

Caracterização química e avaliação da atividade antioxidante, antifúngica e moduladora do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* (BERTH) BRENAN

Chemical characterization and antioxidant, antifungal and modulating activity of the alcohol extract from *Anadenanthera macrocarpa* (Berth) Brenan

Caracterización química y actividad antioxidante, antifúngica y moduladora del extracto alcohólico de *Anadenanthera macrocarpa* (Berth) Brenan

Vivianne Inácio Leite,^I Cícera Datiane de Moraes Oliveira,^{II} Jakson Gomes Figueredo,^{III} Pablo Antônio Maia de Farias,^{III} Saulo Relison,^{II} Edinaldo Fagner Ferreira Matias,^I Pedro Everson Alexandre de Aquino,^I Henrique Douglas Melo Coutinho,^{II} João Victor de Alencar Ferreira,^{II} Luciene Ferreira de Lima,^{II} Fernando Gomes Figueredo^{I,III}

^I Faculdade Leão Sampaio-FLS, CE, Brasil.

^{II} Universidade Regional do Cariri- URCA, CE, Brasil.

^{III} Faculdade de Medicina Estácio Juazeiro do Norte- FMJ, CE, Brasil.

RESUMO

Introdução: o estudo com plantas medicinais tem sido usado para assistência médica e farmacêutica, mais principalmente utilizadas como forma alternativa ou complementar ao tratamento terapêutico.

Objetivo: este trabalho teve como objetivo elucidar os principais metabólitos secundários e atividade antioxidante, bem como avaliar a atividade antifúngica e moduladora do extrato etanólico de folhas de *Anadenanthera macrocarpa* frente às linhagens do gênero *Candida*.

Métodos: na elucidação dos constituintes químicos foi utilizado o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, sendo que a verificação da atividade antioxidante foi realizada por método de FRAP. A atividade antifúngica do extrato

foi mensurada através da determinação da Concentração Inibitória Mínima, sendo a modulação realizada por ensaio de microdiluição, realizado para verificar as interações entre o produto natural e o antifúngico utilizando a amostra em uma concentração subinibitória.

Resultados: demonstrou-se pela análise do Cromatografia Líquida de Alta Eficiência a presença de metabólitos secundários, como a: quercitrina, quercetina, isoquercitrina, apigenina, ácido gálico e ácido caféico. No ensaio FRAP, a redução ocorreu em uma equivalência de 2,72 mg de FeSO₄ por g de extrato. Na avaliação da concentração inibitória mínima foram obtidos resultados $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ e na avaliação dos ensaios para efeito modulador, o extrato etanólico não potencializou o efeito do antifúngico, não havendo nem sinergismo nem antagonismo.

Conclusão: através dos resultados podemos concluir que o presente extrato pode ser uma alternativa terapêutica uma vez que possui constituintes químicos com reconhecidas atividades biológicas e antioxidantes com baixo potencial tóxico.

Palavras-chave: fungos, *Anadenanthera macrocarpa*, antioxidantes.

ABSTRACT

Introduction: the study of medicinal plants has been used for medical and pharmaceutical services, but mainly used as an alternative or in addition to therapeutic treatment.

Objective: this study aimed to elucidate the main secondary metabolites and antioxidant activity and to evaluate the antifungal and modulating activity of the ethanol extract from *Anadenanthera macrocarpa* leaves against genus *Candida* strains.

Methods: the chemical component clearance was made by using high-performance liquid chromatography, and checking of the antioxidant activity was performed by FRAP method. The antifungal activity of the extract was measured by determining the minimum inhibitory concentration, the modulation performed by microdilution test, carried out to verify the interactions between the natural product and the antifungal product using the sample at a subinhibitory concentration.

Results: high-performance liquid chromatography showed the presence of secondary metabolites, such as: quercitrin, quercetin, isoquercitrin, apigenin, caffeic acid and gallic acid. In the FRAP assay, the reduction was 2,72 mg per equivalence grams of FeSO₄ extract. The results of the assessment of minimum inhibitory concentration were $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ and in the evaluation of tests for modulating effect, the extract ethanol did not potentiate the antifungal effect, with neither synergism nor antagonism.

Conclusions: from the results we can conclude that this extract can be an alternative since it has chemical constituents with known biological activities and antioxidants with low toxic potential.

Keywords: fungi, *Anadenanthera macrocarpa*, antioxidant

RESUMEN

Introducción: el estudio de las plantas medicinales se han utilizado para la asistencia médica y farmacéutica, la mayoría utiliza principalmente como una alternativa o complemento al tratamiento terapéutico.

Objetivo: el objetivo del estudio para dilucidar los principales metabolitos secundarios y la actividad antioxidante, así como evaluar la actividad antifúngica modulando el extracto de etanol de *Anadenanthera macrocarpa* frente las cepas del género *Candida*.

Métodos: el esclarecimiento de los componentes químicos se utilizó cromatografía líquida de alta eficiencia y la comprobación de la actividad antioxidante se realizó por el método FRAP. La actividad antifúngica del extracto se midió mediante la determinación de la concentración mínima inhibitoria, y la modulación realizó por la prueba de microdilución, llevado a cabo para comprobar las interacciones entre el producto natural y el antifúngico utilizando la muestra a una concentración subinibitória.

Resultados: se demostró mediante análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia, de la presencia de metabolitos secundarios, tales como: quercitrina, quercetina, isoquercitrina, apigenina, ácido gálico y ácido cafeico. El ensayo FRAP, la reducción fue de 2,72 mg por equivalencia g de FeSO₄ extrato. Na evaluación de la concentración inhibitoria mínima se obtuvieron resultados $\geq 512 \mu\text{g/mL}$ y la evaluación de las pruebas para el efecto de modulación, el extracto etanol no potenció el efecto de antifúngico, ni con sinergismo o antagonismo.

