

Avaliação de polifenóis e capacidade antioxidante de seis espécies da Mata Atlântica

S. M. Clemes¹; A. Beirith²; A. L. B. Zeni^{2*}

¹Curso de Ciências Biológicas, Universidade Regional de Blumenau- FURB, 89012-900, Blumenau- SANTA CATARINA, Brasil

²Departamento de Ciências Naturais, Universidade Regional de Blumenau-FURB, 89012900, Blumenau-SANTA CATARINA, Brasil

*zeni.ana@gmail.com

(Recebido em 10 de outubro de 2014; aceito em 04 de março de 2015)

As plantas medicinais são uma importante fonte de antioxidantes e esta atividade parece ter relação com os compostos fenólicos encontrados em cada espécie. Este estudo teve como objetivo quantificar polifenóis totais e investigar a capacidade antioxidante de seis diferentes espécies utilizadas na medicina popular: *Leandra* sp, *Elephantopus mollis* Kunth. (EM), *Alternanthera dentata* Moench, *Sambucus australis* Cham. & Schldtl, *Tillandsia usneoides* L. e *Psidium guajava* L. Extratos aquosos e etanólicos foram analisados pelo método Folin-Ciocalteu para compostos fenólicos e o método de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) para avaliação da capacidade antioxidante. As concentrações de polifenóis encontradas nos extratos aquosos foi 0,26 – 12,84 mg/g e nos etanólicos foi 10,56 – 17,03 mg/g. Os índices de capacidade antioxidante em extratos etanólicos ficaram entre 17,8 a 89,4% e os extratos etanólicos 79,05 a 87,1%. A correlação obtida entre capacidade antioxidante e a quantidade de polifenóis dos extratos etanólicos testados no método DPPH foi: $R_2 = 0,74$ e para os extratos aquosos, $R_2 = 0,26$. Todas as espécies aqui estudadas apresentaram potencial antioxidante, com destaque para os extratos etanólicos em relação aos aquosos.

Palavras-chave: Mata Atlântica. Plantas medicinais. Fitoquímica.

Polyphenols assessment and antioxidant capacity of six species of the Atlantic Forest

Medicinal plants are important sources of antioxidants and in its activity have been implicated compounds such as polyphenols. This study aimed to quantify total polyphenols and measure antioxidant capacity of six different species used in folk medicine: *Leandra* sp, *Elephantopus mollis* Kunth, *Alternanthera dentata* Moench, *Sambucus australis* Cham. & Schldtl., *Tillandsia usneoides* L. and *Psidium guajava* L. Polyphenolic compounds and antioxidant capacity of the aqueous and ethanolic extracts were analyzed by Folin-Ciocalteu and by 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) methods, respectively. The concentration of polyphenols found in the aqueous extracts were from 0.26 to 12.84 mg/g and in the ethanolic extracts were from 10.56 to 17.03 mg/g. The levels of antioxidant capacity obtained in aqueous extracts were from 17.8 to 89.4% and among the ethanolic extracts were from 79.05 to 87.1%. The correlation between antioxidant capacity and polyphenols content of aqueous and ethanolic extracts tested were $R_2 = 0.26$ and $R_2 = 0.74$, respectively. All species studied here showed a high antioxidant potential, especially in the ethanolic extracts.

Keywords: Atlantic Forest. Medicinal plants. Phytochemistry.

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, as pesquisas fitoquímicas têm sido desenvolvidas principalmente a partir do conhecimento popular, embora exista uma tendência de que resultados definitivos sejam obtidos com o avanço dos procedimentos técnicos aplicados para extração, identificação e análises de compostos oriundos de plantas medicinais ^[1].

