



AVALIAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DE *Siparuna guianensis* Aublet.

Maycon Alcântara de Almeida^{1*}; Jéssica Leiras Mota Conegundes¹; Monique de Rezende
Evangelista¹; Pedro Henrique Santos de Freitas¹; Elita Scio¹

¹ Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas,
Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG, Brasil.

*Corresponding author. E-mail address: maycon.alcalm@gmail.com

RESUMO

Siparuna guianensis Aublet, conhecida como negramina, é uma espécie de importância medicinal amplamente distribuída no território brasileiro. Suas folhas têm sido tradicionalmente utilizadas no combate de dores e distúrbios inflamatórios. O presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil fitoquímico e o potencial antioxidante dessa espécie. Para obtenção do extrato aquoso (EASG), as folhas secas e trituradas de *S. guianensis* foram submetidas à decoção por 20 min. à 100 °C. Para a caracterização do perfil fitoquímico, foram realizados o doseamento dos compostos fenólicos e de flavonoides, além da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao ultravioleta (CLAE-UV). A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), pela inibição do radical óxido nítrico (NO) e pelo ensaio de degradação da 2-desoxirribose (2-DR). Os dados foram demonstrados como média \pm desvio padrão e análise de variância seguida do teste de Bonferroni foi utilizada para medir o grau de significância ($p < 0,05$). Os teores de compostos fenólicos e de flavonoides foram de 87,70 $\mu\text{g}/\text{mg}$, em equivalentes ao ácido tânico, e 13,20 $\mu\text{g}/\text{mg}$, em equivalentes à quercetina, respectivamente. Nove flavonóis foram detectados por CLAE-UV. Com relação ao potencial antioxidante, na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o EASG reduziu o radical DPPH em 63,44 %; inibiu em 110,19 % a produção do NO; e impediu em 82,61 % a degradação da 2-DR. Os resultados encontrados sugerem que o EASG é rico em flavonoides, sendo esses compostos possivelmente responsáveis pela atividade antioxidante, o que pode contribuir na prevenção e/ou redução do desenvolvimento de patologias associadas ao estresse oxidativo.

Palavras-chave: Antioxidantes. Estresse oxidativo. Flavonoides. Produtos naturais.



ABSTRACT

Siparuna guianensis Aublet, known as negramina, is a medicinal species widely distributed in the Brazilian territory. Its leaves have been traditionally used to eliminate pain and inflammatory disorders. The present study aimed to evaluate the phytochemical profile and the antioxidant potential of *Siparuna guianensis*. For this, the dried and crushed leaves were subjected to decoction for 20 min. at 100°C, obtaining the aqueous extract of *S. guianensis* (EASG). For the analysis of the phytochemical profile, the determination of phenolic compounds and flavonoids and high-performance liquid chromatography coupled to ultraviolet (HPLC-UV) were performed. The antioxidant activity was evaluated by the method of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydroxy radical (DPPH) scavenging, by the inhibition of the nitric oxide radical (NO) and by the 2-deoxyribose (2-DR) degradation test. The results were expressed as mean \pm standard deviation, and analysis of variance followed by the Bonferroni test was used to measure the degree of significance ($p < 0.05$). The phenolic compounds and flavonoids content were 87.70 $\mu\text{g}/\text{mg}$, in equivalent to tannic acid, and 13.20 $\mu\text{g}/\text{mg}$, in equivalent to quercetin, respectively. HPLC-UV detected nine flavonols. Regarding the antioxidant potential, at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, EASG reduced the DPPH radical by 63.44 %; inhibited NO production in 110.19 %; and prevented the degradation of 2-DR in 82.61 %. The results found suggest that EASG is rich in flavonoids, and these compounds are possibly responsible for antioxidant activity, which can contribute to the prevention or reduction of the development of pathologies associated with oxidative stress.

Keywords: Antioxidants. Oxidative stress. Flavonoids. Natural products.

INTRODUÇÃO

Siparuna guianensis Aublet é uma espécie vegetal aromática e medicinal, amplamente distribuída na América do Sul. No Brasil é conhecida popularmente como “negramina”, “capitú”, “folha-santa” e “limão-bravo” (VALENTINI *et al.*, 2010). As folhas de *S. guianensis* possuem extenso uso etnobotânico, sendo tradicionalmente utilizadas por comunidades indígenas e locais para combater sintomas gripais, sinusite, febre (TEMPONE *et al.*, 2005), distúrbios inflamatórios (CÉLINE *et al.*, 2009; TAREAU *et al.*, 2017), dores de cabeça e no corpo (DAVIS & YOST, 1983; ANDRADE *et al.*, 2013). Além disso, existem relatos de seu uso como ansiolítico, estimulante sexual e no combate à malária (CÉLINE *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2012).



