

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TRIAGEM FITOQUÍMICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *Glischrothamnus ulei* PILG. (MOLLUGINACEAE)
Monick Oliveira Ribeiro¹; Carla Cardeal Mendes²

¹Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Graduanda em Ciências Farmacêuticas, Bolsista FAPESB, e-mail: monick_ribeiro@hotmail.com

²Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), Departamento de Ciências Exatas, Laboratório de Química de Produtos Naturais (LAPRON), e-mail: ccardealmendes@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Glischrothamnus ulei*, triagem fitoquímica, atividade antioxidante.

INTRODUÇÃO

A grande diversidade química dos produtos naturais obtidos por plantas contribui para que se tornem fontes potenciais de novos protótipos de moléculas com atividade biológica. Nos últimos anos, evidências indicam que vários estados patológicos estão associados com a produção descontrolada de radicais livres e o estresse oxidativo nos sistemas biológicos (Sarmiento; Garcez, 2008/09). Substâncias naturais obtidas das plantas têm sido identificadas como captadoras de radicais livres, protegendo o corpo humano do dano oxidativo e retardando o aparecimento de doenças. A quantidade de antioxidante necessária para diminuir a concentração inicial do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) em 50% é definida como concentração eficiente (CE₅₀). Assim, quanto maior o consumo de DPPH pela amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (Sousa et al., 2007).

O potencial biológico de espécies vegetais de ocorrência no semi-árido baiano ainda é pouco explorado. *Glischrothamnus ulei* (Molluginaceae) (*G. ulei*) é uma espécie endêmica da caatinga com potencial biológico desconhecido (Gadéa, 2008). Até o momento, não existem artigos científicos publicados sobre a composição química e o potencial biológico do gênero *Glischrothamnus*. Um estudo recente dos extratos de caules de *G. ulei* (Ribeiro; Mendes, 2010) mostrou boa capacidade de sequestro do DPPH, bem como a presença de triterpenos, esteróides e flavonóides, após triagem fitoquímica.

É evidente a necessidade de se explorar os produtos naturais oriundos do semi-árido baiano, especialmente de espécies endêmicas de potencial terapêutico desconhecido e quimicamente desconhecidas. Assim, a investigação da atividade antioxidante dos extratos de folhas de *G. ulei* e o conhecimento do perfil químico desta planta abrem perspectivas para a obtenção de novos compostos bioativos que contribuam para a redução do risco as doenças. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e determinar o perfil fitoquímico de extratos de folhas de *G. ulei* de ocorrência na região do semi-árido baiano.

METODOLOGIA

Amostras de folhas de *G. ulei* foram adquiridas na forma de extratos secos: extrato metanólico (bruto), hexânico, diclorometano, acetato de etila, butanólico e aquoso. O extrato bruto e as frações foram submetidos a cromatografia em camada delgada (CCD) para a seleção das fases móveis para a triagem fitoquímica e testes *in vitro* de atividade antioxidante.

Amostras do extrato bruto e frações (5mg/mL) foram aplicadas em placas cromatográficas de gel de sílica GF₂₅₄ e eluídas em fases móveis pré-selecionadas. Após irradiação com luz UV 365 nm, foram reveladas com anisaldeído-ácido sulfúrico (AS); Dragendorff (DRG); Liebermann-Burchard (LB); hidróxido de potássio (KOH) e produtos naturais-polietilenoglicol (NP/PEG) (Wagner e Bladt, 1995). Foram feitos controles negativos. Testes para detecção de saponinas foram realizados nas frações butanólica e aquosa conforme metodologia descrita por Matos (1997).

A avaliação qualitativa da atividade antioxidante dos extratos foi baseada no ensaio do DPPH por CCD descrito por Silva (2005), com adaptações. Os extratos foram solubilizados em metanol (5mg/mL) e aplicados 10 µL, 20 µL e 30 µL sobre placas cromatográficas GF₂₅₄.