A ação protetora das plantas medicinais tem sido atribuída à presença de compostos antioxidantes, em especial polifenóis e vitaminas, uma vez que o oxigênio e os radicais livres contribuem para oxidação de biomoléculas, favorecendo o surgimento de doenças cardiovasculares,

inflamatórias, neurodegenerativas e neoplásicas ^[2]. Existe uma relação positiva entre compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante nas plantas ^[3;4]. A atividade antiinflamatória de certas plantas medicinais também pode ser explicada por sua atividade antioxidante, uma vez que tal ação é associada à presença de fenóis e flavonóides ^[5;6].

Compostos fenólicos antioxidantes reagem individualmente ou em combinações como anticancerígenos e/ou cardioprotetores, através de mecanismos variados, já as vitaminas C e E são associadas a mecanismos de proteção juntamente com carotenóides. A atividade química dos polifenóis como antioxidante é devida à capacidade reducional através da doação de hidrogênio ou elétrons ^[7].

Biavatti et al.^[8] citaram a importância da capacidade antioxidante de determinadas plantas para utilização como cosméticos. Contudo, a maioria das espécies utilizadas popularmente não apresenta estudos prévios referentes à sua composição química e efetiva propriedade medicinal.

A diversidade biológica das florestas favorece uma grande diversidade química, sendo que a Mata Atlântica de Santa Catarina é um grande reservatório de conhecimento inexplorado. Nela podemos identificar fontes alternativas de substâncias já utilizadas e também de novos compostos. Gottlieb e Borin^[1] enfatizaram a necessidade de integrar o conhecimento popular e a tecnologia, com estudos etnobotânicos e científicos, observando assim os padrões e tendências em seu funcionamento natural.

Em estudo prévio, Clemes, Zeni e Kretschmar^[9] realizaram análises qualitativas fitoquímicas de metabólitos secundários em *Leandra* sp., *Elephantopus mollis*, *Alternanthera dentata*, *Sambucus australis*, *Tillandsia usneoides* e *Psidium guajava*. O presente estudo teve o objetivo de quantificar os polifenóis e avaliar a capacidade antioxidante e a possível correlação entre os dois fatores nos extratos aquosos e etanólicos destas espécies da flora nativa.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

As folhas e pecíolos de *Leandra* sp. (Melastomataceae), *Elephantopus mollis* (Asteraceae), *Alternanthera dentata* (Amaranthaceae) foram coletadas no dia 16 de março de 2006 enquanto que, *Sambucus australis* (Adoxaceae), *Tillandsia usneoides* (Bromeliaceae) e *Psidium guajava* (Myrtaceae) foram coletadas no dia 13 de junho de 2006, no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí, SC, nos municípios de Blumenau (26°55'08" e 49°03'57"), Nova Trento (27°17'10" e 48°55'48"), Indaial (26°53'52" e 49°13'54") e Brusque (27°05'55" e 48°55'04") . O material vegetal foi identificado e depositado no Herbário Miguel Klein na Universidade Regional de Blumenau. Informações e números de registro encontram-se abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Principais indicações populares e dados de coleta das seis plantas estudadas.

Nome científico	Nome popular	Indicações populares	Local	Nº Registro	Referências
<i>Psidium guajava</i>	Goiabeira	Antidiarréico, antipirético e anti-inflamatório	Blumenau/SC	1766	[10, 11]
<i>Leandra sp.</i>	Pixirica	Bronquite	Nova Trento/SC	1750	[12]
<i>Elephantopus mollis</i>	Mata-pasto	Cólicas	Nova Trento/SC	3325	[13]
<i>Sambucus australis</i>	Sabugueiro	Bronquite, diabetes, gripe, anti-inflamatória e antisséptica	Blumenau/SC	3364	[13]
<i>Tillandsia usneoides</i>	Barba-de-velho	Bronquite crônica, analgésico, reumatismo e hemorroidas	Indaial/SC	3634	[14]
<i>Alternanthera dentata</i>	Penicilina	Diurética, digestiva e anti-inflamatória	Brusque/SC	1500	[15]

2.2. Preparação dos extratos

Foram utilizados folhas e pecíolos como material vegetal, este foi seco em estufa a 40°C, livre de patógenos e materiais estranhos. Os extratos foram subdivididos em: a) Extrato aquoso (infusão): 10 g do material vegetal triturado foram adicionados a 100 mL de água fervente por 10 min. b) Extrato etanólico: 30 g de material vegetal triturado foi misturado com etanol a 80%. Os recipientes foram tampados e armazenados em ambiente escuro por 15 dias. Após, os extratos foram reduzidos em rotavapor e liofilizados. Em todas as análises foi utilizada a concentração padrão de 1 mg/mL para todas as amostras testadas.

