



Ministério da Educação – Brasil
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – UFVJM
Minas Gerais – Brasil
Revista Vozes dos Vales: Publicações Acadêmicas
ISSN: 2238-6424
QUALIS/CAPES – LATINDEX
Nº. 22 – Ano XI – 10/2022
<http://www.ufvjm.edu.br/vozes>

Avaliação do potencial antioxidante e do perfil fitoquímico de plantas medicinais do cerrado

Cristiane Fernanda Fuzer Grael*

Doutora - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade
de São Paulo- Ribeirão Preto/ Professora do Departamento de Farmácia -
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
<http://lattes.cnpq.br/2697383234729515>
E-mail: cris.grael@ufvjm.edu.br

Carina Alves Ferreira

Mestre – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
<http://lattes.cnpq.br/2611583558990954>
E-mail: carinaferreira95@outlook.com

Dayana Barbosa da Cruz

Doutoranda - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde - Faculdade de
Medicina- Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
<http://lattes.cnpq.br/0516131195816810>
E-mail: dayana.cruz@ufvjm.edu.br

Poliana Ribeiro Barroso

Doutora - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas -
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
<http://lattes.cnpq.br/1557136691837844>
E-mail: poliana.barroso@ufvjm.edu.br

Artenizia Criste Lima

Mestranda - Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas -
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

<http://lattes.cnpq.br/2574146713596219>

E-mail: artenzialima28@hotmail.com

Patrícia Silva Santos Guimarães

Mestre – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas/ Técnica de
laboratório do Departamento de Farmácia - Universidade Federal dos Vales do
Jequitinhonha e Mucuri

<http://lattes.cnpq.br/3339472304481036>

E-mail: patricia.guimaraes@ufvjm.edu.br

Fernando Costa Archanjo

Doutor- Programa de Pós-graduação em Química – Universidade de São Paulo-
Ribeirão Preto/ Professor do Departamento de Farmácia - Universidade Federal dos
Vales do Jequitinhonha e Mucuri

<http://lattes.cnpq.br/5157665792079409>

E-mail: archanjofc@ufvjm.edu.br

Kelly Cristina Kato

Doutora - Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Universidade
Federal de Minas Gerais/ Professora do Departamento de Farmácia - Universidade
Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

<http://lattes.cnpq.br/0740745292365000>

E-mail: kelly.kato@ufvjm.edu.br

Ana Paula Rodrigues

Doutora- Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas – Universidade Estadual
Paulista - Julio de Mesquita Filho / Professora do Departamento de Farmácia -
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

<http://lattes.cnpq.br/8041873105843505>

E-mail: anapaula.rodrigues@ufvjm.edu.br

***autor para correspondência**

Resumo: Este trabalho teve o objetivo de realizar estudo fitoquímico e avaliar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e de *Croton antisiphiliticus*. Foram realizadas a prospecção fitoquímica clássica, a quantificação do teor de compostos fenólicos totais, de flavonoides e os ensaios da redução dos radicais DPPH e ABTS. Frações diclorometânica e hexânica dos extratos foram submetidas a análise por CG-EM e a fração hidroalcoólica foi analisada por CLAE-UV-DAD. Como resultado da prospecção fitoquímica observou-se flavonoides, taninos, esteroides e triterpenos nos extratos das duas plantas, além de alcaloides no extrato de *C. antisiphiliticus*. Os dois extratos apresentaram baixos teores de compostos fenólicos e de flavonoides, e portanto, baixa captura dos radicais DPPH e ABTS: *A. dasycarpum* (114,85 EAG/ g de extrato; 9,28 EQ/g de extrato; DPPH- EC₅₀ de 619,14; ABTS- EC₅₀ de 3097,03); *C. antisiphiliticus* (102,85 EAG/ g de extrato; 10,31 EQ/g de extrato; DPPH- EC₅₀ de 1110,93; ABTS- EC₅₀ de 8919,57). Na CG-EM para *A. dasycarpum* foram identificados o flavonóide Genkvanina e os triterpenos Lupeol e seu Acetato, dentre outros metabólitos e para *C. antisiphiliticus* foram identificados alguns metabólitos, como o Acetato de Lupeol e o γ -Sitosterol. Foi confirmada a presença de flavonoides nos extratos através da análise por CLAE-UV-DAD. Os extratos analisados apresentam um baixo potencial antioxidante, porém foram identificados metabólitos com potencial de atividade biológica. Existe a necessidade de mais estudos com o extrato etanólico das folhas desses vegetais para explorar o potencial antioxidante utilizando-se outros modelos experimentais.

Palavras-chave: Atividade Antioxidante. Plantas Nativas. Triagem Fitoquímica.

Introdução

Diversas plantas nativas do cerrado são utilizadas com fins terapêuticos de maneira empírica. No entanto, a maioria das espécies necessita de estudos científicos para avaliação fitoquímica, farmacológica e determinação das potenciais atividades biológicas, tais como atividades herbicida, inseticida, antioxidante, dentre outras. Dentre essas espécies, destacam-se duas: (I) *Acosmium dasycarpum* (Vogel) Yakovlev (Fabaceae), conhecida como “unha-d’-anta”, “pau-para-tudo” e “perobinha do campo”, sendo utilizada na medicina popular como tranquilizante, hipotensor, diurético, para doenças de pele, verminoses e dores estomacais (ROCHA *et al.*, 1980; TREVISAN *et al.*, 2008; SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2009); e (II) *Croton antisiphiliticus* Mart. (Euphorbiaceae), que tem os nomes populares de “pé-de-perdiz” e “velame”, sendo aplicada no tratamento de inflamações, lesões ulcerativas, eczemas, reumatismos e infecções sexualmente transmissíveis como a

sífilis (SIQUEIRA, 2009; PEREIRA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2013; DOS REIS *et al.*, 2014).

Estudos realizados com extratos de *A. dasycarpum* indicaram a presença de alcaloides, esteroides, flavonoides, saponinas, taninos e triterpenos (PARIZOTTO, 2003; TREVISAN *et al.*, 2008; SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019) e relataram as atividades analgésica, antiúlcera, depressora do sistema nervoso central, antioxidante e antimicrobiana (ROCHA *et al.*, 1980; PARIZOTTO, 2003; SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2009).

Extratos de *C. antisyphiliticus* apresentaram atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, cicatrizante, citotóxica, antigenotóxica e antioxidante em pesquisas anteriores (SIQUEIRA, 2009; FERNANDES *et al.*, 2013; DOS REIS *et al.*, 2014; BRAGA *et al.*, 2000; MAGALHÃES, MOREIRA, NDIAYE, 2010; DA SILVA *et al.*, 2020). Na literatura há relatos da presença de alcaloides, esteroides, flavonoides, terpenos e xantonas em extratos da planta (MAGALHÃES, MOREIRA, NDIAYE, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2020).

Tem-se observado que diversas atividades biológicas de produtos de origem vegetal são avaliadas com o objetivo de confirmar o seu uso popular ou com o intuito de investigar uma nova atividade de seus derivados (extratos, moléculas puras). Dentre as atividades biológicas pesquisadas merece destaque a antioxidante. O interesse nessa atividade biológica é devido, em parte, à participação de espécies radicais em processos patológicos e no envelhecimento (PEREIRA & CARDOSO, 2012). Moléculas com atividade antioxidante podem servir para prevenção ou redução de danos celulares e teciduais causados pelos radicais nos processos biológicos e patológicos (CUMPSTEY & FEELISCH, 2017). Além do emprego na área terapêutica, os agentes antioxidantes são amplamente utilizados em produtos das indústrias farmacêutica, de alimentos e de cosméticos (SILVA *et al.*, 2010; CHERUBIM *et al.*, 2020).

Assim, o objetivo deste trabalho foi contribuir para a produção de conhecimento científico complementar sobre espécies utilizadas na medicina popular da região, avaliando o potencial antioxidante e o perfil fitoquímico de *A. dasycarpum* e *C. antisyphiliticus*

Metodologia

A atividade de pesquisa foi registrada no SisGen (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) sob o número A66F124.

Material vegetal

Folhas das duas espécies vegetais silvestres foram coletadas em área de Cerrado para preparação de extratos e materiais de ambas foram coletados para herborização, preparação de exsicatas e identificação taxonômica pelo Herbário Dendrológico Jeanini Felfili (HDJF), onde as exsicatas estão depositadas.

A. dasycarpum foi coletada no Sítio Gangorras, distrito de Planalto de Minas, município de Diamantina, Minas Gerais, Brasil (Lat: 17°39'00" Sul, Long: 43°20'00" Oeste); a exsicata possui número de registro HDJF1147.

C. antisiphiliticus foi coletada no município de São Gonçalo do Rio Preto, Minas Gerais, Brasil (Lat: 18°00'46" Sul, Long: 43°38'06" Oeste); exsicata com registro HDJF4639.

Preparação dos extratos

As folhas das duas espécies foram dessecadas em estufa de ar circulante à temperatura de 36°C, por quinze dias. Em seguida foram pulverizadas em moinho de facas.

A droga vegetal obtida de cada uma das espécies foi extraída com álcool etílico absoluto (PA) na proporção de 2:1 (droga bruta: álcool), por meio de maceração exaustiva, a temperatura ambiente. Os extratos etanólicos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo a temperatura de 40-42°C.

Estudo fitoquímico - Triagem fitoquímica

Amostras dos extratos etanólicos das folhas de *A. dasycarpum* e de *C. antisiphiliticus* foram submetidas a prospecção fitoquímica clássica, conforme descrito na literatura (FARNSWORTH, 1966; COSTA, 1982; MATOS, 1988), com o objetivo de detectar as principais classes de metabólitos secundários: taninos, alcaloides, antocianinas, antracenosídeos, flavonoides, esteroides, triterpenos e cumarinas.

Estudo fitoquímico - Quantificação de compostos fenólicos totais

A quantificação de compostos fenólicos nos extratos vegetais foi baseada na metodologia clássica de Folin-Ciocalteu (SINGLETON, ORTHOFER, LAMUELA-RAVENTOS, 1999). Foi utilizado o ácido gálico como padrão (Isofar®). As concentrações dos extratos e do padrão utilizadas foram 80, 200, 400, 600, 800 e 1000 µg/mL. Em microplaca de 96 poços de fundo chato (Globo Plast®) foram colocados 12,5 µL das diluições dos extratos e do padrão, preparadas em metanol. Em seguida, foram adicionados 12,5 µL do reagente de Folin- Ciocalteu (Dinâmica®) e 100 µL de água Mili-Q (pH=7,0). A microplaca foi submetida a agitação seguida de repouso por 5 min., sendo adicionados 125 µL de carbonato de sódio (1M). As microplacas foram incubadas ao abrigo da luz por 90 min. Em seguida foi feita a leitura da absorbância, a 750 nm, em leitor de microplacas (SpectraMax®, Paradigm Molecular Devices). O metanol foi utilizado como branco. Uma curva analítica foi obtida a partir das concentrações do padrão ácido gálico x absorbâncias e a equação da reta resultante foi utilizada para converter as absorbâncias dos extratos em equivalentes de ácido gálico (EAG/g de extrato). O ensaio foi realizado em triplicata.

A fim de observar se a absorbância dos extratos causaria interferências no ensaio, pipetou-se 250 µL de cada concentração dos extratos (solução em metanol) na microplaca e procedeu-se a leitura no comprimento de onda de 750 nm.

Estudo fitoquímico - Quantificação de flavonoides

A quantificação de flavonoides foi realizada baseada em metodologia previamente descrita na literatura (PEIXOTO *et al.*, 2012). Os extratos foram analisados nas concentrações de 50, 100, 250, 350, 450, 550 e 650 µg/mL (soluções em metanol). O padrão quercetina, diluído em metanol, foi utilizado nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100 e 150 µg/mL. As soluções (125 µL) foram adicionadas em microplaca de 96 poços e adicionou-se 125 µL de cloreto de alumínio a 2%, com agitação por 10 minutos. As microplacas foram incubadas ao abrigo da luz por 10 minutos. A absorbância das amostra foi obtida em leitor de microplacas (SpectraMax®, Paradigm Molecular Devices) a 420 nm. O metanol foi utilizado como branco. Foi elaborada a curva analítica com os resultados do

flavonoide (concentrações x absorbâncias) e a partir da equação da reta obtida foram convertidas as absorbâncias dos extratos em equivalentes de quercetina (EQ/g de extrato). O ensaio foi realizado em triplicata.

Previamente ao ensaio, os extratos foram analisados por espectrofotometria UV-Vis (varredura) para observar se o $\lambda = 420$ nm utilizado no ensaio de quantificação de flavonoides não sofreria interferências de constituintes dos extratos que absorvam neste comprimento de onda.

Estudo fitoquímico - Fracionamento dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos foram fracionados a fim de realizar análises cromatográficas das frações através de cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-EM) e de cromatografia líquida de alta eficiência-ultravioleta-visível-detector por arranjo de diodos (CLAE-UV-Vis-DAD).

Os extratos brutos foram diluídos em metanol: água (3:1), e submetidos a partição líquido-líquido com hexano e, em seguida, com diclorometano. Foram obtidas, para cada extrato, três frações: hexânica, diclorometânica e hidroalcoólica. As frações hexânicas e diclorometânicas foram concentradas por rotaevaporação e armazenadas em dessecador até completa evaporação dos solventes orgânicos, sendo, posteriormente analisadas por CG-EM. As frações hidroalcoólicas foram concentradas em rotaevaporador e em seguida liofilizadas, com posterior análise por CLAE-UV-Vis-DAD.

Estudo fitoquímico - Análises cromatográficas

As análises cromatográficas das frações hexânica e diclorometânica obtidas a partir do extrato etanólico de cada planta foram feitas em cromatógrafo Shimadzu® modelo QP2010 equipado com coluna capilar de sílica fundida RTx-5ms (Restek Co. Bellefonte, PA, USA), apresentando 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μ m de espessura do filme. As condições analíticas foram: gás Hélio, com velocidade linear de 43,2cm/s, pressão de 86,7 kPa; injeção feita no modo split (1:5), com temperatura do injetor a 260°C; a temperatura inicial de análise foi de 60°C, aumentando 4°C/min e permanecendo a 320°C por 25 minutos. O espectrômetro de massas foi operado no modo de ionização eletrônica a 70 eV e com varredura de m/z de 35 a 600 Da. A interface foi mantida a 320°C e a fonte de

íons a 250°C. A quantificação dos componentes das amostras foi determinada pela área relativa dos picos (%). Para a proposta de identificação de componentes das amostras foram realizados: estudos dos espectros de massas obtidos experimentalmente e comparação destes com os espectros das espectrotescas NIST11, WILEY7 e FFNSC1.3; e foi calculado o IRR (Índice de Retenção Relativo), de acordo com a equação de Van den Dool-Kratz (VAN DEN DOOL & KRATZ, 1963). Para os cálculos, foi obtido um cromatograma com uma série homóloga de hidrocarbonetos alifáticos (C₉-C₄₀) (Alltech®), nas mesmas condições cromatográficas utilizadas nas análises das amostras.

As frações hidroalcoólicas das duas espécies vegetais foram analisadas em cromatógrafo líquido (LCMS2020 SHIMADZU®) com Detector de Arranjo de Diodos (SPD-M20A SHIMADZU®). Foi utilizada para análise coluna analítica Agilent® 5-HC LC-18 (250 x 4,6 mm) com filme de revestimento de 5 µm de espessura, com sistema de pré-coluna modelo KJO-4282 (Phenomenex®). A fase móvel foi constituída por água (solvente A) e acetonitrila grau HPLC (solvente B). Os solventes foram filtrados previamente (sistema Milli-Q - Millipore Corporation®). As amostras diluídas foram submetidas a filtros seringa Millipore com 13mm de diâmetro com membrana de Nylon HN 0.45µm Millex®. As condições analíticas foram: fluxo de 1 mL/min, temperatura ambiente, detecção UV-Vis 200~700 nm, o volume de injeção foi de 20 µL. O gradiente de eluição da fase móvel para *A. dasycarpum* foi: 10(A):90(B), 0-5 min; 30(A):70(B), 5-10 min; 50(A):50(B), 10-15 min; 90(A):10(B), 15-20 min; 100(A):0(B), 20-25 min. Para a análise da amostra de *C. antisiphiliticus*, o gradiente de eluição da fase móvel foi: 100(A):0(B), 0-2 min; 90(A):10(B), 2-5 min; 70(A):30(B), 5-10 min; 50(A):50(B), 10-15 min; 10(A):90(B), 15-20 min; 100(A):0(B), 20-25 min.

Ensaio Antioxidantes - Ensaio para a captura do Radical DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

O ensaio foi realizado com base na literatura (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006) e os testes foram conduzidos em ambiente escuro, devido à fotossensibilidade do radical. O ácido gálico foi utilizado como padrão nas concentrações: 5, 10, 18, 25, 50 µg/mL em metanol. As concentrações dos extratos de *A. dasycarpum* e de *C. antisiphiliticus* foram: 50, 100, 350, 550 e 650 µg/mL, ambos diluídos em metanol.

Em microplacas (Globo Plast®) foram pipetados 6 µL de cada solução dos extratos e do padrão ácido gálico com adição de 244 µL da solução metanólica do radical DPPH (Aldrich®) (60µM) e procedeu-se a incubação por 30 minutos ao abrigo da luz e à temperatura ambiente. As leituras das absorbâncias foram realizadas em leitor de microplacas (SpectraMax®, Paradigm Molecular Devices) a 515 nm. O metanol foi utilizado como branco. Os resultados da absorbância foram convertidos em Porcentagem de Inibição de acordo com a equação:

$$\text{Porcentagem de Inibição (\%)} = [(Ac - Aam) / Ac] \times 100$$

Onde: Ac = absorbância do padrão de ácido gálico

Aam = absorbância da amostra

Através dos gráficos de porcentagem de inibição versus concentração das amostras, por regressão linear, obteve-se a EC₅₀ (Concentração Eficiente para redução de 50% do radical DPPH) para cada um dos extratos e para o padrão ácido gálico.

Ensaio Antioxidantes - Ensaio para a captura do Radical ABTS - 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)

O ensaio baseou-se na metodologia descrita por Pellegrini e colaboradores (1999) e foi realizado em ambiente escuro, devido à reatividade do radical em presença de luz. Em 5 mL da solução aquosa de ABTS (Aldrich®) (7 mM) adicionou-se 88 µL de solução de K₂S₂O₈ (140 mM), a mistura foi mantida ao abrigo da luz e a temperatura ambiente por 16 horas. Em seguida, a mistura foi diluída em álcool etílico (PA) até obter absorbância de 0,7± 0,001 nm no comprimento de onda de 734 nm. As concentrações do padrão ácido gálico utilizadas foram: 25, 50, 100, 150, 450 µg/mL. As concentrações dos extratos foram: 50, 100, 250, 350, 450, 550 µg/mL. Em microplacas (Globo Plast®) foram pipetados 2,5 µL de cada solução dos extratos e do padrão ácido gálico (todos em solução etanólica), sendo então adicionados 247,5 µL do radical ABTS, e deixando em repouso por 6 minutos ao abrigo da luz. Foi utilizado etanol como branco. A leitura foi realizada a 734 nm em leitor de microplacas (SpectraMax®, Paradigm Molecular Devices). Os resultados da absorbância foram convertidos em Porcentagem de Inibição utilizando a mesma equação indicada para o ensaio com DPPH. As EC₅₀ (Concentração Eficiente para

redução de 50% do radical ABTS) dos extratos e do padrão ácido gálico foram obtidas por regressão linear.

Ensaio Antioxidante - Absorção dos extratos

Foi realizada uma varredura ($\lambda = 230$ a 1000 nm) com os extratos em todas as concentrações para verificar o comportamento de absorção dos extratos nos comprimentos de onda utilizados nos ensaios com DPPH ($\lambda = 515$ nm) e ABTS ($\lambda = 734$ nm). Assim, foi observado que a absorção dos extratos foi irrelevante, garantindo que os componentes do extrato não interfeririam nas análises. Os testes foram realizados com $250 \mu\text{L}$ de cada concentração dos extratos em microplacas (Globo Plast®) e as leituras foram realizadas em leitor de microplacas (SpectraMax®, Paradigm Molecular Devices).

Ensaio Antioxidante - Análise Estatística

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram obtidos como a média $\pm$ desvio padrão. Para avaliar as diferenças entre as médias foi utilizada análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O *software* utilizado foi o Graphpad Prism versão 8.0.

Resultados e Discussão

Na Tabela 1 estão representados os resultados da triagem fitoquímica clássica realizada com os extratos etanólicos brutos das duas espécies vegetais.

As fases hexânica e diclorometânica obtidas a partir da partição dos extratos etanólicos das folhas de *A. dasycarpum* e *C. antisiphiliticus* foram analisadas por CG-EM e a proposta de identificação dos constituintes encontrados nas amostras está apresentada na Tabela 2. Alguns constituintes das fases hexânicas e diclorometânicas não puderam ser identificados, devido à inexistência de semelhanças espectrais e de incompatibilidades de índice de retenção relativa (IRR), mediante comparação com espectros das espectrotes e com a literatura (ADAMS, 2001).

Tabela 1. Resultados da triagem fitoquímica clássica realizada com extratos etanólicos brutos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e *Croton antisiphiliticus*.

Triagem fitoquímica clássica		Extrato etanólico bruto das folhas	
Classe de metabólitos secundários	Reação empregada	<i>Acosmium dasycarpum</i>	<i>Croton antisiphiliticus</i>
Alcalóides	Mayer	(-)	(+)
	Dragendorff	(-)	(+)
Antracenosídeos	Borntrager	(-)	(-)
Cumarinas	CCDC- agente revelador KOH + radiação UV (255 nm)	(-)	(-)
Flavonóides	Shinoda	(+)	(+)
Esteróides e Triterpenos	Liebermann-Buchard	(+)	(+)
Saponinas	Teste afrogênico	(-)	(-)
Taninos	Gelatina 2,5%	(+)	(+)
	Cloreto férrico 2%	(+) coloração azul	(+) coloração verde

(-) ausência de coloração característica ou ausência da formação de precipitado; (+) coloração característica ou formação de precipitado; CCDC: cromatografia em camada delgada comparativa

Destacam-se as presenças dos triterpenos Lupeol e Acetato de Lupeol e do flavonóide Genkvanina na fase diclorometânica de *A. dasycarpum* e de triterpeno (Acetato de Lupeol) e esteroide (γ -Sitosterol) respectivamente nas fases hexânica e diclorometânica de *C. antisiphiliticus*.

Nas análises por CLAE-UV-DAD das fases hidroalcoólicas dos extratos etanólicos de *A. dasycarpum* e *C. antisiphiliticus*, a presença de flavonoides foi confirmada através da observação dos espectros de UV, que apresentaram bandas de absorção características de flavonoides: a banda II com absorção entre λ 240-

285 nm e a banda I com máximo de absorção entre λ 300-400 nm (SANTI *et al.*, 2014). Nessas análises por CLAE-UV-DAD não foram evidenciadas a presença de outras classes de metabólitos secundários.

Os dados encontrados nas análises cromatográficas confirmam os resultados positivos para flavonoides e triterpenos/ esteroides observados na triagem fitoquímica clássica.

Os resultados do estudo fitoquímico das duas plantas medicinais estão condizentes com os dados da literatura para essas espécies e seus gêneros. Já foi descrita a presença de flavonoides, taninos e terpenoides na espécie *A. dasycarpum*. Diferenças na composição química de extratos vegetais de uma mesma espécie botânica podem ocorrer devido a diversos fatores que podem interferir nas concentrações dos metabólitos secundários (GOBBO-NETO & LOPES, 2007), tais como, fatores ambientais aos quais as plantas estão expostas, diferentes locais de obtenção das amostras, diferenças genéticas e ontogênicas entre os espécimes estudados, épocas diferentes de coleta, tipo de solvente extrator e método de extração utilizados, o que pode explicar, em parte, a não detecção de alcaloides e saponinas, que foram descritas em estudos anteriores (PARIZOTTO, 2003; TREVISAN *et al.*, 2008; SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2015; RODRIGUES *et al.*, 2019). Por outro lado, as reações para detecção de alcaloides podem não ser tão sensíveis, especialmente quando os alcaloides estão em baixas concentrações nos extratos. Alcaloides, esteroides, flavonoides e terpenos já foram descritos em extratos de *C. antysiphiliticus*, porém, foi detectada a presença de taninos, que ainda não tinha sido descrita para a espécie (MAGALHÃES, MOREIRA, NDIAYE, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012; FERNANDES *et al.*, 2013; DA SILVA *et al.*, 2020). Alcaloides, flavonoides, taninos, terpenos e esteroides encontrados nos extratos são classes de metabólitos secundários que apresentam inúmeras atividades biológicas (KABERA, SEMANA, MUSSA, 2014) e a identificação da presença de lupeol, acetato de lupeol e genkvanina nos produtos vegetais avaliados pode explicar, em parte, algumas atividades terapêuticas relatadas para essas espécies vegetais. Especialmente a genkvanina, o lupeol e seu acetato apresentam atividade anti-inflamatória comprovada (LUCETTI *et al.*, 2010; SIDDIQUE & SALEEM, 2011; GAO *et al.*, 2014).

Tabela 2. Proposta de dados qualitativos e quantitativos a partir de análise por cromatografia gasosa-espectrometria de massas dos constituintes presentes nas fases hexânicas e diclorometânicas obtidas por partição dos extratos etanólicos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e das folhas de *Croton antisiphiliticus*.

Acosmium dasycarpum

FASE HEXÂNICA				
TR (min)	Área do pico (%)	IS	Constituinte proposto	IRR experimental
20,71	0,64	84	Ácido pentanóico	875
24,22	1,80	75	Ácido heptanóico	1073
43,14	2,01	89	Adipato de bis(2-etilhexilo)	2414

FASE DICLOROMETÂNICA				
TR (min)	Área do pico (%)	IS	Constituinte proposto	IRR experimental
51,97	0,94	81	Genkvanina	2602
59,79	0,44	85	Lupeol	2848
60,14	7,36	89	Acetato de Lupeol	2987

Croton antisiphiliticus

FASE HEXÂNICA				
TR (min)	Área do pico (%)	IS	Constituinte proposto	IRR experimental
43,15	7,19	94	Adipato de bis(2-etilhexilo)	2414
71,63	29,02	73	Acetato de Lupeol	2987

FASE DICLOROMETÂNICA				
TR (min)	Área do pico (%)	IS	Constituinte proposto	IRR experimental

27,44	1,86	85	Espatulenol	1536
30,65	6,03	97	Fitona	1841
43,15	17,25	94	Adipato de bis(2-etilhexilo)	2414
58,93	1,75	87	γ -Sitosterol	2731

TR: Tempo de Retenção, em minutos; IS: Índice de Similaridade; IRR: Índice de Retenção Relativa

Os resultados da quantificação de compostos fenólicos totais e de flavonoides nos extratos etanólicos das folhas de *A. dasycarpum* e de *C. antisiphiliticus* e os resultados dos ensaios de captura do radical DPPH e de redução do radical ABTS estão na Tabela 3.

Os extratos de *A. dasycarpum* e de *C. antisiphiliticus* apresentaram percentual de fenólicos totais de 11,48% e de 10,28%, respectivamente. A maior parte desses fenólicos não se trata de flavonoides, uma vez que foram detectados um teor de 0,92% em *A. dasycarpum* e de 1,03% no extrato de *C. antisiphiliticus*. Assim, outros compostos fenólicos, como os taninos que foram detectados na triagem fitoquímica, devem contribuir para a atividade antioxidante observada, mesmo que não seja uma atividade significativa (como evidenciado pelos EC₅₀). Existe uma relação direta entre a composição quantitativa de compostos fenólicos e a capacidade antioxidante de extratos, mas este não é o único fator determinante, pois a atividade antioxidante dos compostos fenólicos depende da sua estrutura química (LIMA & BEZERRA, 2012).

Os extratos analisados apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados ao padrão ácido gálico nos ensaios com radicais DPPH e ABTS. Devido ao fato dos extratos serem misturas complexas de substâncias, os mesmos foram testados quanto à atividade antioxidante em concentrações maiores que as do padrão ácido gálico, que apresenta grau de pureza elevado (mínimo de 99,0% - Isofar®). Os extratos apresentaram alto valor de EC₅₀ e baixo percentual de inibição dos radicais. De acordo com a literatura (MELO *et al.*, 2006), os extratos apresentaram fraca atividade antioxidante nesses ensaios, no entanto, o extrato de *A. dasycarpum* apresentou uma atividade levemente moderada para a inibição do radical DPPH.

Tabela 3. Teor de compostos fenólicos totais (EAG. 100g⁻¹ de extrato), teor de flavonoides totais (EQ.100 g⁻¹ de extrato) e resultados dos ensaios antioxidantes (captura dos radicais DPPH e ABTS) dos extratos etanólicos brutos das folhas de *Acosmium dasycarpum* e *Croton antisiphiliticus*.

	Extrato etanólico das folhas de <i>Acosmium dasycarpum</i>	Extrato etanólico das folhas de <i>Croton antisiphiliticus</i>	Ácido Gálico (padrão)
Quantidade de fenólicos totais (EAG. 100g ⁻¹ de extrato)* ± DP	114,8500 ± 0,0085	102,8500 ± 0,0049	_____
Quantidade de flavonoides totais (EQ. 100g ⁻¹ de extrato)** ± DP	9,2800 ± 0,0002	10,3100 ± 0,0048	_____
% de inibição do radical DPPH na maior concentração avaliada (µg/mL)*** ± DP	52,6400 ± 0,0001 [#]	29,2500 ± 0,0003 [#]	84,50 ± 0,00
EC ₅₀ inibição do radical DPPH (µg/mL)	619,14	1110,93	34,21
% de inibição do radical ABTS na maior concentração avaliada	11,77 ± 0,0001 [#]	8,98 ± 0,0003 [#]	72,00 ± 0,00

(µg/mL)**** ± DP			
EC ₅₀ inibição do radical ABTS (µg/mL)	3097,03	8919,57	273,05
ABTS: 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico); DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; DP: desvio padrão da média; EC₅₀: Concentração eficiente para a captura de 50% do radical * Equação da reta: $y=0,0032x + 0,0319$ (R^2 - coeficiente de correlação linear = 0,9990); onde: y= absorvância da amostra e x= concentração de equivalentes de ácido gálico (EAG) ** Equação da reta: $y=0,0156x + 0,0023$ (R^2 - coeficiente de correlação linear = 0,9999); onde: y= absorvância da amostra e x= concentração de equivalentes de quercetina (EQ) *** Extratos etanólicos de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> = 650 µg/mL; ácido gálico = 50 µg/mL **** Extratos etanólicos de <i>Acosmium dasycarpum</i> e de <i>Croton antisiphiliticus</i> = 550 µg/mL; ácido gálico = 450 µg/mL # Diferença estatisticamente significativa em relação ao padrão ácido gálico, ANOVA, Tukey com $n < 0,05$ ($n=3$, média ± DP).			

Este é o primeiro relato de estudo antioxidante com extratos etanólicos de folhas de *A. dasycarpum* e *C. antisiphiliticus* utilizando as metodologias ABTS e DPPH. Pesquisas com essas duas espécies vegetais envolvendo ensaio com DPPH já foram realizados indicando forte poder antioxidante, no entanto, foram realizados com extrato metanólico da casca de raízes de *A. dasycarpum* (SOUSA-JÚNIOR *et al.*, 2009) e com extrato metanólico de partes aéreas (folhas, casca e caule) de *C. antisiphiliticus* (DA SILVA *et al.*, 2020). Comparando este estudo com as pesquisas previamente publicadas, as diferenças nos resultados entre os ensaios com DPPH podem ser explicadas por algumas variáveis detectadas: diferentes locais de

obtenção e épocas de coleta dos materiais vegetais, diferentes partes das plantas avaliadas, extratos preparados com solventes distintos, o fato das amostras de vegetais serem de origem silvestre (o que pode aumentar a variação genética, bioquímica e ontogênica entre elas), dentre outras. Sabidamente, esses fatores interferem de forma qualitativa e quantitativa na composição química de extratos e, conseqüentemente, nas atividades biológicas apresentadas (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Conclusão

Conclui-se que os resultados confirmam a presença de compostos antioxidantes nos dois extratos. Porém, os resultados dos ensaios antioxidantes não foram significativos para os extratos avaliados, nas concentrações testadas e metodologias utilizadas. Dessa forma, outros estudos de atividade antioxidante, incluindo diferentes metodologias, como as *in vitro* envolvendo células, deverão ser conduzidos, uma vez que os ensaios empregados até o momento são ensaios químicos (redução de radicais).

Agradecimentos

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais pelo apoio financeiro (FAPEMIG: CDS-APQ-02459-15). Agradecimento especial ao Prof Dr Norberto Peporine Lopes do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP/USP) pela CG-EM..

Referências

- ADAMS, R. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Allured Publishing, Carol Stream, Illinois: 2001.
- BRAGA, F.C.; Wagner, H.; Lombardi, J.A.; Oliveira, A.B. Screening Brazilian plant species for *in vitro* inhibition of 5- lipoxygenase. **Phytomedicine**, v.6, n.6, p. 447–452. 2000.

- CHERUBIM, D.J.L.; MARTINS, C.V.B.; FARIÑA, L.O.; DE LUCCA, R.A.S. Polyphenols as natural antioxidants in cosmetics applications. **Journal of Cosmetic Dermatology**, v.19, n.1, p.33-37, Jan. 2020.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia v. III**. 2ª ed, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal: 1982.
- CUMPSTEY, A.; FEELISCH, M. Chapter 27 - Free Radicals in Inflammation. In: CAVAILLON, J.M.; SINGER, M. (Eds). **Inflammation: From Molecular and Cellular Mechanisms to the Clinic**. 1st ed. Wiley-Blackwell, 2017. pp. 695-726. <https://doi.org/10.1002/9783527692156.ch27>
- DA SILVA, R.M.G.; FIGUEIREDO, C.C.M.; GOMES, A.C.; FERREIRA, P.C.; GRANERO, F.O.; SANTIAGO, P.S.; SILVA, L.P. Antigenotoxic and antioxidant activity of the *Croton antispyphiliticus*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.92, suppl. 2, 2020.
- DOS REIS, G.O., VICENTE, G., DE CARVALHO, F.K., HELLER, M., MICKE, G.A., PIZZOLATTI, M.G., FRÖDE, T.S. *Croton antispyphiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacology**, v.22, n.2, p.115-126, 2014.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema Beta-Caroteno/Ácido Linoléico e Método de Seqüestro de Radicais DPPH.. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446–52, 2006.
- FARNSWORTH, N. Biological and phytochemical screening of plants. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.55, n.3, p.225-276, 1966.
- FERNANDES, V.C.; PEREIRA, S.I.V.; COPPEDE, J.; MARTINS, J.S.; RIZO, W.F.; BELEBONI, R.O.; MARINS, M.; PEREIRA, P.S.; PEREIRA, A.M.S.; FACHIN, A.L. The epimer of kaurenoic acid from *Croton antispyphiliticus* is cytotoxic toward B-16 and HeLa tumor cells through apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, v.12, n.2, p.1005-1011, 2013.
- GAO Y.; LIU F.; FANG L.; CAI R.; ZONG C.; QI Y. Genkwanin Inhibits Proinflammatory Mediators Mainly through the Regulation of miR-101/MKP-1/MAPK Pathway in LPS-Activated Macrophages. **PLOS ONE**, v.9, n.5, e96741. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096741>, May, 2014
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p. 374-381, 2007.
- KABERA, J.N.; SEMANA, E.; MUSSA, A.R.; HE,X. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n.7, p.377-392, Jul., 2014.

LIMA, F.O.; BEZERRA, A.S. Flavonoides e Radicais Livres. **Disciplinarum Scientia**, v.13, n.1, p. 111-124, 2012.

LUCETTI, D.L.; LUCETTI, E.C.P.; BANDEIRA, M.A.M.; VERAS, H.N.H. SILVA, A.H.; L.K.A.M.; LOPES, A.A.; ALVES, V.C.C.; SILVA, G.S.; BRITO, G.A.; VIANA, G.B. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. **Journal of Inflammation**, v. 7, n.60, <https://doi.org/10.1186/1476-9255-7-60>, Dec, 2010.

MAGALHÃES, J.S.; MOREIRA, R.P.; NDIAYE, E.A. Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Antibacteriana das Raízes de *Croton antisiphiliticus* Mart. In: 50º CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, Cuiabá (Mato Grosso). 2010. Disponível em <<http://www.abq.org.br/cbq/2010/trabalhos/7/7-317-8019.htm>>. Acesso em: 19 mar. 2021.

MATOS, F.A.J. **Introdução á fitoquímica experimental**. Ed. UFC, Fortaleza: 1988.

MELO, E.A.; MACIEL, M.I.S.; LIMA, V.L.A.G.; LEAL, F.L.L.; CAETANO, A.C.S.; NASCIMENTO, R.J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v,26, n.3, p. 639-644, jul.-set. 2006.

PARIZOTTO, C.A. **Contribuição ao estudo químico do cerne das raízes de *Acosmium dasycarpum* (Vog) Yakovlev**. 2003. 86f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, Mato Grosso, 2003.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; GOMES, T.L.B.; CARDOSO, K.C.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.4, p.586-591, 2012.

PELLEGRINI, N.; RE, R.; YANG, M.; EVANS, C. R. Screening of dietary carotenoids and carotenoid-rich fruit extracts for antioxidant activities applying 2,2'-azinobis-(3-ethylenebenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization assay. **Methods in Enzymology**, v.299, p.379-389, 1999.

PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.146-152, Nov. 2012.

PEREIRA, S.; TALEB-CONTINI, S.; COPPEDE, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANCA, S.; PEREIRA, A. M. An ent-Kaurane-type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, v.17, n.8, p.8851-8858, 2012.

- ROCHA, R.F.; LAPA, A.J.; VALE, J.R.; BRAZ-FILHO, R.; SILVA, S.B. Pharmacological activity of crude and purified extracts from *Acosmium dasycarpum* (Vog) Yakvol. **Ciência e Cultura**, v.33, p.158-162, 1980.
- RODRIGUES, D.A.; PEREIRA, G.A.M.; SILVA, A.A.; SANTOS, M.H; DEMUNER, A.J.; OLIVEIRA, P.M. Phytochemical Profile of Pasture Weeds from the Brazilian Cerrado. **Revista Planta Daninha**, v.37, p. 1-10, 2019.
- SANTI, M.M.; SANCHES, F.S.; SILVA, J.F.M.; SANTOS, P.M.L. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n.2, p.256-261, 2014.
- SIDDIQUE, H.R.; SALEEM, M. Beneficial health effects of lupeol triterpene: A review of preclinical studies. **Life Sciences**, v.88, n.7–8, p. 285-293, Feb, 2011.
- SILVA, L.E.; SOUSA, P.T.; KAYSER, A.K.; SILVA, V.C.; DALL'ÓGLIO, E.L. Estudo químico das folhas de *Acosmium dasycarpum* (VOGEL) YAKOVLEV. **Revista Ciência e Natura**, v. 37, n. 37, 2015.
- SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S.; KOBLITZ, M.G.B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p. 669-681, Jul.-Sep., 2010.
- SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v.299, p.152-178, 1999.
- SIQUEIRA, V.L. **Avaliação da Atividade Cicatrizante do Extrato Etanólico da *Croton antisiphiliticus* em Feridas Cutâneas de Ratos**. 2019. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais, 2019.
- SOUSA-JÚNIOR, P.T.; DALL'OLGLIO, E.L.; SILVA, E.; FIGUEIREDO, U.S.; VIEIRA, P.C.; MACHADO, H.V.; SANTOS, L.G. Gênero *Acosmium*: composição química e potencial farmacológico. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.1, p. 150-157, 2009.
- TREVISAN, T.C.; SILVA, E.A.; DALL'OLGLIO, E.L.; DA SILVA, L.E.; SILVA VELOZO, E.D.; VIEIRA, P.C.; DE SOUSA JR., P.T. New quinolizidine and diazaadamantane alkaloids from *Acosmium dasycarpum* (Vog.) Yakovlev-Fabaceae. **Tetrahedron Letters**, v.49, n.44, p.6289-6292, 2008.
- VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-471, 1963.

Processo de Avaliação por Pares: (*Blind Review* - Análise do Texto Anônimo)

Revista Científica Vozes dos Vales - UFVJM - Minas Gerais - Brasil

www.ufvjm.edu.br/vozes

QUALIS/CAPES - LATINDEX: 22524

ISSN: 2238-6424