

POTENCIALANTIOXIDANTE *IN VITRO*, CONTEÚDO DE FENÓIS E FLAVONÓIDES NOS RAMOS DE *SCUTIA BUXIFOLIA* REISSEK

In vitro antioxidant potential, phenolic and flavonoids contents of Scutia buxifolia Reissek twigs

Aline Augusti Boligon¹, Bruna Ribeiro Magoga², Andrieli Cassel Feltrin¹, Vanessa Janovik³, Margareth Linde Athayde⁴

RESUMO

O presente trabalho descreve a avaliação da atividade antioxidante pela metodologia do radical livre DPPH, o doseamento de polifenóis pelo método de Folin-Ciocalteu e teor de flavonóides no extrato bruto e nas frações dos ramos de *Scutia buxifolia* (coronilha). O conteúdo de polifenóis e flavonóides variaram de 102,02 ± 0,71 a 318,82 ± 1,62 miligrama de ácido pirogálico por grama de planta seca e 83,47 ± 0,93 a 140,71 ± 2,14 miligrama de rutina por grama de planta seca, respectivamente. O IC₅₀, concentração necessária para inibir a atividade do DPPH em 50% foi: extrato bruto > CH₂Cl₂ > AcOEt > n-BuOH. No presente estudo foi possível estabelecer uma alta correlação positiva entre compostos fenólicos das frações e a atividade antioxidante destas (0,99). Estes resultados indicam que *S. buxifolia* possui substâncias químicas capazes de capturarem radicais livres, compostos promissores na busca de fármacos antioxidantes contra doenças decorrentes do estresse oxidativo, sendo as frações n-BuOH e AcOEt as mais efetivas.

Palavras-chave: *Scutia buxifolia*, coronilha, DPPH, radicais livres.

SUMMARY

This work describes the antioxidant evaluation through the DPPH free radical methodology, the determination of polyphenol dosage by the method of Folin-Ciocalteu and the content of flavonoids in crude extract and fractions of the *Scutia buxifolia* twigs (coronilha). The content of flavonoids and polyphenols ranged from 102.02 ± 0.71 to 318.82 ± 1.62 milligram of pirogallic acid per gram of dry plant and 83.47 ± 0.93 to 140.71 ± 2.14 milligram of rutin per gram of dry plant, respectively. The IC₅₀ required concentration to inhibit the activity of DPPH at 50% was: crude extract > CH₂Cl₂ > AcOEt > n-BuOH. In this study it was established a high positive correlation between fractions of phenolic compounds and antioxidant activity of these (0.99). These results indicate that *S. buxifolia* has chemicals that are able to catch free radicals, promising compounds in the search for antioxidant drugs against diseases from oxidative stress, being the n-BuOH and AcOEt fractions the most effective ones.

Key words: *Scutia buxifolia*, coronilha, DPPH, free radicals.

INTRODUÇÃO

A espécie *Scutia Buxifolia* pertence à família Rhamnaceae e é conhecida popularmente como coronilha. É nativa da América do Sul, ocorrendo principalmente no Rio Grande do sul, Argentina e Uruguai^{1,2}, sendo usada popularmente como cardiotônica, hipotensora e diurética através da infusão em água da casca do caule¹.

Os organismos vivos possuem sistemas antioxidantes endógenos para manter a formação de radicais livres em níveis

toleráveis³. Estes sistemas não são 100% eficientes, pois quando os danos a biomoléculas são excessivos, eles podem levar alterações de funções e morte celular. Isso está relacionado com várias patologias, particularmente com as degenerativas associadas com a idade, como doenças cardiovasculares, neuropatias e câncer⁴. Por isso, o consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas, tem sido associado a uma menor incidência de

Trabalho realizado no Departamento de Farmácia Industrial da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) /RS.

¹Aluna do Curso de Pós – Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFSM.

²Acadêmica formada no curso de Farmácia da UFSM.

