



Avaliação de diferentes métodos de extração de compostos bioativos das folhas de *Syzygium malaccense* por meio da determinação da atividade antioxidante e análise cromatográfica

Evaluation of different methods of extracting bioactive compounds from Syzygium malaccense leaves by determining the antioxidant activity and chromatographic analysis

Eloisa Regina Zanchet*, Tatiane Luiza Cadorin Oldoni[†],
Cleidiane da Silva[‡],

RESUMO

O objetivo do trabalho foi realizar um estudo, comparando os extratos obtidos em banho termostático e ultrassônico das folhas de *Syzygium malaccense*. A comparação foi realizada para verificar se a temperatura tem influência no teor de atividade antioxidante e perfil fenólico de extratos obtidos. Para ambos os métodos foi utilizada a mistura extratora com os solventes etanol:água (40:60 v/v). A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada por meio dos métodos de sequestro do radical DPPH, redução do íon ferro (FRAP), captura do radical ABTS e teor de compostos fenólicos totais (CFT). A eficiência das extrações foi avaliada pela detecção e quantificação dos compostos fenólicos individuais presentes nos extratos das folhas de *S. malaccense*, por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os resultados indicaram uma melhor atividade antioxidante para o extrato obtido em banho ultrassônico. Por meio da CLAE, foi possível identificar o ácido gálico e a miricitrina em ambos os extratos. O teor de ácido gálico e miricitrina foi maior para o extrato hidroalcoólico de jambo 2 (EHJ 2). Também foi identificado um composto que absorve em 260/340 nm, esse perfil de absorção é característico de flavonoides.

Palavras-chave: extração, atividade antioxidante, CLAE

ABSTRACT

The objective of this work was to carry out a study, comparing the extracts obtained in a thermostated and ultrasonic bath of *Syzygium malaccense* leaves. The comparison was carried out to verify if the temperature influences the antioxidant activity and phenolic profile of the extracts obtained. For both methods, an extracting mixture with ethanol:water (40:60 v/v) solvents was used. The antioxidant activity of the extracts was evaluated using the methods of DPPH radical scavenging, iron ion reduction (FRAP), ABTS radical capture and total phenolic compounds content (CFT). The efficiency of the extractions was evaluated by detecting and quantifying the individual phenolic compounds present in the extracts of *S. malaccense* leaflets, using the technique of high performance liquid chromatography (HPLC). The results indicated a better antioxidant activity for the extract obtained in an ultrasonic bath. Through HPLC, it was possible to identify gallic acid and myricitrin in both extracts. Gallic acid and myricitrin content was higher for the hydroalcoholic extract of jambo (EHJ 2). A compound that absorbs at 260/340 nm was also identified, this absorption profile is characteristic of flavonoids.

Keywords: extraction, antioxidant activity, HPLC

* Bacharelado em Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil; eloisazanchet@alunos.utfpr.edu.br

[†] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco; tationdoni@gmail.com

[‡] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil; cleidi_dsv@hotmail.com



1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é decorrente desde a antiguidade, muitas vezes são o único recurso de algumas comunidades e grupos étnicos, estas são conhecidas por exercerem um papel relevante na cura e tratamento de diversas doenças (MOURA *et al.*, 2020). A planta *Syzygium malaccense*, conhecida popularmente como jambo vermelho, pertence à família *Myrtaceae*, é original da Malásia e vem sendo estudada, pois é muito utilizada na medicina tradicional, devido aos seus efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antifúngicos, dentre outros (PATEL *et al.*, 2019). Alguns estudos mostram o poder antioxidante de diversas partes do jambo como folhas, frutos e galhos (NERYS *et al.*, 2017).

Prasniewski *et al.* (2021), realizaram extração das folhas de jambo por meio de um banho termostatizado, onde após análises cromatográficas e antioxidantes, relatam a presença de compostos bioativos e um grande potencial antioxidante proveniente das folhas de jambo vermelho.

O principal objetivo deste trabalho foi realizar um estudo, para verificar a influência da temperatura na extração de compostos bioativos das folhas de jambo e a atividade antioxidante. Para realização deste estudo foram utilizadas duas metodologias de extração, sendo uma em banho termostatizado e a outra em banho ultrassônico, bem como diferentes métodos para a determinação da atividade antioxidante e identificação de compostos fenólicos por meio da cromatografia líquida de alta eficiência. Faz-se importante comparar os métodos de extração, pois existem alguns compostos que podem ser degradados, quando submetidos a temperaturas mais altas.

