

Perfil Químico e Análise Antioxidante in vitro do extrato e fração de *Auxemma glazioviana* Taub.

Chemical profile and in vitro antioxidant analysis of the extract and fraction of *Auxemma glazioviana* Taub.

Perfil químico y análisis antioxidante in vitro del extracto y la fracción de *Auxemma glazioviana* Taub.

Recebido: 17/10/2020 | Revisado: 24/10/2020 | Aceito: 26/10/2020 | Publicado: 29/10/2020

Natália Kelly Gomes de Carvalho

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5325-3712>

Universidade Regional do Cariri, Brasil

E-mail: nataliakellygc@gmail.com

Débora Odília Duarte Leite

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3557-8366>

Universidade Estadual do Ceará, Brasil

E-mail: biodeboraleite@yahoo.com.br

Cicera Janaine Camilo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0374-9589>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: janainecamilo@hotmail.com

Carla de Fátima Alves Nonato

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7869-356X>

Universidade Regional do Cariri, Brasil

E-mail: carlaalvesbio@hotmail.com

Gerson Javier Torres Salazar

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0908-0919>

Universidade Federal Rural de Pernambuco, Brasil

E-mail: timotygertor@yahoo.com

Lucas Ribeiro Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1688-5320>

Centro Universitário Dr. Leão Sampaio, Brasil

E-mail: ribeirocosta1996@gmail.com

José Galberto Martins da Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4268-663X>

Universidade Regional do Cariri, Brasil

E-mail: galberto.martins@gmail.com

Resumo

Auxemma glazioviana Taub. (Boraginaceae), conhecida como “pau branco”, está distribuída nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte e é utilizada tradicionalmente no tratamento de cortes e feridas. As distintas atividades biológicas estão associadas a presença de quinonas, composto químico de ampla ocorrência na espécie. O objetivo desse estudo foi identificar as principais classes de metabólitos secundários, quantificar o conteúdo total de polifenóis, obter a fração quinona (FQ) e avaliar o potencial antioxidante do extrato etanólico de *A. glazioviana* e da fração obtida. A partir do extrato foi realizada uma triagem fitoquímica e a quantificação de polifenóis totais. A obtenção e caracterização da fração quinona foi feita por meio de técnicas cromatográficas. O potencial antioxidante do extrato e da fração foi determinado pelos métodos, DPPH•; captura de radical livre ABTS•⁺, determinação do poder de redução do íon Fe³⁺ (FRAP) e capacidade antioxidante relativa (CAR). A prospecção química do extrato etanólico revelou a presença de flavonoides. A quantificação de polifenóis totais foi de 4,4822 mg AG/g.extrato. Nas análises antioxidantes, extrato e fração apresentaram resultados significativos, em que o EECCAG foi mais eficiente quando comparado a FQ. Os dados mostram que o EECCAG é potencialmente mais eficiente quanto a atividade antioxidante.

Palavras-chave: Antioxidante; *Auxemma glazioviana*; Cromatografia; Quinonas.

Abstract

Auxemma glazioviana Taub. (Boraginaceae), known as "white stick", is distributed in the states of Ceará and Rio Grande do Norte and is traditionally used in the treatment of cuts and wounds. The different biological activities are associated with the presence of quinones, a chemical compound widely occurring in the species. The objective of this study was to identify the main classes of secondary metabolites, quantify the total content of polyphenols, obtain the quinone fraction (FQ) and evaluate the antioxidant potential of the ethanolic extract of *A. glazioviana* and the fraction obtained. From the extract a phytochemical screening and quantification of total polyphenols was performed. The attainment and characterization of the quinone fraction was done through chromatographic techniques. The antioxidant potential of

the extract and of the fraction was determined by the methods, DPPH●; capture of free radical ABTS●+, determination of the reduction power of Fe³⁺ ion (FRAP) and relative antioxidant capacity (CAR). The chemical prospection of the ethanolic extract revealed the presence of flavonoids. The quantification of total polyphenols was 4.4822 mg AG/g.extract. In the antioxidant analysis, extract and fraction presented significant results, in which EECCAG was more efficient when compared to FQ. The data show that EECCAG is potentially more efficient in antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant; *Auxemma glazioviana*; Chromatography; Quinonas.

Resumen

Auxemma glazioviana Taub. (Boraginaceae), conocida como "palo blanco", se distribuye en los estados de Ceará y Río Grande do Norte y se utiliza tradicionalmente en el tratamiento de cortes y heridas. Las diferentes actividades biológicas están asociadas a la presencia de quinonas, un compuesto químico muy difundido en la especie. El objetivo de este estudio fue identificar las principales clases de metabolitos secundarios, cuantificar el contenido total de polifenoles, obtener la fracción de quinona (FQ) y evaluar el potencial antioxidante del extracto etanólico de *A. glazioviana* y la fracción obtenida. A partir del extracto se realizó un examen fitoquímico y una cuantificación de los polifenoles totales. La fracción de quinona se obtuvo y caracterizó mediante técnicas cromatográficas. El potencial antioxidante del extracto y la fracción se determinó mediante los métodos, DPPH●; captura de radicales libres ABTS●+, determinación del poder de reducción del ión Fe³⁺ (FRAP) y capacidad antioxidante relativa (CAR). La prospección química del extracto etanólico reveló la presencia de flavonoides. La cuantificación de los polifenoles totales fue de 4,4822 mg AG/g.extracto. En el análisis de antioxidantes, el extracto y la fracción mostraron resultados significativos, en los que el EECCAG fue más eficiente en comparación con el FQ. Los datos muestran que el EECCAG es potencialmente más eficiente en la actividad antioxidante.

Palabras clave: Antioxidante; *Auxemma glazioviana*; Cromatografía; Quinonas.

1. Introdução

Diversos processos fisiológicos e bioquímicos podem produzir radicais livres centrados no oxigênio e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) como subprodutos (Cai, et al., 2004). Grande parte das ROS produzidas no metabolismo humano, são capazes de induzir a oxidação de ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, sendo eliminados naturalmente por

antioxidantes e enzimas em organismos saudáveis. O excesso de ROS pode saturar a função antioxidante da célula e ocasionar o estresse oxidativo, podendo desencadear danos celulares e teciduais associados a uma série de doenças degenerativas (Sousa, et al., 2015).

