



REF – ISSN 1808-0804 Vol. X (3), 54 – 63, 2013.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE *in vitro* DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Rosmarinus officinalis* L.

EVALUATED OF ACTIVITY ANTIOXIDANT in vitro ETHANOLIC EXTRACT OF LEAVES FOR Rosmarinus officinalis L

Thiago José Matos Rocha¹; Márcia Maria Pacheco dos Santos¹; Kelly Cristina Barbosa Silva Santos¹; Bonifácio Pereira do Nascimento Filho¹; Bruno Dyego da Rocha Noé¹; Aldenir Feitosa dos Santos² *

1 Curso de Farmácia, Centro Estudos Superiores de Maceió (CESMAC). Rua Cônego Machado, s/n, Maceió – AL.

2 Professora das disciplinas de bioquímica básica e bioquímica animal do CESMAC.

*Autor para correspondência e-mail: aldenirfeitosa@gmail.com

Enviado em 24/06/10, Aceito em 08/07/12

RESUMO: Os organismos vivos estão constantemente sujeitos à ação oxidativa do oxigênio, sendo que diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra estes processos oxidativos que ocorrem no organismo. Foi descoberto que uma série de doenças entre as quais câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, doenças do coração, podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de "Radicais Livres de Oxigênio" ou RLO. Estão ligadas também com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo. Os produtos alimentícios também se mostram suscetíveis a estes processos oxidativos, resultando em substâncias finais prejudiciais ou com características sensoriais indesejáveis, reduzindo com isso o prazo de validade dos produtos. A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso

farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de toxicidade. O presente trabalho se propõe a estudar a atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas do *Rosmarinus officinalis*, pelo método em que consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura. Ela, entre outras atividades farmacológicas, é utilizada no combate ao catarro e a tosse. Na avaliação preliminar qualitativa obteve-se mancha amarelada no Rfs do extrato etanólico vegetal indicando que é viável para o teste de avaliação quantitativa da AAO%, que mostrou que todas as concentrações têm atividade seqüestradora do radical DPPH.

PALAVRAS-CHAVE: Atividade antioxidante. Planta medicinal. Radicais livres.

ABSTRACT: Living organisms are constantly subject to oxidative action of oxygen, and that several studies have shown that consumption of antioxidant substances in the daily diet, may produce a protective effective action against such oxidative processes that occur in the body. It was discovered that a number of diseases including cancer, arteriosclerosis, diabetes, arthritis, malaria, heart disease, could be linked to damage caused by highly reactive forms of oxygen called "Free Radicals of Oxygen" or RLO. They are also linked with processes responsible for aging of the body. The food also show oxidative susceptible to these processes, resulting in harmful substances or end with sensory characteristics undesirable, reducing it to the shelf life of products. Since the early 80's, the interest in finding natural antioxidants for employment in food or for pharmaceutical use, has increased considerably, with the aim of replacing synthetic antioxidants, which have been restricted because of its potential for toxicity. This study aims to study the antioxidant activity of ethanol extract of the leaves of *Rosmarinus Officinalis*, where the method is to assess the activity of kidnapper free radical 2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila - DPPH •, color purple . She, among other pharmacological activities, is used to combat cough and phlegm. In the preliminary assessment qualitative returned to yellow spot in the Rfs extract ethanol plant indicating that it is feasible for the test of quantitative evaluation of the AAO%, which showed that all mergers are kidnapper activity of the radical DPPH.

KEY WORDS: Antioxidant activity. Medicinal plant. Free radical.

INTRODUÇÃO

Os radicais livres de oxigênio (RLO) são produzidos naturalmente em nosso organismo através de processos

metabólicos oxidativos e, muitas vezes, são de extrema utilidade, como nas situações em que há necessidade de

ativação do sistema imunológico (como exemplo, os macrófagos utilizam o peróxido de hidrogênio para destruir bactérias e outros elementos estranhos); na desintoxicação de drogas; e na produção do fator relaxante derivado do endotélio, o óxido nítrico, extremamente importante nos processos que desencadeiam o relaxamento dos vasos sanguíneos (SHENEIDER, 2004).