Conclusión: de los resultados se puede concluir que el extracto puede ser una terapia alternativa, ya que tiene componentes químicos con actividades biológicas reconocidas y antioxidantes con bajo potencial tóxico.

Palabras clave: hongos, *Anadenanthera macrocarpa*, antioxidantes.

INTRODUÇÃO

A origem do conhecimento do homem sobre as propriedades medicinais das plantas confunde-se com sua própria história. Há milênios os vegetais têm sido utilizados pelos seres humanos no tratamento de doenças,¹ e continuam tendo o seu valor não apenas nas comunidades tradicionais como também são objetos de estudos interdisciplinares na busca de novos fármacos.²

Muitas plantas medicinais apresentam atividade biológica devidos constituintes presentes em sua composição. A realização de estudos sobre a composição química com espécies vegetais de interesse popular, identificando grupos de metabólitos secundários relevantes, contribuem na elucidação de mecanismos de diversos estudos que visam comprovar essas atividades.^{3,4} Além disso, esses compostos estão relacionados com a ação antioxidante de diversos fitoterápicos, ação esta que pode contribuir de forma significativa na potencialização de seus efeitos biológicos.⁵

Diversas espécies de plantas apresentam atividade antifúngica um exemplo é o extrato da malva, da aroeira-do-sertão e da goiabeira.⁶ A pesquisa pela atividade antifúngica tem por função a determinação do espectro antifúngico de um novo fármaco ou também na investigação da resistência ou sensibilidade de um fungo a um ou vários fármacos.⁷

O gênero *Candida* apresenta-se como principal responsável por infecções que ocorrem em ambiente hospitalar, principalmente em setores críticos, como as unidades de terapia intensiva passando a ter importância como agentes potencialmente patogênicos responsáveis por altos índices de mortalidade.⁸ Essas infecções têm conduzido a procura contínua por novos fármacos com efeito biocida em potencial e que não ofereçam efeitos colaterais. O que torna um grande desafio já que os fungos possuem semelhanças com nossas células.⁹

Dentre as várias espécies pertencentes a subfamília Mimosoideae destaca-se a *Anadenanthera macrocarpa*, popularmente conhecida como angico, sendo muito usada na medicina popular no combate de diversas doenças desde infecções a processos inflamatórios.¹⁰ Dentre as atividades biológicas comprovadas estão a antimicrobiana,¹¹ propriedades antinociceptiva, anti-inflamatória e ainda atividade antioxidante.¹²

Portanto, esse estudo teve como objetivo identificar os constituintes químicos e analisar o potencial redutor de ferro do extrato etanólico de *A. macrocarpa*, bem como avaliar atividade antifúngica e moduladora deste produto natural frente a espécies de fungos do gênero *Candida*. Essas pesquisas podem estimular o desenvolvimento de novas drogas com qualidade e segurança para contribuição importante no campo da saúde em nível mundial, que sejam substâncias menos tóxicas aos seres humanos.¹³

MÉTODOS

SELEÇÃO, COLETA DO MATERIAL BOTÂNICO E LOCAL DE REALIZAÇÃO DA PESQUISA

Folhas de *Anadenanthera macrocarpa* foram coletadas em uma área de Caatinga, no sítio Canafisula no município de Penaforte, Ceará, Brasil, localizado nas coordenadas: x – 492 184,12 e y – 35505,56. O material vegetal foi submetido a identificação e uma exsicata do espécime foi depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade e Lima, sob o número 6490, no município de Crato-CE.

OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO

A obtenção do extrato etanólico e frações foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Para preparação do extrato etanólico, foram utilizadas folhas frescas de *Anadenanthera macrocarpa* as quais tiveram a superfície de contato aumentada, onde em um recipiente permaneceu submerso em etanol puro por 72 h, sendo após esse período, filtrado e concentrado em hidroddestilador rotativo a vácuo.¹⁴

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS POR HPLC

Análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas sob condições de gradiente usando coluna C18 (4,6 x 150 mm) embalaro de 5 µm; a fase móvel foi a água que contém 1 % de ácido fórmico (A) e acetonitrila (B), e a composição de partículas de diâmetro o gradiente de composição foi: 13 % de B until 10 min e mudou-se para obter 20 %, 30 %, 50 %, 60 %, 70 %, 20 % e 10 % B no min 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80, respectivamente, seguindo o método descrito por Silva et al¹⁵ com pequenas modificações.

O extrato etanólico de angico e fase móvel foram filtradas através do filtro de membrana de 0,45 µm (*Millipore*) e então desgaseificados por usar antes do banho ultra-sônico, o extrato foi analisado em uma concentração de 20 mg/mL. A taxa de fluxo foi 0,7 mL/min, injeção volume 50 µL e o comprimento de onda foram 270 para ácido gálico; 280 nm para catequina; 327 nm para clorogênico e os ácidos cafeico; e 365 nm para quercitrina, isoquercitrina, quercetina, luteolina, apigenina e rutina. Todas as amostras e fase móvel foram filtradas através do filtro de membrana de 0,45 µm (*Millipore*) e então desgaseificados por banho ultra-sônico antes de utilizar.