Além do uso tradicional, estudos já realizados com *S. guianensis* têm constatado o vasto potencial biológico da espécie. O óleo essencial das folhas *S. guianensis* apresentou atividade antimicrobiana (MELO *et al.*, 2017), antifúngica (ANDRADE *et al.*, 2015), além de propriedades leishmanicida (ANDRADE *et al.*, 2016) e inseticida (AGUIAR *et al.*, 2015). As folhas também apresentaram atividade antifúngica para o extrato metanólico (LOPEZ *et al.*, 2001), tripanocida para a fração alcaloídica (TEMPONE *et al.*, 2005) e antimalárica para o extrato etanólico (FISCHER *et al.*, 2004). Grande parte desses efeitos se deve a sua vasta composição química, dado que a espécie apresenta diversos metabólitos secundários já descritos na literatura (BRAZ-FILHO *et al.*, 1976; GUIMARÃES LEITÃO *et al.*, 2005; FACUNDO *et al.*, 2012; NEGRI, SANTI, TABACH, 2012).

O óleo essencial das folhas de *S. guianensis* é predominantemente constituído por terpenos, dentre os quais destacam-se o β -mirceno, germacreno D e E, E-farnesol, siparunona (MELO *et al.*, 2017), biciclogermacreno (ANDRADE *et al.*, 2015), α -terpinoleno, α -bisabolol (ANDRADE *et al.*, 2013), ácido decanóico, 2-undecanona, β -pineno (FISCHER *et al.*, 2005), germacrona, epi- α -bisabolol, atractilona, espatulenol, selin-11-en-4 α -ol, β -eudesmol e elemol (ZOGHBI *et al.*, 1998).

Nos extratos das folhas de *S. guianensis* também foram identificados os fitoesteróides, β -sitosterol e estigmasterol; flavonoides como lucenina, vicentina, quercetina e canferol, juntamente com seus derivados glicosilados; e os alcaloides oxoaporfina, lirioidenina e cassamedina (BRAZ-FILHO *et al.*, 1976; GUIMARÃES LEITÃO *et al.*, 2005; FACUNDO *et al.*, 2012; NEGRI, SANTI, TABACH, 2012). Por fim, nos frutos, foram identificados os alcaloides nantenina, lirioidenina, n-metilaurotetanina, norglaucina, assimilobina e anonaína, além de um derivado monoglicosilado do sitosterol (FACUNDO *et al.*, 2012).

Embora a espécie seja amplamente utilizada na forma de decocto, não existem relatos na literatura sobre o preparo e as propriedades deste extrato. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil fitoquímico dos metabólitos secundários do extrato aquoso das folhas de *S. guianensis*, obtido por decocção, por meio do doseamento de compostos fenólicos e de flavonoides totais, além da análise do perfil



cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao ultravioleta (CLAE-UV). Além disso, o potencial antioxidante foi investigado, utilizando-se os seguintes métodos: sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), inibição do radical de óxido nítrico (NO) e degradação da 2-desoxirribose (2-DR).

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As folhas de *S. guianensis* foram coletadas em Matias Barbosa, MG, Brasil. A exsicata encontra-se depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJF) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob nº 60333.

Obtenção do extrato aquoso

As folhas secas e trituradas de *S. guianensis* foram submetidas à decocção em água destilada por 20 min. à 100 °C. Foi utilizada a proporção de 1 g de folhas pulverizadas para cada 10 mL de solvente extrator. Posteriormente, o extrato (EASG) foi congelado e liofilizado, obtendo-se um rendimento de 8 %.

Perfil fitoquímico

Determinação do teor de compostos fenólicos

A determinação do teor de compostos fenólicos foi realizada utilizando-se o método de Folin-Ciocalteu (1927), com algumas modificações. O ácido tânico foi utilizado como substância de referência para o preparo da curva de calibração, com concentrações que variaram de 0,9 a 60 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em µg/mg de amostra em equivalentes ao ácido tânico (EAT) ± desvio padrão.



Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação do teor de flavonoides totais foi realizada por meio do método de complexação com cloreto de alumínio (DOWD, 1959), com algumas modificações. A quercetina foi utilizada como substância de referência para o preparo da curva de calibração, com concentrações que variaram de 0,25 a 40 µg/mL. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em µg/mg de amostra em equivalente à quercetina (EQ) ± desvio padrão.

Análise por CLAE-UV

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi conduzida em um módulo de separação Agilent Technologies Série 1200 (Santa Clara, Califórnia, EUA), equipado com bomba quaternária, injetor automático e detector de arranjo de diodos - ultravioleta (DAD-UV). Utilizou-se uma coluna analítica Kromasil C18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) (Bohus, Suécia). A fase móvel consistiu em água (A) e acetonitrila (B). Os solventes foram filtrados e injetados como um gradiente que consistia em 5 % de B de 0 a 5,0 min e 19 % de B de 5,01 a 35,0 min. O volume de injeção foi de 20 µL, com fluxo de 0,3 mL/min e comprimento de onda de detecção em 330 nm.