2 MÉTODO

2.1 Coleta das folhas de *Syzygium malaccense* e preparo dos extratos

As folhas foram colhidas em Jacupiranga – SP em maio de 2019, secas em estufa com circulação de ar à 45 ± 5 °C, durante 7 dias e trituradas em moinho de facas. Para a extração (I), as folhas foram submetidas ao banho ultrassom com temperatura de 35 a 40 °C, durante 15 minutos com uma mistura extratora etanol:água (40:60 v/v). A extração (II), foi realizada em banho termostatizado com temperatura de 80 °C, durante 45 minutos com uma mistura extratora etanol:água (40:60 v/v). Os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotativo. O extrato proveniente da extração (I), foi denominado extrato hidroalcolico de jambo 1 (EHJ 1) e o extrato obtido na extração (II), foi denominado extrato hidroalcolico de jambo 2 (EHJ 2).

2.2 Análises para determinação da Atividade Antioxidante

Inicialmente foi determinado o teor de compostos fenólicos totais (CFT) seguindo a metodologia descrita por Singleton *et al.* (1999), onde foram adicionados 500 µL de amostra em 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (10% em água). Após 5 minutos de repouso adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 4%, e a mistura permaneceu em repouso por 2 horas ao abrigo de luz e em seguida foi realizada a leitura em espectrofotômetro a 740 nm. Como branco foi utilizada as mesmas condições, apenas substituindo-se o volume de amostra por igual volume de água destilada e a curva de calibração foi construída com soluções de 150 ppm a 2,5 ppm de ácido gálico e os resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama (EAG g⁻¹).

Foi utilizado o método de sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazina), para determinação da atividade antioxidante descrito por Brand-Williams *et al.* (1995), onde a reação consistiu na adição de 500 µL de amostra, 3,0 mL de etanol:água (80:20 v/v) e 300 µL do radical sintético DPPH (0,5 mmol L⁻¹ em



etanol). Esta mistura permaneceu ao abrigo de luz por 45 minutos e logo após foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 517 nm. Como branco utilizou-se etanol 80%. A curva de calibração foi construída com o radical sintético Trolox e os resultados foram expressos em μmol de Trolox por grama de folha ($\mu\text{mol Trolox g}^{-1}$).

A atividade antioxidante pelo método de redução do íon ferro (FRAP - do inglês Ferric Reducing Antioxidant Power), foi determinada seguindo a metodologia descrita por Benzie et al. (1996). Inicialmente foi preparado o reagente FRAP, que consistiu na mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mmol L^{-1} , pH 3,6), 2,5 mL de solução do complexo Fe^{3+} - TPTZ (TPTZ 10 mmol L^{-1} em HCl 40 mmol L^{-1}) e 2,5 mL de FeCl_3 (20 mmol L^{-1} em água). Em um tubo de ensaio adicionou-se 100 μL de amostra e 3 mL do reagente FRAP, após repouso de 45 minutos à 37°C em banho termostatizado, foram realizadas as leituras das absorbâncias em 593 nm. Os resultados foram expressos em μmol de Fe^{2+} por g de extrato.

Para a captura do radical ABTS ([2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline)-6-sulfonic acid]), foi empregada a metodologia descrita por Re et al. (1999). O radical ABTS^{++} foi obtido a partir de uma reação com 7 mmol.L^{-1} de ABTS e 140 mmol.L^{-1} de persulfato de potássio, no escuro à temperatura ambiente, por 16 horas. Para determinação da atividade antioxidante, a solução do radical ABTS^{++} , foi diluída em etanol até obter a absorbância de 0,700 em 734 nm. Após 30 μL de amostra e 3 mL da solução contendo o radical foram adicionados em um tubo de ensaio e após 6 minutos de reação foi realizada a leitura das absorbâncias em 734 nm.

