AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FOLHAS E CASCAS DA ESPÉCIE CITRUS LIMONIA

Guilherme Campos da Luz (FA/UEPG), Valéria Gremski Pawlak, Romaiana Picada Pereira, José Carlos Rebuglio Vellosa, Cássia Gonçalves Magalhães, email:cassiagmag@yahoo.com.br

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Química.

Área do conhecimento: Química
Subárea do conhecimento: Química Orgânica

Palavras-chave: ação antioxidante, radicais livres, produtos naturais

Resumo

Dentre as espécies vegetais, muitas vêm sendo pesquisadas quanto às suas características químicas e biológicas, pois apresentam compostos que possam exercer, por exemplo, ação antioxidante. A descoberta dos efeitos deletérios dos radicais livres a células e ao sistema biológico, agindo como causadores de muitas patologias e disfunções orgânicas, impulsiona a busca por antioxidantes extraídos de produtos naturais. No entanto, não existem informações na literatura em relação à atividade antioxidante de extratos das folhas e cascas da espécie *Citrus x limonia.* O trabalho realizado visou avaliar a presença de compostos bioativos, dentre estes os compostos fenólicos totais e flavonoides, presentes nos extratos das folhas e cascas do limão, que possam exercer e caracterizar sua ação antioxidante. Os resultados demonstraram a presença de atividade antioxidante pelos métodos de sequestro do radical $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{+}$, pois apresenta teores significativos de compostos fenólicos e flavonoides nos diferentes tipos de extratos testados.

Introdução

A produção de radicais livres nos sistemas biológicos vem sendo considerada responsável por problemas patológicos gerados no organismo. Os efeitos nocivos ocorrem quando essas espécies reativas estão em excesso, sendo os mecanismos biológicos insuficientes para neutralizar totalmente essas espécies reativas, levando ao estresse oxidativo[1]. Várias plantas vêm sendo estudadas quanto às suas características antioxidantes, como fitoterápicos ou mesmo na geração sintética de drogas capazes de atuar contra as ações degenerativas dos radicais livres. Entre os compostos bioativos que exercem essa função estão os compostos fenólicos, vitaminas A, C e E, flavonoides e carotenoides[2]. Estes compostos reagem com os radicais livres, inibindo sua iniciação ou interrompendo a cadeia de reações oxidativas nas células, impedindo o dano de moléculas. A espécie *Citrus limonia,* conhecida como limão-cravo ou limão-rosa, não possui dados na literatura acerca da ação antioxidante dos extratos de suas folhas e cascas. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o teor de compostos fenólicos, flavonoides e seu potencial antioxidante dos extratos vegetais das folhas e cascas da espécie, podendo ser um alvo de potenciais pesquisas sobre o tema.

Material e Métodos

Folhas e cascas *in natura* da espécie *Citrus x limonia* foram coletados no Campus da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Para a extração, foi utilizado o método de maceração por 7 dias das folhas e cascas trituradas e não-trituradas (5%

m/v). Os extratos etanólico (EtOH) e hidroalcoólico (EtOH:H_2O) foram obtidos, respectivamente por adição de etanol 99,5% e pela mistura de álcool/água, subdivididos em diferentes proporções (v/v):30%, 50% e 70%.

Determinou-se o teor de compostos fenólicos totais das amostras utilizando o reagente [3]Folin-Ciocalteau. O teor de fenóis totais foi determinado por meio da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. A absorbância das amostras foi medida a 750nm em placas de Elisa tendo como branco apenas a amostra do extrato. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Para determinação de flavonoides totais, utilizou-se o método colorimétrico descrito por [4]Woisky e Salatino (1998), que consiste na utilização de uma solução de cloreto de alumínio e quercitina como flavonoide padrão, a curva de calibração em comparação com a absorbância das amostras, sendo o branco somente o extrato sem adição de reagentes. A absorbância foi medida em 450 nm e os resultados expressos em mg de AG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

Entre os diversos ensaios para determinação da atividade antioxidante[5] foram utilizados o $DPPH^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e o $ABTS^{+}$ ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) frente à diversas concentrações dos diferentes extratos. Mediram-se as absorbâncias em triplicata e calculou-se a concentração necessária para inibir 50% do radical, IC_{50}, a qual demonstra a efetividade e atividade antioxidante do extrato em análise.

Resultados e Discussão

Diante dos ensaios realizados, obtiveram-se os resultados para cada respectivo teste e extrato analisado. Os compostos fenólicos totais de cada extrato avaliado foram determinados quantitativamente e estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Teor de compostos fenólicos e flavonoides de folhas e cascas da espécie *Citrus x limonia*

Extratos	Fenólicos totais (mg AG/g)*	Flavonoides totais (mg QER/g)*
EtOH 95% (FT)	1,668 ± 0,035 e	0,382 ± 0,048 c
EtOH 95% (FNT)	1,374 ± 0,010 e	0,338 ± 0,038 c
EtOH 95% (CT)	3,273 ± 0,031 d	1,588 ± 0,130 a
EtOH 95% (CNT)	3,070 ± 0,106 d	1,065 ± 0,100 a
HEtOH 70% (FT)	3,194 ± 0,240 d	1,067 ± 0,106 a
HEtOH 70% (FNT)	2,026 ± 0,391 e	0,408 ± 0,036 c
HEtOH 70% (CT)	4,993 ± 0,045 a	1,753 ± 0,161 a
HEtOH 70% (CNT)	3,333 ± 0,160 d	1,190 ± 0,090 a
HEtOH 50% (FT)	5,194 ± 0,254 b	1,607 ± 0,068 a
HEtOH 50% (FNT)	4,026 ± 0,199 c	0,581 ± 0,145 d
HEtOH 50% (CT)	6,393 ± 0,356 a	1,973 ± 0,100 a
HEtOH 50% (CNT)	5,333 ± 0,099 b	1,790 ± 0,103 a
HEtOH 30% (FT)	4,195 ± 0,223 c	0,907 ± 0,012 b
HEtOH 30% (FNT)	3,036 ± 0,089 c	0,801 ± 0,045 b
HEtOH 30% (CT)	4,393 ± 0,145 c	1,475 ± 0,036 a
HEtOH 30% (CNT)	4,333 ± 0,088 c	1,190 ± 0,070 a

FT: folha triturada FNT: folha não triturada

CT: casca triturada CNT: casca não triturada
*Médias ± desvio padrão (n=3); Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente na mesma coluna (Newman-Keuls a p < 0,05).
Fonte: O autor.