Avaliação da atividade antioxidante

Método do sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)

A atividade sequestrante do radical DPPH foi determinada pelo método descrito por Govindarajan e colaboradores (2003), com algumas modificações. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 100 µL do EASG (400 µg/mL em etanol). Posteriormente, foram realizadas diluições sucessivas obtendo-se a concentração de 100 µg/mL. Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de DPPH (20 µg/mL em etanol) em todos os poços. Após 30 min. ao abrigo da luz, a leitura da absorvância foi realizada no



comprimento de onda de 517 nm em leitor automático de microplacas (Waltham, MA, EUA). A substância de referência, quercetina, foi preparada nas mesmas condições do EASG. O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em percentual de inibição relativo à quercetina (% IR_Q), comparando-se a absorvância das amostras com a substância padrão, que foi considerada como 100 % de inibição da oxidação.

Avaliação da inibição do radical de óxido nítrico

Esta avaliação baseia-se na decomposição espontânea *in vitro* do nitroprussiato de sódio (NPS) em óxido nítrico. Uma vez formado, este é rapidamente convertido a nitrito pela ação do oxigênio sendo, dessa forma, determinado indiretamente por meio da reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982). Em microplacas de 96 poços, foram adicionados 125 µL do EASG ou da substância referência, ácido gálico (1,6 mg/mL em tampão fosfato 10 mM pH 7,4) e, após diluições sucessivas, foi obtida a concentração de 100 µg/mL. Em seguida, adicionou-se 62,5 µL de NPS 10 mM e a placa foi incubada durante 1 hora na presença de luz e temperatura ambiente. Após incubação, adicionou-se 125 µL do reagente de Griess [sulfanilamida 1 % e N-(1-naftil) etilenodiamina (NED) 0,1 % (1:1) em H₃PO₄ 2,5 %] e, após 10 minutos ao abrigo da luz, a absorvância foi mensurada a 540 nm em leitor automático de microplacas (Waltham, MA, EUA). O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em percentual de inibição relativo ao ácido gálico (% IR_{AG}), comparando-se a absorvância da amostra com a substância de referência, que foi considerada como 100 % de inibição da produção do radical NO.

Ensaio de degradação da 2-desoxirribose

Para avaliação do potencial antioxidante do EASG contra o radical hidroxila (OH), utilizou-se a Reação de Fenton (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990), com algumas modificações. O método baseia-se na quantificação do produto de degradação da 2-DR, malonaldeído, que sofre condensação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Em tubos de ensaio, foram aliqüotados 100 µL de tampão fosfato (20 mM, pH 7,2), 100 µL da 2-DR (5



mM), 100 µL do peróxido de hidrogênio (100 mM), 100 µL do EASG ou da substância de referência, ácido gálico (100 µg/mL em tampão fosfato 20 mM) e 100 µL de sulfato ferroso (6 mM). Após 15 min. de incubação, a reação foi cessada pela adição de 500 µL de ácido fosfórico (4 % v/v em tampão fosfato 20 mM), seguida da adição de 500 µL de TBA 1 % (v/v em NaOH 50 mM). Os tubos foram aquecidos durante 15 min. à 98 °C. Posteriormente, 200 µL dessa solução foram transferidos para microplacas de 96 poços. A leitura da absorvância foi realizada no comprimento de onda de 532 nm em leitor automático de microplacas (Waltham, MA, EUA). O teste foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em percentual de inibição relativo ao ácido gálico (% IR_{AG}), comparando-se a absorvância das amostras com a substância de referência, que foi considerada como 100 % de inibição da degradação da 2-DR.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni para mensurar o grau de significância para $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Perfil fitoquímico

Determinação do teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais

Os teores de compostos fenólicos e de flavonoides totais encontrados para o EASG estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais no extrato aquoso das folhas de *S. guianensis*.

Amostra	Compostos fenólicos EAT (µg AT/mg)	Flavonoides EQ (µg Q/mg)
EASG	87,70 ± 4,30	13,20 ± 0,30

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n = 3) dos teores de compostos fenólicos e de flavonoides totais. Legenda: AT: ácido tânico; EASG: extrato aquoso de *Siparuna guianensis*; EAT: equivalentes ao ácido tânico; EQ: equivalentes à quercetina; Q: quercetina.