2.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Para a identificação de compostos bioativos, foi empregada a cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com a metodologia descrita por Prasniewski et al. (2021). Foi utilizado um cromatógrafo líquido Varian (modelo 920-LC) acoplado a um detector de arranjo de fotodiodos. O volume de amostra injetado foi de 10 μL , em uma coluna de fase reversa C18 (250x4,6 mm, com tamanho de partícula de 5 μm) mantida à temperatura constante de 30°C . A fase móvel (Solvente A), foi composta por água acidificada com ácido fosfórico (pH 2,16) e o solvente B foi acetonitrila, em modo gradiente iniciando com 5% B, passando para 30% B em 10 min, 38% B em 25 min, 50% B em 28 min, 95% B em 32 min, retornando para 5% de B dos 35 aos 45 min, com fluxo de 1 mL/min.

3 RESULTADOS

Ambas as extrações apresentaram um rendimento de 18% de extrato seco. Após as análises foi possível determinar o teor de compostos fenólicos totais e a atividades antioxidante dos extratos, os resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados da análise de Compostos Fenólicos (CFT) e atividade antioxidante pelos métodos FRAP, ABTS e DPPH para o EHJ.

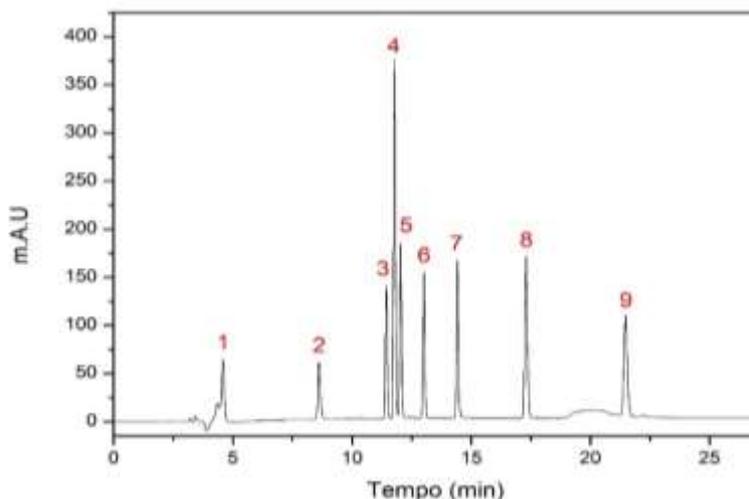
Amostra	CFT (mg EAG/g)	FRAP (μmol de FeSO_4/g)	ABTS (μmol de Trolox/g)	DPPH (μmol de Trolox/g)
EHJ 1	$357,60 \pm 1,87^a$	7530 ± 132^a	$3566 \pm 28,9^a$	$2829 \pm 67,5^a$
EHJ 2	$335,21 \pm 2,90^b$	6864 ± 264^b	3522 ± 313^a	$2643 \pm 27,9^b$

Fonte: Autoria própria (2021). Notas: Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$).

Verificou-se que os melhores resultados para atividade antioxidante foram obtidos para o EHJ 1, o qual foi obtido por método de extração em banho ultrassônico. Os extratos EHJ 1 e EHJ 2, apresentaram teores de compostos fenólicos de 357,60 e 335,21 mg de EAG/g, respectivamente. Arumugam *et al.* (2014) e Prasniewski *et al.* (2021), trabalharam com o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. malaccense*, obtiveram teores de compostos fenólicos de 125,81 mg EAG/g e 355,5 mg EAG/g, respectivamente. Para o método DPPH, os teores foram de 2829 e 2643 μmol de Trolox/g para o EHJ 1 e EHJ 2, respectivamente. Analisando a atividade antioxidante pelo método FRAP, verificou-se que o extrato obtido por meio da extração em ultrassom (EHJ 1), apresentou uma maior atividade antioxidante (7530 μmol de FeSO_4/g), do que o extrato obtido por meio do banho termostatizado (EHJ 2), que foi 6864 μmol de FeSO_4/g . De acordo com o teste de Tukey, a atividade antioxidante por meio do método ABTS, não apresentou diferenças significativas entre os dois métodos de extração.

