

Screening fitoquímico e atividade biológica de *Amburana cearensis* Phytochemical screening and biological activities of *Amburana cearensis*

Paulo Déric de Araújo Dantas¹, Leandro Cabral Silva¹, Vitor Hugo Migueis^{1,2}

¹Centro Universitário UniRuy, Departamento de Saúde. Av. Luis Viana Filho, 3230 - Paralela
Salvador – BA

² Universidade do Estado da Bahia, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Cabula,
41150-000, Salvador, BA, Brasi

Resumo

Amburana cearensis (Fabaceae) é uma árvore silvestre, típica da caatinga nordestina, conhecida popularmente como cumaru ou imburana-de-cheiro. Estudos químicos e farmacológicos têm permitido caracterizar o cumaru, com definição de princípios ativos, como a cumarina e o amburosídio A, e do seu potencial anti-inflamatório, antioxidante e relaxante do músculo liso traqueal de roedores. Entretanto, fatores abióticos influenciam na constituição dos princípios ativos das espécies vegetais, conferindo propriedades farmacológicas diferentes em plantas de diferentes regiões. Diante do exposto o objetivo do presente estudo foi avaliar a composição da semente de *Amburana cearensis*, com ênfase em análise fitoquímica e atividade antimicrobiana. Foram detectados diversos tipos de metabólitos presente no extrato. Além disso, o extrato apresentou atividade antioxidante importante, além de inibição de AChE e potencial antimicrobiano em relação a *C. albicans* e *S aureus*.

Palavras-chave: Umburana de cheiro, DPPH, toxicidade, fenólicos totais, flavonoides totais.

Abstract

Amburana cearensis (Fabaceae) is a wild tree, typical of the northeastern caatinga, popularly known as cumaru or imburana-de-cheiro. Chemical studies and medications can characterize coumaru, with the definition of assets, such as coumarin and amburid A, and its anti-inflammatory, antioxidant and relaxing potential of rodent tracheal smooth muscle. However, abiotic factors influence the constitution of the active principles of plant species, conferring different pharmaceutical properties on plants from different regions. In view of the above, the objective of the present study was to evaluate the composition of the *Amburana cearensis* seed, with an emphasis on phytochemical analysis and antimicrobial activity. Several types of metabolites without extract were detected. In addition, the extract has important antioxidant activity, in addition to AChE inhibition and antimicrobial potential in relation to *C. albicans* and *S aureus*.

Keywords: Umburana de Cheiro, DPPH, toxicity, total phenolics, total flavonoids.

Introdução

O táxon *Amburana* é formado por apenas duas espécies, *Amburana acreana* Ducke e *Amburana cearensis* A. C. Smith, as quais possuem grande importância econômica e medicinal. Enquanto a primeira espécie apresenta-se na forma arborescente de alto fuste, ocorrendo em matas altas e fechadas, a *A. cearensis* assume a forma arbustiva de fuste curto, predominando em formações vegetais tropicais a subtropicais secas¹.

Considerada uma planta nativa da caatinga nordestina, *A. cearensis* é também encontrada nos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Tocantins e da região Centro-Oeste. Por outro lado, a *Amburana acreana* tem sua distribuição restrita ao sudoeste da floresta amazônica (Rondônia, Acre e Amazonas). Há registros de sua ocorrência em outros países como no norte da Argentina, sul da Bolívia e nordeste do Paraguai e Peru².

A. cearensis pertence à família Fabaceae, também conhecida como Leguminosae, e recebe diferentes designações populares como ambaurana, baru, cumaru-do-ceará, cumaru-das-caatingas, imburana-de-cheiro, louro-ingá, umburana, angelim, cerejeira-rajada, cumaré, roble crioulo, tumi e palo trébol¹.

A planta apresenta porte regular, podendo atingir até 10 m de altura nas regiões da caatinga e até 20 m na zona da mata. Os espécimes jovens têm suas folhas compostas, pinadas, com 5 a 9 pinas, alternas, longo-pecioladas, imparipenadas e raras vezes paripenadas na mesma muda. O pecíolo é de coloração verde, piloso, com pulvino. Os folíolos são curto-peciolados, elípticos, com base obtusa e ápice agudo, margem inteira, nervação penínervia evidente na face abaxial, ao contrário da adaxial e apresentam pelos simples. Os cotilédones, quando caem, deixam cicatriz no caule^{3,4}. Possui tronco cuja parte externa se solta em camadas finas (descasca), formando grandes manchas vermelho pardacentas e lisas. Flora em setembro e, dois meses depois, tem boa produção de frutos (vagens curtas). As sementes, em número de uma por fruto, são achatadas, oleaginosas, manchadas de marrom e branco e têm aroma forte agradável de cumarina. O mesmo cheiro, embora mais fraco, está presente em todas as outras partes da planta⁵.

Amburana cearensis (cumaru) é uma árvore cuja casca do caule tem sido amplamente utilizada nas práticas caseiras da medicina popular nordestina, sob a forma de chá como auxiliar no tratamento de problemas respiratórios como a asma, tosse e bronquite⁵. Programas de Fitoterapia no Ceará, incluindo o Estadual (SESA, CE) e municipais como, Fortaleza, Pereiro, Quixeramobim e Viçosa, tem produzido o xarope de cumaru empregando como matéria-prima ativa o extrato hidroalcoólico da planta, não padronizado. O xarope de cumaru tem sido dispensado por unidades de saúde, especialmente relacionadas a atenção básica, e indicado como auxiliar no tratamento da asma. Ainda, o cumaru trata-se uma espécie de interesse para a Indústria Farmacêutica, sendo inclusive comercializado o xarope da planta, mesmo sem registro junto ao órgão competente⁵.

