

Quantificação de fenóis e flavonoides totais e atividade antioxidante *in vitro* das folhas de *Psychotria Trichophora* Müll. Arg (Rubiaceae)

Guilherme Canêdo Mesquita¹ (IC)*, Ivaniely Silveira da Silva¹ (IC), Geralda de Fátima Lemes¹ (PQ).
guilherme.memim@hotmail.com.

¹Universidade Estadual de Goiás- Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas
Henrique Santillo. BR 153, Nº 3105, Anápolis. Caixa postal 459, CEP 7513-2400.

Resumo: O gênero *Psychotria* pertence à família Rubiaceae, ordem Gentianales, compreende cerca de 1800 espécies. A maioria das espécies são de hábito arbustivo, embora árvores, ervas, lianas e epífitas, também, são conhecidas. *Psychotria trichophora* ocorre como erva ou subarbusto de 0,5-1,5 m de altura, nos biomas de Mata Atlântica, Cerrado, em matas de encosta e pluviais. O presente trabalho relata a avaliação da atividade antioxidante e quantificação de fenóis e flavonoides nas folhas de *P. Trichophora*. As folhas secas e pulverizadas da planta foram submetidas à remaceração com EtOH 96 %, obtendo o extrato bruto, que foi submetido a partição líquido-líquido, resultando nas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Nos testes antioxidantes contra o radical livre DPPH o extrato bruto e as frações acetato de etila e *n*-butanol mostraram forte atividade antioxidante, com CE₅₀ de 33,29 ± 0,93, de 14,52 ± 0,23 e 15,18 ± 0,81 µg.mL⁻¹, respectivamente. A fração acetato de etila apresentou alto teor de fenóis totais com 479,78 ± 8,47 mg EAT/g fração e de flavonoides totais foram de 147,22 ± 5,99 mg ER/g fração.

Palavras-chave: *Psychotria*. Atividade antirradicalar. Fenóis. Flavonoides.

Introdução

O gênero *Psychotria* possui ampla distribuição em regiões tropicais do mundo e raramente em regiões subtropicais, e estima-se que na América tropical estejam presentes aproximadamente 550 espécies (DELPETRE, 2010). Esse gênero é dividido nos subgêneros: *Tetramerae* (Hiern) R. Petit (espécies da África e Madagascar), *Psychotria* L. (espécies pantropicais) e *Heteropsychotria* Steyererm (espécies que ocorrem nas Américas, similares ao gênero neotropical, *Palicourea*) (LOPES et al., 2004).

Na literatura existem vários trabalhos sobre o uso tradicional do gênero (raízes, cascas, folhas e rizomas) para diversas finalidades, seja para rituais religiosos, quanto

uso medicinal. A ayahuasca que é uma bebida alucinógena comumente utilizada na Amazônia, contém em sua composição duas espécies do gênero *Psychotria*, que são elas *P. viridis* e *P. carthagenensis* (LEAL; ELISABETSKY, 1996). Já a raiz de *P. colorata* é utilizada pela população amazonense no tratamento de dores abdominais e de ouvido (VEROTTA et al., 1998), enquanto *P. insularum* é utilizada no tratamento de cataratas, desordem abdominal e infecções (GERLACH et al., 2010).

Estudos fitoquímicos de espécies do subgênero *Heteropsychotria* que ocorrem no Brasil mostram a predominância de alcaloides do tipo indol β -carbolínico monoterpênico. Enquanto no subgênero *Psychotria* predominam os alcaloides polindólicos (OLIVEIRA et al., 2013). Porém o estudo de algumas espécies chinesas evidenciaram o acúmulo de compostos fenólicos e não de alcaloides, como no caso de *P. hainanensis* H. L. Li e *P. serpens* L. (NISHIBE, 2002). Assim, os compostos fenólicos possam servir como marcadores químicos de espécies de *Psychotria* desprovidas de alcaloides, principalmente de espécies da região da Ásia-Pacífico (TAN et al., 2012).

