

***Baccharis vulneraria*: descrição química e bioatividade de extratos fenólicos**

***Baccharis vulneraria*: chemical description and bioactivity of phenolic extracts**

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

Foi realizada a caracterização química e avaliação da atividade antioxidante dos extratos fenólicos das folhas da espécie *Baccharis vulneraria*. Os extratos vegetais foram obtidos por meio de extração ácido-base, utilizando-se a sequência de solventes: clorofórmio, acetato de etila em meio básico, acetato de etila e metanol (1:1) em meio básico e acetato de etila em meio ácido. A caracterização química foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada utilizando como revelador cloreto férrico, resultando em teste positivo para fenólicos. Quantificou-se os compostos fenólicos (Folin-ciocalteu) e flavonóides totais (Cloreto de alumínio) e determinou-se a atividade antioxidante pelo método de sequestro de radical 2,2-difenil1-picril-hidrazil. Todas as análises foram realizadas em leitor de microplacas, minimizando o uso de reagentes e extratos. Observou-se neste estudo que os diferentes extratos possuem diferentes quantidades de compostos fenólicos e flavonóides em sua composição química, corroborando com a atividade antioxidante apresentada pelos extratos analisados.

PALAVRAS-CHAVE: Antioxidantes. Flavonóides. Fenóis.

ABSTRACT

Chemical characterization and evaluation of the antioxidant activity of the phenolic extracts of the leaves of the *Baccharis vulneraria* species were carried out. The plant extracts were obtained by acid-base extraction, using the solvent sequence: chloroform, ethyl acetate in basic medium, ethyl acetate and methanol (1: 1) in basic medium and ethyl acetate in acid medium. Chemical characterization was performed by Thin Layer Chromatography using ferric chloride as a developer, resulting in a positive test for phenolics. The phenolic compounds (Folin-ciocalteu) and total flavonoids (Aluminum chloride) were quantified and the antioxidant activity was determined by the sequestration method of 2,2-diphenyl1-picryl-hydrazyl radical. All analyzes were performed in a microplate reader, minimizing the use of reagents and extracts. It was observed in this study that the different extracts have different amounts of phenolic and flavonoid compounds in their chemical composition, corroborating the antioxidant activity presented by the analyzed extracts.

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 01 out. 2020.

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



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 flavonóides (MORAES, 2009).

A espécie *Baccharis vulneraria* encontra-se distribuída em países como Brasil, Uruguai e Argentina. No Brasil sua ocorrência se dá nas Regiões Sudeste e Sul (HEIDEN *et al*, 2012) sendo no Rio Grande do Sul conhecida popularmente como Erva-santa (FLORA DIGITAL, 2009). Esta espécie não apresenta, até o presente momento, estudos sobre a composição química e bioatividade.

Existem vários métodos para se determinar a presença de antioxidantes em extratos de plantas, como por exemplo: a técnica sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), que é considerado um método fácil, preciso e reprodutível na avaliação da atividade antioxidante para determinação de flavonóides (GRANATO *et al*, 2016); o método de compostos fenólicos totais Folin-Ciocalteu, que tem como princípio é transferência de elétrons; ainda, por meio de transferência de elétrons, o método de Flavonóides Totais, que embora, assim como Folin-Ciocalteu ocorra reação de complexação com transferência de elétrons, a vantagem deste sobre o anterior é este ser mais seletivo, não reagindo com todas as substâncias fenólicas (GRANATO *et al*, 2016).

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais da espécie *Baccharis vulneraria*, obtidos por rotaevaporação (em trabalho anterior) e a partir daí, apresentar a caracterização química evidenciadas por CCD e os seus compostos antioxidantes.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras da espécie *Baccharis vulneraria* foram coletadas na cidade de São Francisco de Paula – RS e a identificação realizada pelo botânico Dr. Gustavo Heiden. Alunos do grupo de pesquisa realizaram extração ácido-base das folhas, utilizando como solvente Clorofórmio (CHCl_3), em seguida basificaram e extraíram com Acetato de etila (AcOEt) e com Acetato de etila/Metanol (AcOEt/MeOH) 1:1, por fim acidificaram e extraíram com AcOEt. Os extratos foram codificados da seguinte forma: BV01 (CHCl_3), BV02 (AcOEt em pH=8), BV03 (AcOEt/MeOH 1:1 em pH=8) e a amostra BV04 (AcOEt em pH=4).

