

ESTUDO FITOQUIMICO DE *Aniba parviflora* E SEU POTENCIAL ANTIOXIDANTE

S. A. H. PAREDES¹, L. T. BATISTA², S. DUVOISIN, Jr.¹ e P. M. ALBUQUERQUE^{1,2}

¹ Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Tecnologia, Engenharia Química

² Universidade do Estado do Amazonas, Escola Superior de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia
E-mail para contato: sheylahp@hotmail.com

RESUMO – As plantas são fontes naturais de antioxidantes, compostos que podem ser usados na produção de matérias-primas para a indústria de alimentos. Neste trabalho realizou-se uma triagem fitoquímica visando conhecer os constituintes da espécie amazônica *Aniba parviflora* (macacaporanga) e analisar suas propriedades antioxidantes, na busca por novas fontes destes compostos. Para a determinação da atividade antioxidante, avaliou-se a capacidade sequestradora do radical livre DPPH, calculando-se a concentração efetiva (CE₅₀). Os resultados indicaram a presença de flavonóides, saponinas e taninos nos extratos brutos etanólicos de folhas e galhos, bem como nas fases particionadas (hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica). Na avaliação da capacidade antioxidante a fase hidroalcoólica de galhos apresentou o melhor resultado (CE₅₀ = 275,0 µg/mL), cerca de 2 vezes menos eficiente que o ácido ascórbico (CE₅₀ = 113,3 µg/mL), utilizado como padrão. Verifica-se, portanto, o potencial do uso dessa espécie na obtenção de antioxidantes.

1. INTRODUÇÃO

As plantas da família Lauraceae têm como característica o lenho e as folhas aromáticas. Existem aproximadamente 49 gêneros com 2.500 espécies, aparecendo principalmente nos trópicos e subtropicais do sudeste asiático até o continente americano (Glimn-Lacy e Kaufman, 2006). As espécies do gênero *Aniba*, como o pau-rosa (*A. rosaeodora*), a casca preciosa (*A. canelilla*) e a macacaporanga (*A. parviflora*) são muito requisitadas pela indústria de perfumaria por serem produtoras de óleos essenciais. No entanto, para a obtenção desse produto, o extrativismo tradicional emprega a derrubada de toda a árvore e consequente redução das populações naturais destas espécies (May e Barata, 2004).

A *A. parviflora* é uma espécie nativa da Amazônia, bastante semelhante à *A. rosaeodora* da qual se extrai um óleo essencial que é altamente valioso, devido à grande quantidade de linalol. O óleo da *A. parviflora* pode ser obtido a partir de suas folhas e galhos, apresentando em média 35% de linalol e se caracteriza por um aroma forte e agradável. *A. parviflora* é usada em perfumaria, porém sua ocorrência é muito rara, o que restringe sua exploração (Marques, 2001).

Os organismos vivos estão constantemente sujeitos à ação do oxigênio e o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra estes processos oxidativos. A partir do início dos anos 80, o interesse em encontrar antioxidantes

naturais para o emprego em produtos alimentícios, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais têm sido restringidos devido ao seu potencial de toxicidade (Degáspari e Waszczynskyj, 2004).

Estudos têm revelado que algumas moléculas de origem vegetal possuem atividade antimutagênica, que pode estar relacionada com propriedades antioxidantes (Lambert et al., 2005; Wu et al., 2005). Compostos do metabolismo secundário vegetal como flavonóides e taninos, são importantes nas interações entre planta e seu ecossistema além de serem amplamente utilizados na indústria pelo seu potencial antioxidante (Mello e Santos, 2001).

Portanto, este trabalho teve com objetivo realizar uma triagem fitoquímica para conhecer os grupos químicos de extratos de folhas e galhos da espécie *Aniba parviflora* e analisar sua capacidade antioxidante.

2. METODOLOGIA

2.1. Preparação dos Extratos

As folhas e galhos finos de *A. parviflora* foram coletados na fazenda Experimental Curauá - PEMATEC, localizada no município de Santarém-PA, no período chuvoso. O material vegetal passou por um processo de secagem por 10 dias a temperatura ambiente e moagem em moinho de facas com tela de 3 mm. Foram separados 300 g de folhas e galhos separadamente, sendo macerados em etanol de cereais 92,8% a temperatura ambiente. A extração foi realizada por nove dias, renovando-se o solvente a cada 72 h (Silva, 2012).

O extrato etanólico foi rotaevaporado a 40°C para a retirada do solvente e assim foi obtido o extrato bruto de folhas e galhos. 10,0 g do extrato bruto resultante foram dissolvidos em etanol e água na proporção 1:3 e submetidos à partição líquido-líquido com os solventes, hexano, diclorometano e acetato de etila. As frações obtidas foram colocadas em um evaporador rotativo para a evaporação dos solventes e a fração hidroalcoólica foi liofilizada.

2.2. Triagem Fitoquímica

Utilizou-se a metodologia de Matos (2009). Para cada procedimento realizado foram preparadas soluções dos extratos e partições de folhas e galhos, diluindo-os em álcool etílico (0,5 mg/mL). Na Tabela 1 estão apresentadas substâncias que possuem os constituintes químicos testados, as quais foram utilizadas como padrão positivo nos ensaios qualitativos de triagem fitoquímica.

Tabela 1 – Padrões utilizados nos testes de triagem fitoquímica.

| Metabólitos | Padrões utilizados |
|-------------|-----------------------------|
| Alcalóides | Nicotina |
| Esteróides | Vitamina D |
| Flavonóides | Vinho tinto |
| Saponinas | Babosa (<i>Aloe vera</i>) |
| Taninos | Vinho tinto |

Alcalóides: Utilizou-se 3,00 mL de extrato etanólico em tubo de ensaio, acrescentou-se três gotas do reagente de Drangendorff para a observação da presença de precipitado.

Esteróides: Foi realizada a reação de Lieberman Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado), tomando 3,00 mL do extrato e misturando-o a 2,00 mL de clorofórmio. A solução foi filtrada gota a gota em um funil com algodão coberto com alguns decigramas de sulfato de sódio anidro. Em um tubo de ensaio, adicionou-se 1,00 mL de anidrido acético, agitando suavemente e acrescentaram-se três gotas de H₂SO₄ concentrado, observando o desenvolvimento das cores, azul seguido de verde, para esteroides livres.

Flavonóides: Foi realizado o teste de cianidina ou Shinoda (HCl concentrado e Mg), onde adiciona-se a 3,00 mL do extrato, aproximadamente 0,5 cm de magnésio em fita e 2,00 mL de ácido clorídrico concentrado. O fim da reação é determinado pelo término de efervescência e pode ser considerado positivo se houver o aparecimento da cor vermelha.

Além desse teste, apenas para as frações foi realizado o teste de alcalinização utilizando uma solução de NaOH a 2% adicionada gota a gota a 3,0 mL do extrato etanólico em um tubo de ensaio, até atingir um pH de 11, observando-se a mudança de cor. O teste é utilizado para identificar a presença de flavonas, flavonóis e xantonas, caso a cor encontrada pela adição da base seja amarela, e flavonóis, caso a cor varie de vermelho a laranja.

Saponinas: Foram misturados 2,00 mL de clorofórmio junto a 3,00 mL de extrato etanólico e 5,00 mL de água destilada. Foi separada a fração aquosa e depois agitada, observando-se a possível formação de espuma.

Taninos: A 3,00 mL de extrato etanólico adicionaram-se três gotas de FeCl₃, agitando-se fortemente, e observando qualquer escurecimento da cor inicial.

2.3. Atividade Antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante, avaliou-se a capacidade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH•), de coloração púrpura que possui absorção máxima em 517 nm. A partir do decréscimo da absorbância determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres (Silva, 2012).

A solução de DPPH• foi preparada na concentração 0,06 M. A solução foi preparada no mesmo dia da análise e protegida da exposição à luz. Para o preparo da solução inicial o extrato foi solubilizado em metanol (1.280 mg/mL). A partir desta solução foram feitas diluições sucessivas em progressão geométrica de razão 0,5 até atingir uma concentração de 5,0 µg/mL. Foram transferidos 50 µL de cada concentração, em triplicata, para tubos de ensaio, sendo adicionados 1.950 µL da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação, foi medida a absorbância em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 517 nm. O ácido ascórbico foi utilizado como antioxidante padrão, para fins de comparação. Para a construção da curva padrão foi utilizado o ácido ascórbico nas concentrações de 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50 e 0 µg/mL. O resultado foi expresso como porcentagem de inibição de DPPH• e, por meio de regressão linear foi determinada a Concentração Eficiente a 50% (CE₅₀), concentração de amostra necessária para o sequestro de 50% dos radicais livres (Silva et al., 2007).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Triagem Fitoquímica

Os ensaios foram realizados inicialmente com os extratos brutos de folhas e galhos de *A. parviflora*, em triplicata, sendo os resultados dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 – Resultados dos testes de triagem fitoquímica de extratos etanólicos brutos de folhas e galhos de *Aniba parviflora*.

| Metabólitos | Folhas | Galhos |
|-------------|--------|--------|
| Alcalóides | - | - |
| Esteróides | - | - |
| Flavonóides | + | + |
| Saponinas | + | + |
| Taninos | + | + |

+ Presença; - Ausência.

Verificou-se a ausência de alcalóides e esteróides nos extratos brutos de folhas e galhos de *A. parviflora*. Portanto, nas fases particionadas foram realizados apenas os testes para flavonóides, saponinas e taninos (Tabela 3).

Tabela 3 - Resultados dos testes de triagem fitoquímica das frações particionadas de folhas e galhos de *Aniba parviflora*.

| Metabólitos | Folhas | | | | Galhos | | | |
|-------------|--------|-----|-------|-----|--------|-----|-------|-----|
| | Hex | Dic | Ac Et | Hid | Hex | Dic | Ac Et | Hid |
| Flavonóides | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Saponinas | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Taninos | + | + | + | + | + | + | + | + |

Hex = hexano; Dic = diclorometano; Ac Et = acetato de etila; Hid = hidroalcoólica.

Para a obtenção de resultados mais específicos do grupo dos flavonóides, realizou-se um teste com a adição de NaOH. As reações com NaOH são utilizadas para identificação de fenóis na triagem de grupos funcionais, e sendo os flavonóides polifenóis, estas reações podem ser utilizadas. O mecanismo consiste na formação de fenóxidos (Sofiatti, 2009).

Identificou-se nos extratos de folhas de *A. parviflora* uma coloração entre vermelho e laranja, descrito na literatura como positivo para a presença de flavonóis. Já para as frações obtidas de galhos, as soluções tornaram-se amarelas, indicando a possível presença de xantonas, flavonas e flavonóis. Isto indica que ambas as frações possuem flavonóides, no entanto, possivelmente, com estruturas químicas diferentes. Para a fase hidroalcoólica os testes revelaram uma coloração alaranjada, tanto para a fase obtida de folhas como de galhos.

O teste para saponinas foi considerado positivo, no entanto quando comparado com os resultados obtidos dos extratos brutos de folhas e galhos, obteve-se menos espuma e esta perdurou por menos tempo. Comparando-se apenas as frações, a fase acetato de etila apresentou melhores resultados, indicando a preferência das saponinas presentes nos extratos, por este solvente. As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos, com caráter anfífilo (Schenkel et al., 2001), o que explica sua solubilidade em acetato de etila.

Verificou-se também a presença de taninos, já que houve o escurecimento das soluções testadas, o que pode ser explicado já que estes compostos são facilmente oxidáveis por influência de metais, o que ocasiona o escurecimento da solução (Mello e Santos, 2001). No entanto, observou-se que a coloração adquirida foi sempre mais forte em extratos de folhas do que de galhos. Estes resultados estão de acordo com os observados por Silva et al. (2012).

O uso de testes químicos qualitativos para conhecer a composição química de extratos vegetais é um método rápido e de baixo custo, que possibilita identificar as classes de metabólitos secundários de interesse que estão presentes nos extratos. Dessa forma, o estudo fitoquímico de *A. parviflora* revelou a presença de flavonóides, taninos e saponinas nos extratos etanólicos e partições.

As classes de metabólitos encontrados em *A. parviflora* possuem potencial biológico reconhecido. Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse para a indústria de alimentos, pois possuem ação contra micro-organismos, potencial anticarcinogênico e atividade antioxidante (Monteiro et al., 2007). As saponinas, por sua vez, são uma classe de compostos com ampla distribuição no reino vegetal, com potencial imunoadjuvante e hemolítico já reconhecidos (Mello e Santos, 2001). Da mesma forma, os flavonóides são compostos aromáticos, com inúmeras atividades biológicas descritas, entre elas o potencial vasoprotetor, anti-inflamatório, antitumoral, e destacando-se principalmente o potencial antioxidante (Souza et al., 2011).

3.2. Atividade Antioxidante

O ácido ascórbico (vitamina C) foi utilizado como padrão, pois segundo Duarte-Almeida et al (2006), este composto possui excelente atividade antioxidante.

O extrato etanólico bruto das folhas mostrou uma percentagem de inibição diretamente proporcional à concentração do extrato adicionado, até a concentração de 640 mg/mL, com inibição de $81,16 \pm 1,30\%$ (Figura 1A). Na Figura 1B pode-se observar a percentagem de inibição do radical DPPH, que segue diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato bruto de galhos, até a concentração 640 mg/mL, com inibição de $91,85 \pm 0,1\%$.

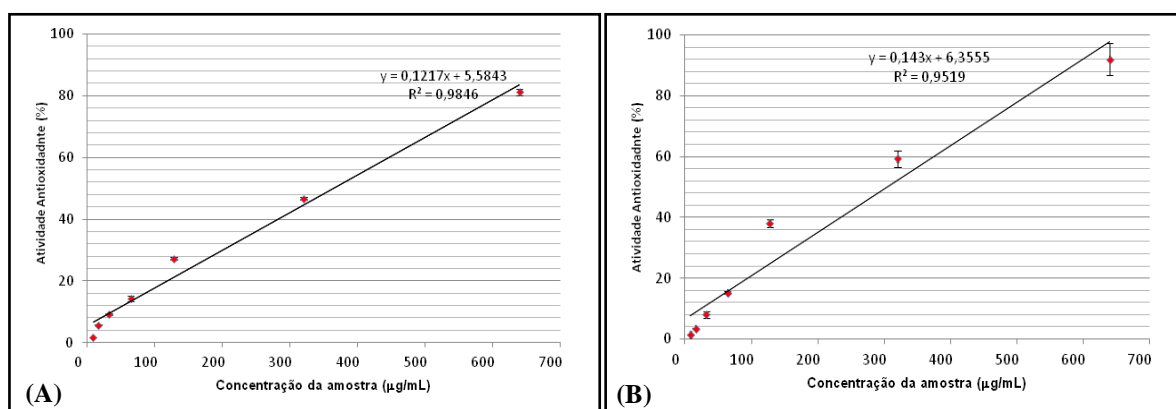


Figura 1 – Atividade antioxidante do extrato bruto de folhas (A) e de galhos (B) de *Aniba parviflora*.

O extrato etanólico bruto das folhas de *A. parviflora* apresentou uma atividade antioxidante 3,24 vezes menos eficiente ($CE_{50} = 367,4 \mu\text{g/mL}$) do que o padrão ácido ascórbico ($CE_{50} = 113,3 \mu\text{g/mL}$) (Figura 2).

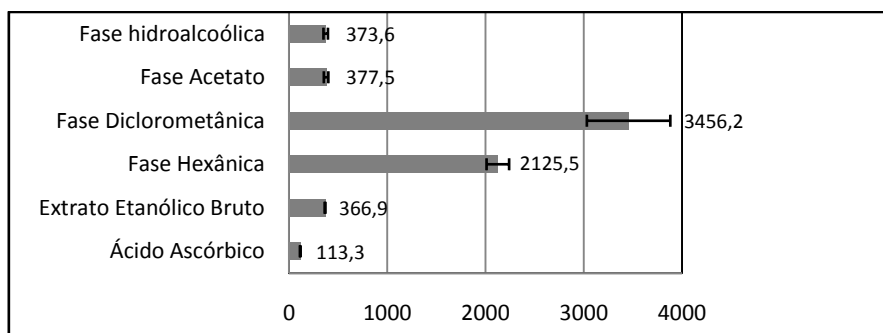


Figura 2 – Concentração Eficiente (CE_{50}) do ácido ascórbico, extrato bruto de folhas e das partições de folhas de *A. parviflora*.

Foi verificado ainda que a maior parte das substâncias responsáveis pela atividade antioxidante apresentada nos extratos brutos de folhas foi separada nas fases acetato de etila e hidroalcoólica, que possuem um caráter mais polar quando comparado aos outros solventes utilizados, apresentando $CE_{50} = 377,5 \mu\text{g/mL}$ e $CE_{50} = 373,6 \mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Uma vez que o ensaio utilizando o radical livre DPPH mede a capacidade das substâncias avaliadas em doar hidrogênio, quanto maior o número de hidroxilas presente nas amostras, maior seu potencial antioxidante (Duarte-Almeida et al., 2006). O aumento do número de hidroxilas nas substâncias também aumenta sua polaridade, e consequentemente, essas substâncias podem ser extraídas nas fases mais polares da partição.

O extrato bruto etanólico de galhos apresentou uma atividade antioxidante 2,7 vezes menos eficiente ($CE_{50} = 309,6 \mu\text{g/mL}$) que o padrão (Figura 3). Os resultados são semelhantes aos encontrados nas folhas, onde a amostra em acetato de etila apresentou $CE_{50} = 449,4 \mu\text{g/mL}$ e a fase hidroalcoólica $CE_{50} = 275,0 \mu\text{g/mL}$. As fases hexano e diclorometano apresentaram atividade apenas nas maiores concentrações, sugerindo que as substâncias responsáveis pela atividade antioxidante dos galhos são similares aos das folhas, possuindo um caráter mais polar.

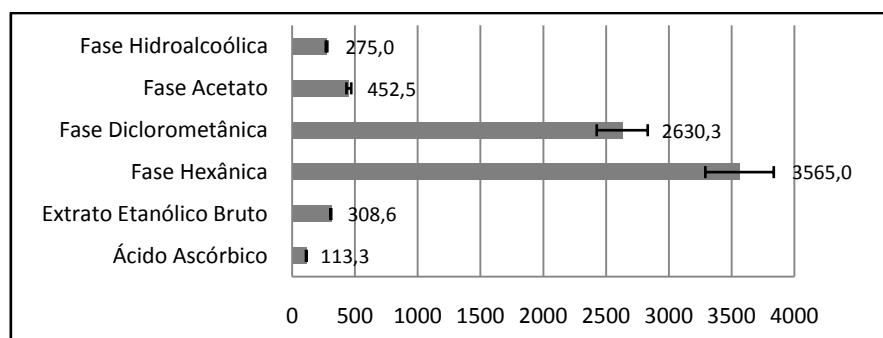


Figura 3 – Concentração Eficiente (CE_{50}) do ácido ascórbico, extrato bruto de galhos e das partições de galhos de *A. parviflora*.

Apesar de não ser possível inferir com exatidão quais compostos são responsáveis pela atividade antioxidante apresentada pelos extratos e partições de *A. parviflora*, pode-se relaciona-la à presença de flavonóides com grupos doadores de hidrogênio ou elétrons na sua estrutura, verificada na triagem fitoquímica. Inúmeras pesquisas relatam diferentes atividades biológicas atribuídas para esta classe de compostos, entre as quais destacam-se como potentes antioxidantes (Alves et al., 2007). Além disso, a possível presença de outros compostos polares contendo grupos hidroxila na sua estrutura, sobretudo a classe de taninos, encontrado na pesquisa fitoquímica, podem contribuir para a ação antioxidante dos extratos, uma vez que estes possuem propriedades supressoras de radicais peroxila reconhecidas (Auricchio et al., 2007).

Estudos sobre a atividade antioxidante de *A. parviflora* são escassos na literatura, mas outras duas espécies deste gênero (*A. rosaeodora* e *A. canelilla*), quando avaliadas pelo método do DPPH apresentaram bons resultados. Silva et al. (2007) encontraram atividade antioxidante em extratos metanólicos de *A. canelilla*. Já no trabalho realizado por Silva (2012), observou-se que os extratos etanólicos de *A. canelilla* apresentaram uma percentagem de inibição do radical livre de 92,65% para folhas e 92,07% para galhos.

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados mostram que os extratos etanólicos das folhas e galhos de *A. parviflora* possuem um bom potencial antioxidante que pode ser aproveitado na indústria de alimentos, fármacos e cosméticos. As moléculas responsáveis por essa atividade podem ser os taninos ou flavonóides, compostos com reconhecida ação antioxidante.

Dessa forma, com este trabalho verificou-se o potencial do uso de metabólitos de *A. parviflora* para a obtenção de novas moléculas antioxidantes, as quais possuem ampla utilização na indústria.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPEAM, CNPq e CAPES pelo suporte financeiro, ao INPA e à EST/UEA pela infraestrutura concedida para a realização deste trabalho.

6. REFERÊNCIAS

- ALVES, C. G.; BRANDÃO, H. N. DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; LIMA, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. *Diálogos & Ciência*, n. 12, p. 1-8, 2007.
- AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades antimicrobiana e antioxidante e toxicidade de *Eugenia uniflora*. *Lat. Am. J. Pharm.*, v. 26, p. 76-81, 2007.
- DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. *Visão Acadêmica*, v. 5, p. 33-40, 2004.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH•. *Cien. Tecnol. Alim.*, v. 26, p. 446-452, 2006.

- GLIMN-LACY, J.; KAUFMAN, P. B. *Botany Illustrated: introduction to plants, major groups, flowering plant families*. Nova York: Springer, 2006.
- MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*, v. 8, p. 195-206, 2001.
- MATOS, F. J. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Fortaleza: Edições UFC, 2009.
- MAY, P. H.; BARATA, L. E. S. Rosewood exploitation in the Brazilian Amazon: options for sustainable production. *Econ. Bot.*, v. 58, p. 257-265, 2004.
- MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed UFRGS/Ed. UFSC, 2001. p. 517-543.
- MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. *Quim. Nova*, v. 28, p. 892-896. 2005.
- LAMBERT, J. D.; HONG, J.; YANG, G.; LIAO, J.; YANG, C. S. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 81, p. 284-291, 2005.
- SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. Saponinas. In: SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2001. p. 597-619.
- SILVA, G. F. *Estudo do potencial biotecnológico de Aniba canelilla (H.B.K) Mez para formulação de cosméticos*. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.
- SILVA, J. K. R.; SOUSA, P. J. C.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and cytotoxicity of essential oil and methanol extract of *Aniba canelilla* (H. B. K.) Mez. *J. Agr. Food Chem.*, v. 55, p. 9422-9426, 2007.
- SILVA, R. C. S.; COELHO, M. D. G.; ALMEIDA, J. C. R.; ALMEIDA, A. A. S. *Potencial do araribá no desenvolvimento de fitoterápico: extração de fenóis e taninos totais*. Congresso Internacional de Cooperação Universidade-Indústria. São Paulo, 2012.
- SOFIATTI, F. T. *Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de Polygonum acre (Polygonaceae) H.B.K e Synadenium carinatum (Euphorbiaceae) Boiss.* Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.
- SOUZA, G. H. B; MELLO, J. P. C.; LOPES, N. P. *Farmacognosia: coletânea científica*. Ouro Preto: ed. UFOP, 2011.
- WU, J. H.; TUNG, Y. T.; WANG, S. Y.; SHYUR, L. F.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Phenolic antioxidants from the heartwood of *Acacia confusa*. *J. Agric. Food. Chem.*, v. 53, p. 5917-5921, 2005.