

1.06.01 – Química Orgânica

### **AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E QUANTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES TOTAIS DE EXTRATOS DOS CAULES DE *Croton linearifolius* (EUPHORBIACEAE)**

Cleia T. Santos<sup>1\*</sup>, Matheus Andrade R. Costa<sup>2</sup>, Marcel Mark da S. Passos<sup>3</sup>, Rennan N. de Franca<sup>4</sup>, Romário da S. Ramos<sup>5</sup>, Sandra Lúcia da C. e Silva<sup>6</sup>, Simone A. Gualberto<sup>7</sup>

1. Bolsista PIBIC-CNPQ. Graduanda em Química com Atribuições Tecnológicas – Departamento de Ciências Exatas e Naturais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (DCEN-UESB)
2. Doutorando em Tecnologias Energéticas e Nucleares da Universidade Federal de Pernambuco (PROTEN-UFPE)
3. Mestrando em Ciências Ambientais da UESB
4. Graduando no curso de Química com Atribuições Tecnológicas – DCEN-UESB
5. Graduando no curso de Química Licenciatura – DCEN-UESB
6. Pesquisadora da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga – BA
7. Professora-Orientadora da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – DCEN

#### **Resumo**

A espécie *Croton linearifolius*, conhecida popularmente como velame pimenta, é endêmica do Bioma Caatinga, encontrado exclusivamente no Brasil. Estudos com espécies do gênero *Croton* vêm aumentando entre a comunidade científica brasileira, tanto no que se refere à investigação das suas propriedades químicas quanto farmacológicas e, dentre elas, destaca-se a atividade antioxidante. Este trabalho teve por objetivo avaliar a capacidade antioxidante e os teores de fenólicos e flavonoides totais presentes no extrato bruto e frações obtidas dos caules da espécie em estudo. O extrato bruto foi preparado por percolação exaustiva com solução hidroetanólica a 70%. Realizou-se o fracionamento por partição líquido-líquido do extrato bruto para obtenção das frações hexânica (FH), diclorometânica (FD) e acetato de etila (FAE). A avaliação da capacidade antioxidante foi realizada por dois métodos espectrofotométricos: o do sequestro de radicais livres DPPH e do poder redutor de íons ferro (FRAP). A quantificação do teor de fenólicos e flavonoides totais foi feita por espectrofotometria na região do visível pelo método de Folin-Ciocalteu e pelo método do ensaio colorimétrico, respectivamente. Os resultados demonstraram que a fração acetato de etila apresentou maior capacidade antioxidante entre as amostras analisadas, bem como os maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides, sendo possível correlacionar o potencial antioxidante com a quantidade destas substâncias presentes na amostra.

**Palavras-chave:** Caatinga; radicais livres; metabólitos secundários;

**Apoio financeiro:** CNPq; Fapesb; UESB

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UESB

#### **Introdução**

Nos últimos anos a utilização de plantas como alternativa no tratamento de algumas doenças tem crescido gradualmente e de forma considerável, representando um importante recurso terapêutico para muitas comunidades. Os compostos bioativos produzidos pelas plantas, denominados metabólitos secundários, apresentam um grande potencial para aplicação nas indústrias de alimentos, farmacêutica, cosmética e de agroquímicos, podendo ser utilizados como antioxidantes, estabilizantes, fitoterápicos e inseticidas botânicos alternativos, a serem empregados em substituição ou associados aos compostos sintéticos (Pereira et al. 2004; Lapa et al, 2007).

As plantas do gênero *Croton* abrangem aproximadamente 1.200 espécies, que possuem uma diversidade de constituintes com propriedades medicinais e inseticidas já comprovadas cientificamente (Lima e Pirani, 2008). Os principais metabólitos identificados nas espécies do gênero *Croton* pertencem principalmente as classes dos alcaloides, esteroides, terpenoides e flavonoides, sendo que estes metabólitos são normalmente responsáveis pelas propriedades farmacológicas identificadas nos vegetais e por sua defesa contra herbívoros e atração dos polinizadores (Barreto et al., 2013; Ndhlala et al., 2013; Costa et al., 2017).

