interagem com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias susceptíveis à oxidação, causando danos que podem contribuir para o envelhecimento e o desenvolvimento de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose e artrite reumatoide. A oxidação dos ácidos graxos insaturados presentes na membrana celular, é identificada como o processo oxidativo mais comum no organismo humano (Ramarathnam *et al.*, 1995). Para validar o uso popular de espécies medicinais, é necessário conduzir estudos científicos que avaliem a atividade farmacológica e toxicológica, fornecendo evidências sobre sua eficácia e segurança. No que diz respeito à avaliação da capacidade antioxidante de espécies vegetais, existem muitas metodologias disponíveis, incluindo ensaios que utilizam a captura de radicais, como o 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e o 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico), o ABTS.

Sendo assim, a avaliação da toxicidade e da capacidade antioxidante do extrato de *S. edule* pode contribuir para o uso seguro dessa espécie e fornecer informações científicas importantes para validar o uso terapêutico do chuchu.

Metodologia

Serão utilizados testes *in vitro* como Fenóis Totais, DPPH e ABTS para estipular o teor de fenóis totais e a capacidade de sequestro de radicais livres do extrato de *Sechium edule*.

Fenóis Totais

A realização do ensaio de fenóis totais foi baseada na metodologia descrita por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), adaptada para microplaca de 96 poços. Inicialmente, foram preparadas soluções de 5 mg/mL de extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Sechium edule*, 500 µg/mL de ácido gálico e 7% (m/v) de carbonato de sódio. Foram realizadas diluições seriadas com o auxílio de uma micropipeta para obter as concentrações de 100; 20; 4; 0,8; 0,16; 0,032; 0,0064 e 0,00128 µg/mL de ácido gálico e 1000; 200; 40; 8; 1,6; 0,32; 0,064 e 0,0128 µg/mL de extrato. Na primeira etapa, com uma micropipeta, foram adicionados 50 µL de água purificada em cada poço a ser utilizado e em triplicata, 12,5 µL de solução de ácido gálico nos poços A1, A2 e A3 e o extrato em A4, A5 e A6. A diluição seriada foi realizada a partir do padrão (ácido gálico) e do extrato, até chegar ao último poço. Na segunda etapa, 12,5 µL do reagente de Folin-Ciocalteu (2N) foram adicionados em todos os poços, homogeneizados e incubando por 5 minutos ao abrigo da luz. Ao término desse tempo, foram acrescidos na placa 125 µL de carbonato de sódio 7% em todos os poços usados, e a placa foi incubada por 90 minutos ao abrigo da luz. Por fim, realizou-se leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 750 nm a 27° C.

A partir dos resultados, montou-se no software Excel a curva padrão (gráfico de dispersão) correlacionando as absorbâncias com as diferentes diluições de ácido gálico. Por regressão linear, foram descobertas as concentrações de ácido gálico equivalentes à absorbância das diluições do extrato, por meio da fórmula: $FT = 1000 \times [F]/[A]$.

DPPH

O ensaio foi realizado de acordo com a metodologia de Blois (1958), modificada por Brand-Williams, Curvelier e Berset (1995) e adaptada para microplaca. Inicialmente foram preparadas soluções de 17,18 µg/mL de ácido gálico, de 1.000 µg/mL de extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *S. edule* e de 40 µg/mL de DPPH, utilizando-se metanol 80% como solvente. Na primeira etapa, com o auxílio de uma micropipeta adequada, foram adicionados: 100 µL de metanol 80% em todos os poços a serem usados, e depois, em triplicata, 100 µL da solução de ácido gálico (padrão) nos poços A1, A2 e A3 e o extrato nos poços A4, A5 e A6. Na segunda etapa, foram feitas diluições seriadas do padrão e do extrato, usando-se uma micropipeta automática, para a obtenção das concentrações 8,59; 4,29; 2,14; 1,07; 0,53; 0,268 e 0,1342 µg/mL para o ácido gálico e 500, 250, 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,9 µg/mL para o extrato. Em seguida, os 100 µL do último poço foram desprezados e adicionados 200 µL da solução de DPPH (40 µg/mL) em todos os poços contendo amostra e padrão. Ao término das diluições, a placa foi incubada ao abrigo de luz por 30 minutos e teve a leitura das absorbâncias em espectrofotômetro no comprimento de onda de 517 nm.

