



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DAS FRAÇÕES DE *Psychotria Deflexa* DC. (RUBIACEAE) ATRAVÉS DO MÉTODO DPPH•

Diego C. Ferreira^{*1}; Matheus S. Silva²; Anelise S. Nazari Formagio³

¹UEMS/Química Industrial, Caixa postal 351 - CEP: 79804-970 Dourados - MS,

¹PIBIC/UFGD/ CNPq. ²PIBIC/UFGD/ CNPq. ³Professora Pesquisadora UFGD/FCA

*E-mail: ferreira.diego22@yahoo.com.br

RESUMO

Compostos secundários tem uma ampla ação biológica em seres humanos, resultando em importância econômica. *P. deflexa* (Rubiaceae), uma planta típica da região tropical, encontrada no cerrado brasileiro, esta família apresenta elevado potencial de flavonóides, compostos fenólicos, antioxidantes, entre outros. Devido a escassez de dados para a espécie, foi realizado a avaliação do potencial antioxidante através do método de DPPH• (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato). O extrato bruto metanólico foi obtido através das folhas de *P. deflexa*, colhidas na Fazenda Coqueiro, Dourados-MS. O extrato bruto metanólico, foi obtido através da maceração eaustiva em metanol e posteriormente rotaevaporado. A atividade antioxidante foi realizada pelo método do DPPH, obtendo-se o valor de $IC_{50}=21.2 \mu\text{g/mL}$. Para uma porção do extrato bruto, foi realizado o particionamento Líquido-Líquido, obtendo-se as frações: clorofórmio, acetato de etila, hidrometanólica e hexano que foram analisadas posteriormente pelo teste de DPPH• obtendo os seguintes valores de $IC_{50}= 14.49, 13.26$ e $1.5\mu\text{g/mL}$, exceto a fração hexano que não obteve valores significativos referentes ao potencial antioxidante.

Palavras-chave: Frações, Antioxidante, Extração.

INTRODUÇÃO

A família Rubiaceae, uma das maiores dentre as angiospermas, compreende cerca de 13.000 espécies distribuídas em 650 gêneros e 44 tribos, dos quais possuem importância econômica, agrícola, ornamental e medicinal (LIMA *et al.*, 2009). O gênero *Psychotria* é o maior da família Rubiaceae e possui cerca de 1400 espécies com ampla distribuição na zona tropical. De acordo com a literatura, há descrição do estudo fitoquímico de diversas espécies deste gênero com isolamento de alcalóides e iridóides (LOPES *et al.*; 2004).

Espécies de *Psychotria* tem importante papel na medicina tradicional, onde o uso interno mais frequente refere-se a diversos tipos de doenças, como as brônquicas, do aparelho reprodutor feminino, distúrbios gastrointestinais. Através do uso externo, relata-se na literatura a aplicação em afecções cutâneas, tumores, úlceras e distúrbios oculares (LAJIS *et al.*, 1993; PERRY, 1980).

Através de estudos etnofarmacológicos, psiquiatras indicam que plantas utilizadas tradicionalmente por nigerianos possuem anti-psicóticos do tipo alcalóides, como reserpina (a partir de gêneros *Rauwolfia*, *Picralima*, *Alstonia* e *Psychotria*) que podem ter potencial e propriedades antipsicóticas. Desta forma, as formulações veem a ser uma combinação casual de compostos com diferentes mecanismos de ação (ELISABETSKY, 2002).

Os organismos aeróbicos possuem uma taxa de radical livre em seu organismo, devido ao processo respiratório na mitocôndria, através da transferência de elétrons, que utilizam o oxigênio molecular para obtenção de energia química na forma de adenosina trifosfato (BOVERIS, 1998). Em particular, a formação de radicais livres, corresponde à uma ligação e intensificação direta de doenças autoimunes e neurodegenerativas, desta forma, sugere-se o controle com fármacos mais eficazes para o tratamento. (THOMAS; KALYANARAMAN, 1997). Entre as doenças neurodegenerativas, o mal de Parkinson e a doença de Alzheimer, apresentam maior impacto na vida das pessoas, sua patogênese está correlacionada com a formação de espécies reativas no sistema nervoso central, além de fatores etiológicos e genéticos (GIASSON *et al.*, 2002).

