

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIOXIDANTE DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE MUCUÍBA
(*Virola Sebifera*)**

Ana Clara Alcantara Rodrigues¹; Elisandra Scapin²;

¹Aluno do Curso de Engenharia Ambiental; Campus de Palmas -TO; e-mail: anaclara.alcantara.r@gmail.com
“PIBIC/CNPq”

²Orientadora do Curso de Engenharia Ambiental; Campus de Palmas- TO; e-mail: scapin@mail.uft.edu.br

RESUMO

A *virola sebifera*, popularmente conhecida como mucuíba, é uma espécie arbórea amplamente distribuída pelo território brasileiro, sendo comum nas áreas que correspondem ao Cerrado e a Savana Amazônica. Na medicina popular a mucuíba possui diversas indicações terapêuticas, com estudos de suas propriedades fitoquímicas que relatam a presença de grande diversidade de metabólitos secundários. Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivos investigar as propriedades químicas da mucuíba a fim de contribuir para o conhecimento sobre a espécie. Para a investigação, foram realizadas extrações pelos métodos à quente (soxhlet) e à frio (ultrassom) utilizando os solventes hexano, metanol e etanol. Os extratos foram submetidos a triagem fitoquímica, caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e tiveram a atividade antioxidante avaliada pelo método de DPPH. A triagem fitoquímica apresentou resultados satisfatórios quanto à diversidade de metabólitos encontrados, estando presente entre eles, antraquinonas, flavonoides e taninos. A caracterização por CLAE revelou a presença de compostos como, catequina, ácido siríngico, ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico e morina. Os extratos, com exceção do extrato hexano, apresentaram ação antioxidante satisfatória, tendo destaque para essa atividade o extrato etanol, apresentando $IC_{50} = 26,46 \pm 0,58 \mu\text{g/ml}$, sendo semelhante ao valor encontrado no padrão rutina. Os componentes encontrados na espécie ratificaram sua indicação como planta de possível uso medicinal, fomentando pesquisas acerca da espécie.

Palavras-chave: *Virola sebifera*; fitoquímica; atividade antioxidante; metabólitos secundários.

INTRODUÇÃO

As plantas representam uma fonte promissora para a obtenção de produtos naturais. Com o crescimento da utilização de medicamentos fitoterápicos na última década, o uso farmacêutico das plantas tem sido colocado em evidência (BRESOLIN; CECHINEL FILHO, 2010).

A fitoquímica é responsável pela caracterização estrutural, e a avaliação das propriedades de substâncias naturais extraídas das plantas, denominadas metabólitos secundários (BRAZ FILHO, 2010). Esses constituintes apresentam diversos metabolitos com funções biológicas como: lignóides com propriedades, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral entre outros; flavonoides com atividade antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral; alcalóides com potencial citotóxico; taninos com atividades bactericida, antioxidante, antiviral e saponinas com ação hemolítica, anti-inflamatória e antiviral (SIMÕES et al., 2017).

A *Virola sebifera*, conhecida popularmente como mucuíba, é uma espécie arbórea com larga dispersão, encontrada em quase toda a América tropical desde Nicarágua ao Peru, Bolívia e Brasil (RODRIGUES, 1980). No Brasil, a espécie se encontra amplamente distribuída pelo território (LORENZI, 2000), sendo comum nas áreas que correspondem ao Cerrado e a Savana Amazônica (MMA, 2011), especificamente no estado do Tocantins a espécie está presente no norte do estado, na região do bico do papagaio (OLMOS et al., 2004).

É uma das espécies da família Myristicaceae mais quimicamente investigadas, possuindo inclusive aplicações na indústria de cosméticos (PEREIRA, 2009). Estudos sobre o perfil fitoquímico, realizados com diferentes partes da planta, relataram a presença de uma vasta diversidade de metabólitos secundários, como os policetídeos (DENNY et al., 2008), alcaloides (KAWANISHI et al., 1985) e uma ampla variedade de lignanas (REZENDE et al., 2005; ENDERS et al., 2005; DANELUTTE et al., 2000).