A partir dos resultados, montou-se no software Excel a curva padrão (gráfico de dispersão) relacionando a porcentagem de captura de radicais livres com as diferentes concentrações de extrato ou padrão. A partir da equação de regressão linear obtida, pôde-se calcular a CE50, que representa a quantidade necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50%, por meio da seguinte equação: $\% CRL = 100 \times [(A0 - A1)/A0]$.

ABTS

O presente ensaio baseou-se na metodologia descrita por Re e colaboradores (1999), adaptada para microplaca de 96 poços. Inicialmente preparou-se as soluções de 7 mM de ABTS, de 2,45 mM de persulfato de potássio, de 1.000 µg/mL de extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *Sechium edule* de 1.000 µg/mL de ácido gálico e de 200 µM de trolox.

Para a formação do radical, misturou-se quantidades iguais de ABTS 7 mM e persulfato de potássio 2,45 mM, deixando-os reagirem por 16 horas no escuro. Antes de usar o radical ABTS, sua absorbância

em 734 nm foi ajustada para aproximadamente 0,700, diluindo-se com metanol 80% numa proporção de 3,75% (v/v).

A partir da solução de estoque de trolox, preparou-se soluções de 32,5; 27,5; 22,5; 17,5; 12,5; 7,5; 5 e 2,5 µg/mL. Foram pipetadas 25 µL dessas soluções para os poços da microplaca em triplicata. Em seguida, adicionou-se 25 µL de metanol 80% em todos os outros poços a serem utilizados e pipetou-se 25 µL da solução de ácido gálico ou de extrato em diferentes poços em triplicata. Por fim, realizou-se diluição seriada das soluções de ácido gálico e de extrato, utilizando-se micropipeta para obter as concentrações desejadas.

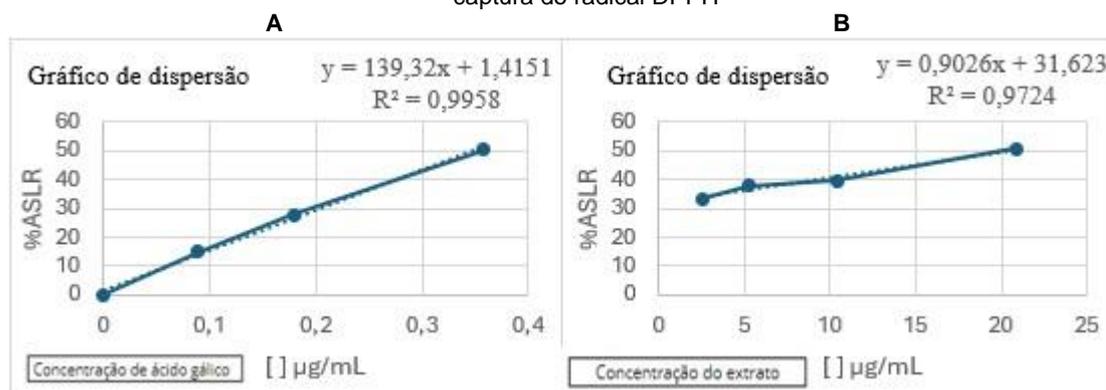
Adicionou-se 175 µL do ABTS diluído em todos os poços contendo trolox, ácido gálico e extrato e em mais três poços contendo somente metanol 80%. As concentrações finais de trolox foram de aproximadamente 4,06; 3,43; 2,81; 2,18; 1,56; 0,93; 0,62 e 0,31 µg/mL, enquanto as de extrato foram de 62,5; 31,25; 15,62; 7,8; 3,9; 1,9; 0,97 e 0,48 µg/mL e as de ácido gálico 56,5; 28,25; 14,13; 7,06; 3,53; 1,77; 0,88; 0,44; 0,22; 0,11; 0,055; 0,028; e 0,014 µg/mL. Incubou-se no escuro por 6 minutos e leu-se a absorbância em espectrofotômetro a 734 nm. Procedeu-se com os cálculos utilizando-se a mesma fórmula usada para calcular a porcentagem de captura de radicais livres no ensaio DPPH.