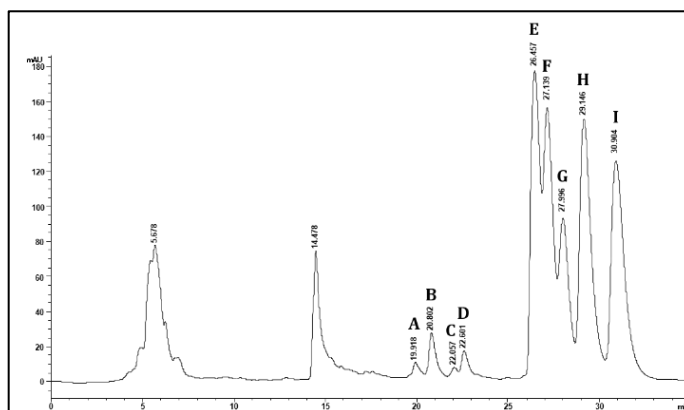
Os compostos fenólicos presentes em espécies vegetais têm recebido grande atenção nos últimos anos. Esses compostos, principalmente os flavonoides, são considerados os principais componentes responsáveis pela atividade antioxidante de extratos vegetais (SHEBIS *et al.*, 2013). A atividade antioxidante está relacionada à habilidade dessas substâncias de sequestrarem e neutralizarem as espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN), devido às suas características estruturais, como o número e a posição das hidroxilas fenólicas (AYRES *et al.*, 2009; AQUINO *et al.*, 2017).

A presença de compostos fenólicos e de flavonoides nas folhas de *S. guianensis* já foi descrita na literatura (FACUNDO *et al.*, 2012; NEGRI, SANTI, TABACH, 2012; MAGALHÃES, 2018). Soares e colaboradores (2017) encontraram um teor de compostos fenólicos e de flavonoides totais no extrato aquoso de *S. guianensis* de 47,1 e 22,1 µg/mg, respectivamente. A variação entre os teores apresentados pode estar relacionada à forma de obtenção do extrato, dado que o presente trabalho utilizou o decocto, enquanto Soares e colaboradores (2017) avaliaram o extrato obtido por meio da extração em ultrassom. Além disso, a composição de extratos vegetais, neste caso da espécie *S. guianensis*, pode variar de acordo com o local e o período de coleta (MAGALHÃES, 2018).

Análise por CLAE-UV

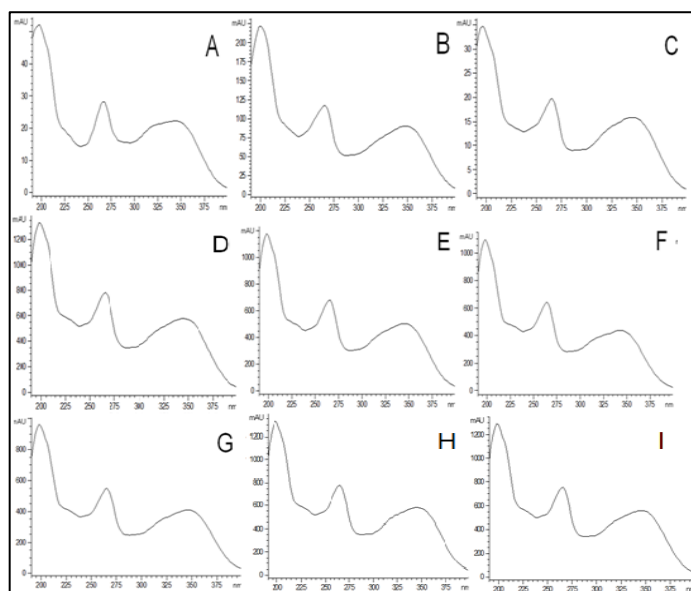
O perfil cromatográfico do extrato aquoso das folhas de *S. guianensis* obtido por CLAE-UV, juntamente com os espectros ultravioletas dos sinais de interesse podem ser observados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Figura 1 - Perfil Cromatográfico do extrato aquoso das folhas de *S. guianensis* por CLAE-UV.



Condições cromatográficas: Fase móvel constituída por água (A) e acetonitrila (B). Gradiente linear de 5 % de B de 0 a 5,0 min e 19 % de B de 5,01 a 35,0 min. Volume de injeção de 20 μ L; Fluxo de 0,3 mL/min; Detecção no UV em 330 nm.

Figura 2 - Espectros UV dos sinais A, B, C, D, E, F, G, H e I encontrados no extrato aquoso de *S. guianensis*.



Os espectros ultravioletas foram obtidos na faixa de 200 a 400 nm.

Ao analisar o cromatograma foi possível observar dez sinais com tempos de retenção (TR) entre 14 e 35 min. Destes, nove sinais (A, B, C, D, E, F, G, H e I) apresentaram máximos de absorvância UV em 200, 265 e 350 nm (Figura 2). Estes, são característicos de flavonóis que apresentam máximos de absorção entre 240 e 400 nm (ANDERSEN & MARKHAM, 2005). Esses dois sinais são característicos de sua estrutura



química básica, comumente referidos como Banda I (geralmente entre 300 e 380 nm) e Banda II (tipicamente entre 240 e 280 nm). A absorção da Banda I pode ser associada ao sistema cinamoil do anel B, enquanto a absorção da banda II é devido ao sistema benzoil do anel A (MERKEN & BEERCHER, 2000).