Na medicina popular a mucuíba possui diversas indicações terapêuticas, com destaque para o tratamento de úlcera, inflamações e feridas, sendo utilizado para o tratamento dessas enfermidades as cascas e as sementes da planta (COSTA et al., 2008; FENNER et al., 2006).

Diante disso, o estudo executado teve como objetivo realizar a triagem fitoquímica dos extratos da folha da *Virola sebifera*, a fim de identificar suas principais classes de metabólitos secundários e também a avaliação de sua capacidade de atuar como agente antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção do material

O material botânico foi coletado nas coordenadas S 10°25'12" O 48°16'47", no município de Porto Nacional, Tocantins. O material foi levado para estufa à 60°C por 48 horas, em seguida foi triturado em moinho de facas e armazenado sob ausência de luz.

Extração

A preparação do extrato bruto foi realizada pela extração a frio em Ultrassom e a quente em Soxhlet. Na extração a frio, o material vegetal (5 gramas do pó da folha) foi misturado com 80 mL de etanol 70%, em um béquer (500mL) e extraído sucessivamente por ultrassom. O frasco da amostra foi imerso em um banho de ultrassom (USC1600, ULTRASONIC CLEANER, UNIQUE, São Paulo, Brasil) que possui frequência de 40 kHz (135 W), por um ciclo de 1 h em temperatura ambiente. Para cada extração de solvente, o processo foi repetido cinco vezes combinando os sobrenadantes. Finalizado esta etapa a amostra foi filtrada.

A extração a quente foi realizada por meio do Soxhlet, a partir de 5 g do pó da folha vegetal em 200 ml do solvente. Inicialmente foi realizada a extração utilizando etanol 70% para obtenção do extrato bruto. Também foi realizada a extração sequencial, por meio do Soxhlet, usando os solventes *n*-hexano, metanol e etanol 70%, em ordem crescente de polaridade, para extrair os componentes máximos.

Todos os extratos obtidos tiveram os solventes recuperados em evaporador rotativo a -600 mmHg (Fisaton 801, Brasil) e a 45 °C. As amostras concentradas foram congeladas a -70° C e depois liofilizadas no Liofilizador de bancada L101 da LIOTOP, finalizando o processo com o armazenamento em frasco âmbar a 4 °C.

Triagem Fitoquímica

Os extratos foram submetidos a uma série de testes químicos qualitativos de identificação de grupos de metabólitos secundários através de reações de coloração e/ou precipitação de acordo com a metodologia desenvolvida por Mouco et al. (2003), Amorim et al. (2008) e Lin et al. (2009).

Avaliação da atividade antioxidante

A avaliação da capacidade antioxidante foi determinada pelo método DPPH estabelecido por Brand Willims et al. (1995) seguindo as descrições de Peixoto Sobrinho et al. (2011) com modificações, tendo o padrão rutina como controle positivo. Foram misturados 0,5 mL de diferentes concentrações dos extratos ou padrões (20 – 200 µg/mL, p/v) a uma solução metanólica de DPPH (3 mL a 40 µg/mL, p/v). O branco foi preparado substituindo o DPPH por metanol no meio reacional. O complexo reacional e o branco foram agitados e mantidos no escuro por 30 min, as absorbâncias medidas a 517 nm em espectrofotômetro calibrado com metanol. Como controle negativo foi utilizado

à solução de DPPH a 40 µg/mL. A atividade de remoção de radicais livres ou atividade antioxidante foi expressa como a porcentagem de inibição determinada pela equação:

$$\% \text{ AA} = \text{ABS}_{\text{Scn}} - (\text{ABS}_{\text{amostra}} - \text{ABS}_{\text{branco}}) / \text{ABS}_{\text{Scn}} \times 100$$

onde % AA é a porcentagem de atividade antioxidante; ABS_{Scn}, a absorbância do controle negativo; ABS amostra, a absorbância da amostra; ABS branco, a absorbância do branco. Utilizou-se as curvas de calibração obtidas pela plotagem das diferentes concentrações em relação à % AAs, e foi calculada a concentração eficiente, quantidade de amostra necessária para diminuir a concentração inicial de DPPH em 50% (IC₅₀), que foi expressa em µg/mL.

Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os extratos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando um cromatógrafo Shimadzu® (série LC-10 Avp) equipado com uma bomba LC-10AD, desgaseificador DGU-14A, Detector UV-vis SPD-10A, forno coluna CTO-10A, injetor manual Rheodyne (circuito de 20 µL) e um integrador CLASSE LC-10A. A separação foi realizada utilizando uma coluna Phenomenex Luna de fase reversa C18 de 250 × 4,6 mm de tamanho de partícula de 5 µm. A fase móvel se consistiu de ácido fosfórico 0.1% em água (fase A) e ácido fosfórico 0.1% em água/acetonitrila/metanol (54:35:11 v/v) (fase B) sob o seguinte perfil de gradiente: 0–5 min, 0% B; 5–10 min, 30% B, 10–20 min, 40% B, 20–60 min 40% B, 60–70 min 50% B, 70–90 min 60% B, 90–100 min 80% B, 100–110 min 100% B. 110–120 min 100% B, fluxo: 1 ml/ min; temperatura: 22 ° C. Detecção UV a 280 nm.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Triagem Fitoquímica Preliminar

Os testes químicos qualitativos realizados nos extratos da folha de *V. sebifera* apresentaram resultados preliminares satisfatórios, indicando grande potencial bioativo para a planta, os resultados estão expostos na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados das reações indicativas da presença ou ausência de grupo de metabólito secundário nos extratos EBU (Extrato Bruto Ultrassom), EB (Extrato Bruto etanol 70%), EH (Extrato Hexano), EM (Extrato Metanol), EE (Extrato Etanol).

Grupo de Metabólitos Secundários	Testes de Identificação	EBU	EB	EH	EM	EE
Flavonoides 1	reação de Shinoda	+	+	-	+	+
Flavonoides 2	cloreto férrico	+	+	+	+	+
Flavonoides 3	hidróxido de sódio	+	+	+	+	+
Taninos 1	cloreto férrico	+	+	-	+	+
Taninos 2	acetato de chumbo	+	+	-	+	+
Taninos 3	acetato de cobre	+	+	-	+	+
Taninos 4	acetato de chumbo e ácido acético	-	-	-	+	-
Saponinas	qualitativo de espuma	-	-	-	-	-
Fitoesteróis	sulfato de fosfato férrico	-	-	-	-	-
Antraquinonas	hidróxido de sódio	+	+	-	+	+
Alcalóides	Reagente de Drangedorff	+	+	+	+	+

(+) resultado positivo; (-) resultado negativo.

Atividade antioxidante

Os extratos obtidos da *V. sebifera* com exceção do extrato hexânico EH, manifestaram atividade sequestradora do radical DPPH. O EH mostrou valores de atividade antioxidante inferiores a 50%, concentração capaz de reduzir o DPPH em 50%, inviabilizando a determinação do IC₅₀. Os resultados para os testes estão expostos na tabela 2 e Figura 1.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão da concentração eficiente necessária para reduzir a absorvância do DPPH em 50 % dos extratos de *V. sebifera*. Resultados expressos em µg/mL. EBU (Extrato Bruto Ultrassom), EB (Extrato Bruto etanol 70%), EH (Extrato Hexano), EM (Extrato Metanol), EE (Extrato Etanol).

EXTRATOS	DPPH IC ₅₀ (µg/mL)
EBU	30,41 ± 0,98 C
EB	31,86 ± 0,31 C
EM	38,32 ± 1,59 D
EE	26,46 ± 0,58 B
RUTINA	22,21 ± 0,24 A

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p > 0,05$).