Montou-se, no software Excel, os gráficos de dispersão relacionando a porcentagem de captura de radicais livres com as diferentes concentrações de extrato, ácido gálico e trolox. A partir da equação de regressão linear obtida, pôde-se calcular a CE50, que representa a quantidade necessária para reduzir a concentração inicial de radical ABTS em 50%.

Resultados

Os resultados dos testes ABTS e DPPH são fornecidos em termos de CE50, ou seja, o tanto de antioxidante necessário para capturar 50% dos radicais presentes. Após a leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 517 nm para o DPPH, calculou-se a CE50 e montou-se os gráficos do padrão (A) e amostra (B), conforme indicado na figura 1.

Figura 1. Correlação linear entre diferentes concentrações de ácido gálico (A) e extrato (B), e porcentagem de captura do radical DPPH

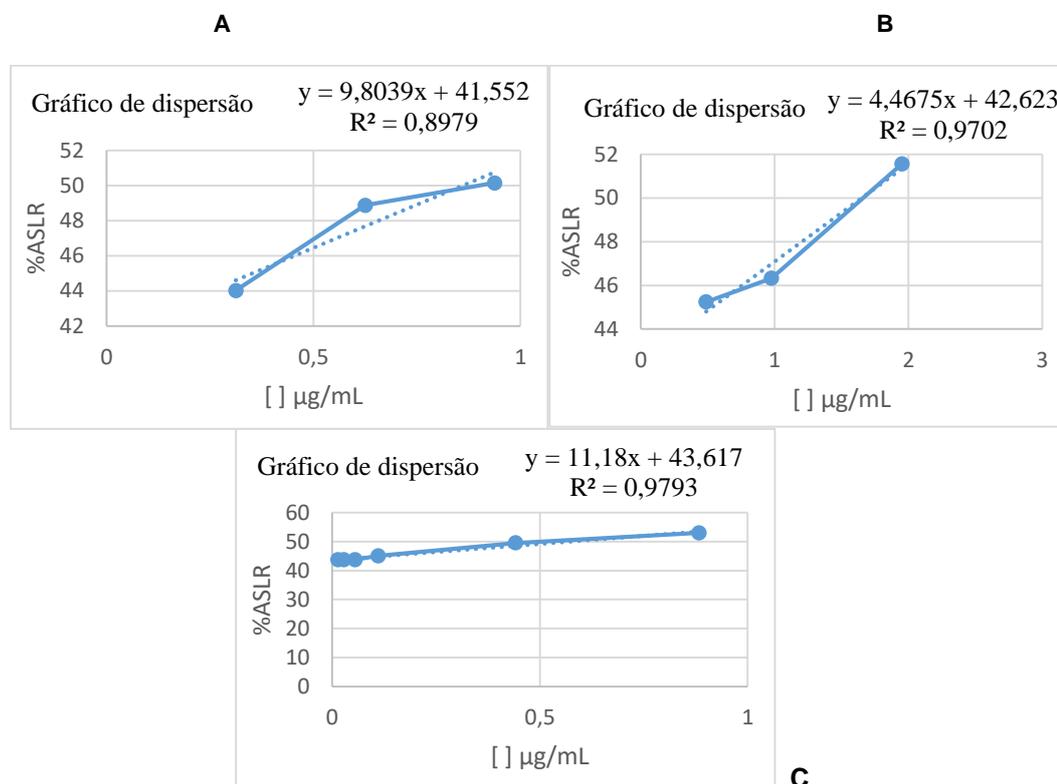


Fonte: os autores (2024).