Para evitar os danos causados pelos radicais livres, o organismo desenvolveu vários mecanismos de defesa, isto é, potenciais de neutralização das ações dos radicais livres, chamados de antioxidantes. Esses antioxidantes estão em permanente atividade no organismo em quantidades suficiente para neutralizar os efeitos dos radicais livres normalmente produzidos (BELLÓ et al., 2002).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que sofrem oxidação em detrimento de outra que seria importante que permanecesse no estado de oxidação natural, e isso se dá pelos mais diferentes mecanismos. Essas substâncias são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos nas células (BARREIROS et al, 2003).

Os sistemas antioxidantes podem ter origem endógena (por ex., superóxido dismutase), ou serem provenientes da dieta alimentar e outras

fontes. Destas últimas destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenóides (HASLAM, 1996; OMONI; ALUKO, 2004; GIL et al. 2005). Como já foi dito, quando há limitação na disponibilidade de antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter cumulativo.

A busca por substâncias antioxidantes naturais vem aumentando nos últimos anos, por isso que cada vez mais os grandes centros de pesquisa e indústrias farmacêuticas têm investido neste tipo de pesquisa (GORDON, 1996). Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, de coloração púrpura que absorve a 518 nm.

Espécies vegetais são fontes importantes de produtos naturais, muitos dos quais se constituem em modelos para desenvolvimento de um grande número de medicamentos (LÚCIO; GIL, 2007).

Algumas plantas medicinais popularmente utilizadas em determinadas regiões do Brasil e do mundo para o tratamento de vários desconfortos e enfermidades, como inflamações podem ter seu uso

parcialmente justificado pela capacidade de neutralizar radicais livres, ou seja, exibirem uma composição química rica em antioxidantes (MORAIS; et al. 2006).

A *Rosmarinus officinalis* L é conhecida popularmente como alecrim, e utilizada no combate ao catarro e a tosse. E, tendo como modo de uso: Chá e lambedor da folha. Além de ser utilizado na culinária, o alecrim está associado a várias propriedades medicinais sendo usada como: estimulante digestivo, antiespasmódica, estomacal, vasodilatadora, anti-séptica. As ações antibacteriana e espasmolíticas são atribuídas ao seu óleo essencial (MORGAN, 1982).

A descorbeta recente da atividade antioxidante do ácido rosmarínico despertaram interesse considerável no potencial preventivo contra choque por endotoxina e síndrome de dificuldade

respiratória do adulto (NEWALL; ANDERSON; PHILLPSON, 2002).

O *Rosmarinus officinalis* L foi utilizado por farmacêuticos desde a antiguidade. Os gregos e os romanos tinham o alecrim com grande estima. Esta planta não faltava em nenhum jardim medicinal no séc. XVI, sendo utilizado em cosmética e, queimado, era usado como incenso para purificar o ar (PANIZZA, 1997). Considerando a importância medicinal dessa planta, a mesma foi selecionada para avaliação do seu potencial antioxidante.

Este artigo tem como objetivo determinar a atividade antioxidante (análise qualitativa e quantitativa) do extrato etanólico das folhas da *Rosmarinus officinalis* L, usado no combate a tosses e resfriados, através do método DPPH (radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila).

MATERIAL E MÉTODO

A pesquisa foi desenvolvida no laboratório de pesquisa do FCBS na Fundação Educacional Jayme de Altavila – FEJAL / Centro de Estudos Superiores de Maceió – CESMAC.

A amostra em estudo é o material vegetal *Rosmarinus officinalis* L (folhas) que foi adquirida no mercado municipal do município de Arapiraca-AL (SANTOS;

SANTOS, 2007) em outubro de 2007. Esse material foi utilizado para o preparo do extrato etanólico.

