

ANÁLISE CROMATOGRÁFICA E AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE DE *Anadenanthera falcata* (benth) Speg

Aldenir Feitosa dos Santos (1); Simone Paes Bastos Franco (2); Alan John Duarte de Freitas (3); Karulyne Silva Dias (4); Mayara Andrade Souza (5).

(1) Centro Universitário Cesmac – aldenirfeitosa@gmail.com;

(2) Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Alagoas – simone_paes7@hotmail;

(3) Instituto Federal de Educação, Ciências e Tecnologia de Alagoas – alan.freitas@ifal.edu.br;

(4) Centro Universitário Cesmac – karulyne.dias@hotmail.com;

(5) Centro Universitário Cesmac – mayarandrade@hotmail.com.

Resumo: Introdução: Apesar de possuir uma ampla biodiversidade, o Brasil apresenta dificuldades quanto à utilização das espécies pois são poucas as que estão catalogadas por terem estudos limitados quanto ao seu potencial farmacológico (RIBEIRO et al, 2014). O estudo sobre a capacidade antirradicalar dos extratos vegetais intensificaram-se com o desenvolvimento de doenças crônicas-degenerativas que tinham como causa a propagação de radicais livres. Para o combate das espécies reativas há os antioxidantes que são substâncias capazes de inibirem a reação dos radicais; atualmente a principal fonte antirradicalar é o extrato de plantas (NASCIMENTO et al., 2011). *Anadenanthera falcata* (benth) Speg pertencente à família Fabacea, é conhecida como angico e é muito utilizada na medicina tendo inúmeras atividades biológicas já comprovadas como antinociceptiva, antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (LEITE et al, 2015). **Objetivo:** Realizar uma análise cromatográfica e avaliar a atividade antioxidante da *Anadenanthera falcata* (benth) Speg. **Metodologia:** A determinação e quantificação dos compostos fenólicos realizada utilizando-se da técnica por HPLC (cromatografia líquida de alta eficiência) foi feita em um equipamento da marca Shimadzu. A avaliação da atividade antioxidante foi realizada segundo metodologia descrita por Mensor et al (2001). A partir de 0,0025 g do extrato vegetal em 25 mL de etanol foi preparada as soluções para a leitura, que para cada concentração analisada foi retirado uma alíquota de 2,5 mL (em triplicata) e posteriormente a adição de 1,0 mL da solução etanólica de DPPH a 0,3 mM. Para o preparo do branco (em triplicata – para cada concentração), foi adicionado em cada vidro âmbar 2,5 mL da solução teste e 1,0 mL de ETOH 99%. O negativo foi realizado em triplicata e em cada vidro âmbar foi adicionado uma alíquota de 2,5 mL de ETOH 99 % e 1,0 mL da solução etanólica de DPPH. **Resultados:** A amostra analisada apresentou diversos constituintes em sua composição química através da análise cromatográfica por HPLC. Sendo possível observar a presença e quantificação do catecol (1,79mg/L), ácido clorogênico (1,24mg/L), ácido cafeico (1,12mg/L), vanilina (0,83mg/L), seringaldeído (1,61mg/L), ácido cumárico (0,37mg/L), cumarina (0,36mg/L), ácido salicílico (1,12mg/L), rutina (1,50mg/L), quercetina (0,65mg/L) e kaempferol (1,39mg/L). Tais compostos são muito citados na literatura científica por sua ação antioxidante. Na avaliação da atividade antioxidante, a espécie estudada apresentou um percentual de 93,10% (AAO%) na concentração de 600µg/mL. É possível identificar que esse valor é similar ou superior a amostras já citadas na literatura. Segundo Dias (2008) a espécie *Erythrina falcata* (folha), na concentração de 1000µg/mL, apresentou AAO% de 87,73%, sendo então menos efetiva que *A. falcata*. **Considerações finais:** Diante dos resultados obtidos, a *Anadenanthera falcata* merece destaque quanto a sua capacidade antirradicalar tendo em vista o crescimento pela busca de extratos vegetais que apresentem essa atividade

devido ao aumento de patologias associadas a presença de radicais livres. A presença de compostos fenólicos certamente explica o potencial antirradicar da espécie.

