

Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*

MERINO, F.J.Z.¹; OLIVEIRA, V.B.¹; PAULA, C.S.²; CANSIAN, F.C.²; SOUZA, A.M.²; ZUCHETTO, M.²; HIROTA, B.C.K.²; DUARTE, A.F.S.¹; KULIK, J.D.¹; MIGUEL, M.D.²; MIGUEL, O.G.¹

¹Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Fitoquímica. Av. Prof. Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, CEP: 80210-170, Curitiba, PR, Brasil; ²Universidade Federal do Paraná, Departamento de Farmácia, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Laboratório de Farmacotécnica. Av. Prof. Lothário Meissner, 632 – Jardim Botânico, CEP: 80210-170, Curitiba, PR, Brasil. *Autor para correspondência: esecocio@yahoo.com.br

RESUMO: A espécie *Senecio westermanii* Dusén pertencente à família Asteraceae é planta endêmica e nativa do Brasil encontrada na região da Floresta Atlântica, nos estados do Paraná e São Paulo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição fitoquímica do extrato bruto etanólico e frações das partes aéreas (folha e caule) de *S. westermanii* utilizando-se a análise fitoquímica qualitativa e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD), avaliar *in vitro* a toxicidade preliminar utilizando *Artemia salina* e o potencial antioxidante. O estudo fitoquímico qualitativo revelou a presença de alcaloides, flavonoides, iridoides, esteroides/triterpenos, heterosídeos saponínicos e aminogrupos. Através da análise realizada por CLAE-DAD obteve-se o *fingerprint* característico de cada amostra. No ensaio frente à *A. salina* houve ausência de toxicidade das amostras, o resultado da DL₅₀ para todas as amostras foi superior a 1000 µg/mL. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante pela redução do complexo fosfomolibdênio, com destaque para a fração clorofórmio que apresentou atividade antioxidante de 92,51% em relação ao padrão rutina. Com relação ao ensaio de redução do radical DPPH•, a fração acetato de etila apresentou IC₅₀ de 26,98 µg/mL. Pelo ensaio do ácido tiobarbitúrico (TBARS) a fração hexano apresentou o melhor índice antioxidante em relação ao padrão rutina. Os resultados obtidos demonstram evidências de que a espécie é fonte potencial de antioxidantes naturais, estimulando assim novos estudos que viabilizam sua utilização no tratamento de patologias associadas aos radicais livres. Além disso, a espécie não apresentou atividade tóxica preliminar, assegurando sua aplicabilidade.

Palavras-chave: *Senecio*; Análise fitoquímica; *Artemia salina*; Antioxidante; CLAE-DAD

ABSTRACT: Phytochemical analysis, antioxidant potential and toxicity of crude ethanol extract and fractions of the species *Senecio westermanii* Dusén against *Artemia salina*.

The species *Senecio westermanii* Dusén, which belongs to the Asteraceae family, is an endemic and native plant from Brazil. It is found mainly in the Atlantic Forest region, in Paraná and São Paulo states. This study aimed to evaluate the phytochemical composition using a qualitative phytochemical analysis and high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), to evaluate preliminary toxicity *in vitro* using *Artemia salina* and antioxidant potential. Qualitative phytochemical analysis revealed the presence of alkaloids, flavonoids, iridoids, steroids, triterpenes, saponinic glycosides and aminogroups. The analysis by HPLC-DAD provided the characteristic fingerprint of each sample. In the *A. salina* assay, the results of LD₅₀ over 1000 µg/mL for all samples did not indicate toxicity of the evaluated extracts. All samples demonstrated antioxidant activity by reducing phosphomolybdenum complex. The highest activity was detected in the chloroform fraction, which presented activity of 92.51% compared to the standard rutin. Regarding the trial to reduce the radical DPPH•, the ethyl acetate fraction showed an IC₅₀ of 26.98 µg/mL. In the thiobarbituric acid assay (TBARS), the hexane fraction showed the highest antioxidant activity compared to the standard rutin. These findings indicate that the *Senecio westermanii* is a potential source of natural antioxidants, stimulating

new studies that enable their use in the treatment of disorders associated with free radicals. In addition, the species did not present toxicity in its evaluation, ensuring its applicability.

Keywords: *Senecio*; Phytochemical analysis; *Artemia salina*; Antioxidant; HPLC-DAD

INTRODUÇÃO

Estudos realizados com espécies do gênero *Senecio* L. evidenciaram a presença de flavonoides com a capacidade de reduzir a ação oxidante de substâncias reativas nas espécies *Senecio gallicus*, *Senecio candicans* e *Senecio erraticus* (Mansour & Saleh, 1981; Mezache et al., 2009; Hariprasath et al., 2012). Além dos flavonoides, Silva et al. (2006) evidenciaram a presença de alcaloides pirrolizidínicos, sendo esta classe de metabólito secundário considerado um marcador quimiossistemático para a tribo *Senecioneae*.

Segundo Lima & Bezerra (2012) os flavonoides são metabólitos que atuam na proteção do sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação no organismo humano, prevenindo ou amenizando doenças. Os alcaloides pirrolizidínicos são conhecidos pela sua atividade hepatotóxica caracterizada por hepatomegalocitose, fibrose e proliferação de ductos biliares (Barros et al., 2007).

Frescura et al. (2013) destacam a importância dos antioxidantes naturais, a exemplo dos flavonoides, em função das suas diversas atividades farmacológicas e terapêuticas. A ação desses metabólitos está relacionada com a melhora da perda da acuidade visual e alterações do campo de visão. Sua presença ameniza os sintomas de insuficiência dos vasos linfáticos e venosos associados com algumas doenças hemorrágicas. Além disso, promovem a normalização da permeabilidade e resistência da parede dos vasos no controle da hipertensão arterial (Frescura et al., 2013).