O material vegetal foi seco à temperatura ambiente e moído em multiprocessador. O extrato foi preparado por maceração com etanol 95% à temperatura ambiente por quatro vezes consecutivas e cada extração tinha

a duração de 4 dias. O extrato foi reunido e concentrado em evaporador rotativo acoplado à bomba de vácuo. O rendimento do extrato foi calculado pela expressão: Rendimento (%) = (massa do extrato/massa do material vegetal) x 100. A partir de 10 mg do extrato seco, foi preparada uma solução em etanol a 1,0 mg mL⁻¹ (ou 1:1) para posteriores diluições.

A avaliação qualitativa da atividade antioxidante foi realizada pelo método físico-químico de separação, a cromatografia, conforme metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações (SOUZA et al., 2007). O extrato da planta foi submetida à dissolução em etanol 95%, aplicado em cromatoplas (sílica gel F₂₅₄,) e eluído em sistema de solvente adequado. A cromatoplas foi revelada em luz Ultravioleta. Após eluição a cromatoplas foi imersa em solução etanólica de DPPH 0,3µg.mL⁻¹ por 10 segundos. O surgimento de mancha amarela sob fundo de coloração púrpura nos Rfs do extrato é indicativo de atividade antioxidante.

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se

o consumo do radical livre DPPH pela amostra, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações (BRAND WILIAMS et al, 1995; SÁNCHEZ; LARRAURI; SAURA, 1998). Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis B582 no comprimento de onda 518 nm, fazendo também leitura do branco e do controle negativo.

Para Leitura das medidas de absorvância na amostra: a mesma foi diluída, em triplicata, com concentrações finais de 500, 125, 50, 10 e 5 µg mL⁻¹ em etanol á 95%, partindo-se da solução a 1,0 mg mL⁻¹. Foi adicionado 1,0 mL de DPPH 0,3 mM em etanol á 95% (2,5 mL) de solução de amostra. As reações transcorrerão à temperatura ambiente (em torno de 26°C) por 30 minutos e ausência de luz. Em seguida foram feitas as leituras das absorvâncias, a 518 nm. Etanol 95% (1,0 mL) mais 2,5 mL da solução da amostra foi usado como branco e a solução de DPPH (1,0 mL; 0,3 mM) mais etanol 95% (2,5 mL) foi usada como controle. Os 33 valores de absorvância foram convertidos em atividade antioxidante percentual (AAO%) usando a seguinte fórmula (MENSOR, 2001): $AAO\% = 100 - \{[ABSA - ABSB) \times 100] / ABSC\}$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O Rendimento (%)= (Massa do Extrato/Massa do Material Vegetal) x 100, obtido na extração por maceração do material vegetal *Rosmarinus*

officinalis (alecrim), resultou em uma boa quantidade de material vegetal, 41,50%, que viabilizou a realização dos experimentos (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimentos do extrato etanólico das folhas do *Rosmarinus officinalis*.

Material Vegetal	*Rendimento (%) = (ME/MMV) x 100 (Cálculo)	%
<i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	(40,567g/97,7420g) x 100	41,50%

* ME= massa do extrato; MMV = massa do material vegetal.

O extrato vegetal seco foi submetido à cromatografia em camada delgada (CCD) e eluído com solventes em gradiente crescente de polaridade puros (CHCL₃), e em combinação (CHCL₃/ MeOH (2:1)), resultando na cromatoplaça.

Na avaliação preliminar qualitativa do extrato por cromatografia de camada delgada em gel de sílica, revelada com solução etanólica a 0,4µmol do radical DPPH foi observada mancha amarelada no Rfs do extrato etanólico vegetal, o que indica que essa amostra apresenta atividade antioxidante e é viável para o teste de avaliação quantitativa da atividade antioxidante percentual.

