

DESENVOLVIMENTO DE UMA ROTINA AUTOMATIZADA DE ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO (FIA) PARA DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM EXTRATOS VEGETAIS USANDO Fe^{3+} COMO AGENTE OXIDANTE.

Thiane Lopes NEVES¹; Ézio SARGENTINI JUNIOR²; Marcos Alexandre BOLSON³; Edilene Cristina Pereira SARGENTINI⁴

¹Bolsista PIBIC/CNPq/INPA; ²Orientador INPA/CPN; ³Co-orientador /INPA; Colaboradora INPA/CPN⁴

1. Introdução

Os antioxidantes são substâncias que em pequenas concentrações, quando comparadas com os substratos oxidáveis, retardam ou inibem significativamente a oxidação destes substratos, além de agir em diferentes níveis da seqüência oxidativa (Halliwell & Gutteridge, 1989). Desta forma, a importância da pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos. A constatação de que os vegetais possuem substâncias biologicamente ativas que traz benefícios à saúde ou efeitos fisiológicos desejáveis tem impulsionado estudos sobre a propriedade antioxidante e como determiná-las. O sistema de análises em fluxo contínuo (FIA) tem o objetivo de otimizar os procedimentos de análises químicas, reduzindo o envolvimento do operador, melhorando a precisão das medidas e aumentando o número de amostras que podem ser processadas por unidade de tempo sendo simples e versáteis. Em muitos casos, o consumo de reagentes e, conseqüentemente, a produção de resíduos são consideravelmente reduzidos em comparação aos procedimentos convencionais (Leite *et al.*, 2004). A proposta deste trabalho foi o desenvolvimento de uma rotina automatizada de análise em fluxo contínuo (FIA) de um método auxiliar para determinação do potencial antioxidante em extratos vegetais usando Fe^{3+} como agente oxidante. Desta forma, o método proposto é definido como um método químico de quantificação indireta da capacidade redutora de extratos vegetais, que se baseia na redução de íons Fe^{3+} por substâncias químicas contidas nos extratos vegetais (chá) em determinadas condições e posteriormente a quantificação de íons Fe^{2+} por técnica espectrofotométrica na região do visível usando um método adaptado do reagente 1,10-fenantrolina, sendo o resultado expresso em equivalência com um redutor de referência. A validação de um método pode ser definida como o processo destinado a estabelecer suas características e limitações, bem como, identificar os fatores que podem modificar essas características e com qual extensão (Eurachem, 1998).

2. Material e Métodos

O método proposto para a automatização foi baseado na adição de Fe^{3+} que foi então reduzido por agentes redutores contidos em extratos vegetais. Após esta etapa foi adicionado 1,10-fenantrolina ($C_{12}H_8N_2.H_2O$) que reage com o íon Fe^{2+} resultante e forma um composto denominado ferroína ($C_{36}H_{24}FeN_6$). Em solução, esse composto formado tem coloração de tons vermelho-amarelado e pode ser quantificado por técnica espectrofotométrica a 550 nm. Com a utilização da estação Espectrofotométrica, simplifica processos analíticos com minimização de erros, redução nos custos e tempo das análises laboratoriais, mas mantendo sempre uma alta qualidade nos resultados. A Estação de Trabalho Espectrofotométrica SWS 100, é composta por uma unidade ótico/mecânica (fonte de luz e monocromador) e por uma unidade elétrica/eletrônica (controle e aquisição de sinal fotométrico). Essa estação tem a habilidade de interromper o fluxo de reagentes entre cada análise sem comprometer a estabilidade, e essa funcionalidade proporcionou a redução da utilização de reagente e conseqüente diminuição da formação de resíduos. O método de análise foi configurado de modo a utilizar menor quantidade possível de reagente sem comprometer a resposta analítica do equipamento. Nesse intuito, foram usados em cada análise, 200 μL de amostra, 700 μL do reagente de Fe^{3+} (200 $mg.L^{-1}$) e 900 μL de 1,10-fenantrolina (0,25%). A análise procedeu com a mistura da alíquota da amostra com o reagente Fe^{3+} para que os compostos ativos na amostra reduzissem o Fe^{3+} para Fe^{2+} . Essa mistura foi então injetada simultaneamente com os 900 μL de 1,10-fenantrolina em uma bobina de reação seguindo para o detector. A leitura de absorbância da ferroína (complexo formado pela reação do Fe^{2+} com 1,10-fenantrolina) foi feita a 550 nm.

A Calibração do método foi feita através de padrões externos de ácido ascórbico preparados no dia da análise. O Limite de Detecção foi determinado com 20 repetições do branco (água utilizada na preparação dos padrões) utilizando a equação 1:

$$LD = 3 \cdot s_{br} / m \quad (1)$$

onde s_{br} é o desvio padrão das 20 repetições e m o coeficiente angular da curva de calibração. O Limite de Determinação foi considerado como sendo 10 vezes o desvio padrão (Skoog *et al.*, 2002). Por se tratar de um método colorimétrico, foi considerado como interferência a variação de cor característica de cada extrato em solução aquosa.

A avaliação do potencial antioxidante foi realizada através da medição da capacidade de seqüestro (CS) de radicais Fe^{3+} (Novaes, 2007). Os resultados obtidos foram expressos em equivalência com o ácido ascórbico ($mg \cdot L^{-1}$ de AA), termo este adotado para expressar a relação da atividade de substâncias antioxidantes da amostra pela concentração de ácido ascórbico.

Para testar a eficácia deste método, um teste de antioxidante foi conduzido utilizando amostras de extratos vegetais dos chás de boldo (*Peumus boldus Molina*), camomila (*Matricaria recutita L.*), capim cidreira (*Cymbopogon citratus Staupf*), carqueja (*Baccharis trimera Less.*), hortelã (*Mentha piperita L.*), e erva-mate (*Ilex paraguariensis*), obtidas em redes de supermercado da cidade de Manaus (fabricante Dr. Oetker Brasil LTDA), e amostras de extratos vegetais utilizados apartir das folhas de plantas de cajuru (*Arrabidaea chira*), e pata-de-vaca (*Bauhinia forficata*), coletadas em residências da cidade de Manaus (espécies estão no herbário do INPA para identificação). Os extratos foram obtidos a partir de 1g de material vegetal previamente seco por 48 horas na estufa de secagem a 50°C, sendo homogeneizado e submetido à infusão em 200 mL de água deionizada e ponto de fervura (aproximadamente 95°C) por 3 minutos. Após a infusão o extrato foi filtrado em filtro de papel e reservado para análise em triplicata na estação espectrofotométrica FEMTO modelo SWS-100. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas.

3. Resultados e Discussão

A Figura 1 representa graficamente os resultados obtidos pelo método automatizado. Foi observado que a faixa linear dinâmica da curva de calibração abrange o intervalo de 1,3 a 100 $mg \cdot L^{-1}$ de AA. Esse intervalo foi determinado inferiormente pelo limite de quantificação e superiormente pelo R^2 de forma a ajustar melhor a regressão linear, determinando assim o limite de linearidade. Após 100 $mg \cdot L^{-1}$ de AA o método não mostrou linearidade satisfatória e foi excluído da curva de calibração. Segundo Skoog *et al.* (2002) um bom método de quantificação tem que apresentar faixa dinâmica de linearidade de pelo menos duas ordens de magnitude e dessa forma qualifica o método proposto como aplicável dentro da faixa determinada. O limite de detecção calculado pela repetição de 20 vezes o branco foi de 0,96 $mg \cdot L^{-1}$ de AA, ou seja, o método é capaz de distinguir variações pouco menores que 1 $mg \cdot L^{-1}$ de AA como potencial de antioxidante.

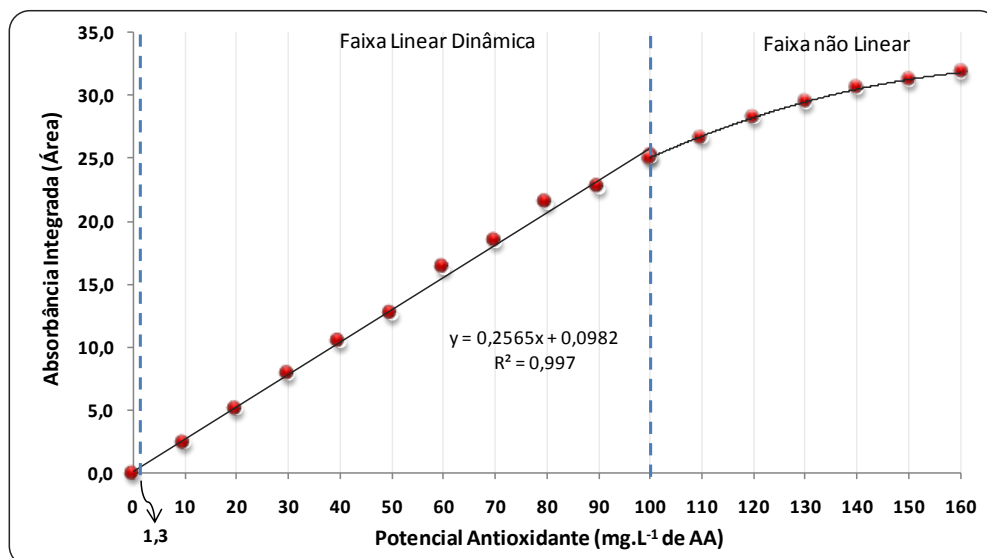


Figura 1 – Curva de calibração para potencial antioxidante apresentando Faixa Linear de 1,3 a 100 $mg \cdot L^{-1}$ de AA. Acima de 100 $mg \cdot L^{-1}$ de AA não apresentou linearidade satisfatória.

As possíveis interferências causadas pelas variadas tonalidades de cor dos chás foram identificadas com a substituição dos reagentes de Fe^{3+} e 1,10-fenantrolina por água deionizada. Os valores de absorbância obtida por esse processo foi subtraída do valor de absorbância da análise com os reagentes, obtendo-se assim resultados livres de interferência de cor. Os resultados do estudo de

interferência de cor mostraram que os extratos apresentam diferentes níveis de interferência na leitura do espectrômetro a 550 nm. Assim, verificamos que o capim-cidreira (*Cymbopogon citratus Staupf*) apresentou o maior nível de interferência, 4,7%, enquanto que a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) o menor, 0,6% (Figura 2.a e Tabela 1). Os resultados são expressos em porcentagem pela equação 2:

$$Ic = \frac{ABS_c}{ABS_r} \times 100 \quad (2)$$

onde Ic é a interferência expressa em porcentagem, ABS_c é a absorvância da cor do extrato medido na ausência de reagentes e ABS_r é a absorvância medida em presença de reagentes.

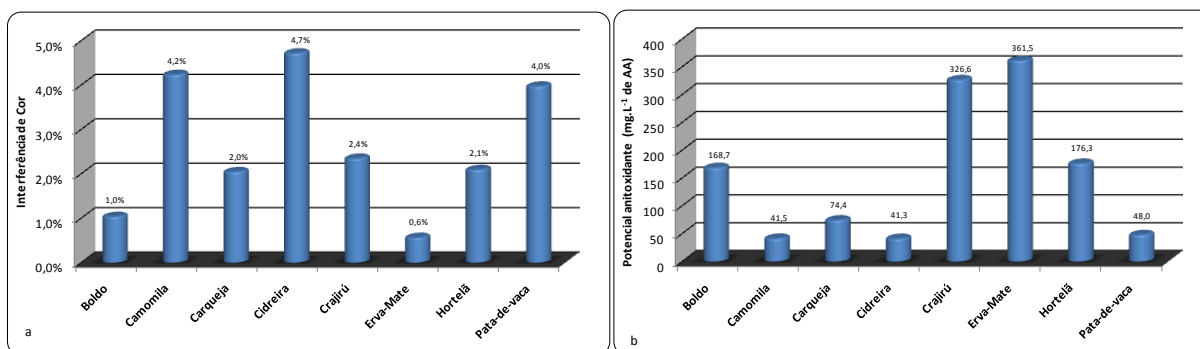


Figura 2 – a) A interferência de cor dos extratos;

b) Análise de potencial antioxidante dos chás.

Tabela 1 – Interferência de cor e potencial antioxidante dos chás

Nome científico	Nome comercial	Absorvância média		Interferência	Fator de diluição	Potencial antioxidante médio mg.L ⁻¹ AA
		Total	Cor			
<i>Peumus boldus</i> Molina	Boldo	19,025	0,20	1,04%	2	162,1
<i>Matricaria recutita</i> L.	Camomila	9,555	0,41	4,24%	1	41,3
<i>Baccharis trimera</i> (Less.)	Carqueja	16,93	0,35	2,05%	1	71,8
<i>Cymbopogon citratus</i> Staupf	Cidreira	9,56	0,45	4,72%	1	41,2
<i>Arrabidaea chira</i>	Crajiú	18,65	0,44	2,35%	4	314,1
<i>Ilex paraguariensis</i>	Erva-Mate	20,295	0,12	0,57%	4	346,4
<i>Mentha piperita</i> L.	Hortelã	20,105	0,42	2,10%	2	169,1
<i>Bauhinia forficata</i>	Pata-de-vaca	11,065	0,44	3,98%	1	47,4

Livre de possíveis interferências de cor as análises mostraram uma clara diferença do potencial antioxidante dos diferentes extratos testados (Figura 2.b, Tabela 1). Dentre eles, a erva-mate (*Ilex paraguariensis*) apresentou maior potencial, 361,5 mg.L⁻¹ de AA, enquanto que o capim-cidreira apresentou menor potencial, 41,3 mg.L⁻¹ de AA. Em trabalho realizado por Asolini *et al.* (2006), foi demonstrado que a erva-mate apresentou também um grande potencial antioxidante (>97%) e a camomila (<90%), um menor potencial. Embora nossa metodologia seja diferente, os resultados não se contradizem. Os extratos de plantas regionais apresentaram também bons resultados. O crajiú (*Arrabidaea chira*) apresentou potencial no nível da erva-mate, 326,6 mg.L⁻¹. Apesar da pata-de-vaca ter apresentado um menor potencial, 48 mg.L⁻¹, se manteve ao nível dos demais extratos.

4. Conclusão

O método automatizado de avaliação de potencial antioxidante proposto, utilizando a estação espectrofotométrica FEMTO SWS-100 se mostrou satisfatório em análise de extratos aquosos. Embora o limite de detecção apresentou valor alto quando se comparado com outros métodos analíticos. Em termos de tempo de análise, para cada amostra, demorou-se no total cerca de 8 minutos, incluindo no processo a inibição da interferência de cor. Em comparação, outros métodos de determinação de potencial antioxidantes podem ultrapassar 30 minutos cada determinação (Miliauskas *et al.*, 2004; Novaes, 2007).

5. Referências

Asolini, F.C.; Tedesco, A. M.; Carpes, S. T. Atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. 2006. Pato Branco, PR: Brazilian Journal of Food Technology, 9 (3): 209-215.

Eurachem. The Fitness for Purpose of Analytical Methods: A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. Teddington: LGC, 1998. Disponível em: <www.eurachem.org/guides/valid.pdf>. Acesso em: 05/06/2010.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. 1989. Free radicals in Biology and Medicine. Oxford: Clarendon Press, 543pp.

Leite, O.D.; Fatibello-Filho, O.; Rocha, F.R.P. 2004. *Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência*. Química Nova, 27 (2): 337-34.

Miliauskas, G.; Venskutonis, P.R.; Van Beek, T.A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food and Chemical Toxicology*, vol.85, 231-237 pp.

Novaes, J. A. P. *Desenvolvimento e validação de método para quantificação da capacidade redutora de extratos vegetais secos*, Manaus, 2007. Dissertação de mestrado. Universidade do Estado do Amazonas.

Skoog, Douglas A.; Holler, James F; Nieman, Timothy A. 2002. Princípios de análise instrumental. 5 ed. Porto Alegre: Bookman. 27-32p.