



# Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae)

Pedro Guilherme Sousa de Sá<sup>1</sup>; Amanda Leite Guimarães<sup>1</sup>; Ana Paula de Oliveira<sup>1</sup>; José Alves de Siqueira Filho<sup>2</sup>; André Paviotti Fontana<sup>2</sup>; Patrícia Kauanna Fonseca Damasceno<sup>3</sup>; Carla Rodrigues Cardoso Branco<sup>3</sup>; Alessandro Branco<sup>3</sup>; Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Mediciniais (NEPLAME), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Centro de Referência para Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga (CRAD), Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brasil.

## RESUMO

*Selaginella convoluta* é uma espécie conhecida no Nordeste do Brasil como “jericó”, e bastante utilizada na medicina popular para tratamento de doenças. Este estudo teve como objetivo determinar o teor de compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico e das frações obtidas por partição de *S. convoluta*. O conteúdo de fenóis totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu. O teor de flavonoides totais também foi avaliado. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada usando o método do sequestro do radical DPPH e inibição da auto-oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico e comparada com os compostos de referência ácido ascórbico, BHA, BHT, quercetina e pirogalol. O conteúdo fenólico total foi de  $209,90 \pm 19,84$  e  $61,13 \pm 2,50$  mg equivalente de ácido gálico/g para os extratos AcOEt e EEB, respectivamente. O conteúdo de flavonoides totais foi de  $155,70 \pm 6,21$  e  $62,13 \pm 4,10$  para os dois extratos, respectivamente. Os extratos AcOEt e EEB apresentaram boas atividades antioxidantes. BHA foi o antioxidante mais efetivo, com um valor de  $IC_{50}$  de  $1,62 \pm 0,69$   $\mu$ g/mL. Os resultados obtidos mostram que *S. convoluta* pode ser uma boa fonte de compostos fenólicos antioxidantes. Estudos posteriores serão realizados para se chegar ao isolamento e identificação dos principais constituintes fenólicos dos extratos.

**Palavras-chave:** Fenóis totais. Flavonoides totais. Atividade antioxidante. *Selaginella convoluta*. Selaginellaceae.

## INTRODUÇÃO

A oxidação é um processo essencial aos organismos aeróbios e ao nosso metabolismo, sendo os radicais livres

produzidos naturalmente, como consequência desse processo de oxidação, ou por alguma disfunção biológica. Nestes radicais, o elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio ou nitrogênio, sendo, portanto, estes radicais classificados como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou espécies reativas do nitrogênio (ERN) (Barreiros et al., 2006).

No organismo, os radicais livres desempenham diversos papéis, como produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, o excesso deles pode ser responsável por uma série de efeitos deletérios como peroxidação de lipídios de membrana, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA, causando danos às membranas, perda de fluidez da mesma, e levando ao surgimento de câncer, como consequência de alterações no DNA, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, entre outras doenças (Alves et al., 2010; Barreiros et al., 2006; Rathee et al., 2006).

Este excesso é combatido por antioxidantes, sejam eles endógenos ou exógenos, absorvidos na dieta. Dentre os antioxidantes exógenos, destacam-se os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, oriundos de produtos naturais. Por apresentarem ressonância após atuarem no combate aos radicais livres, os compostos fenólicos possuem uma determinada estabilidade, que os permite reter o elétron desemparelhado sem causar danos às estruturas celulares (Barreiros et al., 2006; Soares, 2002).

Neste aspecto, a família *Selaginellaceae*, que possui um único gênero, *Selaginella*, destaca-se por apresentar dentre seus constituintes químicos, compostos classificados como biflavonoides, dímeros de flavonoides conectados por ligações C-C ou C-O-C (Lee et al., 2009).

Não se sabe ao certo quantas espécies possui a família. Alguns autores atribuem que são cerca de 700 espécies e outros afirmam que são aproximadamente 750 espécies (Hirai & Prado, 2000).

*Selaginella convoluta* é uma espécie conhecida na região do Vale do São Francisco como “jericó” e em outras

localidades do Nordeste brasileiro como “mão-fechada” ou “mão-de-papagaio”. Ela é facilmente reconhecida pelo seu hábito em roseta, e muito usada na medicina popular como afrodisíaca, diurética, contra amenorréia, febres, sangramentos, para aumentar a fertilidade feminina (Agra et al., 2007; Agra et al., 2008) bem como analgésica e antiinflamatória (Almeida et al., 2005).