³Aluna do curso de graduação de Farmácia da UFSM.

⁴Prof. Adjunta da UFSM

doenças relacionadas ao estresse oxidativo⁵. O melhor método de prevenção é através de alimentação rica em antioxidantes como a vitamina C e a vitamina E. A busca por substâncias antioxidantes naturais vem aumentando nos últimos anos, motivo pelo qual, os centros de pesquisa e indústrias farmacêuticas têm investido cada vez mais neste tipo de pesquisa³.

As plantas, assim como os animais, têm em substâncias do metabolismo especial, como terpenos oxidados, taninos, fenóis, alcalóides, lignanas, cafeína e aminas, seus principais sistemas antioxidantes^{6,7}. Essas substâncias também contribuem com diversas funções ecológicas de extrema importância nas relações de competição nos ecossistemas terrestres, como polinização, alelopatia, defesa contra herbívoros e patógenos^{8,9}.

Os vegetais são fontes de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais utilizados para síntese de inúmeros fármacos. Embora cerca de 100.000 compostos oriundos de plantas tenham sido identificados, as fontes de metabólitos secundários parecem ser inesgotáveis em relação às possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades importantes à terapêutica e à agricultura¹⁰. O Brasil possui a maior diversidade genética vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas de um total estimado entre 350.000 e 550.000, devido a esta grande diversidade de espécies, aumentam-se as chances de identificação de substâncias do metabolismo vegetal com atividades farmacológicas e descobrimento de novos alvos biológicos¹¹.

Os radicais livres são moléculas muito reativas derivados de oxigênio e nitrogênio, formados fisiologicamente no corpo humano. Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos, podendo ser enzimáticos ou não enzimáticos, tais como á-tocoferol, â-caroteno, ácido ascórbico, compostos fenólicos e flavonóides¹².

O objetivo deste estudo foi determinar a atividade antioxidante, o teor de compostos fenólicos e de flavonóides no extrato bruto e nas frações dos ramos de *Scutia buxifolia*.

MATERIALE MÉTODOS

Coleta e extração do material vegetal:

Os ramos de *Scutia buxifolia* foram coletados em outubro de 2007, no município de Dom Pedrito, no estado do Rio Grande do Sul (coordenadas 30°59'09''S e 54° 27'44'' W). O material testemunho (exsicata) está depositado no herbário do Departamento de Biologia da UFSM catalogado sob o número de registro SMBD 10919.

O material vegetal (593,83 g) foi seco ao ar livre e moído e triturado. O extrato foi obtido através da maceração hidroalcoólica (EtOH:H₂O 7:3, v/v) do material que foi colocado em recipiente fechado e recoberto com o solvente, o macerado foi submetido a agitações manuais diárias, por um período de sete dias. Ao fim desse período o conteúdo foi filtrado em algodão, seguindo-se de

concentração em evaporador rotatório, à temperatura inferior à 40°C. Após a eliminação do etanol, o extrato bruto foi particionado através da extração seqüencial utilizando solventes de polaridade crescente: diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e n-butanol (n-BuOH).

Análise fitoquímica preliminar:

O screening fitoquímico dos ramos foi realizado como uma avaliação preliminar das classes de compostos presentes na planta. Esta análise fitoquímica seguiu a técnica descrita por Moreira (1979)¹³, abrangendo uma série de reações de caracterização (qualitativa) para extrato aquoso.

