



ESTUDO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E FOTOPROTETOR DO EXTRATO DE *Spondias tuberosa*

Amanda Dias de Araújo^{1,3*}, Fernanda Granja da Silva Oliveira², Andréa Fradique Britto³, Alzira de Souza Maciel³, Meiga Von Liebg Borckmans³, Ana Lúcia do Espírito Santo³, Rosimery Carneiro da Silva de Queiroz³, Jacson Roberto Guedes da Silva Almeida², Alexandre Gomes da Silva³, Márcia Vanusa da Silva³, Maria Tereza dos Santos Correia³

¹Instituto Nacional do Semiárido; ²Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais UNIVASF; ³Departamento de Bioquímica UFPE, *amanda.araujo@insa.gov.br

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas para fins terapêuticos e curativos há milhares de anos por diferentes etnias (AGRA et al., 2007). Em países com rica biodiversidade e com conhecimentos populares bastante difundidos, como é o caso do Brasil, é elevado o uso de plantas medicinais para fins terapêuticos quando comparado com a utilização de medicamentos sintéticos industrializados, tanto na saúde pública quanto na prestação de serviços privados (ALVES, 2013).

Alguns pesquisadores sugerem que cerca de dois terços das espécies vegetais possuem valor medicinal, sendo o potencial antioxidante de grande relevância, pois podem reduzir o estresse oxidativo nas células, além de serem úteis no tratamento de diversas doenças, como problemas cardiovasculares, processos inflamatórios e até o câncer (KRISHNAIAH et al., 2011).

Recentemente há um aumento de câncer de pele e fotoenvelhecimento induzido pela radiação solar em todo o mundo, sendo o tipo de câncer mais frequente, considerado como um grande problema de saúde pública. Caracterizada como um fator genotóxico e potencialmente lesivo à pele, a radiação ultravioleta é dividida em três faixas de comprimento de onda: UVA (320-400 nm), UVB (290-320 nm) e UVC (290-100 nm), porém a importância clínica deve-se ao comprimento de onda UVA e UVB, visto que a radiação UVC é bloqueada pela camada de ozônio (PEREIRA, 2007). *Spondias tuberosa* pertencente à família Anacardiaceae, conhecida popularmente como umbuzeiro é uma planta endêmica da região Semiárida brasileira, adaptada a sobreviver e produzir sob condição de estresse hídrico. Popularmente, a casca do caule é utilizada para a lavagem de olhos infectados, também é usado como digestivo e laxativo (UCHÔA, et al 2015), há, porém, poucas informações científicas a respeito de sua eficácia e segurança de uso. Diante deste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar o teor de compostos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante e fotoprotetora do extrato acetato de etila obtido por ASE dos ramos de *Spondias tuberosa* (umbu).

MATERIAIS E MÉTODOS

A planta foi coletada no Parque Nacional do Catimbau, Pernambuco, Nordeste do Brasil. A identificação botânica foi realizada pela equipe do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e uma exsiccata foi depositada no herbário (nº 91090).

Para a preparação do extrato, os ramos foram secos numa estufa a 45 °C. O material foi triturado em moinho (Tecnal / Willye moinho / ET-650) para se obter um pó. Os extratos foram obtidos em um

extrator de solvente acelerada (ASE 350 Dionex). Foram utilizadas vinte gramas do pó que foram transferidos para as células do ASE e a extração foi realizada com acetato de etila e depois foram rotovaporados a 50 °C.

O conteúdo de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu de acordo com LI et al. (2008). Duzentos microlitros da amostra diluída foram adicionados a 1 ml de reagente diluído 1:10 de Folin-Ciocalteu. Após 4 min, 0,8 ml foi adicionada uma solução de carbonato de sódio (75 g / L). Após 2 h de incubação à temperatura ambiente, protegida da luz, foram lidas a absorvância de 765 nm em triplicata. O ácido gálico (0 - 500 mg / L) foi utilizado como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por grama de peso seco da amostra (mgEqAG/g)

A determinação de flavonoides segue a metodologia proposta pelo WOISKY e SALATINO (1998). Quinhentos microlitros da amostra diluída foram adicionados a 0,5 ml da solução de AlCl₃ a 2 % (w / v) em metanol. Após 30 minutos de incubação à temperatura ambiente, protegida da luz, foram lidas a uma absorvância de 420 nm. O ensaio foi realizado em triplicata. Os resultados foram expressos como mg de equivalentes de quercetina por grama de peso seco da amostra (mg EqQ/g).

A atividade antioxidante de sequestro do radical livre DPPH foi realizada de acordo com a BRAND-WILLIAMS et al. (1995), com algumas modificações. Uma solução de estoque de DPPH em metanol (200 µM) foi adicionalmente diluída em metanol para se obter a absorvância entre 0,6-0,7 a 517 nm, obtendo-se a solução de trabalho de DPPH. Quarenta microlitros de diferentes concentrações dos extratos (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25) foram misturados com solução de DPPH (250 mL) e após 30 minutos de incubação no escuro as absorvâncias foram lidas ao mesmo comprimento de onda mencionado acima. As medições foram realizadas em triplicatas e suas atividades de sequestro foram calculados com base no percentual de redução do DPPH.

Atividade antioxidante utilizando o ABTS foi realizada de acordo com UCHÔA et al. (2015). O ensaio de ABTS baseia-se na geração de cromóforo radical catiônico obtido a partir da oxidação de ABTS por persulfato de potássio. A reação de oxidação foi preparada com 7 mM solução de ABTS mais persulfato de potássio 140 mM (concentração final) e a mistura foi deixada no escuro à temperatura ambiente (23 °C - 25 °C) durante 12 - 16 h (tempo necessário para a formação de radicais) antes da sua utilização. A solução de ABTS^{•+} foi diluída em etanol até uma absorvância de 0,7 (± 0,02) lida a 734 nm. Para avaliar atividade antioxidante foi utilizado 0,3 ml do extrato misturado a 3 ml da solução de ABTS^{•+} e

após 6 minutos protegidas da luz foram lidas ao mesmo comprimento de onda acima mencionado. O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico) foi utilizado como padrão de referência. Os resultados foram expressos em TEAC (atividade antioxidante equivalente ao trolox) e porcentagem de inibição. Todas as determinações foram realizadas em triplicada.

A atividade fotoprotetora foi avaliada utilizando a leitura espectrofotométrica de soluções diluídas, de acordo com o Método de MANSUR et al. (1986). O extrato foi previamente seco em estufa a 40 °C por 60 minutos. Foram preparadas diluições com as concentrações de 5, 25, 50 e 100 mg/L. Varreduras de 290 a 320 nm, com intervalos de 5 nm foram realizadas. Foi utilizado um espectrofotômetro (Quimis®), com cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico para aquisição dos espectros. Os cálculos foram realizados considerando os intervalos de λ determinados (Equação):

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot abs(\lambda)$$

Os valores de EE (λ) e I(λ) utilizados para o cálculo do FPS (Fator de Proteção Solar) foram os mesmos usados da literatura. Aplicou-se o fator de diluição (Fd) para correção de equivalência dos FPS do extrato com os valores de referência, onde FC = fator de correção (10), EE(λ) = efeito eritemogênico da radiação; I(λ) = intensidade do sol; abs (λ) = leitura espectrofotométrica da absorbância da solução do filtro solar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra o resultado da quantificação dos compostos fenólicos totais e flavonoides no extrato, a qual podemos observar que a espécie possui grandes quantidades desses metabolitos secundários. De acordo com OMENA et al., 2012 os compostos fenólicos têm sido relacionados por ter múltiplos efeitos biológicos, incluindo atividade antioxidante e fotoprotetora.

Tabela 1 - Conteúdo de Compostos fenólicos totais e flavonoides no extrato dos ramos de *Spondias tuberosa*

CFT	CF
83,88 ± 0,2	11,24 ± 2,0

A atividade antioxidante utilizando o método DPPH é mostrado na tabela 2. De acordo com o resultado podemos observar que o extrato possui atividade antioxidante frente ao radical DPPH em todas as concentrações testadas, chegando a um sequestro de 89,13 ± 0,4 % numa concentração de 1000 µg/ml.

Tabela 2 - Atividade antioxidante pelo método DPPH do extrato dos ramos de *Spondias tuberosa*

Concentração µg/mL	Porcentagem de SRL DPPH
1000	89,13 ± 0,4
500	88,79 ± 0,0
250	79,23 ± 0,1
125	77,16 ± 0,0
62,5	74,03 ± 0,6
31,25	42,35 ± 1,8

Legenda: SRL= Sequestro de radical livre.

Na atividade antioxidante, frente ao radical ABTS, foi obtido um TEAC de 1457,778 ± 7,10 µM trolox e porcentagem de inibição = 68,92 % ± 0,7 % após 120 minutos. E o fator de proteção apresentado pelo extrato foi de FPS: 15,50 ± 0,41. De acordo com a

ANVISA (Brasil, 2012), para um extrato ser considerado fotoprotetor, ele deve apresentar um FPS de no mínimo 6, logo podemos observar o grande potencial fotoprotetor do extrato, que provavelmente se deve aos compostos fenólicos, em especial aos flavonoides, além da expressiva capacidade antioxidante.

CONCLUSÕES

O presente estudo com o extrato acetato de etila dos ramos de *Spondias tuberosa* demonstra que a espécie possui grande potencial antioxidante e fotoprotetor, podendo servir de base para o desenvolvimento e utilização de um fotoprotetor natural, seguro e de baixo custo a população. São necessários estudos fitoquímicos, espectroscópicos e farmacotécnicos mais aprofundados, para uma melhor discussão em relação ao potencial biotecnológico da espécie.

REFERÊNCIAS

- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.17, p.114-140, 2007.
- ALVES, L.F. Production of Phytotherapeutics in Brazil: History, Problems and Perspectives. *Revista Virtual de Química*, v.5, p.450-513, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, v.28, p.25-30, 1995.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 30 de 1 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, Brasília, 2012.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Processing*, v.89, p. 217-223, 2011.
- LI, A.B.; WONGA, C.C.; KA-WING, C.; CHEN, F. Antioxidant Properties in Vitro and Total Phenolic Contents in Methanol Extracts from Medicinal Plants. *Swiss Society of Food Science and Technology*, v. 41, p. 385-390, 2008.
- LIU, H.; MOU, Y.; ZHAO, J.; WANG, J.; ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, D.; H. J.; YU, Z.; YANG, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules*, vol. 15, p. 7933-7945, 2010.
- LU, C.L.; ZHU, W.; WANG, M.; XU, X.J.; LU, C.J. Antioxidant and anti-inflammatory activities of phenolic-enriched extracts of *Smilax glabra*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2014, p.1-8, 2014.
- MANSUR, J.S.; BREDER, M.V.R.; MANSUR, M.C.A.; AZULAY, R.D. Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v.61, p.121-124, 1986.
- OLIVEIRA, G.G.; CARNEVALE-NETO, F.; DEMARQUE, D.P.; PEREIRA-JÚNIOR, J.A.S.; PEIXOTO-FILHO, R.C.S.; MELO, S.J.; ALMEIDA, J.R.G.S.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Dereplication of flavonoid glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by untargeted tandem mass spectrometry-based molecular networking. *Planta Medica*, v. 83, p. 636-646, 2017.
- OMENA, C.M.B.; VALENTIM, I.B.; GUEDES, G.S.; RABELO, L.A.; MANO, C.M.; BECHARA, J.H.; SAWARA, A.C.H.F.; TREVISAM, M.T.S.; COSTA, J.G.; FERREIRA, R.C.S.; SANT'ANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. "Antioxidant, anti-acetylcholinesterase and cytotoxic activities of ethanol extracts of peel, pulp and seeds of exotic Brazilian fruits", *Food Research International*, vol. 49, no. 1, pp. 334-344, 2012.
- PAULI, G. F.; KUCZKOWIAK, U.; NAHRSTEDT, A. Solvent effects in the structure dereplication of caffeoyl quinic acids. *Magnetic Resonance in Chemistry*, v. 37, p. 827-836, 1999.

- PEREIRA, B.K. Avaliação do efeito fotoprotetor de três extratos de plantas da antártica por diferentes modelos biológicos. 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.
- SIQUEIRA, E.M.S.; FÉLIX-SILVA, J.; ARAÚJO, L.M.L.; FERNANDES, J.M.; CABRAL, B.; GOMES, J.A.S.; ROQUE, A.A.; TOMAZ, J.C.; LOPES, N.P.; FERNANDES-PEDROSA, M.F.; GIORDANI, R.B.; ZUCOLOTTI, S.M. "Spondias tuberosa (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC-MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity", *Biomedical Chromatography*, vol. 30, no. 10, pp. 1656-1665, 2016.
- UCHÔA, A.D.A.; OLIVEIRA, W.F.; PEREIRA, A.P.C.; SILVA, A.G.; CORDEIRO, B.M.P.C. MALAFAIA, C.B.; ALMEIDA, C.M.A.; SILVA, N.H.; ALBUQUERQUE, J.F.C.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Antioxidant activity and phytochemical profile of *Spondias tuberosa* Arruda leaves extracts. *American Journal of Plant Sciences*, vol. 6, nº. 19, p. 3038-3044, 2015.
- WOISKY, R.G., SALATINO, A., Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *Journal of Apicultural Research*, nº 37, p 99-105, 1998.
- WOLFENDER, J-L.; WARIDEL, P.; NDJOKO, K.; HOBBY, K. R.; MAJOR, H. J.; HOSTETTMANN, K. Evaluation of Q-ToF-MS/MS and multiple stage IT-MSn for the dereplication of flavonoids and related compounds in crude plant extracts. *Analysis*, v. 28, p. 895-906, 2000.
- YU, D.; DUAN, Y.; BAO, Y.; WEI, C.; AN, L. Isoflavonoids from *Astragalus mongholicus* protect PC12 cells from toxicity induced by L-glutamate. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 98, p. 89-94, 2005.
- ZHANG, Q.F.; ZHANG, Z.R.; CHEUNG, H.Y. Antioxidant activity of rhizoma *Smilacis glabrae* extracts and its key constituent-astilbin. *Food Chemistry*, v. 115, p. 297-303, 2009.
- ZHU, L.; CHEN, J.; TAN, J.; LIU, X.; WANG, B. Flavonoids from *Agrimonia pilosa* Ledeb: Free radical scavenging and DNA oxidative damage protection activities and analysis of bioactivity-structure relationship based on molecular and electronic structures. *Molecules*, v. 22, 195, p. 1-11, 2017.