Com o objetivo de avaliar o perfil químico dos extratos, realizou-se análise de cromatografia líquida de alta eficiência em modo reverso (C18). O método foi otimizado para detectar nove compostos fenólicos (Figura 1), sete flavonoides: rutina, miricitrina, isoquercetina, astragalina, miricetina, quercetina e canferol; e dois ácidos fenólicos: ácido gálico e ácido clorogênico. O limite de detecção (LD) variou de 0,024 a 2,129 mg L^{-1} , para ácido gálico e canferol, respectivamente, enquanto o limite de quantificação (LQ) apresentou valores entre 0,080 a 7,097 mg L^{-1} para ácido gálico e canferol, respectivamente.

Figura 1 - Cromatograma da mistura de padrões utilizadas na identificação e quantificação por CLAE-DAD-FL. (1) Ácido Gálico; (2) Ácido Clorogênico; (3) Rutina; (4) Miricitrina ; (5) Isoquercetina; (6) Astragalina; (7) Miricetina; (8) Quercetina e (9) Canferol (50 mg/L)



Fonte: Autoria própria (2021).

A eficiência das extrações foi avaliada pela detecção e quantificação dos compostos fenólicos individuais presentes nos extratos das folhas de *S. malaccense* (Tabela 2 e Figura 2). No EHJ 1 foram identificados o ácido gálico e a miricitrina com teores de 1,54 e 0,88 mg de composto por g de extrato, respectivamente. Para o EHJ 2, os mesmos compostos foram identificados com teores de 3,00 mg de composto por g de extrato para o ácido gálico e o teor de miricitrina foi de 1,50 mg de composto por g de extrato.

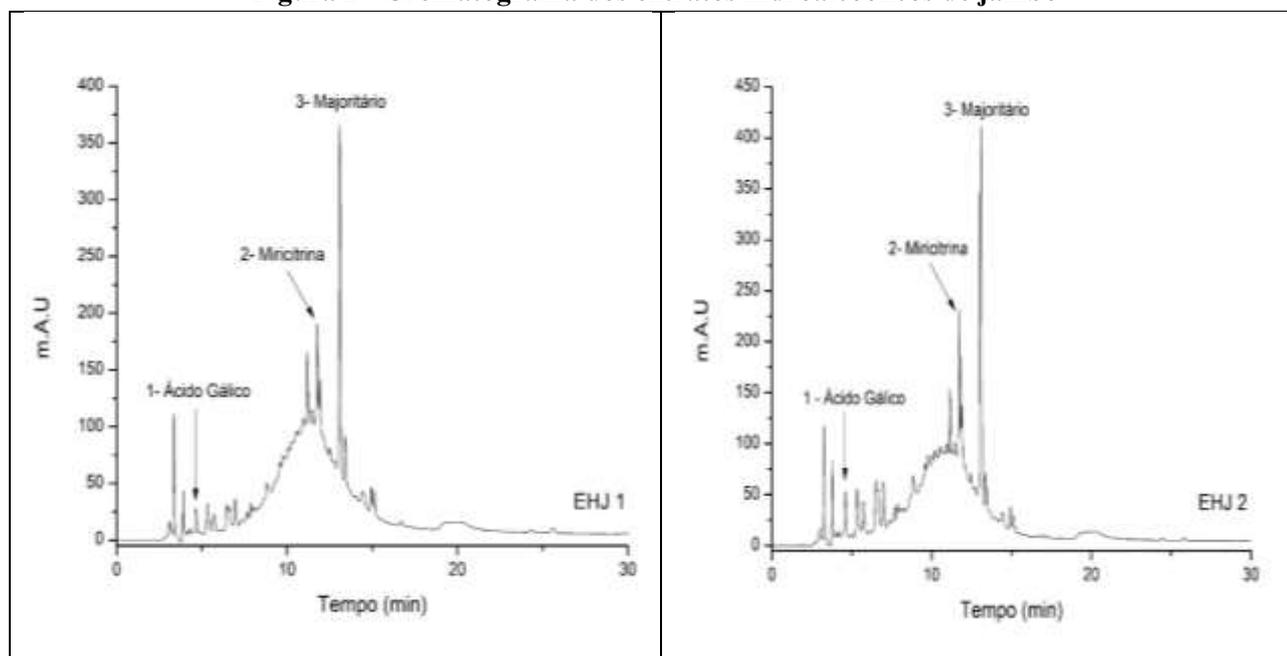
Tabela 2 - Concentração de compostos fenólicos no extrato das folhas de *S. malaccense*

Amostra	Ácido Gálico (mg de composto g ⁻¹ de extrato)	Miricitrina
EHJ 1	1,54 ± 0,08	0,88 ± 0,03
EHJ 2	3,00 ± 0,13	1,50 ± 0,03

Fonte: Autoria própria (2021).