De posse dos extratos, iniciou-se o trabalho de análise qualitativa em CCD por ultravioleta visível. A fase estacionária utilizada foi sílica gel e as fase móvel foi AcOEt:MeOH:H₂O (8,5:1,0:0,5). Alíquota dos extratos foram diluídos separadamente em metanol, e com o auxílio de um capilar, depositados na cromatoplaca. As cromatoplacas foram eluídas com a fase móvel supracitada, revelada com solução FeCl_3 e aquecida em aproximadamente 110°C para que ocorresse a ativação vista a olho nu.

A determinação de atividade antioxidante (AA) foi calculada com base na equação (1) aplicando-se dados da curva do padrão ácido ascórbico em DPPH, com leitura no comprimento de onda de 517nm. O resultado foi expresso em miligrama de ácido ascórbico equivalente por mL de amostra ($\mu\text{g AA mL}^{-1}$). Sendo: AA atividade antioxidante frente ao radical DPPH em miligrama de ácido ascórbico equivalente por mL; a e b o coeficiente angular e linear da equação da reta padrão respectivamente.

$$AA = \{[a \times (\text{absorbância amostra} - \text{banco})] + b\} \times \text{fator de diluição} \quad (1)$$

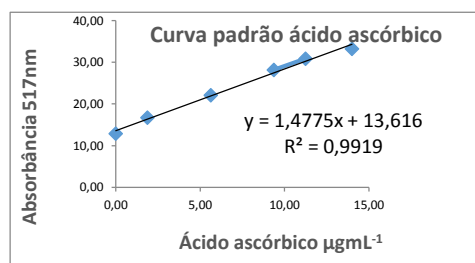
A determinação de compostos fenólicos totais foi realizada pelo método Folin-Ciocalteu e realizou-se a leitura de absorbância do padrão e no comprimento de onda de 735nm. Para a quantificação dos flavonóides totais utilizou-se como padrão a Quercetina e realizou-se a leitura no comprimento de onda de 515nm. Por meio da equação (2), realizou-se o cálculo. As análises, para todos os métodos citados, foram realizadas em triplicata, em uma leitora de microplacas da LMR Loccus, de 96 poços.

$$\text{Flavonoides totais (mgL}^{-1}) = [(a * \text{Abs}) + b * \text{fator de diluição}] \quad (2)$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de atividade antioxidante apresentou curva padrão e equação da reta da Figura 1. O resultado da análise dos extratos são apresentados na Tabela 1.

Figura 1 – Curva padrão de ácido ascórbico em DPPH



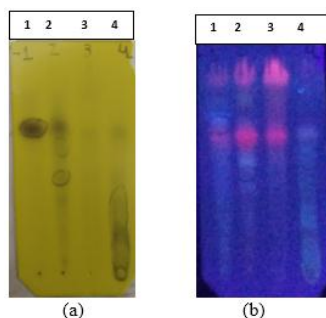
Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 1 – Resultado atividade antioxidante

Extratos	[] $\mu\text{g mL}^{-1}$	AA ($\mu\text{g AA mL}^{-1}$)
BV01	30,00	20,13
BV02	30,00	22,69
BV03	131,25	21,56
BV04	131,25	34,10

Fonte: Autoria própria (2020)

Figura 2 – Cromatoplaça das amostras BV01, BV02, BV03 e BV04



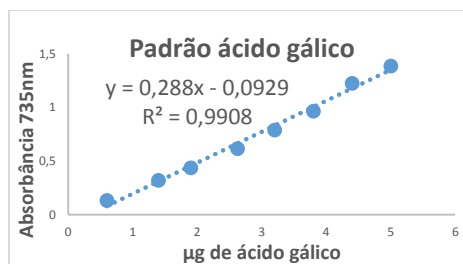
Fonte: Autoria própria (2020)

Os resultados da Tabela 1 corroboram com o efeito notado previamente na cromatografia de camada delgada (CCD) dos extratos (Figura 2), pois o revelador cloreto de ferro (FeCl_3) utilizado na mesma, é específico para compostos fenólicos e por isso deixou em evidência a presença desses compostos.

Os extratos analisados apresentaram resultado positivo para atividade antioxidantes, o que condiz com o que já foi observado pelo método DPPH em outras espécies de *Baccharis*, como mostra o trabalho de Oliveira (2016, apud SARTOR, 2013) para extrato metanólico de *B. dentata* (DE OLIVEIRA, 2016).

Os compostos fenólicos totais foram quantificados pelo método Folin-Ciocalteu. A equação resultante da reta (Figura 3) estabelece a relação entre absorbância do ácido gálico e a massa deste padrão. E foi utilizada para se determinar a quantidade de fenóis no todo da reação que ocorreu na microplaca, a quantidade de fenóis no extrato, bem como a quantidade de fenóis totais. Na Tabela 2, apresenta-se o resultado da quantidade de compostos fenólicos totais por grama de extrato analisado.