As substâncias antioxidantes podem ser naturais ou artificiais. Os naturais podem ser encontrados principalmente em plantas, na forma de compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos, alcoóis, tocoferóis, tocotrienóis), ácido ascórbico e carotenóides. Para os antioxidantes artificiais podem ser citados butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA) e o ácido cítrico, que retardam as reações de degradação oxidativa, ou seja, reduzem a

velocidade da oxidação por um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (MATTOS et al, 2009).

O método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um ensaio antioxidante baseado em transferência de elétrons que produz uma solução violeta. Este radical livre, estável à temperatura ambiente, é reduzido na presença de uma molécula de antioxidante, dando origem a uma solução amarela. A utilização do método de DPPH proporciona um modo fácil e rápido para avaliar antioxidantes por espectrofotometria, por isso pode ser útil para avaliar vários produtos de uma só vez (GARCIA et al., 2012).

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato bruto e das frações de *Psychotria deflexa* através do método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila).

METODOLOGIA

O presente estudo foi realizado em Dourados (Mato Grosso do Sul), na Universidade Federal da Grande Dourados –UFGD, laboratório de Plantas Mediciniais- Faculdade de Ciências Agrárias –FCA.

1- Preparação do extrato metanólico

P. deflexa foi coletada na fazenda Coqueiro, localizada na cidade de Dourados, Mato Grosso do Sul e identificada pela Dra. Zefa Valdevina Pereira. Posteriormente, uma exsicata foi depositada no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), Dourados, MS. A secagem das partes aéreas do vegetal (folhas e galhos) foi realizada em estufa de circulação de ar a 45 ± 5 °C por 48 horas e, em seguida, triturado em moinho de facas. A amostra foi submetida à maceração exaustiva com metanol, posteriormente filtrada e concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, para a obtenção do extrato metanólico.

2- Determinação do método de DPPH

A investigação da atividade antioxidante dos compostos foi realizada pelo método fotolorimétrico *in vitro* do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), utilizando como controle positivo o BHT. O método consiste no monitoramento do consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através do decréscimo da medida de absorbância. As amostras foram preparadas a partir de 20mg de cada composto em 10mL de metanol.

Alíquotas de 1mL das amostras foram adicionadas a 2mL da solução de DPPH 0,0047% e incubadas na temperatura ambiente por 30 minutos. A leitura da absorbância de

cada amostra foi realizada no espectrofômetro a 515nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de inibição (% I) foi calculada pela fórmula: $\% I = (A_0 - A)/A_0 \times 100$. Onde A_0 é a absorbância do DPPH (controle) e A é a absorbância da amostra mais DPPH.

O método de radicais livres está baseado no descolorimento de uma solução composta por radicais livres estáveis DPPH de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (HAUNG *et al.*, 2005; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995) (**Figura 1**), fundamenta-se em medidas espectrofotométricas de descoloração.

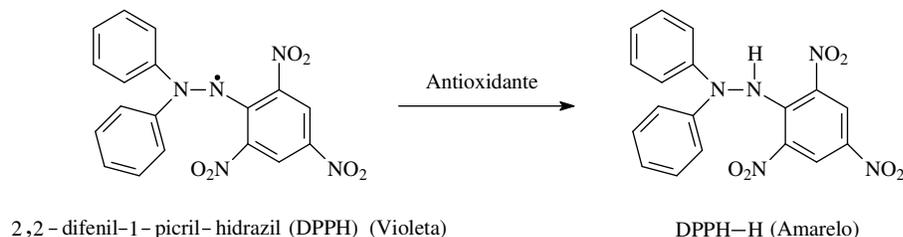


Figura 1. Descoloração do radical livre DPPH.

3- Extração Líquido-Líquido

O procedimento de extração Líquido-Líquido consiste na separação de amostra, entre duas fases imiscíveis (orgânica e aquosa), através de diferentes solventes com diferentes polaridades (QUEIROZ *et al.*, 2001). Preparou-se uma solução (A) com uma porção obtida do extrato bruto de *Psychotria deflexa* (12,301g), metanol (75mL) e água destilada (75mL). A solução A, foi submetida em funil de decantação e dissolvida em diferentes solventes com diferentes volumes, hexano (0,6L), clorofórmio (0,6L) e acetato de etila (2,4L), originando as frações hexânica, clorofórmio, acetato e hidrometanólica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1- Extração Líquido-Líquido

A eficácia do método de extração depende diretamente da afinidade entre o soluto e o solvente de extração. Esta metodologia exibe a eficiência e seletividade com inúmeros solventes, como também evita a contaminação da purificação através da desnaturação de proteínas, a técnica é realizada principalmente em um funil de decantação (QUEIROZ *et al.*, 2001). Cada solvente utilizado, tem afinidade por determinados constituintes químicos, separando-os da amostra, conforme Tabela 1. Os resultados da extração Líquido-Líquido são apresentados na Tabela 2.

