

Atividade antioxidante de extratos hidroalcoólicos obtidos de diferentes biomassas lignocelulósicas

Raquel Bombarda Campanha¹, Jessika Layane da Cruz Rocha², Andrea Samara da Silva Moraes³, Patrícia Abrão Oliveira Molinari⁴, Simone Mendonça⁵

Resumo

A incorporação dos princípios da química verde nos processos produtivos é imprescindível para o desenvolvimento sustentável. Produzir biocombustíveis e químicos com alto valor agregado de forma integrada vai de encontro a crescente demanda da bioeconomia. Neste sentido, o objetivo do trabalho foi produzir extratos fluido ricos em compostos bioativos a partir de uma biomassa lignocelulósica selecionada com base sua atividade biológica e perfil químico, paralelamente à produção de energia ou biocombustível. As matérias-primas utilizadas neste estudo foram: sorgo biomassa (*Sorghum bicolor*), casca de soja (*Glycine max*), casca de algodão (*Gossypium hirsutum*), casca de semente de algodão (*Gossypium hirsutum*), casca de coco verde (*Cocos nucifera*), palhada de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim setária (*Setaria sphacelata*) e cana-do-reino (*Arundo donax*). Os extratos hidroalcoólicos dessas matérias-primas foram caracterizados quanto ao teor de fenóis e flavonoides totais e a atividade antioxidante foi avaliada através dos métodos de sequestro de radical livre (DPPH e ABTS), poder de redução do ferro (FRAP) e pelo sistema de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico. Os resultados obtidos para o teor de fenóis totais variaram de 23 ± 1 a 138 ± 3 μg EAG/mg de extrato seco, sendo que o extrato que apresentou maior teor de fenólicos totais foi o de casca de semente de algodão. Para o método de DPPH e ABTS os resultados obtidos para a casca da semente do algodão e casca de algodão foram os maiores, mais próximos ao do extrato de alecrim. Fato que se repetiu na avaliação pelo método FRAP. As outras biomassas tiveram atividade antioxidante bastante inferior. Na avaliação que considera a ação na proteção de material lipídico, os extratos de casca de algodão e de sorgo, tiveram as maiores atividades antioxidante.

Palavras-chave: bioeconomia, compostos bioativos, resíduos agroindustriais, TEAC.

Introdução

De acordo com a Farmacopeia Brasileira, extratos fluidos são preparações líquidas obtidas de drogas vegetais ou animais por extração com um líquido apropriado (Brasil, 2010). Extratos vegetais são cada vez mais incorporados a formulações cosméticas,

¹ Química, mestre em Ciência de Alimentos, analista da Embrapa Agroenergia, raquel.campanha@embrapa.br

² Farmacêutica, mestranda em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, jessikalayanerocha@gmail.com

³ Farmacêutica, estagiária da Embrapa Agroenergia, moares.samara@hotmail.com

⁴ Farmacêutica, doutora em Química, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, patricia.oliveira@embrapa.br

⁵ Farmacêutica, doutora em Saúde Pública, pesquisadora da Embrapa Agroenergia, simone.mendonca@embrapa.br

e a adição destes ocorre devido às atividades clínicas atribuídas aos mesmos, como atividade antioxidante, atividade anti-inflamatória e anti-envelhecimento.

Os antioxidantes desempenham um papel importante na inibição e eliminação de radicais livres. Esta propriedade dos extratos pode ser explorada tanto para o efeito in vivo (proteção aos seres humanos prevenindo o envelhecimento dos órgãos, o câncer, a disfunção imunológica e outras doenças que estão intimamente relacionadas com o dano oxidativo em células induzidas por radicais livres (Zhang et al., 2011)) quanto como na prevenção de deterioração de formulações cosméticas, alimentícias ou de biodiesel.

Existe uma tendência de substituição dos antioxidantes sintéticos como hidroxianisole butilado (BHA), o hidroxitolueno butilado (BHT) e a tert-butilhidroquinona (TBHQ) por antioxidantes naturais, formados principalmente de metabólitos secundários de plantas. Grande parte dos antioxidantes naturais são compostos fenólicos, em particular os flavonoides e os ácidos hidroxicinâmicos (Balasundran et al., 2006).