Visando ampliar os conhecimentos sobre as propriedades químicas e farmacológicas do gênero, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e quantificar os teores de fenólicos e flavonoides totais no extrato etanólico e frações obtidas dos caules da espécie *Croton linearifolius*, conhecida popularmente como velame pimenta, sendo esta espécie nativa da região do semiárido baiano, para a qual não são encontradas muitas referências na literatura científica. Essas informações subsidiarão a descoberta e obtenção de novos bioprodutos, contribuindo para o desenvolvimento socioeconômico da região.

## Metodologia

### Preparação e fracionamento do extrato bruto

Os caules do *C. linearifolius* foram coletados na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, localizada no município de Contendas do Sincorá, do Estado da Bahia, no mês de maio de 2017.

Os caules foram previamente secos em estufa de circulação de ar por 72 horas, a temperatura de 40°C e, logo após, foram triturados em um moinho de facas. O material vegetal foi extraído por percolação exaustiva com solução hidroalcoólica a 70% e concentrado em evarador rotatório para obtenção do extrato bruto (EB).

O fracionamento do extrato bruto foi realizado por partição líquido-líquido utilizando solventes em ordem de crescente de polaridade (hexano, diclorometano e acetato de etila) para obter respectivamente as frações Hexânica (FH), diclorometânica (FD), acetato de etila (FAE) e a fração remanescente, denominada fração hidroalcoólica (FHA).

### Avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante pelo método do sequestro de radicais livres DPPH foi determinada segundo o método descrito por Rufino et al (2007). Utilizou-se as concentrações (2; 4; 6; 8 e 10 mg.mL<sup>-1</sup>) para EB, FH, FD e para FAE (0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mg.mL<sup>-1</sup>), diluídas em metanol. Os controles positivos utilizados foram a quercetina (0,025; 0,05; 0,075; 0,10 e 0,125 mg.mL<sup>-1</sup>) e a rutina (0,05; 0,1; 0,15; 0,20 e 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>). Em tubos de ensaio âmbar, 100 µL de cada uma das amostras foram agitadas com 3,9 mL de solução metanólica de DPPH a 0,06 mM. Após 40 minutos foram realizadas as leituras em espectrofotômetro UV-VIS no comprimento de onda de 515 nm, utilizando o metanol como branco. O método FRAP foi realizado seguindo a metodologia descrita por Rufino et al. (2006). Utilizou-se a concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> para EB, FH, FD, para FAE 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> e para os controles positivos (quercetina 0,075 mg.mL<sup>-1</sup> e rutina 0,15 mg.mL<sup>-1</sup>). Em tubos de ensaio âmbar, 90 µL de cada amostra foram agitadas com 270 µL de água deionizada e 2,7 mL do reagente FRAP. Após agitação as amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Depois desse tempo foram realizadas as leituras no comprimento de onda de 595 nm. A curva analítica foi preparada com soluções de sulfato ferroso (500, 1000, 1500 e 2000 µM). Nos dois métodos de avaliação as leituras foram feitas em triplicata e em ambiente escuro.

### Determinação do teor de fenólicos e flavonoides totais

O teor de fenólicos totais foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu, seguindo a metodologia descrita por Sousa et al. (2007). Utilizou-se a concentração de 2 mg.mL<sup>-1</sup> para o EB, FH, FD e para FAE 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>, diluídas em metanol. Em balões volumétricos de 10 mL, foram agitadas 500 µL de cada amostra com 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu e 6 mL de água deionizada por 1 minuto. Após esse tempo, 2 mL de solução de carbonato de sódio a 15% foram adicionadas e as soluções agitadas por 30 segundos. Por fim as soluções tiveram o seu volume completado para 10,0 mL com água deionizada. Após 2 horas as leituras foram realizadas a 750 nm em espectrofotômetro Shimadzu (UV mine1240). O teor de flavonoides totais foi realizado por ensaio colorimétrico usando cloreto de alumínio como agente cromofórico, seguindo a metodologia descrita por Santos et al. (1998), com modificações. Foi utilizada a concentração de 1,0 mg.mL<sup>-1</sup> para o EB, FH, FD e para a FAE 0,25 mg.mL<sup>-1</sup>. Em balões volumétricos de 5,0 mL foram agitados 1,0 mL de cada amostra com 500 µL de solução metanólica de AlCl<sub>3</sub> a 10% e o volume completado com solução metanólica de ácido acético a 5%. Após 30 minutos as leituras foram realizadas a 425 nm.

