

## Avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais da espécie *Baccharis punctulata*

## Evaluation of antioxidant activity of plant extracts of the species *Baccharis punctulata*

### RESUMO

**Jaqueline Rosa dos Santos Refati**  
jaquel\_rosa@hotmail.com  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Toledo, Paraná, Brasil.

**Jociani Ascari**  
jascari@utfpr.edu.br  
Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Santa Helena, Paraná, Brasil.

Objetivou-se avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais da espécie *Baccharis punctulata* obtidos por meio de extração ácido-base, com uso de solvente clorofórmio na primeira extração e na seguinte, com meio básico, o acetato de etila. O método utilizado para realizar análise foi o sequestro de radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), em micro volumes, com leitura em leito de microplacas. Fez-se uso do ácido ascórbico como padrão. Determinou-se o percentual de inibição do DPPH, e com a equação da reta padrão do ácido ascórbico, calculou-se a atividade antioxidante da amostra do extrato pelo ensaio DPPH. A partir do resultado, expresso em  $\mu\text{g}$  de ácido ascórbico equivalente por mL de amostra ( $\mu\text{g}$  AAE/mL), pôde-se inferir a atividade antioxidante decorrente de presença de flavonoides e ácidos cafeoilquínicos. Além disso, pode-se concluir a relativa vantagem em se utilizar micro volumes de amostras e reagentes, gerando com isso menos resíduo.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Baccharis*. Antioxidante. Compostos fenólicos.

**Recebido:** 19 ago. 2019.

**Aprovado:** 01 out. 2019.

**Direito autoral:** Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



### ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antioxidant activity of plant extracts of *Baccharis punctulata* obtained by acid-base extraction, using chloroform solvent in the first extraction and the following, with basic medium, ethyl acetate. The method used to perform the analysis was the sequestration of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical in microliter bed reading. Ascorbic acid was used as standard. The percentage of DPPH inhibition was determined, and with the equation of the standard ascorbic acid straight line, the antioxidant activity of the extract sample was calculated by the DPPH assay. From the result, expressed in  $\mu\text{g}$  of ascorbic acid equivalent per mL of sample ( $\mu\text{g}$  AAE / mL), it was possible to infer the antioxidant activity due to the presence of flavonoids and caffeoylquinic acids. In addition, the relative advantage of using micro volumes of samples and reagents can be concluded, thereby generating less waste.

**KEYWORDS:** *Baccharis*. Antioxidant. Phenolic compounds

## INTRODUÇÃO

Os antioxidantes são objeto de estudos em pesquisas para tratamento de diversas doenças (Moraes, 2009) além de sua aplicação, como por exemplo, para fins cosméticos (Castro, 2014). As plantas apresentam uma pluralidade de metabolitos secundários com caráter antioxidante. Entre eles é possível citar os compostos fenólicos, tais como ácidos cafeoilquínicos e flavonoides (Moraes, 2009). O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais da espécie *Baccharis punctulata* pelo ensaio DPPH, tendo resultados expressos em micrograma ácido ascórbico equivalente por mililitro de amostra analisada, uma vez que o ácido ascórbico foi a substância utilizada como padrão antioxidante.

## MATERIAL E METODOS

Extratos foram obtidos por extração ácido-base com solvente clorofórmio na primeira extração. Na seguinte, com meio básico, solvente acetato de etila. Com base no meio em que foram extraídas, as amostras receberam os seguintes códigos: PE01, extraída com clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>); PE02 extraída com acetato de etila (AcOEt), em pH=8; PE03 refere-se a amostra extraída com acetato de etila e metanol 3:1 também com pH8 e a amostra P04 obtida através da extração com acetato de etila em pH=4.

