

ESTUDO QUÍMICO E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Caryocar coriaceum* Wittm

Daniela Ribeiro Alves
Diana Ferreira Alves
Selene Maia de Moraes

Resumo: Na busca contínua de produtos naturais com atividades farmacológicas, objetivou-se neste trabalho realizar a prospecção fitoquímica dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm, determinar os teores de flavonoides e fenóis totais, assim como, avaliar as atividades antioxidantes dos referidos extratos. Os testes fitoquímicos qualitativos foram baseados na observação visual das mudanças de cor ou a formação de precipitado após a adição dos reagentes específicos, onde mostrou-se os seguintes metabólitos secundários: taninos, fenóis, flavonóides, flavonas, flavonóis, xantonas, catequinas, flavanonas, esteroides, saponinas e alcaloides. Os testes quantitativos de fenóis, flavonoides e atividade antioxidante foram realizados através de leitura em espectrofotômetro. As análises em espectrofotômetro dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das folhas de *C. coriaceum* revelaram respectivamente a presença de fenóis nas percentagens de 2,103%; 2,930%; 15,938% e 15,938%, bem como de flavonoides 0,761%; 1,080%; 1,002% e 0,388% em relação a cada extrato e quanto a atividade antioxidante, apresentaram CI_{50} de $9,536 \pm 0,189$; $1,151 \pm 0,192$; $1,007 \pm 0,180$ e $2,606 \pm 0,334$ ($mg \cdot mL^{-1}$). Portanto a atividade antioxidante está diretamente relacionada com o teor de fenóis totais.

Palavras-Chave: Fitoquímico. Antioxidante. *Caryocar*.

Abstract: In the ongoing search for natural products with pharmacological activities, the aim of this work perform the phytochemical prospection of hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol extracts of *Caryocar coriaceum* Wittm leaves to determine the flavonoid content and total phenols, as well as to assess the antioxidant activities of the extracts. Qualitative phytochemicals tests were based on visual observation of color change or precipitate formation after addition of specific reagents, which showed the following secondary metabolites: tannins, phenols, flavonoids, flavones, flavonols, xanthonas, catechins, flavanones, steroids, saponins and alkaloids. Quantitative testing of phenols, flavonoids and antioxidant activity were performed by reading in a spectrophotometer. The spectrophotometer analysis indicated in the hexane, chloroform, ethyl acetate and methanol extracts of *C. coriaceum* leaves, respectively the presence of phenols in proportions of 2.103%, 2.930%, 15.938% and 15.938%, flavonoids content of 0.761%, 1.080%, 1.002% and 0.388% in relation to each extract and the antioxidant activity, showed IC_{50} 9.536 ± 0.189 , 1.151 ± 0.192 , 1.007 ± 0.180 and 2.606 ± 0.334 ($mg \cdot mL^{-1}$). Therefore the antioxidant capacity is directly related to total phenol content.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como tratamento ou prevenção de enfermidades é tão antigo quanto o surgimento do homem. A preocupação com a cura de doenças se fez presente ao longo da história, sendo repassado ao longo das gerações. O Brasil é o país com muita biodiversidade, sendo esta uma das nossas grandes riquezas que está associada à uma rica diversidade cultural. Estudos comprovam que fontes naturais apresentam muitos compostos com atividade farmacológica podendo ser usados no desenvolvimento de novas drogas (COSTA-LOTUFO, 2010).

Caryocar coriaceum Wittm, é popularmente conhecido como pequi, piquiá, pequerim, amêndoa-de-espinho, grão-de-cavalo, suari. O pequi é uma dicotiledônea pertencente ao gênero *Caryocaraceae* onde, são catalogadas 25 espécies estando presentes na Caatinga e no Cerrado brasileiro. A palavra pequi, na língua indígena, significa “casca espinhosa”, caracterizando uma árvore nativa do cerrado brasileiro que apresenta espinhos na sua adaptação a escassez de água no ambiente, e de grande valor econômico, uma vez que em geral todas as partes da planta são utilizadas pela população local (ASCARI et al., 2013). A árvore do pequi atinge até 10 metros de altura, tronco com ramos grossos, normalmente tortuosos, de casca áspera e rugosa de cor castanha acinzentada. Folhas pilosas, recobertas com pelos curtos, compostas, formadas por três folíolos com as bordas recortadas, tendo as nervuras bem marcadas. Ricas em taninos que torna as peles imputrescíveis, sendo, por isso, usada em curtume. Os taninos também fornecem tintas. O pequizeiro possui madeira de boa qualidade e por isso é explorado de forma extrativista, para subsistência e indústrias, é, portanto uma das espécies arbóreas de grande interesse socioeconômico do cerrado (POZO, 1997; SILVA; CONCEIÇÃO, 2010). A casca e as folhas também contêm altos teores de taninos, utilizados como matéria-prima para fabricação de (SOUZA-NETO; COLLEVATTI, 2011). Seus frutos são popularmente conhecidos como pequi e são considerados por muitos como o rei do Cerrado, devido ao seu valor alimentício, medicinal, melífero, ornamental, oleaginoso e tanínifero (PEREZ, 2004; BATISTA et al., 2010; ARARUNA, 2012; ASCARI et al., 2013). Relatos da medicina popular afirmam que as folhas do *C. coriaceum* podem curar vários problemas de saúde dentre eles os relacionados ao fígado (SEPTIMO, 1994; SIQUEIRA, 1982).

Este trabalho teve como objetivo realizar a prospecção fitoquímica dos extratos hexânico, clorofórmico, acetato de etila e metanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm., determinar os teores de flavonoides e fenóis totais, assim como avaliar as atividades antioxidante dos referidos extratos.

METODOLOGIA

As folhas da *C. coriaceum* foram coletadas no campus do Itaperi da Universidade Estadual do Ceará (UECE) lat: -3.792222 long: -38.556111. Estas folhas foram apresentadas e identificadas no Herbário Prisco Bezerra sob o código EAC57060. Em seguida foram encaminhadas ao Laboratório de Química dos Produtos Naturais na UECE, onde foram previamente selecionadas, picadas e colocadas para secar a 40°C por uma semana. Logo após, este material foi triturado e posteriormente submetido ao procedimento via sohxlet, onde foi realizada a extração com os seguintes solventes: Metanol (EMFP), Acetato de etila (EAFP), Clorofórmio (EAFP) e Hexano (EHFP), posteriormente, os extratos foram concentrados em rotaevaporador.

Testes fitoquímicos qualitativos foram realizados com base na observação visual de mudanças colorimétricas ou na formação de precipitado após a adição dos reagentes específicos (MATOS 2009). Utilizou-se a metodologia descrita por Funari e Ferro (2006). Preparou-se uma curva padrão com quercetina (substância de referência). Alíquotas de 2 a 6 mL de solução etanólica de quercetina, a $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, foram transferidas para balões volumétricos de 25 mL, contendo 1 mL de solução de cloreto de alumínio a 2,5% para formação do complexo do flavonoide com AlCl_3 que absorve em 425nm. O volume final de cada balão foi ajustado com etanol. Obteve-se uma reta com os pontos obtidos das concentrações e absorbâncias correspondentes.

Para a quantificação de flavonóides das frações das folhas do pequi, foram utilizados 2 mL de solução deste na concentração de $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo misturados com 1 mL da solução aquosa de AlCl_3 diluído em balão de 25 mL. Decorridos 30 min, foi realizada a leitura de cada solução a 425 nm, em espectrofotômetro. A determinação do teor de fenóis totais presente nas frações das folhas do Pequi foi feito por meio de espectroscopia na região do visível pelo método de Folin-Ciocalteu (SOUSA et al., 2007). O 7,5mg das amostras foram dissolvidas em metanol, em seguida, transferido em um balão volumétrico de 25 mL e o volume final completado com metanol.

Uma alíquota de 100 μL dessa solução foi agitada com 500 μL do reagente de Folin-Ciocalteu por trinta segundos, em seguida acrescentados 6 mL de água destilada e 2 mL de Na_2CO_3 a 15% à mistura e agitada por 1 minuto. Por último completou-se o volume para 10 mL com água destilada. Após 2 horas foi medida a absorbância das amostras a 750 nm utilizando cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol. A atividade antioxidante foi seguida pelo método de varredura do radical livre DPPH, descrito por Brand-Williams (1995). Em um tubo de ensaio, colocou-se 2,7 mL de uma solução metanólica com $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ do radical livre DPPH de coloração roxa.

Em seguida foi adicionado ao tubo 0,3 mL da solução metanólica da amostra a ser testada nas concentrações de 500, 250, 200, 150, 100, 50, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Após o intervalo de 30 minutos, mediu-se então a absorbância num espectrofotômetro Spekol no comprimento de onda de 515 nm. Calculou-se então o Índice Varredor da amostra em percentual (IV%) usando a fórmula:

$$\text{IV}\% = (A_{\text{DPPH}} - A_{\text{AMOSTRA}}/A_{\text{DPPH}}) \times 100$$
, onde A é a absorbância ao final dos 30 minutos. Os valores encontrados foram aplicados no Programa estatístico Origin 7.0 para o cálculo da concentração que inibe 50% dos radicais livres da solução (CI_{50}). Para comparação, usou-se a rotina como padrão na mesma concentração dos extratos. Todos os experimentos foram feitos em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes qualitativos para identificar as principais classes de metabólitos secundários do EECFC foram realizados com base em Matos (2009). Estes ensaios identificaram a presença de grupos de compostos químicos com relevantes propriedades biológicas já descritas na literatura. (tabela 1).

Tabela 1: Prospecção fitoquímica das Frações das folhas da *Caryocar coriaceum* Wittm.

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	P	EHF FP	EC	AFP	E	E MFP
Taninos		-	-		+	+
Fenóis		-	-		-	-
Antocianinas / Antocianidinas	/	-	-		-	-
Flavonas/ Flavonóis / Xantonas		-	-		+	+
Chalconas / Auronas		-	-		-	-
Flavanonóis		-	-		-	+
Leucoantocianidinas		-	-		-	+
Catequinas		-	-		+	-
Flavanonas		+	-		+	+
Flavanonóis		-	-		-	-
Xantonas		-	-		-	-
Triterpenóides		-	-		-	-
Esteróides		-	+		+	-
Saponinas		-	+		+	+
Alcaloídes		-	-		+	+

Com base na prospecção fitoquímica realizou-se a quantificação do teor (em termos percentuais em relação aos extratos secos) de flavonoides e fenóis, que mostraram respectivamente, os seguintes valores: EAFP: 1,002% e 15,938%, ECFP: 0,18% e 2,93%, EHFP: 0,761% e 2,103%, EMFP: 0,388% e 15,938% (Tabela 2).

Tabela 2: Atividade antioxidante CI_{50} ($mg \cdot mL^{-1}$)* e teores de fenóis, flavonoides**.

Amostra	EHFP	ECFP	EAFP	EMFP	Rutina
Atividade antioxidante	9,536	1,151	1,007	2,606	0,013
CI_{50} ($mg \cdot mL^{-1}$)	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
DP (\pm)**	0,189	0,192	0,180	0,334	0,26
Teor de Fenóis totais	21,03	29,301	159,376	159,376	
(mg de EAG/g de extrato)*	\pm	\pm	\pm	\pm	
	5,263	2,771	3,008	15,938	
Teor de Flavonoides	7,615	10,803	10,025	3,881	
(mg de EQ/g de extrato)*	\pm	\pm	\pm	\pm	
	0,152	0,557	0,857	0,066	

*Concentração que inibe 50% do radical livre DPPH, ** Percentagem (%) \pm Desvio Padrão,

Especula-se que a maioria das doenças são originadas pelo stress oxidativo (BERG et al., 2013; SINGH et al., 2014; SARMA et al., 2015), estudos recentes demonstraram efeito positivo de fenóis e flavonoides no combate às doenças relacionadas ao stress oxidativo (ACCIOLY et al., 2012; VILA-NOVA et al., 2013; SILVA et al., 2014). A presença de compostos fenólicos como taninos e flavonoides, indica que este extrato bruto pode ter atividades biológicas (VILA-NOVA et al., 2011, 2012; CALIXTO JÚNIOR et al., 2015; SILVA et al., 2015).

O teste para avaliar a atividade antioxidante dos extratos da *C. coriaceum* foi feito com base na captura do radical livre DPPH e expresso em termos de CI_{50} (concentração do extrato que inibe 50% do radical livre DPPH). Este ensaio indicou que os extratos apresentaram atividade antioxidante moderada em comparação ao padrão do flavonoide Rutina cujo $CI_{50} = 0,013 \pm 0,26$, e para os extratos hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol foram de: $9,536 \pm 0,189$; $1,151 \pm 0,192$; $1,007 \pm 0,18$ e $2,606 \pm 0,334$, respectivamente (Tabela 2).

CONCLUSÃO

Neste trabalho a atividade antioxidante mostrou-se diretamente relacionada com o teor de fenóis totais, verificando-se que os extratos mais polares e que apresentaram taninos foram os mais ativos. A atividade antioxidante de moléculas naturais indica o potencial destas no estudo e desenvolvimento de fármacos para inúmeros distúrbios relacionados ao estresse oxidativo como por exemplo, a leishmaniose, doenças neurodegenerativas como Parkinson e Mal de Alzheimer e por outro lado, radicais livres estão diretamente ligados ao processo de envelhecimento e aumento na incidência de câncer.

REFERÊNCIAS

- ACCIOLY, M. P.; BEVILAQUA, C. M. L.; RONDON, F. C. M.; et al. Leishmanicidal activity in vitro of *Musa paradisiaca* L. and *Spondias mombin* L. fractions. **Veterinary parasitology**, v. 187, n. 1-2, p. 79–84, 2012. Elsevier B.V.
- ARARUNA, M. K. A. **PERFIL QUÍMICO E ENSAIOS BIOLÓGICOS in vivo e in vitro DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO E FRAÇÃO METANÓLICA DAS FOLHAS DE *Caryocar coriaceum* WITTM. (PEQUIZEIRO)**, 2012.
- ASCARI, J.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. The Phytochemistry and Biological Aspects of *Caryocaraceae* Family. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 2, p. 293–308, 2013.
- BATISTA, J. S.; SILVA, A. E.; RODRIGUES, C. M. F.; et al. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arq. Inst. Biol.**, v. 77, n. 3, p. 441–447, 2010.
- BERG, M.; VANAERSCHOT, M.; JANKEVICS, A.; et al. Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure. **Molecular microbiology**, v. 90, n. 2, p. 428–42, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- CALIXTO JÚNIOR, J. T.; MORAIS, S. M.; MARTINS, C. G.; et al. Phytochemical Analysis and Modulation of Antibiotic Activity by *Luehea paniculata* Mart. & Zucc. (Malvaceae) in Multiresistant Clinical Isolates of *Candida* Spp. **BioMed research international**, v. 2015, p. 807670, 2015.
- MATOS, F. J. A. **Introdução a Fitoquímica Experimental**. 1st ed. Fortaleza: Edições UFC, 1988.
- PEREZ, E. **DIAGNOSE FITOQUÍMICA DOS FRUTOS DE *Caryocar brasiliense* CAMB.**, 2004. Universidade Federal do Paraná.
- POZO, C. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do cerrado no Norte de Minas Gerais**, 1997. Universidade Federal de Lavras.
- SARMA, K.; MONDAL, D.; SARAVANAN, M.; MAHENDRAN, K. Evaluation of haemato-biochemical and oxidative indices in naturally infected concomitant tick borne intracellular diseases in dogs. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, n. 1, p. 60–66, 2015.
- SILVA, A. A. DE S.; ALEXANDRE, J. DE B.; VIEIRA, L. G.; et al. Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida, anticolinérgica e antioxidante de extratos de *Annona glabra* L. (araticum panã). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 36, n. 2, p. 189–194, 2015.
- SILVA, A. A. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; et al. Activity of cycloartane-type triterpenes and sterols isolated from *Musa paradisiaca* fruit peel against *Leishmania infantum* chagasi. **Phytomedicine**, v. 21, n. 11, p. 1419–1423, 2014. Elsevier GmbH.
- SILVA, N. L. A.; CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. , v. 6, p. 1–17, 2010.
- SINGH, M.; KAUR, M.; SILAKARI, O. Flavones: An important scaffold for medicinal chemistry. **European journal of medicinal chemistry**, v. 84C, p. 206–239, 2014. Elsevier Masson SAS.

SOUSA, C. M. D. M.; ROCHA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SOUZA-NETO, A. C. DE; COLLEVATTI, R. G. Padrões históricos e filogeográficos do gênero *Caryocar* (Caryocaraceae). VIII Seminário de Pós-Graduação da UFG - MESTRADO. **Anais...** p.1–5, 2011.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M. DE; FALCÃO, M. J. C.; et al. Leishmanicidal activity and cytotoxicity of compounds from two Annonacea species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 5, p. 567–571, 2011.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M. DE; FALCÃO, M. J. C.; et al. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corossolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. **Experimental parasitology**, v. 133, n. 3, p. 334–8, 2013.

VILA-NOVA, N. S.; MORAIS, S. M.; FALCÃO, M. J. C.; et al. Leishmanicidal and cholinesterase inhibiting activities of phenolic compounds of *Dimorphandra gardneriana* and *Platymiscium floribundum*, native plants from Caatinga biome. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 11, p. 1164–1168, 2012.

AGRADECIMENTOS

Ào CNPQ, FUNCAP e À UECE.