AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONÓIDES TOTAIS DE *Passiflora alata*

Gabriela Grube (Fundação Araucária), Anderson Gustavo Santos, Lillian Caroline Fernandes, Bruno Rodrigo Minozzo, José Carlos Rebuglio Vellosa, Edmar Miyoshi.
E-mail do orientador:edmiyoshi@gmail.com
Universidade Estadual de Ponta Grossa/DEFAR/SEBISA.

ÁREA E SUBÁREA: Farmacologia. Neuropsicofarmacologia.

Palavras-chave: antioxidantes, radicais livres, bioquímica, extratos vegetais, neuropsicofarmacologia.

Resumo

O estresse oxidativo gerado por acúmulo de radicais livres podem provocar várias doenças. Com isso, há o interesse em substâncias com característica antioxidante, capazes de neutralizar esses radicais. Assim, o projeto tem como objetivo avaliar o extrato de *Passiflora alata* em relação a modelos oxidativos *in vitro e* quantificar substâncias com capacidade antioxidante. Primeiramente, foi realizada a extração hidroalcoólica da *P. alata*. Em seguida, os testes antioxidantes *DPPH•* e *ABTS•+*. Além disto, quantificou-se os compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato. A determinação de compostos fenólicos no extrato de *Passiflora alata* foi de 16,455 (±1,3) mg Eq ácido gálico/1g de extrato, enquanto que a concentração de flavonoides, foi de 6,55 (±0,72) mg Eq quercetina/1g de extrato.

Na determinação da capacidade antioxidante, o extrato teve uma boa atividade antioxidante frente ao *ABTS•+*, com inibição radicalar máxima (IRM) de 91,32% (± 4,5%). O que não pode-se observar no teste *DPPH•* , obtendo 18,44% (± 2,3%) de IRM.

Introdução

Uma das principais atividades farmacológicas em substâncias naturais é o efeito antioxidante em plantas, importante para a neutralização de radicais livres (Lorenzoni, 2014).

A *Passiflora alata*, é uma planta pertencente à família Passifloraceae, e são consumidas junto a alimentos e em bebidas pela população (Bernacci, 2003). Além disso, o maracujá é conhecido popularmente devido sua ação calmante e sedativa (Farmacopéia Brasileira, 2010).

Há vários estudos que comprovam a atividade antioxidante de plantas do gênero *Passiflora*. Através de uma triagem fitoquímica da folha de *Passiflora edulis* (XAVIER, A. *et al*. 2016), observou-se a presença de compostos fenólicos, caracterizando a atividade antioxidante da planta. Rudnicki (2005) cita que o extrato hidroalcoólico das folhas das espécies *Passiflora alata* e *Passiflora edulis* apresentam atividade antioxidante significativa, possuindo potencial na prevenção de patologias neurodegenerativas e metabólicas.

Nesse contexto, este projeto é importante para avaliar a atividade antioxidante da *Passiflora alata*. Através disto, possibilitando futuros estudos farmacológicos, utilizando a planta como possível tratamento para combater doenças relacionadas ao estresse oxidativo.

Materiais e Métodos

Preparo dos extratos

As folhas de *Passiflora alata* foram submetidas à estufa, trituração e armazenamento, respectivamente. Para obtenção do extrato, foi utilizado o aparelho Soxhlet, usando o Etanol 95% (v/v) como solvente.

Determinação de compostos fenólicos totais

Para a determinação de compostos fenólicos totais foi realizada uma curva de calibração de ácido gálico e o extrato diluído em etanol. Em uma placa de 96 poços adicionou-se 5 µL dos extratos, 100 µL do reagente de Folin-Ciocalteau 10% (v/v) e 100 µL de solução aquosa de Na2CO3 7,5% (m/v). A placa foi incubada em uma temperatura de 45 °C por 15 minutos e a leitura foi realizada no espectrofotômetro a 765 nm. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do conteúdo de flavonóides totais

Foi feita uma curva de calibração com quercetina, e o extrato diluído em etanol. Em uma placa de 96 poços, adicionou-se metanol, 4µL de uma solução CH3COOK (0,100 mol L-1), 4 µL de uma solução de AlCl3 10% (m/v), 112 µL de água deionizada e 5µL de extrato. O procedimento foi realizado em triplicata. As placas foram lidas no espectrofotômetro à 420nm.