Avaliação da atividade antioxidante – DPPH:

Para a avaliação da atividade antioxidante foi utilizado o método fotocolorimétrico do DPPH (2,2-difenil,1-picrihidrazila), segundo Choi et al.¹⁴. Foi utilizado o extrato bruto e as frações CH₂Cl₂, AcOEt e n-BuOH nas concentrações de: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 e 7,81 µg/mL em etanol (2,5mL). A 2,5mL de cada amostra, foi adicionado 1mL da solução de DPPH 0,3mM em etanol. Após 30 minutos, foram feitas as leituras, em espectrofotômetro (Shimadzu-UV-1201) das absorbâncias a 518nm, onde o radical DPPH apresenta o máximo de absorção. Uma solução de DPPH (1mL; 0,3nM) em etanol (2,5mL) foi usada como controle negativo e uma preparação de ácido ascórbico como padrão (controle positivo), nas mesmas concentrações das amostras. O etanol foi usado para zerar o espectrofotômetro, tendo como brancos as soluções testes de cada amostra (sem adição do DPPH), visando minimizar a interferência de componentes das amostras na leitura. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo da atividade antioxidante seguiu a equação:

$$\% \text{inibição} = 100 - \left[\frac{\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \right]$$

Onde: Abs_{amostra} é a absorbância da fração e do extrato bruto; Abs_{branco} é a absorbância das frações e do extrato bruto sem adição do DPPH e Abs_{controle} é a absorbância da solução de DPPH em etanol.

Foi calculada a porcentagem de inibição do radical DPPH e construído um gráfico de porcentagem de inibição *versus* a concentração do extrato e das frações.

Determinação de polifenóis:

A determinação de conteúdos fenólicos totais foi realizada pelo método do Folin-Ciocalteu¹⁵ na concentração de 0,15 mg/mL para as frações e o extrato bruto. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro no comprimento de onda de 730nm, em triplicata. O conteúdo de polifenóis totais foi

expresso em miligramas equivalentes de ácido pirogálico por grama de planta seca. A equação obtida para a curva padrão do ácido pirogálico foi $y = 34,443x - 0,0942$ ($r = 0,9994$). As médias obtidas para cada fração foram comparadas entre si pelo teste de Tukey em 5% de probabilidade de erro.

Doseamento de flavonóides:

A determinação do teor de flavonóides foi realizado segundo o método descrito por Woisky e Salatino¹⁶, a 1mL de uma solução da amostra (150µg/mL) das frações e extrato bruto de *S. buxifolia*, foram adicionados 0,5mL de uma solução de AlCl₃ 2%. Após 15 minutos, as absorbâncias foram lidas em 420nm. Os testes foram realizados em triplicata e para o cálculo do doseamento de flavonóides utilizou-se a curva padrão de rutina ($Y = 20,394x - 0,2033$ ($r = 0,9997$)). Os teores de flavonóides foram determinados em miligrama de rutina por grama de planta seca.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O rendimento das frações dos ramos de *S. buxifolia* está representado na Tabela 1, os maiores rendimentos foram obtidos para a fração n-BuOH, seguido da fração AcOEt e CH₂Cl₂.

Tabela 1 – Rendimento expresso em gramas e porcentagem para as frações dos ramos de *Scutia buxifolia* Reissek.

Frações	Rendimento das frações (gramas e %)
CH ₂ Cl ₂	1,0172g (0,17%)
AcOEt	1,6923g (0,28%)
n-BuOH	4,2933g (0,72%)

A capacidade de inibir a formação de radicais livres é medida pela descoloração da solução etanólica pelo DPPH segundo o método descrito por Choi et al.¹⁴. A solução de DPPH absorve na banda de 518 nm que mede a intensidade da coloração violeta. Na presença de boa atividade contra radicais livres ocorre descoloração¹⁷. A atividade medida pelo DPPH é usada muitas vezes como parâmetro para avaliar o poder antioxidante de extratos de plantas *in vitro*, que pode ser relacionada a compostos fenólicos e flavonóides presente¹⁸.

Em nosso estudo foi encontrado 96,35% e 95,83% de inibição do DPPH na concentração de 250 µg/mL, para n-BuOH e AcOEt, respectivamente. Essas frações apresentaram uma atividade rápida e forte, uma vez que, na menor concentração (7,81µg/mL) foi muito significativa essa atividade, representando 67,99% de inibição para a fração n-BuOH e

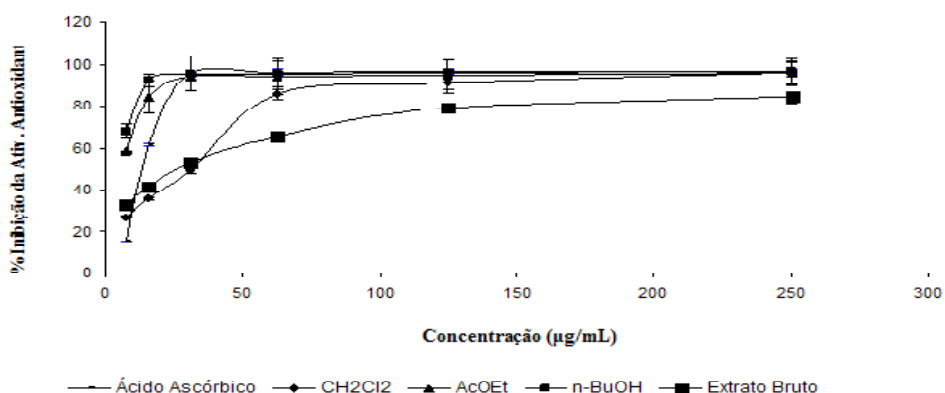


FIGURA 1-Percentual da atividade antioxidante do ácido ascórbico (padrão), do extrato bruto e das frações CH₂Cl₂, AcOEt, n-BuOH dos ramos de *Scutia Buxifolia*.

58,31% para AcOEt, este comportamento não ocorreu com a fração CH₂Cl₂ que na menor concentração apresentou uma inibição de 26,49% (figura 1). Este comportamento pode ser entendido pela concentração dessas frações que apresentam compostos com propriedades polares, como é o caso de compostos fenólicos e flavonóides, os quais possuem comprovada atividade antioxidante. Vários trabalhos mostram a maior potência de extratos de fração n-BuOH e AcOEt em testes de atividade antioxidante. Tseng et al.¹⁹, fazendo uso do mesmo ensaio (DPPH) em extratos de folhas de *Hibiscus sabdariffa*, testaram extratos de várias polaridades e foi constatada que a fração AcOEt apresentava maior porcentagem no índice de inibição.

Tendo em vista a atividade antioxidante demonstrada nas frações, o IC₅₀ (índice que descreve a concentração necessária para inibir a atividade do DPPH em 50%) para o extrato bruto, as frações e para o ácido ascórbico foi calculado. O IC₅₀ da fração CH₂Cl₂ foi obtido através da equação da reta $y = 0,8559x + 25,816$ ($R = 0,9998$), considerando os quatro primeiros pontos da curva, resultando no IC₅₀ de $21,78 \pm 1,23$ µg/mL. Para o extrato bruto a equação obtida foi $y = 0,6879x + 30,2109$ ($R = 0,9982$), com IC₅₀ de $34,57 \pm 0,98$.

Para o ácido ascórbico e as frações AcOEt e n-BuOH, o IC₅₀ foi estimado matematicamente a partir da primeira concentração utilizada (7,81µg/mL), que demonstrou atividade

antioxidante próxima ou superior a 50%, já que para essas frações e para o ácido ascórbico não foi possível demonstrar linearidade nas demais concentrações testadas. O IC₅₀ estimado para a fração n-BuOH e AcOEt foi de 5,74 ± 0,40 mg/mL e 6,69 ± 0,76, respectivamente (Tabela 2). O ácido ascórbico, cuja atividade antioxidante é bastante documentada, apresentou um IC₅₀ de 15,98 ± 0,12 mg/mL.

As frações n-BuOH e AcOEt apresentaram IC₅₀ inferiores ao do ácido ascórbico, demonstrando uma excelente atividade antioxidante, superior àquela manifestada pelo ácido ascórbico. Esses baixos valores de IC₅₀ evidenciados nas frações de *S. buxifolia*, sugerem a presença de compostos com forte atividade antioxidante, principalmente nas frações n-BuOH e AcOEt. Estes resultados são semelhantes aos reportados por Tung et al.²⁰, analisando a capacidade antioxidante de frações obtidas das raízes de *Acácia confusa* pelo método do DPPH, onde os autores

descrevem as melhores atividades antioxidantes e os menores valores de IC₅₀ para as frações AcOEt e n-BuOH.

A Tabela 2 apresenta os conteúdos de polifenóis e flavonóides do extrato bruto e das frações dos ramos de *S. buxifolia*. Os resultados indicam que a concentração destes compostos foi n-BuOH > AcOEt > CH₂Cl₂ > Extrato bruto. É bem documentada a concentração superior de fenólicos nas frações n-BuOH e AcOEt quando os extratos são fracionados com solventes de polaridade crescente^{1,20,21,22}.

Vários autores descrevem uma positiva correlação entre conteúdos fenólicos e atividade antioxidante usando DPPH e Folin-Ciocalteu para as análises^{1, 20, 23}. No presente estudo foi possível estabelecer uma alta correlação positiva entre compostos fenólicos das frações com a atividade antioxidante destas (0,99).

Tabela 2 – Doseamento de polifenóis (P), flavonóides (F) e IC₅₀ do extrato bruto e das frações dos ramos de *Scutia buxifolia* Reissek.

Frações/Extrato	P (mg AP/g PS) ± DP	F (mg Rut/g PS) ± DP	IC ₅₀
Extrato bruto	102,02 ± 0,71 a	83,47 ± 0,93 a	34,57 ± 0,98
CH ₂ Cl ₂	121,59 ± 0,66 b	93,21 ± 1,23 b	21,78 ± 1,23
AcOEt	315,14 ± 1,20 c	137,28 ± 0,39 c	6,69 ± 0,76
n-BuOH	318,82 ± 1,62 c	140,71 ± 2,14 c	5,74 ± 0,40

* Médias seguidas por letras diferentes diferem entre si pelo teste Tukey em 5% de probabilidade de erro.

AP = Ácido pirogálico, Rut = rutina, PS = planta seca e DP = desvio padrão da média.

IC₅₀ = concentração necessária para inibir 50% da atividade oxidante (µg/mL).

A Avaliação fitoquímica preliminar (screening) de *S. buxifolia* indicou a presença de cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos flavônicos, heterosídeos cianogênicos, fenóis e alcalóides. A presença de flavonóides e heterosídeos cianogênicos encontrados no screening preliminar justificam a boa atividade antioxidante e elevados conteúdos fenólicos.

Os resultados encontrados em nosso estudo indicam que essa espécie possui substâncias químicas capazes de capturarem radicais livres, compostos promissores na busca de fármacos antioxidantes que previnem doenças decorrentes do estresse oxidativo. No entanto, o teste do DPPH não permite uma precisa definição dos efeitos antioxidantes por se tratar de uma metodologia *in vitro*²⁴. Sabendo-se que a atividade de extratos de plantas não pode ser avaliada somente por um método¹⁴, torna-se necessário um estudo *in vivo* para determinar se esta planta medicinal poderá ser utilizada industrialmente.

CONCLUSÃO

Os baixos valores de IC₅₀ encontrados para as frações n-BuOH e AcOEt indicam uma forte atividade antioxidante, um alto conteúdo de polifenóis e de flavonóides nos ramos de *Scutia*

buxifolia, estas frações serão priorizadas para ensaios biodirecionados visando o isolamento destes compostos.