2.3. Determinação de fenóis totais

O método Folin-Ciocalteu utilizado para análise de compostos polifenólicos foi adaptado de Pilarski et al.^[6]. Foram misturados 250 µL da amostra e 250 µL de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) (1:1) e, posteriormente, adicionados 500 µL de carbonato de sódio a 20% e 4 mL de água destilada. Após agitado, o tubo foi deixado em repouso por 25 min em temperatura ambiente e depois centrifugado a 5000 rpm durante 10 min. Os experimentos foram realizados em triplicata e a leitura em espectrofotômetro (Spectrum SP-2000 UV) a 725 nm. O resultado foi expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico por grama de extrato (mgAG/g).

2.4. Avaliação de capacidade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada através do método DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (Sigma-Aldrich), que consiste em avaliar a atividade sequestradora do radical livre DPPH, de coloração púrpura, que absorve em 515 nm. O método utilizado foi modificado de Brand-Williams, Cuvelier e Berset^[16] e Kim, Guo e Packer^[17]. À 0,1 mL da amostra dos extratos foram adicionados 2,9 mL do radical DPPH. Os tubos foram agitados e deixados em repouso por 30 min em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após este período realizou-se a leitura em espectrofotômetro em 515 nm. Todos os

experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como % de inibição do radical e como padrões positivos foram utilizados ácido 6-hidroxi- 2, 5, 7,8-tetrametilcromo-2 carboxílico (Trolox) (Fluka), quercetina (Sigma) e 2,6-di-t-butil-4-metilfenol (BHT) (Fluka).

Cálculo dos resultados:

$$\% \text{ capacidade antioxidante} = (1 - A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100$$

Os resultados de correlação foram obtidos segundo Mensor et al.^[8], entre atividade antioxidante e compostos fenólicos e expressos como atividade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC - Figura 1b), mmol TEAC/g \pm desvio padrão (DP).

2.5. Análise estatística

Todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos como médias \pm DP e submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida do Teste de Tukey para determinar diferenças ($p \leq 0.05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a medicina popular, as plantas utilizadas nesta pesquisa são utilizadas principalmente no combate a bronquite, como anti-inflamatório e diurético entre outras afecções citadas na Tabela 1. Entretanto, pouco é descrito na literatura científica sobre suas atividades biológicas e sua caracterização química.

Os resultados da determinação de polifenóis obtidos conforme o método Folin-Ciocalteu foram expressos mgAG/g (Figura 1A e Tabela 2). As maiores concentrações de polifenóis em extratos aquosos foram encontradas na seguinte ordem decrescente, *T. usneoides* > *Leandra* sp = *P. guajava* > *E. mollis* = *A. dentata* > *S. australis* (0,26 – 12,84 mg/g). Nos extratos etanólicos foram *Leandra* sp e *E. mollis* > *P. guajava*, *S. australis*, *T. usneoides* e *A. dentata* (10,56 – 17,03 mg/g). Embora existam diferenças significativas entre os extratos, observa-se que a concentração de polifenóis das amostras de forma geral foi maior nos extratos etanólicos, confirmando que estas extrações, em termos de compostos fenólicos, foram mais eficientes ^[6;4:19].

