



ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE POR DPPH E DAS
CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS DO EXTRATO ETANÓLICO DAS PARTES
AÉREAS DE *PLECTANTHUS AMBOINICUS*

Suele Bierhals Vencato¹
Marcela S. Santos²
Claudia C. Brigido²
Ivana Grivicich,²
Alexandre Barros Falcão Ferraz²

Resumo:

Plectranthus amboinicus é popularmente conhecida como hortelã-da-folha-grossa, hortelã-da-folha-graúda e malvariço. *P. amboinicus* é indicada para tratar uma ampla gama de alterações fisiológicas como queimadura, edema, inflamação, artrite, bronquite, asma crônica, distúrbios gastrintestinais e renais. Devido a relação de varias indicações de uso com o estresse oxidativo, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antioxidante e estudar a constituição fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *P. amboinicus*. A capacidade antioxidante foi determinada através do ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), utilizando como padrão a rutina (IC₅₀ = 22,62 ± 1,0 mg/mL). O extrato foi analisado por ensaios colorimétricos qualitativos (screening fitoquímico) e quantitativos (doseamento do teor de compostos fenólicos, flavonoides e taninos totais). A capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *P. amboinicus* apresentou o valor de IC₅₀ = 486,83 ± 3,28 mg/mL. Quanto a constituição fitoquímica, apenas saponinas, diterpenos e flavonoides foram detectados pelos ensaios qualitativos do *screening*. Os doseamentos apresentaram um teor de 33,40 ± 3,82g EAG/g de compostos fenólicos e 4,33 ± 0,88 g EQ/g de flavonoides totais. Os dados aqui encontrados mostram que *P. amboinicus* possui uma baixa concentração de compostos fenólicos, o que esta de acordo com o fraco potencial antioxidante desta planta. A ausência de alcaloides e o baixo teor de compostos fenólicos encontrado no extrato etanólico das folhas de *P. amboinicus*, permite sugerir que as propriedades medicinais desta planta devam estar relacionadas aos derivados de origem terpênica, tais como saponinas e diterpenos.

Palavras-chave: estresse oxidativo; terpenos; flavonoides;

INTRODUÇÃO:

As plantas são mundialmente empregadas na medicina popular, a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de inúmeras patologias tiveram seu início com a utilização de plantas medicinais, desde o inicio da antiguidade, sendo utilizadas e pesquisadas até o hoje (PINTO et al, 2002). Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram que cerca de 80% da população mundial faz uso de algum tipo de erva na busca de alívio de alguma sintomatologia dolorosa ou desagradável. Desse total, pelo menos 30% ocorreu por indicação médica (Silva & Casali, 2000)

O conhecimento adquirido pela cultura popular sobre plantas medicinais está cada vez mais sendo buscado e pesquisado. Devido ao elevado custo de medicamentos, as plantas estão sendo cada vez mais empregadas como uso empírico popular na medicina.

¹ Aluna do curso de Farmácia na Universidade Luterana do Brasil – Bolsista PIBIC/CNPq

² Programa de Pós Graduação em biologia celular e molecular aplicada à saúde

alexandre.ferraz@ulbra.br

Sendo analisadas cientificamente os seus constituintes biológicos e comprovando sua eficácia e segurança para utilização (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; PINTO et al, 2002)

Com a evolução da ciência e dos métodos experimentais, começaram a ser estudados os seus constituintes químicos, buscando o isolamento de princípios ativos para pesquisar os efeitos que tais substâncias exercem sobre o organismo humano e animal. (ALVIM et al., 2006).