AGRADECIMENTOS

À Bióloga mestre em Botânica Nelci Rolim Basto Zacchia, Departamento de Botânica da Universidade Federal de Santa Maria, por proporcionar a identificação de *Scutia buxifolia*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wasicky R, Wasicky M, Joachimovits R. Erstuntersuchungen na Coronilha – *Scutia buxifolia* Reissek. *Planta Medica* 1964; 12: 13-25.
2. Menezes ACS, Mostardeiro M A, Zanatta N, Morel A. F. Scutianina-J, A New Cyclopeptidic Alkaloid Isolated From *Scutia Buxifolia* Reiss. *Phytochemistry* 1995; 28: 783-786.
3. Gordon MH. Dietary antioxidants in disease prevention. *Natural Products Report* 1996; 4: 265-272.
4. Melo OAG, Moraes E, Ferreira R. Os radicais livres. Disponível

- em: <<http://www.l.Anhembi.Br/halunos/farmácia/radical/index.htm>>. Acesso em: mar. 2008.
5. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 2002; 82: 47-95.
 6. Larson RA. The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* 1988; 27(4): 969-978.
 7. Cotelle AC. Antioxidant proprieties of hydroxy-flavones. *Free Radical Biology and Medicine* 1996; 21: 35-43.
 8. Gottlieb OR. The role of oxygen in phytochemical evolution towards diversity. *Phytochemistry* 1989; 28 (10): 2545-2558.
 9. Langenhein JH. Higher plant terpenoides: a phytocentric overview of their ecological roles. *Journal of Chemical Ecology* 1994; 20(6): 1223-1280.
 10. Yunes RA, Calixto JB. In: *Plantas medicinais – sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, 500pp, 2001.
 11. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora UFSC, 2003.
 12. Halliwell B. Free radicals and other reactive species in disease. In: *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group 2001; 1-7.
 13. Moreira EA. Contribuição para o estudo fitoquímico de *Lobelia hassleri* A. Zahlb e *Lobelia stellfeldii* R. Braga. *Companulaceae*. *Tribuna Farmacêutica* 1979; 47 (1): 13-39.
 14. Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 2002; 163: 1161-1168.
 15. Chandra S, Meija EG. Polyphenolic Compounds, Antioxidant Capacity, and Quinone Reductase Activity of an Aqueous Extract of *Ardisia compressa* in comparison to Mate (*Ilex paraguariensis*) and Green (*Camellia sinensis*) Teas. *J. Agric Food Chemistry* 2004; 52: 3583-3589.
 16. Woisky RG, Salatino A. Analysis of própolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal Apicultural Research* 1998; 37 (2): 99-105.
 17. Kulisic T, Radonic A, Katanilic V, Milos M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem* 2004; 85: 633-640.
 18. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure – antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad Biol Med* 1996; 20(7): 933-956.
 19. Tseng TH, Kao ES, Chu CY, Chou FP, Lin HW, Wang CJ. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. Against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food and Chemical Toxicology* 1997; 35(2): 1159-1164.
 20. Tung, YT, Wu JH, Kuo YH, Chang ST. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. *Bioresource Technology* 2007; 98(5): 1120-1123.
 21. Schubert A, Pereira DF, Zanin FF, Alves SH, Beck RCR, Athayde ML. Comparison of antioxidant activities and total phenolic and methylxanthine contents between the unripe fruit and leaves of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil. *Die Pharmazie* 2007, in press.
 22. Turkmen N, Sari F, Velioglu YS. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin-Ciocalteu methods. *Food Chem*. 2006; 99: 835-841.
 23. Shyamala BN, Gupta S, Lakshmi A, Prakash J. Leafy vegetable extracts – antioxidant activity and effect on storage stability of heated Oils. *Innovative Food Science & Emerging Technologie* 2005; 6: 239-245.
 24. Ursini F, Maiorino M, Marazzoni P, Roveri A, Pifferi G. A novel antioxidant flavonoid (idb 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Radical Biology & Medicine* 1994; 16(5): 547-553.

Endereço para correspondência:

Aline Augusti Boligon

Rua Coronel Niederauer, 1565, apto 209.

CEP: 97114-122, Santa Maria – RS – Brasil.

Fone: (55) 3011-7356/ 9952-2577.

E-mail: alineboligon@hotmail.com