Atividade scavenger (neutralização de radicais livres)

Para a avaliação da atividade *scavenger* foram utilizadas 7 concentrações de extrato: 125 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL e 2,5 µg/mL. Essas concentrações foram determinadas com base a um estudo semelhante (LUGATO et al., 2014b). Para a obtenção dessas concentrações de extrato foram preparadas duas soluções “padrão” nas concentrações de 1 mg/mL e 0,1mg/mL utilizando álcool etílico absoluto para solubilizar o extrato.

Atividade scavenger sob o radical DPPH•

O procedimento foi realizado segundo Soares *et al*. (1997). As amostras, em diversas concentrações, foram incubadas durante 10 minutos, com uma solução de *DPPH*$^{\bullet}$ a 60µM e etanol. Logo após, foram lidas em espectrofotômetro a 531nm. Para comparar os resultados finais, também foi analisada a atividade *scavenger* do ácido ascórbico, que foi intitulada como padrão, por ser uma substância pura com alta atividade antioxidante conhecida.

Atividade scavenger sob o radical ABTS$^{\bullet+}$

A metodologia foi baseada em Pellegrini (1999), porém com algumas modificações. Inicialmente, foi realizada a incubação dos extratos, em diversas concentrações, durante 15 minutos contendo tampão fosfato de sódio (10mM e pH 7,4) e solução de *ABTS*$^{\bullet+}$

Resultados e Discussão

Determinação da concentração de compostos fenólicos e flavonoides

O conteúdo de compostos fenólicos determinado no extrato hidroalcoólico das folhas de Passiflora alata foi de 16,455 (±1,3) mg Eq ácido gálico/1g de extrato, enquanto que a concentração de flavonoides, que é uma classe de compostos pertencente aos compostos fenólicos, foi de 6,55 (±0,72) mg Eq quercetina/1g de extrato.

Avaliação da atividade scavenger do extrato pelo método *ABTS*$^{\bullet+}$

Observou-se que o extrato hidroalcoólico apresentou atividade antioxidante significativa no modelo de captura de radicais livres *ABTS*$^{\bullet+}$, obtendo uma inibição radicalar máxima (IRM) de 91,32% (± 4,5%). As concentrações 125 µg/mL, 100 µg/mL, 75 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL e 12,5 µg/mL apresentaram diferença estatística quando comparadas com o controle.

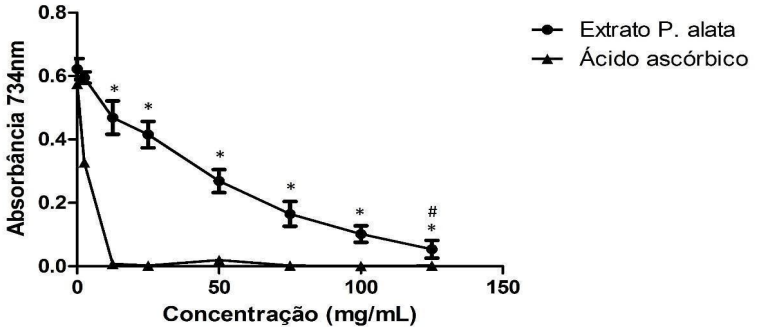


Gráfico 1. Relação entre a concentração de extrato hidroalcoólico de *Passiflora alata* e do padrão de Ácido ascórbico pela absorbância obtida no teste ABTS$^{\bullet+}$. * p<0,05 em comparação com o grupo controle e # p<0,05 em relação a IRM do padrão de ácido ascórbico.

Quando comparado ao padrão de ácido ascórbico, houve diferença significativa entre os resultados (p < 0,05), uma vez que este apresentou 99,83% (± 0,1%) de IRM. Isto pode ser justificado pelo fato de que o padrão é uma substância pura e que apresenta uma elevada atividade *scavenger*.

