



CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL FITOQUÍMICO E ANÁLISE DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DAS CASCAS DE *CALLIANDRA FERNANDESII*

Suele Bierhals Vencato¹

Ivana Grivicich²

Alexandre de Barros Falcão Ferraz³

RESUMO:

As cascas de *Calliandra fernandesii* (Fabaceae), comumente conhecidas como caroba ou carobinha, são utilizadas em uma preparação popular chamada de “garrafada de carobinha”. A qual é composta por cinco plantas e vem sendo utilizada como um tratamento alternativo e complementar para pacientes renais crônicos submetidos a tratamento por hemodiálise. Porém, em estudos prévios esta preparação mostrou um potencial mutagênico e citotóxico. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo analisar a constituição fitoquímica e avaliar o potencial antioxidante e antiproliferativo do extrato aquoso das cascas de *C. fernandesii*. A análise fitoquímica foi estudada por ensaios colorimétricos qualitativos além de doseamentos de compostos fenólicos e flavonoides totais. A atividade antioxidante do extrato aquoso das cascas de *C. fernandesii* foi avaliada frente ao radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) tendo como padrão quercetina ($IC_{50} = 18,22 \pm 2,22 \mu\text{g/mL}$). Para avaliar a atividade antiproliferativa utilizou-se o método da sulforrodamina B (SRB) frente às linhagens de adenocarcinoma de colón (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7), célula tumoral geral (KB), glioblastoma humano (U-251) e fibroblasto (NHI-3T3), o padrão utilizado foi o etoposídeo. A análise fitoquímica determinou a presença de flavonóides e saponinas. Além disso, apresentou teores de fenólicos totais $146,82 \pm 0,49 \text{ mg/g EAG}$ e $3,52 \pm 0,14 \text{ mg/g EQ}$ de flavonoides totais. O potencial antioxidante do extrato bruto de *C. fernandesii* apresentou $IC_{50} = 125,54 \pm 4,07 \mu\text{g/mL}$. Além disso, o extrato aquoso apresentou efeito antiproliferativo em quatro das cinco linhagens celulares, sendo mais ativo contra a linhagem celular HT-29.

Palavras chave: *screening* fitoquímico; antiproliferativo; *Calliandra fernandesii*;

INTRODUÇÃO:

As plantas são mundialmente empregadas na medicina popular para a produção de medicamentos e o tratamento farmacológico de inúmeras patologias tiveram seu início com a utilização de plantas medicinais, desde o início da antiguidade, sendo utilizadas e pesquisadas até hoje (PINTO et al, 2002). Devido ao elevado custo dos medicamentos, as plantas estão sendo cada vez mais empregadas na medicina tradicional, tendo seus constituintes biológicos analisados cientificamente, obtendo assim a comprovação de sua eficácia e segurança para utilização (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Friedrich Serturmer, em 1806, foi um pioneiro quando isolou o alcaloide morfina da *papoula*, o qual levou a uma busca contínua para outros medicamentos derivados de plantas. Em 1824, Pierre-Jean Robique obteve a codeína, um agente antitussígeno também da *papoula*, e George Merck Fraz isolou a papaverina um alcalóide antiespasmódico a partir desta mesma planta em 1848 (DUTRA et al 2016). Estima-se que metade das espécies nativas tenha alguma propriedade medicinal, sabe-se que nem 1% é estudado adequadamente (MESSIAS et al., 2015). Com isso, evidencia-se que a composição química de algumas plantas ainda é desconhecida, representando um importante potencial a

¹Aluna do curso de Farmácia na Universidade Luterana do Brasil – Bolsista PIBIC/CNPq suele.bierhals@gmail.com;

²Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde grivicich@terra.com.br;

³Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular Aplicada à Saúde alexandre.ferraz@ulbra.br;

ser explorado (CECÍLIO et al., 2012). O gênero *Calliandra* é caracterizado por apresentar atividade analgésica, laxante, antitussígena, anticonvulsivante, antimicrobiana e anti-helmíntica, além da indicação para o tratamento de cefaleia, doenças sexualmente transmissíveis e infecções oftálmicas (AGUNU et al, 2005). Além disso, o extrato das raízes de *Calliandra portoricensis* apresentou atividade antioxidante, efeitos antiangiogênico e antiproliferativo contra as células de câncer de próstata (ADARAMOYE et al 2015), sendo que o extrato com as folhas são relatados por apresentar ação antiúlcera e antiinflamatória Um exemplo de uso empírico utilizado na cultura popular é a *Calliandra fernandesii* pertencente a família Fabaceae, uma espécie nativa do Brasil e que apresenta florescimento exuberante de coloração branca, rosa ou vermelho. Essa espécie é utilizada isoladamente como planta ornamental, cerca-viva, ou como alimento para animais em algumas regiões. (LORENZI; SOUZA 2001). Contudo, *Calliandra fernandesii* vem sendo utilizada pela população na região nordeste em garrafadas produzidas artesanalmente juntamente com outras plantas para o uso em pacientes renais crônicos, que fazem o tratamento com hemodiálise (CAMPELO 2016). Nesse sentido, *C. fernandesii*, é uma espécie de uso popular, com poucos estudos científicos. Á vista disso, buscou-se com este trabalho caracterizar o perfil fitoquímico e avaliar atividade antioxidante e citotóxica do extrato bruto aquoso das cascas de *Calliandra fernandesii*.

METODOLOGIA:

Material vegetal: As cascas de *C. fernandesii* foram obtidas no Estado do Piauí no herbário da Universidade Federal do Piauí – UFPI.

Preparação das amostras: Para obtenção do extrato as cascas de *C. fernandesii* foram submetidas ao método de extração por decocção durante 15 minutos. Para este processo utilizou-se a relação de 1:10 (planta/solvente). O decocto foi filtrado, congelado e submetido à liofilização sob temperatura de -40°C.

Análise fitoquímica: Os testes para detecção dos constituintes do metabolismo secundário das cascas de *C. fernandesii* foram realizados através de reações gerais: alcalóides (precipitação com reagentes de Bertrand, de Bouchardat, de Dragendorff e de Mayer), antraquinonas (reação de Borntraeger), cumarinas (KOH / UV 365 nm), flavonoides (Reação da cianidina), saponinas (índice de espuma) e taninos (precipitação com solução de gelatina) seguindo a técnica descrita por Falkenberg, Santos e Simões (2007). Para a confirmação dos resultados qualitativos, foi realizada uma análise cromatográfica utilizando sistemas eluentes e reveladores específicos propostos por Wagner e Bladt (1996).

Determinação de compostos fenólicos: Uma curva de calibração foi preparada com 1 mL das soluções de ácido gálico em etanol nas concentrações de 0,015 a 0,105 mg/mL misturadas com reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio (SINGLETON; ROSSI, 1965). Após 1h as amostras foram lidas na absorvância em 765 nm. (MILIAUSKAS et al., 2004). Os testes foram realizados em triplicada e o valor total de compostos fenolicos é expresso em mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato.

Determinação de flavonoides totais: A quantificação de flavonoides foi realizada seguindo a metodologia descrita por Woisky e Salatino (1998) que utiliza a solução de cloreto de alumínio a 2,5% como agente cromogênico. A técnica baseia-se na formação de complexos estáveis entre o cátion alumínio e os flavonoides presentes na amostra. O teor de flavonoides será calculado através da equação da reta obtida na curva de calibração de quercetina. A curva será construída da mesma maneira que as amostras testadas, nas concentrações de 0,002 até 0,008 mg/mL. O valor obtido através da substituição da absorvância do teste na curva será convertido para expressar o resultado em flavonoides equivalentes de quercetina por grama de extrato liofilizado.

Avaliação da capacidade antioxidante por DPPH: O extrato bruto foi pesado e diluído em metanol para a obtenção das concentrações 25-300 µg/mL. Após, 2,5 mL da amostra foi transferida para a cubeta de 3,5 mL e adicionado 1 mL da solução de DPPH na concentração de 0,2 mg/mL. O controle negativo, consiste na amostra sem o DPPH, e o controle positivo, consiste em 1 mL de DPPH diluído em 2,5 mL de metanol. O padrão, utilizado é a quercetina. Após 30 minutos, será medido a absorvância em espectrofotômetro no comprimento de ondas de 518 nm (Mensor et al., 2001). Todos os testes serão feitos em triplicata e a porcentagem de inibição de DPPH, que diz respeito à atividade antioxidante, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Inibição de DPPH} = [(Abs_{\text{controle}(+)} - Abs_{\text{amostra}}) \times 100] / Abs_{\text{controle}(+)}$$

Avaliação da atividade antiproliferativa: Para avaliar a atividade antiproliferativa utilizou-se o método da sulforrodamina B (SRB) frente às linhagens de adenocarcinoma de colón (HT-29), carcinoma de mama (MCF-7), célula tumoral geral (KB), glioblastoma humano (U-251) e fibroblasto (NHI-3T3), o padrão utilizado foi o etoposídeo (Skehan et al, 1990).

RESULTADO E DISCUSSÃO

A partir da análise qualitativa do *screening* fitoquímico preliminar, sugere-se a presença de flavonoides e saponinas para *Calliandra fernandesii* (carobinha). Silva et al. (2005) em seu estudo citou o isolamento de uma saponina chamada pulcherrimasaponina das folhas de *Calliandra pulcherrima*. Chan et al (2013) citou em seu trabalho o isolamento dos flavonoides canferol e a quercetina de *Calliandra tergemina*.

Através da análise quantitativa e avaliação antioxidante (Tabela 1), observou-se um moderado teor de compostos fenólicos e flavonóides para o extrato aquoso de *C. fernandesii*. O estudo de Detoni et. al (2011) corrobora os resultados encontrados, pois foram citados em seu estudo valores de 100 – 200 mg/g EAG/g de compostos fenólicos para a espécie de mesmo gênero *Calliandra brevipes*.

Tabela 1: Resultados das análises quantitativas das cascas de *C. fernandesii*.

Doseamentos e DPPH	
Flavonoides totais	3,52 ± 0,14
Fenólicos totais	146,82 ± 0,49
DPPH	125,54 ± 4,07

Segundo Degáspari e Waszczyński (2004) muitas plantas utilizadas na medicina popular possuem uma ampla variedade de compostos fenólicos em sua constituição e sabe-se que estes compostos atuam na eliminação dos radicais livres. Desse modo, o estudo de Saha e Verma (2015) relata que quanto maiores o teor de compostos fenólicos, maior será o potencial antioxidante. Um exemplo disto é uma planta *Hymenaea courbaril* que possui um alto teor de compostos fenólicos (516,89 ± 2,63 EAG/g) conseqüentemente apresenta um elevado potencial antioxidante (IC₅₀= 33,97 ± 0,55 µg/mL) (Vencato et al. 2016). O extrato aquoso de *C. fernandesii* apresentou um moderado potencial antioxidante (IC₅₀=125,54 ± 4,07 µg/mL) quando comparado com o padrão rutina (IC₅₀ =22, 62 ± 1,0 µg/mL). Trabalhos como o de Siemuri, Akintunde e Salemcity (2015) e o de Adaramoye et. al (2015) relatam atividade antioxidante *in vitro* com extrato metanólico das cascas de *Calliandra portoricensis*, outra espécie do mesmo gênero.

Através da avaliação antiproliferativa (Tabela 2) verificou-se atividade citotóxica contra quatro das cinco linhagens celulares, sendo que o maior potencial foi frente à linhagem celular de adenocarcinoma de colon (HT – 29).

Tabela 2: Atividade antiproliferativa de *C. fernandesii* frente a linhagens celulares

IC ₅₀ (média ± SD; n = 6)		
Tratamento (µg/mL)		
Cell Line	Caroba	Etoposide
HT-29	58.6 ± 9.4	1.2 ± 0.1
MCF-7	OR	3.5 ± 0.5
U251	73.5 ± 2.4	1.5 ± 0.05
KB	95.3 ± 3.6	8.3 ± 1.3
NHI-3T3	62.7 ± 10.1	20.3 ± 2.8

Adaramoye et. al (2015) observou efeitos antioxidantes e antiproliferativos frente as linhagens celulares de câncer de próstata para uma espécie do mesmo gênero *Calliandra portoricensis*. Procópio et. al (2017) em seu trabalho descreve o isolamento de uma lectina termo-estável com potencial biotecnológico como citotóxico, antibiótico e agente antifúngico para as folhas de *Calliandra surinamensis*

O potencial citotóxico observado pode estar relacionado com a presença de saponinas em nosso extrato, pois as saponinas mostram diversos efeitos biológicos, incluindo antitumoral, antiinflamatórios, antidiabéticos e funções antifúngicas. Korchowiec et. al (2015) atribui como principal propriedade das saponinas a atividade antiproliferativa que elas exercem. Wang et. al (2017) relatara, em seu estudo ensaios de viabilidade celular com saponinas, ao qual demonstraram atividade antiproliferativa contra três linhagens celulares de tumor. Da mesma forma, Wu et. al (2015) citaram em seu trabalho a atividade citotóxica para saponinas isoladas do extrato de *Camellia oleifera*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Através da análise do *screening* fitoquímico observou-se a presença de flavonóides e saponinas nas cascas de *Calliandra fernandesii*. A capacidade antioxidante avaliada frente ao radical livre DPPH apresentou um moderado IC₅₀=125,54 ± 4,07 µg/mL, que provavelmente está relacionado aos teores de compostos fenólicos encontrados neste extrato. Além disso, o extrato aquoso apresentou efeito antiproliferativo em quatro das cinco linhagens celulares, sendo mais ativo contra a linhagem celular HT-29.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADARAMOYE O.; ERGUEN B.; OYEBODE O.; NITZSCHE B.; HOPFNER M.; JUNG K.; RABIEN A. Antioxidant, antiangiogenic and antiproliferative activities of root methanol extract of *Calliandra portoricensis* in human prostate cancer cells, **Journal of Integrative Medicine**. v. 13, p. 185-193, 2015.
- AGUNU, A; ABDURAHMAN, EM; SHOK, M; YUSUF, SA. Analgesic activity of the roots and leaves extracts of *Calliandra portoricensis*, **Fitoterapia**. v. 76, p. 442-225, 2005.
- CAMPELO D. Avaliação das características químicas biológicas de garrafada de “carobinha” 20015, f. 60, Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular aplicada à saúde) Universidade luterana do Brasil em Canoas, Canoas, 2016.
- CECÍLIO, AB; FARIA DB; OLIVEIRA PC; CALDAS S; OLIVEIRA DA; SOBRAL MEG;
- CHAN EWL;GRAY, AI;IGOLI, LO;LEE, SM;GOH, JK. Galloylated flavonol rhamnosides from the leaves of *Calliandra tergemina* with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytochemistry**, v.107 148–154 2014.
- DEGÁSPARI, CH; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33–40, 2004.
- DETONI, ML; VASCONCELOS, EG; RUST, NM; ISAIAS, RMS; SOARES, GLG. Seasonal variation of phenolic content in galled and non-galled tissues of *Calliandra brevipes* Benth (Fabaceae: Mimosoidae). **Acta Botanica Brasílica**, v. 25, p. 601-604, 2011.

DUTRA RC; CAMPOS MM; SANTOS ARS; CALIXTO JB;. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Article in press**, 2016.

FALKENBERG, MB; SANTOS, RI; SIMÕES, CMO. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, CMO; SCHENKEL, EP; GOSMANN, G; MELO, JCP; MENTAZ, LA; PETROVICK, PR. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Ed. da UFSC, Porto Alegre, UFRGS, ed. 6, p. 229-245, 2007.

GOBBO-NETO, L; LOPES, NP. Plantas medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v: 30, p: 374-381, 2007.

GURGEL, APA D.; SILVA, JG.; GRANGEIRO, AARS.; OLIVEIRA, DC; LIMA, CMP; SILVA, ACP; OLIVEIRA, RAG; SOUZA, CI. A. In vivo study of the anti-inflammatory and antitumor activities of leaves from *Plectranthusamboinicus* (Lour.) Spreng (Lamiaceae). *J. of Ethnopharmacol.* v. 125, p. 361–363, 2009.

KORCHOWIEC, B; GORCZYCA, M; WOJSZKO, K; JANIKOWSKA, M; HENRY, M; ROGALSKA, E. Impact of two different saponins on the organization of model lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1848, p. 1963-1973, 2015.

LAPA AJ; SOUCAR C; LIMA-LANDMAN, MTR; GODINHO RO; NOGUEIRA TCML 2004. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. **Farmacognosia da planta ao medicamento**, 11:248-262.

LORENZI, H & SOUZA HM. Plantas ornamentais no Brasil – Arbustivas, herbáceas e trepadeiras. **Instituto Plantarum** 3 ed., Nova Odessa, p. 1088, 2001.

MENSOR, LL.; MENEZES, FS; LEITÃO, GG; REIS, AS, DOS SANTOS, TC; COUBE, CS; LEITÃO, SG. 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.

MESSIAS, MCTB. MENEGATTO MF; PRADO ACC; SANTOS BR; GUIMARÃES MFM. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil.. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, p. 76-104, 2015.

PINTO AC, SILVA DHS, BOLZANI VS, LOPES NP, EPIFANIO RA. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova** v.25, p.45-61, 2002.

PROCÓPIO, TF; PATRIOTA, LLS; MOURA, MC; SILVA, PM; OLIVEIRA, APS; CARVALHO, LVN; LIMA, TA; SOARES, T; SILVA, TD; COELHO, LCB; PITTA, MGR; RÊGO, MJBM; FIGUEIREDO, RCBQ; PAIVA, PMG; NAPOLEÃO, TH. CasuL: A new lectin isolated from *Calliandra surinamensis* leafpinnulae with cytotoxicity to cancer cells, antimicrobial activity and antibiofilm effect. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.98, p. 419-429, 2017.

SAHA S; VERMA RJ. Antioxidant activity of polyphenolic extract of *Terminalia chebula* Retzius fruits. **Journal of Taibah University for Science**, 2015. *in press*.

SIEMURI, EO; AKINTUNDE, JK and SALEMCITY, AJ. Effects of sub acute methanol extract treatment of *Calliandra portoricensis* root bark on antioxidant defence capacity in an experimental rat model. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v.4, p. 375-382, 2015.

SILVA, BP; SOARES, JBRC; SOUZA, EP; PALATNIK, M; SOUSA, CBP; PARENTE, JP. Pulcherrima saponin, from the leaves of *Calliandra pulcherrima*, as adjuvant for immunization in the murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 23, p.1061-1071, 2005.

SINGLETON VL;ROSSIJRJA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p.144-158, 1965.

VENCATO, SB; LEMES, MLB; CAMPELO, DS; CORRÊA, DS; FERRAZ, ABF. Avaliação do perfil fitoquímico e potencial antioxidante do extrato aquoso de *Hymenaea courbaril*. **Revista de Iniciação Científica da ULBRA**. v. 14, p. 55-66, 2016.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant drug analysis a thin layer chromatography atlas**. 2ªed. Berlin: Springer, 1996.

WANG, L; WANG, Z; SU, S; XING, Y; LI, Y; LI, M; LUI, J; YANG, S. Synthesis and cytotoxicity of oleanolic acid trisaccharide saponins. **Carbohydrate Research**, v. 442 p. 9-16, 2017.

WOISKY R; SALATINO A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37 p. 99-105, 1998.

WU, J; ZHAO, J; LUI, Y; LI, X; XU, Q; FENG, Y; KHAN, IA; YANG, S. Five new triterpenoid saponins from the roots of *Camellia oleifera* C. Abel with cytotoxic activities. **Phytochemistry Letters**, v. 13 p. 379-385, 2015.