Esses resultados demonstram a importância de espécies do gênero *Psychotria*, amplamente distribuídos na região do Cerrado/GO e evidenciam a importância de estudos químicos e farmacológicos de espécies deste gênero pouco estudado.

Material e Métodos

Coleta e identificação do material botânico

O material botânico foi coletado em 18/04/2017, no Bosque Saint-Hilaire, floresta semi-caducifolia, Campus II, UFG, Goiânia-GO.

Preparação do extrato e obtenção das frações

As folhas foram dessecadas em estufa com ventilação forçada à 40 °C, pulverizadas em moinho de facas com granulação definida. O pó obtido (190 g) foi submetido à remaceração com EtOH 96%. Após a extração, a solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida, obtendo-se o extrato bruto etanólico (33,5 g). Parte do extrato (28 g) foi dissolvido em 200 mL de MeOH:H₂O (7:3)

e, em seguida, submetido a partições líquido-líquido com hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol.

Análise quantitativa da atividade antioxidante

Os testes antioxidantes foram realizados com o radical estável, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) conforme metodologia adaptada de Oliveira e colaboradores (2014).

Quantificação de fenóis totais

Construção da curva de calibração: alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 6,0 mL da solução de ácido tânico ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) foram transferidas para balões volumétricos de 25,0 mL, contendo 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, agitou-se por 30 segundos, adicionou-se 4,0 mL de Na_2CO_3 à 20 %, acertou-se o volume com H_2O destilada. Depois de 30 minutos, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV-Vis em 750 nm. A solução-branco foi preparada colocando todos os reagentes menos o ácido tânico.

Determinação de fenóis totais nas amostras- alíquotas de 0,5 mL das soluções do extrato bruto, Fr. *n*-butanol e Sf. 2, todas $1500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, diclorometano ($3000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e hidrometanólica ($2000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), foram transferida para balões volumétricos de 25,0 mL, em seguida, adicionou-se 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, agitou-se por 30 segundos. Adicionou-se 4,0 mL de solução de Na_2CO_3 à 20 %, completou-se o volume com H_2O destilada.

Fração acetato de etila: 15 mg solubilizado em MeOH foram transferidos para um balão de 10,0 mL. Completou-se o volume com MeOH. Transferiu-se 3,0 mL dessa solução para um balão de 5,0 mL. Desta solução transferiu-se 0,5 mL para balão volumétrico de 25,0 mL, em seguida, adicionou-se 0,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu, agitou-se por 30 segundos. Adicionou-se 4,0 mL de solução de Na_2CO_3 à 20 %, completou-se o volume com H_2O destilada.

Após 30 minutos em repouso foram realizadas leituras das absorvâncias em espectrofotômetro UV-Vis em 750 nm. A solução-branco foi preparada com todos os reagentes menos a amostra.



O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido tânico e expressos como mg de EAT (equivalentes de ácido tânico) por g de amostra.

Quantificação de flavonoides totais

Construção da curva de calibração: alíquotas da solução de rutina (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, contendo 1,0 mL da solução de cloreto de alumínio à 12 %, preparada em MeOH/H₂O 10 %. Em seguida, completou-se o volume com MeOH/HAc 5%, resultando concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Após 30 minutos em repouso foram realizadas leituras em espectrofotômetro em 422 nm. A solução banco foi preparada com todos os reagentes, menos o AlCl₃.

Amostras

Alíquotas de 0,5 mL (extrato bruto, 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), 2,0 mL (fração hidrometanólica, 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 1,0 mL da diclorometano (3000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), acetato de etila e *n*-butanol, ambas de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, foram transferidas para balões volumétricos de 10,0 mL, contendo 1,0 mL de solução de AlCl₃ à 12%. Completou-se o volume com MeOH/HAc 5%. Após 30 minutos em repouso, a temperatura ambiente, foram realizadas leituras das absorvâncias em 422 nm. A solução-branco foi preparada colocando-se todos os reagentes, menos o AlCl₃. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O teor de flavonoides totais foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de rutina e expressos como mg de ER (equivalentes de rutina) por g de amostra.

Resultados e Discussão

As folhas de *P. trichophora* submetidas a extração por remaceração com EtOH 96 % forneceram 33,5 g, rendimento de 18,7 % (m/m) de extrato bruto etanólico. Parte do extrato (28,0 g) foi ressuspendido em MeOH:H₂O (8:2 v/v), filtrado à vácuo para eliminar clorofilas e material insolúvel. O filtrado foi submetido a extração descontínua





líquido-líquido em funil de separação, conduzindo nas frações hexano (0,6 g), diclorometano (1,3 g), acetato de etila (2,6 g), *n*-butanol (6,0 g) e na remanescente, hidrometanólica.

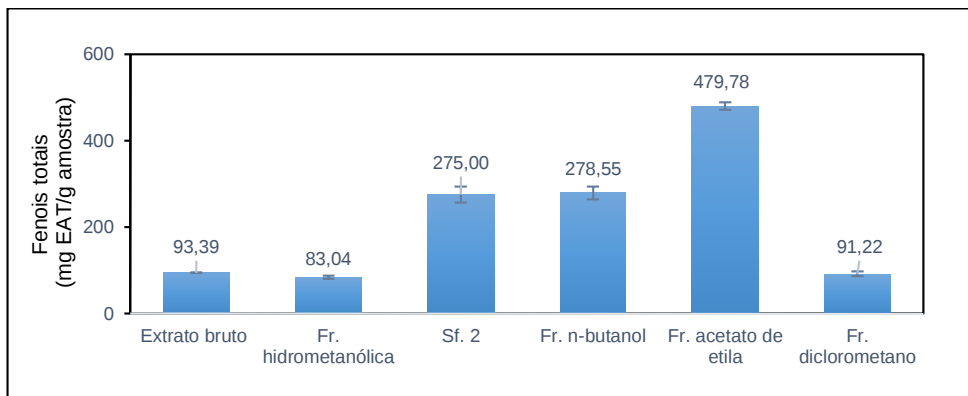
A fração hidrometanólica, remanescente da partição do extrato bruto, apresentou alta concentração de compostos inorgânicos e açúcar livre, sendo assim, purificada em coluna de Diaion-HP 20, obtendo-se 4 subfrações. A Sf. 2 (200 mg), eluída com etanol 50 %, foi considerada a mais promissora para a quantificação de compostos fenólicos devido ao perfil cromatográfico apresentado.

Neste trabalho, realizou-se a quantificação de fenóis totais pelo método colorimétrico com Folin-Ciocalteu. Os resultados expressos em mg EAT/por grama de amostra, estão na Figura 1. Os coeficientes de correlação foram superiores 0,99, comprovando a adequação do método ao intervalo avaliado.

O extrato bruto apresentou $93,39 \pm 0,59$ mg EAT/g de extrato, o que corresponde a aproximadamente 9,3 % (m/m) de fenóis na amostra. Dentre as frações oriundas do extrato bruto, a diclorometano e a hidrometanólica, foram as que apresentaram os menores teores de fenóis totais, com $91,22 \pm 5,48$ e $83,04 \pm 3,82$ mg EAT/g de fração, respectivamente. Todavia, a Sf. 2, proveniente da fração hidrometanólica, apresentou $275,00 \pm 18,59$ mg EAT/g de fração, cerca de 27,5 % (m/m) de fenóis na amostra, enquanto a fração hidrometanólica apresentou apenas 8,3 % de fenóis.

As frações *n*-butanol e acetato de etila, apresentaram os maiores teores de fenóis, com $278,55 \pm 14,33$ e $479,78 \pm 8,47$ mg EAT/g de fração, respectivamente. A fração acetato etila com aproximadamente 72 % a mais de fenóis que a *n*-butanol, evidenciando a eficiência do acetato de etila em extrair os compostos fenólicos presentes no extrato bruto.

Figura 1- Fenóis totais no extrato e frações das folhas de *P. trichophora*.



Esses resultados são bastante significativos, uma vez que os compostos fenólicos se destacam em pesquisas voltadas para a prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e câncer (MANACH et al., 2005).

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides desempenham um papel importante na saúde humana, pois estão presentes em muitos alimentos como em frutas, verduras, chá, mel, etc. Estudos relatam que pessoas que fazem a ingestão de maiores quantidades dessas substâncias apresentam menor susceptibilidade de risco de morte por acidentes cardiovasculares como infarto do miocárdio, derrame e trombose (KINSELLA et al, 1993).

Alguns medicamentos possuem flavonoides como princípio ativo, de modo especial, para o tratamento de doenças circulatórias como hipertensão e agindo como cofator da vitamina C. Há estudos que sugerem que alguns flavonoides sejam responsáveis por ação antitumoral, atividades antiviral, anti-hemorragica, anti-inflamatório, antimicrobianos e antioxidantes (SIMÕES et al., 2017).

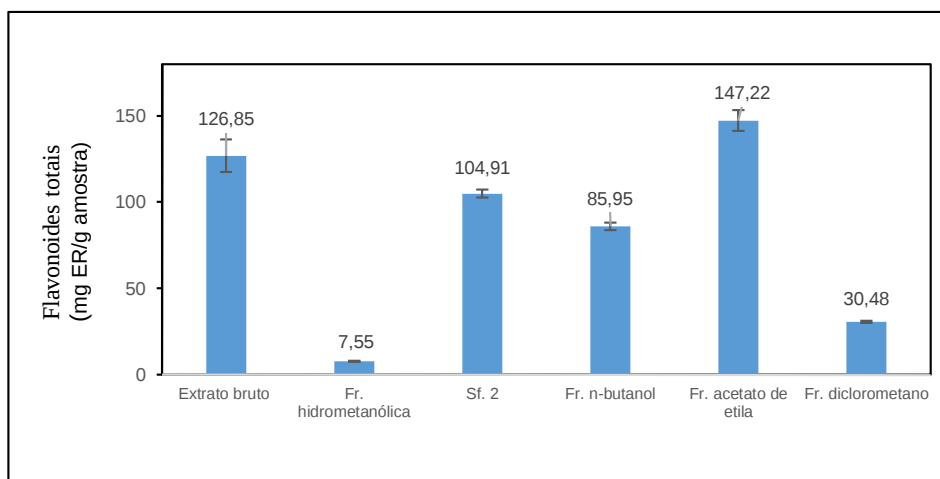
Os resultados obtidos na determinação de flavonoides totais pelo método colorimétrico com cloreto de alumínio, expressos em mg ER/g de amostra, estão apresentados na Figura 2. O extrato bruto apresentou $126,85 \pm 9,48$ mg ER/g de extrato, o que corresponde a aproximadamente 12,6 % (m/m) de flavonoides. Esse resultado é bem superior aos encontrados nas folhas de *P. capillacea*, *P. leiocarpa* e

P. deflexa, com $91,58 \pm 3,74$, $59,80 \pm 6,45$, e $37,64 \pm 10,14$ mg equivalente de quercetina/g extrato, respectivamente (FORMAGIO et al, 2014).

As frações oriundas do extrato bruto que mostraram os maiores teores de flavonoides foram a *n*-butanol e a acetato de etila, com $85,95 \pm 2,26$ e $147,22 \pm 5,99$ mg ER/g fração, respectivamente. Nos vegetais os flavonoides geralmente são encontrados como heterosídeos e, geralmente, se concentram nas frações mais polares como acetato de etila e *n*-butanol, quando os extratos são fracionados.

A fração hidrometanólica mostrou apenas 7,55 mg ER/g de fração, o que equivale a aproximadamente a 0,7 % (m/m). Enquanto a Sf 2 oriunda da hidrometanólica apresentou cerca de 10 % (m/m) de flavonoides.

Figura 2- Flavonoides totais no extrato e frações das folhas de *P. trichophora*.



Em seguida, a capacidade antioxidante do extrato bruto e das frações foram avaliadas através da percentagem de redução inicial do radical DPPH pelas amostras em diferentes concentrações. Quanto maior o consumo de DPPH no meio reacional, menor o valor da CE_{50} , e mais eficiente é a amostra como antioxidante. Os valores da CE_{50} foram obtidos a partir da análise de regressão linear e mostraram boa correlação ($r > 0,99$).

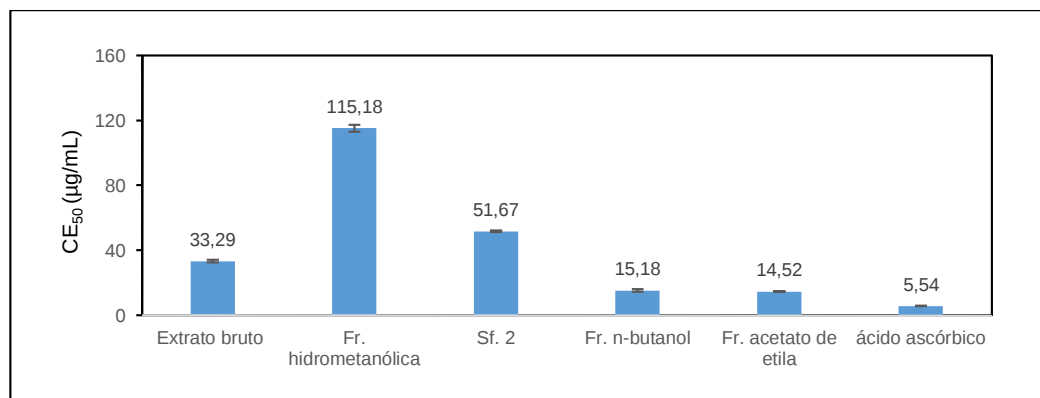
O extrato bruto mostrou-se forte atividade antioxidante com CE_{50} de $33,29 \pm 0,93 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Essa atividade pode ser atribuída a presença de compostos fenólicos, especialmente de flavonoides no extrato. Além disso, alguns trabalhos sugerem que

os efeitos sinérgicos de misturas de flavonoides podem ser responsáveis pela elevada atividade antioxidante observada em extratos brutos (HARBORNE; WILLIAMS, 1992).

Comparando-se os valores da CE_{50} (Figura 3) das frações provenientes da partição do extrato bruto, percebe-se que o efeito antioxidante é mais pronunciado nas frações acetato de etila e *n*-butanol, com valores de CE_{50} de $14,52 \pm 0,23$ e $15,18 \pm 0,81 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Essas frações foram as que apresentaram os maiores teores de fenóis e flavonoides, corroborando assim com o potencial antioxidante das mesmas.

Já a fração hidrometanólica mostrou baixo potencial antioxidante com CE_{50} de $115,18 \pm 2,13$. Enquanto a Sf. 2, proveniente da hidrometanólica, mostrou moderada ação antirradicalar, com CE_{50} de $51,67 \pm 0,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Figura 3- Valores da CE_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) do extrato bruto e frações das folhas de *P. trichophora* no teste com DPPH.



As descobertas do efeito deletério dos radicais livres sobre as células e sua relação com certas doenças, estimulou a busca por produtos naturais (compostos puros, frações e/ou extratos) capazes de minimizar ou prevenir danos oxidativos às células vivas. Os compostos fenólicos são importantes antioxidantes naturais, conseguindo neutralizar ou sequestrar radicais livres, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados nesses processos são relativamente estáveis, devido estabilização do radical por ressonância no anel aromático.

Além disso a capacidade antioxidante de um produto natural pode servir como indício de outras atividades biológicas, como anti-inflamatória, antitumoral, dentre



outras. Assim, os resultados descritos neste trabalho estimulam a continuidade dos estudos fitoquímicos e da ação antioxidante de metabólitos secundários isolados das folhas de *P. trichophora*.

Considerações Finais

O extrato bruto e as frações acetato de etila e *n*-butanólica mostraram forte atividade antioxidante. Enquanto a fração acetato de etila apresentou-se como fonte promissora de compostos fenólicos.

Agradecimentos

Agradecemos a UEG-CCET e a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação por possibilitar o desenvolvimento do projeto.

Referências

DELPETRE, P.G. Flora dos Estados de Goiás e Tocantins. Goiânia: Ed. UFG, 2010. v. 40, coleção Rizzo. Rubiaceae, parte: Gêneros I-R, Coordenador- José Ângelo Rizzo.

FORMAGIO, A. S. N.; VOLOBUFF, C. R. F.; SANTIAGO, M.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. D. C.; VALDEVINA PEREIRA, Z. Evaluation of antioxidant activity, total flavonoids, tannins and phenolic compounds in *Psychotria* leaf extracts. **Antioxidants**, v. 3, n 4, p. 745-757, 2014.

GERLACH, S. L.; BURMAN, R.; BOHLIN, L.; MONDAL, D.; RANSSON, U. G. Isolation, Characterization, and Bioactivity of Cyclotides from the Micronesian Plant *Psychotria leptothyrsa*. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 7, p. 1207–1213, 2010.

HARBORNE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Advances in flavonoid research since 1992.

KINSELLA, J. E.; FRANKEL, E.; GERMAN, B.; KANNER, J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods, **Food Technology**, p. 85-89, 1993.

LEAL, M. B.; ELISABETSKY, E. Absence of alkaloids in *Psychotria carthagenensis* Jacq. (Rubiaceae). *Journal Ethnopharmacol.*, v. 54, n. 1, p. 37-40. 1996.

LOPES, S.; POSER, G. L. V.; KERBER, V. A.; F. M.; KONRATH, E. L.; MORENO, P.; SOBRAL, M. E.; ZUANAZZI, J. A. S.; HENRIQUES; A. T. Taxonomic



significance of alkaloids and iridoid glucosides in the tribe Psychotrieae (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 12, p. 1187-1195, 2004.

MANACH, C.; MAZUR, A.; SCALBERT, A. Polyphenols and prevention of cardiovascular diseases. **Current Opinion in Lipidology**, v. 16, n. 1, p. 77-84, 2005.

NISHIBE, S. The plant origins of medicines and their quality evaluation. **Journal Pharmaceutical Society of Japan**, v. 122, n. 6, p. 363-380, 2002.

OLIVEIRA, A. M., LEMOS, R. P. L., CONSERVA, L. M. β -Carboline alkaloids from *Psychotria barbiflora* DC. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 50, p. 339-341, 2013.

OLIVEIRA, G. L. S.; GOMES JÚNIOR, A. L.; OLIVEIRA, F. R. A. M.; FREITAS, R. M. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básicas e Aplicada.**, v. 35, n. 2, p. 293-300, 2014.

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.

TAN, M. A.; EUSEBIO, J. A.; ALEJANDRO, G. J. Chemotaxonomic implications of the absence of alkaloids in *Psychotria gitingensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 45, p. 20-22, 2012.

VEROTTA, L.; PILATI, T.; TATO, M.; ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; NUNES, D. S. Pyrrolidinoindoline Alkaloids from *Psychotria colorata*. **Journal of natural products**, v. 61, n. 3, p. 392-396, 1998.