



# Atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., secas em diferentes temperaturas

Myrian Lane Soares Negri,<sup>1</sup> João Carlos Possamai,<sup>2</sup> Tomoe Nakashima<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothario Meissner, 632, Jardim Botânico, 80210-170 Curitiba-PR, Brasil

<sup>2</sup>Departamento de Fitotecnia, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários, s/n, 80035-50 Curitiba-PR, Brasil

**RESUMO:** *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, a espinheira-santa verdadeira, é largamente utilizada para tratamento de gastrites e úlceras estomacais. O seu valor terapêutico é atribuído principalmente aos polifenóis (flavonóides e taninos) e triterpenos. Os polifenóis são bastante estudados e estão relacionados à atividade antioxidante exercida pela planta. Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante, a qual pode ser medida a capacidade antioxidante total utilizando o método de formação do complexo fosfomolibdênio e a atividade antioxidante em relação à redução de um radical, utilizando-se o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). A atividade antioxidante das folhas de espinheira-santa seca em diferentes temperaturas foi avaliada, visando verificar a possível influência das temperaturas de secagens e seu poder antioxidante. Foram utilizadas cinco temperaturas (40, 50, 60, 70 e 80 °C) e uma temperatura de secagem de rotina, de um produtor/beneficiador de plantas medicinais. As menores temperaturas apresentaram as maiores atividades antioxidantes.

**Unitermos:** *Maytenus ilicifolia*, Celastraceae, temperatura de secagem, antioxidante, DPPH, fosfomolibdênio.

**ABSTRACT:** “Antioxidant activity of “espinheira-santa” - *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss., leaves dried in different temperatures”. *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, the true “espinheira-santa” is widely used for treating gastritis and stomach ulcers. Its therapeutic values are due mainly polyphenols (flavonoids and tannins) and triterpens. Polyphenols are largely studied and they are related to the antioxidant activity of the plants. There are several methods for evaluating the antioxidant activity, which can be measured the total antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex and the antioxidant activity related to the reduction of one radical, using the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). The antioxidant activity of “espinheira-santa” dried leaves in different temperatures was measured in order to evaluate the possible influence of drying temperatures under its antioxidant power. Five temperatures used were (40, 50, 60, 70 and 80 °C) and a drying routine of medicinal plants as well. Lower temperatures showed the highest antioxidant activities.

**Keywords:** *Maytenus ilicifolia*, Celastraceae, drying temperature, antioxidant, DPPH, phosphomolybdenum.

## INTRODUÇÃO

*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss, a espinheira-santa verdadeira, é uma planta nativa da região do sul do Brasil, utilizada principalmente para o tratamento de gastrites e úlceras estomacais. O nome espinheira-santa é devido às folhas possuírem bordas com espinhos e propriedades medicinais (Magalhães, 2002). Estas apresentam diversas substâncias químicas que lhe confere as propriedades terapêuticas, como triterpenos e os polifenóis (flavonóides e taninos) (Xavier & D'angelo,

1996; Cordeiro et al., 1999; Carvalho et al., 2008; Marlière et al., 2008). Os polifenóis atuam como captadores de radicais livres e têm despertado grandes interesses por possuírem a propriedade de impedir ou minimizar o estresse oxidativo causados pelos radicais livres (Lien et al., 1999; Morais et al., 2009; Rocha et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio (ERO) possuem um elétron desemparelhado na última camada de valência e atacam as biomoléculas, como proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos, podendo originar várias distúrbios, como envelhecimento precoce, processos inflamatórios, disfunção cerebral,

\* E-mail: tomoenakashima@ufpr.br; Tel. +55-41-3360-4066

doenças do coração, câncer e outros danos (Prieto et al., 1999; Lu & Foo, 2001; Choi et al., 2002).

Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante, como o método de formação do complexo fosfomolibdênio ou a atividade antioxidante em relação à redução de um radical, como o DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Brand-Williams et al., 1995; Huang et al., 2005; Vicentino & Menezes, 2007; Rodríguez et al., 2008; Fonseca et al., 2009; Mosquera et al., 2009; Rebelo et al., 2009). Nesse ensaio, o resultado pode ser expresso em  $IC_{50}$ , que é a concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical DPPH, sendo que quanto menor o  $IC_{50}$ , maior a atividade antioxidante do material ou em poder antiradical, que é a relação inversa de  $IC_{50}$  ( $1/IC_{50}$ ). Devido à complexidade das substâncias químicas presentes é necessário fazer a avaliação da capacidade antioxidante da planta pelo menos por dois métodos (Choi et al., 2002).