Palavras-chave: *Anadenanthera falcata*; HPLC; atividade antioxidante.

INTRODUÇÃO

Apesar de possuir uma ampla biodiversidade, o Brasil apresenta dificuldades quanto à utilização das espécies pois são poucas as que estão catalogadas por terem estudos limitados quanto ao seu potencial farmacológico (RIBEIRO et al, 2014).

O emprego de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, com objetivo de tratar, curar e prevenir patologias é considerado como uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Os produtos derivados de fontes naturais são importantes para a fabricação de novos medicamentos ao passo que muitos deles são capazes de tratar diversas enfermidades, agindo como hipoglicemiantes, antibacterianos, anticoagulantes, antiparasitários, imunossuppressores, antioxidante e anticancerígenos (ANDRADE et al, 2018).

O início do processo de estresse oxidativo decorre da existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Este processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (BRABOSA et al, 2010).

O estudo sobre a capacidade antirradicalar dos extratos vegetais intensificaram-se com o desenvolvimento de doenças crônicas-degenerativas que tinham como causa a propagação de radicais livres. Para o combate das espécies reativas há os antioxidantes que são substâncias capazes de inibirem a reação dos radicais; atualmente a principal fonte antirradicalar é o extrato de plantas (NASCIMENTO et al., 2011).

Perante a diversidade de moléculas bioativas, o emprego de espécies vegetais tem se tornado um recurso terapêutico alternativo acolhido em grande escala por parte da população ao mesmo tempo que vem aumentando o interesse da comunidade médica, desde que sejam plantas medicinais cujas ação biológicas tenham sido comprovadas cientificamente (BEZERRA, et al., 2017).

Anadenanthera falcata (benth) Speg pertencente à família Fabacea, é conhecida como angico e é muito utilizada na medicina tendo inúmeras atividades biológicas já comprovadas como antinociceptiva, antimicrobiana, anti-inflamatória e antioxidante (LEITE et al, 2015). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo principal realizar uma análise

cromatográfica e avaliar a atividade antioxidante da espécie vegetal *Anadenanthera falcata* (benth) Speg, através de ensaios laboratoriais.

METODOLOGIA

Obtenção da amostra

Amostras das folhas de *Anadenanthera falcata* (benth) Speg foram coletadas e levadas para laboratório onde foram colocadas em estufa a 70° C até atingirem peso constante e posteriormente foram triturados em moinho.

Para a preparação do extrato a amostra vegetal foi macerada em etanol PA com quantidade suficiente para cobrir o material, protegido da luz e com troca de solvente a cada 24h durante 3 dias. Após este período, com auxílio de funil e gaze, o extrato fluido foi filtrado e concentrado em evaporador rotatório (Fisaton 802D), em temperatura variável de 35 a 40° C e 117 rpms. O extrato vegetal etanólico das folhas foi armazenado em frasco hermeticamente fechado, num local fresco e ao abrigo da luz e foi submetido às análises de HPLC e antioxidante.

Quantificação de compostos fenólicos por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

Para os padrões (ácido gálico, catecol, ácido vanílico, ácido salicílico, vanilina, seringaldeído, ácido cumárico, ácido clorogênico, cumarina, rutina, quercetina, kaempferol, ácido cafeico) foram preparadas soluções-estoque com concentração de 40 mg L⁻¹ em água/álcool a 30%/70%. O método utilizado para a quantificação foi o da padronização externa. Para a construção das curvas analíticas, foram realizadas diluições de uma solução intermediária, contendo uma mistura de todos os padrões, sendo que esta foi obtida por meio da diluição das soluções-estoque previamente preparadas. Nesta solução intermediária, todos os padrões encontraram-se na concentração de 10 mg L⁻¹. Foram utilizados como fase móvel para a eluição dos compostos analisados a solução de ácido fórmico a 1% em água milli-Q (Solvente A) e etanol (Solvente B). As amostras e os padrões foram diluídos de acordo com um gradiente que inicia em 7% de etanol e vai aumentando até chegar em 85%, totalizando uma corrida de 80 minutos. O comprimento de onda utilizado foi de 290 nm,