A partir das equações de regressão linear obtidas, calculou-se as concentrações efetivas de padrão e de amostra para capturar 50% do radical DPPH. A CE50 do ácido gálico foi de aproximadamente 0,34 µg/mL. Já para o extrato das folhas de *S. edule*, a CE50 obtida foi de 20,36 µg/mL.

Para o teste ABTS, após a leitura das absorbâncias no comprimento de onda de 734, calculou-se a CE50 e montou-se os gráficos dos padrões trolox (A), ácido gálico (B) e amostra (C) conforme indicado na figura 2.

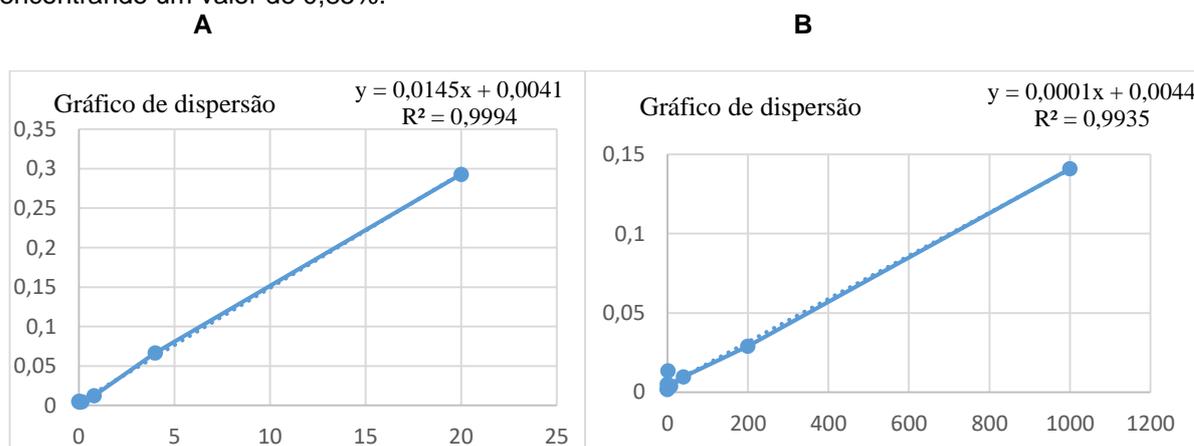
Figura 2. Correlação linear entre diferentes concentrações de trolox (A), extrato (B) e ácido gálico (C), e porcentagem de captura do radical ABTS



Fonte: os autores (2024)

A partir das equações de regressão linear obtidas, calculou-se as concentrações efetivas de padrão e de amostra para capturar 50% do radical ABTS. A CE50 foi estimada em aproximadamente 0,86 $\mu\text{g/mL}$ para o trolox e 0,57 $\mu\text{g/mL}$ para o ácido gálico. Já para o extrato bruto hidroalcoólico das folhas de *S. edule*, a CE50 obtida foi de 1,65 $\mu\text{g/mL}$.

Por fim, no ensaio de Fenóis Totais, após a leitura das absorvâncias em um comprimento de onda de 734nm, montou-se o gráfico de dispersão do padrão ácido gálico (A) e do extrato (B), conforme identificado na figura 3. Com esses resultados, fez-se o cálculo do teor estimado de fenóis do extrato, encontrando um valor de 0,85%.



Fonte: os autores (2024)

Discussão

Plantas medicinais são uma fonte crucial de antioxidantes, como compostos fenólicos, que desempenham um papel essencial na prevenção de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares e câncer. (Barbosa *et al.*, 2010; Simões *et al.*, 2017). A avaliação da capacidade antioxidante de extratos vegetais é vital, utilizando métodos *in vitro* como DPPH e ABTS. (Chanda; Dave, 2009).