Os polifenóis em especial os flavonoides possuem ação terapêutica principalmente ligada a patologias que se desenvolvem através dos radicais livres, porém outras atividades como antihiperlepidêmica, anticarcinogênica e antiinflamatória foram encontradas (Becho et al., 2009). A principal propriedade dos antioxidantes é sua capacidade de neutralizar ou sequestrar os radicais livres, tanto na etapa inicial como na propagação do processo oxidativo (Sousa et al., 2007).

Alguns antioxidantes apresentam a capacidade de eliminar espécies de radicais livres, tais como o superóxido e hidroxil, além de reduzir radicais tocoferóis de volta para sua forma ativa nas membranas celulares, mantendo a sua integridade em células dos organismos aeróbios (Oliveira et

al., 2011). Também podem prevenir mutações em DNA de humanos, uma vez que altas concentrações dela reduzem mutações causadas por estresse oxidativo em células humanas *in vitro* (Lutsenko et al., 2002). Sua presença nos alimentos tem um papel importante na preservação de nutrientes do alimento bem como no aumento do tempo de vida em prateleira. Além disso, é um nutriente essencial que deve ser ingerido diariamente (Chaves et al., 2004).

Porém muitos dos antioxidantes utilizados pelas indústrias alimentícias são sintéticos, como, por exemplo, o BHT. A estrutura fenólica do BHT possui a capacidade de doar um elétron a um radical livre, evitando dessa forma a ação destes radicais sobre os alimentos (Ramalho & Jorge, 2006).

Ensaio de toxicidade são frequentemente empregados para averiguar a segurança do uso de plantas na medicina popular, assim como extratos e outros insumos obtidos através de produtos naturais. Para Meyer et al. (1982) a utilização do microcrustáceo *Artemia salina* é frequentemente aplicado em ensaios de toxicidade aguda para pesquisa preliminar de atividade biológica de extratos e frações obtidos a partir de produtos naturais. Esse simples organismo pode ser usado como um monitor conveniente para a citotoxicidade de produtos, além de ser um método rápido, simples e sensível a substâncias tóxicas.

Devido a ausência de estudos referentes a *Senecio westermanii* Dusén e por não ser utilizada pela população como fitoterápico ou alimento, a espécie despertou um grande interesse em ser estudada devido ao gênero possuir metabólitos secundários de interesse biológico, como alcaloides e flavonoides. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi realizar a caracterização fitoquímica do extrato bruto etanólico e frações das partes aéreas (folha e caule) da planta, com relação ao potencial antioxidante *in vitro* e avaliar a toxicidade das amostras frente a *Artemia salina*.

MATERIAL E MÉTODOS

Material Vegetal

As partes aéreas da espécie *Senecio westermanii* foi coletada na Estrada da Graciosa, localizada no município de Quatro Barras - PR, nas coordenadas 25°18'27"S e 48°56'37"W, 845 m. A identificação da espécie vegetal foi realizada no

Museu Botânico Municipal (MBM) de Curitiba-PR, onde está depositada a exsicata MBM 379066. O projeto foi regularizado de acordo com a resolução nº35, de 27 de abril de 2011 do Ministério do Meio Ambiente que dispõe sobre a regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético.

Obtenção do extrato bruto e frações

O material coletado foi seco em temperatura ambiente e triturado em moinho de facas e martelo. A partir de 6,3 kg do material vegetal seco e estabilizado, o extrato bruto etanólico (355,98 g) foi obtido por meio de extração etanólica exaustiva em aparelho de Soxhlet e posteriormente concentrado em evaporador rotatório, com pressão reduzida, a temperatura de 65 °C e 150 rpm. A partir do extrato bruto foram obtidas as frações n-hexano (57,98 g), clorofórmio (80,04 g), acetato de etila (3,36 g) e hidroalcoólica remanescente (291,73 g) por partição líquido/líquido com solventes de polaridade crescente (Carvalho et al., 2009). Para o extrato aquoso foram macerados à quente 40 g do material vegetal em 200 mL de água destilada a 70°C em banho-maria por um período de uma hora (Moreira, 1979).

Estudo fitoquímico

As frações do extrato hidroalcoólico da espécie *S. westermanii* foram submetidas ao ensaio fitoquímico de acordo com Moreira (1979). Os grupos químicos pesquisados foram os alcaloides; flavonoides; cumarinas; iridoides; antraquinonas; esteroides e/ou triterpenos. Para o extrato aquoso foram avaliadas a presença de heterosídeos antociânicos, saponínicos, cianogênicos; taninos hidrolisáveis e condensados; ácidos fixos e voláteis; e aminogrupos.

Análises por CLAE-DAD

As análises cromatográficas foram realizadas empregando cromatógrafo líquido de alta eficiência modelo: Merck Hitachi, detector de arranjo de díodos (DAD) L-2450, com varredura entre 220-400 nm. Coluna X-Terra RP-18 (25 cm x 4,6 mm x 5 µm) e pré-coluna (2,5 cm x 3 mm) de mesma fase da coluna. A eluição foi realizada com gradiente de concentração composta por fase A (fase ácida) e fase B (metanol) iniciando com 80% de fase A e 20% da fase B (0 a 35 min.) até 100% de fase B isocrático até 45 min com a vazão de fluxo da bomba de 1 mL.min⁻¹ e volume injetado de 20 µL.

Tocividade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

Foram adquiridos os ovos do microcrustáceo da espécie *Artemia salina* e procedeu-se ao ensaio conforme metodologia desenvolvida por Meyer et al.