Tabela 1. Propriedades dos solventes.

Solvente	Classe	Extração
<i>Hexano</i>	Hidrocarboneto alifático	Esteroides, terpenos, ácidos graxos, hidrocarbonetos e acetofenonas
<i>Clorofórmio</i>	Hidrocarboneto halogenado	Lipídeos polares e apolares
<i>Acetato de etila</i>	Estér oxigenado	Flavonóides, taninos, xantonas, saponinas, ácidos triterpênicos e compostos fenólicos.

Tabela 2. Frações com massa obtida, comparando com o rendimento do extrato bruto (12,301g).

Frações	Massa (g)	% Rendimento
Hexânica	0,614	4,99
Clorofórmio	0,337	2,74
Acetato	7,08	57,56
Hidrometanólica	4,27	34,71
Total	12,301	100

2- Avaliação antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de descoloramento do radical livre DPPH, mostrou que o extrato metanólico de *P. deflexa* apresentou significativa atividade antioxidante com valor de $IC_{50} = 21.2 \mu\text{g/mL}$ (**Figura 2**), quando comparado com o padrão BHT ($16,7 \mu\text{g/mL}$).

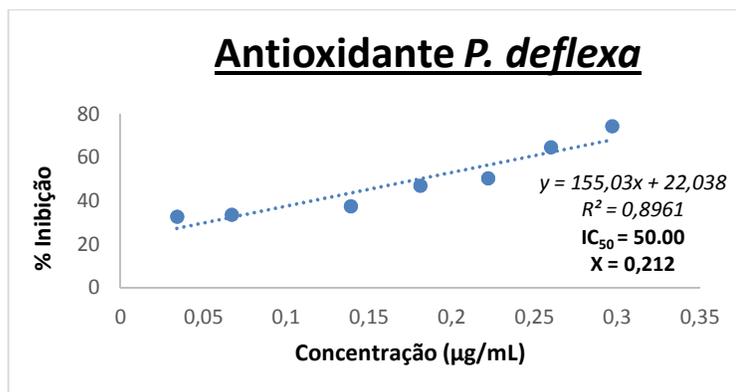


Figura 2. Curva analítica do Teste antioxidante (DPPH)

As frações clorofórmio, hidrometanólica e acetato, apresentaram atividade respectivas de IC_{50} = 14.49, 13.26 e $1.5\mu\text{g/mL}$ (**Figura 3**). Para a fração hexano, não foi obtido resultado significativo de IC_{50} pois não possui afinidade com compostos fenólicos.

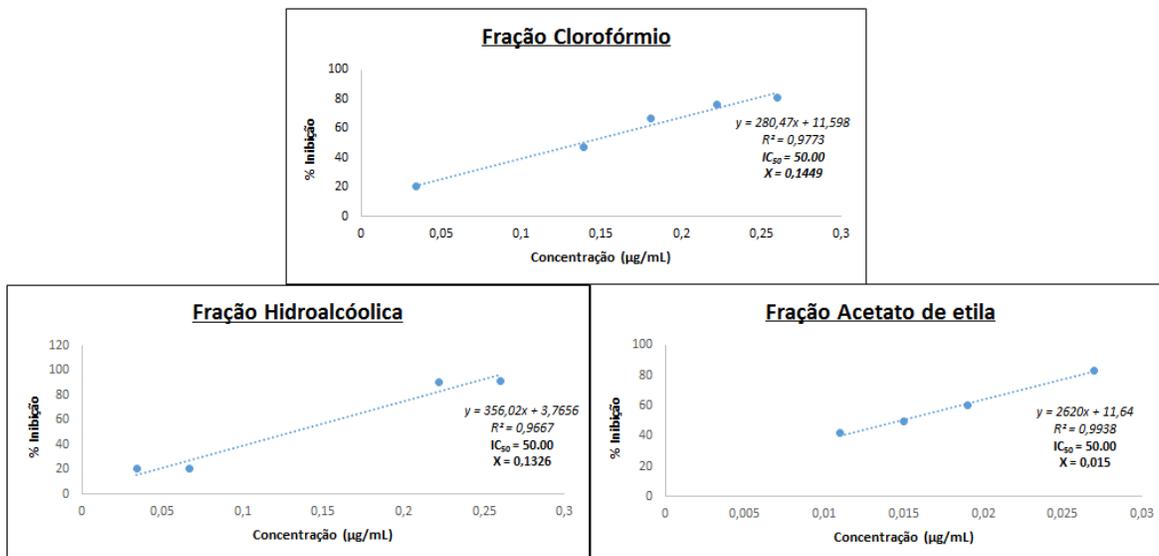


Figura 3. Curva analítica das frações.