As plantas possuem ampla variedade em compostos químicos capazes de diminuir ou impedir o processo de oxidação por diferentes mecanismos de ação, permitindo o equilíbrio entre antioxidante/oxidante (Moure, et al., 2001). Devido a isso, produtos de origem natural surgem como uma nova alternativa de fontes antioxidantes. Como exemplo desses compostos é possível destacar os ácidos fenólicos, flavonóides, quinonas, cumarinas e taninos, que atuam na prevenção e tratamento do câncer e doenças degenerativas cardiovasculares (Oliveira, et al., 2015).

Quinonas são compostos subdivididos de acordo com o sistema aromático que os sustentam sendo eles, benzoquinonas, naftoquinonas e hidroquinonas. Estudos apontam uma biodinamicidade na participação em etapas da cadeia respiratória, fotossíntese e ciclos redox enzimáticos e/ou não-enzimáticos, além de, possuírem propriedades microbidas, antitumorais e ações farmacológicas (Sousa, et al., 2016; Silva, et al., 2003)

Auxemma glazioviana Taub. (Boraginaceae), popularmente conhecida por “pau branco”, é uma espécie nativa do Brasil, distribuída especialmente na caatinga nos estados do Ceará e Rio Grande do Norte. Na medicina tradicional é reconhecida por suas propriedades adstringentes, atuando no tratamento de ferimentos (Costa, et al., 2005). Alguns estudos de isolamento identificaram a presença do composto oncocalyxona A, uma benzoquinona com atividades farmacológicas comprovadas cientificamente como citotóxica, analgésica e anti-inflamatória (Leyva, et al., 2000; Ferreira, et al., 2003; Ferreira, et al., 2004).

Devido à presença de importantes compostos isolados relatados na literatura e à ausência de pesquisas antioxidantes referentes a espécie *A. glazioviana*, o estudo teve como objetivo identificar as principais classes de metabólitos secundários, quantificar o conteúdo de polifenóis totais, fracionar o extrato etanólico de *A. glazioviana* através de técnicas cromatográficas e avaliar seu potencial antioxidante.

2. Metodologia

2.1 Coleta e Preparo das Amostras

O material vegetal foi coletado em agosto de 2017, no Município de Barro, Ceará, Brasil. Inicialmente, o cerne do caule de *A. glazioviana* (300 g) foi previamente triturado em

forrageira e submetidos ao processo de maceração em hexano por 72 horas para remoção de gorduras, seguido da concentração em evaporador rotativo sob pressão reduzida. Após a secagem do material, o mesmo procedimento foi utilizado para extração em etanol, obtendo o extrato etanólico do cerne do caule de *A. glazioviana* (EECCAG) com rendimento de 5,2 %.

2.2 Prospecção Química

Para a determinação das classes de metabólitos secundários presentes no EECCAG foi utilizada a metodologia proposta por Matos (2009). A presença e ausência dos metabólitos secundários é determinada através de algumas reações qualitativas de coloração e precipitação, baseada nas propriedades físico-químicas das substâncias.

2.3 Quantificação de Polifenóis totais

O teor de compostos fenólicos presentes no EECCAG foi quantificado seguindo o método proposto por Waterman & Mole (1994) com o reagente Folin-ciocalteu. Foram preparadas 04 amostras do EECCAG com concentrações de 50 mg diluídas em etanol. O meio reacional foi composto pela adição de 200 µl do EECCAG, 600 µl de etanol 70 %, 400 µl do reagente folin-ciocalteu e 2000 µl da solução de carbonato de sódio (20 % m/v). A mistura foi homogeneizada, e adicionado mais 800 µl da solução de carbonato de sódio (20 % m/v). As amostras foram incubadas por 20 minutos em banho maria à 45 °C, em seguida centrifugadas por 3 minutos a 14.000 rpm e mantidas em repouso por 20 minutos a temperatura ambiente. A leitura da absorvância foi realizada em espectrofotômetro UV-visível a 735 nm. O teste foi realizado em triplicata, tendo o ácido gálico como padrão de referência.

2.4 Métodos Cromatográficos

2.4.1 Cromatografia em coluna (CC)

A cromatografia em coluna do EECCAG teve como adsorvente gel de sílica 60, constituindo a fase estacionária. Na fase móvel foram aplicados diferentes solventes orgânicos: hexano, acetato de etila e metanol puros e/ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, devido a interação solvente-soluto.

2.4.2 Cromatografia em camada delgada analítica (CCD)

A técnica ocorreu em cromatoplasmas com uma das faces revestidas por gel de sílica 60G (fase estacionária). A aplicação ocorreu uniformemente por capilares de vidro, em cuba vedada e saturada com acetato de etila (fase móvel). A técnica foi empregada para o monitoramento durante o processo de fracionamento da CC, a fim de identificar e agrupar as frações com características idênticas. As frações (25-31), resultantes da CC com fase móvel 100 % acetato de etila, foram agrupadas e nomeadas de fração quinona (FQ)

2.5 Análises antioxidantes

2.5.1 Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método DPPH•

A atividade sequestradora do radical livre foi determinada pelo método fotocolorimétrico de DPPH• (1,1, difenil-2-picrilhidrazil), proposto por Rufino, et al., (2007) com adaptações. As concentrações da FQ e EECCAG variaram de 0,50 a 0,0025 mg/mL. Para o ensaio foram utilizados 20 µL das amostras, 80 µL de etanol 95 % e 100 µL da solução do radical DPPH• (0,3 mM). Após 30 minutos de incubação a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram realizadas as medidas de absorvância em espectrofotômetro UV-visível a 518 nm. O branco das amostras e o padrão antioxidante (ácido ascórbico) foram quantificados nas mesmas condições com 20 µL dos padrões e 180 µL de etanol 95 %. Os resultados foram calculados conforme equação 1.

Equação 1:

$$PI \% = 100 - \left\{ \left[\frac{Abs_{Amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{Controle\ negativo}} \right] \times 100 \right\}$$

Onde: PI%= Porcentagem de Inibição; Abs: Absorvâncias.

2.5.2 Captura do Radical Livre ABTS•⁺

Para o ensaio de captura de radical livre ABTS•⁺ foi utilizada a metodologia proposta por Rufino, et al., (2006). O radical ABTS•⁺ foi preparado a partir da mistura de uma solução do sal diamônio do ABTS a 7 mM com uma solução de persulfato de potássio (concentração final de 2,45 mM), ambas preparadas em tampão fosfato salino (pH 7,2). A solução resultante

(solução estoque) foi mantida em frasco âmbar à temperatura ambiente por 16 horas para a formação do radical livre ABTS^{•+}. A solução estoque de ABTS^{•+} foi diluída com tampão fosfato salino (pH 7,2) até o valor de absorvância de $0,80 \pm 0,02$, ser obtido em 734 nm. Uma alíquota de 2970 µL dessa solução foi adicionada 30 µL das concentrações de 5,0 a 1,0 µl/mL do EECCAG e da FQ, bem como dos controles positivos de quercetina e rutina. O ensaio foi realizado em triplicata e as leituras foram efetuadas 5 minutos após o início da reação em espectrofotômetro ajustado para 734 nm. Os resultados foram calculados conforme equação 1.

2.5.3 Determinação do poder de redução do íon ferro - FRAP

O poder de redução do íon Fe³⁺ foi determinado de acordo com a metodologia proposta por Rufino et al., (2006). As concentrações do EECCAG e da FQ variaram de 0,005 a 0,001 mg/mL. O meio reacional foi composto por 90 µL das amostras, 270 µL de água destilada, com 2,7 mL do reagente FRAP (preparado no momento da análise, obtido a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM). Após o tempo reacional de 30 min (ao abrigo da luz e em banho – maria a 37 °C), as absorvâncias foram lidas a 595 nm. Os padrões antioxidante utilizados foram: ácido gálico, quercetina e catequina.

2.5.4 A capacidade antioxidante relativa (CAR)

Para a capacidade antioxidante relativa foi utilizado o método do reagente fosfomolibdênio conforme Prieto & Aguilar (1999). As concentrações utilizadas do EECCAG e da FQ variaram de 0,035 a 0,010 mg/mL. O meio reacional foi composto por 100 µL das amostras, 2,7 mL do reagente fosfomolibdênio (1000 µL molibdato de amônia 4 mM, 1000 µL de tampão fosfato de sódio 28 mM pH 7.4, 700 µL de ácido sulfúrico 0.6 M) e 200 µL de água miliq, os tubos foram parcialmente fechados e colocados em banho Maria a 95 °C durante 90 minutos. Após resfriadas, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 695nm. Para leitura do branco o volume de 1000 µL de molibdato de amônia foi substituído por água miliq. Como padrão de referência antioxidante foram utilizadas as soluções: rutina (0,075 mg/mL), ácido ascórbico (0,020 mg/mL) e catequina (0,020 mg/mL).

2.6 Análise estatística

Os valores foram expressos como medias \pm S.E.M. (n=3). Para todos os testes, após normalização dos dados foi realizado teste de curva de regressão não linear pelo Microsoft Excel (2007) e programa estatístico GraphPad Prism versão 7.0 para obtenção dos valores de IC₅₀. Com os valores obtidos, foi realizado ANOVA e o teste de Tukey para comparação múltipla entre pares, considerando significativos os valores de P < 0.05.

3. Resultados e Discussão

3.1 Prospecção Química

Os resultados da triagem química identificaram importantes metabolitos secundários presentes no EECCAG pertencentes a classe dos flavonoides, entre esses; flavonas, flavonóis e xantonas, como mostra a Tabela 1.

Tabela 1. Identificação das principais classes químicas do EECCAG.

	Classe de Metabólitos Secundários										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
EECCAG	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-

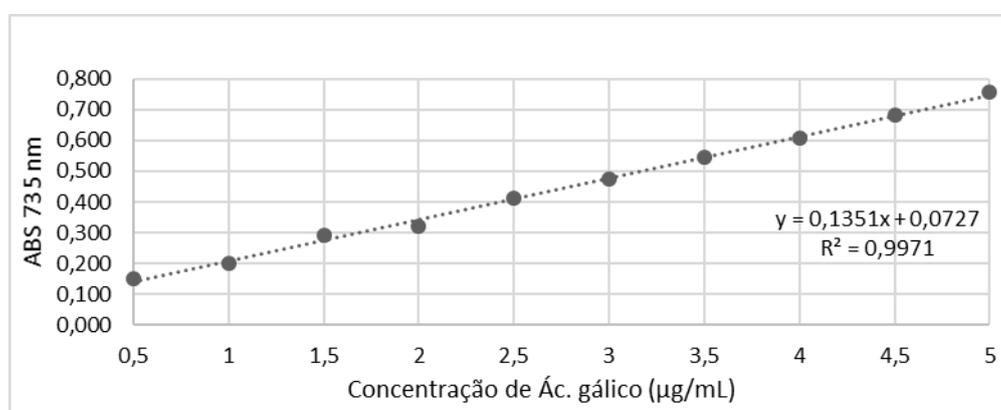
1: Fenóis; 2: Taninos condensados; 3: Taninos pirogálicos; 4: antocianinas e antocianidinas; 5: Flavonas, flavonóis e xantona; 6: flavononóis; 7: flavononas; 8: chalconas e auronas; 9: leucoantocianidinas; 10: catequinas; 11 alcaloides. (+) presente e (-) ausente. Fonte: Os autores (2020).

Além dos metabólitos secundários encontrados em estudo, Silva (2017) a presença em *A. glazioviana* de sesquiterpenos, alcaloides, quinonas terpenoídicas e suas formas reduzidas, as quais são estruturalmente semelhantes aos cordiacromos. Tais compostos possuem excelentes propriedades redox e atuam como agentes coagulantes na família da vitamina K, além disso, são reconhecidos por serem frequentemente bioativas com potencial antiinflamatório, hepatoprotetor, analgésico, antimicrobiano, antifúngico (Oza & Kulkarni, 2017; Bessa, et al., 2013; Giada, 2014).

3.2 Quantificação de polifenóis totais

A quantificação do conteúdo de polifenóis totais é baseada na redução dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico em solução alcalina. O cálculo do teor de compostos fenólicos foi realizado através da elaboração da curva do ácido gálico em concentrações variando de 0,5 a 5 µg/mL, com equação da curva de calibração de $y = 0,1351x + 0,0727$ e coeficiente de correlação $R^2 = 0,9971$, conforme a Gráfico 1, obtendo um conteúdo de polifenóis totais de $4,4822 \pm 0.1371$ mg.GA/g. EECCAG.

Gráfico 1. Curva de calibração do ácido gálico.