No modelo do *DPPH*$^{\bullet}$, o extrato não apresentou atividade antioxidante significativa, obtendo 18,44% (± 2,3%) de IRM. Enquanto isso, o padrão de ácido ascórbico mostrou 96,31% (± 0,17%) de IRM neste mesmo modelo de captura de radicais, apresentando diferença estatística significante quando comparado com o IRM apresentado pelo extrato.

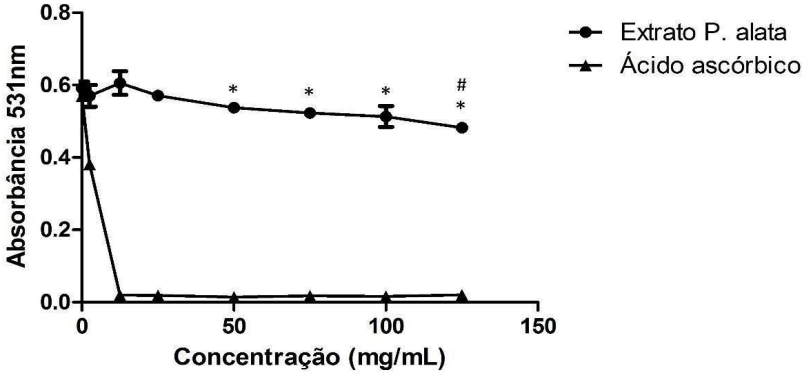


Gráfico 2. Relação entre a concentração de extrato hidroalcoólico de *Passiflora alata* e do padrão de Ácido ascórbico pela absorbância obtida no teste DPPH$^{\bullet}$. * p<0,05 em comparação com o grupo controle e # p<0,05 em relação a IRM do padrão de ácido ascórbico.

De acordo com Floegel et al. (2011), a metodologia do *ABTS*$^{\bullet+}$ apresenta maior representatividade que o *DPPH*$^{\bullet}$ na determinação da atividade antioxidante de extratos, estando esta atividade associada a presença de compostos fenólicos e flavonoides.

Conclusões

Com base nos resultados, conclui-se que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Passiflora alata* apresentou atividade antioxidante frente ao ensaio do *ABTS*•+. A atividade *scavenger* frente ao modelo do *ABTS*•+ ficou mais evidente, por se tratar de um método com maior sensibilidade. Já no teste do *DPPH*•, não houve atividade *scavenger* significante. Outra evidência que aponta esta capacidade antioxidante é a presença dos compostos fenólicos e flavonoides na planta.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária pela bolsa concedida, à Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade da busca pelo conhecimento. Ao Professor Dr. Edmar Miyoshi pela orientação e aprendizado, e ao Mestrando Anderson Gustavo de Santos, pelo aprendizado, pela partilha de conhecimentos e por ceder espaço para participar dos experimentos do seu mestrado.

Referências

ANVISA, **Farmacopéia Brasileira**, 5ª Edição, 904p., vol. 2, 2010.

BERNACCI, L.C. Passifloraceae. In: WANDERLEY, M.G.L.; SHEPHERD, G.J.;

FLOEGEL et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis.** v. 24, p. 1043-1048, 2011.

LORENZONI, A. A. Efeito protetor de produtos naturais sobre o dano hepático induzido pelo paracetamol. **Acta Ambiental Catarinense**. Vol. 11, No 1/2 2014.

PELLEGRINI, N. et al. Screening of dietary Carotenoids and Carotenoid-Rich Fruit Extracts for Antioxidant Activities Applying 2,2'-Azinobis(3-ethylenebenzothiazoline-6 sulfonic acid Radical Cation Decolorization Assay. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 379-389, 1999.

RUDNICKI, M. **Propriedade antioxidantes de extratos de *Passiflora alata* Dryander e de *Passiflora edulis* Sims.** Porto Alegre, 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005)

SOARES, J. R. *et al.* Antioxidant activities of some extracts of Thymus zygis. **Free Radical Research**, v. 26, p. 469-478, 1997.

XAVIER, A. S.; GALVÃO, D. F.; MAGALHÃES, E. P.; GARCIA, T. S. T..; RAMOS, M. P. O. Triagem fitoquímica da folha do maracujá (Passiflora edulis). **Revista Unipam**, 2016.