Frequentemente, os espécimes de *S. convoluta* apresentam-se como ripícolas e crescem sobre uma fina camada de húmus nas encostas dos morros graníticos e paredões rochosos, mas podem ser também terrestres, ocupando barrancos. Preferencialmente, ocorrem em locais secos e expostos ao sol (Hirai & Prado, 2000).

Diante das atividades atribuídas aos compostos fenólicos e da ausência de qualquer informação acerca da composição química e atividade biológica de *S. convoluta*, o objetivo deste trabalho foi caracterizar fitoquimicamente o extrato vegetal e avaliar através de métodos fotocolorimétricos a atividade antioxidante, bem como determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides da planta.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta do material botânico

O material vegetal foi coletado em agosto de 2009 no Campus de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), localizado na zona rural de Petrolina-PE. Uma exsicata da planta (6440) foi depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

### Preparo dos extratos

O material vegetal seco e pulverizado (361 g) foi submetido à maceração exaustiva em etanol 95%. As extrações foram realizadas em intervalos de 72 h entre cada extração. Foram feitas 3 (três) extrações, até o completo esgotamento da droga. A solução extrativa obtida foi submetida à destilação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida a uma temperatura média de 50 °C. Após destilação do solvente até a secura, foram obtidos 27 g do extrato etanólico bruto (EEB) de *S. convoluta*. Uma fração do EEB foi reservada para os testes posteriores e a outra foi submetida à partição por solventes orgânicos (hexano, clorofórmio e acetato de etila) em ordem crescente de polaridade.

A fração reservada para partição (25 g) foi ressolubilizada usando-se 1 litro de uma mistura hidroalcoólica (MeOH:H<sub>2</sub>O, 3:7) e submetida à agitação mecânica durante 40 minutos. A solução hidroalcoólica foi depositada em funis de decantação, sendo, em seguida, particionada respeitando-se a ordem crescente de polaridade dos solventes. As soluções resultantes foram submetidas à destilação do solvente em evaporador rotatório à pressão reduzida, obtendo-se as respectivas fases.

### Avaliação fitoquímica preliminar

O EEB foi submetido à triagem fitoquímica preliminar de acordo com as classes de metabólitos secundários compreendidas pelo gênero. Foram realizados testes para a identificação de fenóis e taninos (cloreto férrico 2%), flavonoides (Shinoda), alcaloides (Dragendorff, Mayer e Bouchardat), esteroides e terpenoides (Liebermann-Burchard) segundo metodologia descrita por Matos (1997).

### Análise dos compostos fenólicos do EEB por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo (CLAE-DAD)

A análise do perfil de compostos fenólicos foi desenvolvida em um cromatógrafo líquido Hitachi modelo Lachrom Elite, coluna LiCospher 100 RP18 (5 mm) com dimensões 150 mm x 04 mm, Merk, equipada com Detector de Arranjo de Diodo (DAD). A fase móvel utilizada foi uma solução de H<sub>2</sub>O/H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,1% (A) e MeOH (B) composta inicialmente por 75% de A e 25% de B durante 25 minutos. A temperatura da coluna foi mantida constante a 30 °C com fluxo de 1,0 mL/minuto. Para os extratos foi utilizado um volume de injeção de 20 µL. Os dados espectrais foram registrados em 320 nm durante todo o experimento.

### Sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A avaliação da capacidade em sequestrar o radical livre DPPH foi feita de acordo com metodologia descrita por Mensor et al. (2001), com adaptações. Em cubetas confeccionadas em vidro, 2,5 mL das amostras, nas concentrações de 1, 3, 9, 27, 81 e 243 µg/mL, foram postos para reagir com 1 mL de solução etanólica de DPPH (50 µg/mL) durante 30 min, ao abrigo da luz. A medida da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 518 nm em espectrofotômetro UV-VIS Quimis. A percentagem de sequestro de radical livre (%SRL) foi calculada de acordo com a equação abaixo, onde *Ac* equivale à absorbância do controle, e *Aa* absorbância da amostra.

$$\%SRL = 100 \times [(Ac - Aa) / Ac]$$

O branco foi preparado substituindo-se o DPPH por etanol na mistura reacional. O controle negativo foi preparado a partir da adição de 1 mL de DPPH em 2,5 mL de etanol. Todas as análises foram feitas em triplicata e os valores de CE<sub>50</sub>, definida como concentração de antioxidante requerida para sequestrar 50% dos radicais DPPH, foram calculados a partir de regressão não linear no software Graphpad Prism, versão 4.0. O ácido ascórbico, BHA e BHT foram utilizados como padrões.

### Inibição da auto-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico

A capacidade dos extratos de *S. convoluta* em prevenir a oxidação do β-caroteno foi avaliada de acordo

com metodologia descrita por Jayaprakasha et al. (2001), com adaptações. Uma solução estoque da mistura  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi preparada da seguinte forma: 2 mL de  $\beta$ -caroteno em clorofórmio (0,2 mg/mL), 40 mg de ácido linoleico e 400 mg de Tween 40 foram adicionados em um balão de 250 mL. O clorofórmio foi completamente destilado em evaporador rotatório à pressão reduzida e a uma temperatura média de 40 °C. Em seguida, foram adicionados 100 mL de água destilada, procedendo-se de uma agitação vigorosa por 2 minutos. Uma alíquota de 3 mL da solução resultante foi dispensada em uma cubeta de vidro e 120  $\mu$ L das amostras em análise (1 mg/mL) foram adicionados, sendo a absorbância medida imediatamente (espectrofotômetro UV-VIS Quimis, t = 0 h) a 470 nm. Em seguida, a emulsão foi incubada a 50 °C durante 2 horas, quando foi realizada nova medida de absorbância (t = 2 h) a 470 nm. O branco foi preparado com 5 mL da solução oxidante e 0,2 mL de EtOH 99,5 % e tratado da mesma maneira que as amostras. O branco do aparelho foi o próprio etanol. A atividade antioxidante (AA) foi calculada de acordo com a equação abaixo, onde  $A_0$  corresponde às absorbâncias iniciais das amostras ou padrões,  $A_1$  às finais,  $A_0^0$  à absorbância inicial do branco e  $A_1^0$  à final.

$$AA = 100 \times [1 - (A_0 - A_1)/(A_0^0 - A_1^0)]$$

No cálculo da AA foi avaliado o efeito da amostra em análise em relação ao branco. Neste experimento, quercetina e pirogaloal foram usados como padrões.

#### Determinação de fenóis totais

A determinação espectrofotométrica dos compostos fenólicos foi realizada de acordo com metodologia descrita por Slinkard & Singleton (1977), utilizando-se o reagente de Folin-Ciocalteu. A curva de calibração foi obtida fazendo-se uso de seis diluições de ácido gálico (0-1000 mg/L). As amostras em análise foram submetidas ao mesmo procedimento. As mensurações das absorbâncias em função da concentração foram feitas em espectrofotômetro UV-VIS Quimis a 765 nm, em triplicata. A equação da curva de calibração obtida através de regressão linear está mostrada abaixo:

$$A = 0,0008C - 0,0086, R = 0,9997$$

Onde  $A$  representa a absorbância medida e  $C$  a concentração de equivalentes de ácido gálico.

Os resultados foram expressos como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra.

#### Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação de flavonoides foi feita de acordo com metodologia descrita por Dewanto et al. (2002), com adaptações. A técnica baseia-se na medida da absorbância, a 510 nm, do complexo formado entre o flavonoide e o alumínio do reagente de cor, formando compostos de coloração amarelada. Os resultados foram expressos como equivalentes de catequina (ECAT) por grama de amostra.

As análises foram efetuadas em espectrofotômetro UV-VIS Quimis. O teor de flavonoides foi calculado a partir da equação da curva de calibração obtida por regressão linear abaixo:

$$A = 0,0026C + 0,0311, R = 0,9995$$

Onde  $A$  representa a absorbância e  $C$  a concentração de equivalente de catequina.

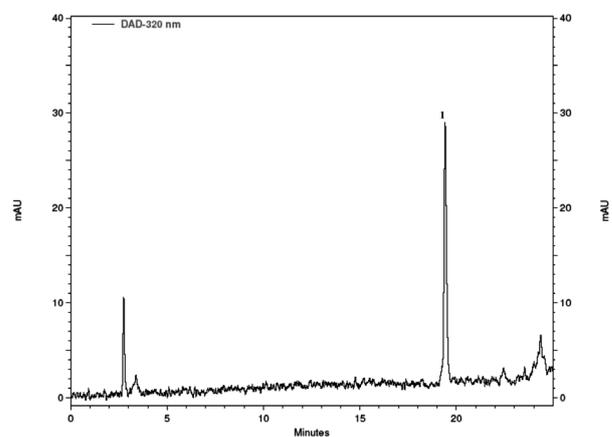
#### Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão (D.P.). Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ , utilizando o teste  $t$  de Student.