Como padrão positivo, utilizou-se 0,7µL de solução de rutina (5mg/mL). Após eluição, as placas foram reveladas com solução metanólica de DPPH a 0,004%. O surgimento de bandas de cor amarela, em até 45 minutos, foi considerado resultado positivo para atividade antioxidante. Para amostras de cor intensa ou com matizes próximas ao amarelo, foram feitos controles negativos. O grau de resposta ao DPPH foi avaliado em função do tempo de reação em minutos (min.) e assim classificado: início da reação < 5 min. (rápido), entre 5-30 min. (intermediário) e > 30 min. (lento) (Huang et al., 2005).

A avaliação quantitativa de atividade antioxidante do extrato bruto foi baseada no ensaio espectrofotométrico do DPPH descrito por Pinto (2011), com adaptações. Foram preparadas três soluções metanólicas do extrato (5000 µg.mL⁻¹). De cada solução, foram preparadas soluções nas concentrações de 1500 µg.mL⁻¹; 1000 µg.mL⁻¹; 750 µg.mL⁻¹; 500 µg.mL⁻¹; 350 µg.mL⁻¹; 250 µg.mL⁻¹; 150 µg.mL⁻¹; 100 µg.mL⁻¹ e 50 µg.mL⁻¹, submetidas ao teste antioxidante em triplicata. Como controle da amostra, utilizou-se a mistura de 2 mL de metanol e 1 mL da amostra; como branco, 3 mL de metanol e, como controle do DPPH, a mistura de 2 mL de DPPH (0,004%) e 1 mL de metanol. Para a reação, foram adicionados 2 mL da solução de DPPH a 1 mL de cada solução do extrato. Utilizou-se a rutina como controle positivo. A reação foi monitorada pela medida do decréscimo da absorbância das soluções, após 30 minutos de reação. As medidas de absorbância (Abs.) foram realizadas em espectrofotômetro (UV-vis NOVA) a 517 nm. Foram calculadas as percentagens de inibição do radical DPPH, correspondente a quantidade de DPPH sequestrado, conforme a equação:

$$\% \text{inibição DPPH} = \text{Abs. DPPH} - \frac{\text{Abs. após reação} - \text{Abs. controle da amostra}}{\text{Abs. DPPH}} \times 100$$

Foram construídas curvas analíticas da percentagem de DPPH sequestrado nas concentrações testadas do extrato e calculados, por interpolação logarítmica, os valores de CE₅₀.

ANÁLISE E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A Tabela 1 mostra os resultados da triagem fitoquímica do extrato bruto e frações de folhas de *G. ulei*.

Tabela 1. Perfil fitoquímico do extrato bruto e frações das folhas de *G. ulei*

Amostra	Reagente				
	AS	LB	NP/PEG	KOH	DRG
Extrato Metanólico	+	+	+	+	-
Fração Hexânica	+	+	+	-	-
Fração Diclorometano	+	+	+	-	-
Fração Acetato de Etila	-	-	+	+	-
Fração Butanólica	+	+	+	+	-
Fração Aquosa	+	+	+	+	-

Resultados: Positivo: (+); Negativo: (-)

Os resultados dos testes com AS e LB indicam a presença de terpenos e esteróides em todas as amostras, a exceção da fração acetato de etila. Por possuírem na sua estrutura uma aglicona esteroidal ou triterpênica, as saponinas podem dar resposta positiva para o teste com AS e LB. Os testes realizados para detecção de saponinas nas frações butanólica e aquosa foram positivos, justificando os resultados obtidos no teste com AS e LB para estas frações. Os resultados para NP/PEG indicam a presença de flavonóides em todas as amostras. A presença de flavonóides é comum em amostras polares derivadas de plantas. No caso da fração hexânica, este resultado sugere a presença de flavonóides metoxilados. A exceção das frações hexânica e diclorometano, as demais frações reagiram com KOH, sugerindo a presença de cumarinas glicosiladas. Nenhuma amostra reagiu com DRG, indicando a

provável ausência de alcalóides ou compostos nitrogenados heterocíclicos. No entanto, Musa et al. (2006) relatam a presença de triterpenos, flavonóides e saponinas na família Molluginaceae, embora algumas espécies elaborem alcalóides.

Na Tabela 2, são apresentados os resultados do ensaio qualitativo de atividade antioxidante dos extratos e frações das folhas de *G. ulei*.

Tabela 2. Atividade antioxidante dos extratos e frações de folhas de *G. ulei* pelo método do DPPH por CCD

Amostra	Atividade*	Início da reação**	Número de bandas detectadas***
Extrato metanólico (Bruto)	+	Rápido	3
Fração Hexânica	+	Rápido	15
Fração Diclorometano	+	Intermediário	1
Fração Acetato de etila	+	Rápido	4
Fração Butanólica	+	Rápido	9
Fração Aquosa	+	Rápido	2

*Resultados: Positivo (+); Negativo (-)

**Início da reação: Rápido: <5 min, Intermediário: entre 5-30 min e Lento: > 30 min lento.

*** Número de bandas amarelas detectadas até 45 minutos de reação.

O teste com DPPH permite avaliar a capacidade de sequestro deste radical livre, de coloração púrpura que, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar presente na amostra, sofre redução formando 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela (Oliveira, 2009). Os resultados mostraram que todas as amostras apresentaram atividade antioxidante, havendo variação do tempo do início de reação de cada amostra. Contudo, a fração hexânica, em especial, e as frações butanólica e acetato de etila apresentaram um maior número de bandas com coloração amarela quando comparadas com as demais amostras, sugerindo um maior efeito antioxidante dessas frações. Os resultados podem ser explicados pela presença de flavonóides ou ainda a presença de terpenos ou esteróides com grupos doadores de hidrogênio ou elétrons na sua estrutura (Alves et al. 2007), verificada na triagem fitoquímica dos extratos das folhas de *G. ulei*. A possível presença de outros compostos polares contendo grupos hidroxila na sua estrutura pode conferir ação antioxidante, uma vez que são capazes de reduzirem o DPPH.

Na Tabela 3, são apresentados os resultados do ensaio quantitativo de atividade antioxidante do extrato metanólico (bruto) de folhas de *G. ulei*.

Tabela 3. Atividade antioxidante do extrato metanólico de folhas de *G. ulei* pela redução do radical DPPH*

Concentração (µg/mL)	1.500	1.000	750	500	350	250	150	100	50
% DPPH Seqüestrado (x±dp)	96,39 ± 3,12	92,09 ± 1,63	84,59 ± 3,49	67,50 ± 0,50	53,61 ± 4,16	43,85 ± 3,82	32,72 ± 2,24	25,26 ± 1,41	17,89 ± 2,29
% DPPH Remanescente (x±dp)	2,61 ± 1,89	7,91 ± 1,63	15,41 ± 3,49	32,5 ± 0,50	46,39 ± 4,16	56,15 ± 3,82	67,28 ± 2,24	74,74 ± 1,41	82,11 ± 2,29

*Resultados obtidos após 30 minutos de reação.

Os resultados obtidos no ensaio quantitativo de atividade antioxidante do extrato bruto confirmaram a atividade antioxidante do extrato verificada no ensaio qualitativo. Após completar o tempo de 30 minutos de reação, houve um decréscimo da absorvância da solução contendo o extrato e DPPH, quando comparada a absorvância do controle do DPPH, indicando o sequestro do radical por compostos antioxidantes presentes no extrato. Os resultados mostraram uma tendência crescente da eficiência na captura do radical com o aumento da concentração do extrato. A partir dos percentuais de inibição do DPPH, foi possível determinar a concentração do extrato capaz de inibir 50% dos radicais livres (CE₅₀), igual a (243,93 ± 20,35) µg/mL. Um estudo realizado por Pinto (2011), mostrou que CE₅₀ da rutina é de 6,06 µg/mL. Assim, o extrato metanólico bruto das folhas de *G. ulei* não