## Resultados e Discussão

A capacidade antioxidante das amostras foi monitorada através do sequestro do radical livre DPPH, sendo este, um radical estável, que na presença de um antioxidante é reduzido formando uma coloração amarelada, com conseqüente redução da absorção no comprimento de onda analisado. Já a avaliação da capacidade antioxidante pelo método FRAP foi medida através da habilidade em que os compostos antioxidantes presentes nas amostras possuem em reduzir o íon ferro de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> através da transferência de elétrons. Sendo assim, quanto maior o potencial antioxidante dos compostos presentes nas amostras, maior será a quantidade de íons Fe<sup>2+</sup> na solução (Costa et al., 2017).

Os resultados da capacidade antioxidante do extrato bruto e frações obtidas dos caules de *C. linearifolius*, assim como dos padrões positivos são mostrados na Tabela 1. Pelo método DPPH, os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de atividade antioxidante (%), pela concentração efetiva (CE<sub>50</sub>) e pelos índices de atividade antioxidante (IAA), proposto por SCHERER & GODOY (2009). Para o método FRAP os resultados foram expressos em mg de Fe<sup>2+</sup> por grama de extrato.

De acordo com SCHERER & GODOY (2009), o IAA busca facilitar a comparação da força antioxidante de diferentes extratos e trabalhos na literatura, tendo em vista que os resultados mudam de acordo com os diferentes protocolos e adaptações metodológicas aplicadas ao método DPPH. Desta forma, os autores desenvolveram um índice, onde: A atividade antioxidante é pobre quando o IAA < 0,5; moderada entre 0,5 e 1,0; forte entre 1,0 e 2,0; e muito forte quando o IAA > 2,0.

**Tabela 1.** Resultados da avaliação da capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e FRAP para o extrato bruto e frações obtidas dos caules de *C. linearifolius*

Amostras	Inibição (%) ± DP	CE <sub>50</sub> (µg.mL <sup>-1</sup> )	IAA	Mg Fe <sup>2+</sup> /g extrato
EB	74,85 ± 0,36	148,17	0,16	4,21
FH	18,18 ± 0,24	-	-	2,27
FD	67,17 ± 0,87	324,75	0,074	3,66
FAE	80,62 ± 3,77	24,50	1,0	16,55
Rutina	59,87 ± 1,55	4,97	4,82	82,60
Quercetina	90,59 ± 0,63	1,55	15,39	254,74

DP (Desvio padrão); IAA (Índice de atividade antioxidante); - (Não calculado); EB (extrato bruto); FH (fração hexânica); FD (fração diclorometânica); FAE (fração acetato de etila); Concentrações utilizadas no percentual de inibição (%): EB e FH (10000 µg.mL<sup>-1</sup>); FD (8000 µg.mL<sup>-1</sup>); FAE (2000 µg.mL<sup>-1</sup>); Rutina (250 µg.mL<sup>-1</sup>); Quercetina (125 µg.mL<sup>-1</sup>);

A avaliação dos resultados permite afirmar que a fração acetato de etila (FAE) é a que apresenta compostos com maior capacidade antioxidante, uma vez que foi a que produziu o maior percentual de inibição do radical livre DPPH, com o valor de CE<sub>50</sub> igual a 24,50 µg.mL<sup>-1</sup> e o índice de atividade antioxidante (IAA) de 1,0, indicando uma atividade de moderada a forte para esta fração. A FAE foi também o extrato que produziu a maior quantidade de íon Fe<sup>2+</sup> (82,60 mg Fe<sup>2+</sup>. g<sup>-1</sup> extrato), corroborando com os resultados encontrados no ensaio com o DPPH. Já os extratos EB, FH, e FD apresentaram baixa capacidade antioxidante quando comparados aos controles positivos rutina e quercetina. Portanto, de acordo com os resultados encontrados, para os dois métodos realizados (DPPH e FRAP) a fração acetato de etila apresentou um potencial antioxidante proeminente perante as demais amostras.

Os teores de fenólicos e flavonoides totais são apresentados na Tabela 2. Os teores de fenólicos totais foram expressos como miligrama de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG.g<sup>-1</sup>), enquanto os teores de flavonoides totais foram expressos como miligrama de equivalentes de quercetina por grama de extrato (mg EQ. g<sup>-1</sup>).