(1982). Os ovos do crustáceo foram eclodidos em água salina, preparada com 14,31 g de sal marinho e dissolvido em 400 mL de água purificada. Para esta quantidade, foram adicionados 200 mg dos ovos do crustáceo. O pH foi mantido entre 8,0 e 9,0 para evitar a morte dos crustáceos. A temperatura foi controlada entre 27 °C e 30 °C e a solução foi mantida sob agitação e aeração constante por 48 horas. Nas primeiras horas do processo foi mantida iluminação (20 W) sobre o recipiente. Foram preparadas as amostras em metanol nas concentrações de 1000 µL/mL, 100 µL/mL e 10 µL/mL e adicionados 10 microcrustáceos. Como controle positivo foi utilizado sulfato de quinidina para ocasionar a morte da *A. salina*. Após 24 horas de contato dos nauplios realizou a contagem dos crustáceos mortos. Os dados foram submetidos a análise pelo método estatístico Probitos e determinados os valores da dose letal (DL₅₀) com 95% de intervalo de confiança.

Avaliação da atividade antioxidante

Ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio

A reação para formação do complexo requer o preparo de um reativo que consiste de uma solução com fosfato de sódio 0,1 mol/L (28 mL), molibdato de amônio 0,03 mol/L (12 mL) e ácido sulfúrico 3 mol/L (20 mL), sendo o volume final ajustado H₂O para 100 mL. O extrato bruto e as frações foram preparados na concentração de 200 µg/mL em metanol, assim como os padrões utilizados, vitamina C e rutina. Em tubos de ensaio foram colocados alíquotas de 0,3 mL de cada amostra e adicionado 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio. Os tubos foram fechados e incubados a 95 °C por 90 minutos. Após resfriamento, a leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro UV-1601 PC Shimadzu® no comprimento de onda 695 nm. O branco era constituído de 0,3 mL de metanol e 3 mL de reativo. Todo o ensaio foi realizado em triplicata (Prieto et al., 1999).

A capacidade antioxidante das amostras foi expressa em atividade antioxidante relativa (AAR) em relação aos padrões, conforme a equação:

$$\text{AAR}(\%) = \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}) \times 100}{(\text{Abs padrão} - \text{Abs branco})}$$

A partir dos resultados de AAR(%) realizou-se a análise estatística dos resultados pelo teste de Scott-Knott (1974) (p<0,05).

Redução do radical DPPH•

A avaliação do potencial de redução do radical DPPH• foi realizada de acordo com a

metodologia proposta por Mensor et al. (2001). Para cada amostra do extrato bruto, frações e dos padrões vitamina C e rutina, foram preparadas concentrações crescentes as quais ficaram em meio reacional com 1 mL de solução de DPPH a 0,03 mmol/mL. Para cada amostra foi preparado um branco com 2,5 mL da solução da amostra e 1 mL de metanol para cada concentração. Paralelamente foi realizado um controle com 2,5 mL de metanol e 1 mL de DPPH. Após 30 minutos as absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro a 518 nm.

A atividade sequestrante do radical DPPH foi expressa em porcentagem de atividade antioxidante (AA), conforme a equação:

$$AA(\%) = 100 - \frac{(\text{Abs amostra} - \text{Abs branco})}{(\text{Abs controle})}$$

Para comparar os resultados obtidos foi estabelecida a concentração inibitória (IC_{50}), calculada por regressão linear. No intervalo linear foi estabelecida a equação da reta do tipo $y=ax+b$, sendo dessa forma, determinada para cada amostra analisada os valores de IC_{50} . Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o teste de Scott-Knott (1974) ($p < 0,05$).

Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

O ensaio foi realizado de acordo com Morais et al. (2006). Em tubos de ensaio, foram adicionados 0,5 mL de solução de gema de ovo (10% p/v), 0,1 mL de amostra ou padrão (BHT) 1000 ppm e o volume foi completado com água destilada para 1 mL. Em seguida, foi acrescentado a cada um dos tubos de ensaio 0,05 mL de solução de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) dihidroclorato (ABAP) 0,07 mol.L⁻¹, 1,5 mL de solução de ácido acético 20% (pH 3,5) e 1,5 mL de solução de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,8% p/v em solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) 1,1% p/v. Os tubos de ensaio foram submetidos ao banho-maria (95°C) por 1

hora. Após resfriamento, foi acrescentado 5 mL de n-butanol a cada tubo, que foi centrifugado durante 10 minutos a 3000 rpm. Os sobrenadantes foram submetidos ao espectrofotômetro em 532 nm.

A atividade antioxidante foi determinada pelo Índice Antioxidante (IA), segundo equação:

$$IA(\%) = \frac{(1 - \text{Abs amostra})}{(\text{Abs controle})} \times 100$$

A partir dos resultados de IA(%) realizou-se a análise estatística dos resultados pelo teste de Scott-Knott (1974) ($p < 0,05$).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O resultado do estudo fitoquímico qualitativo indicou por meio de reações características para o extrato hidroalcoólico a presença de alcaloides (Mayer, Dragendorff e Bertrand), flavonoides (leucoantocianidinas, heterosídeos flavônicos e oxálico bórico), iridoides (flogoglucinol e ácido sulfúrico/vanilina) e esteroides/triterpenos (Lieberman-Bouchard e Keller-Kelliani) (Tabela 1). Porém para o extrato aquoso constatou-se heterosídeos saponínicos (teste de formação de espuma) e aminogrupos (Tabela 2). Através desses ensaios a espécie em estudo revelou um perfil químico semelhante ao encontrado para outras espécies do gênero.

O perfil cromatográfico do extrato bruto etanólico e frações das partes aéreas de *S. westermanii* foram comparados entre si empregando como parâmetros o tempo de retenção (Tabela 3) e o espectro de absorção molecular obtido através do detector de arranjo de diodos. Os sinais que apresentaram similaridade com relação aos parâmetros monitorados para as amostras foram numerados. Os picos foram tratados como sinais, pois pode haver mais de uma substância em um mesmo sinal.

Analisando o cromatograma das amostras

TABELA 1. Resultado da análise fitoquímica a partir do extrato hidroalcoólico da espécie *S. westermanii*

Grupos Fitoquímicos	FH	FCL	FAE	FHR
Alcaloides	-	+	-	-
Flavonoides	-	+	+	+
Cumarinas	-	-	-	-
Iridoides	+	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-	-
Esteroides/Triterpenos	+	-	-	-

Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FCL), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Hidroalcoólica Remanescente (FHR); (+) positivo, (-) negativo

TABELA 2. Resultado da análise fitoquímica do extrato aquoso da espécie *S. westermanii*

Grupos Fitoquímicos	Extrato Aquoso
Heterosídeos antociânicos	-
Heterosídeos saponínicos	+
Heterosídeos cianogênicos	-
Taninos hidrolisáveis	-
Taninos condensados	-
Ácidos fixos	-
Ácidos voláteis	-
Aminogrupos	+

(+) positivo, (-) negativo

(Figuras 1-4) observa-se que o sinal 1 está presente no extrato bruto etanólico e na fração acetato de etila. O sinal 2 está presente no extrato bruto etanólico e fração hidroalcoólica remanescente. O sinal 3 presente apenas no extrato bruto etanólico. O sinal 4 está presente no extrato bruto etanólico e na frações clorofórmio e acetato de etila. O sinal 5 está presente apenas na fração clorofórmio. O sinal 6 está presente apenas na fração clorofórmio. E os sinais 7, 8 e 9 estão presentes, respectivamente, nas frações clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica remanescente.

Apesar dos tempos de retenção semelhantes para os demais sinais presentes nos cromatogramas, porém não apresentaram similaridade quanto ao espectro de absorção molecular indicando que são substâncias diferentes.

De acordo com Araújo et al. (2010) o bioensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* possui o intuito de monitorar extratos vegetais em diversos laboratórios de produtos naturais. Porém

diversos ensaios biológicos simples têm sido desenvolvidos para a mesma função, mas a *A. salina* tem sido incluída na rotina laboratorial para monitorar o estudo de extratos e frações de plantas, além disso para auxiliar no isolamento, purificação e elucidação estrutural de componentes isolados dessas amostras. O ensaio permite a avaliação da toxicidade geral e é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de amostras com potencial atividade biológica.

Bednarczuk et al. (2010) comentam que a *A. salina* são bastante utilizadas em ensaios toxicológicos por serem de fácil manuseio, baixo custo, fácil cultivo e obtenção. Os ensaios de letalidade são largamente empregados em testes toxicológicos podendo-se obter a dose letal mediana (DL_{50}), dose necessária para ocasionar a morte de 50% dos microcrustáceos nas amostras em estudo.

Dessa forma para o extrato bruto etanólico e frações das partes aéreas de *S. westermanii* no ensaio de toxicidade ao microcrustáceo *A. salina* obteve-se uma DL_{50} superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$ para todas as amostras analisadas. De acordo com Nguta et al. (2011) amostras com valores de DL_{50} inferiores 100 $\mu\text{g/mL}$ são considerados altamente tóxicas, valores entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$ são moderadamente tóxicas, entre 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ são suavemente tóxicas e acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ são atóxicas.

Estudos realizadas com algumas espécies do gênero *Senecio* mostraram se tóxicas frente ao microcrustáceo como exposto por Bardón et al. (2007), onde os extratos clorofórmico e metanólico da mistura das folhas e flores da espécie *Senecio santelisis* apresentaram uma DL_{50} de 49 e 1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. E para a espécie *Senecio puchii* os extratos clorofórmico e metanólico apresentaram uma DL_{50} de 109 e 202 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Bardón et al., 2007). Apesar dos alcaloides

TABELA 3. Tempo de retenção dos sinais monitorados presentes nas análises das frações e extrato bruto hidroalcoólico de *S. westermanii*

Pico	Amostras	λ_{Abs}	TR
1	EB, FAE	281; 328	19,74
2	EB, FHR	284; 326	20,38
3	EB	286; 326	21,27
4	EB, FCL, FAE	284; 328	21,65
5	FCL	310	13,62
6	FCL	280; 308	25,62
7	FCL	280; 315	26,38
8	FAE	256; 294; 350	20,29
9	FHR	292; 326	14,39

λ_{Abs} : Bandas de absorção (nm); TR: Tempo de Retenção (min)

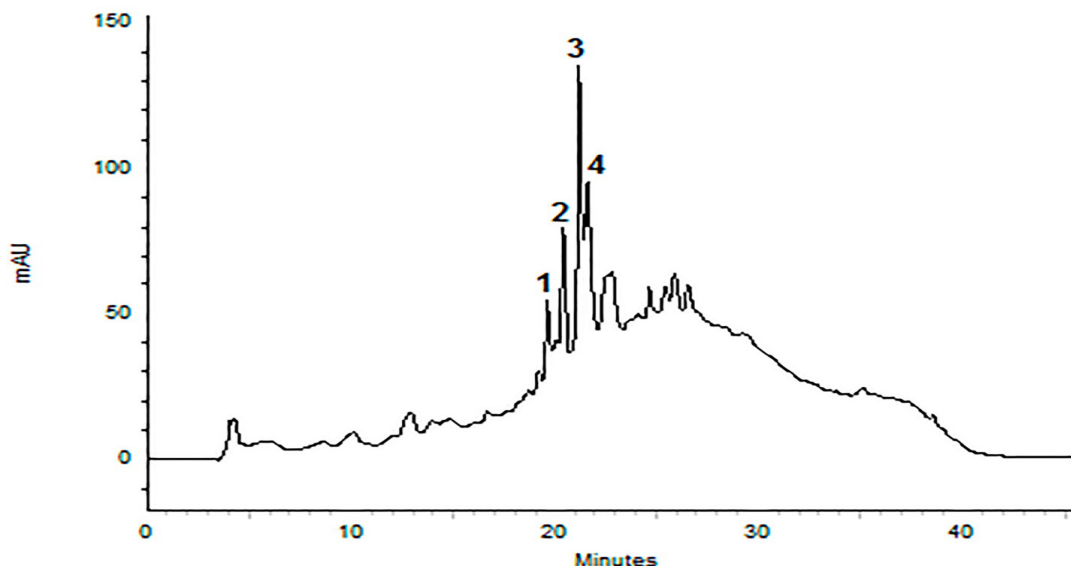


FIGURA 1. Perfil cromatográfico do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *S westermanii*