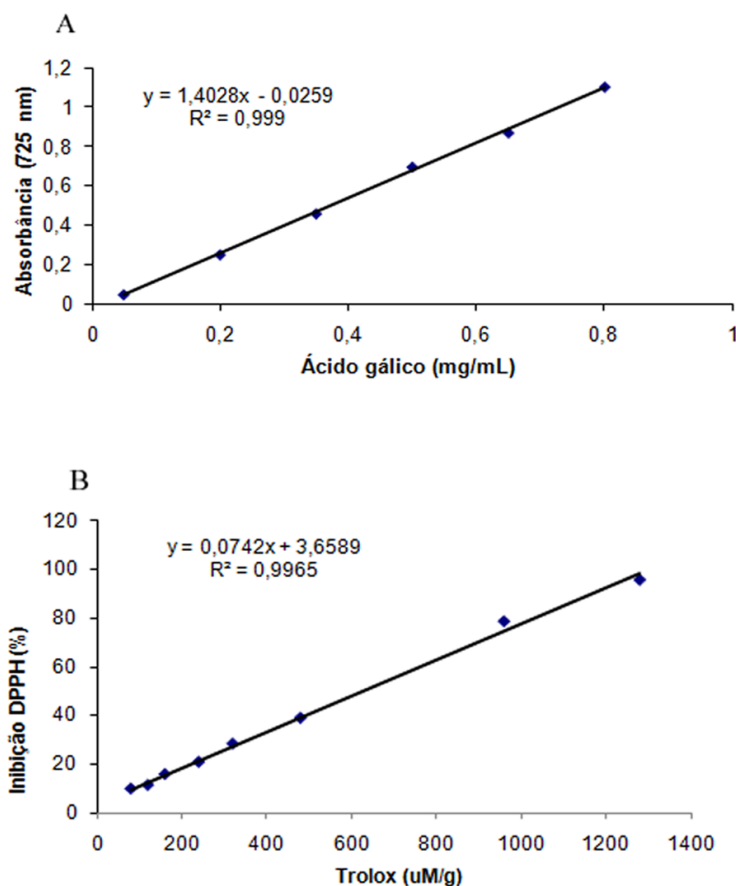


Figura 1: Curva de calibração do ácido gálico (A). Curva de calibração com Trolox (B).

Tabela 2: Quantificação de compostos fenólicos totais (mg/g) e avaliação da capacidade antioxidante, TEAC (mmol/g) de seis plantas nativas.

Nome científico	AQ	TEAC AQ	EtOH	TEAC EtOH
<i>Psidium guajava</i>	8,83± 0,05 ^a	0,42±0,01 ^a	11,1± 0,11 ^a	1,07±0,03 ^a
<i>Leandra sp</i>	9,5 ± 0,08 ^a	1,14±0,00 ^b	17,03± 0,08 ^b	1,14±0,01 ^a
<i>Elephantopus mollis</i>	4,06± 0,06 ^b	0,59±0,01 ^a	14,9± 0,36 ^b	1,10±0,00 ^a
<i>Sambucus australis</i>	0,26± 0,02 ^c	0,87±0,03 ^c	12,32± 0,06 ^a	1,10±0,02 ^a
<i>Tillandsia usneoides</i>	12,84±0,01 ^d	0,12±0,00 ^d	12,01± 0,24 ^a	1,08±0,01 ^a
<i>Alternanthera dentata</i>	4,9± 0,06 ^b	0,05±0,03 ^c	10,56± 0,11 ^a	1,02±0,01 ^a

Valores médios na mesma coluna seguidos pelas mesmas letras são significativamente iguais ($p \leq 0,05$).

AQ=Extrato aquoso e EtOH=extrato etanólico.

A avaliação quantitativa da capacidade antioxidante (%) encontra-se na Figura 2 e valores em TEAC (Figura 1B) na Tabela 2, com resultados obtidos com extratos etanólicos e aquosos, quercetina, Trolox e BHT foram utilizados como controles positivos, sendo o último amplamente aplicado na indústria de alimentos.