apresentou atividade antioxidante em uma proporção significativa quando comparada a atividade desenvolvida pelo padrão (rutina) no ensaio de captura do DPPH. A atividade antioxidante constatada do extrato pode ser atribuída a presença de terpenos, esteróides e flavonóides, os quais são constituintes que apresentam grande potencial antioxidante (Pietta, 2000). No entanto, o ensaio qualitativo de atividade antioxidante de frações de *G. ulei* mostrou um maior efeito antioxidante quando comparado ao extrato bruto, o qual poderá ser posteriormente confirmado em estudos quantitativos desta atividade para estas frações.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A biodiversidade do Brasil pode desempenhar um papel importante na busca de novos protótipos provenientes de fontes naturais (Sarmiento; Garcez, 2008/09). O extrato metanólico bruto e frações das folhas de *G. ulei* apresentam em sua composição química terpenos, esteróides, flavonóides, cumarinas e saponinas. A capacidade antioxidante presente nestes extratos pode ter relação direta com a presença destes compostos. A partir dos resultados obtidos na triagem fitoquímica e na prospecção da atividade antioxidante de extratos de *G. ulei*, bem como dos estudos desenvolvidos anteriormente por Gárdea (2008), pode-se afirmar que esta espécie é uma fonte promissora de metabólitos ativos. Estudos mais aprofundados devem ser realizados, pois esta espécie é detentora de um potencial bioativo para a elaboração de fármacos naturais ou ainda para a associação destes com os fármacos sintéticos, além de contribuírem para o conhecimento químico e do potencial terapêutico da espécie.

REFERÊNCIAS

- ALVES et al. 2007. Diálogos e Ciência – **Rev. da rede de ensino FTC**. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. Ano V, n. 12.
- GADÉA, S. F. 2008. **Determinação da atividade antimicrobiana de óleo essencial e extrato bruto de *Glischrothamnus ulei* (Molluginaceae) do semi-árido baiano**. Univ. Estadual de Feira de Santana. MSc. diss.
- HUANG, D. et al. 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.** v. 53.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 1997. 2. ed Fortaleza: EUFC.
- MUSA, K. Y. et al. 2006. Pharmacognostic investigation of the leaves of *Gisekia pharnacioides*. **Afr. J. of Biotechnol.** v. 5(10).
- OLIVEIRA, R. et al. 2009. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quím. Nova.** v.32, n.3.
- PIETTA, P. - G. 2000. Flavonoids as Antioxidants. **J. Nat. Prod.** v. 63. n. 7.
- PINTO, F. P. 2011. **Atividade antimicrobiana, antioxidante e composição química de espécies do gênero *Blechnum* da Mata Atlântica baiana**. Univ. Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana. MSc. diss.
- RIBEIRO, M. O.; MENDES, C. C. **Avaliação da atividade antioxidante e perfil fitoquímico de espécimes de *Glischrothamnus ulei* Pilg. (Molluginaceae)**. XIV Seminário de Iniciação Científica. UEFS, 2010.
- SARMENTO, U. C.; GARCEZ, W. S. 2008/09. **Busca de substâncias bioativas de plantas – ensaios com substâncias puras**. Univ. Federal do Mato Grosso do Sul.
- SILVA, A. F. S. 2005. ***Hippeastrum vittatum* (L'Hér) Herbert e *Hippeastrum striatum* (Lam.) Moore: análise química e avaliação biológica dos alcalóides isolados**. 2005. 207 f. Tese de Doutorado, Faculdade de Farmácia, Univ. Federal do Rio Grande do Sul - RS.
- SOUSA, C. M. de M. et al. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova,** v. 30, n. 2.
- WAGNER, H.; BLADT, S. 1995. **Plant Drug Analysis. A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. New York: Springer Verlag.