Os resultados obtidos por CLAE-UV confirmam a presença de substâncias fenólicas, como flavonoides já quantificados no EASG (Tabela 1). Também, a literatura traz diversos trabalhos relatando a presença de flavonoides em *S. guianensis*. Soares e colaboradores (2017) relataram a presença de rutina no extrato metanólico, etanólico e hidroetanólico de *S guianensis*. Guimarães Leitão e colaboradores (2005) identificaram a presença de quercetina e derivados glicosilados como a rutina e quercetina 7-O-β-D-glicopiranosil-ramnosídeo, além de canferol e um derivado monoglicosilado (canferol ramnosídeo) no extrato em acetato de etila das folhas de *S guianensis*. Negri, Santi e Tabach (2012), por meio de estudos com o extrato hidroetanólico das folhas de *S guianensis*, identificaram a presença de vicentina-2, quercetina, canferol e derivados glicosilados.

Diante dos espectros obtidos, é provável que alguns dos flavonóis já identificados na espécie como a quercetina e/ou o canferol também estejam presentes no EASG.

Atividade antioxidante

Os modelos utilizados para a determinação da atividade antioxidante de uma amostra são inúmeros. Dessa forma, torna-se necessário o uso de mais de uma técnica, a fim de avaliar etapas distintas do estresse oxidativo (KRISHNAIAH, SARBATLY, NITHYANANDAM, 2011). Neste trabalho, optou-se por utilizar ensaios que têm como base a redução de espécies reativas (ensaio de redução do radical DPPH, método de inibição do radical NO e inibição da degradação da 2-DR).

Os resultados encontrados para a atividade antioxidante do EASG estão demonstrados na Tabela 2.



Tabela 2 - Atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas de *S. guianensis*, por meio do ensaio de redução do radical DPPH, inibição do radical óxido nítrico e inibição da degradação da 2-DR.

Amostras (100 µg/mL)	DPPH (% IR _Q)	NO (% IR _{AG})	2-DR (% IR _{AG})
EASG	63,44 ± 0,26 ^{****}	110,19 ± 4,33 ^{***}	82,61 ± 1,19 ^{****}
Quercetina	100	-	-
Ácido Gálico	-	100	100

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (n=3) do % IR_Q, % IR_{AG} ou % RR_Q. ANOVA, seguida por Bonferroni. Valores significativos: p^{****}<0,0001, p^{***}<0,001, vs substância referência (quercetina ou ácido gálico). Legenda: EASG: extrato aquoso de *Siparuna guianensis*; % IR_Q: Percentual de inibição relativo à quercetina; % IR_{AG}: Percentual de inibição relativo ao ácido gálico.

A atividade antioxidante do EASG foi comparada às substâncias de referência, como a quercetina e o ácido gálico, de acordo com a descrição de cada metodologia. A quercetina é um flavonoide amplamente distribuído no reino vegetal, que apresenta a capacidade de reduzir espécies reativas, inibir enzimas do metabolismo oxidativo, como a xantina oxidase, e inibir a peroxidação lipídica, além de ser conhecida por suas propriedades quelantes e estabilizadora do ferro (LESJAK *et al.*, 2018). O ácido gálico, por sua vez, é um ácido fenólico também encontrado em diversas espécies vegetais, reconhecido por inúmeras propriedades biológicas, dentre as quais destaca-se o seu notável potencial antioxidante (BADHANI, SHARMA, KAKKAR, 2015).

O DPPH é um radical livre, estável, não natural, que pode ser obtido diretamente por dissolução do reagente em meio orgânico. Assim, o método de sequestro deste radical trata-se de um teste simples e amplamente empregado na triagem e na predição da atividade antioxidante de compostos químicos sintéticos e provenientes de produtos naturais (ZOU *et al.*, 2011; MISHRA, OJHA, CHAUDHURY, 2012).

Como observado na Tabela 2, quando comparado à quercetina, o EASG (100 µg/mL) apresentou inibição relativa do radical DPPH de 63,44 %. Esse resultado é promissor, visto que o EASG é uma amostra complexa constituída de uma mistura de



substâncias, enquanto a quercetina é uma substância de referência com atividade antioxidante reconhecida.

Devido a algumas limitações do método como a reversibilidade da reação que pode ocasionar leituras subestimadas e o favorecimento de substâncias mais polares em virtude de características do meio reacional, outros ensaios também foram utilizados (MISHRA, OJHA, CHAUDHURY, 2012).

Diferente do DPPH, que é uma molécula sintética, o óxido nítrico é uma substância biológica que desempenha funções diversas no organismo. Este mediador pode atuar como um importante neurotransmissor, auxiliando na memória e aprendizado, além de ser responsável pela homeostase do organismo, ao desempenhar funções em vários tecidos e ter um papel decisivo na imunorregulação (BURTON & JAUNIAUX, 2011; ARULSELVAN *et al.*, 2016; RADI, 2018). No entanto, em condições como desordens inflamatórias, esta molécula encontra-se elevada, sendo rapidamente oxidada à ERN, o que a torna responsável por inúmeros danos a biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos (BORGES *et al.*, 2014).

A detecção e quantificação direta do NO é difícil, uma vez que ele apresenta meia vida curta devido a sua rápida oxidação a nitrito. Portanto, são utilizados métodos de detecção indiretos, sendo o mais comum o método de Griess (GRIESS, 1879). Nessa técnica, o nitrito formado a partir da oxidação do radical NO sofre uma reação de diazotização com a sulfanilamida, gerando um complexo intermediário, seguida de complexação com o NED, formando um cromóforo róseo (RAMOS *et al.*, 2006). Logo, a leitura espectrofotométrica realizada no comprimento de onda de 540 nm é proporcional à concentração de óxido nítrico disponível no meio reacional.

De acordo com a Tabela 2, o EASG (100 µg/mL) foi capaz de reduzir a formação do radical NO em 110,19 %, em relação ao ácido gálico. Isto significa que EASG apresentou uma capacidade de inibição do radical NO em cerca de 10 % superior ao controle utilizado, o que torna este resultado muito relevante.

Outro radical de importância fisiopatológica que foi avaliado por metodologia *in vitro* é o radical hidroxila. O radical OH é uma das espécies mais reativas, podendo ser



extremamente danoso ao organismo. Com tempo de meia vida curto, esse radical reage rapidamente com todos os tipos de biomoléculas, podendo causar danos ao DNA, carboidratos, proteínas e lipídios (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015; TREML & SMEJKAL, 2016). Em seres vivos, que possuem predominantemente como composição corpórea a água, o radical OH pode ser gerado por diversos mecanismos, como a exposição à radiação de alta energia ou por meio de reações catalisadas por metais na presença do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2015).

Um dos métodos específicos para determinar a atividade contra o radical OH é o ensaio da degradação da 2-DR (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1990). Nessa técnica, o Ferro (II) reage com o H₂O₂ formando o radical OH por meio da reação de Fenton. Esse radical, por sua vez, pode reagir com a 2-DR gerando o malonaldeído que, em pH ácido e sob aquecimento, reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico formando um cromóforo róseo, que pode ser detectado por espectrofotometria (GUTTERIDGE & HALLIWELL, 1988). Substâncias com propriedades antioxidantes podem impedir a formação deste radical por diversos mecanismos, ao competir com a 2-DR e/ou ao atuar como quelante do Fe (II) (ALVES *et al.*, 2010).

Os resultados da atividade antioxidante das amostras ao inibir o processo de degradação da 2-DR estão apresentados na Tabela 2. O EASG, na concentração de 100 µg/mL, foi capaz de inibir a degradação da 2-DR em 82,61 % em relação à substância de referência, o ácido gálico. Este resultado é de grande relevância, pois, como já mencionado, os radicais hidroxila e óxido nítrico são espécies reativas comumente formadas *in vivo* e envolvidas em condições patológicas. O estresse oxidativo causado pelo excesso destes radicais é a base de muitos distúrbios inflamatórios, como a asma, dermatites e artrite (PANAT *et al.*, 2015; TREML & SMEJKAL, 2016).

Portanto, a investigação e a constatação do potencial antioxidante para o extrato aquoso de *S. guianensis* pode ser atribuído, pelo menos em parte, à presença de compostos fenólicos e de flavonoides que foram quantificados e caracterizados por CLAE-UV. Sabe-se que esses constituintes têm sido considerados a classe de metabólitos



secundários com maior potencial antioxidante (WOJTUNIK, CIESLA, WAKSMUNDZKA-HAJNOS, 2014).

As hidroxilas fenólicas presentes na estrutura dos flavonoides desempenham a excelente função de doar hidrogênios participando da remoção de radicais livres e espécies reativas. Dentre as diferentes formas de atuação dos flavonoides, a ação quelante de metais é de grande importância para a inibição da formação de espécies reativas, inclusive o radical OH (ALVES *et al.*, 2010). A forma pela qual estes metabólitos exercem essa função se dá principalmente devido à presença do grupo catecol, que possibilita a formação de complexos com íons metálicos, e pelas hidroxilas 5-OH e 3-OH que, juntamente com o grupamento 4-oxo, complexam os metais, como pode ser observado na molécula da quercetina (RAJENDRAN *et al.*, 2012; LESJAK *et al.*, 2018).

A atividade antioxidante de flavonoides descritos na espécie já foi relatada. Dentre eles o canferol (RATHEE *et al.*, 2009) e a quercetina (BAGHEL *et al.*, 2012), com seus respectivos derivados glicosilados, vicentina 2 (UMA DEVI *et al.*, 2000) e a forma dimérica da procianidina B1 (LU & FOO, 2000; SOBRATTEE *et al.*, 2005). Portanto, a provável presença desses constituintes está diretamente relacionada ao potencial antioxidante observado para o EASG.