Fonte: Os autores (2020).

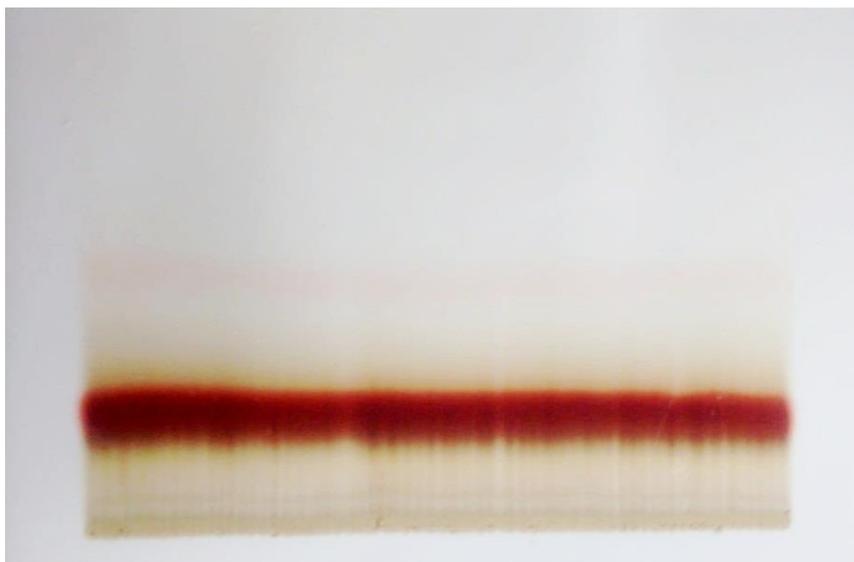
O conteúdo de polifenóis totais pode variar em decorrência a diversos fatores, como região geográfica, variações à exposição solar, método de cultivo e fertilização aplicados, dentre outros (Angelo & Jorge 2007). Vale salientar ainda que esse é um estudo pioneiro, não sendo encontrados dados na literatura relacionados a quantificação de fenóis totais na espécie.

3.3 Processos cromatográficos

Através da cromatografia em coluna (CC) foram coletadas 39 frações com volumes variados de aproximadamente 100 mL com solventes orgânicos puros e/ou em misturas binárias. As frações coletadas de 25 a 31 com fase móvel 100 % acetato de etila revelaram a presença de uma substância com pigmentação vinho escuro. A técnica de monitoramento por CCD analítica demonstrou que tais frações apresentaram o mesmo perfil cromatográfico (Figura 1) com um fator de retenção (R_f) de 0,6, sendo unidas, pesadas e concentradas em evaporador rotativo, fornecendo uma massa de 1,64 g e rendimento de 18,2

%. Segundo Dresler, et al., (2017) a família Boraginaceae é rica em quinonas e grande parte são caracterizadas pela coloração vinho escuro. Costa, et al., (2005) isolaram diversos constituintes químicos de *A. glazioviana*, dentre esses, é destacado a presença de uma substância denominada oncocalyxona A, com as mesmas características e perfis encontrados nesse estudo.

Figura 1. CCD preparativa da FQ.



Fonte: Os autores (2020).

3.4 Analise Antioxidante

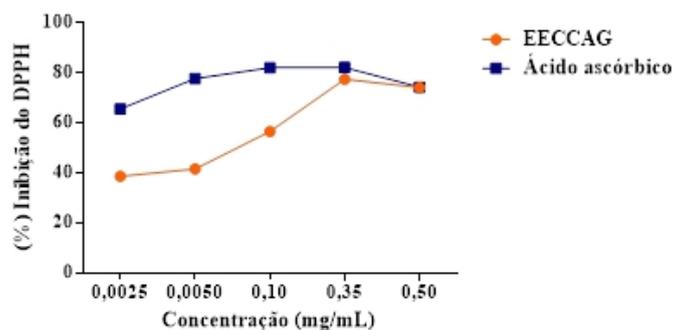
3.4.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH•

Para todas as concentrações testadas do EECCAG obteve-se porcentagens de neutralização do radical livre DPPH• relevantes (Gráfico 2) com IC₅₀ de $0,01278 \pm 0,026$ mg/mL (Tabela 2), enquanto que para a FQ (Gráfico 3) a IC₅₀ foi de $0,1320 \pm 0,015$ mg/mL (Tabela 2). Tais valores denotam que quanto maior o consumo de DPPH• pela amostra, maior o potencial antioxidante, nesse sentido, os resultados mostram que em concentrações menores o EECCAG foi mais eficiente (Alves, et al., 2010).

Entretanto, ambas amostras nas concentrações de 0,35 e 0,50 mg/mL permaneceram com valores semelhantes e invariáveis, devido possivelmente, a uma estabilidade da oxidação. Amudha & Rani (2016) mostraram que o extrato etanólico e acetato de etila de *Cordia retusa* em concentração de 1mg/mL inibiram em 74,13 % e 67,38 %, respectivamente, tais valores

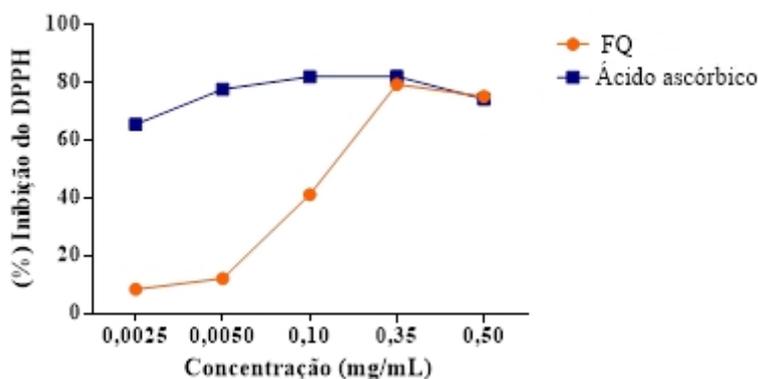
são próximos aos encontrados na concentração máxima em estudo, corroborando com os resultados obtidos.

Gráfico 2. Poder de inibição do radical DPPH[•] do EECCAG tendo como padrão antioxidante ácido ascórbico.



Fonte: Os autores (2020).

Gráfico 3. Poder de inibição do radical DPPH[•] na FQ, tendo como padrão antioxidante ácido ascórbico.



