

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE SEQUESTRO DE RADICAL LIVRE DPPH• DE EXTRATO E FRAÇÕES DA ESPÉCIE *Calophyllum brasiliense* (JACAREÚBA)

F. M. S. COSTA¹, A. R. NUNES¹, G. A. SILVA¹, F. T. SOBRAL² e D. C. SANTOS¹

¹Universidade do Estado do Amapá

²Faculdade Estácio do Amapá

E-mail para contato: fmanuelascosta@gmail.com

RESUMO – Os compostos antioxidantes são responsáveis pela inibição de radicais livres, estes são produzidos naturalmente pelo organismo e causam efeitos danosos aos sistemas como o estresse oxidativo que tem relação com disfunções celulares como o câncer e doenças degenerativas. A ação de antioxidantes naturais tem ganhado destaque, com ênfase aos compostos relacionados a plantas. Com o objetivo de caracterizar a atividade de sequestro de radical livre da espécie *Calophyllum brasiliense*, coletada no estado do Amapá, realizou-se o preparo dos extratos através das cascas da planta e também a preparação do extrato bruto, frações clorofórmio, acetato de etila e fração residual para análise da atividade sequestradora do radical livre DPPH•, com leitura a 515 nm em espectrofotômetro, sendo os resultados expressos em IC₅₀. A fração acetato de etila obteve melhor resultado, apresentando sequestro de radical livre (SRL) igual a 2,93±0,08 µg/mL, seguido da fração residual que apresentou 4,01±0,20 µg/mL e extrato bruto com 6,91±0,22 µg/mL, entretanto a fração clorofórmio obteve resultado insatisfatório comparado aos demais, com seu SRL respectivamente igual a 26±1,39 µg/mL, tal resultado pode ser relacionado ao alto teor de polifenóis.

1. INTRODUÇÃO

Os radicais livres são moléculas orgânicas quimicamente instáveis e reativas, devido apresentarem um ou mais elétrons não pareados, sua formação em organismos vivos decorre via ação catalítica enzimática e exposição a fatores exógenos, suas atuações são as mais diversas, tais como na produção de energia, regulação do desenvolvimento celular, fagocitose e outros (ALVES et al. 2010). Contudo sua presença em excesso pode ocasionar efeitos danosos aos sistemas sendo prejudicial para a manutenção de várias funções fisiológicas tida como normais exemplos comuns são os danos ao DNA, proteínas, organelas celulares e outros (HAIDA et al. 2014; SOUSA et al. 2007), esta ação também é conhecida como estresse oxidativo por haver uma desproporcionalidade entre as moléculas oxidantes e antioxidantes (BIANCHI e ANTUNES. 1999), por isso a sua relação com disfunções celulares, sendo assim as mais conhecidas: o câncer, envelhecimento precoce e doenças degenerativas (FANHAN & FERREIRA. 2006).

Nesse contexto, o emprego de compostos antioxidantes, que podem ser obtidos através de dietas ou em forma sintética e disponível por meio das indústrias de bebidas, cosméticos, alimentos e outros, é um dos artifícios usados contra a ação dos radicais livres (BIANCHI e ANTUNES. 1999). Estes compostos possuem a característica de que quando presentes em

concentrações baixas em relação ao substrato oxidável são capazes de realizar a inibição da oxidação de tal substrato, desta forma como resultado tem-se radicais não reativos para a capacidade de propagação em cadeia e sua neutralização se dá por meio de reações com outros radicais (SOUSA et al. 2007). Os estudos envolvendo antioxidantes naturais, especificamente relacionados a plantas, tem cada vez mais ganhado destaque perante a comunidade científica (HAIDA et al. 2013), em virtude dos mesmos apresentarem semelhança ou superioridade aos antioxidantes sintéticos quanto ao bloqueio da oxidação, maior confiabilidade, potencial nutricional e efeitos terapêuticos (MILITÃO e FURLAN. 2014)

O Estado do Amapá possui um litoral estuarino com vegetações inigualáveis, devido a performance do rio Amazonas. A espécie *Calophyllum brasiliense*, também conhecida popularmente como guanandi, guarandi, jacareúba e outros, ocorre em vegetações de várzeas e igapós (SOUSA et al. 2007), caracteriza-se por ser uma espécie heliófita ou de luz difusa. Sua empregabilidade esta associada à apicultura e como forrageira, de sua casca é extraído o bálsamo de jacareúba para o uso em tratamento de úlceras e tumores, o óleo oriundo da semente tem aplicabilidade indústria (BOTREL et al. 2006). Segundo Navarro (2007) a madeira da espécie tem aplicação que passa pela construção civil, fluvial, marcenaria, compensados, papel e barris para vinho.

Mesmo com várias aplicabilidades esta espécie não apresenta muitos estudos quanto a sua atividade antioxidante e a partir do exposto o presente trabalho visa como objetivo realizar a caracterização da atividade de sequestro de radical livre DPPH• de extrato e frações da espécie *Calophyllum brasiliense* (jacareúba) coletada no Estado do Amapá no mês de agosto de 2016.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção e preparo dos extratos

A obtenção das amostras da espécie *Calophyllum brasiliense* no mês de agosto de 2016 no município de Magazão-Ap se deu através da parceria com o Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá (IEPA). No Laboratório de Química Orgânica e Bioquímica da Universidade do Estado do Amapá (UEAP) as cascas das amostras foram reduzidas e maceradas em etanol:água (70:30 p/p) por 4 dias/temperatura ambiente/agitações periódicas e banho ultrassom por 15 minutos/dia. Após filtrações a vácuo o volume dos filtrados foi mensurado e concentrado em rotaevaporador (40°C/pressão negativa), resultando em extrato bruto, este também subsidiou o preparo da fração clorofórmio no qual foram usados 250 ml de extrato bruto para 400 ml de clorofórmio, após 48h a fase orgânica foi retirada e adicionado 400 ml do reagente acetato de etila, em ambos os casos o processo foi realizado por partição líquido-líquido, após 48h a fase orgânica foi recolhida dando origem as fração acetato de etila e a fração de extrato bruto contida no funil foi denominada de fração residual, todas as frações auxiliaram a caracterização da atividade de sequestro de radical livre DPPH da espécie *Calophyllum brasiliense* (jacareúba).

2.2. Determinação da atividade de sequestro do radical livre

Um dos métodos mais utilizados para a determinação da atividade do sequestro do radical livre baseia-se em analisar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila - DPPH•, que apresenta coloração púrpura. Isto ocorre devido à presença de um antioxidante ou uma espécie radicalar, assim o DPPH• é reduzido dando origem ao difenil-picril-hidrazina, que manifesta coloração amarelada. Após a leitura dos resultados em espectrofotômetro a 515 nm é possível estipular a porcentagem de atividade antioxidante (AA%), que condiz com a quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, desta forma a quantidade de antioxidante essencial para fazer com que a concentração inicial de DPPH diminua em 50% é chamada de concentração inibitória (IC₅₀). Como conclusão, tem-se que quando o consumo de DPPH for mais expressivo por uma determinada amostra, o resultado será um IC 50 de baixa intensidade e em contra partida sua atividade antioxidante será maior. (SOUSA et al. 2007)

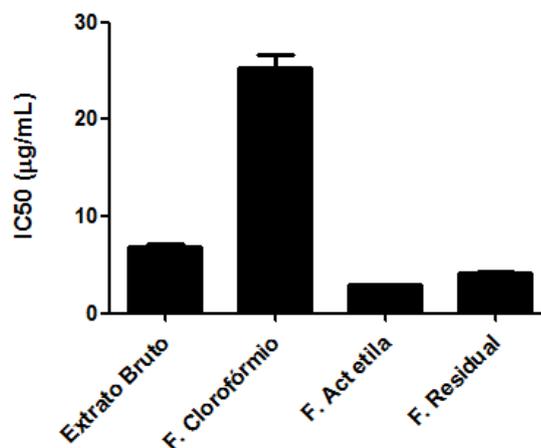
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A realização da avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi realizada segundo a metodologia usada por Brand-Williams et al. (1995), assim o acompanhamento referente a taxa do consumo do radical livre DPPH pelas amostras deu-se por meio da diminuição da absorbância das soluções de diferentes concentrações. Neste caso, as análises ocorreram em espectrofotômetro (biospectro sp-22) no comprimento de onda 515 nm, tendo como controle positivo metanol.