Figura 3 – Curva padrão ácido gálico



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 2 – Quantificação de fenólicos totais

Extrato	[] $\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa (μg)	Absorbância	Fenólicos totais (mg g^{-1})
BV01	100	2,5	0,13	12,38
BV02	100	2,5	0,12	11,83
BV03	100	2,5	0,07	9,05

Extrato	[] $\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa (μg)	Absorbância	Fenólicos totais (mg g^{-1})
BV04	100	2,5	0,12	11,83

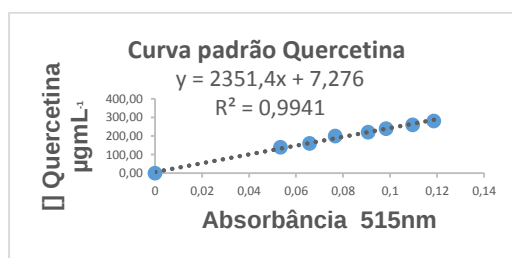
Fonte: Autoria própria (2020)

O resultado apresentado condiz com estudos que mostram a presença de compostos fenólicos em diferentes espécies de *Baccharis*, como por exemplo flavonóides em *Baccharis trimera* relatado por Claudino (2013, apud HERZ, 1997).

Utilizou-se a Equação 2 e com equação da reta da Figura 5, determinou-se a concentração de flavonóides totais, a partir de extratos em $200\mu\text{g mL}^{-1}$, cujo resultados são apresentados na Tabela 3.

Onde: a = coeficiente angular da curva padrão; Abs = absorbância do extrato; e b = coeficiente angular da equação da curva padrão.

Figura 5 – Curva padrão Quercetina



Fonte: Autoria própria (2020)

Tabela 3 – Flavonóides totais

Extrato ($200\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorbância	Flavonóides Totais (mg g^{-1})
BV01	0,05	120,4804
BV02	0,07	167,5084
BV03	0,06	143,9944
BV04	0,08	191,0224

Fonte: Autoria própria (2020)

Os valores de flavonóides totais foram convertidos para a mesma unidade utilizada na determinação de fenólicos totais e verificou-se a quantidade específica do composto fenólico flavonóide contido no extrato, Tabela (4).

Tabela 4 – Quantidade de flavonóides totais nos extratos

Extrato $200\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa μg	Absorbância	Flavonóides totais/Extrato (mg g^{-1})
BV01	5,0	0,05	24,95
BV02	5,0	0,07	34,48
BV03	5,0	0,06	29,71

Extrato 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$	Massa μg	Absorbância	Flavonóides totais/Extrato (mg g^{-1})
BV04	5,0	0,08	39,24

Fonte: Autoria própria (2020)

Com a relação entre a Tabela 3 e Tabela 4, percebe-se que enquanto na primeira se tem a quantidade de flavonóides totais expressa em miligrama de Quercetina (padrão) por litro equivalente de extrato, na segunda, essa quantidade é convertida para a massa de extrato efetivamente utilizada durante o experimento, por isso expressa em mg de flavonóides totais, presente em cada quantidade em grama de extrato analisada no experimento.

A relação de miligrama por grama pode ainda ser utilizada para comparar a quantidade de flavonóides totais com fenólicos totais (expresso com mesma unidade). Basta verificar as Tabelas 2 e 4. Em termos quantitativos elas são coerentes, porém quando se nota por exemplo o extrato BV01 em termos de compostos fenólicos totais, apresenta 12,38mg/g. Com a mesma concentração e tendo sido analisado o composto fenólico específico flavonóides totais, apresenta 68,95mg/g. Isso é justificado pelo fato de o método Folin-Ciocalteu apresentar a desvantagem de sofrer interferências de outras espécies, segundo Granato (2016).

Segundo a literatura (GRANATO *et al*, 2016), pode-se inferir que no extrato BV01 (extraído com clorofórmio) pode ocorrer a presença de flavonóides do tipo 1 (baixa polaridade), Figura 9. Nos extratos BV02 e BV03, possivelmente ocorre a presença de flavonóides tipo 2 (média polaridade) Figura 10. No extrato BV04 (extraído com acetato de etila em pH=4) infere-se a presença de ácidos hidroxicinâmicos, Figura 11.