Fonte: Os autores (2020).

Tabela 2. Inibição do radical DPPH[•].

	Ácido ascórbico	EECCAG	FQ
IC ₅₀ ± ΔIC ₅₀ (mg/mL)	0,001910 ± 0,0008	0,01278 ± 0,026	0,1320 ± 0,015

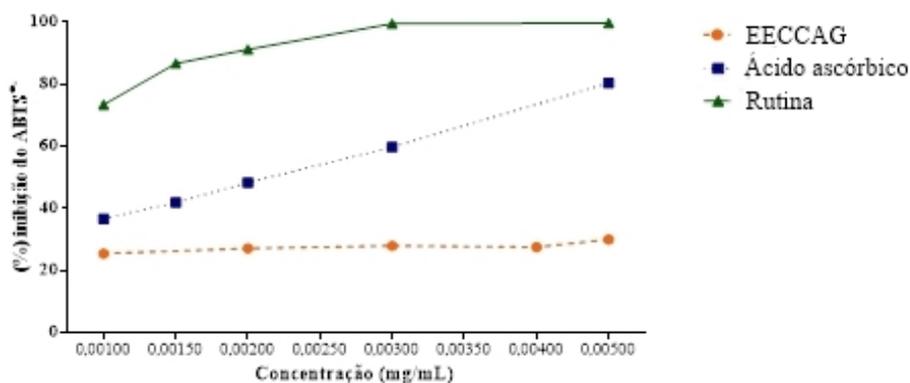
Fonte: Os autores (2020).

Costa, et al., (2007) ao analisarem o potencial antioxidante do óleo essencial de *A. glazioviana* obtiveram 68,52 % de neutralização do radical DPPH• na concentração de 0,125 mg/mL, além disso, identificaram α -bisabolol (46,3 %) como composto majoritário, estudos apontam que além de diminuir o estresse oxidativo essa substância apresenta propriedades anti-inflamatórias (Rocha, et al., 2011). Resultados semelhantes foram encontrados em estudo, em concentrações menores (0,100 mg/mL) o EECCAG e a FQ foram capazes de inibir 58,5 % e 41 % o radical DPPH•, respectivamente. Além do conteúdo de flavonóides encontrados em estudo, Costa, et al., (2005) identificaram benzoquinonas, hidroquinonas e sesquiterpenos no extrato de *A. glazioviana*. Sunassee & Davies-Coleman (2012) descrevem que quinonas preniladas possuem potencial antioxidantes por meio da neutralização do radical DPPH•. Quimicamente, esses compostos possuem a habilidade em liberar homoliticamente o hidrogênio da ligação O-H e formar radicais estáveis por efeito de ressonância ou por efeito de hiperconjugação, potencializando a atividade antioxidante. Nesse sentido, o EECCAG se mostra mais eficaz quando comparado a FQ devido a concentração total desses componentes (Quideau, et al., 2011).

3.4.2 Captura do radical livre ABTS^{•+}

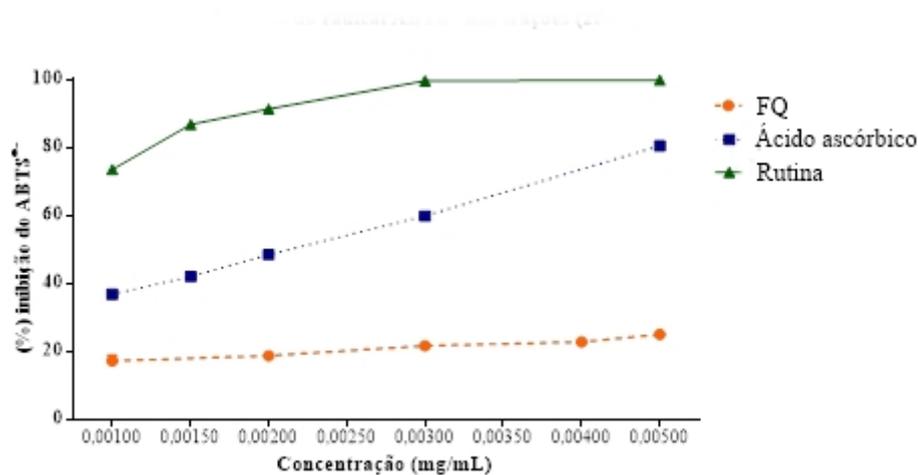
Os resultados indicam que as porcentagens de neutralização do radical livre ABTS^{•+} variaram de 25,60 % a 29,0 % para o EECCAG (Gráfico 4) e de 17,98 % a 23,38 % em relação a FQ (Gráfico 5). Entretanto, tais valores foram inferiores a 50 % dos padrões antioxidantes testados (rutina e ácido ascórbico), dessa forma, não foi possível realizar o cálculo de IC₅₀.

Gráfico 4. Gráfico da porcentagem de inibição do cátion radical livre ABTS^{•+} do EECCAG medida pelo ensaio da descoloração do ABTS^{•+} em 734nm, com rutina e ácido ascórbico como controles positivos.



Fonte: Os autores (2020).

Gráfico 5. Gráfico da porcentagem de inibição do cátion radical livre ABTS^{•+} da FQ medida pelo ensaio da descoloração do ABTS^{•+} em 734nm, com rutina e ácido ascórbico como controles positivos.



Fonte: Os autores (2020).

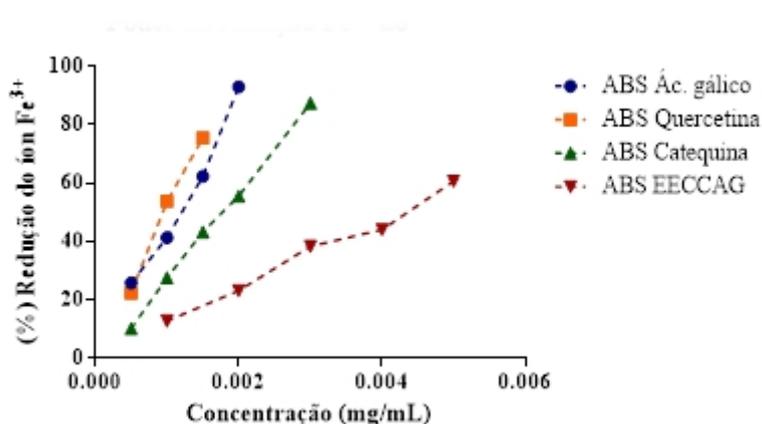
Castro, Rivera & Franco (2019) ao utilizarem concentrações de 0,125 a 0,75 mg/mL para o extrato etanólico de *Cordia alba* (Boraginaceae) notificaram um percentual IC₅₀ de 276,7 ± 1,3 µg/mL, nesse sentido, o EECCAG e a FQ possivelmente podem exercer um maior potencial de neutralização do radical livre ABTS^{•+} em concentrações superiores as testadas no presente estudo. Cai, et al., (2004) associam a atividade antioxidante de *Lithospermum*

erythrorhizon Sieb. e Zucc. (Boraginaceae) ao conteúdo de naftoquinonas presentes no extrato. Silva (2017) identificou a presença de tal composto no extrato de *A. glazioviana*. Segundo Araújo, Alencar & Neto (2002) relatam que o potencial das atividades biológicas de naftoquinonas é diretamente influenciado aos detalhes químico-estruturais, podendo ser inativado pela retirada de um metileno da cadeia isoprenóide, que conseqüentemente, pode ser menos ativo em compostos isolados do que no extrato bruto da planta, sugerindo um sinergismo de ações dos outros componentes. Justificando assim, o maior potencial antioxidante do EECCAG quando comparado a FQ purificada.

3.4.3 Determinação do Poder de Redução do Ferro - FRAP

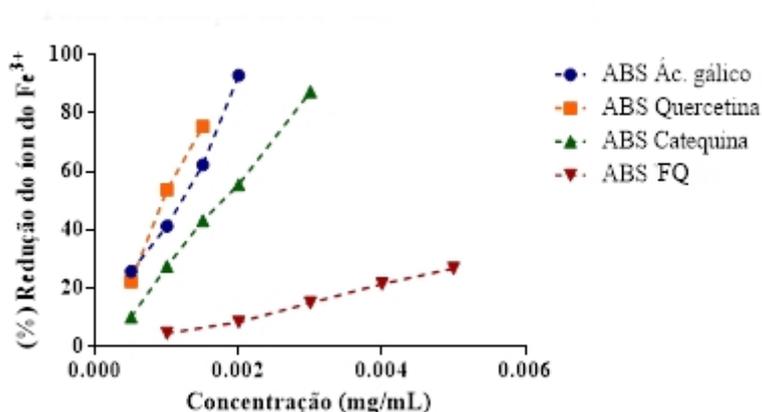
Os resultados demonstram que o EECCAG reduziu significativamente a forma férrica do ferro (Fe III) para sua forma ferrosa (Fe II) com IC_{50} de $0,004167 \pm 0,00027$ (Tabela 3) e porcentagem máxima de 60 % (Gráfico 6). Já a FQ apresentou baixa capacidade redução com valores máximos de 24,5% (Gráfico 7), porcentagem inferior a 50 % dos controles positivos ácido gálico, quercetina e catequina, impossibilitando o cálculo de IC_{50} .

Gráfico 6. Poder de redução do íon Fe^{3+} expressos em (mg/mL) com o EECCAG utilizando o ácido gálico, quercetina e catequina como padrão antioxidante.



Fonte: Os autores (2020).

Gráfico 7. Poder de redução do íon Fe^{3+} expressos em (mg/mL) com a FQ utilizando ácido gálico, quercetina e catequina como padrão antioxidante.



Fonte: Os autores (2020).

Tabela 3. Poder de inibição do Fe^{3+} dos padrões ácido gálico, quercetina, catequina e do EECCAG.

	Ácido gálico	Quercetina	Catequina	EECCAG
($\text{IC}_{50} \pm \Delta\text{IC}_{50}$)	0,001029 \pm	0,0009101 \pm	0,001626 \pm	0,004167 \pm
mg/mL	0,00017	0,000022	0,00011	0,00027

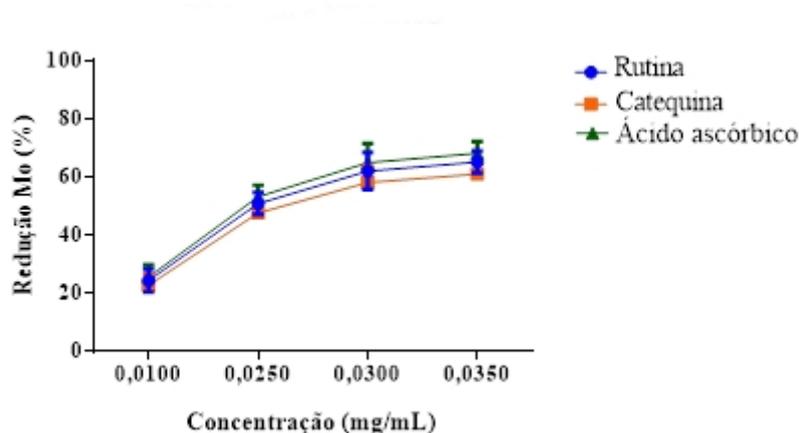
Fonte: Os autores (2020).

Resultados semelhantes foram relatados por Melo, et al., (2007) ao avaliarem o extrato do cerne do caule e as entrecasas de *A. oncocalyx* obtiveram valores de $14026 \pm 358,08$ e $14376,72 \pm 612,19$ $\mu\text{mol ET/g}$, respectivamente, considerando uma alta atividade antioxidante da espécie. Mecanicamente, a redução do complexo Fe III-TPTZ pode ser atribuída a doação de elétrons/hidrogenação por agentes redutores (Nobre, et al., 2018). Sabido do potencial redox de quinonas e considerando que o EECCAG é uma mistura complexa de componentes químicos, pode-se supor que a atividade antioxidante está relacionada a um sinergismo dos componentes (Sousa, et al., 2016; Silva, 2017). Nesse sentido, Casanova & Costa (2017) relatam que os processos de fracionamento e purificação de extratos vegetais levam à redução da atividade biológica inicialmente observada, e que misturas complexas de substâncias de origem natural são potencialmente mais eficientes.

3.4.4 Capacidade antioxidante relativa – CAR

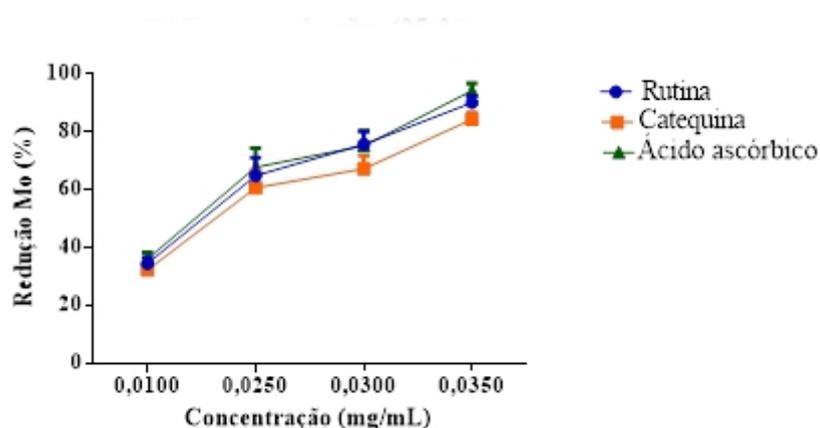
Para todas as concentrações testadas ambas amostras demonstraram atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio relevante quando associadas ao ácido ascórbico, seguido da rutina e quercetina. A FQ e o EECCAG tiveram IC_{50} de $0,01429 \pm 0,0028$ e $0,02102 \pm 0,0036$ mg/mL, respectivamente (Tabela 4). Tais valores denotam que nas duas maiores concentrações a FQ desempenhou uma capacidade redutora 1,45 vezes maior em relação ao EECCAG (Gráficos 8 e 9).

Gráfico 8. Capacidade antioxidante relativa utilizando com padrão de referência Rutina (0,075 mg/mL), catequina (0,020 mg/mL) e ácido ascórbico (0,020 mg/mL) associado ao EECCAG.



Fonte: Os autores (2020).

Gráfico 9. Capacidade antioxidante relativa utilizando com padrão de referência Rutina (0,075 mg/mL), catequina (0,020 mg/mL) e ácido ascórbico (0,020 mg/mL) associado a FQ.



Fonte: Os autores (2020).

Tabela 4. Capacidade antioxidante relativa (CAR), utilizando rutina, catequina e ácido ascórbico como padrão de 100 % de inibição para o EECCAG e a FQ.

	Padrões	EECCAG	FQ
IC ₅₀ ± ΔIC ₅₀ (mg/mL)	Rutina	0,02251 ± 0,0031	0,01503 ± 0,0026
	Catequina	0,02493 ± 0,0033	0,01685 ± 0,0028
	Ácido ascórbico	0,02102 ± 0,0036	0,01429 ± 0,0028

Fonte: Os autores (2020).

Os resultados obtidos estão de acordo com os dados relatados por Marini, et al., (2018) ao analisarem diferentes espécies do gênero *Cordia*, mostraram atividade antioxidante por redução do complexo fosfomolibdênio. O ensaio mede a capacidade de redução em relação aos íons dos metais de transição Mo (VI) a Mo (V) em uma mistura aquosa de pH ácido. Portanto, a pequena falta de correlação com ambos os outros ensaios em que o EECCAG foi mais eficiente pode estar relacionado a diferença no mecanismo envolvido (Ślusarczyk, et al., 2009). Além disso, Rockenbach & colaboradores (2008) relatam que a atividade antioxidante pode depender de fatores incluindo a possível localização de antioxidantes e estabilidade em diferentes estágios, etapas de oxidação e a formação da estabilidade dos radicais.

4. Considerações Finais

Com base nos resultados, pode-se concluir que o EECCAG possui importantes metabólitos secundários da classe dos flavonóides e valores significativos de polifenóis totais. Dentre as duas amostras testadas, o EECCAG demonstrou atividade antioxidante nos quatro mecanismos avaliados, tendo como melhor resposta para o teste DPPH•, já a FQ apresentou melhores resultados na redução do complexo fosfomolibdênio. Os dados mostram que o EECCAG é potencialmente mais eficiente quanto a atividade antioxidante.

Referências

Alves, C. Q., David, J. M., David, J. P., Bahia, M. V., Aguiar, R. M. (2010). Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. *Química Nova*, 33 (10), 2202-2210.

Amudha, M., Rani, S. (2016). Evaluation of *in vitro* Antioxidant Potential of *Cordia retusa*, *Indian J Pharm Sci.*, 78(1), 80–86.

Angelo, P. M., Jorge, N. (2017). Phenolic compounds in foods - a brief review. *Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.)*, 66 (1), 01-09.

Araújo, E. L., Alencar, J. R. B., Neto, P. J. R. (2002). Lapachol: segurança e eficácia na terapêutica. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 12, 57-59.

Bessa, N. G. F., Borges, J. C. M., Beserra, F. P., Carvalho, R. H. A., Pereira, M. A. B., Fagundes, R., Campos, S. L., Ribeiro, L. U., Quirino, M. S., Chagas Junior, A. F., Alves, A. (2013). Preliminary phytochemical *screening* of native Cerrado plants of medicinal popular use by the rural community of the Vale Verde settlement – Tocantins. *Rev. bras. Plantas med.*, 15 (4), 692-707.

Cai, Y., Luo, Q., Sun M., Corke, H. (2004). Atividade antioxidante e compostos fenólicos de 112 plantas medicinais tradicionais chinesas associadas ao anticâncer. *Life Sci*, 74 (17), 2157-2184.

Casanova, L. M., Costa, S. S. (2017). Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. *Rev. Virtual Quim.*, 9 (2), 575-595.

Castro, J., Rivera, D., Franco, L.A. (2019). Atividade anti-inflamatória tópica no modelo de edema de orelha de camundongo induzido por TPA e propriedades antibacterianas *in vitro* de flores de *Cordia alba*. *J. Pharm. Investig*, 49, 331–336.

Costa, J. G. M., Pessoa, O. T. D. L., Monte, F. J. Q., Menezes, E. A., Lemos, T. L. G. (2005). Benzoquinonas, Hidroquinonas e Sesquiterpenos de *Auxemma glazioviana*. *Quim. Nova*, 28 (4), 591-595.

Costa, J. G. M., Rodrigues, F. F. G., Machado, L. L., Fonseca, A. M., Lemos, T. L. G. (2007). Essential oil of *Auxemma glazioviana* Taub. (Boraginaceae): chemical composition,

antibacterial and antioxidant activities. *Research journal of biological sciences* (online), 2, 369-371.