Um exemplo de empírico popular muito utilizado é *Plectranthus amboinicus* uma planta aromática nativa da Ásia Oriental - Índia (WEI et al., 2006; LUKHOBA et al., 2006; LORENZI & MATOS, 2008). No Brasil é popularmente conhecida como malva-do-reino, hortelã-da-folha-grossa, hortelã-da-folha-graúda e malvariço, como descrita por GURGEL et al, (2009). É uma árvore do tipo arbusto, herbácea, perene, com caule grosso de cor verde, sua parte medicinal é a que cresce acima do solo (LUKHOBA et al., 2006; WU et al., 2008). *P. amboinicus* é indicada no tratamento de uma ampla gama de alterações fisiológicas como queimadura, edema, inflamação, artrite, bronquite, asma crônica, distúrbios gastrintestinais e renais, segundo KHARE et al,(2011). Este trabalho teve como objetivo, analisar a constituição fitoquímica e avaliar o potencial antioxidante através do ensaio com o radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

METODOLOGIA:

Material vegetal: As partes aéreas de *P. amboinicus* foram coletadas, no Município de Teresina, Estado de Piauí – Brasil.. O material para produção do extrato aquoso foi selecionado e seco em ambiente arejado e ao abrigo de luz direta, depois foi triturado em moinhos de facas. Após a separação foi realizada a extração e fracionamento dos extratos.

Preparação do extrato bruto: Para obtenção do extrato bruto, as folhas de *P. amboinicus* foram submetidas a extração em aparelho soxhlet, na relação de 1:10 (planta/solvente). O extrato bruto etanólico, foi concentrado em rota evaporador sob temperatura inferior a 50 °C.

Análise fitoquímica: A análise fitoquímica qualitativa (flavonóides, taninos, antraquinonas, alcalóides, saponinas, cumarinas e glicosídeos cardiotônicos) das partes aéreas de *P. amboinicus* foi analisada de acordo com os métodos descritos por Simões et al (2007). A presença de resultado positivo foi confirmada com a realização de cromatografia em camada delgada (CCD). As análises em cromatografia em camada delgada foram realizadas conforme sistema e desenvolvimento descrito por Wagner & Bladt (1996).

Determinação de compostos fenólicos: O conteúdo total foi determinado pelo método Folin-Ciocalteu. Para a preparação da curva de calibração foi utilizada 1 mL das soluções de ácido gálico em etanol nas concentrações de 0,015, 0,024, 0,075 e 0,105 mg/mL que serão misturadas com 5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (1:10) e 4 mL de carbonato de sódio (75 g/L) (Singleton & Rossi, 1965). Para o teste, foram utilizado 1 mL do extrato na concentração de 0,1 mg/mL. Após 1h, foi realizada a leitura da absorbância em 765 nm. (Miliauskas et al., 2004).

Determinação de taninos totais: Para a quantificação de taninos totais foi utilizado o método por precipitação da caseína. As amostras foram analisadas de acordo com o método Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965; Miliauskas et al., 2004). A quantidade de taninos totais corresponde à diferença entre o valor obtido nesse teste e o obtido no doseamento de fenólicos totais. Os testes foram realizados em triplicada e o valor total de taninos é expresso em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato.

Determinação de flavonoides totais: A quantificação de flavonoides foi realizada seguindo a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998) que utiliza a solução de cloreto de alumínio a 2,5% como agente cromogênico. A técnica baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonóides presentes na amostra. O teor de flavonóides será calculado através da equação da reta obtida na curva de calibração de quercetina. A curva será construída da mesma maneira que as amostras testadas, nas concentrações de 0,002 até 0,008 mg/mL. O valor obtido através da substituição da absorvância do teste na curva será convertido para expressar o resultado em flavonóides equivalentes de quercetina por grama de extrato liofilizado.

Avaliação da capacidade antioxidante por DPPH: O extrato bruto foi pesado e diluído em metanol para a obtenção das concentrações 50 a 400 µg/mL. Após, 2,5 mL da amostra foi transferida para a cubeta de 3,5 mL e adicionado 1 mL da solução de DPPH na concentração de 0,2 mg/mL. O controle negativo, consiste na amostra sem o DPPH, e o controle positivo, consiste em 1 mL de DPPH diluído em 2,5 mL de metanol. O padrão, utilizado é a rutina. Após 30 minutos, será medido a absorvância em espectrofotômetro no comprimento de ondas de 518 nm (Mensor et al., 2001). Os testes com o extrato e o padrão serão realizados conforme o método já descrito para o pré-teste. Todos os testes serão feitos em triplicata. A porcentagem de inibição de DPPH, que diz respeito à atividade antioxidante, será calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Inibição de DPPH} = [(Abs_{\text{controle}(+)} - Abs_{\text{amostra}}) \times 100] / Abs_{\text{controle}(+)}$$

RESULTADOS ALCANÇADOS E DISCUSSÃO:

A partir da análise do *screening* fitoquímico, não foram detectados, alcaloides, antraquinonas, cardiotônicos, cumarinas e taninos. Estes dados estão de acordo quando comparados a outros resultados da espécie *Plectranthus amboinicus* como o trabalho de El-hawary et al, 2012a. Por outro lado sugere-se a presença de diterpenos, flavonóides e saponinas (Tabela 1). Quanto a isso, a maioria dos estudos fitoquímicos com espécies de *Plectranthus* presentes na literatura basicamente relatam o isolamento de uma grande variedade de diterpenos (Lukhoba, Simmonds e Paton, 2006). De acordo com (Ascensão et al. 1998), o β-cariofileno, um sequisterperno é um dos principais constituintes químicos encontrados em diferentes espécies do gênero *Plectranthus*. Segundo Grayer et al. (2010), há poucos casos relatados de flavonóides na espécie *Plectranthus*. Mas, no *screening* realizado por El-hawary et al, (2012a) foi detectada a presença de flavonoides assim como neste estudo. Este resultado é confirmado pela identificação do flavonoide Crisoeriol detectado por UPLC-MS no trabalho de El-hawary et al, (2012b) além dos flavonoides isolados genkwantina, crisimaritina, taxifolina, apigenina e 5-O-metil-luteolina (El-hawary et al, 2012a). Contudo, este autor relata a presença de taninos, os quais não foram encontrados no *screening* nem no doseamento. Esta diferença pode ser explicada pela baixíssima quantidade (81 µg/g) detectada no estudo de El-hawary et al, (2012b) a qual em nossos métodos não podemos detectar.

Tabela 1: Resultados da análise qualitativas do *screening* fitoquímico apresentados pelo extrato bruto etanólico de *Plectranthus amboinicus*.

<i>Screening</i> Fitoquímico	
Classe Química	Resultado
Alcaloides	Negativo
Antraquinonas	Negativo
Cardiotônicos	Negativo

Cumarinas	Negativo
Diterpenos	Positivo
Flavonóides	Positivo
Saponinas	Positivo
Taninos	Negativo

Os doseamentos apresentaram um teor de $33,40 \pm 3,82$ g EAG/g de compostos fenólicos e $4,33 \pm 0,88$ g EQ/g de flavonoides totais. Novamente, comparando nossos dados (Tabela 2) com o trabalho de El-hawary et al, (2012b) notamos que o teor determinado de compostos fenólicos totais nas folhas de *P. amboinicus* também foi muito baixo (8,4 mg/g).

Tabela 2: Resultados de análise quantitativas dos doseamentos e DPPH apresentados pelo extrato bruto etanólico de *Plectranthus amboinicus*.