Dessa forma, o resultado obtido no ensaio de Fenóis Totais realizado no presente estudo, junto aos relatos da literatura sobre a composição fitoquímica dessa espécie, sugerem que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Sechium edule* apresentam uma concentração baixa de fenóis totais, principalmente quando comparado a outros extratos. Em um estudo realizado por Fiuza e colaboradores (2008), um extrato hidroalcoólico das folhas de *E. uniflora* obteve um teor de Fenóis Totais de 9,22%. A sazonalidade, a composição do solo e a exposição à luz solar são fatores que podem influenciar a variabilidade dos teores de fenóis e a capacidade antioxidante. (Santos *et al.*, 2011; Vargas, 2015).

Já para os testes DPPH e ABTS, os resultados são expressos em CE50. Conforme observado no presente trabalho, a quantidade de captura dos radicais dos dois testes foi relativamente baixa, o que necessita de uma grande concentração de extrato para capturar os radicais quando comparado aos padrões. Em um ensaio realizado por Melo e colaboradores (2006), foi avaliada a capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas por meio do teste DPPH, dentre as quais estavam couve-flor, espinafre, cenoura, chuchu. Esses resultados sugerem uma eficácia limitada do extrato na neutralização de radicais livres, exigindo altas concentrações para obter um efeito antioxidante significativo.

A ausência de padronização nos resultados dos testes DPPH, conforme relatado na literatura, dificulta comparações diretas entre diferentes estudos e amostras, reforçando a necessidade de métodos mais uniformes para avaliação da atividade antioxidante. (Deng *et al.*, 2011).

Conclusão

Dessa forma, conclui-se que dentro das condições esperadas, nos testes ABTS e DPPH é preciso uma grande quantidade de extrato para capturar os radicais livres em relação ao ácido gálico e trolox, e que o teor de Fenóis Totais também é baixo. Isso nos permite dizer, que o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. edule* apresenta uma capacidade antioxidante relativamente baixa quando comparada ao padrão.

Referências

- BARBOSA, K. B. F. *et al.* Oxidative stress: concept, implications and modulating factors. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- DE OLIVEIRA LDL, De Carvalho MV, Melo L. Health promoting and sensory properties of phenolic compounds in food. **Rev Ceres**. 2014;61:764–79.
- DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chemistry**, v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011.
- FIUZA, T. S. *et al.* Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 1-11, 2008.

JÜTTE, Robert *et al.* Herbal medicinal products—Evidence and tradition from a historical perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 207, p. 220-225, Jul. 2017.

LEON, J. Fundamentos botanicos de los cultivos tropicales. Primera Edicion. San José, Costa Rica: **Editorial IICA**, 487p., 1968.

MACHADO, Helen L. *et al.* Research and extension activities in herbal medicine developed by Rede FitoCerrado: rational use of medicinal plants by the elderly in Uberlândia-MG. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 527-533, jul-set. 2014.

MELO, E. A. *et al.* Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 26(3): 639-644, set. 2006.

RAMARATHNAM, N.; OSAWA, T.; OCHI, H.; KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends Food Sci. Technol.**, v. 6, n. 3, p. 75-82, 1995.

RE, R. *et al.* Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

SANTOS, R. M. *et al.* Seasonal variation in the phenol content of *Eugenia uniflora* L. leaves. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 85-89, 2011.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org). Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: **Artmed**, 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHORFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in enzymology**, v. 299, p. 152-177, 1999.

SZERWIESKI, Laura L.D. *et al.* Uso de plantas medicinais por idosos da atenção primária. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, Goiânia, v. 19, p. a04, 2017.

WEGENER, Tancred. Patterns and Trends in the Use of Herbal Products, Herbal Medicine and Herbal Medicinal Products. **International Journal of Complementary and Alternative Medicine, Edmond**, v. 9, n. 6, p. 00317, Dec. 2017.

Agradecimentos

A Universidade Federal do Espírito Santo, Campus Alegre, nas dependências dos quais os experimentos ocorreram, bem como o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES).