



Avaliação do potencial antioxidante pelo método DPPH dos extratos de açafão-da-terra obtidos por ultrassom

Evaluation of antioxidant potential by the DPPH method of turmeric extracts obtained by ultrasound

Giovanna Martins Domingos¹, Lilian Tatiani Dusman Tonin²

RESUMO

Este trabalho otimizou a extração dos compostos fenólicos antioxidantes dos rizomas do açafão-da-terra (*Curcuma longa*). Os rizomas foram desidratados a 40 °C. Os extratos foram obtidos por extração assistida por ultrassom, utilizando-se um planejamento experimental 2³, utilizando como variáveis independentes tempo, temperatura e porcentagem de etanol, e variável dependente a porcentagem de atividade antioxidante pelo método DPPH. As superfícies de resposta demonstraram a influência das três variáveis no processo de extração, apresentando quatro regiões nas quais a maior atividade antioxidante pode ser obtida: 30-60 minutos a 25-30 °C; 10-35 minutos a 60-65 °C; 25-55 minutos com 75-85% de EtOH; 55-65 °C com 70-85% de EtOH. As condições de 30 minutos, 62 °C, EtOH 85% (87,49%) e 45 minutos, 55 °C, EtOH 75% (87,16%) apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante sem apresentar diferença significativa entre seus valores. O extrato tem potencial para testes de atividade antitumoral e produção de nanopartículas, visando sua aplicação nas indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas.

PALAVRAS-CHAVE: antioxidantes; açafão-da-terra; extração.

ABSTRACT

This study optimized the phenolic antioxidant extraction from the rhizomes of turmeric (*Curcuma longa*). The rhizomes were dehydrated at 40 °C. The extracts were obtained by ultrasound-assisted extraction, using a 2³ experimental design, using time, temperature and ethanol percentage as independent variables and antioxidant activity percentage via the DPPH method as the dependent variable. The surface responses demonstrated the influence of three variables on the extraction process, revealing four regions where the highest antioxidant activity could be achieved: 30-60 minutes at 25-30 °C; 10-35 minutes at 60-65 °C; 25-55 minutes with 75-85% EtOH; 55-65°C with 70-85% EtOH. The following conditions: 30 minutes, 62 °C, EtOH 85% (87.49%) and 45 minutes, 55 °C, EtOH 75% (87.16%) displayed the highest antioxidant activity values, without showing a significant difference among their values. The extract exhibits potential for antitumoral activity tests and nanoparticles production, with the aim of application in the cosmetic, food, and pharmaceutical industries.

KEYWORDS: antioxidants; turmeric; extraction.

INTRODUÇÃO

A *Curcuma longa* é uma planta originária do sudeste da Ásia e pertencente à família Zingiberaceae, conhecida como cúrcuma, açafão-da-terra, açafão ou açafão-da-Índia (PATIL *et al.*, 2019). Seu componente principal é o composto fenólico curcumina, que se faz presente em concentração de 2,8-8% (GOVINDARAJAN, 1980). A curcumina tem recebido considerável atenção como potencial agente terapêutico para a prevenção de várias doenças (ZHOU; BEEVERS; HUANG, 2011).

Diversos estudos confirmaram que seus extratos possuem poderosas atividades biológicas, como antioxidante (WOJDYŁO; OSZMIAN'SKI; CZEMERYYS, 2007), anti-

¹Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: giovannadomingos@alunos.utfpr.edu.br. ID Lattes:7670187208121934.

²Docente no Curso Licenciatura em Química/COLIQ/Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Apucarana, Paraná, Brasil. E-mail: liliandusman@utfpr.edu.br. ID Lattes: 5182710800072951.



inflamatória (JURENKA, 2009), antibacteriana (DE *et al.*, 2009), antidepressiva (KULKARNI; DHIR; AKULA, 2009), antidiabético (WICKENBERG; INGEMANSSON; HLEBOWICZ, 2010) e antitumoral (WILKEN *et al.*, 2011). Além disso, foi usada com sucesso no tratamento da doença de Alzheimer (AHMED; ENAM; GILANI, 2010) e distúrbios cardíacos (MORIMOTO *et al.*, 2010).

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que atrasa ou inibe a oxidação de um substrato oxidável, diminuindo a concentração dos radicais livres no organismo e/ou quelando íons metálicos, prevenindo a peroxidação lipídica (LABUZA, 1971). Encontrar métodos e condições eficientes na extração de produtos naturais é importante para a obtenção de um produto final com elevados teores de substâncias ativas. A extração é um dos processos de obtenção de compostos bioativos, na qual um solvente age na estrutura celular do vegetal, retirando os compostos de interesse. Há diversos fatores que influenciam o resultado final da extração, como o tipo e polaridade do solvente, o método de extração, tempo e temperatura (KOWALCZYK *et al.*, 2013).

O presente trabalho teve como objetivo otimizar a extração dos componentes antioxidantes da açafraão-da-terra, utilizando extração assistida por ultrassom (EAU) e avaliando seu potencial antioxidante por meio do método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

MATERIAIS E MÉTODOS

AMOSTRAS

Os rizomas do açafraão-da-terra foram obtidos na feira do produtor em Apucarana-PR. Foram higienizados e submetidos à desidratação em estufa de circulação de ar (marca SOLAB, modelo 102/480) à 40 °C (TONIN *et al.*, 2021), até peso constante. Após a secagem, os produtos desidratados foram triturados e armazenados em geladeira para a realização das análises.

PREPARO DOS EXTRATOS

Os extratos foram preparados em duplicata, pesando-se 1,0000 g do rizoma desidratado com 100,0 mL de solvente etanol:água (EtOH:H₂O) nas proporções v/v descritas na Tabela 1. A extração foi realizada em ultrassom (Cristófoli, com frequência operacional de 42 KHZ e capacidade total 2,5 L), conforme o planejamento experimental apresentado na Tabela 1, ao abrigo da luz (C = 20 g L⁻¹). Os extratos foram filtrados e armazenados sob refrigeração e ao abrigo da luz.

PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Foi conduzido um estudo de otimização das variáveis independentes, tempo (min), temperatura (°C) e proporção de etanol (%EtOH), a partir de um delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ com duplicata no ponto central, conforme a Tabela 1. O planejamento consistiu no desenvolvimento de um modelo preditivo elaborado pelo software Statistica® 10.

As condições de extração apresentadas na Tabela 1 mostram os níveis codificados $-\alpha$ (-1,68) e $+\alpha$ (+1,68), como pontos extremos aos quais o processo de extração é submetido (pontos axiais), -1 e +1 como os pontos mínimos e máximos, respectivamente, definidos para o processo experimental, e 0 representando o ponto central das condições.

O desenho experimental foi adequado ao seguinte modelo polinomial de segunda ordem apresentado na Equação 1.



$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3 \quad (1)$$

onde, X_1 é o tempo de extração, X_2 é a temperatura de extração, X_3 é a concentração de etanol e β_0 , β (1, 2 e 3), β (11, 22 e 33), e β (12, 13 e 23) são os coeficientes de regressão para o intercepto, comportamento linear, comportamento quadrático e para o comportamento de interação entre os termos, respectivamente.

A variável dependente para o experimento foi a resposta para porcentagem de atividade antioxidante (%AA) pelo método DPPH.

Tabela 1 - Delineamento composto central rotacional (DCCR) 2³ para otimização do tempo, temperatura e proporção de etanol/água (%EtOH).

Variáveis/Níveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
X ₁ : Tempo (min)	5	15	30	45	55
X ₂ : Temperatura (°C)	28	35	45	55	62
X ₃ : %EtOH	68	75	85	95	100

Fonte: Autoria própria (2023).

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH

O método do sequestro do radical livre DPPH (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995.), foi realizado a partir da adição de 1,0 mL de extrato ($C = 20 \text{ g L}^{-1}$) e 2,0 mL de solução do radical DPPH (0,12 mM em MeOH) em uma cubeta. Após 30 minutos foi realizada a leitura da absorbância em espectrofotômetro (Agilent Technologies, modelo Cary 60 UV-VIS) a 517 nm.

Interpreta-se a atividade antioxidante como a porcentagem de inibição em relação ao controle (1,0 mL de EtOH e 2,0 mL da solução do radical DPPH). Foi feito também o preparo do branco da amostra (1,0 mL de extrato e 2,0 mL de EtOH). A atividade antioxidante foi calculada como o uso da Equação 2, onde (A_a) representa a absorbância da amostra, (A_b) a absorbância do branco da amostra e (A_c) a absorbância do controle. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

$$\%AA = [Ac(Aa - Ab)] \cdot Ac^{-1} \quad (2)$$

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados apresentados foram obtidos através da média das repetições \pm desvio padrão e foram analisados estatisticamente pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), com comparações múltiplas. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se software Stat Soft. Inc. (2007).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados de atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH para os extratos do açafraão-da-terra estão apresentados na Tabela 2. O modelo proposto se ajustou ao ensaio de atividade antioxidante com R^2 de 0,9168. Os dados de ANOVA indicam que as variáveis tempo (L e Q), temperatura (L e Q), %EtOH (L e Q) e a interação entre as variáveis foram significativas no intervalo de confiança de 95% (Tabela 3).



A modelagem dos dados experimentais foi realizada com base no modelo representado na Equação 3:

$$\%AA\ DPH = 82,85 + 1,41t - 4,78t^2 - 1,91T + 1,68T^2 - 18,82\ \%EtOH - 13,43\ \%EtOH^2 - 3,62tT - 4,55t\ \%EtOH - 2,64T\ \%EtOH \quad (3)$$

Tabela 2 - Resultados de porcentagem de atividade antioxidante para os extratos do açafrão.

Tempo (min)	Temperatura (°C)	EtOH (%)	%AA DPPH
5	45	85	71,07 ± 0,40 ^{e,f}
15	35	95	67,07 ± 0,33 ^g
15	35	75	80,45 ± 0,48 ^d
15	55	95	72,97 ± 0,45 ^e
15	55	75	82,86 ± 0,22 ^{b,c}
30	28	85	81,01 ± 0,889 ^{c,d}
30	45	100	48,63 ± 0,58 ⁱ
30	45	68	81,26 ± 0,24 ^{c,d}
30	45	85	83,12 ± 0,39 ^{b,c}
30	45	85	84,00 ± 0,21 ^b
30	62	85	87,49 ± 0,22^a
45	35	95	69,53 ± 0,48 ^f
45	35	75	83,23 ± 0,46 ^{b,c}
45	55	95	59,42 ± 0,77 ^h
45	55	75	87,16 ± 0,27^a
55	45	85	79,19 ± 0,39 ^d

Fonte: Autoria própria (2023).

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=6). Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferenças significativas (p<0,05) pelo teste de Tukey.

A relação entre as variáveis dependentes e independentes está representada tri e bidimensionalmente pela superfície de resposta (Figura 1) gerada pelo modelo (Equação 3). A análise dos resultados demonstra a influência dos três fatores estudados na atividade antioxidante dos extratos do açafrão-da-terra.

Tabela 3 - Análise de Variância (ANOVA) para a atividade antioxidante pelo método DPPH.

	GL ^a	SQ ^b	QM ^c	F ^d	Pr (F)	Significância
Tempo (L)	1	40,16	40,16	3,95	0,049916	***
Tempo (Q)	1	314,82	314,82	31,01	0,000000	***
Temperatura (L)	1	75,12	75,12	7,40	0,007900	***
Temperatura (Q)	1	41,76	41,76	4,11	0,045662	***
% EtOH (L)	1	6877,61	6877,61	677,36	0,000000	***
% EtOH (Q)	1	2196,54	2196,54	216,33	0,000000	***
Tempo*Temperatura	1	157,67	157,67	15,53	0,000165	***
Tempo*%EtOH	1	247,87	247,87	24,42	0,000004	***
Temperatura*%EtOH	1	83,43	83,43	8,22	0,005218	***
Resíduo	95	10495,23	10,154			

Fonte: Autoria própria (2023).

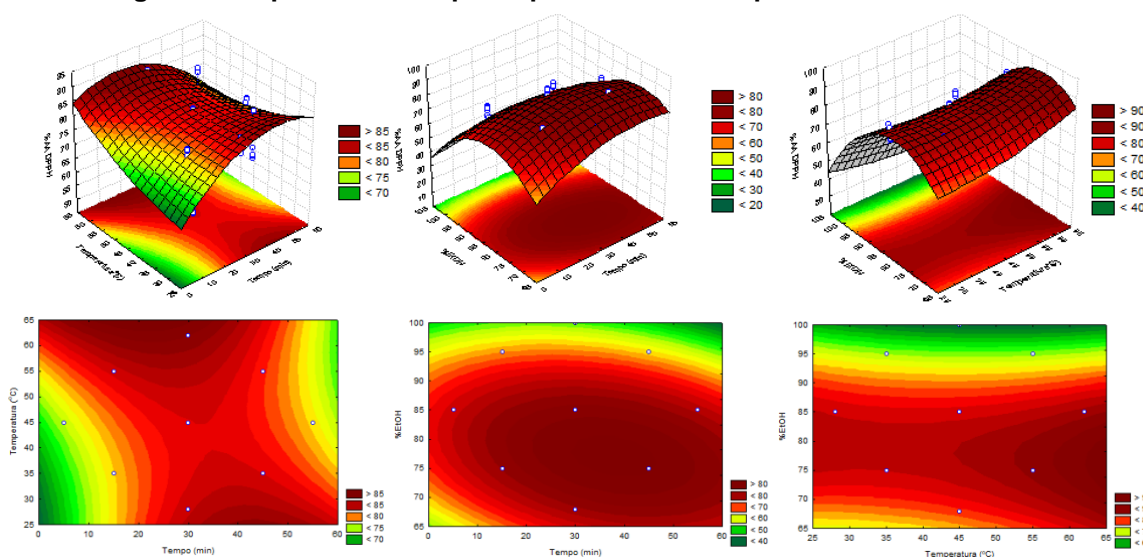
^a graus de liberdade; ^b soma dos quadrados; ^c quadrados médios; ^d coeficiente F calculado; Pr (F) Valor do teste T (< 0,05 houve diferença significativa).

A análise das superfícies de resposta (Figura 1) demonstra 4 regiões nas quais a maior atividade antioxidante pode ser obtida: 30-60 minutos a 25-30 °C; 10-35 minutos a 60-65 °C; 25-55 minutos com 75-85% de EtOH; 55-65 °C com 70-85% de EtOH. As condições experimentais (Tabela 2): 30 minutos, 62 °C, EtOH 85% e 45 minutos, 55 °C,



EtOH 75% apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante sem apresentar diferença significativa entre seus valores ($p < 0,05$). Observa-se que com o aumento da temperatura de 55 para 62 °C, pode-se diminuir o tempo de extração em 15 minutos, diminuindo a polaridade do solvente (aumentado a proporção de etanol na mistura).

Figura 1 - Superfície de resposta para a variável dependente %AA DPPH.



Fonte: Autoria própria (2023).

CONCLUSÕES

Neste trabalho foram otimizadas as condições da extração assistida por ultrassom, dos compostos antioxidantes dos rizomas do açafrão-da-terra. As melhores respostas de %AA pelo método de sequestro do radical DPPH foram obtidas nas condições experimentais: 30 minutos, 62 °C e EtOH 85% e 45 minutos, 55 °C e EtOH 75%, sendo demonstrada a influência das três variáveis no processo extrativo. O extrato otimizado poderá ser aplicado em estudos futuros de testes de atividade antitumoral e encapsulado em nanopartículas poliméricas, visando sua aplicação nas indústrias cosméticas, alimentícias e farmacêuticas.

Agradecimentos

Ao Laboratório Multiusuário de Apoio à Pesquisa da UTFPR – Campus Apucarana (LAMAP).

Conflito de interesse

Não há conflito de interesse.

REFERÊNCIAS

AHMED, T.; ENAM, S.A.; GILANI, A.H. Curcuminoids enhance memory in an amyloid-infused rat model of Alzheimer's Disease. **Neuroscience**, v. 169, p. 1296-1306, 2010.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 22, p. 25-30, 1995.



DE, R.; KUNDU, P.; SWARNAKAR, S.; RAMAMURTHY, T.; CHOWDHURY, A.; NAIR, G.B.; MUKHOPADHYAY, A.K. Antimicrobial Activity of Curcumin against *Helicobacter pylori* isolates from India and during Infections in Mice. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 1592-1597, 2009.

GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric: Chemistry, Technology and Quality. **CRC Critical**, 1980.

JURENKA, J.S. Anti-inflammatory Properties of Curcumin, a Major Constituent of *Curcuma longa*: A Review of Preclinical and Clinical Research. **Alternative Medicine Review**, v. 14, p. 141-153, 2009.

KOWALCZYK, D.; SWIECA, M.; CICHOCKA, J.; GAWLIK-DZIKI, U. The phenolic content and antioxidant activity of the aqueous and hydroalcoholic extracts of hops and their pellets. **Journal of the Institute of Brewing**, v. 119, p. 103-110, 2013.

KULKARNI, S.K.; DHIR, A.; AKULA, K.K. Potentials of Curcumin as an Antidepressant. **Scientific World Journal**, v. 9, p. 1233-1241, 2009.

LABUZA, T.P. Kinetics of lipidoxidation in foods. **CRC Critical Reviews in Food Technology**, v. 2, p. 355-405, 1971.

MORIMOTO, T.; SUNAGAWA, Y.; FUJITA, M.; HASEGAWA, K. Novel Heart Failure Therapy Targeting Transcriptional Pathway in Cardiomyocytes by a Natural Compound, Curcumin. **Circulation Journal**, v. 74, p. 1059-1066, 2010.

PATIL, V.V.; SURWASE, S.R.; BELURE, A.S.; SURYAWANSHI, A.G.; MANE, D.V. Phytochemical analysis and antibacterial evaluation of *Curcuma longa* and *Curcuma aromatica* against enteric poultry pathogens. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, p. 2000-2003, 2019.

TONIN, L.T.D.; DE OLIVEIRA, T.F.V.; DE MARCO, I.G.; PALIOTO, G.F.; DÜSMAN, E. Bioactive compounds and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of extracts of *Curcuma longa*. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 15, p. 3752–3760, 2021.

WICKENBERG, J.; INGEMANSSON, S.L.; HLEBOWICZ, J. Effects of *Curcuma longa* (turmeric) on postprandial plasma glucose and insulin in healthy subjects. **Nutrition Journal**, v. 9, p. 1-5, 2010.

WILKEN, R.; VEENA, M.S.; WANG, M.B.; SRIVATSAN, E.S. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. **Molecular Cancer**, v. 10, p. 1-19, 2011.

WOJDYŁO, A.; OSZMIAN´SKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940-949, 2007.

ZHOU, H.; BEEVERS, C.S.; HUANG, S. The targets of curcumin. **Current Drug Targets**, v. 12, p. 332–347, 2011.