A metodologia consistiu em reagir por 30 minutos e em ambiente escuro, diferentes concentrações de amostras de extrato em 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) seguindo método de Granato (2015) com modificações. Posteriormente mediu-se a diminuição da absorbância do DPPH a um comprimento de onda de 517nm em um leitor de microplacas de 96 poços. Metanol foi usado como controle e a solução de DPPH sem amostras como branco. A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\%inibiçãoDPPH = \left(1 - \frac{amostraA517}{brancoA517}\right) \times 100$$

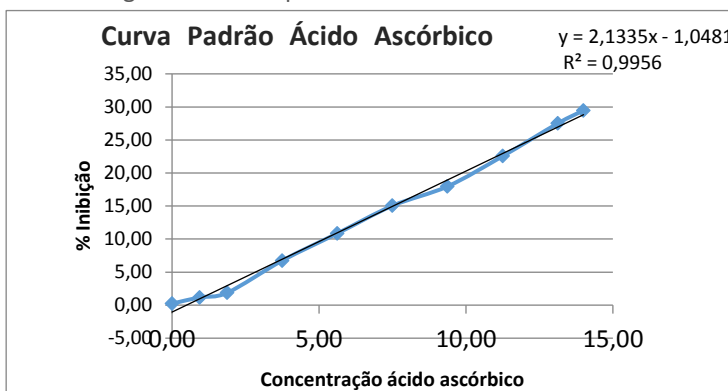
A partir da equação da reta gerada pela curva analítica do ácido ascórbico (AA) utilizado com padrão, calculou-se a atividade antioxidante das amostras pelo ensaio DPPH, expressa em µg de AA equivalente por mL de amostra (µg AAE/mL). Os experimentos foram realizados em triplicata e a leitura da absorbância foi medida em 517nm em leitor de microplacas LMR-96 da Loccus.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a padronização do teste antioxidante foi necessário o ajuste das concentrações das amostras e padrão, assim como da concentração dos reagentes utilizados e tempo de reação, com base na metodologia de Ganato, (2015). A absorbância da porcentagem de inibição do radical DPPH pelo ácido ascórbico foi relacionada com concentração do ácido ascórbico, resultando na

curva analítica de função  $y = 2,1335x - 1,0481$  e  $R^2 = 0,9956$ , representada na Figura 1:

Figura 1 – Curva padrão do ácido ascórbico em DPPH

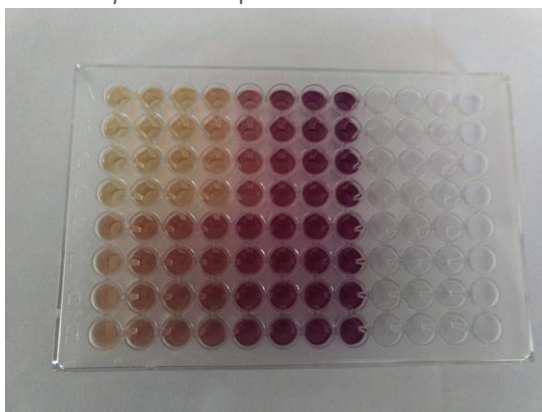


Fonte: Produção do autor

A partir dos extratos PE01, PE02, PE03 e PE04, cuja obtenção está descrita na metodologia já apresentada, preparou-se uma solução metanólica com as concentrações variando de 5,0µg/mL a 80µg/mL. Após cada leitura, calculou-se a partir dos valores de absorbância de cada amostra a % de inibição do radical DPPH (Figura 2). Para o cálculo da atividade antioxidante dos extratos se utilizou a equação da reta gerada pela curva analítica com os valores de porcentagem de inibição do radical DPPH• de concentrações seriadas de ácido ascórbico Figura 1.

O cálculo da atividade antioxidante se deu com a concentração no qual a % de inibição do DPPH ficou entre 20 e 50%. A atividade antioxidante dos extratos fenólicos foi expressa em µg de AA equivalente por mL de amostra (µg AAE/mL). Com isso, quanto maior o valor equivalente ao AA (AE), mais forte é a capacidade antioxidante do extrato fenólico analisado. A Figura 2 mostra o resultado visual da análise, onde é possível notar que houve variação da cor violeta para amarelo quando ocorreu a redução do radical DPPH pelos extratos analisados.