As soluções de referências de padrões foram preparadas em fase móvel para HPLC em um intervalo de concentração de 0,030-0,250 mg/mL para a catequina, quercitrina, quercetina, isoquercitrina, luteolina, apigenina e rutina; e 0,020-0,300 mg/mL para o gaulês, caféico e ácidos clorogênicos. Picos de cromatografia foram confirmados, comparando o seu tempo de retenção dos padrões de referência e por espectros de pai (200 a 500 nm). Curva de calibração para catequina: $Y=13\ 057\ x + 1261,9$ ($r=0,9997$); o ácido clorogênico: $Y=11\ 952\ x + 1\ 283,9$ ($r=0,9999$); ácido caféico: $Y=11\ 856\ x + 1197,6$ ($r=0,9998$); ácido gálico: $Y=12\ 518\ x + 1163,7$ ($r=0,9999$); rutina: $Y=13\ 260\ x + 12459$ ($r=0,9996$); isoquercitrina: $Y=11\ 754\ x + 1\ 296,4$ ($r=0,9995$); quercitrina: $Y=12\ 309\ x +$

$1\ 348,9$ ($r=0,9993$); luteolina: $Y=12\ 725\ x + 1187,5$ ($r=0,9998$); apigenina: $Y=11\ 856\ x + 1\ 189,3$ ($r=0,9998$) e quercetina: $Y=13\ 084\ x + 132,1$ ($r=0,9999$). Todas as operações de cromatografia foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram calculados com base no desvio-padrão de respostas e na inclinação usando três curvas analíticas independentes. LOD e LOQ foram calculados como $3,3$ e $10\ \sigma/S$, respectivamente, onde σ é o desvio-padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração.¹⁶

ENSAIO FRAP

Para realização do ensaio de ferric reducing ability of plasma (FRAP), utilizou-se o método de Benzie e Strain.¹⁷ As soluções estoque incluem um tampão acetato 300 mM de pH 3,6, TPTZ (2,4,6-tripiridyls-Triazina) 10 mM em 40 mM HCl e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM na proporção de 10:01:01 no momento da utilização.

As amostras (0,15 mL) foram misturadas para reagir com 2,85 mL de solução de FRAP durante 30 minutos no escuro em temperatura ambiente, após isso, as amostras foram mensuradas em espectrofotômetro com comprimento de onda 593 nm. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de FeSO_4/g de amostras, interpolando este valor na curva de calibração construída com os padrões de FeSO_4 , em diferentes concentrações (125 a 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

PREPARO DA SOLUÇÃO INICIAL E DE TESTE

O preparo da solução inicial das amostras foi efetuado pesando-se 10 mg do extrato e diluindo-o em 1 mL de dimetilsulfóxido (*DMSO-Merck*, Darmstadt, Alemanha), para obter uma concentração inicial. A partir desta concentração, foi feita uma diluição em água destilada estéril para atingir a concentração de 1 024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (solução teste).

LINHAGENS UTILIZADAS

As linhagens ensaiadas nos testes de sensibilidade ao produto natural foram leveduras (isolados clínicos) de *Candida albicans* 62, *Candida krusei* 01 e *Candida tropicalis* 18 (CA LM 62, CK LMBM 01, e CT LM 18) obtidas do Laboratório de Micologia (LM) da Universidade Federal da Paraíba-UFPB e do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM) da Universidade Regional do Cariri-URCA.

DROGAS E REAGENTES

Etanol absoluto (álcool etílico; PA; *MMERCK*) foi utilizado como solvente para obtenção do extrato e o dimetilsulfóxido (*Synth*; P.A.-A.C.S.-DMSO) foi usado na primeira diluição do extrato. Fluconazol (150 mg c/ 2 Cápsulas-*Medley-Genérico*) foi a droga de referência no teste de modulação dos fármacos comerciais.

MEIOS DE CULTURA

As leveduras foram inicialmente cultivadas em meio sólido *Agar Sabouraud Dextrose* (ASD) e depois transferidas para tubos de ensaio contendo 5 mL de solução salina estéril. A concentração dos inóculos foi padronizada, comparando-se a turbidez dos tubos com o padrão 0,5 da escala de nefelométrica de McFarland. Esse procedimento forneceu uma suspensão padrão de levedura contendo 1×10^5 células por mL.¹⁸ Nos testes de microdiluição o meio utilizado foi o *Caldo Sabouraud Dextrose* (CSD).

TESTE DE CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

Foram preparados tubos eppendorf® para distribuição na placa de microdiluição, contendo cada um deles com 1,5 mL de solução contendo 1 350 µL de CSD e 150 µL da suspensão fúngica. A placa foi preenchida adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço (placa de 96 poços) e em seguida procedendo-se a microdiluição seriada com uma solução de 100 µL do produto natural (extrato), variando nas concentrações de 512 a 8 µg/mL, ficando o último poço para controle de crescimento. As placas foram levadas à incubadora por 24 horas a 37 °C.¹⁸ A revelação da CIM foi feita observando-se a turbidez dos poços. A CIM foi definida como a menor concentração na qual nenhum crescimento foi observado.

TESTE DE MODULAÇÃO DA AÇÃO DE ANTIFÚNGICOS

Para verificar se o extrato exerce efeito modulador da ação dos antifúngicos frente às leveduras testadas, utilizou-se o método proposto por Coutinho et al,¹⁹ onde a solução do extrato foi testada em concentração sub-inibitória (CIM/8). Foram preparados tubos eppendorf® contendo cada um deles 1,5 mL de solução contendo meio de cultura CSD, 150 µL da suspensão fúngica e o produto natural na concentração CIM/8. Para o controle foram preparados tubos eppendorf® com 1,5 mL de solução contendo 1 350 µL de CSD e 150 µL de suspensão dos micro-organismos. A placa foi preenchida adicionando-se 100 µL desta solução em cada poço. Em seguida, 100 µL de droga (antifúngico) foram misturados ao primeiro poço, procedendo-se a microdiluição em série, até a penúltima cavidade. As concentrações de antifúngicos variavam a partir de 1 024 a 1 µg/mL.

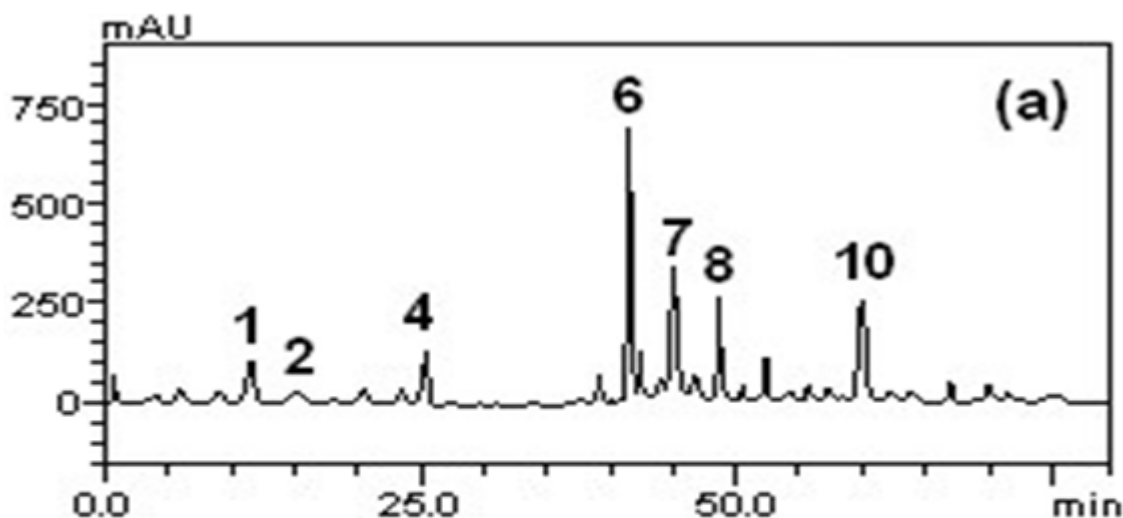
ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as determinações foram realizadas em triplicata e os resultados de testes normalizados através do cálculo das médias geométricas, erro padrão da média geométrica e desvio padrão geométricos. Os resultados foram comparados através de análise de variância (ANOVA) e a comparação entre as médias geométricas foi realizada de acordo com teste de *Bonferroni* sendo considerado significativo quando $p < 0,05$.²⁰

RESULTADOS

Através da análise do HPLC de frações do extrato etanólico do angico o qual revelou a presença de ácido gálico (tempo de retenção - tR=11,85 min; 1 de pico), catequina (tR =15,07 min; 2 de pico), ácido clorogênico (tR=min 21,98; 3 de pico), ácido caféico (tR= 25,03 min; 4 de pico), rutina (tR=min 37,69; 5 de pico), quercitrina (tR=41,27 min; 6 de pico), isoquercitrina (tR=44,81 min; 7 de pico), quercetina (tR=min 48,19; 8 de pico), luteolina (tR=51,46 min; 9 de pico) e

apigenina (tR=59,92 min; 10 de pico). Evidenciando assim que o componente majoritário foi a quercitrina (figura 1).



Ácido gálico (pico 1), catequina (máximo 2), ácido caféico (máximo 4), quercitrina (6 de pico), isoquercitrina (7 de pico), quercetina (8 de pico) e apigenina (máximo 10).

Fig. 1- Representação do perfil de cromatografia líquida de alta performance do angico e extrato etanólico (a).

A análise cromatográfica revelada pelo HPLC-DAD mostrou que a composição do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* apresenta os seguintes flavonóides: quercitrina, isoquercitrina, quercetina e apigenina. E também compostos fenólicos: ácido gálico e ácido caféico. Sendo os flavonóides os compostos detectados em maior quantificação (tabela).

Tabela. Composição do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa*

Componentes	<i>A. macrocarpa</i> (mg/g)	LOD µg/mL	LOQ µg/mL
Ácido gálico	4,11±0,02 a	0,015	0,049
Ácido clorogênico	-	0,008	0,025
Ácido caféico	4,35±0,01 a	0,011	0,037
Rutina	-	0,023	0,076
Catequina	0,87±0,01 b	0,028	0,093
Quercitrina	25,86±0,03 c	0,017	0,058
Isoquercitrina	13,07±0,01 d	0,009	0,028
Quercetina	10,54±0,02 e	0,034	0,113
Luteolina	-	0,026	0,085
Apigenina	10,72±0,01 e	0,011	0,036

Os resultados são expressos como média ±desvios-padrão (SD) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes diferem pelo teste de Tukey a 0,05<p. LOD: limite de detecção e LOQ: limite de quantificação.

A capacidade do extrato em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} , foi de uma equivalência 2,72 mg de $FeSO_4$ por g de extrato.

O extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* foi testado frente a três linhagens do gênero *Candida*: *Candida albicans* (CA LM 62), *Candida krusei* (CK LMBM 01) e *Candida tropicalis* (CT LM 18) demonstrando que não houve atividade clinicamente relevante para tais leveduras, com CIM de $\geq 512 \mu\text{g/mL}$. Na avaliação dos ensaios para efeito modulador da atividade antifúngica, foi verificado que a CIM do Fluconazol na presença do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* não ocorreu nem sinergismo nem antagonismo. Sendo assim, não houve interferência do produto natural sobre a ação do fármaco (figura 2).

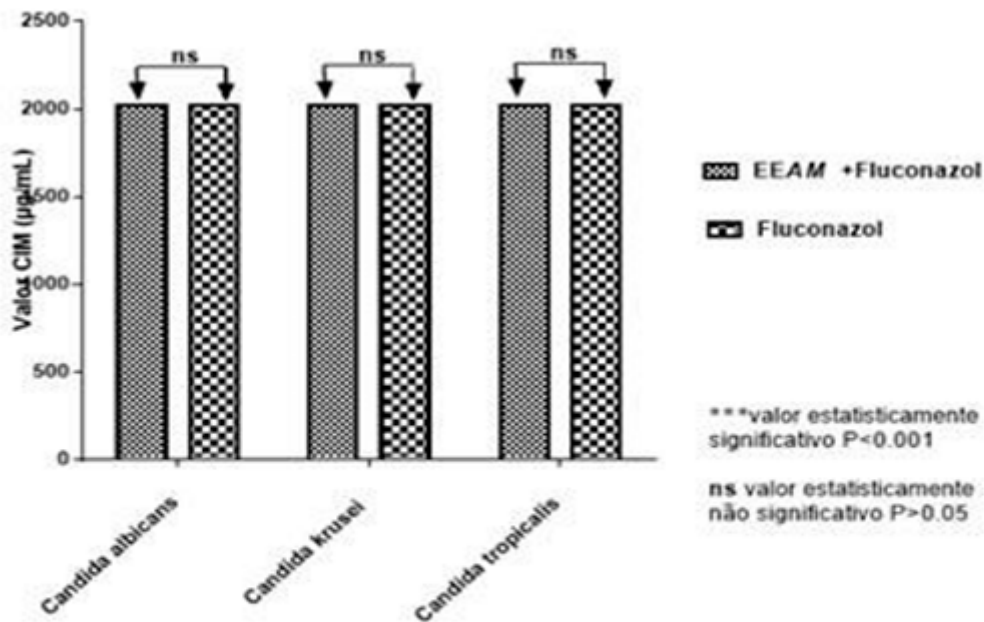


Fig. 2 Modulação da ação antifúngica do Fluconazol frente às linhagens de *Candida albicans* (CA LM 62), *Candida krusei* (CK LMBM 01) e *Candida tropicalis* (CT LM 18), na presença e na ausência do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* (EEAM).

DISCURSÃO

Dados da literatura mostram que o componente majoritário, a quercitrina apresenta atividade antimicrobiana,²¹ antioxidante,²² atividade hipotensiva,²³ sedativa em ratos,²⁴ antiinflamatória,²⁵ atividade esta que Comalada et al,²⁶ afirma ser devido a clivagem do glicosídeo e liberação de sua genina, a quercetina. A quercitrina, ainda apresenta atividade antiviral contra a herpes²⁷ mostrando uma grande atividade analgésica frente ao teste de ácido acético, sendo esta ação dose-dependente.²⁸

O composto quercetina apresenta substâncias sugeridas como antioxidante, por apresentarem propriedade seqüestradora de radicais livres.²⁹ No estudo realizado por Veras et al,³⁰ a quercetina, não demonstrou atividade antifúngica quando testada contra as linhagens padrão de *C. albicans* ATCC 40227 e *C. krusei* ATCC 6538.

Ao passo que a isoquercitrina como a maioria dos flavonóides, também demonstrou atividade antioxidante.³¹ Evidenciando também atividade antidiabética,³² atividade contra o protozoário *Entamoeba histolytica*³³ e ainda foi retratado sua atividade antinociceptiva frente aos testes de ácido acético e formalina.^{34,35}

A apigenina possui características anti-inflamatória, anticarcinogênica, antiviral, e antimutagênica.³⁶⁻³⁹ Enquanto os ácidos fenólicos caféico e clorogênico também apresentam potencial antioxidante conhecido.⁴⁰ Essa atividade ocorre em sistemas lipídicos e na inibição da peroxidação celular.⁴¹ E ainda, o ácido gálico mostra uma propriedade de indução de morte celular (apoptose) em células cancerosas com grande seletividade.^{42,43}

Segundo o estudo realizado por Figueredo et al,⁴⁴ foi avaliado a prospecção fitoquímica do extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* indicando a presença de compostos potencialmente bioativos, sendo estes: taninos pirogálicos, antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, catequinas, e flavononas. Muitos destes metabólitos secundários são responsáveis por atividades antimicrobianas. Os flavonóides por exemplo impedem o crescimento ou matam muitas cepas bacterianas, inibem enzimas específicas, sequestram radicais livres, estimulam alguns hormônios e neurotransmissores.⁴⁵

Ainda considerando as propriedades biológicas também pode ser atribuído atividades anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, antialérgica, anti-hepatotóxica, anti-ulcerosa, anti-neoplásica, anti-hipertensiva, anti-envelhecimento, antidiabética, inibição da agregação plaquetária e anticelulítica.⁴⁶⁻⁵¹ Devido a suas atividades já comprovadas, o uso de flavonoides na clínica é estimulado para o tratamento de diversas doenças.⁴⁵

Os radicais livres são responsáveis por muitos danos oxidativos irreversíveis que podem levar ao desenvolvimento de várias doenças com características degenerativas, por exemplo, a aterosclerose, Doença de Parkinson, Mal de Alzheimer, distúrbios cardiovasculares, câncer e diabetes.⁵²

A superprodução de espécies reativas ou um declínio das defesas antioxidantes naturais podem produzir o stress oxidativo celular, caracterizando o que ocorre nas doenças inflamatórias crônicas, tais como artrite e aterosclerose, além de desencadear diversas doenças associadas com o envelhecimento.^{53,54}

Dessa forma, muitos são os estudos que investem na descoberta de novas substâncias que apresentem atividades antioxidantes, protegendo o organismo dos radicais livres retardando e prevenindo o desenvolvimento dessas doenças.⁵⁵

Estudos têm demonstrado que polifenóis naturais como os identificados no presente estudo, apresentam ação na redução do câncer, além de que o consumo de alimentos fonte de substâncias fenólicas demonstrou redução do desenvolvimento de doenças cardiovasculares.⁵⁶

O teste antioxidante pelo método FRAP, um composto é considerado um antioxidante quando apresenta potencial capacidade de reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} .^{57,58} Neste ensaio, o extrato apresentou capacidade de redução de ferro. Este dado pode estar relacionado a sua constituição predominante de flavonoides, um polifenol que apresentam uma capacidade antioxidante comprovada sendo seu produto relativamente estável, devido à ressonância do anel aromático em sua estrutura.^{59,60} Logo, a atividade antioxidante de um composto pode estar relacionada à sua quantidade de compostos fenólicos totais. Quanto maior a quantidade de compostos fenólicos, maior a atividade antioxidante.⁶¹

Neste contexto, estudos realizados por Silva,¹² evidenciam-se que os extratos etanólicos da casca, galho e folhas de *Anadenanthera macrocarpa* apresentam atividade antioxidante através de técnicas de autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico e atividade sequestrante do radical DPPH, sendo bons sequestradores de radicais livres.

Além disso, Desmarchelier et al.⁶² evidenciou a atividade antioxidante dos extratos aquoso e metanólico das cascas desta espécie através dos modelos de avaliação do potencial antioxidante reativo total (TRAP), reatividade antioxidante total (TAR) e inibição da peroxidação lipídica, apresentando resultados positivos para ação antioxidante.

No grande grupo dos compostos fenólicos, os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e, são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes naturais.⁶³ Portanto este polifenol pode ser apontado como um dos fatores que influenciam na atividade redutora apresentada no presente estudo.

Os resultados da atividade antifúngica e moduladora corroboram com os resultados de Costa et al.,⁶⁴ ao verificar que o extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* não apresentou resultados positivos para a ação antifúngica contra *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *C. glabrata*.

Entretanto vale destacar alguns estudos que comprovam a ação antifúngica do extrato de *Anadenanthera colubrina* comprovando a ação do extrato bruto e fração acetato de etila da espécie contra *Candida albicans*,⁶⁵ o extrato hidroalcoólico das cascas desta espécie contra *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. gilliermond* e *C. parapsilosis*⁶⁶ e do extrato hidroalcoólico das cascas e frações ciclo-hexânica e acetato de etila contra *Cândida albicans*.⁶⁷

O presente estudo mostra que o extrato etanólico de *Anadenanthera macrocarpa* apresenta atividade antioxidante, possuindo a presença de flavonóides e compostos fenólicos que apresentam as mais diversas atividades biológicas. Embora, não apresentou efeito antifúngico ou modulador da atividade do Fluconazol sobre as linhagens de *Candida*.

REFERÊNCIAS

1. Novais TS, Costa JFO, David JPL, David JM, Queiroz LP, França F, et al. Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. Rev Bras Farmacog. 2003;13:5-8.
2. Macedo M, Carvalho JMK, Nogueira FL. Plantas medicinais e ornamentais da área de aproveitamento múltiplo de Manso, Chapada dos Guimarães, Mato Grosso. Cuiabá: Editora da UFMT; 2002. p.188.
3. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP de, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFSC; 2004. 1102p.
4. Albuquerque U, Hanazaki N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. Rev Bras Farmacog. 2006;16:678-689.

5. Pereira RJ & Cardoso MC. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes Vegetable secondary metabolites antioxidant benefits. J Biotec Biodivers. 2012;3(4):146-152.
6. Alves PM, Queiroz LMG, Pereira JV, Pereira MSV. Atividade antimicrobiana, antiaderente e antifúngica *in vitro* de plantas medicinais brasileiras sobre microrganismos do biofilme dental e cepas do gênero *Candida*. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42:222-224.
7. Volpato AMM. Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendula officinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico. [Dissertação de doutorado]. Paraná: Universidade Estadual de Ponta Grossa; 2005. P.58-67.
8. Kauffman CA. Fungal infections: Proceedings of the American Thoracic Society. 2006;3:35-40.
9. Rossi T, Lozovoy MAB, Silva RV, Fernandes EV, Geraldino TH, Costa IC. Interações entre *Candida albicans* hospedeiro. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde. 2011;32:15-28.
10. Matos FJA. Introdução a fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC Edições; 1997. p. 141.
11. Dantas JP, Benvindo FS, Sousa JH, Almeida JM, Figueiredo MC, Pequeno AS, et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. Rev Bras Anal Clin. 2010;42:33-37.
12. Silva OK. Avaliação das atividades antimicrobiana, aderência, antioxidante, antiinflamatória e antinociceptiva de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan. [Dissertação Mestrado]. Bahia: Universidade Federal da Bahia; 2011. p.67-74.
13. Barbosa-Filho JM, Nascimento Júnior FA, Tomaz ACA, Athayde-Filho PF, Silva MS, Cunha EVL, et al. Natural products with antileptotic activity. Rev Bras Farmacol. 2007;17:141-8.
14. Brasileiro BG, Pizziolo VR, Raslan DS, Jamal CM, Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district, Rev Bras Cienc Farm. 2006;19:195-202.
15. Silva ARH, Moreira LR, Brum ES, Freitas ML, Boligon AA, Athayde ML, et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. J Ethnopharmacol. 2014;53:908-916.
16. Boligon AA, Kubiça TF, Mario DN, Brum TF, Piana M, Weiblen R, et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutiabuxi folia* Reissek extracts. Acta Physiol Plant. 2013;35:2229-2239.
17. Benzie IEF & Strain JJ. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. Anal Biochemistry. 1999;239:0-76.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute-CLSI. Os padrões de desempenho para testes de susceptibilidade antimicrobiana; 22. Suplemento informativo. M100-S22 documento. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA; 2012.