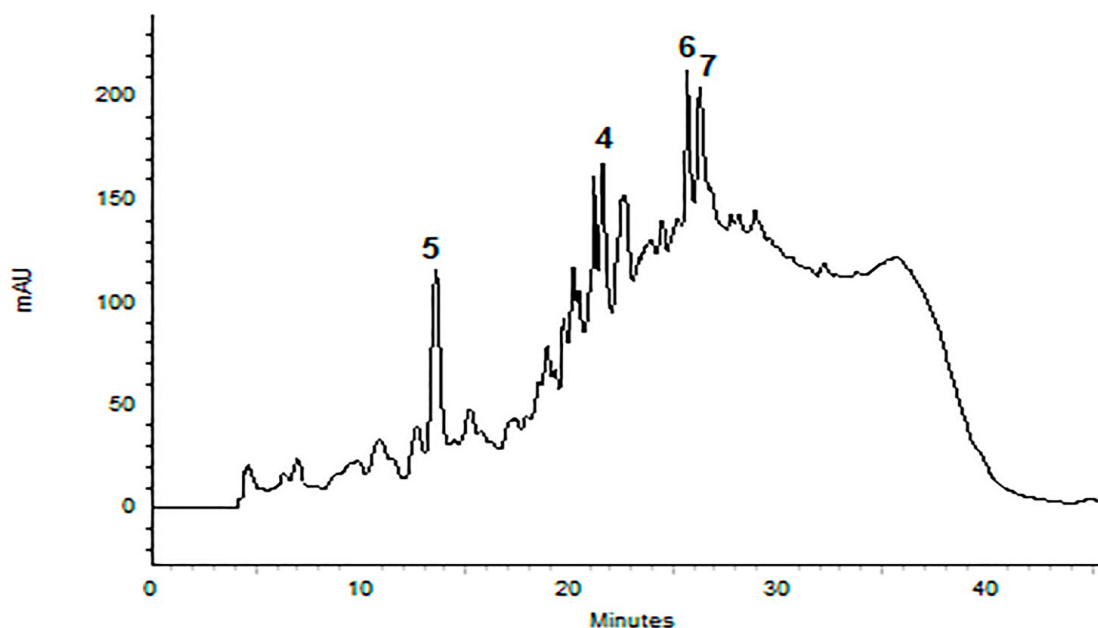


FIGURA 2. Perfil cromatográfico da fração clorofórmio das partes aéreas de *S westermanii*

pirrolizidínicos extraídos das espécies do gênero *Senecio* demonstrarem toxicidade em bovinos (Barros et al., 2007; Lucena et al., 2010), mas de acordo com Bolzan et al. (2007) esses metabólitos não estão presentes em todas as espécies do gênero.

Dessa forma, algumas espécies do gênero não apresentaram atividade tóxica preliminar frente ao microcrustáceo *A. salina* como expôs Bardón et al. (2007) para os extratos clorofórmico e metanólico das folhas de *Senecio leucostachys* e Cuadra et al. (2005) para o extrato etanólico das folhas de *Senecio miser*. Com isso, o extrato bruto etanólico e as frações da espécie em estudo não apresentaram toxicidade preliminar para a *A. salina* apresentando uma $DL_{50} > 1000 \mu\text{g}/\text{mL}$, quando comparada ao

sulfato de quinidina com valor de DL_{50} em $89,41 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Para Campos & Frasson (2011) definir uma metodologia mais eficiente de extração de compostos antioxidantes pode não ser fácil, pois estes compostos podem sofrer influência de diversos fatores como a natureza do vegetal, tamanho das partículas, solvente utilizado, tempo e temperatura de extração. Com isso, há diversos métodos para a extração dos componentes antioxidantes em vegetais, dentre eles os tradicionais métodos com solventes orgânicos como a água, etanol, éter e metanol. Para avaliar o desempenho da atividade antioxidante do extrato bruto e frações da espécie *S. westermanii* foram utilizados os métodos fosfomolibdênio, DPPH e TBARS.