#### RESULTADOS

Na triagem fitoquímica preliminar, o extrato apresentou reação positiva para a presença de fenóis e taninos, flavonoides, esteroides e terpenoides. Não foi constatada no EEB a presença de alcaloides.

O perfil cromatográfico e espectral do extrato etanólico de *S. convoluta*, obtido pela técnica CLAE-DAD e registrado em 320 nm é mostrado na figura 1. O cromatograma mostra a presença de um único pico, com tempo de retenção de 19,41 minutos. O composto tem banda de UV característica de um flavonoide. Este composto está sob investigação, mas dados da literatura mostram que o biflavonoide amentoflavona é o principal constituinte de vários extratos de espécies de *Selaginella* (Ma et al., 2001).



**Figura 1.** Cromatograma do extrato etanólico bruto (EEB) de *Selaginella convoluta* obtido por CLAE-DAD em 320 nm.

*S. convoluta* foi avaliada quanto à sua capacidade antioxidante, pelo uso dos métodos do sequestro do radical livre DPPH e da inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno. Os resultados estão mostrados na Tabela 1. A atividade antioxidante dos extratos foi analisada de acordo com os valores de  $CE_{50}$ , em que valores mais baixos indicam alta atividade antioxidante. No método da inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno, os resultados foram expressos como porcentagem de atividade antioxidante.

Para os extratos, o extrato etanólico (EEB) mostrou melhor atividade antioxidante, com um valor de  $CE_{50}$  igual a  $47,06 \pm 5,50 \mu\text{g/mL}$ . A fase acetato de etila (AcOEt) apresentou um valor de  $CE_{50}$  igual a  $69,49 \pm 9,04 \mu\text{g/mL}$ . As fases hexânica e clorofórmica apresentaram baixa atividade antioxidante, com valores de  $CE_{50}$  maiores que  $243 \mu\text{g/mL}$ . Para os padrões, o BHA foi o antioxidante mais efetivo, com valor de  $CE_{50}$  igual a  $1,62 \pm 0,69 \mu\text{g/mL}$ . No método da inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno, todos os extratos apresentaram baixa atividade antioxidante. Nesse teste, os resultados foram comparados com a quercetina e pirogalol, sendo que a quercetina apresentou o melhor efeito, com  $80,65 \pm 0,50\%$  de atividade antioxidante.

Tabela 1. Atividade antioxidante do extrato etanólico e das fases obtidas por partição de *S. convoluta* em comparação com padrões comerciais.

Amostra	Seqüestro do radical livre DPPH		Inibição da autooxidação do $\beta$ -caroteno/ácido linoléico
	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	%SRL*	%AA
<b>Extratos</b>			
EEB	$47,06 \pm 5,50$	$75,23 \pm 2,38$	$17,61 \pm 3,71$
HEX	> 243	$36,18 \pm 2,83$	$30,22 \pm 7,64$
CHCl <sub>3</sub>	> 243	$55,21 \pm 1,06$	$30,33 \pm 26,58$
AcOEt	$69,49 \pm 9,04$	$90,13 \pm 0,24$	$41,20 \pm 10,50$
<b>Padrões</b>			
Ácido ascórbico	$2,28 \pm 0,53$	$96,40 \pm 0,27$	$4,13 \pm 1,42$
BHA	$1,62 \pm 0,69$	$83,55 \pm 0,84$	n.d.
BHT	$9,65 \pm 1,13$	$83,16 \pm 1,29$	n.d.
Quercetina	n.d.	n.d.	$80,65 \pm 0,50$
Pirogalol	n.d.	n.d.	$34,89 \pm 2,64$

Valores foram expressos como média  $\pm$  D.P. (n=3); n.d.= não determinado; %SRL= percentagem de seqüestro de radical livre (\*atividade antioxidante avaliada através do método do seqüestro do radical livre estável DPPH com concentração final equivalente a  $243 \mu\text{g/mL}$  de amostra); %AA= percentagem de atividade antioxidante; EEB (extrato etanólico bruto); HEX. (fase hexânica); CHCl<sub>3</sub> (fase clorofórmica); AcOEt (fase acetato de etila); BHA (butilhidroxianisol); BHT (butilhidroxitolueno)

O teor de fenóis totais bem como de flavonoides totais são mostrados na Tabela 2. O conteúdo de fenóis totais dos extratos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu e expresso como miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama (mg EAG/g) enquanto o conteúdo de flavonoides totais foi calculado como miligramas de equivalentes de catequina por grama (mg ECAT/g). O conteúdo de fenóis totais foi de  $61,13 \pm 2,50 \text{ mg EAG/g}$  para o extrato etanólico bruto (EEB) e de  $209,90 \pm 19,84 \text{ mg EAG/g}$  para a fase acetato de etila (AcOEt). O teor de flavonoides totais foi de  $155,70 \pm 6,21 \text{ mg ECAT/g}$  para a fase acetato de etila e  $62,13 \pm 4,10 \text{ mg ECAT/g}$  para o extrato etanólico bruto. Devido à baixa atividade antioxidante apresentada pelas fases hexânica e clorofórmica no teste do seqüestro do radical DPPH ( $CE_{50} > 243 \mu\text{g/mL}$ ), o conteúdo de fenóis e flavonoides totais não foi determinado.

Tabela 2. Teor de compostos fenólicos e de flavonoides presentes em *S. convoluta*.

Amostra	mg de EAG/g de amostra	mg de ECAT/g de amostra
EEB	$61,13 \pm 2,50$	$62,13 \pm 4,10$
HEX	n.d.	n.d.
CHCl <sub>3</sub>	n.d.	n.d.
AcOEt	$209,90 \pm 19,84$	$155,70 \pm 6,21$

Valores foram expressos como média  $\pm$  D.P. (n=3); n.d., não determinado. EAG= equivalente de ácido gálico; ECAT= equivalente de catequina.

## DISCUSSÃO

A triagem fitoquímica preliminar de *S. convoluta* revelou a presença de fenóis e taninos, flavonoides, esteroides e terpenoides.

Os flavonoides são os principais constituintes químicos da família Selaginellaceae. Entre eles, destacam-se os biflavonoides, dímeros de flavonoides cuja função na planta é agir como antifúngico ou alimento dissuasivo para insetos, além de protegerem contra os raios ultravioleta que incidem principalmente sobre as folhas (Simões et al., 2010).

De acordo com Lin et al. (2000), o gênero *Selaginella* é rico em biflavonoides. Alguns deles, como é o caso de 4'-metoxi-robustaflavona e 7,4'-dimetoxi-2'',3''-diidrorobustaflavona, isolados de *S. delicatula*, que são responsáveis por atividades citotóxicas em determinadas linhagens de culturas de células cancerosas. A ginkgetina, um biflavonoide isolado em *S. moellendorffii* por Sun et al. (1997), demonstrou-se eficaz em inibir em 50%, seletivamente, o crescimento de células de adenocarcinoma ovariano a partir da dose de  $1,8 \mu\text{g/mL}$ . Portanto, *S. convoluta* merece atenção neste aspecto, podendo este vegetal ser fonte de compostos a serem utilizados no combate ao câncer. Os esteroides são outra classe de metabólitos secundários encontrada em outras espécies do gênero. Zheng et al. (2007) isolaram e identificaram o ácido  $3\beta,16\alpha$ -diidroxi-(5 $\alpha$ )-colestan-21-oico em *S. pulvinata*. Além desta, *S. delicatula* e *S. doederleinii* também produzem essa classe de metabólitos secundários (Chiu et al., 1988).

O teste do seqüestro do radical livre estável DPPH baseia-se na capacidade de determinadas substâncias em doar um átomo de hidrogênio ao radical, reduzindo-o à hidrazina, provocando mudança de coloração, de violeta para amarelo pálido. Essa mudança de coloração é acompanhada pela queda de absorvância a  $518 \text{ nm}$  (Alves et al., 2010).

Neste teste, quando comparados os valores de percentagem de seqüestro de radical livre (%SRL) dos extratos em relação aos padrões, podemos observar que o EEB e a fase AcOEt apresentaram forte atividade antioxidante, com percentual de seqüestro do radical DPPH acima de 50% na concentração de  $243 \mu\text{g/mL}$  (Kiendrebeogo et al., 2011). Os valores de  $CE_{50}$  foram iguais a  $47,06 \pm 5,50$  e  $69,49 \pm 9,04 \mu\text{g/mL}$ , para o EEB e a fase AcOEt, respectivamente. No entanto, essa atividade foi melhor para os padrões, ácido ascórbico, BHA e BHT, que apresentaram menor valor de  $CE_{50}$ . Esses padrões foram escolhidos para esse estudo por serem padrões muito utilizados comercialmente. Os resultados estão expressos na Tabela 1. Estudos fitoquímicos estão sendo realizados para a identificação dos compostos responsáveis pela atividade antioxidante apresentada pelos extratos.

O ensaio da inibição da auto-oxidação do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico baseia-se na capacidade de determinadas substâncias protegerem o  $\beta$ -caroteno da oxidação. Essa oxidação é provocada pelos radicais livres formados durante a peroxidação do ácido linoleico que atacam o cromóforo do  $\beta$ -caroteno resultando no clareamento da emulsão reacional (Alves et al., 2010; Damasceno et al., 2011). Neste ensaio, todas as amostras de *S. convoluta* testadas mostraram baixa atividade antioxidante. Pelos valores de percentagem da

atividade antioxidante, podemos sugerir que os extratos possuem compostos lipofílicos, que os permite atuarem em ambientes como o do teste, retardando ou inibindo a oxidação do  $\beta$ -caroteno. O mesmo não foi observado para o ácido ascórbico, que possui uma polaridade relativamente acentuada. A maior atividade antioxidante foi observada para a quercetina. Neste experimento, a quercetina foi escolhida por ser um antioxidante que está normalmente presente em frutas e vegetais, enquanto o pirogalol é um antioxidante sintético bastante utilizado.

De acordo com Sousa et al. (2007), os compostos fenólicos distribuem-se nas seguintes categorias: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados do ácido benzoico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Eles possuem a capacidade de inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro*.

O método utilizado neste trabalho para se determinar o teor de fenóis, fazendo-se uso do reagente de Folin-Ciocalteu, é um dos mais utilizados pelos pesquisadores. O referido reagente consiste em uma mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstíco, onde o molibdênio e o tungstênio se encontram em um estado de oxidação +6. Na presença de agentes redutores, ocorre a formação de molibdênio e tungstênio azul, cujo estado de oxidação se encontra entre +5 e +6. Esta mudança na coloração permite que seja determinada a concentração de substâncias redutoras, neste caso, os compostos de natureza fenólica (Chaves et al., 2010).

Em *S. convoluta*, os compostos de natureza fenólica concentraram-se majoritariamente na fase AcOEt e no extrato etanólico bruto (Tabela 2), isto justifica a maior capacidade antioxidante dos extratos, quando avaliados pelo método do sequestro do radical livre estável DPPH.

Sousa et al. (2007) afirmam que as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos são devidas à estrutura química e propriedade redutora dos mesmos, sendo estas características importantes no sequestro ou neutralização dos radicais livres, bem como na quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação quanto na de propagação do processo oxidativo, formando intermediários estáveis por ressonância.

Tendo em vista os resultados da atividade antioxidante (Tabela 1), o teor de compostos fenólicos e a determinação de flavonoides foi realizada na fase AcOEt, bem como no EEB (Tabela 2). Alguns trabalhos relatam o isolamento de flavonoides a partir da fase AcOEt de algumas espécies do gênero *Selaginella* (Aguilar et al., 2008; Zheng et al., 2008; Xu et al., 2009).

Os mecanismos de ação antioxidante dos flavonoides se dão de três maneiras: supressão da formação de espécies reativas de oxigênio através de inibição enzimática ou quelação de elementos envolvidos na produção de radicais livres; neutralização das espécies reativas de oxigênio e aumentando ou protegendo o sistema de defesa antioxidante (Pietta, 2000). O autor coloca ainda que os flavonoides, devido ao seu baixo potencial de redução, são termodinamicamente aptos para reduzirem radicais livres altamente oxidantes como o superóxido, peroxila, alcóxila e hidroxila através da doação de um átomo de hidrogênio.