19. Coutinho HDM, Costa JG, Lima EO, Falcão-Silva VS, Siqueira-Júnior JP. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*. 2008;54:328-330.
20. Matias EFF, Alves EF, Santos BS, Souza CES, Ferreira JVA, Lavor AKLS, et al. Biological Activities and Chemical Characterization of *Cordiaverbenacea* DC. as Tool to Validate the Ethnobiological Usage. *J Evid Based Complementary Altern Med*. 2013:1-7.
21. Penna C, Marino S, Vivot E, Cruanes MC, Munoz JD, Cruanes J, et al. Antimicrobial activity of Argentine plants used in the treatment of infectious diseases. Isolation of active compounds from *Sebastiania brasiliensis*. *J Ethnopharmacol*. 2000;77:37-40.
22. Peng ZF, Strack D, Baumert A, Subramaniam R, Goh KN, Chia TF, et al. Antioxidant flavonoids from leaves of *Polygonum hydropiper* L. *Phytochemistry*. 2003;62:219-228.
23. Novoa BE, Céspedes AC, De Garcia LA, Olarte CJE. Quercitrin, a flavonoid with hypotensive activity obtained from *Croton glabellus*. *Rev Colomb Cienc Quim Farm*. 1985; 4:4-17.
24. Kang TH, Jeong SJ, Kim NY, Higuchi R, Kim YC. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin* Durazz. *J Ethnopharmacol*. 2000;71:321-323.
25. Fermin SMLH, Galvez J, Romero JA, Zarnuelo A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental. *J Pharmacol Exp Ther*. 1996;278:771-779.
26. Comalada M, Camuesco D, Sierra A, Balleste I, Xaus J, Galvez J, et al. *In vivo* quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Eur J Immunol*. 2005;35:584-592.
27. Musci I, Gyulai Z, Beladi I. Combined effects of flavonoids and acyclovir against herpes viruses in cell cultures. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 1992;39:137-147.
28. Silva MC, Yunes RA, DelleMonache F, Santos ARS, Schmeling LO, Gadotti VM, et al. Phytochemical and pharmacological analysis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Leguminosae). *Z Naturforsch C*. 2001;56:939-942.
29. Czimmer E, Hagymas IK, Blazovics A, Kery A, Szoke E, Lemberkovics E. The *in vitro* effect of *Helichrysis flos* on microsomal lipid peroxidation. *J Ethnopharmacol*. 2001;77:31-35.
30. Veras HNH, Santos IJM, Santos ACB, Fernandes CN, Matias EFF, Leite GO, et al. Comparative evaluation of antibiotic and antibiotic modifying activity of quercetin and isoquercetin in vitro. *Curr Top Nutraceut R*. 2011;9:25-29.
31. Vitor RF, Mota-Felipe H, Teixeira G, Borges C, Rodrigues AI, Teixeira AP. Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *J Ethnopharmacol*. 2004;93:363-370.
32. Kim HY, Moon BH, Lee HJ, Choi DH. Flavonol glycosides from the leaves of *Eucommia ulmoides* glycation inhibitory activity. *J Ethnopharmacol*. 2004; 93:227-230.

33. Calzada F, Cedillo-Rivera R, Mata R. Antiprotozoal activity of the constituents of *Conyza filaginoides*. J Nat Products. 2001;65(5):671-673.
34. Krogh R, Kroth R, Berti C, Madeira AO, Souza MM, Cechinel-Filho V, et al. Isolation and identification of compounds with antinociceptive action from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. Pharmazie. 1999;54:464-466.
35. Silva MC. Análise fitoquímica e farmacológica de plantas medicinais selecionadas da flora catarinense: *Aleurites moluccana*, *Bauhinia microstachya*, e *Marrubium vulgare*. [Tese de Doutorado]. Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina; 2003. p. 128-138.
36. Wan L, Guo C, Yu Q, Li Y, Wang X, Wang X, et al. Quantitative determination of apigenin and its metabolism in rat plasma after intravenous bolus administration by HPLC coupled with tandem mass spectrometry. J Chromatogr B. 2007;855:286-289.
37. Svehlíková V, Bennett RN, Mellon FA, Needs PW, Piacente S, Kroon PA, et al. Isolation, identification and stability of acylated derivatives of apigenin 7-O-glucoside from chamomile (*Chamomilla recutita* L. Rauschert.). Phytochemistry, 2004;65:2323-2332.
38. Schulz V, Hansel R, Tyler VE. Fitoterapia Racional: Um guia de Fitoterapia para as Ciências da Saúde. 4. ed. Barueri: Editora Manole; 2002. p. 307-311.
39. Zekovic Z, Pekic B, Lepojevic Z, Petrovic L. Chromatography in our investigations of Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). J Chromatogr B. 1994;39:9-10.
40. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. Rev Nutr. 2002;15:71-81.
41. Morais-Braga MFB. Prospecção química do extrato etanólico das folhas de *Lygodium venustum* sw (Lygodiaceae) e avaliação das bioatividades antioxidante, antiepimastigota, antipromastigota, citotóxica e antimicrobiana de extrato e frações (*in vitro*). [Dissertação de Mestrado]. Ceará: Universidade Regional do Cariri; 2012. p. 165-170.
42. Krogh R, Tunes RA, Andricopulo AD. Structure-activity relationships for the analgesic activity of gallic acid derivatives. Il Farmaco. 2001;55(11-12):730-735.
43. Inoue M, Suzuki R, Koide T, Sakaguchi N, Ogihara Y, Yabu Y. Antioxidant, gallic acid, induces apoptosis in HL-60RG cells. Biochem Biophys Res Commun. 1994;204:898-904.
44. Figueredo FG, Ferreira EO, Lucena BFF, Torres CMG, Lucetti DL, Lucetti ECP, et al. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburanacearensis* A. C. Smith and *Anadenan theramacarpa* (Benth.) Brenan. Biomed Res Int. 2013;1:1-5.
45. Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. Pharmacology & Therapeutics. 2002;96:67-202.
46. Walle T. Flavonoids and isoflavones (phytoestrogens): absorption, metabolism and bioactivity. Free Radical Bio Med. 2004;36:829-837.
47. Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids: effects of rutin, quercetin and hesperedin on adjuvant arthritis in rat. FÁrmaco. 2001;56:683-687.

48. Narayana KR, Reddy MS, Chaluvadi MR, Krishna DR. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potencial. *Indian J Pharmacol.* 2001;33:2-16.
49. Harborne JB & Williams CA. Advances in flavonoids research since 1992. *Phytochemistry.* 2000;55:481-504.
50. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 1999;65:337-353.
51. Formica LV, Regelson W. Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol.* 1995;33:1061-1080.
52. Uchôa VT, Carvalho AA, Sousa CMM, Chaves MH, Sant'ana AEG. Evaluation of the antioxidizing activity of isolated *Ximeniaamericana* L. extracts and compounds. In: 1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]; São Pedro, SP; 2007.
53. Jomova K, Vondrakova D, Lawson M, Valko M. Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Mol Cell Biochem.* 2010;345:91-104.
54. Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, Baros S, Liska J, Hudecova D, et al. Arsenic: Toxicity, oxidative stress and human disease. *J Appl Toxicol.* 2011;31:95-107.
55. Andrade CA, Costa CK, Bora K, Miguel MD, Miguel OG, Kerber VA. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acaciapodalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. *Rev Bras Farmacogn.* 2007;17:231-235.
56. Ajaikumar KB, Asheef M, Babu BH, Padikkala J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punicagranatum* L. (pomegranate) methanolic extract. *J Ethnopharmacol.* 2005;96(1):171-176.
57. Stratil P, Klejdus B, Kuban V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables evaluation of spectrophotometric methods. *J Agr Food Chem.* 2006;54(3):607-616.
58. Hukkanen AT, Pölönen SS, Kärenlampi SO, Kokko HI. Antioxidant capacity and phenolic content of sweet rowanberries. *J AgrFoodChem.* 2006;54(1):112-119.
59. Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Junior GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova.* 2007;30(2):351-355.
60. Saxena R, Venkaiah K, Anitha P, Venu L, Raghunath M. Antioxidant activity of commonly consumed plant foods of India: contribution of their phenolic content. *Int J Food SciNutri.* 2007;58(4):250-260.
61. Singh RP, Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK. Studies on the Antioxidant Activity of Pomegranate (*Punicagranatum*) Peel and Seed Extracts Using *in vitro* Models. *J Agr Food Chem.* 2002;50:81-86.
62. DesmarchelierC, Lisboa Romão R, Coussio J, Ciccía G. Atividades de eliminação de radicais livres em antioxidantes e extratos de plantas medicinais utilizadas na região de caatinga no Nordeste do Brasil. *J Etnofarmacol.* 1999;67(1):69-77.

63. Karakaya S. Bioavailability of phenolic compounds. Crit Rev Food Sci Nutr. 2004;44(6):453-464.
64. Costa EMMB, Barbosa AS, Florentino VGB, Silva JDF, Trovão DMBM, Medeiros ACD. *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts of semi-arid region of Paraíba, PB, Brazil. Rev Odonto Cienc. 2013;28(4):101-104.
65. Lima RF, Alves EP, Rosalen PL, Ruiz ALTG, Duarte MCT, Góes VFF, et al. Antimicrobial and Antiproliferative Potential of *Anadenantheracolubrina*(Vell.) Brenan. J Evid Based Complementary Altern Med.2014;2014:1-7.
66. Carvalho AVOR. Atividade antimicrobiana *in vitro* de plantas do semiárido paraibano sobre espécies de *Streptococcus* e *Cândida* TCC. [Dissertação de Mestrado]. Paraíba: Universidade Estadual da Paraíba; 2012. p. 36-41.
67. Weber-sobrinho CR. Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos e da casca do caule de anadenanthera colubrina (Vell.) Brenan var. *Cebil*(Griseb.) Von Reis Alt. (Angico de Carço). [Dissertação de Mestrado]. Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco; 2010. p. 154-160.

Recibido:30 de marzo de 2015

Aprobado: 2 de junio de 2015

Vivianne Inácio Leite. Faculdade Leão Sampaio-FLS, CE, Brasil. Correo electrónico: vivianne_25@hotmail.com