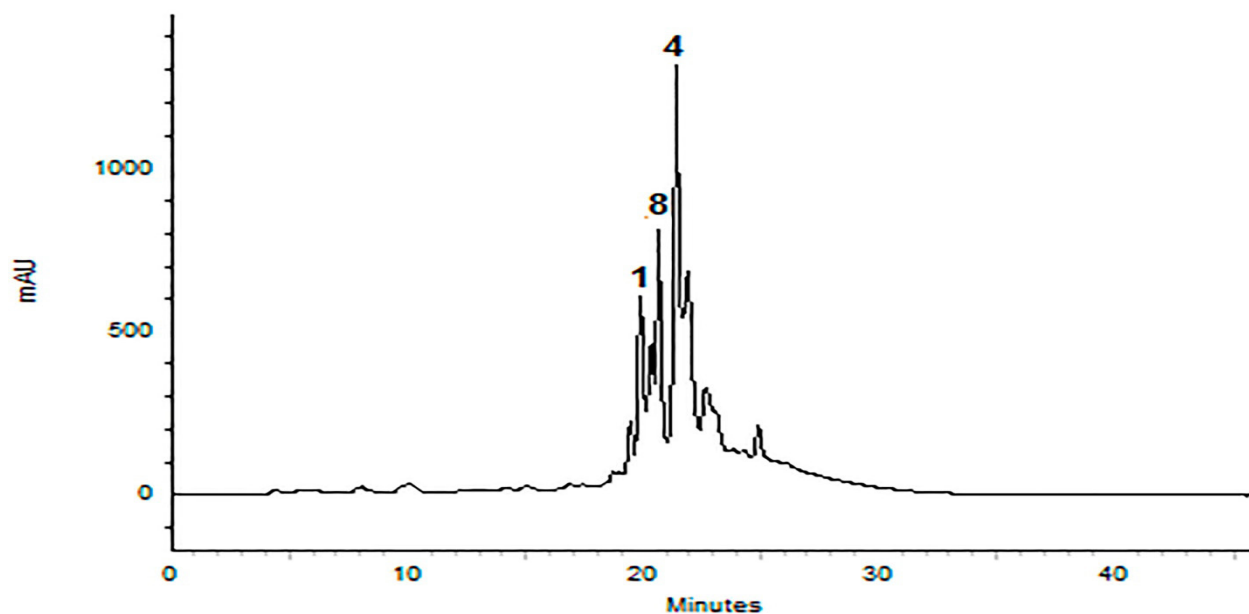


FIGURA 3. Perfil cromatográfico da fração acetato de etila das partes aéreas de *S westermanii*

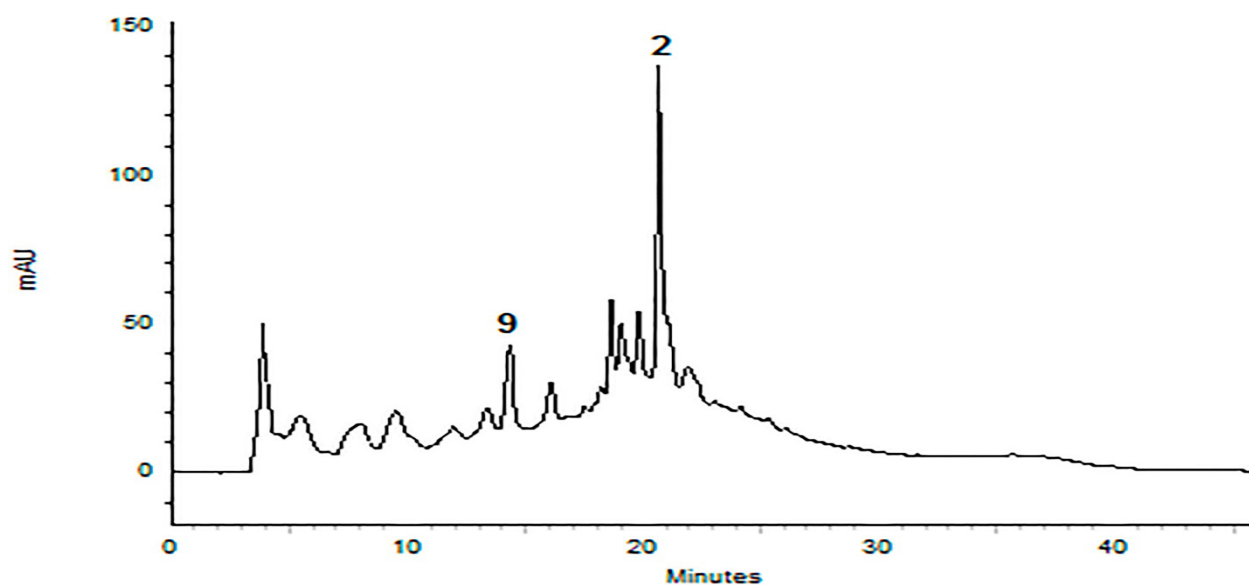


FIGURA 4. Perfil cromatográfico da fração hidroalcoólica das partes aéreas de *S westermanii*

Para Martelli & Nunes (2014) os antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, inibindo os radicais livres e prevenindo a formação de doenças, tornando-se essenciais para o equilíbrio entre os radicais livres e o sistema de defesa antioxidante do corpo humano. De acordo com Sousa et al. (2007) os radicais livres e outros oxidantes são considerados como grandes causadores de doenças para o ser humano ocasionando declínio do sistema imune, câncer, doenças cardiovasculares, catarata, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I. Dessa forma, uma dieta baseada em substâncias essenciais tem um papel importante na prevenção dessas doenças

devido a combinação de substâncias presentes nos vegetais, reduzindo o risco de desenvolvimento de doenças crônicas (Pereira & Cardoso, 2012).

De acordo com Prieto et al. (1999) a avaliação pelo método fosfomolibdênio possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante de componentes lipofílicos e hidrofílicos. Além disso, o método utilizado permite avaliar a capacidade total de uma mistura complexa de compostos (extratos e frações obtidos de plantas) de maneira simples e barata. A partir dos resultados obtidos através desse método (Tabela 4) observa-se que a fração clorofórmio demonstrou potencial antioxidante, com atividade de 92,51% em comparação com a atividade

da rutina, utilizada como controle positivo. Segundo Balestrin et al. (2008) a atividade antioxidante no ensaio de fosfomolibdênio pode estar relacionada a uma mistura complexa de componentes químicos, ocorrendo um sinergismo entre eles.

As substâncias existentes no extrato bruto etanólico e frações da espécie *S. westermanii* também possuem a capacidade em reagir com o radical livre instável DPPH• e convertê-lo no 2,2-difenil-1-picril hidrazina. A capacidade ou a atividade de atuar como um antioxidante é visível quando há mudança de cor nas soluções preparadas. A fração acetato de etila foi a amostra que mais se aproximou da atividade antioxidante comparada aos controles vitamina C e rutina (Tabela 4), assim como as outras frações e o extrato bruto. A atividade antioxidante medida através do radical DPPH• mostra a capacidade de substâncias pertencentes ao extrato e frações das partes aéreas de *S. westermanii* em sequestrar radicais livres do meio existente.

De acordo com Andrade et al. (2007) substâncias com núcleo fenólico, como flavonoides, ácidos fenólicos e o tocoferol atuam como captadores de espécies reativas de oxigênio, desta forma possuem características antioxidantes. Os flavonoides atuam como antioxidantes primários, sendo as flavonas e os flavonóis as classes mais encontradas nas plantas. Porém, dependendo do estado de oxidação da cadeia heterocíclica dos flavonoides, tem-se inúmeras atividades biológicas relacionadas a esse metabólito secundário, como atividade antiinflamatória, antitumoral, agregação plaquetária, redução da fragilidade e permeabilidade capilar, inibição na destruição do colágeno e redução na incidência de doenças cardiovasculares (Pereira & Cardoso, 2012). Além disso os flavonoides são comumente isolados da fração acetato de etila como exposto por Paula et al. (2014) e Hirota et al. (2012). Isso explica a uma maior atividade antioxidante da fração acetato de etila da espécie *S. westermanii*.

No ensaio de peroxidação lipídica pelo método TBARS observa-se que as frações hexano e hidroalcoólica remanescente tiveram atividade antioxidante semelhante ao controle BHT (Tabela 4). Observando-se que a fração hexânica possui um melhor resultado devido sua característica lipofílica, permitindo uma melhor interação com a matriz lipídica. Porém, Santi et al. (2014) comentam que os compostos fenólicos em vegetais abrange uma gama de substâncias, desde moléculas simples até aquelas com alto grau de polimerização, comprovando a atividade antioxidante dos ácidos fenólicos na inibição da peroxidação lipídica.

A peroxidação lipídica promove a perda da fluidez da membrana plasmática e a liberação de proteínas intracelulares, ocasionando lesões

de tecidos e afetando biomoléculas no organismo humano (Júnior & Pereira, 2008). Além disso pode ocorrer inativação enzimática, ruptura de membrana, aumento da aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas, mutações e à morte celular (Cerqueira et al., 2007).

Apesar da grande produção de antioxidantes em indivíduos saudáveis, os componentes celulares não são protegidos por antioxidantes endógenos em sua totalidade, sendo necessário a busca de antioxidantes exógenos para a complementação do sistema de defesa, isso faz com que o organismo seja protegido de substâncias oxidantes (Cerqueira et al., 2007).

A inibição da peroxidação lipídica é uma das principais preocupações sobre a questão do estresse oxidativo, a inibição está relacionada com a ação dos fitosteróis no corpo humano, onde agem como transportadores de elétrons. Por serem estruturalmente semelhantes aos lípidos de membrana, os fitoesteróis agem na cadeia de transporte de elétrons evitando a oxidação celular do organismo, agindo quimicamente como antioxidantes em membranas celulares e estabilizando-as (Yoshida & Nikki, 2003).

Os fitoesteróis são constituintes das membranas celulares das plantas e são biologicamente comparáveis ao colesterol nos animais, apenas diferem por conterem grupos metilo ou etilo na cadeia lateral da molécula (Ellegard et al., 2007).

Através da análise fitoquímica preliminar foi possível identificar classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico presentes nos extrato bruto etanólico e frações de *S. westermanii*. Para complementar foram realizados *fingerprint* das amostras através da análise por CLAE-DAD para comprovar a presença de vários componentes secundários nas amostras analisadas, observando-se que alguns sinais possuem o mesmo tempo de retenção e espectro de absorção para mais de uma amostra.

Para auxiliar de forma complementar os estudos fitoquímicos, utilizou-se o bioensaio de toxicidade sobre *A. salina*, isentando o extrato bruto etanólico e as frações de apresentarem toxicidade preliminar. Além disso as amostras analisadas de *S. westermanii* mostrou-se excelente perante a atividade antioxidante por diferentes mecanismos, como capacidade redutora (complexo fosfomolibdênio), capacidade de sequestro de radicais livres (DPPH) e efeito protetor contra a peroxidação lipídica (TBARS). Aliado a isso, tem-se a ausência de toxicidade frente à *A. salina* mostrando que a espécie em estudo possui potencial para o desenvolvimento de fitoterápicos, uma vez que outras espécies do mesmo gênero, cuja

TABELA 4. Análise antioxidante utilizando os métodos Fosfomolibdênio, DPPH e TBARS do extrato bruto e frações das partes aéreas de *S. westermanni*

Amostra	REDUÇÃO DO COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO		REDUÇÃO DO RADICAL DPPH	TBARS
	Atividade Antioxidante em Relação à Rutina - AA (%) ± DP	Atividade Antioxidante em Relação à Vitamina C - AA (%) ± DP	IC ₅₀ (µg) ± DP	IA(%) ± DP
BHT	-	-	-	33,98 ± 6,11 n
Vitamina C	-	100 d	4,92 ± 0,07 h	-
Rutina	100 a	-	6,15 ± 0,08 h	-
EB	24,33 ± 0,02 c	8,70 ± 0,02 g	169,52 ± 3,50 l	3,68 ± 7,80 p
FH	64,44 ± 0,04 b	23,04 ± 0,04 f	346,96 ± 1,83 m	23,04 ± 10,82 o
FCL	92,51 ± 0,04 a	33,08 ± 0,04 e	71,46 ± 0,21 j	1,05 ± 8,51 p
FAE	53,74 ± 0,02 b	19,22 ± 0,02 f	26,98 ± 0,77 i	4,85 ± 10,35 p
FHR	20,05 ± 0,02 c	7,17 ± 0,02 g	146,72 ± 0,12 k	15,50 ± 6,44 o

Extrato Bruto (EB), Fração Hexano (FH), Fração Clorofórmio (FCL), Fração Acetato de Etila (FAE), Fração Hidroalcoólica Remanescente (FHR), Butil Hidroxi Tolueno (BHT). AA: Atividade Antioxidante. IC₅₀: Concentração Inibitória. IA: Índice Antioxidante. DP: Desvio Padrão. *Resultados seguidos pela mesma letra não diferem estatisticamente (p < 0,05) entre si, pelo teste de Scott-Knott (1974).

rota metabólica é semelhante, tem apresentado interesse por parte da indústria farmacêutica, visto que muitas doenças estão relacionadas diretamente com distúrbios oxidativos.