A capacidade de seqüestrar radicais livres em relação ao radical estável 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH') foi inicialmente escolhida por se tratar de uma metodologia simples rápida e sensível, muito conveniente

para realização de "screening" de um grande número de amostras com diferentes polaridades. As substâncias antioxidantes presentes no extrato reagiram com o DPPH que é um radical estável, e converte-o em 2,2-difenil-1-picril hidrazina (ROESLER et al., 2007). O mesmo autor também relata que o grau de descoloração indica o potencial antioxidante do extrato. Um extrato que apresenta alto potencial em seqüestrar radicais livres.

Os trinta e três (33) valores de absorvância obtidos nos testes com o radical livre DPPH são apresentados na tabela 2 e convertidos em atividade antioxidante percentual (AAO%). Os resultados da AAO% do extrato etanólico da amostra, nas concentrações de 500, 125, 50, 10 e 5 µgmL⁻¹ mostram que o alecrim apresenta atividade seqüestradora do radical DPPH em todas as concentrações avaliadas, e que entre essas duas variáveis existe uma relação

concentração dependente, uma vez que quanto maior a concentração do extrato etanólico maior a capacidade seqüestradora de radicais livres, ou seja, maior a atividade antioxidante. (Figura 8). A 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o extrato alcoólico das folhas do alecrim apresentou 96,25% de atividade antioxidante, equivalente ao apresentado pelo seu extrato aquosos que apresentou %AAO acima de 97% (ASOLINI et al., 2006). O efeito antioxidante do alecrim também foi mencionado por Buissa; Raccanicci; Alencar (2008), mas sem fornecer

detalhes sobre o tipo de extrato e a concentração avaliada.

Por meio da análise de regressão linear entre a concentração avaliadas do extrato etanólico das folhas do alecrim e a sua atividade antioxidante percentual (capacidade em seqüestrar radicais livres), obtiveram-se os coeficientes angular e linear, o que possibilitou a determinação da equação da reta $y = 23,646 + 0,154x$ com coeficiente de determinação (R^2) 0,941 e o cálculo do valor de CE_{50} de 170,465 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a amostra vegetal.

Tabela 2 – Valores de Absorbância, Média, Desvio Padrão e AA% do extrato testado.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Absorbância			Média da Absorbância	Desvio Padrão	AAO%
	1	2	3			
500	0,117	0,121	0,118	0,118	0,0021	96,251
Branco 500	0,051	0,054	0,050	0,052	0,0021	
125	0,720	0,719	0,762	0,733	0,0245	61,451
Branco 125	0,044	0,047	0,043	0,045	0,0021	
50	1,214	1,205	1,190	1,203	0,0121	35,099
Branco 50	0,041	0,045	0,041	0,043	0,0017	
10	1,523	1,538	1,553	1,538	0,0076	16,692
Branco 10	0,041	0,045	0,041	0,042	0,0023	
5	1,509	1,585	1,569	1,554	0,0401	15,461
Branco 5	0,043	0,046	0,041	0,043	0,0025	
Controle						
Negativo	1,770	1,796	1,796	1,787	0,0150	