O teor de ácido gálico e miricitrina foi maior para o EHJ 2. Além do ácido gálico e a miricitrina, em ambos os extratos foi identificado a presença de um composto majoritário, como podemos observar nos cromatogramas a seguir (Figura 2). Este composto absorve em 260/340 nm, com tempo de retenção em aproximadamente 13 minutos. O perfil de absorção deste composto é característico de flavonoides.

Figura 2 - Cromatograma dos extratos hidroalcoólicos de jambo



Fonte: Autoria própria (2021).

Algumas técnicas convencionais de extração de compostos fazem o uso de aquecimento, isto pode ocasionar degradação de substâncias naturais termicamente instáveis presentes no material (SOARES MELECCHI *et al.*, 2006), logo o método em ultrassom foi escolhido por não ser necessário aquecer a amostra e assim poder realizar um estudo comparativo com o banho aquecido.

4 CONCLUSÃO

No estudo foi possível verificar que o método de extração apresenta influência na atividade antioxidante. O extrato obtido no banho de ultrassom apresentou maior potencial pelos métodos CFT, FRAP e DPPH, enquanto não apresentou diferenças pelo método ABTS. Por meio das análises cromatográficas foi possível identificar os compostos ácido gálico e miricitrina em ambos os extratos com diferenças significativas. O



extrato produzido em ultrassom apresentou maior atividade antioxidante, porém pela cromatografia foi quantificado menor teor dos compostos extraídos. A atividade antioxidante dos extratos pode estar relacionada com os demais compostos presentes, que não foram identificados. Diante disto é possível concluir que o melhor método de extração é em ultrassom, além de ser mais rápido e não usar temperatura elevada, observamos que a atividade antioxidante é melhor.

AGRADECIMENTOS

À UTFPR pela bolsa e à central de análises do campus Pato Branco, pelo espaço e auxílio nas análises realizadas.

REFERÊNCIAS

- ARUMUGAM, B.; MANAHARAN, T.; HENG, C. K.; KUPPUSAMY, U. R.; PALANISAMY, U. D. Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2P1, p. 707–712, 2014.
- BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 239, p. 70–76, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25–30, 1995.
- MOURA, D. F. *et al.* A Importância da Biossegurança na Produção e Utilização de Produtos Naturais e Fitoterápicos. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 2, p. 7054–7062, 2020.
- NERYS, L. de C. R.; SILVA, M. C. R. da; SILVA, M. G. de F.; SANTANA, E. R. B. de; PATRIOTA, B. F. L.; YARA, R.; LIMA, C. S. de A. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *Syzygium malaccense* E *Syzygium cumini*. p. 81–82, 2017.
- PATEL, D.; DESAI, S.; DESAI, A.; DAVE, D.; MESHARAM, D. Phytochemical Evaluation and In-vitro Thrombolytic Activity of Hydro Alcoholic Extract of *Syzygium malaccense* Leaves. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 8, n. 3, p. 3916–3918, 2019.
- PRASNIEWSKI, A.; DA SILVA, C.; AYRES, B. R. B.; SILVA, E. A. da; PILAU, E. J.; NANI, B. D.; ROSALEN, P. L.; OLDONI, T. L. C. Characterization of phenolic compounds by UHPLC-QTOF-MS/MS and functional properties of *Syzygium malaccense* leaves. **South African Journal of Botany**, v. 139, p. 418–426, 2021.
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9/10, p. 1231–1237, 1999.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, 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. 152–178, 1999.
- SOARES MELECCHI, M. I.; PÉRES, V. F.; DARIVA, C.; ZINI, C. A.; ABAD, F. C.; MARTINEZ, M. M.; CARAMÃO, E. B. Optimization of the sonication extraction method of *Hibiscus tiliaceus* L. flowers. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 13, n. 3, p. 242–250, 2006.