Figura 2 – Determinação de atividade antioxidante de extratos fenólicos das folhas de *Baccharis punctulata* pelo método DPPH



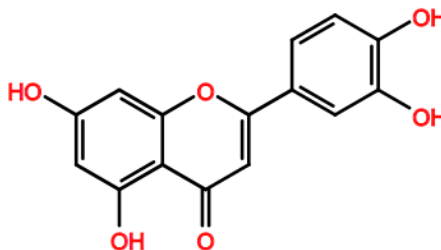
Fonte: Produção do autor

Os resultados analíticos apresentados para atividade antioxidantes dos extratos, expressos em função de ácido ascórbico, mostram que quanto maior a atividade antioxidante em função de ácido ascórbico, maior é a capacidade antioxidante da amostra analisada. Sendo assim, observou-se que a amostra P01 na maior concentração testada 80 µg/mL apresentou 17,34 % de inibição do DPPH, sendo que a atividade antioxidante foi de 1,76 µg AAE/mL, as demais amostras P02, P03 e P04 tiveram % de inibição do DPPH acima de 20% já na concentração de 40µg/mL. Na concentração de 40ug/mL, a amostra P02 apresentou 21,95% de inibição do DPPH e atividade antioxidante de 1,91µg AAE/mL, a amostra P03 apresentou 29,26% de inibição do DPPH e atividade antioxidante de 2,54µg AAE/mL e a amostra P04 apresentou 22,10% de inibição do DPPH e atividade antioxidante de 1,93 µg AAE/mL. Assim, os resultados revelaram que PE01 apresentou menor capacidade antioxidante frente ao DPPH, enquanto que para as amostras PE02, PE03 e PE04 os resultados foram maiores.

De acordo com Granato e Nunes (2016), observa-se que em uma extração utilizando CHCl<sub>3</sub> (Amostra P01) se obtém extrato que poderá conter proporções variadas de gorduras, diterpenos e triterpenos. O extrato aquoso resultante da extração com CHCl<sub>3</sub> foi basificado até pH levemente básico (8,0 a 8,5) e extraído num funil de separação com porções acetato de etila. O extrato P02 “AcOEt/pH8” obtido, poderá conter flavonoides do tipo 2 (Figura 3). Uma nova extração do extrato aquoso resultante extraíndo-se porções de acetato de etila/metanol (2:1), extrato P03 “AcOEt/MeOH/pH8” poderá conter os flavonoides do tipo 3 (Figura 4).

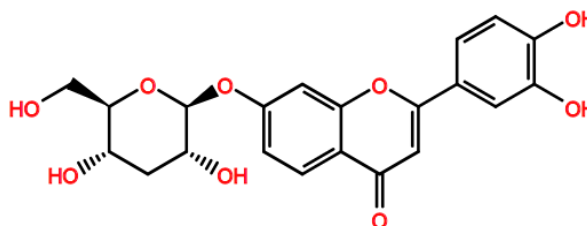
Finalmente após a acidificação do extrato aquoso e extração com porções de acetato de etila é possível separar outra classe de compostos fenólicos, que inclui os ácidos hidroxicinâmicos e seus glicosídeos, ácidos mono-, di- e tricafeoilquínicos (Figura 5). Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos fenólicos comuns em plantas (cafeico, ferúlico, cumárico) tanto livres quanto na forma de ésteres do ácido quínico ou de açúcares.

Figura 3 – 5,7,3',4'-tetraidroxiflavona (tipo 2, polaridade média)



Fonte: Granato e Silva, 2016.

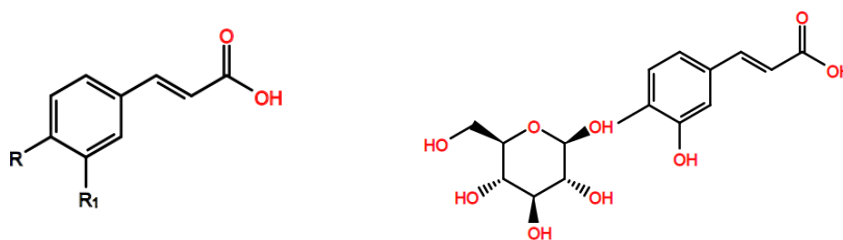
Figura 4 – 5,3',4'-trihidroxiflavona-7-O-β-glucopiranosídeo (tipo 3, polaridade alta)



Fonte: Granato e Silva, 2016.