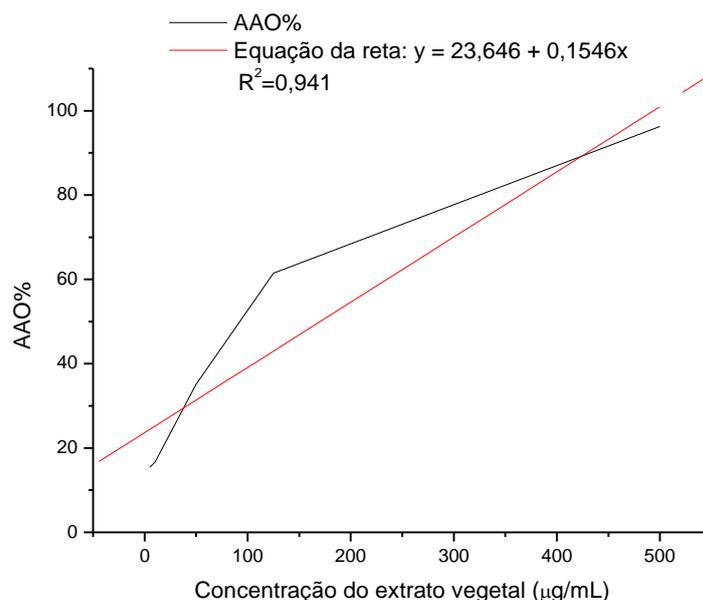


Figura 8 – Atividade Antioxidante Percentual do etanólico das folhas do *Rosmarinus officinalis*.

(Fonte: Dados da pesquisa).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As propriedades antioxidantes do extrato de alecrim têm recebido considerável atenção nos últimos anos, sendo reconhecidas desde a Antiguidade. Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos neste trabalho mostram que em todas as concentrações avaliadas o

alecrim tem atividade seqüestradora do radical DPPH, ou seja, apresenta a atividade antioxidante. Tais resultados estimulam a continuidade dos estudos visando a determinação dos fenóis totais da espécie *Rosmarinus officinalis* L, uma vez que essas substâncias são muito citadas na literatura como responsáveis pelo potencial antioxidante das plantas.

REFERÊNCIAS

1. ASOLINI, F. C. et al. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. Braz. J. Food Technol., v.9, n.3, p. 209-215, jul./set. 2006.
2. BARREIROS, A. L. B. S. et al. Quim. Nova. 2006.
3. BELLÓ, A. R. et al. Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. 2002.
4. BRAND-WILLIAMS, W. et al. Lebensm. Wiss. Technol.1995.
5. BUISSA, R. S.; RACANICCI, A. M. C.; ALENCAR, S. M. **Avaliação do potencial antioxidante de especiarias e condimentos.** 2008. Disponível em: <<http://www.usp.br/siicusp/15Siicusp/1767.pdf>>. Acessado em 07/05/2009.
6. GIL, E. S. Atividade antioxidante de extrato etanólico e hidroalcoólico de “canjiqueira” (*byrsonima orbygniana*). Doseamento de rutina, Quercetina, ácido elágico e ácido ascórbico. Revista eletrônica de farmácia. Vol 2 (2), 85-88, 2005.
7. GORDON, M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. Natural Products Report, v.4, 1996.
8. HASLAM, E.; J. Nat. Prod. 1996.
9. LÚCIO, T. C.; GIL, E. S. Caracterização e avaliação da atividade antioxidante de Extratos vegetais através de voltametria. Revista eletrônica de farmácia. Vol. IV (2),128-130, 2007.
10. MORAIS, S. M. et al. Química Nova, Vol.29,n. 5, 2006.
11. MORGAN, R. Enciclopédia das ervas e plantas medicinais: doenças, aplicações, descrição e propriedades. São Paulo: Hermus, 1982.
12. MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy Research, v.15, p.12-130, 2001.
13. NEWALL, A. C.; ANDERSON, A. L; PHILLIPSON.; D. J. Guia para profissionais de

Saúde. 2002.

14. OMONI, A. O.; ALUKO, R. E.; Trends Food Sci. Technol. 2005.
15. PACKER, J. F. LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, 2007.
16. ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, 27(1): 53-60, jan.-mar. 2007.
17. SÁNCHEZ, M. C.; LARRAURI, J. A.; SAURA, C. F.; J. Sci. Food. Agric. 1998.
18. SANTOS, K. C. B. S.; SANTOS, A. F. dos. Revista Semente, 2007.
19. SOUZA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Departamento de Química, Universidade Federal do Piauí, 64049-550 Teresina – PI, Brasil. Quim. Nova, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.
20. SHENEIDER, J. H. Mechanism of action of antioxidants as exemplified in vegetables, tomatoes and tea. Food Chem. Toxicol. V. 37, n. 9-10, 2004.