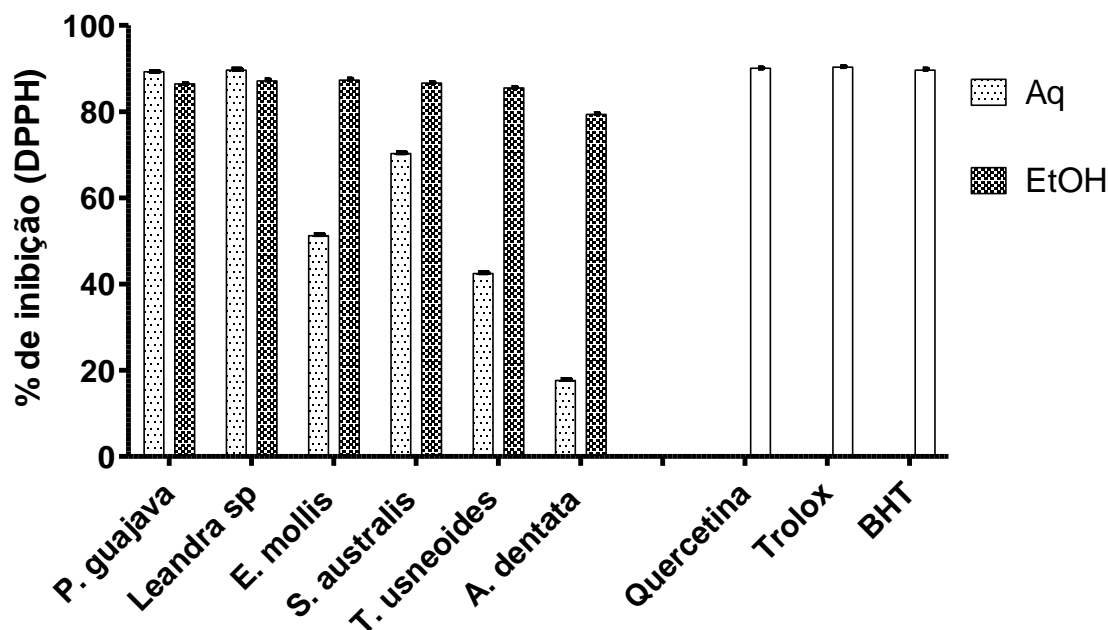


Figura 2: Avaliação da capacidade antioxidante (%) de seis espécies da Mata Atlântica. Extrato aquoso (Aq) e extrato etanólico (EtOH). 1. *Psidium guajava*, 2. *Leandra sp* 3. *Elephantopus mollis* 4. *Sambucus australis* 5. *Tillandsia usneoides* 6. *Alternanthera dentata*, 7. *Quercetina* 8. *Trolox* 9. *BHT*.

Os maiores índices de capacidade antioxidante dos extratos aquosos foram obtidos na seguinte ordem *Leandra sp* > *S. australis* > *P. guajava* e *E. mollis* > *T. usneoides* > *A. dentata* (Tabela 2). Os extratos etanólicos, apesar das diferenças significativas em relação ao conteúdo de polifenóis, não apresentaram diferenças em relação à capacidade antioxidante. Todas as amostras etanólicas apresentaram alta capacidade antioxidante sem diferenças significativas entre elas. Os extratos aquosos apresentaram diferenças estatísticas significativas entre as espécies, sugerindo uma maior diversidade de compostos, entretanto, um rendimento inferior em compostos fenólicos resultou em menores valores na capacidade antioxidante.

Comparando quantidade de polifenóis e capacidade antioxidante, *Leandra sp* e *P. guajava* tiveram os mesmos rendimentos polifenólicos nos dois tipos de extratos e alta capacidade antioxidante, ao contrário de *A. dentata*, que obteve os valores baixos. *E. mollis* e *S. australis* possuem diferentes valores de polifenóis e semelhante poder antioxidante, sugerindo a participação de outras substâncias além dos polifenóis na inibição do radical. Resultado semelhante ocorreu para a espécie *T. usneoides*, altos valores de polifenóis parecem não ter contribuído com o resultado obtido para capacidade antioxidante.