AGRADECIMENTOS

À CAPES e CNPQ pela concessão das bolsas de estudo e financiamento do projeto e ao Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba (MBM), pela identificação da espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, C.A. et al. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.17, n.2, p.231-235, 2007
- ARAÚJO, M.G.F.; CUNHA, W.R.; VENEZIANI, R.C.S. Estudo fitoquímico preliminar e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de extrato obtido de frutos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hill (Solanaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.31, n.2, p.205-209, 2010.
- BALESTRIN, L. et al. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.230-235, 2008
- BARDÓN, A.E. Bioactive plants from Argentina and Bolivia. **Fitoterapia**, v.78, n.3, p.227-231, 2007.
- BARROS, C.S.L. et al. Biópsia hepática no diagnóstico da intoxicação por *Senecio brasiliensis* (Asteraceae)

- em bovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.27, n.1, p.53-60, 2007.
- BECHO, J.R.M. et al., Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v.1, n.1, p.21 - 25, 2009.
- BEDNARCZUK, V. O. et al. Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.44, 2010.
- BOLZAN, A.A. et al. Espécies de *Senecio* na medicina popular da América Latina e toxicidade relacionada a sua utilização. **Latin American Journal of Pharmacy**, v.26, n.4, p.619-625, 2007.
- CAMPOS, J.S.; FRASSON, A.P.Z. Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. ST-HIL. em emulsão não-iônica. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.32, n.2, p.363-368, 2011.
- CARVALHO, J.L.S. et al. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, v.32, n.4, p.1031-1035, 2009.
- CERQUEIRA, F.M. et al., Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v.30, n.2, p.441-449, 2007.
- CHAVES, M.C.V. et al. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.4, n.2, p.1-10, 2004.
- CUADRA, P. et al. Biological activity of some Patagonian plants. **Fitoterapia**, v.76, n.7-8, p.718-721, 2005.
- ELLEGARD, L.H. et al. Dietary plant sterols and cholesterol metabolism. **Nutrition Reviews**, v.65, n.1, p.39-45, 2007.
- FRESCURA, V.D.S. et al. Compostos fenólicos em extratos de *Rosmarinus officinalis* L. sob cultivo fora do solo. **Enciclopédia biosfera**, v.9, n.17, p.755-761, 2013.
- HARIPRASATH, L. et al., Gastroprotective effect of *Senecio candicans* DC on experimental ulcer models.

- Journal Ethnopharmacology**, v.140, n.1, p.145–150, 2012.
- HIROTA, B.C.K. et al. C-glycosyl flavones and a comparative study of the antioxidant, hemolytic and toxic potential of *Jatropha multifida* leaves and bark. **International Journal of Phytomedicine**, v.4, n.1, p.1-5, 2012.
- JÚNIOR, T.P.S.; PEREIRA, B. Exercício físico intenso como pró-oxidante: mecanismos de indução de estresse oxidativo e consequências. **Revista Brasileira de Ciência e Movimento**, v.16, n.3, p.1-26, 2008.
- LIMA, F.O.; BEZERRA, A.S. Flavonoides e radicais livres. **Disciplinarum Scientia**, v.13, n.1, p.111-124, 2012.
- LUCENA, R.B. et al. Doenças de bovinos no Sul do Brasil: 6.706 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.30, n.5, p.428-434, 2010.
- LUTSENKO, E.A., et al., Vitamin C Prevents DNA Mutation Induced by Oxidative Stress. **The Journal of Biological Chemistry**, v.27, n.19, p.16.895-16.899, 2002.
- MANSOUR, R.H.A.; SALEH, N.A.M. Flavonoids of three local *Senecio* species. **National Research Centre**, v.20, n.5, p.1180–1181, 1981.
- MARTELLI, F.; NUNES, F.M.F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, v.66, n.3, p.54-57, 2014.
- MENSOR, L.L. et al. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.127-130, 2001.
- MEYER, B.N. et al. Brine Shrimp: A convenient general bioassays for active plant constituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982.
- MEZACHE, N. et al. Fast counter current chromatography of n-butanolic fraction from *Senecio giganteus* (Asteraceae). **Natural Product Communications**, v.4, n.10, p. 1357-1362, 2009.
- MORAIS, S.M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de Croton do nordeste do Brasil. **Química Nova**, v.29, n.5, p.907-910, 2006
- MOREIRA, E.A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna farmacêutica**, v.47, n.1, p.1-19, 1979.
- NGUTA, J.M. et al. Biological screening of kenya medicinal plants using *Artemia salina* L. (Artemiidae). **Pharmacologyonline**, v.2, p.458-78, 2011.
- OLIVEIRA, D.S. et al. Vitamina C, carotenoides, fenólicos totais e atividade antioxidante de goiaba, manga e mamão procedentes da Ceasa do Estado de Minas Gerais. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.33, n.1, p.89-98, 2011
- PAULA, C.S. et al. Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.189-195, 2014.
- PEREIRA, R.J.; CARDOSO, M.G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidants. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.3, n.4, p.146-152, 2012.
- PRIETO, P, et al., Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, n.2, p.337-341, 1999.
- RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, v.29, n.4, p.755-760, 2006.
- SCOTT, A.; KNOTT, M. Cluster-analysis method for grouping means in analysis of variance. **Biometrics**, v.30, n.3, p.507-512, 1974.
- SANTI, M.M., et al., Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.2, p.256-261, 2014.
- SILVA, C.M, et al., Alcaloides pirrolizidínicos em espécies do gênero *Senecio*. **Química Nova**, v.29, n.5, p.1047-1053, 2006.
- SOUSA, C.C.C., et al., Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- YOSHIDA, Y.; NIKKI, E. Antioxidant effects of phytosterol and its components. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.49, n.4, p.277-280, 2003.