O método do DPPH• baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH•, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida e passa a coloração amarela, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (BRAND-WILLIAMS et al., 1995). O radical estável DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) reage com a substância antioxidante e é convertido a 2,2-difenil-1-picril hidrazina. O grau de descoloração indica a capacidade do extrato em sequestrar o radical livre. Um alto potencial de sequestrar radicais livres é expresso através de um baixo índice de IC_{50} , pois quanto menor a concentração utilizada do extrato para inibir a oxidação pelo radical em 50%, melhor atividade antioxidante.

Tem sido sugerido que o conteúdo fenólico de diferentes partes do material vegetal está correlacionado com a sua atividade antioxidante (VELIOGLU et al., 1998). Desta forma, a fração hexano devido ao seu potencial extrativo, não se encaixa na avaliação antioxidante através do método de DPPH•. A fração acetato de etila, resultou em uma concentração mais efetiva em relação ao extrato bruto, necessitando de uma quantidade de $19.7\mu\text{g/mL}$ menor, para atingir o valor do extrato bruto.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação da atividade antioxidante através do método de descoramento do radical livre DPPH•, demonstrou que as frações obtidas através do particionamento, apresentam valores significativos comparados ao extrato bruto e ao padrão BHT. Estes valores são atribuídos à elevada quantidade de compostos fenólicos presentes nas frações, com exceção da fração hexano a qual não apresenta afinidade por compostos fenólicos.

REFERÊNCIAS

- BOVERIS, A. Biochemistry of free radicals; from electrons to tissues. *Medicina*, v.58 p. 350-356, 1998.
- BRAND-WILLIAMS, M.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm – Wiss,u- Techno.*, v.28 p. 25-30, 1995.
- ELISABETSKY, E. Traditional medicines and the new paradigm of psychotropic drug action. *Ethno medicine and drug discovery*, p. 138-139, 2002.
- GARCIA, E.J.; OLDONI, T.L.C.; ALENCAR, S.M.de; REIS, A.; LOGUERCIO, A.D.; GRANDE, R.H.M. Antioxidant activity by DPPH assay of potential solutions to be applied on bleached teeth. *Brazilian dental journal*, v.23 n°1, 2012.
- GIASSON, B. I.; ISCHIROPOULOS, H.; LEE, V. M-Y.; TROJANOWSKI, Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 32 p. 1264-1275, 2002.
- HAUNG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal Agriculture Chemistry*, v. 53 p. 1841-1856, 2005.
- LAJIS, N.H.; MAHMUD, Z.; TOIA, R.F. The alkaloids of *Psychotria rostrate*. *Planta Méd.*, v.59 p.383-384, 1993.
- LIMA, G.S.; MOURA, F.S.; LEMOS, R.P.L.; CONSERVA, L.M. Triterpenos de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.19 p. 284-289, 2009.
- LOPES, S.; POSER, G. L. V.; KERBER, V.A.; FARIAS, F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Taxonomic significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe *Psychotrieae* (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.32 p. 1187-1195, 2004.

MATTOS, L.M.; MORETTI, C.L.; MUNIZ L.B.; SILVA, E.Y.Y. da. Protocolo de análise para determinação da atividade antioxidante total em hortaliças no sistema Beta-caroteno/ácido linoléico. *Embrapa -ComunicadoTécnico*, p.1-2, 2009.

PERRY, L.M. Rubiaceae. In: Medicinal plants of east and southeast Asia. *MIT Press*, p. 347 - 360, 1980.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quimica Nova*, v. 24 nº 1 p. 68-76, 2001.

THOMAS, C.E.; KALYANARAMAN, B. Oxygen radicals and the disease process. *Harwood Academic Publishers*, p. 237-277, 1997.

VELIOGLU, Y.S.; MAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B.D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal Agriculture Food Chemistry*, v. 46 p. 4113-4117, 1998.