Figura 9 –
5-hidroxi-7,3',4'-trihidroxiflavona

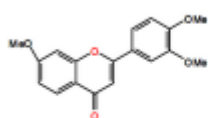


Figura 10 –
5,7,3',4'-tetraidroxiflavona

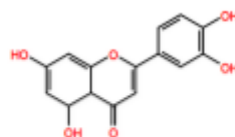
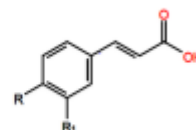


Figura 11 –
Estrutura de ácido
Hidroxicinâmico



Fonte: GRANATO *et al*, 2016

Embora o método de determinação de compostos fenólicos totais sofra interferência de substâncias não fenólicas, a análise para presença de compostos fenólicos, flavonóides especificamente, o método utilizado foi capaz de mostrar coerência por apresentar, por exemplo, a maior concentração de fenólicos totais e flavonóides para BV04 e BV02. As variações em termos de concentrações fenólicas apresentadas podem estar atreladas ao fato de enquanto no método fenólicos totais o Folin reage com todas as substâncias fenólicas, para o método

flavonóides totais, cátion alumínio do sal cloreto de alumínio utilizado no método, reage apenas com hidroxilas dos anéis aromáticos, tornando a técnica mais específica, excluindo o que seria uma espécie de interferência para este método, como fenólicos tão comuns em vegetais, a título de exemplo, ácidos fenólicos (GRANATO *et al*, 2016).

Estatisticamente é possível notar que a quantidade de compostos fenólicos e flavonóides totais para o extrato de *Baccharis vulneraria* apresenta correlação positiva com capacidade de atividade antioxidantes, como se nota na Tabela 5. Percebe-se que o maior coeficiente de covariação foi obtido para interação entre flavonóides e capacidade antioxidante ($r = 0,73$), que descreve uma correlação forte de acordo com conceito de correlação de Pearson (SPAGOLLA *et al*, 2009) (pois $0,73 < r < 1$). Embora as correlações fenólicos totais e flavonóides ($r = 0,41$) bem como fenólicos totais com capacidade antioxidante ($r = 0,25$) sejam positivas, estas são moderadas fracas pois $0 < 0,2 < 0,5 < 0,1$ (SPAGOLLA *et al*, 2009).

Tabela 5 – Coeficientes de correlação de Pearson entre os teores de fenólicos totais e flavonóides totais entre fenólicos e capacidade antioxidante

Correlação	r	n
Fenólicos totais X Flavonóides	0,41	4
Fenólicos totais X Capacidade antioxidante	0,25	4
Flavonóides X capacidade antioxidante	0,73	4

Fonte: Autoria própria (2020)

O resultado deste trabalho é harmonioso com estudos relatados sobre o gênero *Baccharis*. A mesma apresenta atividades biológicas como antioxidante, gastroprotetora e anti-inflamatória. Infere-se que estas atividades estejam relacionadas com compostos tais como, flavonóides, ácidos fenólicos e diterpenos conforme o trabalho de Verdi (2005 apud BRESSAN, 2014). No mesmo trabalho, Bressan destacou que os ácidos fenólicos são cada vez mais evidentes na composição do gênero *Baccharis*.

CONCLUSÃO

A partir das análises realizadas, constatou-se que extratos vegetais das folhas da espécie *Baccharis vulneraria* apresentam quantidades significativas de compostos fenólicos e flavonóides totais, o que corrobora com atividade antioxidante observada nos mesmos. Isso a torna promissora para estudo.

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

BRESSAN, J. **Constituintes químicos, atividade antioxidante e citotóxica das partes aéreas de *baccharis burchellii baker* (asteraceae).** 2014. F. 111 (Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos. Universidade Federal do Paraná – UTPR. Curitiba, PR.

CLAUDINO, J. C. ***Baccharis trimera* (Less) DC.: estudo fitoquímico e avaliação da citotoxicidade.** 2013. 101f. Dissertação (Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Universidade Estadual Paulista. UNESP. Araraquara, São Paulo. 2013.

DE CASTRO, A. C. C. M. **Avaliação do perfil químico de fenólicos, do potencial antioxidante e fotoprotetor da torta de semente de *coffea arábica* L. (rubiacaceae).** 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.

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 OLIVERIA, C.T. **Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis oreophila* malme.** 2016. F.59 (Título Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR. Pato Branco, PR.

Flora Digital. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Disponível em: (http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=buscar_mini.php&especie=6698). Acesso em: 21 mar. 2020.

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

HEIDEN, G.; bumgratz, J.F. A.; ESTEVES, R.L. **Baccharis subgen. *Molina* (Asteraceae) no estado do Rio de Janeiro, Brasil.** Rodrigésia. Revista do Jardim Botânico do Rio

de Janeiro. n. 63. p.649-687. 2012. Disponível em:
(<http://www.scielo.br/pdf/rod/v63n3/a13v63n3.pdf>) Acesso em: 21 mar. 2020.

SPAGOLLA, L.C.; SANTOS, M.M; PASSOS, L.M.L.; AGUIAR, C.L. **Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2009.