numa temperatura de 33°C, fluxo de 0,6 mL min⁻¹ e volume de injeção de 20 µL. As amostras e os padrões foram filtrados em membrana de polietileno de 0,45 µm (Milipore) e injetados diretamente no sistema cromatográfico. Cada injeção foi realizada três vezes no sistema CLAE, com a finalidade de se obter a média das concentrações e dos tempos de retenção. Sendo assim, a identidade dos analitos confirmada pelo tempo de retenção, e o perfil dos picos da amostra, comparados aos dos padrões.

Avaliação quantitativa da atividade antioxidante pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila - DPPH

O método para captura do radical livre DPPH baseia-se na transferência de elétrons de uma substância antioxidante ou de uma espécie radicalar. A transferência de elétrons é perceptível pela mudança de coloração, em que o DPPH de coloração púrpura é reduzido a difenil-picril-hidrazina de coloração amarelada, com consequente desaparecimento da absorção, podendo ser monitorado pelo decréscimo da absorbância (NASCIMENTO et al., 2011).

Através das absorbâncias adquiridas é possível determinar o percentual de atividade antioxidante (AAO%), que consiste basicamente na quantidade de DPPH consumido por uma determinada substância com ação antioxidante na captura do radical e/ou porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. Desta forma, também pode ser avaliada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀), onde quanto maior for o consumo de DPPH por uma amostra, menor será o resultado do CE₅₀ e maior o seu potencial antioxidante (RODRIGUES et al., 2013).

O teste quantitativo foi realizado segundo metodologia descrita por Mensor et al (2001). A partir de 0,0025 g do extrato vegetal em 25 mL de etanol. Em seguida foi preparada as soluções para a leitura, que para cada concentração analisada foi retirado uma alíquota de 2,5 mL (em triplicata) e posteriormente a adição de 1,0 mL da solução etanólica de DPPH a 0,3 mM. Para o preparo do branco (em triplicata – para cada concentração), foi adicionado em cada vidro âmbar 2,5 mL da solução teste e 1,0 mL de ETOH 99%. O negativo foi realizado em triplicata e em cada vidro âmbar foi adicionado uma alíquota de 2,5 mL de ETOH 99 % e 1,0 mL da solução etanólica de DPPH.

O teste foi realizado com um auxílio de um espectrofotômetro UV-VIS com um comprimento de onda de 518 nm, no qual foi realizado a leitura das soluções e assim a

obtenção das absorvâncias, que foram convertidas em potencial antioxidante através da equação 1.

Equação 1:

$$AAO\% = \frac{100 - (ABSA - ABSB \times 100)}{ABSC}$$

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Quantificação de compostos fenólicos por HPLC

Para quantificar e identificar os compostos fenólicos, as amostras foram injetadas no HPLC e a partir da comparação de retenção dos padrões de polifenóis, foi possível realizar tal procedimento. Conforme resultados dispostos na tabela 1. Tais compostos são muito citados na literatura científica por sua ação antioxidante.

Tabela 1- Identificação e quantificação de compostos fenólicos por HPLC em *Anadenanthera falcata* (benth) Speg

Compostos Fenólicos	Concentração
Catecal	1,79 mg/L
Ácido clorogênico	1,24 mg/L
Ácido cafeico	1,12 mg/L
Vanilina	0,83 mg/L
Seringaldeido	1,61 mg/L
Ácido cumárico	0,37 mg/L
Cumarina	0,36 mg/L
Ácido salicílico	1,12 mg/L
Rutina	1,50 mg/L
Quercetina	0,65 mg/L
Kaempferol	1,39 mg/L

Fonte: Dados do autor.

Os compostos fenólicos são fitoquímicos que possuem ação antioxidante, evitando a formação de radicais livres ou retardando a oxidação nos seres vivos e plantas. Este processo, acontece por meio da neutralização da estrutura química e/ou sua ação redutora. Portando a ingestão de compostos fenólicos traz benefícios ao organismo humano. Estudos científicos

comprovam que este grupo de metabolitos, possuem ação antioxidante, evitando o surgimento de doenças crônicas degenerativas (DEBORA, et al, 2018).

Avaliação quantitativa da atividade antioxidante pelo método do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila – DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante, a espécie estudada apresentou um percentual de 93,10% (AAO%) na concentração de 600µg/ML, conforme tabela 2.

Tabela 2- Percentual antioxidante de *Anadenanthera falcata* (benth) Speg

AMOSTRA	CONCENTRAÇÃO	PERCENTUAL
<i>Anadenanthera falcata</i> (benth) Speg	600 µg/mL	93,10 %

Fonte: Dados do autor.

É possível identificar que esse valor é similar ou superior a amostras já citadas na literatura. Segundo Dias (2008) a espécie *Erythrina falcata* (folha), na concentração de 1000µg/mL, apresentou AAO% de 87,73%, sendo então menos efetiva que *A. falcata*.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, a *Anadenanthera falcata* merece destaque quanto a sua capacidade antirradicalar tendo em vista o crescimento pela busca de extratos vegetais que apresentem essa atividade devido ao aumento de patologias associadas a presença de radicais livres. A presença de compostos fenólicos certamente explica o potencial antirradicalar da espécie.

REFERÊNCIAS

CAETANO, N. L. B., AMARAL, R. G., NEO, G. G. A., SANTOS, S. A., ANDRADE, L. N., ANDRADE, L. R. M., SEVERINO, P., Carvalho, A. A. (2018). Uso de plantas medicinais e fitoterápicos por pacientes submetidos a tratamento antineoplásico no serviço de saúde privado no estado de Sergipe-Brasil. **Caderno de Graduação-Ciências Biológicas e da Saúde-UNIT**, Aracaju, v. 5, n. 1, p. 163-176, Out. 2018.

BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. C. G., PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 23, n. 4, p. 629-643, Aug. 2010.

BEZERRA, A. S., STANKIEVICZ, S. A., KAUFMANN, A. I., MACHADO, A. A. R., UCZAY, J. (2017). Composição nutricional e atividade antioxidante de plantas alimentícias
(83) 3322.3222

contato@conadis.com.br

www.conadis.com.br

não convencionais da região sul do Brasil. **Arquivos Brasileiros de Alimentação**, Recife, v. 2, (3), p. 182-188. 2017.

DÉBORA, H. I. T. Z., BARBOSA, M., CAMPOS, N. M., MAZUR, C. E. AÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS NA ATEROSCLEROSE: UMA REVISÃO. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.19 n. 1, Jan-Mar, 2018.

DIAS, S. A. **Avaliação de parâmetros neurofarmacológicos, genotóxicos e antioxidantes do extrato etanólico das folhas da *Erythrina falcata***. 2008. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada), Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, Universidade Luterana do Brasil, Canoas, 2008.

LEITE, V. I. Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante, antifúngica e moduladora do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* (BERTH) BRENAN. **Revista Cubana de Farmácia**, vol. 49, n. 4, p. 719-733, 2015.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 2, p. 127-130. 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000118&pid=S0100-2945201400020001800019&lng=en>. Acesso em 20 outubro de 2018.

NASCIMENTO, J. C. OLIVEIRA, L.F. CAMARGOS, C.R.D. AMARAL, J. C. COSTA, L.M. SOUSA, A.N. OLIVEIRA, F.Q. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, vol. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

RIBEIRO, D. A, MACÊDO, D. G., OLIVEIRA, L. G. S., SARAIVA, M. E., OLIVEIRA, S. F., SOUZA, M. M. A. Potencial terapêutico e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga no estado do Ceará, nordeste do Brasil. **Rev. bras. plantas med.** Botucatu , v. 16, n. 4, p. 912-930, Dezembro. 2014.