



Avaliação da atividade antioxidante dos extratos botânicos de *Croton Heliotropiifolius* Kunth. e *Croton blanchetianus* Baill: Resultados Preliminares.

Onaldo Guedes Rodrigues^{1*}, Elissandra Couras Angélico¹, José Galberto Martins Da Costa², Maria De Fátima Araújo Lucena¹, Vicente Queiroga Neto¹, Wilson Wouflam Silva¹

RESUMO: Antioxidantes são compostos que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo. Muitas doenças e processos degenerativos estão associados à superprodução de radicais livres os quais têm estimulado vários grupos de pesquisa a investigarem o potencial antioxidante de substâncias produzidas por diversas famílias da flora mundial. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo identificar as principais classes de metabólitos secundários presente nos extratos etanólicos das folhas de *Croton blanchetianus* e *Croton heliotropiifolius*, bem como avaliar o seu potencial antioxidante. Os extratos etanólicos foram obtidos das folhas pelo método de extração exaustiva a frio com rendimento de 3,29% e 3,26%. Em seguida, os extratos foram submetidos a análises fitoquímica, nos quais foi possível identificar a presença de taninos condensados, flavonóides, flavononas, flavonóis, flavononóis, catequinas e xantonas. A atividade antioxidante dos extratos foi determinada pelo método fotolorimétrico *in vitro* realizada por meio do seqüestro de radicais livres, usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila). Ambos os extratos foram capazes de seqüestrar o radical livre DPPH, sendo que o extrato de *Croton blanchetianus* mostrou ser mais eficiente do que o BHT (controle positivo), com $CE_{50} = 6,5 \pm 0,5$ mg / mL. Contudo, os resultados observados para os extratos etanólicos, possivelmente sejam atribuídas à presença e à concentração de compostos fenólicos pertencentes a classes dos taninos e flavonóides, identificados nesse estudo.

Palavras-chave: Radicais livres, fitoquímica, fotolorimétrico.

Evaluation antioxidant activity of botanical extracts at *Croton heliotropiifolius* Kunth and *Croton blanchetianus* Baill

ABSTRACT: Antioxidants are compounds that, at optimal concentrations in relation to oxidable substrates, react with free radicals preventing or reducing oxidative stress. Many diseases and degenerative processes are associated with overproduction of free radicals. This stimulated several research groups to investigate the antioxidant potential of substances produced by several families of the world flora. Thus, this study identified the major classes of secondary metabolites present in ethanol leaf extracts of *C. blanchetianus* and *C. heliotropiifolius*, and assessed their antioxidant potential. Ethanol extracts were obtained by the exhaustive extraction method cold and resulted in 3.29% and 3.26% extraction efficiency. Then phytochemical analyses were performed on the extracts to investigate the presence of tannins, flavonoids, flavonones, flavonols, catechins and xanthenes. The antioxidant activity of extracts was determined by *in vitro* photolorimetric method based on the sequestration of free radicals, using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). Both extracts were able to sequester DPPH free radical. *Croton blanchetianus* extract activity showed to be more efficient than BHT (positive control), with $EC_{50}=6.5 \pm 0.5$ mg/mL. *Croton heliotropiifolius* extract showed lower antioxidant activity, with $EC_{50}=50.15 \pm 0.21$ but still higher than that observed for BHT. However, the results observed for the ethanol extracts are possibly the result of the presence and concentration of phenolic compounds such as tannins and flavonoids, which were identified in this study.

Keywords: free radicals, phytochemistry, photolorimetric.

INTRODUÇÃO

O organismo humano produz constantemente radicais livres por meio de suas atividades metabólicas. Apesar de ser um processo normal na vida dos organismos vivos, quando em excesso, podem gerar estresse oxidativo, levando a alterações

teciduais responsáveis por diversas patologias, como artrites inflamatórias (HADJIGOGOS, 2003), úlceras (La CASA et al. 2000) diabetes (EL-REMESSY et al., 2003) e processos degenerativos como doença de Alzheimer, doença de Parkinson,

aterosclerose e o envelhecimento precoce (SIKORA et al. 2008), dentre outras.

Para impedir os efeitos deletérios associados ao excesso dessas espécies reativas de oxigênio, o organismo apresenta defesas antioxidantes. No entanto, os antioxidantes são um grupo de substâncias que, quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos oxidáveis, reagem com os radicais livres impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo (HALLIWELL, 2001). Os antioxidantes presentes no organismo podem ser de origem endógena agindo enzimaticamente, como a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutatona peroxidase (GPx), ou não-enzimaticamente, como glutatona reduzida (GSH) (PIMENTEL, 2006).

Além destes antioxidantes produzidos no organismo, existem os sintéticos, substâncias utilizadas na indústria alimentícia, destacando-se o BHT, BHA, GP, TBHQ e os naturais tais como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonóides) (SOUSA et al. 2007) os quais são os responsáveis pela remoção dessas espécies reativas.

O uso de antioxidantes sintéticos tem diminuído, devido a suspeita de atividades como promotores de carcinogênese, bem como devido à rejeição de aditivos sintéticos em alimentos (CARVALHO, 2004). Nesse contexto, a procura por substâncias antioxidantes naturais tem aumentado nas últimas décadas, em especial os produtos naturais extraídos de plantas medicinais.

Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas os compostos fenólicos têm sido apontados como responsáveis por maior capacidade antioxidante, sendo representados pelos flavonóides e isoflavonóides, taninos, lignanas, xantonas e outros. A ação antioxidante da maioria dessas substâncias naturais se deve a presença de hidroxilas fenólicas e as suas propriedades de oxirredução, pois eles agem como agentes redutores, doadores de hidrogênio. Além desses compostos, vários outros com atividade antioxidante têm sido isolados de diversas famílias de plantas (FONSECA et al. 2009; REBELO et al. 2009).

De acordo com a literatura, estudos mostram que tanto óleos essenciais (SOUZA et al. 2007) como componentes não voláteis (extratos), extraídos de plantas (BALESTRIN et al., 2008; NUNES et al. 2008), têm sido estudados quanto à avaliação do seu potencial antioxidante, demonstrando alta eficiência.

Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos das folhas de *Croton blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*, bem como avaliar o seu potencial

antioxidante pelo ensaio de captura de radicais DPPH.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e Identificação do material botânico

As folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius* foram coletadas nos meses de outubro e novembro de 2009 às 8:00 horas, no sítio São José do Bonfim – município de Patos, coordenadas geográficas 07° 08' 20" S e longitude 37° 18' 62" O. Em seguida uma mostra representativa de cada espécie foi identificada pela professora Dr^a. Maria de Fátima Araújo Lucena (UFCG) e depositada no Herbário CSTR da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Patos- PB, sob o registro de número # 496 e # 497, respectivamente.

Preparação dos extratos botânicos

Os extratos etanólicos das folhas foram obtidos pelo método de extração exaustiva a frio (MATOS, 1988). As folhas frescas de *C. heliotropiifolius* (300 g) e *C. blanchetianus* (280 g) foram previamente trituradas e submetidas à extração com etanol durante 72 horas. Após o período de extração, o solvente foi destilado em evaporador rotatório a 80 °C sob pressão reduzida. Os extratos etanólicos brutos obtidos foram pesados e armazenados a temperatura ambiente até a realização das análises fitoquímica e ensaios antioxidantes.

Prospecção fitoquímica dos extratos botânicos

Foram realizados testes fitoquímicos para identificar as principais classes de metabólitos secundários nos extratos vegetais de acordo com a metodologia descrita por Matos (1997), que é baseado na mudança de cor ou formação de precipitados após a adição de reagentes específicos.

Avaliação da atividade antioxidante

Método de seqüestro do radical DPPH.

A atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas foi determinada pelo método fotocolorimétrico *in vitro* realizada por meio do seqüestro de radicais livres, usando o DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila) (MENSOR et al. 2001). Essa análise é baseada na habilidade de compostos em doar um próton para o radical DPPH e formar estruturas de ressonância estáveis, estabilizando assim o radical livre.

As amostras para a realização do ensaio foram preparadas adicionando-se 1 mL da solução de DPPH (60 μ M) em 2,5 mL de soluções dos extratos que foram diluídas em etanol na concentrações de 5, 10, 25, 50, 125 μ g/mL em triplicata.

A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a atividade antioxidante de uma amostra pode ser visualizada pelo progressivo

descoloramento da solução de DPPH, ao final do qual a mesma torna-se amarelada (NUNES et al. 2008). Após o tempo de reação de 30 min das amostras preparadas, as absorbâncias foram lida com auxílio de Espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis com comprimento de onda ajustado para 520 nm.

Um teste em branco foi realizado adicionando-se 1 mL de etanol a 2,5 mL das concentrações dos extratos. Como controle negativo foi usada a mistura de 1 mL da solução de DPPH com 2,5 mL de etanol e como controle positivo utilizou-se o 2,5 mL das concentrações de BHT (butil-hidroxitolueno) e 1 mL da solução de DPPH.

Todas as leituras foram realizadas em triplicata e com a média dos dados obtidos foi calculada a diferença de absorbância entre as amostras e o controle negativo, sendo as atividades antioxidantes (AA) percentuais obtidas por regressão linear, para cada fase, chegando-se assim à concentração das amostras que promovesse a diminuição para a metade da concentração inicial de DPPH (50%), definida como Concentração Efetiva (CE₅₀) (Mensor et al. 2001).

A atividade antioxidante (AA) das amostras por seqüestro do DPPH foi expressa em porcentagem, segundo a equação:

$$100 - \left\{ \frac{[\text{Abs}_{\text{extrato}} - \text{Abs}_{\text{branco}}] \times 100}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \right\} \text{(equação 1)}$$

Tabela 1. Dados relacionados à obtenção dos extratos etanólicos das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*.

Espécies	Massa das folhas (g)	Massa dos extratos brutos (g)	(%)
<i>C. heliotropiifolius</i>	300	9,87	3,29
<i>C. blanchetianus</i>	280	9,15	3,26

Na prospecção fitoquímica realizada com os extratos etanólicos das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* foi identificada a presença de taninos condensados, flavonóides, flavononas, flavonóis, flavanonóis, catequinas e xantonas

Análises estatísticas

As análises estatísticas das médias em triplicata (n=3) ± desvio padrão foram realizadas usando a Análise de Variância (ANOVA) seguida por Student-Newman Keuls-test Múltipla comparação. Os resultados com p < 0,05 foram considerados significantes. Todas as análises foram realizadas usando o programa software GraphPad Prism 5.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As massas do material vegetal seco utilizado e dos extratos etanólicos obtidos da percolação, assim como os rendimentos em extrativos constam na Tabela 1. Na prospecção fitoquímica realizada com os extratos etanólicos das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* foi identificada a presença de taninos condensados, flavonóides, flavononas, flavonóis, flavanonóis, catequinas e xantonas (Tabela 2). A presença de taninos catéquicos e flavonóides nas folhas de *C. heliotropiifolius* está de acordo com as descrições feitas por Randau et al. (2004).

As massas do material vegetal seco utilizado e dos extratos etanólicos obtidos da percolação, assim como os rendimentos em extrativos constam na Tabela 1.

(Tabela 2). A presença de taninos catéquicos e flavonóides nas folhas de *C. heliotropiifolius* está de acordo com as descrições feitas por Randau et al. (2004).

Tabela 2. Classe de metabólitos secundários identificados nos extratos etanólico das folhas de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*

Metabólitos secundários	<i>C. blanchetianus</i>	<i>C. heliotropiifolius</i>
Taninos	*	*
Fenóis	-	-
Antocianinas e Antocianidinas	--	--
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	---	***
Chalconas e Auronas	--	--
Flavanonóis	*	-
Leucoantocianidinas	-	-
Catequinas (Taninos catéquicos)	*	*
Flavanonas	*	*

(*) Presença de compostos; (-) Ausência de compostos.

Na análise dos resultados da atividade antioxidante (AA%) frente ao radical DPPH, considerou-se como valor de referência a CE₅₀ de 35,50±0,50 µg/mL do BHT (controle positivo) para comparar com a atividade antioxidante dos extratos

etanólicos das folhas frescas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus*, pois o BHT é bastante utilizado como padrão para a atividade antioxidante (MENSOR et al. 2001).

Na Tabela 3, estão representados os resultados quantitativos da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das plantas. Portanto, observa-se que os extratos apresentaram atividade antioxidante como seqüestradores do radical livre DPPH, sendo que o extrato de *C. blanchetianus* demonstrou uma maior

atividade (isto significa um menor valor de CE₅₀) em comparação ao BHT, com CE₅₀ de 6,5±0,5 µg/mL. O extrato das folhas *C. heliotropiifolius* mostrou menor atividade antioxidante, com o valor da CE₅₀ de 50,15±0,21, superiores ao observado para o BHT.

Tabela 3. Resultados da atividade antioxidante dos extratos etanólicos das folhas de *C. heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* utilizando o radical DPPH.

µg/mL	EFCb	EFCh	BHT
5	34,42±2,38	9,35±3,78	3,30±0,06
10	73,81±2,57	13,56±1,85	10,52±0,11
25	88,65±1,35	28,72±1,6	31,82±0,22
50	98,12±1,85	48,43±8,15	60,12±0,11
125	93,29±0,96	92,06±0,5	88,03±0,49
CE _{50%}	6,5±0,5	50,15±0,21	35,50±0,50

*EFCb: Extrato das folhas de *C. blanchetianus*; EFCh: Extrato das folhas de *C. heliotropiifolius*. BHT: Butil hidroxitolueno.

A diferença na atividade antioxidante observada para os extratos etanólicos das espécies em estudo, possivelmente sejam atribuída à presença e a concentração de compostos fenólicos pertencentes a classes dos taninos e flavonóides verificados nos extratos, cuja ação antioxidante é conhecida na literatura (Arts; HOLLMAN, 2005). No entanto, a atividade antioxidante desses compostos fenólicos tem sido atribuída às suas propriedades de óxido-redução, que desempenham importante papel na adsorção ou neutralização de radicais livres (BASILE et al., 2005).

Esses compostos derivados de plantas medicinais com atividade antioxidante têm sido isolados das mais diversas famílias de plantas (BOUDET, 2007; RAZAVI et al. 2008) e os flavonóides são, por certo, as substâncias representativas desta atividade (VAN DEN BERG et al. 2000), uma vez que possuem esqueleto carbônico propício para a estabilização de radicais livres. Contudo, a intensidade da ação antioxidante exibida por estes fitoquímicos é diferenciada, principalmente devido ao número e posição de hidroxilas presentes nas moléculas (MELO et al. 2008).

A atividade antioxidante têm sido descritas em algumas espécies de *Croton*, como *C. celtidifolius* (NARDI et al. 2003), *C. nepetaefolius* (MORAIS et al. 2006) e o *C. argyrophyloides* (Catunda Jr; Luciano; MORAIS, 2002). No entanto, ainda não há relatos de estudos do potencial antioxidante com extratos das espécies de *C. blanchetianus* e *C. heliotropiifolius*, somente com óleos essenciais.

Contudo, esses estudos são preliminares e servem como ponto de partida para estudos posteriores como o isolamento, a purificação e a elucidação estrutural das substâncias que funcionam como antioxidantes, além de ajudar a inferir sobre um possível mecanismo de ação dessas substâncias, finalizando por testar a viabilidade terapêutica em antioxidantes para seu uso futuro.

CONCLUSÕES

Os estudos com os extratos botânicos *C. Heliotropiifolius* e *C. blanchetianus* resultaram na comprovação de atividade antioxidante; muito provavelmente essa atividade é atribuída à presença de compostos fenólicos identificados na análise fitoquímica dos extratos etanólicos de ambas as plantas, principalmente taninos e flavonoides.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa concedida e o auxílio para execução do projeto e ao professor Dr. José Galberto Martins da Costa Coordenador do LPPN pela preciosa contribuição na realização dessa pesquisa.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.32-36, 2005.
- BOUDET, A. M. Evolution and current status of research in phenolic compounds. **Phytochemistry**, v.68, n.4, p.22-24, 2007.
- BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; DALL'STELLA, D. S. G.; MIGUEL, M. D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, p.230-235, 2008.
- CATUNDA-JÚNIOR, F. E. A.; LUCIANO, J. H. S.; MORAIS, S. M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de plantas do Nordeste do Brasil. **Revista de Ciência & Tecnologia**, Lavras, v.4, p.23-29, 2002.
- EL-REMESSY, A. B.; BEHZADIAN, M. A.; ABOU-MOHAMED, G.; FRANKLIN, T.; CALDWELL, R. W.;