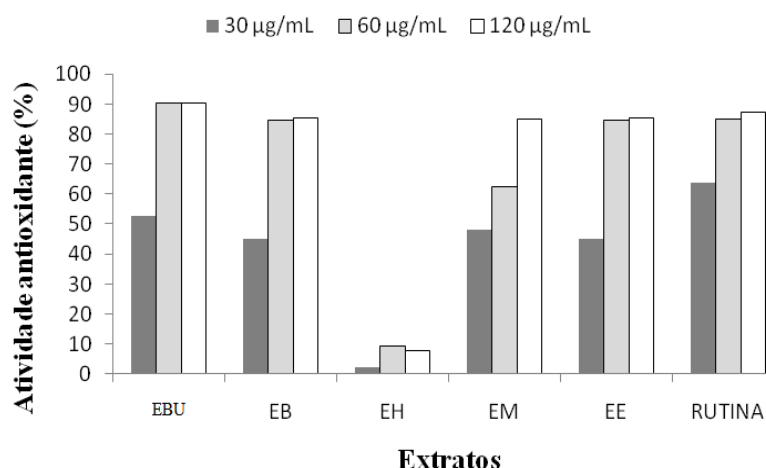


Figura 1. Atividade antioxidante dos extratos medidas no ensaio DPPH, em três concentrações diferentes (30, 60 e 120 µg.mL⁻¹). Os valores representam a porcentagem da eliminação de radicais. EBU: extrato bruto, etanol 70%, Ultrassom; EB: extrato bruto, Etanol 70%, Soxhlet; EH: extrato hexano, Soxhlet, EM: extrato metanol, Soxhlet e EE: extrato etanol; Soxhlet.

Caracterização por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Os metabólitos detectados nos extratos da folha de *V. sebifera* são apresentados na Tabela 3 e os perfis cromatográficos obtidos por CLAE são mostradas na Figura 2.

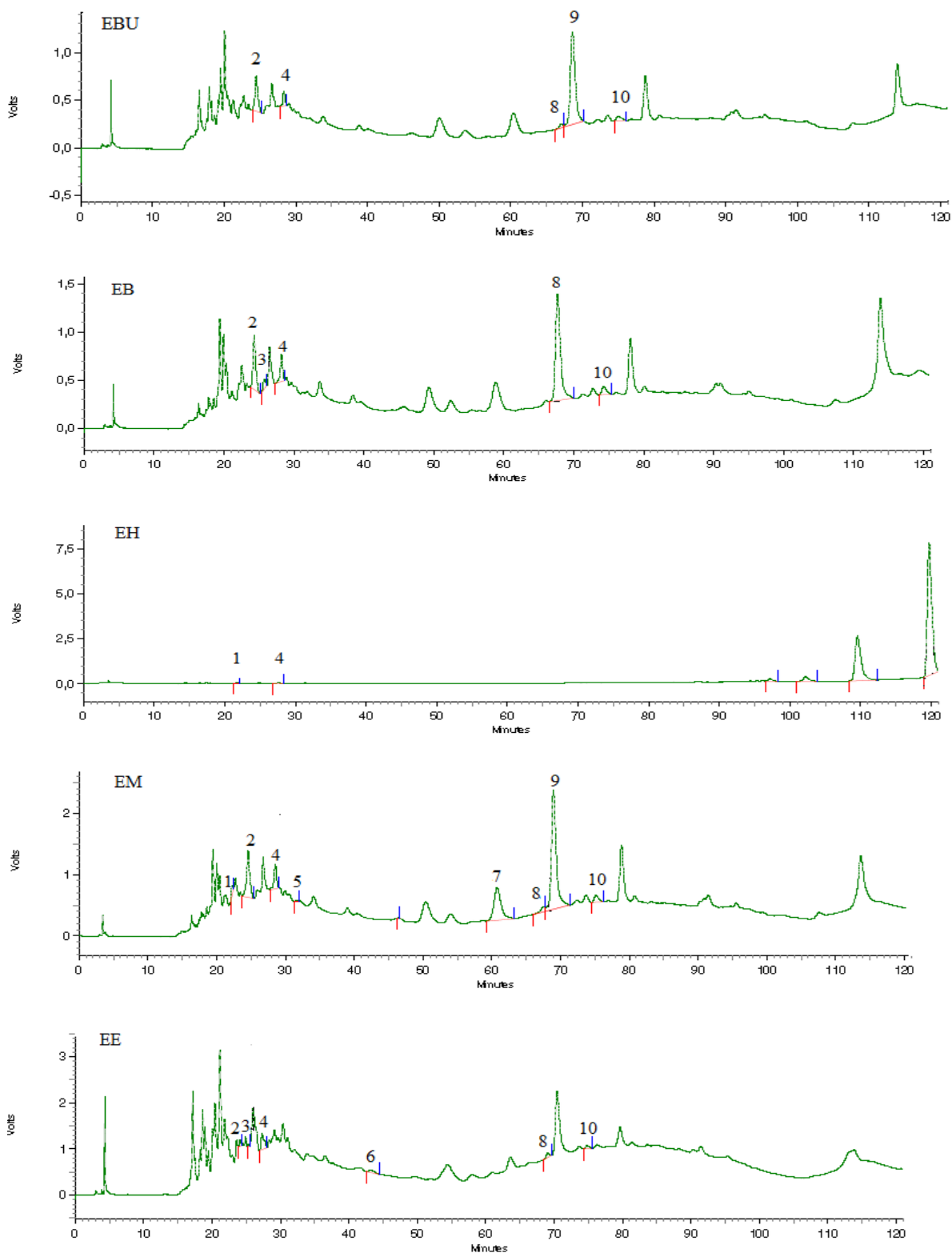
Tabela 3: Compostos fenólicos identificados por CLAE nos extratos EBU (Extrato Bruto Ultrassom), EB (Extrato Bruto etanol 70%), EH (Extrato Hexano), EM (Extrato Metanol), EE (Extrato Etanol) da folha de *V. sebifera*.

Compostos fenólicos	Área dos extratos (%)				
	EBU	EB	EH	EM	EE
Catequina	-	-	0,159	1,09	-
Ácido siríngico	16,144	17,906	-	13,221	10,193
Ácido clorogênico	-	2,877	-	-	2,53
Ácido <i>p</i> -cumárico	5,34	8,231	0,296	5,593	48,246
Naringina	-	-	-	0,199	-
Rutina	-	-	-	-	14,093
Hesperidina	-	-	-	21,8	-
Morina	2,276	66,331	-	1,996	14,357
Ácido rosmarínico	72,646	-	-	53,23	-
Quercetina	3,595	4,655	-	2,851	10,581

(-) não detectado.

Figura 2. Perfil cromatográfico via CLAE dos extratos da folha de *V. sebifera*, detectados a 280 nm. EBU extrato obtido pelo método a frio (Ultrassom); EB, EH, EM e EE extratos obtidos pelo método a quente

(Soxhlet). Pico 1: catequina, Pico 2: ácido siríngico, Pico 3: ácido clorogênico, Pico 4: ácido *p*-cumárico, Pico 5: naringina, Pico 6: rutina, Pico 7: hesperidina, Pico 8: morina, Pico 9: ácido rosmarínico e Pico 10: quercetina



As análises por CLAE confirmaram os dados obtidos na prospecção fitoquímica preliminar, constatando diversidade semelhante de metabólitos para os extratos. Os cromatogramas dos extratos demonstraram uma matriz de compostos fenólicos diversa para a *V. sebifera*, dentre eles encontram-se,

ácidos fenólicos (ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico e ácido clorogênico) e flavonoides (morina, quercetina, catequina, hesperidina, naringina e rutina). Conforme apresentado na Tabela 3 e Figura 2.

As classes de compostos encontradas estão de acordo com resultados já observados na literatura. Scapin et al. (2020) identificou perfil fitoquímico semelhante nos extratos brutos da casca da *V. sebifera*, onde foram detectados o ácido gálico, ácido elágico e alguns flavonoides, dentre eles, a naringina, morina, quercetina e rutina. No geral, esses metabólitos secundários, estão relacionados à várias atividades terapêuticas, sendo as mais observadas entre elas, as atividades, antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória assim como observado por Pereira (2017) e Soares (2002). Dessa forma o estudo realizado ressalta as indicações terapêuticas da *V. sebifera*, e evidencia a importância de pesquisas acerca de seus constituintes químicos.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil e a Universidade Federal do Tocantins.

LITERATURA CITADA

AMORIM, E. L. C. et al. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.

BRAND-WILLIMS, E. Use of a free radical method to evaluate antioxidante activity. **Food Science and Technology**. 28: p. 25-30, 1995.

BRAZ-FILHO, R. **Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente**. Quim. Nova, v. 33, n. 1, p. 229-231, 2010.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: Santos, 416 p, 2010.

COSTA, E. S. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytotherapy research**, v. 22, n. 5, p. 705-707, 2008.

DANELUTTE, A. P.; CAVALHEIRO, A. J.; KATO, M. J. Lignoids in seedlings of *Virola sebifera*. **Phytochem. Anal.**, v. 11, p. 383–386, 2000.

DENNY, C. et al. Antiproliferative properties of polyketides isolated from *Virola sebifera* leaves. **Phytother. Res.**, v. 22, p. 127–130, 2008.

ENDERS, D. et al. First asymmetric synthesis and determination of the absolute configuration of a lignan isolated from *Virola sebifera*. **Eur. J. Org. Chem**, p.1984–1990, 2005.

FENNER, R. et al. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**. v. 42, n. 3, (Jul./set. 2006), p. 369-394, 2006.

KAWANISHI, K.; UHARA, Y.; HASHIMOTO, Y. Alkaloids from the hallucinogenic plant *Virola sebifera*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 6, p. 1373-1375, 1985.

LIN, Y. et al. Microbial transformation of phytosterol in corn flour and soybean flour to 4-androstene-3, 17-dione by *Fusarium moniliforme* Sheld. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1864-1867, 2009.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**, v. 1. 3ª ed., Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2000.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE – MMA. **Guia de campo: vegetação do Cerrado 500 espécies**. Brasília: MMA/SBF, 2011.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J.; CORNÉLIO, M. L. Controle de qualidade de ervas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 31, p. 68-73, jul./dez., 2003.

OLMOS, F. et al. Secretaria do Planejamento e Meio Ambiente (Seplan). Diretoria de Zoneamento Ecológico-Econômico. Projeto de Gestão Ambiental Integrada da Região do Bico do Papagaio. **Zoneamento Ecológico-Econômico. Estudo de Flora e Fauna do Norte do estado do Tocantins**. Palmas: Seplan/DZE, 154 p. (ZEE - Tocantins), 2004.

PEIXOTO-SOBRINHO, T. J. D. S. *et al.* Phenolic content and antioxidant capacity of four *Cnidocolus species* (Euphorbiaceae) used as ethnopharmacologicals in Caatinga, Brazil. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 5: p. 2310-2316, 2011.

PEREIRA, M.A.V., **Caracterização E Desenvolvimento De Metodologias Para Análise Simultânea De Ésteres Derivados Do Ácido P-Cumárico Por Métodos Instrumentais**. (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal. 2017.

PEREIRA, N. P. Sustainability of cosmetic products in Brazil. **Journal of Cosmetic**, v. 8, n. 3, p. 160-161, 2009.

REZENDE, K. R. et al. Antioxidant activity of aryltetralone lignans and derivatives from *Virola sebifera* (Aubl.). **Natural Product Research**, v. 19, n. 7, p. 661–666, 2005.

RODRIGUES, W. A. Revisão taxonômica das espécies de *Virola Aublet* (Myristicaceae) do Brasil. **Acta Amazônica**, v. 10, n. 1, Suplemento, 1980.

SCAPIN, E. *et al.* Análise fitoquímica e caracterização química via CLAE da *Vellozia Flavicans* Mart., *Brosimum Gaudichaudii* Trécul. e *Virola Sebifera* Aubl., espécies típicas do Cerrado tocaninense. In: **Biodiversidade e Biotecnologia no Cerrado Tocantinense** – v. 1, Curitiba, Ed. CRV, capítulo IV, p. 73-90, 2020.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento**. Porto Alegre, Artmed, 2017.

SOARES, S.E., Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants. **Rev. Nutr.** v.15 n.1 Campinas Jan., 2002.