Dresler, S., Szymczak, G., Wójcik, M. (2017). Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the Boraginaceae family. *Pharm Biol.*, 55(1): 691–695.

Ferreira, M. A. D., Nunes, O. D. R. H., Fontenele, J. B., Pessoa, O. D. L., Lemos, T. L. G., Viana, G. S. B. (2004). Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. *Phytomedicine*, 11, 315–322.

Ferreira, M. A. D., Nunes, O. D. R. H., Leal L. K. A. M., Pessoa O. D. L., Lemos T. L. G., Viana, G. S. B. (2003). Antioxidant Effects in the Quinone Fraction from *Auxemma oncocalyx* Taub. *Biol. Pharm. Bull.*, 26(5) 595—599.

Giada, M. L. R. (2014). An approach about in vitro antioxidant capacity of plant foods and beverages. *Demetra*, 9(1), 137-146.

Leyva, A., Pessoa, C., Boogaardt, F., Sokaroski, R., Lemos, T. L., Wetmore, L. A., Huruta, R. R., Moraes, M. O. (2000). Oncocalyxones A and C, 1,4-anthracenediones from *Auxemma oncocalyx*: comparison with anticancer 1,9-anthracenediones. *Anticancer Res*, 20, 1029–1031

Marini, G., Graikou, K., Zengin, G., Karikas, G. A., Gupta, M. P., Chinou, I. (2018). Phytochemical analysis and biological evaluation of three selected *Cordia* species from Panama. *Industrial Crops and Products*, 120, 84-89.

Matos, F. J. A. (2009). Introdução a fitoquímica experimental. (3a ed.), Fortaleza: edições UFC, 150p.

Melo, I. S. V., Santos, A. F., Lemos, T. L. G., Goulart, M. O. F., Santana, A. E. G. (2015). Oncocalyxone a functions as an anti-glycation agent *in vitro*. *PLoS ONE*, 10 (6).

Melo, J. I. M., Andrade, W. M. (2007). Boraginaceae *s.l.* A. Juss. em uma área de Caatinga da ESEC Raso da Catarina, BA, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, 21 (2), 369-378.

Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D. F., Domínguez, J. M., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., Carlos Parajó, J. C. (2001). Natural antioxidants from residual sources, *Food Chemistry*, 72 (1), 145-171.

Nobre, C. B., Sousa, E. O., Camilo, C. J., Machado, J. F., Silva, J. M. F. L., Filho, J. R., Costa, J. G. M. (2018). Antioxidative effect and phytochemical profile of natural products from the fruits of “babaçu” (*Orbignia speciosa*) and “buriti” (*Mauritia flexuosa*). *Food and Chemical Toxicology*, 121, 423-429.

Oliveira, V. B., Zuchetto, M., Paula, C. S., Verdam, M. C. S., Campos, R., Duarte, A. F. S., Miguel, M. D., Miguel, O. G. (2015). Avaliação do potencial antioxidante frente à oxidação lipídica e da toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das frondes de *Dicksonia sellowiana* (Presl.) Hook. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17 (4), 614-621.

Oza, M. J., Kulkarni, Y. A. (2017). Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of the medicinal species of the genus *Cordia* (Boraginaceae). *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 69 (7), 755-789.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidante capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269, 337-341.

Quideau, S., Deffieux, D., Douat - Casassus, C., Pouységu, L. (2011). Plant polyphenols: chemical properties, biological activities and synthesis. *Angewandte. Chemie International Edition*, 50 (3), 586-621.

Rocha, N. F. M., et al (2010). Gastroproteção de (-) - alfa-bisabolol em lesões agudas da mucosa gástrica em camundongos: os possíveis mecanismos farmacológicos envolvidos. *Fundam Clin Pharmacol.*, 24 (1), 63-71.

Rockenbach, I. I., Silva, G. L., Rodrigues, E., Kuskoski, E. M., Fett, R. (2008). Solvent Influence on total polyphenol content, anthocyanins, and antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) bagasse extracts from Tannat and Ancelota - different varieties of *Vitis vinifera* varieties. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, 28(Supl.), 238-244.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C.G., Jiménez, J. P., Calixto, F.D.S. (2007). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa* ISSN 1679- 6535.

Rufino, M. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Morais, S. M., Sampaio, C. G., Jiménez, J. P., Calixto, F. D. S. (2006). Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pelo método de redução do ferro (FRAP). *Embrapa* ISSN 1679-6535.

Silva, M. N., Ferreira, V. F., Souza, M. C. B. V. (2003). An overview of the chemistry and pharmacology of naphthoquinones with emphasis on b-lapachone and derivatives. *Quím. Nova*, 26 (3), 407-416.

Silva, A. K.O. Prospecção química e farmacológica dos extratos de *Cordia glazioviana* Taub. E *Cordia oncocalyx* Taub. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal do Ceará – UFC, Fortaleza – CE. 25. 2017.

Sousa, E. O., Miranda, C. M. B., Nobre, C. B., Boligon, A. A., Athayde, M. L., Costa, J. G. M. (2015). Análise fitoquímica e atividades antioxidantes dos extratos de *Lantana camara* e *Lantana montevidensis*. *Culturas e produtos industriais*, 70, 7-15.

Sousa, E. T., Lopes, W. A., Andrade, J. B. (2016). Fontes, Formação, Reatividade e Determinação de Quinonas na atmosfera. *Quim. Nova*, 39 (4), 486-495.

Sunasse, S. N., Davies-Coleman, M. T. (2012). Cytotoxic and antioxidant marine prenylated quinones and hydroquinones. *Nat. Prod. Rep.*, 29, 513-535.

Ślusarczyk, S., Hajnos, M., Skalicka-Woźniak, K., Matkowski, A. (2009). Atividade antioxidante de polifenóis de *Lycopus lucidus* Turcz. *Química Alimentar*, 113, 134-138.

Waterman, P. G., Mole, S. (1994). Analysis of phenolic plant metabolites. *Blackwell Scientific Publications*, 38 (4), 248p.

Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito

Natália Kelly Gomes de Carvalho – 40%

Débora Odília Duarte Leite – 10%

Cicera Janaine Camilo – 10%

Carla de Fátima Alves Nonato – 10%

Gerson Javier Torres Salazar – 10%

Lucas Ribeiro Costa – 10%

José Galberto Martins da Costa – 10%