No agro negócio, a planta logo após a colheita deve passar pelo processo de secagem, a fim de retirar a água e impedir as reações de hidrólise e o crescimento de microorganismos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2003) recomenda que as plantas medicinais sejam secas em temperaturas inferiores a 60 °C evitando perda de material volátil e degradação de princípios ativos. De acordo com alguns autores (Correa Junior et al., 1994; Reis & Silva, 2004) a temperatura máxima para a secagem é de 40 °C, porém, a temperatura de 80 °C foi recomendada para a secagem de camomila (Borsato, 2003). Julkunen-Tiito & Sorsa (2001) estudando o efeito dos métodos de secagem para flavonóides, taninos e salicilatos do salgueiro observaram que o calor empregado nas secagens (60 e 90 °C) pode determinar mudanças na composição dos fenólicos, com exceção da apigenina-7-glucosídeo. Para os flavan-3-óis, (+) catequinas e taninos condensados o calor causou forte decomposição (a 60 °C, diminuição de 40% e a 90 °C, de 79% em relação às folhas frescas). Existem controvérsias quanto ao processo e neste contexto, estão os agricultores ou beneficiadores das plantas medicinais que realizam a secagem, muitas vezes, em temperaturas sem o controle devido ou na temperatura inadequada ao princípio ativo. As plantas medicinais são sensíveis ao processo de secagem e as temperaturas a que são submetidas podem causar alterações na quantidade e qualidade dos princípios ativos, principalmente nos teores de óleo essencial, porém no geral, temperaturas entre 40 °C e 60 °C são as mais indicadas independentes do método de secagem (Melo et al., 2004; Blank et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da temperatura de secagem das folhas de espinheira-santa na capacidade antioxidante.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material botânico

Ramos e folhas de *Maytenus ilicifolia*, cultivados a pleno sol, foram coletados no município de Araucária-PR, nos meses de janeiro a março de 2006, secas em escala agroindustrial em temperaturas de 40, 50, 60, 70, 80 °C e conforme a rotina de secagem de um beneficiador de plantas medicinais (até 90 °C). As folhas foram secas até 6% de umidade (Farmacopéia Brasileira, 2003), trituradas, passadas por tamis de 1,4 mm de abertura e extraído com etanol e na seqüência com água. Reunido os extratos, evaporados em Banho-maria a 60 °C até secura. Um exemplar da exsiccata encontra-se depositado no Herbário do Departamento de Botânica da UFPR sob o n.º 53031.

### Método fosfomolibdênio

Fração de 0,3 mL da amostra em solução aquosa a 200 µg/mL, acrescentou-se 3 mL do reativo (molibdato de amônio 4 mM, fosfato de sódio 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). Os tubos foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95 °C por 90 min. após resfriamento foi feita a leitura em espectrofotômetro UV a 695 nm, utilizando como branco 0,3 mL água e 3 mL do reativo. As substâncias referências utilizados foram ácido ascórbico e rutina a 200 µg/mL. Para efeito de cálculo, o ácido ascórbico foi considerado como 100% de atividade antioxidante.

% Ativ. antioxidante =  $\frac{\text{Absorvância amostra} - \text{absorvância branco}}{\text{absorvância ác. ascórbico} - \text{absorvância branco}} \times 100$  (Prieto, Pineda e Aguilar, 1999).

### Método DPPH

O método é baseado na metodologia de Blois (1958) e Brand-Williams et al. (1995), utilizando o radical estável DPPH<sup>•</sup> que sofre redução pelos antioxidantes com mudança de coloração violeta para amarela, proporcional à concentração da substância redutora da amostra.

A uma fração de 3 mL da amostra a 50 µg/mL em etanol p.a. foi adicionado 0,1 mL de DPPH a 1 mM. A leitura foi realizada em espectrofotômetro UV em 517 nm. A amostra foi homogeneizada rapidamente e a leitura feita a cada 5 min até estabilização do resultado.

Soluções etanólicas das amostras foram preparadas nas concentrações de 0,625 a 10 µg/mL. A 3 mL da solução foi adicionado 0,1 mL de DPPH a 1 mM. Como controle foi utilizado 3 mL de etanol e 0,1 mL de DPPH. Após 30 min foi efetuada a leitura em espectrofotômetro UV a 517 nm. A determinação do  $IC_{50}$  foi feita através da fórmula: % Atividade antioxidante (Ativ. Antiox.) =  $100 - \frac{\text{Abs. Amostra} - \text{Abs. Branco}}{\text{Abs. Controle}} \times 100$ . Com os valores obtidos foi construído um gráfico de % Ativ. antiox. x concentração em µg/mL.

Para o cálculo do  $IC_{50}$  foi utilizada a equação da reta, substituindo o valor de y por 50 para obtenção da concentração da amostra com capacidade de reduzir 50% do DPPH. Para o cálculo do  $IC_{50}$  das substâncias

referências, o ácido ascórbico (AA), foi utilizado nas concentrações de 0,078 a 5 µg/mL em etanol; a rutina nas concentrações de 0,625 a 10 µg/mL.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a classificação de Brand-Williams et al. (1995) a espinheira-santa apresenta uma cinética de reação intermediária, com um tempo de trinta minutos para a descoloração máxima de DPPH. O resultado da atividade antioxidante em relação ao radical DPPH está demonstrado de duas maneiras: Poder antiradical e como IC<sub>50</sub> - concentração capaz de inibir 50% do DPPH. O resultado do poder antiradical (Tabela 1) demonstrou que a temperatura de 40 °C (menor temperatura utilizada no experimento) obteve a maior atividade antioxidante dentre as amostras analisadas, mas inferior aos padrões de rutina (0,320) e de ácido ascórbico (2,272). O ácido ascórbico é uma substância referência bastante utilizada nas análises de atividade antioxidante pela capacidade de reduzir rapidamente o DPPH e a rutina, um flavonol heterosídico derivado da quercetina com substituição na posição 3 (3-O-rutinosídeo-quercetina). Na secagem de rotina de um produtor o aumento de temperatura foi gradual, atingindo 90 °C no final do processo e a atividade antioxidante foram maiores que na secagem a 80 °C, provavelmente devido ao escalonamento da temperatura do ar de secagem, possibilitando uma saída de água das plantas mais branda

que na secagem de rotina, que foi mantida a temperatura de 80 °C durante o processo.

Na medida de IC<sub>50</sub>, que expressa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH, os valores obtidos foram de 4,02 µg/mL à temperatura de 40 °C a 7,07 µg/mL à 80 °C, o que significa que serão necessários 4,02 µg/mL de espinheira-santa seca a 40 °C para a redução de 50% do DPPH, enquanto que para a planta seca a 80 °C serão necessários 7,07 µg/mL para que aconteça a mesma redução do radical e portanto uma atividade antioxidante menor que na secagem a 40 °C.

No método de fosfomolibdênio, que mede a capacidade antioxidante total, também, houve uma diminuição com o aumento da temperatura de secagem. Os resultados estão de acordo com Pessuto (2006) que obteve 30% de atividade antioxidante para o extrato bruto.

A espinheira-santa mostrou possuir uma boa atividade antioxidante e neste trabalho verificou-se que a temperatura utilizada para a secagem das folhas de espinheira-santa influencia na atividade antioxidante da droga vegetal, diminuindo seus valores conforme se aumenta a temperatura. A temperatura de 40 °C mostrou-se mais eficaz na secagem das folhas de espinheira-santa, pois os valores de atividade antioxidante foram os maiores. É importante enfatizar o controle da temperatura na secagem das folhas de espinheira-santa, evitando alteração na qualidade e na eficiência terapêutica da planta.

**Tabela 1.** Atividade antioxidante de espinheira-santa seca em diferentes temperaturas.

Temp.	DPPH		Fosfomolibdênio	
	IC <sub>50</sub> - µg/mL	Poder antiradical	Ativ. antiox. (% ± DP) <sup>1</sup>	DMS-Teste (95%)
40 °C	4,02	0,248	36,86 ± 0,79	a
50 °C	4,77	0,210	36,14 ± 0,78	ab
60 °C	5,88	0,170	34,67 ± 0,44	bc
70 °C	5,66	0,176	34,26 ± 0,68	c
80 °C	7,07	0,141	29,55 ± 3,55	e
Rotina	6,69	0,149	31,74 ± 2,23	d
Padrão rutina	3,12	0,320	25,64 ± 3,74	..
Padrão AA	0,44	2,272	100,00 ± 1,33	..

<sup>1</sup>média ± desvio padrão (n=3)

Resultado de mesma letra não difere estatisticamente

## REFERÊNCIAS

- Blank AF, Costa AG, Arrigoni-Blank MF, Cavalcanti SCH, Alves PB, Innecco R, Ehlert PAD, Sousa IF 2007. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. *Rev Bras Farmacogn* 17: 557-564.
- Blois MS 1958. Antioxidant determination by the use of stable free radical. *Nature* 181: 1199-2000.
- Borsato AV 2003. Secagem da camomila sob diferentes temperaturas e vazões específicas do ar. Curitiba. Dissertação de Mestrado em Produção Vegetal - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss u-Technol* 28: 25-30.

- Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS 2008. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 18: 314-319.
- Choi CW, Kim SC, Hwang SS, Choi BK, Ahn HJ, Lee MY, Park SH, Kim SK 2002. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. *Plant Sci* 163: 1161-1168
- Cordeiro PJM, Vilegas JHY, Lanças FM 1999. HRGC-MS Analysis of terpenoids from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium* ("Espinheira-santa"). *J Braz Chem Soc* 10: 523-526.
- Corrêa-Junior C, Ming LC, Scheffer MC 1994. *Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas*. 2. ed. Jaboticabal: FUNEP.
- Farmacopéia Brasileira 2003. 4 ed. São Paulo: Atheneu, fasc.4, mon. 194.
- Fonseca AM, Bizerra AMC, Souza JSN, Monte FJQ, Oliveira MCF, Mattos MC, Cordel GA, Braz-Filho R, Lemos TLG 2009. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). *Rev Bras Farmacogn* 19: 193-198.
- Huang D, Ou B, Prior RL 2005. The Chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem* 53: 1841- 1856.
- Julkunen-Tiitto R, Sorsa S 2001. Testing the effects of drying methods on willow flavonoids, tannins, and salicylates. *J Chem Ecol* 27: 779-789.
- Lien EJ, Ren S, Bui H, Wang R 1999. Quantitative structure-activity relationship analysis of phenolic antioxidants. *Free Radical Bio Med* 26: 285-294.
- Lu Y, Foo LY 2001. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). *Food Chem* 75: 197-202.
- Magalhães PM. 2002. Agrotecnologia para o cultivo de espinheira-santa. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/artigos/agroespsant.htm>> Acesso em: 2 out 2005
- Marlière LDP, Ribeiro AQ, Brandão MGL, Klein CH, Acurcio FA 2008. Utilização de fitoterápicos por idosos: resultados de um inquérito domiciliar em Belo Horizonte (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 18(Supl.): 754-760.
- Melo EC, Radünz LL, Melo, RCM 2004 Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – Revisão. *Eng Agricultura* 12: 307-315.
- Morais SM, Cavalcanti ESB, Costa SMO, Aguiar LA 2009. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Rev Bras Farmacogn* 19: 315-320.
- Mosquera OM, Corraera YM, Niño J 2009. Antioxidant activity of plant extracts from Colombian flora. *Rev Bras Farmacogn* 19: 382-387.
- Pessuto MB 2006. Análise fitoquímica de extratos de folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e avaliação do potencial antioxidante. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá, 104 p..
- Prieto P, Pineda M, Aguilar M 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a fosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* 269: 337-341.
- Rebello MM, Silva JKR, Andrade EHA, Maia JGS 2009. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. *Rev Bras Farmacogn* 19: 230-235.
- Reis MS, Silva SR 2004. *Conservação e uso sustentável de plantas medicinais e aromáticas: Maytenus spp., espinheira-santa*. Brasília: Ibama, 204 p.
- Rocha FD, Pereira RC, Kaplan MAC, Teixeira VL 2007. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. *Rev Bras Farmacogn* 17: 631-639.
- Rodríguez M, Hasegawa M, González-Mújica F, Motta N, Castillo A, Castillo J, Zea E, Mora K, Sousa L, González A, Camejo D 2008. Antidiabetic and antiradical activities of plants from Venezuelan Amazon. *Rev Bras Farmacogn* 18: 331-338.
- Vicentino ARR, Menezes FS 2007. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. *Rev Bras Farmacogn* 17: 384-387.
- Xavier HS, D'angelo LCA 1996. Perfil cromatográfico dos componentes polifenólicos de *Maytenus ilicifolia* Mart. (Celastraceae). *Rev Bras Farmacogn* 1: 20-28.
- WHO 2003. *WHO guidelines on agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants*. Geneva.