Os testes antioxidantes realizados $ABTS^{+}$ e $DPPH^{\bullet}$ levaram aos resultados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Teor de IC50 para testes antioxidantes frente ao $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{+}$

Extratos	(CI_{50}) $DPPH^{\bullet}$ (µg/mL)*	(CI_{50}) $ABTS^{+}$ (µg/mL)*
EtOH 99,5% (FT)	344,813 ± 13,356 a	411,408 ± 4,004 g
EtOH 99,5% (FNT)	388,319 ± 8,872 a	483,609 ± 5,715 g
EtOH 99,5% (CT)	305,878 ± 15,610 a	234,873 ± 3,232 d
EtOH 99,5%(CNT)	316,504 ± 10,987 a	327,920± 4,290 f
HEtOH 70% (FT)	287,349 ± 12,316 a	676,173 ± 8,216 h
HEtOH 70% (FNT)	296,514 ± 17,776 a	545,872 ± 7,742 h
HEtOH 70% (CT)	207,533 ± 15,645 a	351,025 ± 6,753 f
HEtOH 70% (CNT)	219,202 ± 14,874 b	639,822 ± 5,925 h
HEtOH 50% (FT)	237,998 ± 11,236 b	99,426 ± 4,955 a
HEtOH 50%(FNT)	256,694 ± 16,775 b	126,807 ± 4,004 b
HEtOH 50% (CT)	204,293 ± 14,514 b	89,360 ± 4,287 a
HEtOH 50%(CNT)	237,311 ± 14,988 b	279,786 ± 8,769 e
HEtOH 30% (FT)	251,073 ± 8,950 b	154,154 ± 5,202 c
HEtOH 30%(FNT)	268,141 ± 9,458 b	161,818 ± 5,008 c
HEtOH 30% (CT)	206,753 ± 12,325 b	309,681 ± 7,384 f
HEtOH 30% (CNT)	229,024 ± 11,998 b	215,447 ± 8,018 d

FT: Folha triturada CT:Casca triturada
FNT: Folha não triturada CNT:Casca não triturada
*Médias ± desvio padrão (n=3); Médias seguidas por letras diferentes diferem estatisticamente na mesma coluna (Newman-Keuls a p < 0,05).
Fonte: O autor.

Diante dos resultados apresentados, os extratos HEtOH 50% apresentaram maiores teores de compostos fenólicos e flavonoides em comparação com as outras frações hidroalcoólicas analisadas e diante dos extratos etanólicos (EtOH 99,5%). Os resultados da avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos inibindo 50% da concentração do radical $DPPH^{\bullet}$ e $ABTS^{+}$ corroboram os resultados de determinação do teor de flavonoides e compostos fenólicos. Sendo assim, quanto maior o teor de tais compostos, melhor é sua atividade antioxidante, ou seja, a fração 50% EtOH:H_2O do vegetal triturado apresentou melhor inibição dos radicais testados em menor concentração.

O líquido extrator pode interferir na atividade antioxidante, pois foi observada correlação positiva, sendo que maiores quantidades de compostos fenólicos e flavonoides foram extraídos quando utilizados mais de um solvente no processo de extração. A relação de polaridade entre esses compostos e o líquido utilizado pode existir, visto que a proporção álcool/água age positivamente, balanceando esse fator. Dessa forma, pode-se afirmar que os extratos da espécie *Citrus x limonia* contém compostos bioativos importantes, que podem vir a ser fontes de pesquisa mais detalhada relacionada a essa temática.

Conclusões

Verificou-se neste estudo que extratos da espécie *Citrus x limonia* possuem diferentes teores de compostos fenólicos e flavonoides, sendo relevantes os extratos hidroalcoólicos, que apresentaram elevados teores de tais substâncias. Essa característica contribuiu para que a atividade antioxidante fosse verificada nas folhas e cascas do vegetal.

A proporção do solvente influenciou na extração dos compostos citados acima, demonstrando a importância da extração na avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais. Os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas por extração das folhas e cascas da espécie *Citrus x limonia* contribuindo na descoberta do potencial efeito resultante da atividade antioxidante.

Agradecimentos

Fundação Araucária, CNPq, UEPG, DEQUIM e DEFAR.

Referências

[1] FILHO, P. A; OLIVEIRA, G.J; CHRISTOFOLI, M; CASTRO, S. F. C. Atividade Antioxidante, Conteúdo de Fenólicos Totais, Carotenoides e Provitamina A em Extratos Vegetais do Cerrado Goiano. **Uniciências**, v. 22, p 28-32, 2018.

[2] BENFATO, V; M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

[3] 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, p 351-355, 2007.

[4] WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **J Apic Res**, v. 37, p. 99-105, 1998.

[5] PIRES, J; TORRES, B. P; DOS SANTOS, C. A. Y. D. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Universidade de São Paulo: **Instituto de Biociências**, 2017.