

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *CARYOCAR CORIACEUM* WITTM. : ESTUDO *IN VITRO*

Sandra Mara Pimentel Duavy¹, Lidianny Juca da Silva², José Galberto Martins da Costa¹, Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues¹

Resumo

Caryocar coriaceum (Caryocaraceae), popularmente conhecida como pequi, é uma espécie endêmica da Chapada do Araripe, Ceará. Na medicina popular seu fruto é comumente utilizado para tratamento de infecções e inflamações, propriedades também demonstradas em modelos experimentais. Entretanto, existem poucos estudos sobre a folha desta planta. Dessa forma, objetivou-se investigar a toxicidade, as características fitoquímicas e a atividade antioxidante de extratos aquoso e etanólico de folhas do *Caryocar coriaceum*. O material vegetal foi identificado no Herbário Cariense Dárdamo de Andrade-Lima (HCDAL) sob registro 6684. O extrato etanólico foi concentrado em evaporador rotativo e o extrato aquoso foi submetido à ebulição e posteriormente liofilizado. Quanto à toxicidade à *Artemia salina*, os extratos aquoso (18,5 µg/mL) e etanólico (14,9 µg/mL) apresentaram Concentração Letal (CL₅₀) inferior ao controle positivo (55,9 µg/mL). Em relação à prospecção fitoquímica, verificou-se a presença de taninos, fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis e flavononas. Quanto a atividade antioxidante, os resultados demonstraram um considerável efeito dos extratos aquoso (CE50=2,70µg/mL) e etanólico (CE50=3,24 µg/mL) quando comparado ao controle positivo (CE50=42,0 µg/mL - BHT). A partir dos resultados obtidos, evidencia-se a necessidade da realização de testes mais específicos para quantificar e caracterizar os compostos bioativos assim como para comprovar a atividade antioxidante dos extratos para que seja estendido a ensaios experimentais *in vivo*.

Palavras-chave: *Caryocar coriaceum* Wittm., Antioxidante, Toxicidade.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF LEAVES EXTRACTS *CARYOCAR CORIACEUM* WITTM. : STUDY *IN VITRO*

Abstract

Caryocar coriaceum (Caryocaraceae), popularly known as pequi, is an endemic species of the Araripe, Ceará. In folk medicine the fruit is used to treat infections and inflammations, properties also demonstrated in experimental models. However, there is few studies regarding to pharmacological properties of leaves from pequi. Hence, this study was aimed to investigate the toxicity properties phytochemical and antioxidant activity of aqueous extracts, ethanolic leaves *C. coriaceum*. The plant material was identified in the HCDAL under register 6684. The extracts were prepared from the fresh leaves of *C. coriaceum* getting the aqueous and ethanol extracts. the aqueous (18,5 µg/mL) and ethanolic (14,9 µg/mL) extracts showed a LC₅₀ lower than the positive control (55,9 µg/mL). Regarding the phytochemical compounds, it was found tannins, fenols, flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis e flavononas. In

¹ Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade Regional do Cariri, Rua Cel. Antônio Luiz 1161, Pimenta, 63105-000 Crato-CE, Brasil

² Bolsista PIBIC-URCA. Departamento de Enfermagem da Universidade Regional do Cariri.

the antioxidant activity evaluation, both extracts exhibited a considerable antioxidant potential when compared to positive control. From the results found in this study, there is a need to conduct further research to substantiate the use of these compounds for therapeutic purposes.

Keywords: *Caryocar coriaceum* Wittm, Antioxidant, Toxicity.

1. Introdução

Embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, com cerca de 60.000 espécies vegetais superiores catalogadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006), apenas 8% foram estudadas para pesquisas de compostos bioativos e 1.100 espécies foram avaliadas com relação às propriedades medicinais (GUERRA et al., 2001).

No estado do Ceará, na Chapada do Araripe, o fruto da espécie do *Caryocar coriaceum* Wittm., popularmente conhecida como pequi é comumente consumido em pratos típicos regionais e se destaca na medicina popular pela utilização no tratamento de doenças inflamatórias, cicatrização de feridas, lesões gástricas (QUIRINO et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2008). Por outro lado, existem poucas informações disponíveis na literatura especializada sobre essa espécie, principalmente em relação ao uso das folhas (VIZZOTTO, KROLOW, WEBER, 2010).

Dados da literatura têm demonstrado que os compostos químicos presentes na folha do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) podem ser efetivos em reduzir danos oxidativos nos seres humanos, os quais estão envolvidos na gênese e/ou desenvolvimento de várias doenças via estresse oxidativo (PORTO, 2008). Assim, estudos voltados para a avaliação das características químicas e propriedades biológicas das folhas do *Caryocar coriaceum* Wittm constituem-se em um amplo campo de pesquisa, bem como contribuirão para aumentar o conhecimento sobre plantas naturais usados na medicina popular.

Com base nos aspectos abordados acima, este estudo foi delineado para determinar a composição fitoquímica e o potencial antioxidante de extratos de folhas de do *Caryocar coriaceum*, bem como avaliar seus possíveis efeitos tóxicos.

2. Material e métodos

2.1. Material botânico

As folhas foram obtidas em janeiro/2012 na Chapada do Araripe, Crato – Ceará e uma amostra representativa da espécie foi depositada no Herbário Caririense Dárdamo de Andrade-Lima– HCDAL do Departamento de Ciências Biológicas (Universidade Regional do Cariri-URCA) e identificada sob registro 6684.

2.2. Preparação dos extratos

Os extratos aquoso e etanólico foram preparados a partir das folhas frescas do pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.). Para a obtenção do extrato etanólico, o material vegetal previamente triturado foi concentrado com Etanol P.A por 72 h. Em seguida, o solvente foi destilado em evaporador rotativo a 80°C sob pressão reduzida. O processo utilizado foi o de extração a frio com solvente orgânico, segundo metodologia de MATOS, 1997. O extrato etanólico bruto obtido foi pesado e armazenado a temperatura ambiente até a realização dos ensaios experimentais.

Para obtenção do extrato aquoso, o material vegetal foi previamente triturado e submetido à ebulição em placa quente por 2 horas. O extrato obtido foi então filtrado, liofilizado, pesado e armazenado à temperatura ambiente até a realização das análises experimentais.

2.3 Ensaios *in vitro*

2.3.1 Toxicidade à *Artemia salina*

Os possíveis efeitos tóxicos dos extratos foram avaliados com o microcrustáceo *Artemia salina* através do método proposto por MEYER, 1982. Os microcrustáceos foram expostos a diferentes concentrações dos respectivos extratos (1-1000µg/ml) durante um período de 24 horas. Após este período, foi feita a leitura de larvas sobreviventes. Concomitantemente, um grupo controle positivo foi preparado com água marinha e dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇); e um controle negativo com água marinha e Tween 80. As análises foram feitas em triplicatas e o cálculo da CL₅₀ foi realizado por regressão linear, sendo considerado significativo quando CL₅₀ < 1000 µg/mL.

2.3.2 Prospecção fitoquímica

Os testes fitoquímicos para detectar a presença de classes de metabólitos secundários foram realizados segundo o método descrito por MATOS, 1997. Esses ensaios se baseiam na observação visual por mudança de coloração ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos.

2.3.3 Redução do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O potencial antioxidante dos diferentes extratos foi pelo método fotolorimétrico através da redução do radical livre estável DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazil) (MENSOR et al., 2001).

As amostras foram preparadas adicionando-se 1 ml da solução de DPPH (60µM) em 2,5ml de soluções dos extratos nas concentrações finais de 5, 10, 25, 50, 125 e 250µg/ml (n=3). Um teste (branco) foi realizado adicionando-se 1ml de etanol a 2,5 ml das concentrações dos extratos. Como controle negativo foi utilizado a mistura de 1 ml da solução de DPPH com 2,5 ml de etanol e como controle positivo utilizou-se 2,5 ml das concentrações de BHT (butil-hidroxitolueno) e 1 ml da solução de DPPH. Após 30 minutos de reação (ambiente escuro), as absorvâncias foram lidas com auxílio de um Espectrofotômetro de Ultravioleta UV-Vis em 518nm. Neste ensaio, a atividade antioxidante de uma amostra pode ser visualizada pela progressiva descoloração da solução de DPPH, a qual possui coloração roxa (NUNE et al., 2008).

Através de regressão linear, obteve-se a Concentração Efetiva (CE₅₀) de extrato capaz de diminuir 50% da concentração inicial de DPPH (MENSOR et al., 2001).

3. Resultados e discussão

3.1 Toxicidade

Os testes de toxicidade são elaborados com o objetivo de avaliar ou prever os efeitos de substâncias tóxicas nos sistemas biológicos (BAROSA et al., 2003). Vários trabalhos indicam que o ensaio com *Artemia salina* mimetiza eficientemente análises citotóxicas em linhagens de células humanas (MEYER, 1982). Assim, avaliação de toxicidade geral é considerada fundamental como um bioensaio preliminar no estudo de substâncias com propriedades biológicas. Neste contexto, os extratos de *C. coriaceum* foram submetidos ao ensaio de toxicidade frente larvas de *Artemia salina*, para obtenção da concentração letal (CL₅₀), ver Tabela 1.

Tabela 1- Efeito dos extratos de folhas de *Caryocar coriaceum* sobre à *Artemia salina*.

EXTRATOS	CL ₅₀
EAF* µg/ml	18,5
EEF# µg/mL	14,9
CONTROLE POSITIVO µg/mL	55,9

*: Aquoso de folhas; #: Etanólico de folhas. FONTE: Própria.

Segundo Meyer, et al. 1982 foi estabelecido uma relação entre o grau de toxicidade e a CL₅₀ de extratos de plantas sobre *Artemia Salina*, considerando que quando verificados valores acima de 1000 µg/mL e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos. Nos nossos resultados é possível observar que os ambos os extratos utilizados apresentaram uma CL₅₀ inferior ao controle positivo e à concentração de 1000 µg/mL, indicando ação tóxica à *Artemia salina* (Tabela 1). Não foram encontrados estudos na literatura sobre a toxicidade e o extrato de folhas do pequi (*C. coriaceum*). No entanto, há evidências de que o extrato hidroalcoólico do farelo da casca de pequi (*C. brasiliense*), quando administrado via intraperitoneal em camundongos, causa uma toxicidade igual a 0,31mg/mL (CL₅₀). (ALMEIDA et al, 2010).

3.2 Composição Fitoquímica

A partir da obtenção dos extratos das folhas do *C. coriaceum* foram encontradas as seguintes classes de metabólitos secundários, taninos e fenóis, flavonas, flavonóis e xantonas e flavononóis e flavononas. Não sendo detectada a presença de alcaloides, chalconas e auronas nos extratos (Tabela 2).

Os compostos fenólicos são substâncias presentes nos vegetais que atuam de forma essencial na proteção contra agressores naturais e oxidantes como, raio ultravioleta, poluição ambiental e outros elementos agressores, acredita-se que essa função se repita no ser humano, protegendo-o de danos oxidantes (VIZZOTO, KROLOW e WEBER, 2010). Lima et al. 2007 associa a elevada concentração de compostos fenólicos do pequi (*C. brasiliense*), ao fato do fruto ser encontrado em regiões onde as árvores recebem alta incidência de raios solares favorecendo a geração de radicais livres.

Tabela 2 – Composição fitoquímica de extratos de folhas do *Caryocar coriaceum*.

EXTRATOS/COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA	EAF*	EEF#
TANINOS E FENÓIS	+	+
ANTOCIANINAS, ANTOCIANIDINAS, FLAVONÓIDIS	-	-
FLAVONAS, FLAVONOIS E XANTONAS	+	+
CHALCONAS E AURONAS	-	-
FLAVONONÓIS	+	+
LEUCOANTOCIANIDINAS	+	+
CATEQUINAS	+	+
FLAVONONAS	+	+
ALCALÓIDES	-	-

*: Aquoso de folhas; #: Etanólico de folhas. FONTE: própria.

3.3 Atividade antioxidante

Os antioxidantes são compostos sintéticos e/ou naturais que podem agir direta ou indiretamente neutralizando espécies reativas para manter o equilíbrio redox das células (ANDRADE et al., 2007; GONZALES et al., 2001; ARAÚJO, et al., 2005). O interesse em se obter novas fontes de antioxidantes naturais é crescente e visa, principalmente, substituir o uso dos antioxidantes sintéticos. No nosso trabalho, a atividade antioxidante dos extratos foi expressa em CE_{50} (concentração final do extrato necessária para inibir a oxidação do radical DPPH em 50%). Os dados da tabela 3 mostram que os extratos da folhas de *C. coriaceum* apresentaram um elevado potencial redutor, uma vez que a CE_{50} foi inferior ao controle positivo, butil hidroxitolueno (BHT).

Os resultados obtidos nesse estudo indicaram elevado percentual de atividade antioxidante e conseqüentemente baixa concentração efetiva (CE) em sequestrar 50% do radical nos extratos aquoso e etanólico da folha, 94,54% e $CE_{50}=2,70\mu\text{g/mL}$, e 91,99% e $CE_{50}=3,24\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A CE_{50} do controle positivo apontou concentração maior que os extratos estudados ($CE_{50}=42\mu\text{g/mL}$). Ver Tabela 3. Segundo Porto, 2008 a efetividade da fração etanólica de folhas de *C. brasiliense* no ensaio do DPPH foi observada ($CE_{50}=0,41\mu\text{g/mL}$) quando comparada a quercetina ($CE_{50}=0,51\mu\text{g/mL}$). Araruna, 2012 encontrou um potencial antioxidante em extrato de folha de *C. coriaceum* de $CE_{50}=11,9\mu\text{g/mL}$, mesma espécie estudada aqui, no entanto o resultado apresentou CE_{50} maior quando comparada ao nosso estudo.

Tabela 3- Efeitos dos Extratos de folhas do *Caryocar coriaceum* sobre a redução do radical DPPH

EXTRATOS	MÉDIA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (250 µg/mL)	CE ₅₀
EAF* µg/mL	94,54%	2,70
EEF# µg/mL	91,99%	3,24
CONTROLE POSITIVO µg/mL	-	42,0

*: Aquoso de folhas; #: Etanólico de folhas. FONTE: Própria.

4. Conclusões

Os extratos utilizados não exibiram atividade atóxica no teste com *Artemia salina*. Quanto à prospecção fitoquímica foi detectada a presença de diversos compostos relacionados à atividades biológicas, como possivelmente atividade antioxidante. Sobre a capacidade em sequestrar o radical DPPH, os extratos responderam de forma eficiente ao radical, uma vez que tiveram menor CE₅₀ comparado ao controle positivo. No entanto, cabe salientar que esta avaliação constitui apenas um indicativo da propriedade antioxidante exibida pelos extratos e que mais testes referentes a parâmetros antioxidantes/oxidantes precisam ser analisados *in vitro*, antes de uma futura análise sobre os efeitos benéficos que podem estar associados ao uso da folha do pequi em modelos experimentais *in vivo*.

Referências

ALMEIDA, A C., SOBRINHO, E. M., PINHO, L de, SOUZA, P. N. S, MARTINS, E. R., DUARTE, E. R., SANTOS, H. O., BRANDI, I. V., CANGUSSU, A. S., COSTA, J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural on line**, v. 40, n.1, p 200-203, 2010.

ARARUNA, M.K.A de. **Perfil químico e ensaios biológicos in vivo e in vitro do extrato hidroalcoólico e fração metanólica das folhas de *Caryocar coriaceum* Wittm. (pequizeiro)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Regional do Cariri. Crato. CE. 2012.

ARAÚJO, C.R.F.; PEREIRA, M.S.V.; HIGINO, J.S.; PEREIRA, J.V. & MARTINS, A.B. prospecção oxidativa de antiácidos refinados. **Revista Brasileira de Odontologia**, v.41 n.3, p.112, 2005.

ANDRADE, C.A.; COSTA, C.K.; BORA, K.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, G.M. & KERBER, V.A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G.Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacologia**. v. 17 n. 2, p.231-235, 2007.

BAROSA, J., FERREIRA, A., FONSECA, B. e SOUZA, I. **Teste de toxicidade de cobre para *Artemia salina* – Poluição e Ecotoxicologia Marinha**, Nov. 2003.

GONZALES, D.C.; PEREIRA, D.G.; PAVANELLI, D.P.; SILVA, E.V.; ALMEIDA, F.M. & SIVIERO, F. Bioquímica do envelhecimento. **Instituto de Química da USP**, 2001.

GUERRA, P. M.; NODARI, O. R. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES, M. O. et al, Farmacognosia: da planta ao medicamento. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001. p.15.

LIMA, A de.; SILVA, A.M de O e.; TRINDADE, R.A.; TORRES, R.P.; MANCINI-FILHO, J. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar coriaceum*, Camb). **Rev. Bras. Frutic.**, v. 29, n.3, 2007.

MATOS, F.J.A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Editora UFC, 1997.

MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; DOS 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. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.127-130, 2001

MEYER B.N. *et al.*, Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Med.** v.45 p.31-34, 1982.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Série B. Textos Básicos de Saúde Brasília – DF, 2006.

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 citotóxicas e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, supl.1, p. 718-723, 2008.

OLIVEIRA, M.E.B; GUERRA, N.R; BARROS, L.M; ALVES, R.E. **Aspectos Agronômicos e de Qualidade do Pequi**. Embrapa Agroindústria Tropical. Fortaleza, CE. Fevereiro, 2008.

PORTO, C da S. **Potencial antioxidante de extratos obtidos a partir de frutos e folhas do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Universidade Estadual de Montes Claros. Mestrado em Ciências Biológicas. Montes Claros, Minas Gerais, 2008.

QUIRINO, G. da S., *et al.* Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. **Phytochemistry Letters**, v. 2, p.179-183, 2009.

VIZZOTTO, M., KROLOW, A.C., WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e Sua Importância**. EMBRAPA: Clima Temperado. Pelotas, RS, 2010.