A correlação obtida neste estudo entre capacidade antioxidante e composição fenólica dos extratos etanólicos, $R_2 = 0,74$ e os extratos aquosos, $R_2 = 0,26$, demonstram que, quanto aos primeiros existe uma correlação positiva entre polifenóis e capacidade antioxidante, o mesmo não acontecendo com os extratos aquosos, nos quais outras moléculas parecem estar sendo responsáveis pela capacidade

antioxidante. Existem compostos com reconhecida capacidade antioxidante pertencentes a outras classes de moléculas como, carotenóides, vitaminas C e E e os terpenóides.

A atividade antioxidante de muitas plantas pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos, por terem a capacidade de sequestrarem radicais livres, apresentando uma atividade antioxidante eficiente^[4]. Portanto, espera-se uma relação positiva entre a concentração de polifenóis e a capacidade antioxidante. Porém, o inverso foi demonstrado pelo extrato aquoso de *T. usneoides*, cuja quantificação polifenólica atingiu 12,84 mgAG/g e obteve somente 51,4% de inibição do radical DPPH. Quando comparamos as amostras com quantificação polifenólica semelhante, observamos que estas obtiveram uma capacidade antioxidante superior, porém o extrato etanólico dessa mesma planta obteve uma correlação positiva entre estes fatores.

P. guajava não apresentou diferenças entre os extratos aquoso e etanólico, tanto em quantidade de polifenóis quanto em relação à capacidade antioxidante, reforçando assim suas conhecidas aplicações fitoterápicas^[20:21]. Esta espécie demonstrou potencial antioxidante elevado, assim como apresentado por Iha et al.^[22], mostrando atividade reducional semelhante à apresentada pelo BHT. Outros autores também estudaram os extratos de folhas de *P. guajava* e diferentemente do presente estudo observaram compostos fenólicos em maior quantidade no extrato etanólico do que no extrato aquoso^[23, 24] porém, uma capacidade antioxidante máxima de 88,23% e 88,07% em extratos aquosos e metanólicos, respectivamente^[24] semelhante a este estudo, as diferenças não foram significativas entre os tipos de extrato quanto à capacidade antioxidante para *P. guajava*. Além disso, a comparação com o BHT utilizada aqui é interessante, pois é um composto antioxidante industrial, sintético e reconhecidamente tóxico, o que vem estimulando pesquisas em busca compostos naturais com potencial antioxidante mas sem apresentar toxicidade^[4].

4. CONCLUSÃO

As espécies estudadas apresentaram efeito antioxidante significativo, principalmente os extratos etanólicos. Em relação às diferenças de resultados obtidos entre extratos aquosos e etanólicos, futuros estudos devem levar em conta além da identificação e quantificação dos compostos fenólicos presentes, a participação de outras classes de moléculas, como vitaminas, carotenóides e taninos, possivelmente presentes nesses extratos e capazes de influenciar na atividade antioxidante.

Considerando que substâncias naturais podem oferecer proteção contra os efeitos nocivos dos radicais livres, o presente estudo indica que estas espécies nativas a maioria com escassa literatura científica têm potencial atividade antioxidante e merecem ser objetivo de mais estudos de caracterização química e atividade biológica para tornar sua aplicação tradicional terapêutica segura e eficiente para a população.

5. AGRADECIMENTOS

Ao programa de iniciação científica Pipe/ART 170, pelo apoio financeiro. A equipe do Laboratório de Frutas e Hortaliças da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e do Laboratório de Bioquímica da Universidade Regional de Blumenau (FURB).

-
1. Gottlieb OR, Borin MRMB. Shamanism or science? *An. Acad. Bras Ciênc.*, 2002; 74(1):135-144.
 2. Jang H, Jang H, Chang K, Huang Y, Hsu C, Lee S, Su M. Principal phenolic phytochemicals and antioxidant activities of three Chinese medicinal plants. *Food Chem.* 2007;103(3):749-756.

3. Lim YY, Quah EPL. Antioxidant properties of different cultivars of *Portulaca oleracea*. *Food Chem.*, 2007;103(3):734-740.
 4. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quím. nova*, 2007;30(2): 351-355.
 5. Santos TG. Avaliação da atividade antioxidante da espécie *Serjania erecta* RADLK [monografia]. Blumenau: Curso de Farmácia/Universidade Regional de Blumenau; 2007.
 6. Pilarski R, Zieliński H, Ciesiołka D, Gulewicz K. Antioxidant activity of ethanolic and aqueous extracts of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. *J. Ethnopharmacol.*, 2006;104(1-2):18-23.
 7. Rice-Evans CA, Miller N, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.*, 1997;2(4):152-159.
 8. Biavatti MW, Marensi V, Leite SN, Reis A. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmetic species from Atlantic Forest. *Rev. Bras. Farmacog.*, 2007;17(4):640-653.
 9. Clemes SM, Zeni ALB, Kretschmar M. Avaliação química de folhas de plantas medicinais nativas utilizadas no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí (PNSI). *Rev. Bras. Farmácia*, 2008;89(1):10-12.
 10. Almeida CE, Karnikowski MGO, Foletto R, Baldisserotto B. Analysis of antidiarrhoeic effect of plants used in popular medicine. *Rev. Saúde Públ.*, 1995;29(6):428-433.
 11. Zeni ALB, Bosio F. O uso de plantas medicinais em uma comunidade rural de Mata Atlântica – Nova Rússia, SC. *Neotrop Biol Conserv.*, 2011;6(1):55-63.
 12. Bosio F & Zeni ALB. Medicinal plants used in Nova Rússia, Brazilian Atlantic Rain Forest. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 2006;8:167-171.
 13. Garlet TMB & Irgang BE. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 2001;4(1):9-18.
 14. Mentz LA, Lutzemberger LC, Schenkel EP. Da flora medicinal do Rio Grande do Sul: notas sobre a obra de D'Ávila (1910). *Caderno de Farmácia*, 1997;13(1):25-48.
 15. Silva MD, Dreveck S, Zeni ALB. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população rural no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí – Indaial. *Revista Saúde e Ambiente*, 2009;10(2):54-64.
 16. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT*, 1995;28(1):25-30.
 17. Kim YK, Guo Q, Packer L. Free radical scavenging activity of red ginseng aqueous extracts. *Toxicol.*, 2002;172(2):149-156.
 18. Mensor LL, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitão SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother. Res.*, 2001;15(2),127-130.
 19. Spigno G, Tramelli L, Faveri DM. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.*, 2007;81(1): 200-208.
 20. Gonçalves JLS, Lopes RC, Oliveira DB, Costa SS, Miranda MM, Romanos MT, Santos NS, Wigg MD. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *J. Ethnopharmacol.*, 2005;99(3):403-407.
 21. Almeida MMB, Lopes MFG, Sousa PHM, Nogueira CMD, Magalhães CEC. Determinação de umidade, fibras, lipídios, cinzas e sílica em plantas medicinais. *Bol. Ceppa*, 2003;21(2): 343-350.
 22. Iha SM, Migliato KF, Velloso JCR, Sacramento LVS, Pietro LCLR, Isaac VLB, Brunetti IL, Corrêa MA, Salgado HRN. Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev. Bras. Farmacogn*, 2008;18(3):387-393.
 23. Qian H, Nihorimbere V. Antioxidant power of phytochemicals from *Psidium guajava* leaf. *J. Zhejiang Univ. Sci.* 2004;5(6):676-683.
 24. Haida SH, Baron A, Haida KS, Facci D, Haas J, Silva FJ. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de duas variedades de goiaba e arruda. *RBCS* 2011;9(28):11-19.
-