**Tabela 2.** Resultados da determinação dos teores de fenólicos totais e flavonoides totais no extrato bruto e frações obtidas dos caules de *C. linearifolius*

Amostras	Fenólicos Totais (mg de EAG / g de extrato)	Flavonoides Totais (mg de EQ / g extrato)
EB	58,43	15,67
FH	30,37	11,94
FD	59,21	21,64
FAE	105,04	73,62

EB (extrato etanólico); FH (fração hexânica); FD (fração diclorometânica); FAE (fração acetato de etila);

Com relação aos resultados da determinação dos teores de fenólicos e flavonoides totais, a fração acetato de etila foi a que apresentou a concentração mais elevada, sendo o menor teor encontrado para a fração hexânica. Estes resultados demonstram a correlação positiva existente entre a concentração de fenólicos e flavonoides totais e a capacidade antioxidante das amostras analisadas, principalmente quando analisando-se os resultados encontrados para a fração acetato de etila, que apresentou a maior capacidade antioxidante e uma maior quantidade de fenólicos e flavonoides totais, em relação aos demais extratos. O fato da fração acetato de etila ter sido mais eficiente, pode ser explicado em virtude dos compostos fenólicos apresentarem uma maior afinidade por solventes mais polares, presentes em maior concentração na fração FAE.

## Conclusões

Os resultados demonstraram que a espécie em estudo apresenta potencial para a aplicação como antioxidante natural, verificando-se a importância do isolamento e identificação dos constituintes presentes na FAE, por ter maior capacidade antioxidante e maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides totais, o que demonstra a necessidade de dar continuidade aos estudos, no sentido de elucidar a estrutura e a composição química dos constituintes da espécie.

## Referências bibliográficas

- BARRETO, M. B.; GOMES, C. L.; FREITAS, J. V. B.; PINTO, F. C. L.; SILVEIRA, E. R.; GRAMOSA, N. V. **Flavonoids and terpenoids from *Croton musicarpa* (Euphorbiaceae)**. *Química Nova*, v.36, n.5, p.675-679, 2013.
- COSTA, M. A. R.; SANTOS, R. R. C.; GUALBERTO, S. A.; SILVA, S. L. C. Fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de extratos de *Croton argyrophyllus* Kunth (Euphorbiaceae). **Enciclopédia Biosfera**, v.14, n.25, p.687-701, 2017.
- LAPA, A. J. et al. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. p. 247-262.
- LIMA, L. R.; PIRANI, J. R. **Revisão taxonômica de *Croton sect. Laprocroton* (Müll. Arg.) Pax (Euphorbiaceae s.s.)**. *Biota Neotropica*, v. 8, n. 2, p. 177-231. 2008.
- NDHLALA, A. R.; ADEROGBA, M. A.; NEUBE, B.; STADEN, J. V. Anti-oxidative and cholinesterase inhibitory effects of leaf extracts and their isolated compounds from two closely related Croton species. **Molecules**, v.18, n.2, p.1916-1932, 2013.
- PEREIRA, R.S. et al. **Antibacterial activity of essential oils on microorganisms isolated from urinary tract infection**. *Revista de Saúde Pública*, v.38, n.2, p.1-3, 2004.
- RUFINO, M. DO SOCORRO M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., DE MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. DE G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH**. Embrapa-Comunicado Técnico online, 2007.
- RUFINO, M. DO SOCORRO M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., DE MORAIS, S. M., SAMPAIO, C. DE G., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. Embrapa-Comunicado Técnico online, 2006.
- SANTOS, M.D. dos; BLATT, C.T.T. **Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado**. *Revista Brasileira de Botânica*, São Paulo, v. 21, n. 2, ago. 1998.
- SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, p.654-658, 2009.
- SOUSA, C.M.M., SILVA, H.R., VIEIRA-JR., G.M., AYRES, M.C.C., COSTA, C.L.S., ARAÚJO, D.S., CAVALCANTE, L.C.D., BARROS, E.D.S., ARAÚJO, P.B.M., BRANDÃO, M.S., CHAVES, M.H. **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. *Química Nova* v. 30, Supl. 2, p. 351-355, 2007.
- SILVA, A. A. S; MORAIS, S. M.; MARTINS, C. G.; VIEIRA-ARAÚJO, F. M. **Antileishmanial and antioxidant potential of the ethanol extract of *Croton argyrophylloides* Muell. Arg.** *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.13, n.3, p.165-171, 2016.