CONCLUSÃO

A capacidade antioxidante do extrato aquoso de *S. guianensis* obtido por decocção foi demonstrada pela primeira vez. Esta é de grande valia uma vez que evidencia o potencial da espécie em contribuir para a prevenção e/ou redução do desenvolvimento de patologias associadas ao estresse oxidativo. Além disso, a atividade verificada pode ser atribuída, pelo menos em parte, aos compostos fenólicos e flavonoides observados nos ensaios fitoquímicos e cromatográfico. Contudo, estudos posteriores são necessários a fim de identificar os principais constituintes responsáveis pela atividade antioxidante encontrada.



REFERÊNCIAS

AGUIAR, R. W. S.; DOS SANTOS, S. F.; DA SILVA MORGADO, F.; ASCENCIO, S. D.; DE MENDONÇA L. M.; VIANA, K. F.; RIBEIRO, B. M. Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl. (Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0116765, 2015.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. D. L.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.

ANDERSEN, A.; E MARKHAM, C. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications**. New York: CRC Press, 2005.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. D. G.; GOMES, M. D. S.; AZEREDO, C. M. O. D.; BATISTA, L. R.; SOARES, M. J.; RODRIGUES, L. M. A.; FIGUEIREDO, A. C. S. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 189-194, 2015.

ANDRADE, M. A.; DAS GRAÇAS C. M.; DE ANDRADE, J.; SILVA, L. F.; TEIXEIRA, M. L.; VALÉRIO R. J. M.; FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, J. G. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 384-397, 2013.

ANDRADE, M. A.; DOS SANTOS AZEVEDO, C.; MOTTA, F. N.; DOS SANTOS, M. L.; SILVA, C. L.; DE SANTANA, J. M.; BASTOS, I. M. Essential oils: *in vitro* activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 444, 2016.

AQUINO, V. V. F.; COSTA, J. G. M.; ANGÉLICO, E. C.; MEDEIROS, R. S.; LUCENA, M. D. F. A.; RODRIGUES, O. G. Metabólitos Secundários e ação antioxidante de *Croton heliotripifolius* e *Croton blanchetianus*. **Acta Brasiliensis**, v. 1, n. 3, p. 28-31, 2017.

ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016.

AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; RINALDO, D.; VILEGAS, W.; VIEIRA JÚNIOR, G. M. Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos das folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1509-1512, 2009.



BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: a versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.

BAGHEL, S. S.; SHRIVASTAVA, N.; BAGHEL, R. S.; AGRAWAL, P.; RAJPUT, S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 146-60, 2012.

BORGES, F. R.; SILVA, M. D.; CORDOVA, M. M.; SCHAMBACH, T. R.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid α -spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 144-150, 2014.

BRAZ-FILHO, R.; GABRIEL, S. J.; GOMES, C. M. R.; GOTTLIEB, O. R.; BICHARA, M. D. G. A.; MAIA, J. G. S. Oxoaporphine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna guianensis*. **Phytochemistry**, p. 1187-1188, 1976.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.

CÉLINE, V.; ADRIANA, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A. C.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L.F.; ROSÁRIO, R.; DIONICIA, G.; MICHEL, S.; DENIS, C.; GENEVIÈVE, B. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 413-422, 2009.

DAVIS, E. W.; YOST, J. A. The ethnomedicine of the Waorani of Amazonian Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 9, n. 2-3, p. 273-297, 1983.

DOWD, L. E. Spectrophotometric Determination of Quercetin. **Analytical Chemistry**, v. 31, n. 7, p. 1184–1187, 1959.

FACUNDO, V. A.; AZEVEDO, M. S.; RODRIGUES, R. V.; NASCIMENTO, L. F. D.; MILITÃO, J. S.; DA SILVA, G. V.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1134–1139, 2012.

FISCHER, D. C. H.; DE AMORIM G. N. C.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C. S.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; ALVES, M. O.; YOGI, A.; DI SANTI, S. M.; AVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K.; MORENO, R.H. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta tropica**, v. 92, n. 3, p. 261-26, 2004.

FOLIN, O.; CIOCALTEU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627-650, 1927.



GOVINDARAJAN, R.; RASTOGI, S.; VIJAYAKUMAR, M.; SHIRWAIKAR, A.; RAWAT, A. K. S.; MEHROTRA, S.; PUSHANGADAN, P. Studies on the antioxidant activities of *Desmodium gangeticum*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 10, p. 1424–1427, 2003.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GRIESS, P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt „Ueber einige Azoverbindungen“. **Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft**, v. 12, n. 1, p. 426–428, 1879.

GUIMARÃES LEITÃO, G.; SANTOS EL-ADJI, S.; DE MELO, W. A. L.; GUIMARÃES LEITÃO, S.; BROWN, L. Separation of free and glycosylated flavonoids from *Siparuna guianensis* by gradient and isocratic CCC. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 12–13, p. 2041–2051, 2005.

GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, B. The deoxyribose assay: an assay both for ‘free’ hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production. **Biochemical Journal**, v. 253, n. 3, p. 932–933, 1988.

HALLIWELL, B. **Free radicals and other reactive species in disease**. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**: 5 ed. Oxford: Oxford University Press, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 1–85, 1990.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

LESJAK, M.; BEARA, I.; SIMIN, N.; PINTAĆ, D.; MAJKIĆ, T.; BEKVALAC, K.; ORČIĆ, D.; MIMICA-DUKIĆ, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 68-75, 2018.

LOPEZ, A.; HUDSON, J. B.; TOWERS, G. H. N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, n. 2, p. 189-196, 2001.



LU, Y.; FOO, L. P. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food Chemistry**, v. 68, p. 81-85, 2000.

MAGALHÃES, M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de *Oenocarpus bacaba* Mart., *Cordia glabrata* Mart. e *Siparuna guianensis* Aubl.** 2018. 37 f. Monografia (Bacharelado em Farmácia) - Universidade Federal de Mato Grosso, Sinop, 2018.

MELO, D.; MIRANDA, M.; JUNIOR, W.; ALCOBA, A.; ANDRADE, P.; SILVA, T.D.S.; CAZAL, C.; MARTINS, C. Anticariogenic and Antimycobacterial Activities of the Essential Oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). **Orbital- The Electronic Journal of Chemistry**, v. 9, n.1, p. 55-60, 2017.

MERKEN, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of Food Flavonoids by High Performance Liquid Chromatography: A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-599 2000.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

NEGRI, G; SANTI, D; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 1024–1034, 2012.

PANAT, N. A.; AMRUTE, B. K.; BHATTU, S.; HARAM, S. K.; SHARMA, G.; GHASKADBI, S. Antioxidant Profiling of C3 Quercetin Glycosides: Quercitrin, Quercetin 3- β -D-glucoside and Quercetin 3-O-(6''-O-malonyl)- β -Dglucoside in cell free environment, **Free Radicals and Antioxidants**, v. 5, n. 2, p. 90-100, 2015.

RADI, R. Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxy nitrite: Redox pathways in molecular medicine. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, p. 5839-5848, 2018.

RAJENDRAN, M.; RAVICHANDRAN, R.; DEVAPIRIAM, D. Molecular modeling study of quercetin and their metal complexes. **International Journal of Computer Applications**, v. 50, n. 22, p. 30-44, 2012.

RAMOS, L. A.; CAVALHEIRO, C. C. S.; CAVALHEIRO, E. T. G. Determinação de nitrito em águas utilizando extrato de flores. **Química Nova**, v. 29, n. 5, p. 1114–1120, 2006.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: A review. **Inflamm. Allergy Drug Targets**, v. 8, p. 229–235, 2009



SANTOS, J. D. F. L.; PAGANI, E.; RAMOS, J.; RODRIGUES, E. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 503-515, 2012.

SHEBIS, Y.; ILUZ, D.; KINEL-TAHAN, Y.; DUBINSKY, Z.; YEHOSHUA, Y. Natural Antioxidants: Function and Sources. **Food and Nutrition Sciences**, v. 4, n. 6, p. 643-649, 2013.

SOARES, I. M.; RIBEIRO, M. F.; DA COSTA, O. J.; DE SOUZA, E. E.; AGUIAR, A. A.; BARBOSA, R. S.; ALVIM, T. D.; ASCÊNCIO, S. D.; AGUIAR, R. W. S. Application of a degreasing process and sequential ultrasound-assisted extraction to obtain phenolic compounds and elucidate of the potential antioxidant of *Siparuna guianensis* Aublet. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 11, n. 21, p. 367-366, 2017.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. **Mutation Research/fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.

TAREAU, M. A.; PALISSE, M.; ODONNE, G. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 203, p. 200-213, 2017.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. T.; DE ANDRADE, H. F.; DE AMORIM GUALDA, N. C.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, 2005.

TREML, J.; ŠMEJKAL, K. Flavonoids as potent scavengers of hydroxyl radicals. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 15, n. 4, p. 720-738, 2016.

UMA DEVI, A.; GANASOUNDARI, B.; VRINDA, K. K. S; UNNIKRIISHNAN, M. K. Radiation Protection by the *Ocimum* Flavonoids Orientin and Vicenin: Mechanisms of Action. **Radiation Research**, v. 154, n. 4, p. 455-460.

VALENTINI, C. M. A.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 96-104, 2010.

WOJTUNIK, K. A.; CIESLA, L. M.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 37, p. 9088-9094, 2014.



ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SANTOS, A. S.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S.
Essential oils of *Siparuna guianensis* Aubl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 543-540, 1998.

ZOU, Y.; CHANG, S. K.C; GU, Y.; QIAN, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2268, 2011.

Received: 24 August 2020

Accepted: 10 September 2020

Published: 02 April 2021