Doseamentos e DPPH	
Flavonoides Totais	$4,33 \pm 0,88^1$
Fenólicos Totais	$33,40 \pm 3,82^2$
Taninos Totais	ND
DPPH	$486,83 \pm 3,28^3$

¹ Resultado equivalente a quercetina mg/g de extrato; ² Resultado equivalente ao ácido gálico mg/ml de extrato; ³ $\mu\text{g/mL}$; ND= Não detectado

A capacidade antioxidante do extrato etanólico das folhas de *P. amboinicus* analisado pelo método do DPPH apresentou uma baixa atividade antioxidante ($\text{IC}_{50} = 486,83 \pm 3,28$ mg/mL) quando comparada ao padrão (quercetina $\text{IC}_{50} = 18,22 \pm 2,28$ mg/mL). A baixa atividade antioxidante para esta espécie também foi relatada no trabalho de Chia et al. (2011) que determinou a atividade frente ao DPPH em $660 \mu\text{g/mL}$.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Após a análise fitoquímica observa-se, a presença de diterpenos, flavonóides e saponinas. Através dos doseamentos constatou-se baixos teores de compostos fenólicos para o extrato etanólico das partes aéreas de *Plectranthus amboinicus*. O qual apresenta uma baixa atividade antioxidante frente ao DPPH, provavelmente relacionada ao reduzido teor de compostos fenólicos detectados pelos doseamentos, o que nos permite sugerir que as propriedades medicinais desta planta devam estar relacionadas aos derivados de origem terpênica, tais como saponinas e diterpenos.

REFERÊNCIAS

ALVIM, N.A.T. et al. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, 2006.

CHIA, JL , LIH, GC, TING, LC , WEI, MK, YING, FL , CHING, CW. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants, **Food Chemistry** v. 124, p. 833–841, 2011

- EL-HAWARY SS, EL-SOFANY RH., ABDEL-MONEM AR., ASHOUR RS..
Phytochemical Screening, DNA Fingerprinting, and Nutritional Value of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, **Pharmacognosy Journal**, v. 4 n. 30, p. 10- 13, 2012a
- EL-HAWARY SS, EL-SOFANY RH., ABDEL-MONEM AR., ASHOUR RS, SLEEM AA.
Polyphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng growing in Egypt (Lamiaceae). **Pharmacognosy Journal**, v. 4, n. 32, p. 45-54, 2012b.
- FALKENBERG, M.B; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução a análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6 ed., Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 165-181, 2007.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v: 30, p: 374-381, 2007.
- GRAYNER, R. J.; et al. Distribution of exudates flavonoids in the genus *Plectranthus*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 335-341, 2010.
- GURGEL, A. P. A. D.; SILVA, J. G.; GRANGEIRO, A. A. R. S.; OLIVEIRA, D. C.; LIMA, C. M. P.; SILVA, A. C. P.; OLIVEIRA, R. A. G.; SOUZA, C. I. A. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 125, p. 361–363, 2009.
- KHARE, R. S.; BANERJEE, S.; KUNDU, K. *Coleus aromaticus* Benth – a nutritive medicinal plant of potential therapeutic value. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. v. 2, n. 3, 2011.
- LORENZI, H. & MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil nativas e exóticas**. 2ª Edição, São Paulo: Instituto Plantarum. 2008.
- LUKHOBWA CW, SIMMONDS MSJ, PATON AJ. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses **Journal of Ethnopharmacology** v.103, p.1–24, 2006.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S., DOS SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, p.127-130; 2001.
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; van Beek, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-237, 2004.
- PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais: Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**. v: 25, p: 45-61, 2002.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas**. 2ªed. Berlin: Springer, 1996.
- WEI, CHENG-YU; LU, KU-SHAN.; HSIA, CHING-WU. et al. Leaf juice of *Plectranthus amboinicus* for treating cancer and/or tumor. United States. Patent Application Publication. Pub. N° :US 2006q0099283A1. Pub. Date: May 11, 2006. .
- WOISKY R., SALATINO A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37 p. 99-105, 1998.
- WU, R.Y.; CHUNG, Y. S.; WU, Y. Y.; SIU, M. L.; HUANG, H. J.; HSIAO, C. W. Plant extracts from genera *Plectranthus amboinicus* e *Centella asiatica* for treating skin disorders and enhancing healing of wounds for diabetics patients. European patent application EP 1 925 310 A1. 2008.