As medidas de absorbância foram efetuadas em duplicata. Para a equação da curva de calibração do DPPH foram adotadas seis concentrações distintas da solução padrão, a partir dos valores obtidos em absorbância, um gráfico de dispersão foi plotado para a observação da curva de calibração e de maneira estatística os coeficientes de correlação ($R^2 = 0,9985$), coeficiente angular ($a = 0,0068$) e intersecção no eixo y ($b = 0,0138$).

Os resultados do sequestro do radical livre DPPH• pelos compostos químicos dos extratos hidroalcoólicos das cascas de *Calophyllum brasilienses* foram expressos em IC₅₀ (µg/mL), como apresentados na Figura 1.

Figura 1: Atividade de sequestro do radical livre DPPH da amostra da espécie *Calophyllum brasiliense* no mês de agosto de 2016.



Os resultados são expressos como a média \pm SEM (n=3).

É factível afirmar através do gráfico que entre as frações analisadas a fração acetato de etila obteve melhor resultado, apresentando sequestro de radical livre (SRL) igual a $2,93 \pm 0,08$ $\mu\text{g/mL}$, seguido da fração residual que apresentou $4,01 \pm 0,20$ $\mu\text{g/mL}$ e extrato bruto com $6,91 \pm 0,22$ $\mu\text{g/mL}$, entretanto a fração clorofórmio obteve resultado insatisfatório comparado aos demais, com seu SRL respectivamente igual a $26 \pm 1,39$ $\mu\text{g/mL}$.

Pertencente a classe de metabólitos secundários e com uma distribuição extensiva no reino vegetal, Coutinho et al. (2009) afirma que os flavonoides constituem um dos grupos fenólicos mais significativos e diversificados dentre os produtos de origem natural. Segundo Araújo et al. (2015) em sua quantificação e identificação destes compostos em extratos de jacareúba, pôde-se observar a composição em $8,07 \pm 0,15$ mg/g teor de flavonóides totais na espécie. Estes flavonóides podem ser responsáveis pela atividade antioxidante e tendem a ser extraídos com mais frequência por meio da fração acetato de etila.

4. CONCLUSÃO

Após a análise dos resultados, expressos em IC_{50} , pôde-se concluir que os extratos obtidos a partir das cascas da espécie *Calophyllum brasiliense* tiveram bons resultados, entretanto a fração acetato de etila apresentou melhor sequestro de radical livre em relação às demais, tal explicação possivelmente pode estar relacionada ao alto teor de polifenóis.

5. AGRADECIMENTO

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) pelo apoio fornecido ao trabalho e ao Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá pelo fornecimento das amostras a este projeto vinculadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Q. C.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, B. M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*. v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ARAÚJO, V. A. P de.; NUNES, A. R.; LUCAS, R.; SILVA, G. A da. Total flavonoid content for standardization of amazonian commercial plant extracts. In: international conference of chemical and biochemical engineering, 2015, Paris. *Anais ... Paris*, 2015.

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.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G.. Free radicals and the main dietary antioxidants. *Revista de Nutrição*., v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BOTREL, M. C. G.; de SOUZA, A. M.; de CARVALHO, D.; PINTO, S. I. do C.; MOURA, M. C. de Oliveira.; ESTOPA, R. A. Caracterização genética de *Calophyllum Brasiliense* Camb. em duas populações de mata ciliar. *Sociedade de Investigações Florestais*., v. 30, n. 5, p. 821-827, 2006.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.S.; COSTA, S.S. Flavonoides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Revista Virtual de Química*, v.1, p. 241-256, 2009.

FANHANI, A. P. G.; FERREIRA, M, P. Agentes antioxidantes: seu papel na nutrição e saúde dos atletas. *SaBios- Revista de Saúde e Biol*. v. 1, n. 2, p. 33-41, 2006.

HAIDA, K. S.; SILVA, F. J.; COELHO, R. M.; LIMA, D. S. ABRÃO, R. M.; HAIDA, K. Y.. Caracterização físico-química e atividade antioxidante de amoreira-preta (*Morus nigra* L.). *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, ano 12, n. 2014.

MILITAL, F. de L.; FURLAN, M. R. Alimento funcional através do uso de ocimum basilicum L. (manjeriço) como aromatizante de tempero. *Revista Acadêmica Oswaldo Cruz*. ISSN 2357-81873. ano 1, n.4, 2014.

NAVARRO, E. C. Viabilidade econômica do *Calophyllum brasiliense* (Guanandi). *Revista científica eletrônica de engenharia florestal*. v. 9, n. 9, 2007.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.