Estudos têm mostrado a natureza química, a baixa toxicidade e as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e antiespasmódica do extrato e constituintes químicos do cumaru em roedores, com correlação entre estas atividades e a presença de cumarina e amburosídio A, compostos majoritários na planta (0,2% e 0,3%, respectivamente)⁶⁻⁸. Além disso, estudos clínicos preliminares têm mostrado a segurança relativa e o potencial antiasmático do cumaru⁹.

Neste contexto, nos últimos anos tem havido grande investimento no desenvolvimento de insumos farmacêuticos padronizados produzidos a partir da casca do caule do cumaru, incluindo desde a preparação e caracterização da droga vegetal à otimização na produção do extrato etanólico da planta^{10, 11}, entretanto, nenhum estudo do extrato metanólico está em andamento.

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi agregar conhecimento sobre a composição metabólica de *Amburana cearensis*, toxicidade e atividade biológica.

Material e métodos

Preparo do extrato

Foram comprados o caroço da *Amburana cearensis* em uma pequena loja de produtos à base de plantas na cidade de Jacobina – BA e trazidas para Salvador, onde foram trituradas e em seguida passada para um frasco de vidro onde foi realizado a maceração manual por 48 horas, tendo o metanol como solvente extrator. Após esse período, foi realizado a filtração do extrato com papel filtro. O extrato foi levado ao rotaevaporador, para redução de volume, seguida foi deixado o extrato em uma estufa a 45 °C até a completa evaporação do solvente. O extrato foi transferido para recipiente limpo e identificado.

Prospecção Fitoquímica

A metodologia que foi utilizada para a detecção dos grupos de metabólitos secundários foi proposta por Costa¹² e adaptada por Paula e Bara¹³. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Pesquisa de alcalóides

Para a extração dos possíveis alcalóides, foram pesados em balança semianalítica 2g da amostra pulverizada. Foram adicionados 30 mL de ácido sulfúrico a 5% (v/v). A mistura foi levada à fervura por 3 minutos, e, em seguida, filtrada em papel de filtro e resfriada. A solução extrativa foi distribuída igualmente em 3 tubos de ensaio, sendo que em cada tubo, respectivamente, foram acrescentadas 3 a 9 gotas dos reativos gerais: Reativo de Mayer, Reativo de Dragendorff e Reativo de Bouchardat. Foi observado se ocorreria o aparecimento dos precipitados branco, vermelho-tijolo e marrom-avermelhado, respectivamente, para indicação de reação positiva para alcalóides.

Pesquisa de taninos

Para a extração dos possíveis taninos, foram pesados em balança semi-analítica, 2g da amostra pulverizada e adicionados 30 mL de água destilada. A mistura foi levada à fervura durante 5 minutos. Em seguida procedeu-se a filtração da mistura ainda quente, utilizando papel de filtro. Foi montada uma bateria contendo 3 tubos de ensaio. A cada tubo foram adicionados 5 mL da solução extrativa e foram adicionadas 5 gotas dos reagentes para taninos, como: FeCl₃ SR 2%, Acetato de Cobre SR 10%, Solução de Gelatina a 2,5% (em solução de NaCl a 5%). Foi visualizado se ocorreria a formação de precipitados.

Pesquisa de heterosídeos flavonóides

Para a extração dos possíveis heterosídeos flavonóides presentes na amostra pulverizada foram pesados, em balança semi-analítica, 2g da amostra e foram acrescentados 30 mL de etanol a 70% (v/v). Essa mistura foi fervida durante 5 minutos e filtrada em papel de filtro umedecido com etanol a 70% (v/v). A caracterização foi realizada a partir do filtrado obtido, onde se procederam as seguintes reações: Reação de Shinoda, onde, foram transferidos 3 mL do filtrado para um tubo de ensaio. Adicionou-se cerca de 1 cm de fita de magnésio fina e acrescentou-se cuidadosamente 5 gotas de ácido clorídrico concentrado. Foi observado se ocorria o aparecimento de coloração vermelha para heterosídeos flavonóides. Reação com Hidróxido: foram transferidos 3 mL da solução extrativa para um tubo de ensaio. Adicionou-se 1 mL de hidróxido de sódio a 20% (p/v) e agitou-se o tubo. O desenvolvimento de coloração amarela indicaria reação positiva para heterosídeos flavonóides. Reação Oxalo-Bórica realizada em uma cápsula de porcelana: evaporou-se 5 mL de solução extrativa em uma cápsula de porcelana. Juntou-se ao resíduo semi-seco 3 mL de solução de ácido bórico a 3% (p/v) e 1 mL de solução de ácido oxálico a 10% (p/v). Evaporou-se até secar e adicionou-se, ao resíduo seco, 7 mL de éter etílico P.A. Observou-se sob luz ultravioleta a ocorrência ou não de fluorescência.

Pesquisa de esteróides e triterpenóides

Para a extração dos possíveis esteróides e triterpenóides presentes na amostra pulverizada pesou-se, em balança semi-analítica, 2g da amostra, acrescentou-se 30 mL de solução hidroalcoólica a 50% (v/v) e 10 mL de solução de acetato de chumbo a 10% (p/v) e ferveu-se por 4 minutos. Filtrou-se e

adicionou-se 10 mL de clorofórmio. Para a caracterização desta classe de metabólitos secundários utilizou-se a Reação de Liebermann-Burchard. Foi observado o desenvolvimento de coloração azul evanescente seguida de verde ou parda a vermelha, para esteróides e triterpenos, respectivamente.

Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Para a extração dos possíveis heterosídeos saponínicos, pesou-se em balança semianalítica, 2g da amostra em pó que foi transferida para um béquer contendo 100 mL de água destilada. Essa mistura foi levada à fervura em chapa aquecedora por 5 minutos, adicionando-se durante a decocção, carbonato de sódio em solução até a neutralização, que foi observada utilizando-se papel de tornassol como indicador. Logo em seguida, a mistura foi filtrada em algodão e ao filtrado acrescentou-se água destilada até completar um volume de 100 mL. Para a caracterização de heterosídeos saponínicos, transferiu-se 5 mL para o tubo de ensaio 5 e agitou-se vigorosamente por 20 segundos. Observou-se presença persistente de espuma por quinze minutos.

Pesquisa de cumarinas

Para extração das possíveis cumarinas, foram pesadas 2g da amostra pulverizada em balança semi-analítica e adicionados a 30 mL de água quente. Essa mistura foi filtrada, e ao filtrado adicionou-se 1 mL de ácido clorídrico 1N (pH 1,0). Em seguida, extraiu-se com 10 mL de éter etílico P.A. A fase etérea foi concentrada até a metade de seu volume. Para caracterização dessa classe de metabólitos secundários foram aplicadas gotas da fase etérea sobre duas regiões de um papel de filtro. Em uma das manchas formadas adicionou-se 1 gota de NaOH 1N. O papel foi observado sob luz ultravioleta a 365nm para caracterização de fluorescência.

Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos

Para a extração dos possíveis heterosídeos antraquinônicos, presentes na amostra pulverizada, pesou-se, em balança semi-analítica, 2g da amostra e acrescentou-se 30 mL de etanol a 70% (v/v), aqueceu-se durante 3 minutos em chapa aquecedora, e, filtrou-se em papel de filtro. Para a caracterização dessa classe de metabólitos secundários adicionou-se 10 mL de éter, homogeneizou-se. Separou-se 5 mL de fase etérea e adicionou-se 3 mL de hidróxido de amônio SR (1:1). Observou-se se ocorria o aparecimento de coloração vermelha na fase amoniacal.

Preparação das amostras e ensaio toxicológico

O bioensaio com *Artemia salina* foi baseado na técnica descrita por Meyer¹⁴. Foram utilizados 10 mg do extrato bruto de todas as amostras, nos quais foram adicionados 100 µL de Cremophor® e 1 mL de Tween 80 a 5% para ajudar a solubilização deles. As soluções foram homogeneizadas e o volume completado para 5 mL com água salinizada filtrada (água do mar e água destilada 1:1) a pH = 8,0. Destas soluções foram retiradas alíquotas de 2500, 1875, 1250, 625, 250 e 125 µL que foram transferidas para outros balões de 5 mL e os volumes completados com o mesmo solvente, obtendo-se concentrações de 1000, 750, 500, 250, 100 e 50 µg/mL para cada extrato. Os ovos de *A. salina* (20 mg) foram incubados sob iluminação artificial por 48 horas para que houvesse a eclosão das larvas (metanáuplios), e estas, separadas em sete grupos com 10 a 13 indivíduos cada. O primeiro grupo recebeu a solução controle (solvente e tensoativos) e os seis seguintes receberam as soluções dos extratos em diferentes concentrações. As amostras foram submetidas à iluminação artificial durante 24 horas, após este período foram contabilizadas as larvas vivas e mortas. O experimento foi realizado em triplicata para cada extrato. Para obtenção dos valores de CL₅₀ (concentração média letal) foi utilizada a análise PROBIT, através do software STATPLUS® 2005, com 95% de confiança. Para comparação dos valores de CL₅₀ entre as espécies, nos diferentes locais de coleta, foi utilizado o intervalo de confiança obtido pela análise PROBIT

Análise da atividade antioxidante

O teste de atividade antioxidante, frente ao sequestro de radicais livres DPPH, foi realizado pela metodologia descrita por Brand-Williams¹⁵, modificado por Miliauskas¹⁶. Diluiu-se os extratos em MeOH, adquiriu-se uma solução mãe de 100mg/mL utilizada para triagem, em seguida foram feitas

diluições decrescentes (50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,125 e 1,56 mg/mL), colocou-se 50µL destas amostras na microplaca de 96 poços. Em seguida adicionou-se em cada poço 200µL da solução de DPPH (200Mm). Como padrão usou-se o antioxidante hidroxitolueno de butila (BHT) e como branco substituiu a solução do extrato por MeOH.

A placa foi incubada em local com ausência de luz por 30 minutos, em seguida realizou-se a leitura em espectrofotômetro a 600nm. Após a leitura, calculou-se a porcentagem de atividade pela fórmula:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH} = \left(\frac{\text{Abs do controle} - \text{abs da amostra}}{\text{abs do controle}} \right) \times 100$$

Através destes dados foi possível construir a curva % de inibição do radical DPPH *versus* concentração, e por interpolação obteve-se o valor da IC₅₀.

Determinação de fenólicos totais

A determinação no teor de fenólicos totais nos extratos acetato, clorofórmico, hexânico e metanólico foram determinadas usando o reagente Folin-Ciocalteu em microplaca de 96 poços como modificado por Roesler¹⁷.

Determinação de flavonoides totais

O teor total de flavonóides dos extratos foi determinado pelo método colorimétrico do cloreto de alumínio (AlCl₃) adaptado por Dewanto¹⁸. Para a realização do teste, 50µL dos extratos na concentração de 1000µg/mL (em triplicata), foram adicionados a microplaca de 96 poços, em seguida adicionou-se 10µL do reagente AlCl₃ (10%), seguido da adição de 150µL de EtOH (95%) juntamente a 10µL de acetato de sódio (1M). O branco foi preparado substituindo a amostra por EtOH (80%). Os reagentes foram misturados com pequenos movimentos da microplaca sobre uma estrutura lisa e armazenados na ausência de luz em temperatura ambiente por 40 minutos. A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 415 nm. A construção da curva de concentração *versus* absorbância foi realizada através do preparo de uma solução mãe, na qual utilizou-se como padrão a quercetina. Esta foi diluída em EtOH (80%) até uma concentração de 200µg/mL, em balão volumétrico de 10mL. Em seguida, passou por diluição seriada cujas concentrações variaram de 5 a 100µg/mL. O teor de flavonóides totais, foram expressos em mg equivalentes de quercetina por grama de extrato.

Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

O teste foi realizado em microplaca de 96 poços (KASVI) com base no método espectrofotômetro proposto por Ellman e colaboradores¹⁹, modificado por Rhee²⁰ e adaptado por Hasnat²¹. Adicionou-se, em cada cavidade da microplaca, 140µL de tampão fosfato (pH = 7,5), 10µL da enzima acetilcolinesterase (0,5 U/mL), 20µL de DTNB (10mM) e 20µL da amostra. Em seguida, foi realizado a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 405 nm. Para dar início à reação, se acrescenta o substrato acetilcolina iodada. Como padrão utilizou-se a eserina (Fisiostigmina) e MeOH como controle. A placa foi incubada na ausência de luz, com o monitoramento da reação a cada 10 minutos durante 1 hora. Os resultados foram calculados em porcentagem de inibição através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\frac{\text{Abs do controle} - \text{abs da amostra}}{\text{abs do controle}} \right) \times 100$$

Os valores de IC₅₀ foram adquiridos a partir da construção de uma curva de concentração em mg/mL *versus* porcentagem de inibição com auxílio do programa Excel.

Determinação da atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana foram realizados através da técnica de microdiluição em caldo descrita no documento Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005; CLSI, 2002), com adaptações. Foram selecionadas cepas padrão American Type Culture Collection (ATCC): *Streptococcus mutans* (25175), *S. oralis* (10557) *Escherichia coli* (ATCC 8739), *S. aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (10231). Após serem feitos testes prévios com a concentração do extrato variando de 2mg/mL até 8mg/mL frente às cepas escolhidas, a melhor concentração do extrato selecionada para prosseguir a determinação da Concentração Inibitória Mínima foi a de 4mg/ml²².

Preparo dos inóculos

O preparo dos inóculos para os testes de suscetibilidade foram realizados seguindo as recomendações do protocolo M7-A6 para bactérias²³ e M27-A2 para leveduras²⁴. Culturas de bactérias incubadas por 24 horas em gerador de anaerobiose (Probac) foram preparadas e adicionadas em solução salina (0,85%) esterilizada (5mL). Sua absorbância foi ajustada entre 0,08 a 0,10 a um comprimento de onda de 625nm em fotolorímetro Bioespectro, modelo SP-22, originando uma concentração equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC. A partir disso, foi realizada uma diluição seriada obtendo-se ao final da mesma uma concentração de 1×10^6 UFC. Os testes de suscetibilidade para *Candida albicans* foram realizados através do método de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do protocolo M27-A2 para leveduras²⁴. A concentração do inóculo, após ajuste em fotolorímetro (530nm), correspondeu a 5×10^6 céls/mL e, após diluições sucessivas a $2,5 \times 10^3$ céls /mL.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Foram distribuídos nos orifícios de cada coluna, 100 µL do caldo BHI e Sabouraud para bactéria e fungo, respectivamente. Na coluna 1 - linha A foram acrescentados 50 µL (micropipeta Eppendorf, Researchplus, 20-200 µL) de solução da amostra testada, de concentração conhecida, sendo estes referentes ao controle de esterilidade das amostras. Em seguida, na linha B foram adicionadas 100 µL dos extratos para em seguida efetuar uma diluição seriada nos poços consecutivos, retirando-se 100 µL do poço de maior concentração para o poço seguinte. Os 100 µL finais foram desprezados. A partir das suspensões padrões de cada espécie de microrganismo foram pipetados 100 µL dessa suspensão em cada poço. As primeiras colunas correspondem ao controle positivo (gluconato de clorexidina 0,12% para bactéria e nistatina 100.000 UI/mL para a levedura) e ao controle do solvente (etanol 40%) para verificar se o etanol seria capaz de inibir o crescimento das células viáveis. As placas foram incubadas por 24-48 horas a cerca de 36°C em atmosfera aeróbia, microaerofilia ou anaeróbia dependendo da exigência do microrganismo (CLSI, 2002; CLSI, 2005). Para a leitura dos resultados da CIM, foram adicionados 20 µL da solução de cloreto de resazurina 0,01% (Sigma AldrichChemistry®). As placas foram re-incubadas por um período de 40 minutos para a levedura, e por duas horas para bactérias. A CIM foi definida como a menor concentração da amostra, capaz de impedir o aparecimento de coloração rósea, conferida ao meio quando as células apresentam atividade respiratória²³.

Resultados e Discussão

Os constituintes químicos encontrados na triagem *fitoquímica de U. cearensis* estão descritos na Tabela 1. Pode-se observar que a espécie vegetal apresenta diversas classes de metabólitos como: cumarinas, flavonóides, terpenos e ácidos fenólicos

A eficácia do uso popular de *Amburana cearensis* é comprovada por estudos farmacológicos a partir do extrato hidroalcoólico da casca do caule e de alguns de seus constituintes químicos, os quais demonstraram atividades analgésica, broncodilatadora, antiespasmódica e anti-inflamatória, além de não apresentarem toxicidade em doses usuais²⁵. As análises químicas e farmacológicas desta planta demonstram que a casca do caule é basicamente constituída de cumarina, responsável pelo seu odor peculiar, dos flavonoides isocampferídio, campferol e afrormosina, pelos glicosídeos fenólicos amburosídeos A e B, dos ácidos fenólicos ácido vanílico e ácido protocatequico, além de quantidades abundantes de 19 sacarose. Estudos recentes revelaram que a cumarina, o isocampferídio e o amburosídeo A possuem efeitos anti-inflamatório, antioxidante e broncodilatador, sendo indicados como princípios ativos da planta. As cumarinas presente no caule da planta são provavelmente o responsável,

juntamente com outras substâncias, pela ação benéfica das infusões das cascas e pela atividade broncodilatadora determinada experimentalmente, validando cientificamente o uso popular e o tratamento caseiro, especialmente em crianças e idosos²⁶.

Tabela 1 - Classes de metabólitos secundários presentes no extrato obtido a partir da *Amburana cearensis*.

Classes de metabólitos secundários	Positivo	Negativo
Alcalóides		X
Triterpenóides	X	
Esteróides	X	
Saponinas		X
Cumarinas	X	
Compostos Fenólicos	X	
Taninos	X	
Flavonóides	X	
Antraquinonas	X	
Antocianidinas	X	
Chalconas	X	
Leucoantocianidina	X	
Catequinas		X
Flavonas	X	

Análise toxicológica

Um dos métodos alternativos amplamente utilizados em triagem de substâncias de origem vegetal é o método que utiliza o microcrustáceo *Artemia salina*. A *Artemia salina* é um microcrustáceo da ordem Anostraca utilizado na alimentação de peixes e camarões por seu alto valor nutritivo. Dependendo da alimentação ingerida esse microcrustáceo pode adquirir diversas colorações, sua característica é de nadar com a parte ventral do corpo voltada para cima, ou seja, para a luz, e de estarem sempre em locomoção, por serem animais filtradores e dependem disso para alimentar-se e respirar²⁷.

A utilização da *A. salina* em estudos toxicológicos preliminares deve-se a simplicidade com que pode ser manuseado. A rapidez e o baixo custo favorecem a utilização em diversos estudos. Ensaio de letalidade são muito utilizados em análises preliminares de toxicidade geral podendo estimar a concentração média letal (CL₅₀)²⁸.

Segundo Meyer¹⁴ foi estabelecido uma relação entre o grau de toxicidade e a dose letal média, CL₅₀, de extratos de plantas sobre os microcrustáceos *Artemia Salina*, considerando que quando verificados valores acima de 1000 µg/mL e não havendo morte acima de 50%, estes, são considerados atóxicos.

Para o cálculo da DL₅₀ os resultados das amostras testadas foram submetidos ao teste estatístico Probits. No teste realizado, verificou-se que a utilização de concentração superior a 1000 µg/mL não acarretou a morte de náuplios. Dessa forma, verifica-se que a espécie *A. cearensis* não apresenta toxicidade. Os controles feitos com o solvente metanol não apresentaram influência sobre os resultados, pois nenhuma larva morreu; do mesmo modo que o controle realizado com água salgada.

Os dados encontrados nesse trabalho são corroborados por dados encontrados na literatura. Em um estudo toxicológico²⁹ preliminar do extrato seco padronizado de *A. cearensis* mostrou que a

administração diária deste produto, por via oral na dose de até 750 mg/kg, durante 30 dias, não induziu alterações nos parâmetros bioquímicos e hematológicos, em ratos, ratificando a relativa segurança da planta determinada anteriormente³⁰.

Atividade antioxidante

Os flavonóides compreendem um grupo de compostos fenólicos amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais, apresentando-se sob muitas variações como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas antocianinas, isoflavonas e chalconas. Suas principais fontes são: café, cebola, maçã, uva, cerveja, vinho tinto e especialmente chá, que contém sobretudo catequinas em sua composição^{31, 32}. Na classe dos não-flavonóides estão os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzóico. Sua atividade antioxidante está relacionada com a posição dos grupos hidroxilas e com a proximidade do grupo $-CO_2H$ em relação ao grupo fenil. Quanto mais próximo esse grupo estiver do grupo fenil, maior será a capacidade antioxidante do grupo hidroxila na posição meta³³.

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*³⁴. Na Tabela 2, está apresentada a quantificação dos flavonoides, fenóis e ácidos fenólicos do extrato metanólico.

Tabela 2 - Teores de flavonoides, fenóis e ácidos fenólicos totais do extrato metanólico de *Amburana cearensis* obtidos por maceração.

Flavonóides (%) ^{a,b}	Fenóis (%) ^{a,c}	Ácidos fenólicos (%) ^a
14,98 ± 0,02	48,09 ± 0,5	0,5 ± 0,04

^aResultados representam médias ± desvio padrão (n=3), ^bExpressos como equivalente de quercetina. ^c Expressos como equivalente de ácido gálico.

Em um estudo realizado em Barreiras - BA, Santos³⁵ verificaram que o extrato etanólico de *Amburana cearensis* apresentou alta concentração de fenóis totais e grande atividade antioxidante, 131,14 mg EAG/g e 93,13%, respectivamente; sugerindo assim que não apenas as sementes que são já bastante estudadas como também as folhas da *A. cearensis* podem ser uma alternativa aos antioxidantes sintéticos, na preparação de aditivos alimentar, bem como em preparações farmacêuticas e cosméticas.

Determinação da atividade antioxidante total pela captura do radical livre DPPH

A Figura 1 refere-se à curva de calibração empregada para o experimento de DPPH. Esta curva também foi avaliada quanto à linearidade. Com a finalidade de avaliar a capacidade dos constituintes do extrato metanólico de *A. cearensis* em capturar radicais livres (DPPH) foi feita análise de soluções deste extrato com DPPH. Os resultados foram expressos em percentagem de inibição de oxidação, ou seja, a porcentagem de atividade antioxidante é correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante.

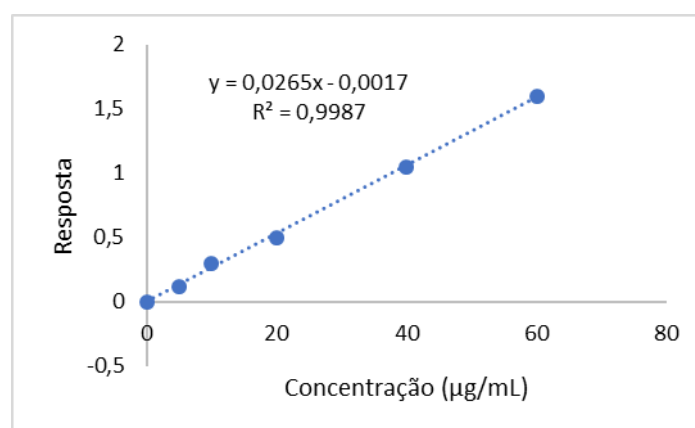


Figura 1: Curva padrão empregada no experimento de DPPH

De acordo a definição de concentração inibitória proposta por Dogan e Aydin³⁶, quanto menor a IC₅₀, maior será a atividade antioxidante e consequentemente menor será a quantidade de extrato necessário para inibir 50% dos radicais livres DPPH. Em vista disso, a concentração inibitória determinada nesse trabalho foi igual a 27,05 mg/mL. Todas as amostras apresentaram capacidade de consumo de DPPH, visto que as absorbâncias após reação de DPPH com as diferentes concentrações das amostras testadas foram significativamente menores em se comparando com as absorbâncias obtidas para o controle negativo (DPPH + solvente), o que pode demonstrar preliminarmente a atividade antioxidante para o extrato testado.

Geralmente esta atividade tem sido correlacionada com a presença de flavonoides, classe presente em todas as amostras analisadas, isto em diferentes teores de acordo com a época do ano. Rajani e Ashok³⁷ em estudo semelhante para caule e raiz de *B. variegata* também evidenciaram atividade antioxidante pelo mesmo método de DPPH e comparação com outros.

Atualmente o interesse no estudo dos compostos fenólicos tem aumentado muito, devido principalmente à habilidade antioxidante destas substâncias em sequestrar radicais livres, os quais são prejudiciais à saúde humana^{38, 39}. Alguns estudos in vitro demonstram que a atividade antioxidante dos flavonóides é maior que a das vitaminas E e C^{39,40}.

Diferentes autores vêm empregando o mesmo método para avaliação da capacidade antioxidante de espécies vegetais, tendo-se observado resultados semelhantes e significativos^{17, 41-45}.

Atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase

Na busca de novos produtos capazes de inibir a atividade de AChE, o extrato metanólico de *A. cearensis* mostrou percentual de inibição igual a 51%. Extratos cuja inibição enzimática apresente inibição maior ou igual a 50%, são candidatos a fracionamentos e isolamento dos princípios ativos capazes de inibir a enzima acetilcolinesterase⁴⁶.

Um estudo recente com plantas brasileiras⁴⁶ utilizou o ensaio bioautográfico de Rhee²⁰ e o ensaio de Ellmann em microplaca¹⁹, para identificar extratos que poderiam conter substâncias inibidoras da AChE. Foram estudados 58 extratos de 30 espécies de diversos gêneros vegetais, dos quais os autores consideraram os resultados de inibição maior ou igual a 50% como critério de seleção para o fracionamento químico. A partir do trabalho de triagem, *Paullinia cupana* (guaraná), *Amburana cearensis* e *Lippia sidoides* foram as espécies que demonstraram os melhores resultados, inibindo de 65-100% da atividade enzimática, em ambos os bioensaios. Tais resultados levaram ao fracionamento bioquímico dos extratos de *A. cearensis* e *L. sidoides* levou ao isolamento de 12 cumarinas⁴⁶, demonstrando a utilidade e praticidade deste tipo de ensaio para a bioprospecção de novos fármacos anticolinesterásicos.

Avaliação da atividade antimicrobiana -Concentração inibitória mínima (CIM)

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais prescritos com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos Maciel⁴⁷. O valor das plantas medicinais, aromáticas e condimentares é determinado pelos compostos químicos especiais, elaborados por elas e que são chamados princípios ativos⁴⁸. A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos da atividade antimicrobiana.

Tabela 3: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato metanólico da semente de *Amburana cearensis*.

Microrganismos	CIM (µg/mL)
<i>Streptococcus. mutans</i> (25175)	>1600
<i>Streptococcus oralis</i> (10557)	>1600
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	500
<i>Candida albicans</i> (10231)	250
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	>1600

Aligiannis⁴⁹ sugerem uma classificação de Concentração Inibitória Mínima: CIM até 500 µg/mL são inibidores potentes; CIM entre 600 e 1500 µg/mL são inibidores moderados; CIM acima de 1600 µg/mL são inibidores fracos. Por isso, pode-se considerar que frente à *C. albicans*, a *A. cearensis* apresentou-se como um forte inibidor de crescimento, pois o valor da CIM foi igual a 250 µg/ mL. Além disso, a espécie apresenta-se como um inibidor moderado para cepas de *Staphylococcus aureus*. Tais resultados mostraram-se diferentes de um estudo realizado no Piauí⁵⁰. Nesse estudo, os autores avaliaram o extrato aquoso das sementes de *Amburana cearensis* frente a cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25923) e os resultados demonstraram que não houve inibição do crescimento bacteriano nas concentrações e metodologia empregada.

De fato, é importante destacar que a atividade antimicrobiana pode estar relacionada não só com as características da planta estudada, como também pelo fato de que diferentes espécies apresentam diferentes princípios ativos, pelas características das cepas testadas e da metodologia analítica empregada^{51, 52}.

Considerações Finais

Foram detectados diversos metabólitos no extrato de *Amburana cearensis* responsáveis por conferir proteção para as plantas além de possuírem atividade biológica, oferecendo benefícios também à saúde humana. Ademais, foi possível observar atividade antioxidante para o extrato estudado. Além disso, a presença de não toxicidade da espécie é fundamental para o desenvolvimento, *a posteriori*, de formas farmacêuticas para o cuidado da pele.

De acordo com os dados apresentados, o extrato metanólico da semente de *A. cearensis* mostrasse promissor para o tratamentos de doença de Alzheimer, uma vez que a concentração de inibição de acetil colinesterase apresenta-se expressiva. Da mesma forma, o extrato metanólico, demonstrasse promissor como potencial medicamento no tratamento frente a *C. albicans* e *S. aureus*.

Estes resultados reforçam a necessidade da continuidade do estudo de forma a realizar a partição do extrato e a purificação das frações para isolar a(s) molécula(s) responsável(eis) pelo(s) resultado(s) observado(s).

Referências

- [1] CANUTO, K.M 2007. Aspectos químicos do estudo interdisciplinar (QuímicaAgronomia-Farmacologia) de *Amburana cearensis* A.C. Smith. Fortaleza. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Química, UFC.
- [2] LEITE, E. J., Stage-of-knowledge on *Amburana cearensis* for genetic conservation in Brazil. Journal for Nature Conservation, v. 13, p. 49-65, 2005.
- [3] ALMEIDA, J. R. G. S. et al. *Amburana cearensis* – uma revisão química e farmacológica. Scientia Plena, v. 6, n. 11, 2010.
- [4] CUNHA, M.C.J.; FERREIRA, R.A. Aspectos morfológicos da semente e do desenvolvimento da planta jovem de *Amburana cearensis* (Arr. Cam.) A.C.Smith Cumaru - Leguminosae Papilionoideae. Revista Brasileira de Sementes, v. 25, n. 2, p. 89-96, 2003.
- [5] MATOS, F.J.A 1994. Farmácias Vivas: Sistema de Utilização de Plantas Medicinais Projetado para Pequena Comunidades, 2ª ed. UFC, Fortaleza.
- [6] LEAL, L. K. A. M. et al. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. Life Sciences, v. 79, p. 98-104, 2006.
- [7] LEAL, L. K. A. M. et al. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. Pharmaceutical Biology, v. 41, p. 308-314, 2003.

- [8] LOPES, J. C.; SOARES, A. da S. Estudo da Maturação de Sementes de Carvalho Vermelho (*Miconia cinnamomifolia* (Dc.) Naud.). *Ciência Agrotécnica*, Lavras, v. 30, n. 4, p. 623-628, jul./ago., 2006.
- [9] MARINHO, M.G.V. Levantamento de plantas medicinais em duas comunidades do Sertão Paraibano, Nordeste do Brasil, com ênfase na atividade Imunológica de *Amburana cearensis* (F. All.) A. C. Smith (Fabaceae). 2006.171p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Farmacologia), Departamento de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa
- [10] ARARUNA, S.M.; LEAL, L.K.A.M.; CANUTO, K.M. et al. Desenvolvimento e validação de método (CLAE-DAD) para o controle de qualidade das cápsulas de *Amburana cearensis* (cumaru): dosagem de amburosídio A (AMB) e cumarina (CM). 1º Workshop Brasileiro de Tecnologia Farmacêutica e Inovação-Novas tecnologias e os desafios da parceria Universidade/Empresa, Aracaju. 2011.
- [11] ARARUNA, S.M.; SILVA, A.H.; CANUTO, K.M. et al. Influence of process conditions on the physicochemical characteristics of cumaru (*Amburana cearensis*) powder produced by spray drying. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v. 23, n. 1, 2013.
- [12] COSTA, A.F. Farmacognosia. 3. ed . Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, v. 3, 2001.
- [13] PAULA, J. R.; BARA, M.T.F. Farmacognosia 2. Universidade Federal de Goiás Faculdade de Farmácia: Apostila de aulas práticas. 2007.
- [14] MEYER, B. N., FERRIGNI, N. R., PUTNAN, J. E., JACOBSEN, L. B., NICHOLS, D. E., Mcl. AUGHLIN, J. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, v. 45, n.1, p. 31-34, 1982.
- [15] BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm-Wiss. Technol.*, London, v.28, p.25-30, 1995.
- [16] MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem.*, Washington, v.85, p.231-237, 2004.
- [17] ROESLER, R, et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, vol.27, n.1, pp. 53-60, 2007.
- [18] DEWANTO V, WU X, ADOM KK, LIU RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2002;50(10):3010-4.
- [19] ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95, 1961.
- [20] RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography* v, 915, p. 217–223, 2001.
- [21] HASNAT, M. A.; PERVIN, M.; LIM, B. O. Acetylcholinesterase Inhibition and in Vitro and in Vivo Antioxidant Activities of *Ganoderma lucidum* Grown on Germinated Brown Rice. *Molecules*, v. 18, p. 6663-6678, 2013.
- [22] MELLO-PEIXOTO, E.C. T. de, et al., Extrato hidroalcoólico de *Punica granatum* Linn. sobre *Staphylococcus* spp. isolado de leite bovino, *Cadernos de Agroecologia*, v. 9, n.1, 2014.
- [23] CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M7-A6. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. 6.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2005. 81 p.
- [24] CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A2. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade de leveduras à terapia antifúngica. 2.ed. Pennsylvania: NCCLS; 2002. 51p.

- [25] SILVEIRA, E. R. et al. Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico: com dados de RMN 13C. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 2005. 216p.
- [26] CARTAXO, S. L. Diversidade e uso de plantas medicinais em uma área de Caatinga em Aiuaba-CE, Brasil. 2009. 103 f. Dissertação (Mestrado em Bioprospecção Molecular) - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Regional do Cariri, Crato, 2009
- [27] ASEM, A. Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. *Journal of Biological Research-Thessaloniki.*, 2008. p. 113 – 114.
- [28] LUNA, J.S. et al. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology.* 2005. p. 199 - 206.
- [29] SÁ-LEITÃO, K. S. Avaliação toxicológica pré-clínica do extrato seco padronizado (HPLC-PDA) de *Amburana cearensis* – Cumaru. Monografia - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.
- [30] LEAL, L. K. A. M. et al. Toxicological study of the hydroalcoholic extract from *Amburana cearensis* in rats. *Pharmaceutical Biology*, v. 41, p. 308-314, 2003.
- [31] GRAHAM, H. D. Stabilization of the Prussian blue color in the determination of polyphenols. *J. Agric. Food Chem.*, Columbus, v. 40, n. 5, p. 801-805, 1992
- [32] VAN ACQUIRE, S. A. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.*, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996
- [33] HRAZDINA, G.; BORZEL, A. J.; ROBINSON, W. B. Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5- diglucosides. *Am. J. Enol. Vitic.*, v. 21, n. 4, p. 201-204, 1970.
- [34] CHAURET, D.C., BERNARD, C.B., ARNASON, J.T., DURST, T., KRISHNAMURTY, H. G., SANCHEZ-VINDAS, P., MORENO, N., ROMAN, L.S., POVEDA, L. Insecticidal Neolignans from *Piper decurrens*, *Journal of Natural Products*, 1996 59 (2), 152-155, DOI: 10.1021/np960036y
- [35] SANTOS, L.O., REIS, M.R, OGAVA, L.E., LEÃO, K.V., MACHADO, L.L., LIRA, S.P. Avaliação da Atividade Antioxidante dos Compostos Fenólicos Presentes na *Amburana cearensis*. *Orbital: The Electronic Journal of Chemistry*, v. 1, p. 44-49, 2016
- [36] DOGAN, H. H.; AYDIN, S. Determination of antimicrobial effect, antioxidant activity and phenolic contents of desert truffle in Turkey. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, v. 10, n. 4, p. 52-58, 2013.
- [37] Rajani GP, Ashok P. In vitro antioxidant and antihyperlipidemic activities of *Bauhinia variegata* Linn. *Indian J Pharmacol.*, 41(5):227–232, 2009.
- [38] ALVES CQ, Brandão HN, David JM, David JP, Lima LS. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. *Diálogos e ciência – Revista da rede ensino FTC*, 5(12): 7- 8, 2007.
- [39] NEVES LC, ALENCAR SM, CARPES ST. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Braz. J. Food Technol.*, 2(15), 2008.
- [40] RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, New York, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996
- [41] LIMA, A.R. et al. In vitro evaluation of the antioxidant activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *bardana*. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 16(4): 531-536, 2006.
- [42] SOUSA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDAO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim. Nova*, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007

- [43] IHA, S.M. *et al.* Estudo fitoquímico de goiaba (*Psidium guajava* L.) com potencial antioxidante para o desenvolvimento de formulação fitocosmética. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18(3): 387-393, 2008.
- [44] AYRES, M.C.C. *et al.* Constituintes químicos e atividade antioxidante de extratos as folhas de *Terminalia fagifolia* Mart. et Zucc. *Química Nova*, 33(1): 141-145, 2010.
- [45] NUNES, X.P. *et al.* Constituintes químicos, avaliação das atividades citotóxica e antioxidante de *Mimosa paraibana* Barneby (Mimosaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, 18: 718-723, 2008.
- [46] TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. *Química Nova*, v.26, n.3, p.301-4, 2003.
- [47] MACIEL, M. A. M. *et al.*; Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v.25, n.3, p.429 – 438, 2002
- [48] JUNIOR, C. C.; SCHEFFER, M. C.; MING, L. C. Cultivo Agroecológico de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. Curitiba, 2006
- [49] ALIGIANNIS, N, *et al.*, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 40, p. 4168-4170, 2001
- [50] LIMA, L.R.; CAVALCANTE, R.R.L.; MARTINS, M.C.C.; PARENTE, D.M.; CAVALCANTE, A.A.M.C. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro) *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.15, n.3, p.415-422, 2013.
- [51] CATÃO, R.M.R. Atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre bactérias e fungos leveduriformes. 126p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Farmacologia) - Departamento de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.
- [52] SANTOS, V. L. *et al.*; Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). *Rev. bras. plantas med.*, v.13, n.1, Botucatu, 2011.