Página | 5

Figura 5 – Ácidos hidroxicinâmicos livres e na forma de glicosídeos



Ácido cinâmico, R, R1=H

Ácido caféico, R,R1=OH

Ácido felúrico, R=OH, R=MeO

Ácido p-cumárico, R=OH, R1=H

Ácido caféico  $\beta$ -glucopiranosídeo

Fonte: Granato e Silva, 2016

Baseado no exposto acima referente ao processo de extração de compostos fenólicos e a atividade antioxidante observada, infere-se que a maior atividade antioxidante notada nas amostras P02, P03 e P04 são decorrentes da presença de flavonoides e ácidos cafeoilquínicos. A eficácia do método de determinação de atividade antioxidante de flavonoides e ácidos cafeoilquínicos, o DPPH, coincide com vários estudos. A título de exemplo é possível citar de Araujo (2015) que obteve diferentes porcentagens de inibição de quercitina e rutina em extratos de *Baccharis trimera* e Murad (2013), que demonstrou atividade antioxidante do ácido 5-cafeoilquínico sobre crescimento e captação celular em células de adenocarcinoma de cólon humano.

Os resultados ainda indicam a teoria de que, a depender do meio em que se obteve o extrato, o tipo de solvente utilizado (polar ou apolar), isso irá influenciar nos teores de fenóis e flavonoides e como consequência na atividade antioxidante de amostras de *Baccharis* (Moreira, 2012). Tal conceito ficou evidente no meio em que o solvente era apolar, houve menor atividade antioxidante pela metodologia utilizada, foi o caso da amostra PE01 extraída em clorofórmio que é um solvente apolar. Quando se compara essa observação com o resultado da avaliação da atividade antioxidante da mesma amostra PE04, em DPPH, percebe-se a coerência, pois em microplaca, foi para esta amostra que, no ponto com a maior concentração, se obteve a maior atividade antioxidante total equivalente ácido ascórbico.

## CONCLUSÃO

Os resultados obtidos comprovaram a ocorrência de compostos com propriedades fenólicas em amostras de extratos de *Baccharis punctulata*. A evidência de tal propriedade se deu quando houve variação de cor do radical DPPH (violeta para amarelo pálido) indicando assim que o mesmo reagiu com os microvolumes das amostras. Além disso, a análise ter sido realizada por espectrofotometria em leitor de microplacas possibilitou o trabalho com microvolumes de amostras e reagentes e consequentemente a geração mínima de resíduos.

## REFERÊNCIAS

DE MORAIS S. M.; CAVALCANTI, E. S. B; COSTA, S. M. O; AGUIAR, L. A. **Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil.** Revista Brasileira de Farmacologia. Vol. 19. N.1b. João Pessoa, março de 2009.

DE CASTRO, A. C. C. M. **Avaliação do perfil químico de fenólicos, do potencial antioxidante e fotoprotetor da torta de semente de coffea arábica I. (rubiaceae).** 2014. F. 104. (Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Câmpus de Araraquara. Araraquara-SP.

GRANATO, D.; KOOT, A.; SCHNITZLER, E.; VAN RUTH, S.M. **Autenticação de origem geográfica e sistema de colheita de sucos de uva por compostos fenólicos e atividade antioxidante utilizando quimiometria.** Journal of Food Science. V. 80. Nº 3, p. 584 – 593. Ano 2015.

GRANATO, D; NUNES, D. S. **Análises químicas, propriedades funcionais e controle da qualidade de alimentos e bebidas – Uma Abordagem Teórico-Prática.** Edição 01. Ano: 2016.

DE ARAÚJO, G. R. **Baccharis trimera inibe a produção de espécies reativas de oxigênio através da via de sinalização da PKC e NADPH oxidase em células SK Hep-1.** 2015. F. 122. (Título de Doutor em Ciências Biológicas). Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto. Minas Gerais.

MOREIRA, V. E; GASPARETTO, C. M.; CHIBLI, L. A.; VIERIE, G. D.; DE SOUSA, O. V. **Teores de fenóis totais e flavonoides e avaliação da atividade antioxidante de Baccharis trimera (Less.) DC. (Asteraceae).** HU Revista. Juiz de Fora, v. 38, n. 3 e 4, p. 223-229, jul./dez. 2012.

MURAD, L. D. **Efeitos dos ácidos cafeico e 5-cafeoilquínico sobre o crescimento e captação celular em células de adenocarcinoma de cólon humano.** 2013. F. 119. (Título de Mestre em Alimentos e Nutrição). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro.