



ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DE TRÊS ESPÉCIES DA FAMÍLIA FABACEA

AMANDA LIMA CUNHA

ALDENIR FEITOSA DOS SANTOS

EIXO: 23. PESQUISA FORA DO CONTEXTO EDUCACIONAL

RESUMO

O presente trabalho objetivou a análise do potencial antioxidante de três espécies vegetais, da família Fabaceae. Através dos testes realizados foi possível verificar que tais extratos analisados possuem capacidade antioxidante, pois foi identificado constituintes químicos que possuem potencial de combater os radicais livres, além de todos os extratos terem apresentado potencial de captura do radical livre DPPH e capacidade inibitória da peroxidação lipídica, que comparado com resultados já descritos na literatura demonstraram superioridade ou similaridade; por meio do método Folin-Ciocalteu as espécies obtiveram valores significativos comparados aos já descritos na literatura. Portanto, o estudo do potencial antioxidante destas espécies é de total relevância, para que assim algumas patologias sejam erradicadas.

Palavras-chave: Antioxidante, extratos vegetais, radicais livres.

ABSTRACT

This study aimed to analyze the antioxidant potential of three plant species of the Fabaceae family. Through the tests it observed that such analyzed extracts have antioxidant capacity, because it was identified chemical constituents that have the potential to fight free radicals, and all extracts have shown free radical DPPH and capture potential inhibitory capacity of lipid peroxidation, that compared to results described in the literature demonstrated superiority or similarity; by means of Folin - Ciocalteu method species significant values were obtained compared to those reported in the literature. Therefore, the study of the antioxidant potential of these species is full of relevance, so that some diseases are eradicated.

Keywords: Antioxidant, plant extracts, free radicals.

INTRODUÇÃO O uso de produtos naturais no tratamento de doenças é uma prática tão antiga quanto a história da humanidade, porém as plantas só chegaram no âmbito farmacológico no século XX, quando surge a fitoterapia (área designada ao estudo de produtos naturais). A utilização de folhas, raízes, frutos entre outras partições no tratamento de doenças ou para aliviar dores ainda é uma prática bastante comum no Brasil; e uma região que ganha destaque neste hábito é o Nordeste (PEREIRA; CARDOSO, 2012). A região Nordeste possui uma flora diversificada e característica, apesar de ser uma região de clima quente e com pouca umidade, esta região abrange uma grande quantidade de espécies vegetais que possuem em sua composição diversos metabólitos secundários que caracterizam seu alto potencial de retardar a ação dos radicais no organismo humano (ROQUE et al., 2010). O estudo sobre a capacidade antirradicalar dos extratos vegetais intensificaram-se com o desenvolvimento de doenças crônicas-degenerativas que tinham como causa a propagação de radicais livres. Espécies radicalares são moléculas ou átomos que possuem um número ímpar de elétrons e podem ser provenientes de fontes exógenas (cigarro, poluição do ar, radiação, bebidas alcoólicas, metais pesados e drogas) ou endógenas (metabolismo do oxigênio que origina as espécies reativas do

metabolismo do oxigênio) (AZEVEDO et al., 2011). O excesso de radicais livres no corpo causa o chamado estresse oxidativo que proporciona ao desenvolvimento de enfermidades (catarata, câncer, artrite, doenças degenerativas do cérebro, envelhecimento celular e tecidual, problemas cardiovasculares e alteração da função de biomoléculas) que vem desafiando a medicina. Para o combate das espécies reativas há os antioxidantes que são substâncias capazes de inibir a reação dos radicais; atualmente a principal fonte anti-radicalar é o extrato de plantas (NASCIMENTO et al., 2011). Os produtos vegetais vêm merecendo destaque na medicina e farmacologia por serem o fonte de substâncias bioativas que são utilizadas em serviços terapêuticos. A presença destes compostos caracteriza o potencial antioxidante de espécies como *Bauhinia forficata* Link (mororó), *Mimosa hostilis benth* (jurema preta), *Anadenanthera falcata* (angico – do- cerrado), originárias do Nordeste brasileiro. O mororó, segundo a cultura popular, é uma espécie de combate a diabete. (SILVA et al., 2003) A jurema preta do gênero *Mimosa*, da família Leguminosae e subfamília Mimosoidea é um vegetal pertencente a região nordeste, possui aproximadamente 500 espécies de metabólitos secundários e seu uso popular é no tratamento de tosse e cicatrização (CRUZ, 2014). O angico-do-cerrado é uma espécie vegetal pertencente à família Fabacea-Mimosoideae, estudos indicam que essa espécie possui a presença de esteróides e flavonoides que constituem uma fonte inesgotável de princípios ativos na erradicação de patologias (ESTEVAM et al., 2006).

Deste modo, torna-se válido a investigação do potencial antioxidante e a identificação dos constituintes químicos destas espécies. A análise da atividade antioxidante pode ser realizada por meio dos métodos DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e FTC (Tiocianato Férrico). Por meio do método Folin-Ciocalteu determina-se a quantidade de compostos fenólicos e a triagem fitoquímica identifica qualitativamente os compostos bioativos presentes nas referidas amostras vegetais.

O método radical livre DPPH consiste na captura do radical 2,2- difenil-1-picril-hidrazila, de coloração púrpura. Por meio de uma amostra antioxidante este radical é reduzido a difenil-picril-hidrazina, de coloração amarelada. A partir dos resultados obtidos determina-se o percentual de atividade sequestradora de radical livre. (RODRIGUES et al., 2013)

O FTC (Tiocianato Férrico) monitora a quantidade de peróxido de hidrogênio no início da peroxidação lipídica, na qual o peróxido de hidrogênio reage com o cloreto férrico, originando o íon férrico, que liga-se ao tiocianato de amônia formando o tiocianato férrico, de coloração vermelha (RODRIGUES et al., 2013).

A determinação de compostos fenólicos ocorre por meio do reagente Folin-Ciocalteu (WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999). E a triagem fitoquímica é realizada a partir da reação do extrato vegetal com outros reagentes e a identificação dos metabólitos secundários é realizada pela mudança de coloração (OLIVEIRA et al., 2007).

Diante do que foi exposto, o presente trabalho tem como objetivo determinar a capacidade antirradicalar dos extratos etanólicos das espécies *Anadenanthera falcata* (benth.) Speg, *Mimosa hostilis Benth* e *Bauhinia forficata* Link.

MATERIAIS E MÉTODOS

PREPARO DO EXTRATO

A extração dos constituintes fixos dos vegetais foi realizada por maceração em etanol, com posterior remoção do solvente por rota-evaporação. A troca de solvente foi realizada a cada 48h durante uma semana.

ANÁLISE FITOQUÍMICA

Para a realização da etapa de triagem fitoquímica tomou-se como base a metodologia proposta por Matos (1988) a qual foi trabalhada com algumas adaptações a fim de realizar prospecção dos seguintes aleloquímicos: fenóis, taninos pirógalicos, taninos flobafênicos, antocianina e antocianidina, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavononas, flavonóis, xantonas, esteróides, triterpenóides e saponinas.

OPERAÇÕES PRELIMINARES

De cada extrato obtido e utilizado nos bioensaios separou-se 35 mL para a prospecção fitoquímica, os quais foram separados em sete porções de 3 mL em tubos de ensaios numerados e identificados de acordo com cada tipo de extrato e uma porção de 10 mL em béquer rotulado. Aqueceu-se o béquer em banho-maria por meio de uma placa de aquecimento com agitação até a evaporação total da parte líquida, a qual foi utilizada nos testes para esteroides, triterpenóides e saponinas.

TESTES PARA FENÓIS, TANINOS PIROGÁLICOS E TANINOS FLOBATÊNICOS

No tubo "1" de cada extrato foram colocadas três gotas de solução alcoólica de FeCl₃, após agitação foi observada a ocorrência de variação de cor ou formação de precipitado abundante escuro. A coloração entre o azul e o vermelho e indicativa de fenóis, precipitado escuro de tonalidade azul e indicativa da presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde da presença de taninos flobatênicos (taninos condensados ou catéquicos). Para comparação foi realizado um teste em branco usando apenas água e o cloreto férrico.

TESTE PARA ANTOCIANINA E ANTOCIANIDINA, FLAVONAS, FLAVONOIS E XANTONAS, CHALCONAS E AURONAS, FLAVONONÓIS

O tubo "2" foi acidulado com ácido clorídrico (HCl) a pH 3, o extrato do tubo "3" foi alcalinizado a pH 8,5 e o tubo "4" alcalinizado a pH 11 através da adição de hidróxido de sódio (NaOH). A variação de cor indicou a presença ou ausência dos aleloquímicos. A coloração vermelha, lilás e azul púrpura, nos "2", "3" e "4" (respectivamente) indica a presença de antocianinas e antocianidinas. O aparecimento da cor amarela no tubo "4" demonstra a presença de flavonas, flavonóis e xantonas. A cor vermelha, vermelho-púrpura no tubo "2" e "4" (respectivamente) evidencia a presença de chalconas e auronas. E o aparecimento do vermelho laranja no tubo "4" mostra a presença de flavononóis na amostra.

TESTE PARA LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVANONAS

O tubo "5" foi acidulado por adição de HCl até pH 2 e o tubo "6" foi alcalinizado pela adição de NaOH até pH 11. Ambos foram aquecidos com o auxílio de uma lamparina de álcool durante 3 minutos. A variação de cor indicou a presença ou ausência dos aleloquímicos. A coloração vermelha e pardo-amarelada, no tubo "5", indica a presença de leucoantocianidinas e catequinas (respectivamente). E o aparecimento do verde-laranja, no tubo "6", indica a presença de flavonas.

TESTES PARA FLAVONOIS, FLAVANONAS, FLAVONONÓIS E XANTONAS

Ao Tubo "7"; foi adicionado uma pequena fita de magnésio e 1,0 ml de HCl concentrado. Após o término da reação, indicada pelo fim da efervescência, o tubo "7" foi comparado com o tubo "5" (ambos acidulados). Esperava-se o aparecimento ou a intensificação de cor vermelha indicando a presença de flavonóis, flavononas, flavononóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos.

TESTE PARA ESTEROIDES E TRITERPENÓIDES

O resíduo seco do béquer foi extraído 3 vezes com 2 mL de clorofórmio e homogeneizado. A solução foi filtrada gota a gota em um pequeno funil com algodão, coberta com alguns decigramas de Na₂SO₄ anidro, para um tubo de ensaio. Foi adicionado 1 mL de anidro acético, agitou-se suavemente, e adicionou - se 3 gotas de H₂SO₄ concentrado. Agitou-se novamente e observou-se a projeção de cores indicando: coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteróides livres. A coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

TESTE PARA SAPONINAS

O resíduo insolúvel em clorofórmio, separado na operação anterior, foi redissolvido em 8 mL de água destilada e a solução foi filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se o tubo com a solução, fortemente, por 3 minutos e observou-se a formação de espuma, a qual se fosse persistente e abundante (colarinho) é indicativa da presença de saponinas (heteróides saponinicos).

CAPTURE DO RADICAL LIVRE DPPH

O método baseia-se na transferência de elétrons de uma substância antioxidante ou de uma espécie radicalar. A transferência de elétrons é perceptível pela mudança de coloração, em que o DPPH de coloração púrpura é reduzido a difenil-picril-hidrazina de coloração amarelada, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorado pelo decréscimo da absorbância (NASCIMENTO et al., 2011).

O teste foi realizado segundo metodologia já descrita na literatura, com algumas modificações. A partir de 0,0035 g do extrato do angico-do-cerrado em 35 mL de etanol; 0,0025 g do extrato da jurema preta em 25 mL de etanol e 0,0045 g do extrato do mororó em 45 mL de etanol, realizou-se o teste para cada amostra em concentrações diferenciada.

TIOCIANATO FÉRRICO (FTC)

Neste método o peróxido de hidrogênio oxida o ferro ferroso em meio acidificado. Os íons férricos resultantes reagem

com o tiocianato de amônia para formar o tiocianato férrico, um complexo de cor vermelho-alaranjado. A inibição da lipoperoxidação ocorre por meio da espécie antioxidante, que pode ser um óleo, extrato vegetal ou antioxidante sintético. Desta forma, quanto menor for a intensidade da coloração vermelha, maior será a absorvância analisada (RODRIGUES et al., 2011).

Inicialmente pesou-se 0,0052 g de cada extrato vegetal e diluiu-se em 5 mL de ETOH 99%, a partir desta solução estoque preparou-se as soluções de armazenamento em estufa a 50°C. As soluções de armazenamento foram preparadas com adição de 4 mL da solução estoque, uma alíquota de 4,1 mL de ácido linoleico 2,51%, 8 mL da solução de tampão fosfato 0,02M e 3,9 mL de H₂O destilada. Para o preparo do branco foi pesado 0,001 g de BHA e diluído em 5 mL de ETOH 99%. Em seguida retirou-se uma alíquota de 4 mL desta solução e adicionou em vidro âmbar com 4,1 mL de ácido linoleico 2,51%, 8 mL da solução de tampão fosfato 0,02M e 3,9 mL de H₂O destilada. Para o preparo da solução negativo foi adicionada em vidro âmbar 4 mL de H₂O destilada, 4,1 mL de ácido linoleico 2,51%, 8 mL da solução de tampão fosfato 0,02M e 3,9 mL de H₂O destilada.

O teste foi realizado durante 5 dias com auxílio de um espectrofotômetro UV-VIS com comprimento de onda de 500nm. As soluções para leitura diária foram realizadas em triplicata (para cada amostra), que continha 0,1 mL da solução estoque (estufa), 9,75 mL de H₂O destilada, 0,1 mL de tiocianato de amônia 30% e 0,1 mL de cloreto ferroso 0,02M em HCl 3,5%. Este procedimento foi realizado tanto para os extratos como para o branco e o negativo.

COMPOSTOS FENÓLICOS – FOLIN CIOCALTEAU

Inicialmente pesou-se 0,005 g da amostra vegetal e diluiu em 5 mL de MeOH. Em seguida retirou-se uma alíquota de 0,075 mL desta solução e adicionou-se 0,425 mL de MeOH (solução estoque).

Para a realização da leitura, foi adicionado em vidro âmbar (em triplicata – para cada amostra) 100µL da solução estoque, 500µL do reagente Folin – Ciocalteu e 6 mL de H₂O destilada. Posteriormente foi agitada no vórtex por 1 minuto, em seguida adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 15% e agitou-se novamente no vórtex por 30 segundos no vórtex. O último procedimento para o preparo das soluções foi transferido a solução para um balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com H₂O destilada; e posteriormente incubou-se as soluções no escuro durante 2 horas.

Para obtenção do branco foi preparado uma solução de 100µL de MeOH, 500µL do reagente Folin-Ciocalteu e 1 mL de H₂O destilada. e em seguida agitou-se no vórtex durante 1 minuto. Logo após, adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 15% e depois agitou-se por 30 segundos no vórtex. Posteriormente completou o volume da solução em um balão volumétrico de 10 mL. A solução foi incubada no escuro durante 2 horas. Antes de qualquer leitura, utilizou-se o branco para zerar o espectrofotômetro.

Para a leitura das soluções utilizou-se um espectrofotômetro UV-VIS com comprimento de onda de 750 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Utilizando, como base, a metodologia de prospecção preliminar de Matos (2001) foi identificado alguns constituintes químicos, nas plantas investigadas, que reafirmam que estas possuem poder anti-radicalar. De acordo com a tabela abaixo (Tabela 1) estão descritas as substâncias bioativas identificadas nas quatro espécies analisadas. A identificação dos compostos bioativos deu-se por meio da variação de coloração e pela formação de precipitado.

Tabela 1 Compostos bioativos identificados pelo método da triagem fitoquímica. Dados da pesquisa.

Planta	Parte estudada	Compostos identificados
<i>Anadenanthera falcata</i> Speg. (Benth).	Folha	Taninos flobafênicos, catequinas, flavononas, esteróides, saponinas.
<i>Bauhinia forficata</i> Link	Folha	Taninos flobafênicos, flavonas, flavonóis e xantonas, catequinas, esteróides, saponinas.
<i>Mimosa hostilis</i> Benth	Folha	Taninos flobafênicos, esteróides e saponinas.

O extrato etanólico das três amostras estudadas apresentaram atividade antioxidante pelo método DPPH. Comparando-se os resultados de cada amostra foi possível identificar que *Anadenanthera falcata* Speg. (Benth) mostrou melhor potencial antioxidante; na menor concentração analisada (200 µg/mL) atingiu 37,20% e na maior (600 µg/mL) 93,10%. A *Mimosa hostilis* Benth e a *Bauhinia forficata* Link também obtiveram percentual de atividade antioxidante. O

FTC, que avaliou o potencial das amostras estudadas em inibir o peróxido de hidrogênio no início da peroxidação lipídica; utilizando o BHA (butil-hidroxi-anisol). De acordo com os resultados obtidos foi identificado que os extratos analisados tiveram resultados semelhantes ao antioxidante sintético, BHA. Logo, o angico-do-cerrado; jurema preta e mororó possuem capacidade de inibir o peróxido de hidrogênio. Segundo Freitas (2014), ao estudar as espécies *M. x villosa* e *P. amboinicus* obteve as respectivas variações de percentuais 88, 78 a 101, 51% e 89, 47 a 101, 78%. Enquanto para as amostras estudadas os percentuais obtidos foram: *A. falcata* Speg. (Benth.) (12, 33 a 42, 52%), *B. forficata* Benth Link (12, 70 a 39,67%), *M. hostilis* Benth (12, 75 a 40%), *M. caesalpinifolia* Benth (15,62 a 42%). Os valores inferiores aos apresentados na literatura são decorrentes de fatores físicos (local e período da coleta das amostras) que alteram os aspectos químicos, que conferem aos vegetais capacidade antioxidante (PAULA, 2014). Através do método Folin –Ciocalteu foi determinado pelo método espectrofotométrico o teor de fenóis totais dos três extratos vegetais estudados. O teor de fenóis totais foi identificado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (WETTASINGHE; SHAHIDI, 1999), como mostra a tabela 2.

Tabela 2 Teor de fenóis totais, determinados, nos extratos do Angico-do-cerrado, mororó e jurema preta. Dados da pesquisa.

Espécie vegetal	Teor de fenóis totais em mg EAG/ g da amostra
<i>Anadenanthera falcata</i> Speg. (Benth). – folha	320,03
<i>Bauhinia forficata</i> Link – folha	174,31
<i>Mimosa hostilis benth</i> – folha	261,74

CONCLUSÃO

Diante das análises realizadas, foi possível identificar alguns constituintes bioativos, como esteroides, taninos flobafênicos, saponinas, catequinas, que conferem aos extratos capacidade de minimizar ou inibir a ação oxidativa de espécies radiculares. Vale ainda ressaltar o potencial de captura do radical livre DPPH, pelas espécies, que comparado com outras já descritas na literatura, pode-se afirmar que apresentaram valores significativos, além de terem apresentado similaridade com o antioxidante sintético BHA no método tiocianato férrico e ainda apresentaram uma quantidade de compostos fenólicos significativa.

Portanto, é de grande relevância o estudo, quanto ao potencial farmacológico, do angico-do-cerrado, jurema preta e mororó, para que assim sejam utilizados no tratamento ou cura de algumas patologias desenvolvidas pelos radicais livres.

AZEVEDO, R. R. S.; et al. **Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás**. Revista Semente, vol. 6, nº, p. 240-249, 2011.

CRUZ, M. P. **Isolamento e identificação de compostos bioativos de *Mimosa hostilis* Benth.** Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química – UFBA, 2014.

ESTEVAM, C.S.; et al. Estudo da atividade antioxidante do extrato e partições da entrecasca do Angico-do-cerrado contra a redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) e determinação de polifenóis total. REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, n. 29, 2006. **Anais da 29ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química.**

NASCIMENTO, J. C.; et al. **Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L.** Revista Brasileira de Farmácia, vol. 92, nº4, p. 327-332, 2011.

OLIVEIRA, A. L. S.; FIGUEIREDO, A. D. **Prospecção fitoquímica das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae – Mimosoidae).** Revista Brasileira de Biociências, vol. 5, nº2, p. 384 – 386, 2007.

- PAULA, C. S. **Estudo fitoquímico e propriedades biológicas das folhas de Bauhinia ungalata I., Fabaceae.** Tese de doutorado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná-Curitiba, 2014.
- PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes.** Journal of Biotechnology and Biodiversity. Vol. 3, nº 4: p. 146-152. 2012. ISSN-2179-4804, 2012.
- RODRIGUES, A. C. F.; et al. **Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de Senna Obtusifolia.** Revista Sementes, vol.6, nº 6, p. 250-257, 2011.
- RODRIGUES, A. C. F.; et al. **Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de Senna obtusifolia.** Revista Eletrônica de Farmácia, vol. 10, nº3, p. 43 – 53, 2013.
- ROQUE, A. A.; et al. **Uso e diversidade de plantas medicinais da Caatinga na comunidade rural da Lgoinhas, município de Caicó, Rio Grande do Norte (Nordeste do Brasil).** Revista Bras. Pl. Med., vol. 12, nº1: p. 31 -42, 2010.
- SILVA, C. F. G.; et al. **Avaliação da atividade antioxidante e determinação de fenóis totais de Bauhinia forficata.** XVII Seminário de iniciação científica e tecnologia da UTFPR, 2012.
- SILVA, G. M. C.; et al. **Morfologia do fruto, semente e plântula do mororó (ou pata de vaca) – Bauhinia forficata Linn.** Revista de Biologia e Ciências da Terra, vol. 3, nº2, ISSN 15195228, 2003.
- WETTASINGHE, M.; SHAHIDI, F. **Evening primrose meal: a source of natural antioxidants and scavenger of hydrogen peroxide and oxygen-derived free radicals.** J. Agric. Food Chem., vol. 47, p. 1801-1812, 1999.

Graduanda em Licenciatura em Química pela Universidade Estadual de Alagoas – UNEAL.
Prof^a. Dr^a. Da Universidade Estadual de Alagoas-UNEAL e Centro Universitário CESMAC.

Recebido em: 18/07/2015

Aprovado em: 20/07/2015

Editor Responsável: Veleida Anahi / Bernard Charlort

Método de Avaliação: Double Blind Review

E-ISSN:1982-3657

Doi: