

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DA *Spondias Tuberosa* Arruda

Lúcio Wagner Santos Demesio¹; Luís Ricardo Monteiro de Melo¹; Luciclaudio cassimiro Amorim²;
João Victor de Oliveira Alves³; Marcia Vanusa Da Silva¹.

(Faculdade integrada de Pernambuco – FACIPE; Lúcio.wagner2017@gmail.com¹)

(Faculdade integrada de Pernambuco – FACIPE; Luizricardo9999@hotmail.com¹)

(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; Luciclaudioamorim@hotmail.com²)

(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; jv-bio@hotmail.com³)

(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE; marciavanusa@yahoo.com.br¹)

1. INTRODUÇÃO

A influência da ação dos radicais livres em sistemas biológicos tem cada vez mais sido correlacionada com diversas doenças como câncer, doenças cardiovasculares, disfunções do sistema imunológico, entre outras enfermidades (Nascimento et al., 2011). O oxigênio tem um papel fundamental para os seres aeróbicos, contudo o seu excesso ocasiona a formação de espécies reativas de Oxigênio (EROS), acarretando a exposição do indivíduo a um estresse oxidativo (EO) (Nascimento et al., 2011).

A formação de EROS ocorre naturalmente no corpo, são fundamentais em diversas atividades produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes, contudo o excesso deles pode ser responsável por diversos efeitos deletérios como peroxidação de lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, causando danos às membranas, perda de fluidez da mesma, e levando ao surgimento de câncer, como consequência de alterações no DNA, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, entre outros eventos patológicos (Souza de Sá et al., 2012)

As substâncias denominadas de antioxidantes, são capazes de combater os efeitos deletérios do EO, criando uma estabilidade dentro o sistema e evitando os efeitos colaterais dos radicais livres (Nascimento et al., 2011). Estes antioxidantes podem ser endógenos, que são substância sintetizadas pelo corpo, ou exógenas substâncias que são adquiridas através da alimentação. Entre os antioxidantes exógenos pode-se destacar alguns grupos como os compostos fenólicos, com certa ênfase os flavonoides, oriundos de produtos naturais. Por apresentarem ressonância após atuarem no combate aos radicais livres, os compostos fenólicos possuem uma determinada estabilidade, que os permite reter o elétron desemparelhado sem causar danos às estruturas celulares (Souza de Sá et al., 2012). Outro método corriqueiramente utilizado para medir a atividade antioxidante é através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) (ABTS), que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Rufino et al., 2007).

A utilização de plantas é uma tática que favorece o surgimento de novos métodos de produção de substâncias com caráter antioxidante, através de extratos de diversos tecidos, como a casca, o fruto, raiz, caule, essa metodologia além de colaborar para a produção de um produto com relevância comercial e farmacológica e que tenha um valor mais acessível (Borges et al., 2011). Existem diversos estudos que comprovam a capacidade de algumas plantas de sintetizar substância

antioxidantes, a Caatinga é um importante bioma brasileiro que ainda necessita de receber estudos para evidenciar todo o potencial dos seus exemplares como plantas medicinais (Araújo, 2012).

Esta vertente de pesquisa é fundamental, pois estas plantas já são utilizadas pelas comunidades para diversos fins curativos, diante disso a comprovação positiva ou negativa dessas práticas é fundamental (Araújo, 2012).

O nordeste brasileiro é um dos grandes produtores de fruta, já que possui uma significativa parcela de produtores de agricultura de extrativismo vegetal com diversas plantas, entre estas o Umbu (*SPONDIAS TUBEROSA ARRUDA*) recebe um destaque, graças a sua capacidade de adaptação ao clima do semiárido nordestino e sua versatilidade na produção de diversos produtos tais como: suco, doce, umbuzada, licor, xarope, conseqüentemente colaborando para o desenvolvimento socioeconômico da comunidade produtora (Santana et al., 2010).

2. METODOLOGIA

2.1. Coleta do material vegetal

Cascas de *Spondias Tuberosa Arruda* foram coletadas no Parque Nacional do Catimbau (PARNA do Catimbau), Pernambuco-Brasil. Após a coleta, foram identificadas e depositadas no Herbário do Instituto de Pesquisas Agronômicas de Pernambuco (IPA-PE).

Obtenção dos extratos

As cascas de *Spondias Tuberosa Arruda* foram submetidas à secagem em temperatura ambiente por 7 dias, sendo então trituradas. O extrato aquoso foi obtido por infusão, em água deionizada, a 90°C, utilizando 100 g de folhas moídas em 1,5 L do solvente. Após 30 minutos de repouso, o material foi filtrado e o solvente foi totalmente removido a 40°C, a pressão reduzida, em rota evaporador.

2.2. Compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado de acordo com o método Folin-Ciocalteu. 200 µL extratos vegetais (na concentração de 1 mg/mL) foram adicionados em tubos, juntamente com 1 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1:1/v:v) e 2.5 mL de carbonato de sódio (20%). A mistura foi incubada por 30 min em temperatura ambiente. A absorbância foi medida à 765 nm e a estimativa de compostos fenólicos totais foi calculada utilizando uma equação obtida a partir da curva de calibração do ácido gálico, sendo realizada em triplicata.

2.3. Atividade antioxidante por DPPH

A técnica baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar, o DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorvância a 515 nm. A partir dos resultados da absorbância obtidos determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante de radicais livres. Para a realização da atividade antioxidante diluímos 0,008 g de DPPH em 100ml de metanol e lemos no elisa no comprimento de onda a 517 nm, onde a absorbância da solução tem que está entre 0.600 a 0.700. 2 mg do extrato foi diluído em 2 ml de metanol e dessa solução foi realizada uma diluição seriada para obtenção de 6 concentrações distintas 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,6 µg/ml. O teste é feito em placa de 96 poços, adicionamos 40 µl de cada concentração em triplicata e adicionamos 250 µl da solução da DPPH deixamos em repouso por 25 minutos no escuro. Para validação o teste fazemos dois controles (negativo e positivo) com metanol e ácido gálico. O resultado é expresso em porcentagem de inibição pela fórmula abaixo:

$$\text{SRL}(\%) = \frac{\text{ABS CONTROLE} - \text{ABS AMOSTRAS}}{\text{ABS CONTROLE}} \times 100$$

Onde: ABS controle é o radical com metanol e ABS amostras é o Radical com o extrato.

2.4. Atividade antioxidante por ABTS

A técnica do radical livre ABTS+ foi feita de acordo com Sánchez-González et al. (2005). A solução ABTS foi preparada em meio aquoso, o cátion ABTS+ foi produzido reagindo 7mM da solução estoque ABTS com 2,45mM de persulfato de potássio. A mistura foi guardada em frasco amba e em temperatura ambiente por 16 horas, antes do uso. A solução ABTS+ foi diluída com em etanol para uma absorvância de 0,700 a 730nm. 1 mg do extrato foi diluído em 1 ml de etanol, dessa solução foi retirada 20 ul e posta em tubos de ensaio em 3 triplicata e adicionando 2 ml da solução ABTS+• deixada em repouso no escuro por 6 minutos. As leituras de absorvância a 730nm foram realizadas após da reação de 6 à 7 minutos. O resultado é expresso em porcentagem de inibição pela formula abaixo:

$$\text{Inibição}(\%) = \frac{\text{ABS CONTROLE} - \text{ABS AMOSTRAS}}{\text{ABS CONTROLE}} \times 100$$

Onde: ABS controle é o radical com etanol e ABS amostras é o Radical com o extrato.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A crescente busca por compostos fenólicos está relacionado às suas propriedades antioxidantes; vários estudos mostram os benefícios a saúde humana, proporcionada por uma dieta rica nesses compostos. Esses compostos estão incluídos na categoria de neutralizadores de radicais livres e apresentam uma grande gama de efeitos biológicos incluindo ações antioxidantes, antiviral, antimicrobiana antitumoral e atividade antibacteriana.

Diante disso, a determinação de compostos fenólicos é de fundamental importância, objetivando compreender melhor as atividades biológicas de extratos de origem vegetal. No presente estudo, os compostos fenólicos presentes nos extratos foram determinados utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e expressos como equivalentes a ácido gálico (EAG) por grama de extrato. A determinação de compostos fenólicos em extrato aquoso das folhas de *Spondias Tuberosa Arruda* foi de 124,4mg EAG/g extrato.

Os radicais livres de DPPH apresenta inicialmente a coloração roxa por terem elétron livre, mudança de cor é dada quando um radical hidrogênio é doado por uma molécula antioxidante entra em ressonância com a molécula de DPPH, tendo uma cor amarelada, diminuindo-se, assim, a absorvância. A baixa absorvância indica atividade sequestrante de radicais livres (SANTOS et al, 2007). Em nosso estudo a casca do umbu obtivemos o melhor resultado na nossa quarta menor, com um sequestro de 89,78 % na concentração de 62,5 ug/ml mostrando um bom resultado. As concentrações superiores à 62,5 ug/ml tiveram uma taxa de sequestro inferior, mas próxima a 89,78%. Assim podemos afirmar essa dosagem de 62,5 ug/ml é suficiente para garantir uma boa atividade oxidante.

O ABTS indica sua atividade positiva a partir desaparecimento da absorção como o DPPH, nesse teste na concentração 1 Mg/ml a inibição da coloração foi de 99,95%. Nesta técnica a casa do umbu conseguiu quase 100% de dissociação do persulfato de potássio, quanto mais o extrato conseguir dissociar o ABTS do persulfato de potássio menor será a absorvância indicando uma atividade positiva.

4. CONCLUSÃO

Diante desses resultados e a constante busca de produção de medicamentos naturais, os antioxidantes naturais são fundamentais para progressão da qualidade na medicina, estes bioativos possuem uma citotoxicidade quase nula, ou sejam não existem efeitos colaterais presentes em fármacos a partir destes compostos, diferentemente do que é comercializado atualmente e com uma futura produção a nível industrial acarretará na geração de emprego e renda para diversas comunidades produtoras destas plantas.

De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o extrato aquoso da casca da *Spondias Tuberosa Arruda* possui uma concentração significativa de compostos fenólicos mostrando ser eficiente no sequestro de radicais livres ao mesmo tempo atuando como um atioxidante natural. Desse modo, estudos mais específicos e métodos *in vivo* devem ser realizados com os extratos desta espécie, para incentivar seu interesse biotecnológico.

Entretanto, mais estudos relacionado a etapas de isolamento, e caracterização dos compostos fenólicos responsáveis pela sua atividade antioxidante se faz necessários.

5. REFERÊNCIAS

1. BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. de S.; BARBOSA, E. F. ; **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais.** ; ENCICLOPEDIA BIOSFERA.; 7; 1-20; 2011
2. BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. de S.; BARBOSA, E. F. ; **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais.** ; ENCICLOPEDIA BIOSFERA.; 7; 1-20; 2011
3. HOTTA, H, NAGANO, S, UEDA, M, TSUJINO, Y, KOYAMA, J, OSAKAI, T, **Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation.** Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects. 2002.
4. HOTTA, H, NAGANO, S, UEDA, M, TSUJINO, Y, KOYAMA, J, OSAKAI, T, **Higher radical scavenging activities of polyphenolic antioxidants can be ascribed to chemical reactions following their oxidation.** Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects. 2002.
5. Jaqueline Nery Sena de Santana, Edithe Helena de Brito Santos, Fabiana Pacheco Reis Batista, Laila Matos Pereira, Luciana Cavalcanti de Azevedo, Marta Eugênia Cavalcanti Ramos, **ELABORAÇÃO DE PRODUTOS DERIVADOS DO UMBU (*Spondias tuberosa* Arruda) E ACEITAÇÃO PELOS CONSUMIDORES**, IF SERTÃO-PE, Coordenação de Tecnologia em Alimentos, Campus Petrolina, 2010.
6. Juliana Couto Nascimento, Luiz Fernando Oliveira Lage, Cláudio Rodrigues Dayrell Camargos, Juliana Coelho Amaral, Lucas Martins Costa, Adriana Nascimento de Sousa, Franciêlda

Queiroz Oliveira **Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonóides totais em extratos de folhas da Bauhinia variegata L.** Rev. Bras. Farm. 92(4): 327-332, 2011.

7. Maria do Socorro Moura Rufino, Ricardo Elesbão Alves, Edy Sousa de Brito, Selene Maia de Moraes, Caroline de Goes Sampaio, Jara Pérez-Jiménez, Fulgencio Diego Saura-Calixto, **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS**, ISSN 1679-6535 Julho, 2007 Fortaleza, CE.

8. MILARDOVIC, S, IVEKOVIC, D, GRABARIC, BS. **A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical.** Bioelectrochemistry. 68, 180-185. 2005

9. MILARDOVIC, S, IVEKOVIC, D, GRABARIC, BS. **A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical.** Bioelectrochemistry. 68, 180-185. 2005

10. Pedro Guilherme Sousa de Sá, Amanda Leite Guimarães, Ana Paula de Oliveira, José Alves de Siqueira Filho, André Paviotti Fontana, Patrícia Kauanna Fonseca Damasceno, Carla Rodrigues Cardoso Branco, Alexsandro Branco, Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, **Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de Selaginella convoluta (Arn.) Spring (Selaginellaceae)**, Rev Ciênc Farm Básica Apl., 2012;33(4):561-566.

11. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I. et al. **In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures: Italian, espresso and filter.** Food Chemistry, Oxford, v. 90, n. 1/2, p. 133-139, Jan./ Feb. 2005.

12. SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, I. et al. **In vitro antioxidant activity of brewed using different procedures: Italian, espresso and filter.** Food Chemistry, Oxford, v. 90, n. 1/2, p. 133-139, Jan./ Feb. 2005.

13. Thiago Antônio de Souza Araújo, **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE PLANTAS MEDICINAIS DA CAATINGA E MATA ATLÂNTICA: ASPECTOS ETNOBOTÂNICOS E ECOLÓGICOS**, UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS NÍVEL DOUTORADO, 2012.