- CALDWELL, R. B. Experimental diabetes causes breakdown of the blood-retina barrier mechanism involving tyrosine nitration and increases in expression of vascular endothelial growth factor and urokinase plasminogen activator receptor. **American Journal of Pathology**, v.162, p.1995-2004. 2003.
- FONSECA, A. M.; BIZERRA, A. M. C.; SOUZA, J. S. N.; MONTE, F. J. Q.; OLIVEIRA, M. C. F.; MATTOS, M. C.; CORDEL, G. A.; BRAZ-FILHO R.; LEMOS, T. L. G. Constituents and antioxidant activity of two varieties of coconut water (*Cocos nucifera* L.). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.19, p.193-198, 2009.
- HALLIWELL, B. Free radicals and other reactive species in disease. In: Encyclopedia of Life sciences. **Nature Publishing Group**, v.1, p.1-7, 2001.
- HADJIGOGOS, K. The role of free radicals in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. **Panminerva Médica**, Torino, v.45, p.7-13, 2003.
- LA CASA, C.; VILLEGAS, I.; ALACRÓN DE LASTRA, C.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**, v.71, p.45-53, 2000.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 1 ed. UFC, 1997. 141p.
- MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytother Research**, v.15, p.127-130, 2001.
- MORAIS, S. M.; CATUNDA-JÚNIOR, F. E. A.; SILVA, A. R. A.; STONE, J.; NETO, M. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v.29, p.907-910, 2006.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v.44, p.193-201, 2008.
- NARDI, G. M.; FELIPPI, R.; DALBÓ, S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J.M.; ARRUDA, D. C.; DELLE MONACHE, F. Anti-inflammatory and antioxidant effects of *Croton celtidifolius* bark. **Phytomedicine**, v.10, p.176-84, 2003.
- PIMENTEL, F.O. **Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied. e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução de úlcera gástrica**. 2006. 111f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Estadual de Campinas-São Paulo.
- RANDAU, K. P.; FLORÊNCIO, D. C.; FERREIRA, C. P.; XAVIER, H. S. Estudo farmacognóstico de *Croton rhamnifolius* H.B.K. e *Croton rhamnifolioides* Pax & Hoffm. (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 14, p.89-96, 2004.
- NUNE, X. P.; MESQUITA, R. F.; SILVA, D. A.; LIRA, D. P.; COSTA, V. C. O.; SILVA, M. V. B.; XAVIER, A. L.; DINIZ, M. F.F.M.; AGRA, M. F. Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, p.718-723, 2008.
- RAZAVI, S. M.; NAZEMIYEH, H.; HAJIBOLAND, R.; KUMARASAMY, Y.; DELAZAR, A.; NAHAR, L.; SARKER, S. D. Coumarins from the aerial parts of *Prangos uloptera* (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, PB. v.18, p.1-5, 2008.
- REBELO, M. M.; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.19, p.230-235, 2009.
- SOUSA, C. M.; SILVA, H. R. E.; 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. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v.30, p.351-355, 2007.
- SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.17, p.368-372, 2007.
- SIKORA, E.; CIESLIK, E.; LESZCZYNSKA, T.; FILIPIAK-FLORKIWUACZ, A.; PISULEWSKI, P. M. The antioxidant activity of selected cruciferous vegetables subjected to aquathermal processing. **Food Chemistry**, v.107, p.50-55, 2008.
- VAN DEN BERG, R.; HAENEN, G.; VAN DEN BERG, H.; VANDER, V.W.; BAST, A. The predictive value of the antioxidant capacity of structurally related flavonoids using the trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay. **Food Chemistry**, v.703, p.391-395, 2000.