Em decorrência da grande diversidade química existente, em especial entre os compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliação da capacidade antioxidante de amostras. Sendo os mais populares o 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), o 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e o *ferric reducing antioxidant power* (FRAP). Estes ensaios diferem em relação ao mecanismo de ação, às espécies alvo, às condições reacionais e na forma como os resultados são expressos (Oliveira et al., 2009).

A determinação da capacidade sequestrante do radical ABTS^{•+} está baseada na habilidade dos antioxidantes em capturar este radical, causando decréscimo da absorvância. O radical é obtido a partir de um precursor, o ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico, composto cromóforo estável e solúvel em meios orgânicos e aquosos (Torres et al., 2017). O DPPH é um radical livre estável que em metanol possui uma absorção característica a 518 nm de cor roxa. Na presença de sequestradores de radicais, que fornecem átomos de hidrogênio ou doam elétron, a forma reduzida do radical é acompanhada pela perda da cor (Sanchez, 2017). O princípio do método FRAP é baseado na produção do íon Fe²⁺ a partir da redução do íon Fe³⁺, encontrado no complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) na presença de antioxidantes. Esta propriedade indica que os compostos antioxidantes são doadores de elétrons e podem reduzir os intermediários oxidados do processo de peroxidação lipídica, de forma que possam atuar como antioxidantes primários e secundários (Ghahremani-Majd; Dashti, 2015). Outro teste antioxidante usado neste estudo baseia-se na perda da cor amarela do β-caroteno devido à sua reação com os produtos da oxidação do ácido linoleico em uma emulsão. A avaliação do sistema β-caroteno/ácido linoleico determina a capacidade de uma amostra de proteger um substrato lipídico da oxidação (Duarte-Almeida et al., 2006).

Produzir biocombustíveis e químicos com alto valor agregado de forma integrada, dentro do conceito de biorrefinarias, foi a motivação deste trabalho. A produção de extrato bioativos poderia ser inserida como um processo preliminar antes da produção do etanol de segunda geração ou cogeração, integrado assim ao processo de produção de biocombustíveis. As matérias-primas utilizadas neste estudo foram: sorgo biomassa (*Sorghum bicolor*), casca de soja (*Glycine max*), casca de algodão (*Gossypium hirsutum*), casca de semente de algodão (*Gossypium hirsutum*), casca de coco verde (*Cocos nucifera*), palhada de cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), capim setária (*Setaria sphacelata*) e cana-do-reino (*Arundo donax*). Estas biomassas foram selecionadas por estarem ligadas

diretamente a cadeia agroenergética para a produção de biocombustíveis/energia ou serem resíduos gerados em outras cadeias, mas que possuem potencial para a produção de energia.

Material e Métodos

Material

O presente trabalho utilizou extratos hidroalcoólicos liofilizados obtidos a partir das seguintes biomassas: casca de algodão e casca de semente de algodão doados pela empresa Dual (Campo Novo do Parecis-MT), palhada de cana-de-açúcar da empresa Jales Machado (Goianésia-GO), casca de coco verde (CEASA de Brasília-DF) e casca de soja (Cooperativa Agrícola do Rio Preto, localizada em Planaltina-DF); e plantas inteiras: setária e arundo coletados em áreas experimentais da Embrapa Agroenergia no Distrito Federal e sorgo da Embrapa Milho e Sorgo (Sete Lagoas-MG). Um extrato comercial de alecrim foi usado como referência.

Quantificação de Fenóis Totais

A quantificação de fenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu com adaptações de Waterhouse (2002). Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. Em tubos de ensaio foi pipetado 100 μ L de cada extrato, em triplicata, adicionados 7mL de água deionizada e 500 μ L de reagente de Folin-Ciocalteu, após um período mínimo de 1 minuto e máximo de 8 minutos foi adicionado 1,5 mL de carbonato de sódio 20%. Os tubos foram deixados ao abrigo da luz por 2h antes da leitura da absorbância a 765 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi feita com ácido gálico nas concentrações: 10, 100, 200, 300, 400 e 500 μ g/mL. Os resultados foram expressos como μ g de ácido gálico/mg de extrato.

Quantificação de Flavonoides Totais

A quantificação de flavonoides totais foi realizada de acordo com metodologia descrita por Siatka e Kasparova (2010). Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. Em tubos de ensaio foi pipetado 1 mL de cada extrato, em triplicata, adicionados 100 μ L de solução reativa de cloreto de alumínio 2% (p/v) e 1,4 mL de ácido acético 5% em metanol (v/v). Os tubos foram deixados ao abrigo da luz por 30 minutos antes da leitura da absorbância a 425 nm em espectrofotômetro. A curva de calibração foi feita com quercetina nas concentrações: 1, 10, 20, 30, 40 e 50 μ g/mL. Os resultados foram expressos como μ g de quercetina/mg de extrato.

Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS^{•+})

O ensaio avalia a capacidade que os extratos possuem de sequestrar o radical ABTS^{•+} foi realizado conforme descrito por Re et al. (1999) com modificações. Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. A solução do radical catiônico ABTS^{•+} foi preparada com 5 mL da solução estoque de ABTS (ácido

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfônico)) a 7 mM e 88 μL da solução de persulfato de potássio a 140 mM, mantida ao abrigo de luz por 16 horas, a temperatura ambiente. Após esse período, uma alíquota da solução foi diluída em metanol até obter absorvância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm. Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 20 μL de cada extrato, em triplicata, e adicionados 280 μL de radical ABTS^{•+}. A microplaca foi deixada por 6 minutos ao abrigo de luz antes da leitura da absorvância a 734 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em μg de trolox/mg de extrato e, para isso, foi feita uma curva de calibração com Trolox nas concentrações: 1, 2,5, 5, 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical 2,2 - difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

O método foi realizado conforme descrito por Pires et al. (2017) com modificações. Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. Em microplaca de 96 poços, foram pipetados 22 μL de cada extrato, em sextuplicata, e adicionados 200 μL de solução de DPPH a 0,06 mg/mL. A microplaca foi deixada por 30 minutos ao abrigo de luz antes da leitura da absorvância a 518 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em μg de trolox/mg de extrato e, para isso, foi feita uma curva de calibração com Trolox nas concentrações: 20, 65, 110, 155 e 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Atividade antioxidante pelo método de redução do íon férrico (FRAP)

O ensaio foi realizado conforme descrito por Benzie e Strain (1996) com modificações. Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) em diferentes concentrações. A solução reagente FRAP foi preparada com 50 mL de tampão acetato de sódio 0,3 M pH 3,6, 5 mL de solução TPTZ 10 mM (em HCl 40 mM) e 5 mL de solução de cloreto férrico 20 mM. Em microtubos de 2 mL, foram pipetados 30 μL de cada extrato, em triplicata, 90 μL de água deionizada e 900 μL de reagente FRAP. Após agitação, três alíquotas de 200 μL foram transferidas de cada microtubo para microplaca de 96 poços. A microplaca foi incubada a 37 °C por 30 minutos ao abrigo de luz antes da leitura da absorvância a 595 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em μg de trolox/mg de extrato e, para isso, foi feita uma curva de calibração Trolox nas concentrações: 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Atividade antioxidante pelo sistema de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico

Esse método foi adaptado do estudo publicado por Duarte-Almeida et al. (2006). Os extratos foram solubilizados em etanol 80:20 (v/v) a 1 mg/mL. Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 80 μL de ácido linoleico, 1600 μL de Tween 20, 1000 μL de solução de β -caroteno a 2 mg/mL em clorofórmio e 5 mL de clorofórmio. A mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio em rotaevaporador. Adicionou-se água previamente saturada com oxigênio até a mistura apresentar absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm. Em microplaca de 96 poços foram 10 μL de cada extrato, em pelo menos quadruplicata, e adicionados de 250 μL de mistura reativa. A microplaca

foi incubada a 50°C por 2 horas ao abrigo de luz, a leitura da absorbância a 470 nm em espectrofotômetro foi registrada no início (tempo inicial) e após os 120 minutos de reação (tempo final). Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição da oxidação, calculada em relação ao decaimento da absorbância do controle (etanol 80:20), que deve ser menor que 0,2 de absorbância para ser considerado que houve 100% de oxidação, após 120 min de reação.

Análise Estatística

Todos os ensaios foram realizados em no mínimo triplicata certificando-se que o coeficiente de variação das replicatas analíticas fosse menor que 5%, além disso, foi assegurado que o R^2 da regressão linear das curvas padrão tivesse valor próximo a 1. Os dados foram avaliados pelo emprego software Microsoft Excel (2016), abrangendo a análise descritiva dos dados pela análise de variância por ANOVA e comparação de médias pelo teste Tukey ($p < 0,05$).

Resultados e Discussão

Diversos estudos comprovaram a atividade antioxidante do alecrim na forma natural e sob a forma de extrato, sendo considerado uma das plantas que apresenta maior poder antioxidante (Basaga et al., 1997; Almeida-Doria; Regitano-D'Arce, 2000; Ramalho; Jorge, 2006). Por esse fato, extrato de alecrim comercial foi utilizado como referência em todas as análises realizadas com os extratos estudados no presente trabalho.

Os resultados da quantificação de fenóis totais estão apresentados na Figura 1a. Como era esperado, o extrato de alecrim possui o maior teor de fenóis totais, seguido pelo extrato de casca de semente de algodão, casca de algodão e casca de coco verde (138 ± 3 , 108 ± 3 e 77 ± 2 μg de ácido gálico/mg de extrato, respectivamente), enquanto que a casca de soja foi o extrato com o menor teor de compostos fenólicos totais (23 ± 1 μg de ácido gálico/mg de extrato).

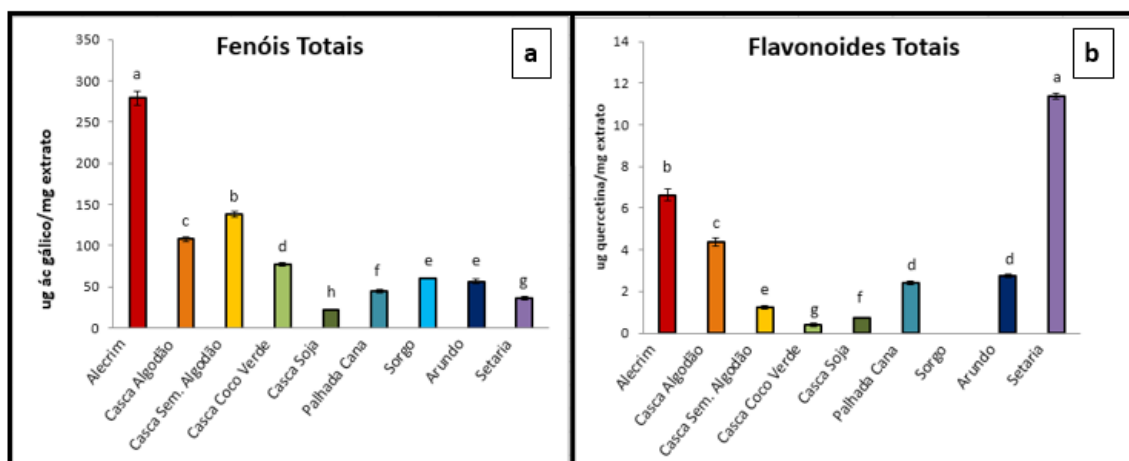


Figura 1. Teor de (a) fenóis totais e (b) flavonoides totais dos extratos hidroalcoólicos estudados. Letras iguais, dentro de cada método, não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A quantificação de flavonoides totais (Figura 1b) mostrou que, entre os extratos estudados, o de setária teve o maior valor para esse parâmetro ($11,38 \pm 0,14 \mu\text{g}$ de quercetina/mg de extrato), o teor de flavonoides totais do extrato de sorgo encontrado estava abaixo do limite de quantificação do método usado.

A avaliação da atividade antioxidante está apresentada na Figura 2. Os resultados obtidos pelos métodos ABTS, DPPH e FRAP expressam o resultado em equivalentes de Trolox, que permite a comparação direta de resultados executados em laboratórios com diferentes ajustes metodológicos.

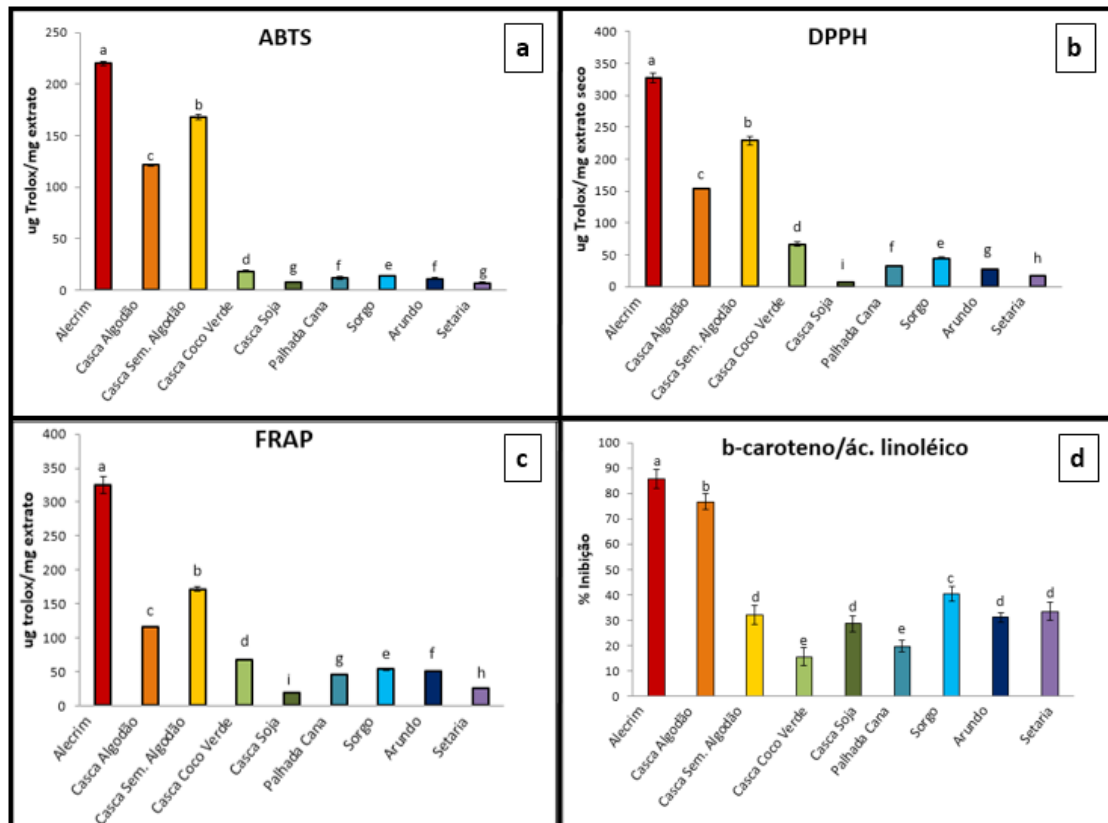


Figura 2. Atividade Antioxidante pelos métodos: (a) ABTS, (b) DPPH, (c) FRAP e (d) sistema β -caroteno/ácido linoleico. Letras diferentes, dentro de cada método, apresentam diferença estatística pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

A Figura 2a mostra que pelo método ABTS os extratos de casca de semente de algodão e casca de algodão foram, apesar de menores, os que apresentaram atividade antioxidante mais próxima ao do alecrim, enquanto os outros extratos avaliados apresentaram valores bem abaixo desses. Um perfil muito próximo foi obtido com o método DPPH (Figura 2b), onde o extrato de alecrim apresentou a maior atividade, seguido por casca de semente de algodão e casca de algodão, respectivamente, e o extrato de casca de coco verde aparece se destacando levemente dos extratos com valores mais baixos. Com o método ABTS pode-se medir a atividade de substâncias com natureza hidrofílica e lipofílica, fator limitante no ensaio de DPPH, que apresenta pouca reprodutibilidade para substâncias com natureza hidrofílica (Rufino et al., 2007). As capacidades antioxidantes obtidas pelo método FRAP (Figura 2c), apesar de seguir o mesmo perfil daqueles encontrados com os métodos ABTS e DPPH, apresentaram maiores diferenças entre os extratos estudados e o alecrim. Em comparação ao

observado nos outros métodos, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico foi possível observar a mudança no perfil da atividade antioxidante (Figura 2d) dos extratos, de modo que o extrato de casca de algodão apresentou valor mais próximo ao alecrim seguido pelo sorgo, e os extratos de casca de coco verde e palhada de cana de açúcar tiveram os valores mais baixos. O método de cooxidação do β -caroteno/ácido linoleico permite a avaliação da atividade de uma amostra ou composto ao proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que métodos como o de inibição de radicais DPPH, por exemplo, baseiam-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (Duarte-Almeida et al., 2006), fato que explica a mudança no perfil das atividades antioxidantes observadas.

Os polifenóis compreendem o maior grupo dentre os compostos bioativos nos vegetais, sendo subdivididos em classes, de acordo com a estrutura química de cada substância. Os flavonoides formam uma das classes mais importantes quanto a atividades bioativas. No entanto, apesar da atividade antioxidante dos extratos avaliados guardar relação com o teor de fenóis totais, isto não ocorre com o teor de flavonoides. Indicando que possivelmente esta não é a classe de fenóis responsável pela ação antioxidante.

Conclusão

Dentre as biomassas estudadas, as que apresentaram melhor atividade antioxidante foram casca de semente algodão, casca de algodão e casca de coco-verde. Os métodos de avaliação antioxidante que se baseiam em captura de radicais livres ou poder redutor tiveram comportamentos similares, esses resultados estão de acordo com o encontrado na quantificação de fenóis totais. No entanto, no teste que avaliou a proteção de material lipídico contra a oxidação, a casca de algodão é que teve destacada ação antioxidante. Apesar de apresentar o maior teor de flavonoides totais, a setária não se sobressaiu em nenhum dos testes antioxidantes realizados.

Referências

- ALMEIDA-DORIA, R. F.; REGITANO-D'ARCE, Marisa AB. Antioxidant activity of rosemary and oregano ethanol extracts in soybean oil under thermal oxidation. **Food Science and Technology**, v. 20, n. 2, p. 197-203, 2000.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, 99, 191–203, 2006.
- BASAGA, Huveyda; TEKKAYA, Ceren; ACIKEL, Funda. Antioxidative and free radical scavenging properties of rosemary extract. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 1, p. 105-108, 1997.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Analytical biochemistry**, v. 239, n. 1, p. 70-76, 1996.
- BRASIL. Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa; 2010.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema beta-caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Food Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- GHAHREMANI-MAJD, Hojat; DASHTI, Farshad. Chemical composition and antioxidant properties of cultivated button mushrooms (*Agaricus bisporus*). **Horticulture, Environment, and Biotechnology**, v. 56, n. 3, p. 376-382, 2015.
- OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 689-702, 2009.
- PIRES, Janaína et al. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017.

RAMALHO, Valéria C.; JORGE, Neuza. Atividade antioxidante do α -tocoferol e do extrato de alecrim em óleo de soja purificado. **Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)**, São Paulo, v. 65, n. 1, 2006.

RE, Roberta et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology and medicine**, v. 26, n. 9-10, p. 1231-1237, 1999.

RUFINO, M. D. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS*. Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E), 2007.

SÁNCHEZ, Carmen. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. **Synthetic and systems biotechnology**, v. 2, n. 1, p. 13-22, 2017.

SIATKA, T.; KASPAROVA, M. Seasonal variation in total phenolic and flavonoid contents and DPPH scavenging activity of *Bellis perennis* L. flowers. **Molecules**. V. 15, p. 9450-9461, 2010.

TORRES, Priscila Bezerra et al. Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS^{•+} em microplaca. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017.

WATERHOUSE, A. L. Determination of total phenolics. Current Protocols in Food Analytical Chemistry. Seção I, Capítulo I, Unidade I 1.1, 2002.

ZHANG, J.; YUAN, K.; ZHOU, W.; ZHOU, J.; YANG, P. Studies on the active components and antioxidant activities of the extracts of *Mimosa pudica* Linn. **Pharmacognosy Magazine**, 2011.