

Extração de compostos com potencial antioxidante de *Calycophyllum spruceanum*.

Extraction of compounds with antioxidant potential from *Calycophyllum spruceanum*.

RESUMO

Dentre as plantas que compõe a grande biodiversidade brasileira está presente a *Calycophyllum spruceanum*, muito utilizada de forma empírica por povos amazônicos para tratamento e prevenção de problemas de saúde. Relatos na literatura mostram que a *Calycophyllum spruceanum* possui atividade antioxidante capaz de reduzir o efeito deletério dos radicais livres. A grande maioria desses compostos fazem parte da classe dos compostos fenólicos. O objetivo desse estudo foi maximizar a extração dos compostos fenólicos totais (CFT) com atividade antioxidante (AA) em cascas de *Calycophyllum spruceanum* por meio de um planejamento experimental fracionado. Para isso, os efeitos das variáveis temperatura, concentração do solvente e tempo de extração foram avaliados. Como resposta da otimização, o CFT variou de 54,25 a 956,36 mg EAG g⁻¹ (Equivalente em ácido gálico) e a AA variou de 0,29 a 21,93 Mm TEAC g⁻¹ (Equivalente em trolox). Sendo que a melhor condição de extração dos compostos totais foi obtida com a menor concentração do solvente (etanol 20% v/v), tempo de extração de 60 min e temperatura de banho de 80 °C. Essa condição foi também a ideal para extrair aqueles compostos com maior atividade antioxidante, evidenciando a importância da otimização da extração por meio de um planejamento experimental.

PALAVRAS-CHAVE: Otimização. *Calycophyllum spruceanum*. Antioxidantes.

ABSTRACT

Among the plants that make up the great Brazilian biodiversity is the *Calycophyllum spruceanum*, widely used empirically by Amazonian people for the treatment and prevention of health problems. Literature reports show that this plant has antioxidant activity capable of reducing the harmful effect of free radicals. The vast majority of these compounds are part of the class of phenolic compounds. This study aimed to maximize the extraction of total phenolic compounds (TPC) with antioxidant activity (AA) in *Calycophyllum spruceanum* barks through fractional experimental design. For this, the effects of the variables temperature, solvent concentration and extraction time were evaluated. In response to the optimization, the TPC ranged from 54.25 to 956.36 mg GAE g⁻¹ (Gallic acid equivalent), and AA ranged from 0.29 to 21.93 Mm TEAC g⁻¹ (Trolox equivalent). The best condition for the extraction of total phenolic compounds was obtained with the lowest concentration of solvent (ethanol 20% v / v), extraction time of 60 min and bath temperature of 80 °C. This extraction condition was also ideal for the extracting those compounds with greater antioxidant activity. It shows the importance of optimizing extraction through experimental planning.

KEYWORDS: Optimization. *Calycophyllum spruceanum*. Antioxidants.

Bruno Henrique Fontoura

bruno-hf@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Solange Teresinha Carpes

carpes@utfpr.edu.br

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Ellen Cristina Perin

ellenperin@hotmail.com

Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, Paraná, Brasil

Recebido: 19 ago. 2020.

Aprovado: 23 out. 2020.

Direito autorial: Este trabalho está licenciado sob os termos da Licença Creative Commons-Atribuição 4.0 Internacional.



INTRODUÇÃO

É crescente nos dias atuais o número de pessoas em busca de melhoria na qualidade de vida. As pessoas buscam cada vez mais, ter uma alimentação mais equilibrada, praticar exercícios físicos e fazer uso de plantas medicinais como forma alternativa para tratamentos e prevenção de problemas de saúde (Silva; Oliveira, 2018). O uso de plantas medicinais é uma prática antiga, utilizada a milhares de anos como forma de profilaxia e tratamento (Silva et al. 2015).

O Brasil possuía a maior cobertura vegetal do mundo, com cerca de 55 mil espécies catalogadas (Pimentel et al. 2015) o que representa cerca de 24% do total mundial (Grosso et al. 2017). Entre as plantas que compõe essa biodiversidade está presente a *Calycophyllum spruceanum* conhecida popularmente como mulateiro, a qual é pertencente à família das Rubiaceas e seu local de ocorrência é a floresta Amazônica (Figueiredo et al., 2016). Essa planta, é utilizada popularmente por povos locais para tratamento de doenças intestinais e estomacais, infecções da pele e oculares, diabetes, entre outros. Além disso, ainda há estudos indicando também atividade antioxidante dessa planta (Luciana et al., 2017).

Compostos com potencial antioxidante são aqueles que através de mecanismos podem diminuir o efeito causado pelos radicais livres (Clarkson; Thompson, 2000), sendo a maioria pertencente a classe dos compostos fenólicos (Naczki; Shahidi, 2004). Nas plantas esses compostos fazem parte da classe dos metabólitos especializados e são responsáveis basicamente por funções como: proteção contra agentes bióticos e abióticos, alelopatia e perpetuação da espécie. Os compostos fenólicos são a maior classe de compostos e podem ser divididos em outros subgrupos: fenóis simples (ácidos fenólicos e cumarinas) e polifenóis (flavonoides e taninos) (Giada, 2013).

O objetivo desse trabalho foi realizar a otimização de extração dos compostos fenólicos totais com atividade antioxidante em cascas de *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os extratos e análises foram realizadas nos laboratórios de química da UTFPR – Campus Pato Branco, na Central de análises e no laboratório de qualidade agroindustrial – LAQUA, ambos vinculados a universidade.

Amostras e preparação do extrato

Cascas e entrecascas de mulateiro foram gentilmente cedidas pela empresa Fonte Clara Indústria e Comércio de Produtos Naturais LTDA, com sede no município de Bom Sucesso do Sul – PR, obtidas na zona rural do município de Alto Paraíso – RO no mês de julho de 2019.

As cascas e entrecascas do mulateiro foram secas em estufa 37 °C por 24 horas, moído (malha 30) em moinho de facas (Tecnal modelo R-TE-650/1, Piracicaba, SP, Brasil), acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas em freezer com temperatura de -12 °C até posterior análises.

Para realização do estudo foi utilizado um planejamento fatorial fracionado, visando melhorar as condições extrativas dos compostos fenólicos totais com atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP.

O extrato das cascas da *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro) foram obtidos a partir de 2 gramas de amostra e 30 mL de solvente, em banho-maria, com tempo e temperatura e concentração do solvente descritos na tabela 1, os extratos foram agitados em vórtex em intervalos de 15 min e centrifugados posteriormente a 12.000 rpm (Hermle Z200 A, Wehingen, Alemanha) durante 15 min a 20 °C. O sobrenadante foi coletado e armazenado em freezer a -12 °C até a realização das análises.

Planejamento fatorial fracionado

Foi utilizado um planejamento experimental 3^{3-1} visando a otimização da extração dos compostos com potencial antioxidante. Neste sentido, foram avaliadas três variáveis (tempo de extração, temperatura e concentração do etanol) avaliadas em três níveis: -1 para o nível mais baixo, +1 para o nível mais alto e 0 para o nível central (tabela 1), totalizando 9 execuções sendo que todas foram realizadas em triplicata.

Cada variável (tempo, concentração de solvente e temperatura) foram avaliadas em três níveis, sendo que o nível mais baixo (-1) foi: 20% de etanol, 40 °C e 30 min, o nível mais alto (+1): 60% de etanol, 60°C e 90 min e para o nível central (0): 60% de etanol, 80 °C e 60 min.

Compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos foi realizada através método espectrofotométrico de Folin-Ciocateau, utilizando ácido gálico como padrão de referência, descrito por Singleton et al. (1999). Adicionou-se 0,5 mL de extrato e 2,5 mL do reagente de Folin-Fiocateau (1:10). Após 5 minutos de repouso da mistura, foram adicionados 2,0 mL de uma solução de Na_2CO_3 4%. As soluções foram incubadas em local escuro, à temperatura ambiente e após 2 horas, foi feita a leitura da absorbância a 740 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg EAG g^{-1} de amostra (equivalente em ácido gálico).

Atividade antioxidante pelo sequestro do radical ABTS

A atividade antioxidante pelo método $\text{ABTS}^{\bullet+}$ (2,2-azino-bis-(3-etil-benzotiazolína-6-ácido sulfônico)) foi realizada de acordo com método descrito por Re et al. (1999). A reação ocorreu por uma solução $\text{ABTS}^{\bullet+}$ 7mM com persulfato de potássio 140 mM. O radical foi formado após 12-16 h de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após decorrido o tempo de incubação o radical foi diluído em etanol absoluto até a obtenção do valor de absorbância de 0,7 a 734 nm em espectrofotômetro. O Trolox, um antioxidante sintético análogo a vitamina E, foi utilizado como padrão. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em mM Trolox g^{-1} de amostra.

Atividade antioxidante pelo método FRAP

O ensaio do FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro) ocorreu de acordo com metodologia descrita por Rufino et al. (2006) baseia-se na capacidade do antioxidante reduzir o Fe^{+3} em Fe^{+2} , na presença de 2,4,6-tri(2-piridil)-1,3,5-triazina (TPTZ) e em condições ácidas, formando-se um complexo de coloração azul intensa com o Fe^{+2} . A análise foi realizada em ambiente escuro, transferindo-se uma alíquota de 100 μ L de extrato diluído e 3,0 mL de reagente FRAP. Após homogeneização, manteve-se as amostras em banho-maria à 37°C por 30 minutos. Após esse período, as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro a 595 nm. Uma curva padrão de sulfato ferroso foi realizada e os resultados da atividade antioxidante foram expressos em $mm Fe^{+2} g^{-1}$ de amostra.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa computacional STATISTICA 8.0. Os dados foram submetidos à análise de variância ($p \leq 0,05$). Em caso de significância estatística, foram comparadas as corridas pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em estudos realizados por Chew et al. (2011) os principais fatores que influenciam na extração de compostos com potencial antioxidante em plantas são tempo de extração, concentração do solvente e temperatura de extração. Neste estudo, a razão volume de solvente e quantidade de amostra foram mantidas constantes, e os resultados estão expressos na tabela 1.

Os resultados para CFT variaram de $54,25 \pm 0,16$ a $956,36 \pm 1,98$ mg EAG g⁻¹. Os resultados obtidos para análise antioxidante pelo método do sequestro do radical ABTS variaram de $0,29 \pm 0,001$ a $21,93 \pm 0,66$ mM TEAC g⁻¹. Para o método FRAP os resultados variaram entre $0,35 \pm 0,03$ e $25,04 \pm 0,98$ mM $Fe^{+2} g^{-1}$.

Tabela 1 - Planejamento experimental 3^{3-1} para extração dos compostos antioxidantes em

	Etanol (%)	Temperatura (°C)	Tempo (min)	CFT (mg GAE g ⁻¹)	ABTS (mM TEAC g ⁻¹)	FRAP (mM $Fe^{+2} g^{-1}$)
1	20 (-1)	40 (-1)	30 (-1)	731,97 \pm 3,94c*	7,75 \pm 0,003e	11,01 \pm 0,21d
2	20 (-1)	60 (0)	90 (1)	921,65 \pm 2,62b	16,05 \pm 0,16b	21,05 \pm 0,51b
3	20 (-1)	80 (1)	60 (0)	956,36 \pm 1,98a	21,93 \pm 0,66a	25,04 \pm 0,98a
4	60 (0)	40 (-1)	90 (1)	242,22 \pm 0,66e	2,86 \pm 0,03f	6,18 \pm 0,12e
5	60 (0)	60 (0)	60 (0)	322,18 \pm 3,93d	8,80 \pm 0,12d	11,60 \pm 0,39d
6	60 (0)	80 (1)	30 (-1)	325,36 \pm 2,53d	13,32 \pm 0,11c	12,99 \pm 0,11c
7	100 (1)	40 (-1)	60 (0)	60,74 \pm 1,50g	0,58 \pm 0,01g	3,41 \pm 0,06f
8	100 (1)	60 (0)	30 (-1)	54,25 \pm 0,16h	0,49 \pm 0,01gh	0,35 \pm 0,03g
9	100 (1)	80 (1)	90 (1)	91,82 \pm 0,40f	0,29 \pm 0,001h	3,36 \pm 0,01f

cascas de *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro)

Fonte: Autoria própria (2020)

*Letras diferentes indicam diferença estatística ($p < 0,05$) pelo teste de Tukey entre as execuções.

Com os resultados obtidos é possível observar que em concentrações maiores de etanol (100% e 60%) houve uma diminuição na extração de compostos fenólicos. Essa tendência também foi observada para a atividade antioxidante pelos dois métodos de avaliação utilizados neste estudo. Por outro lado, pode-se observar que conforme ocorre a diminuição da concentração do solvente há uma maior extração dos compostos com atividade antioxidante.

Ao avaliar a variável temperatura de extração, observou-se que em maiores temperaturas houve uma maximização da extração dos compostos com atividade antioxidante, enquanto que em relação a variável tempo de extração, os tempos intermediários (60 min) apresentaram os melhores resultados. De maneira geral, os maiores valores de CFT ($956,36 \pm 1,98$ mg EAG g^{-1}) e atividade antioxidante ($21,93 \pm 0,66$ mM TEAC g^{-1} e $25,04 \pm 0,98$ mM Fe^{+2} g^{-1} pelos métodos ABTS e FRAP, respectivamente) foram alcançados no ensaio com etanol na concentração de 20% v/v, em banho-maria a 80 °C durante 60 min de extração.

Apesar da *Calycophyllum spruceanum* (mulateiro) ser ainda pouco estudada, é possível encontrar alguns relatos sobre a atividade antioxidante para esta planta. De fato, em estudos realizado por Magrini (2016), o qual obteve em extratos etanólico 70% (v/v) em cascas dessa planta, valores de atividade antioxidante expresso em IC_{50} igual a $25,03 \mu g mL^{-1}$ (pelo sequestro do radical ABTS), enquanto que em extrato aquoso o autor conseguiu $16,10 \mu g mL^{-1}$ expresso da mesma forma. Segundo, Anjos et al. (2018) o teor de compostos extraídos pode ser influenciado pelo momento da coleta das plantas, por fatores climáticos e pela quantidade de metabolitos presentes. Além disso, diferenças nas formas de expressar os resultados dificultam uma comparação.

Estudo conduzidos por Filho et al., (2014) com a planta *Guettarda platypoda* pertencente a família Rubiaceae, mesma família da *Calycophyllum spruceanum* os autores reportaram a presença de taninos e flavonoides. Em estudos com *Richardia brasiliensis* também da mesma família da *Calycophyllum spruceanum* Figueiredo et al., (2009) relataram também a presença de flavonoides. Vale salientar que taninos e flavonoides são compostos pertencentes a classe dos compostos fenólicos já conhecidos pela sua atividade antioxidante (Angelo; Jorge, 2007).

A análise estatística realizada pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) indicou que há diferença significativa entre todas os extratos analisados. De fato, o melhor resultado foi obtido pelo ensaio 3 enquanto a condição que promoveu a menor extração dos compostos foi o ensaio 8. Para as análises de atividade antioxidante pelos métodos ABTS e FRAP a melhor condição foi a 3 para os dois métodos de análise resposta e a condição que promoveu a menor extração foram as amostras 9 e 8 respectivamente.

CONCLUSÃO

Na busca por plantas com potencial antioxidante é importante que estudos sejam realizados a fim de garantir resultados mais seguros. Podemos observar que a elaboração de um planejamento experimental garante uma melhor otimização da extração de compostos com potencial antioxidante. Neste estudo foi possível observar que o melhor desempenho em termos de extração dos compostos fenólicos com atividade antioxidante foi obtido em concentração menores de etanol à alta temperatura e em tempos maiores de extração. Nesta busca pela maximização dos resultados podemos ainda realizar outros planejamentos experimentais com a finalidade de melhorar ainda mais a extração. Estudos qualitativos podem ainda ser realizados com a finalidade de classificar quais são os compostos presentes e definir possíveis aplicações.

AGRADECIMENTOS

A empresa Fonte Clara indústria e comércio de produtos naturais LTDA pelo incentivo a pesquisa cedendo gentilmente as amostras de mulateiro, UTFPR pelo aporte financeiro, Central de análises e LAQUA por ceder espaço e equipamentos para a realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Phenolic compounds in foods – A brief review. **Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ANJOS, A.; MELO, A. DE; BATISTA, A. M.; et al. Fitoquímicos e atividade antioxidante das espécies *Lafoensia pacari* e *Calycophyllum spruceanum*. **Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 15, p. 530–543, 2018.

CHEW, K. K.; NG, S. Y.; THOO, Y. Y.; et al. Effect of ethanol concentration, extraction time and extraction temperature on the recovery of phenolic compounds and antioxidant capacity of *Centella asiatica* extracts. **International Food Research Journal**, v. 18, p. 571–578, 2011.

CLARKSON, P. M.; THOMPSON, H. S. Antioxidants: What role do they play in physical activity and health? **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 2 SUPPL., 2000.

FIGUEIREDO, A.; BUSTAMANTE, K.; SOARES, M.; et al. Avaliação da atividade antimicrobiana das partes aéreas (folhas e caules) e raízes de *Richardia brasiliensis Gomez* (Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, 2009.

FIGUEIREDO, F. D. A.; FARIA, F. S. E. D. V.; RODRIGUEZ, A. F. R.; et al. Mulateiro (*Calycophyllum spruceanum*) Stem Cell Extract: An Evaluation of Its Anti-Aging Effect on Human Adult Fibroblasts. , v. 7, n. 11, p. 87–90, 2016.

FILHO, P.; CLEANE, M.; TERESINHA, G. Free radical-scavenging activity and cytotoxicity from leaves of *Guettarda platypoda*. **Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. October, 2014.

GIADA, M. DE L. R. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power, Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants. **Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants**, p. 87–112, 2013.

GROSSO, M.; ROCHA, F.; OLIVEIRA, A. DE; et al. Prevalência e fatores associados ao uso de benzodiazepínicos em idosos da comunidade. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 20, n. 4, p. 463–474, 2017.

MAGRINI, V. **Estudo fitoquímico dos extratos de folhas, galhos e cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth para testes de potencial de cosmético funcional**, 2016. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 2004.

PIMENTEL, V.; VIEIRA, V.; FELIPE, T. M.; JOÃO, F.; PIERONI, P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, , n. 43, p. 41–89, 2015.

RUFINO, SOCORRO MOURA; ALVES, R. E.; SOUSA DE BRITO, E.; et al. FRAP embrapa. , p. 3–6, 2006.

SILVA, A. B.; ARAÚJO, C. R. F. DE; MARIZ, S. R.; et al. O Uso De Plantas Mediciniais Por Idosos Usuários De Uma Unidade. **Revista de Enfermagem UEPE On Line**, v. 9, p. 7636–7643, 2015.

SILVA, M. I. DA; OLIVEIRA, H. B. DE. Development of software with guidelines on the use of medicinal plants most used in the south of Minas Gerais. **Brazilian Applied Science Review**, v. 2, n. 3, p. 1104–1110, 2018.

SINGLETON, V.; LIBBEY, L. M.; WALRADT, J. P. analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Anitoxidants by Means Of Folin-Ciocalteu Reagent. *Lipids*, v. 3, n. 6, p. 561, 1999.