Em resumo, este estudo mostrou que o extrato etanólico bruto e a fase acetato de etila obtida por partição do

EEB de *Selaginella convoluta* contêm substâncias fenólicas, as quais são responsáveis pela atividade antioxidante, *in vitro*, em modelos experimentais. A atividade antioxidante está diretamente relacionada à presença de compostos fenólicos nos extratos. Tomados juntos, os resultados deste trabalho mostram que *S. convoluta* pode ser uma boa fonte de compostos fenólicos, no entanto, os antioxidantes comerciais foram mais efetivos como antioxidantes. Estudos posteriores serão realizados para se chegar ao isolamento e identificação dos constituintes químicos responsáveis pela atividade antioxidante dos extratos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo apoio financeiro, e ao Centro de Referência para a Recuperação de Áreas Degradadas da Caatinga (CRAD) pelo auxílio na identificação do material botânico.

## ABSTRACT

*Total phenols, total flavonoids and antioxidant activity of Selaginella convoluta (Arn.) Spring (Selaginellaceae)*

***Selaginella convoluta* is a species of ‘spike moss’ (an order of pteridophytes) known in Northeast Brazil as “jericó” and widely used in popular medicine to treat several diseases. Phenolic compounds were determined in extracts of whole *Selaginella convoluta* plants. The total phenolics content was determined by the Folin-Ciocalteu method. Total flavonoid content was also measured. Antioxidant activities of the extracts were assayed by DPPH radical scavenging and inhibition of  $\beta$ -carotene-linoleic acid bleaching and compared with ascorbic acid, BHA, BHT, quercetin and pyrogallol, used as reference compounds. The total phenolics contents of ethyl acetate (EtOAc) and crude ethanol extract (CEE) were  $209.90 \pm 19.84$  and  $61.13 \pm 2.50$  mg of gallic acid equivalent/g, respectively. The total flavonoids contents were  $155.70 \pm 6.21$  and  $62.13 \pm 4.10$  mg of catechin equivalent/g for the two extracts, respectively. The EtOAc and CEE extracts exhibited good antioxidant activities. BHA was the most effective antioxidant, with an  $IC_{50}$  of  $1.62 \pm 0.69$   $\mu$ g/ml. The results show that *S. convoluta* could be a good source of antioxidant phenolics. Further research will be carried out to achieve the isolation and identification of the main phenolic constituents of the extracts.**

**Keywords:** Total phenols. Total flavonoids. Antioxidant activity. *Selaginella convoluta*. Selaginellaceae.

## REFERÊNCIAS

Agra MF, Baracho GS, Nurit K, Basilio IJ, Coelho VP. Medicinal and poisonous diversity of the flora of “Cariri Paraibano”, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2007;111(2):383-95.

- Agra MF, Silva KN, Basílio IJLD, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Survey of medicinal plants used in the region of Northeast of Brazil. *Braz J Pharmacogn.* 2008;18(3):472-508.
- Aguilar MI, Romero MG, Chavez MI, King-Diaz B, Lotina-Hennsen B. Biflavonoids isolated from *Selaginella lepidophylla* inhibit photosynthesis in spinach chloroplasts. *J Agric Food Chem.* 2008;56(16):6994-7000.
- Almeida JRGS, Moraes ACA, Ribeiro RL, Gois RMO, Quintans-Junior LJ. Plantas medicinais comercializadas por raizeiros no Vale do São Francisco. Resumos da 1ª Reunião Regional da Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais; 2005; Fortaleza: SBPM/NE; 2005.
- Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Quim Nova.* 2010;33(10):2202-10.
- Barreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova.* 2006;29(1):113-23.
- Chaves MH, Citó AMGL, Lopes JAD, Costa DA, Oliveira CAA, Costa AF, et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e constituintes químicos de extratos de *Anacardium occidentale* L., Anacardiaceae. *Braz J Pharmacogn.* 2010;20(1):106-12.
- Chiu PL, Patterson GW, Salt TA. Sterol composition of Pteridophytes. *Phytochemistry.* 1988;27(3):819-22.
- Damasceno EIT, Silva JKR, Andrade EHA, Sousa PJC, Maia JGS. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Braz J Pharmacogn.* 2011;21(1):78-85.
- 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.
- Hirai RY, Prado J. Selaginellaceae Willk. no Estado de São Paulo, Brasil. *B J Bot.* 2000;23(3):313-39.
- Jayaprakasha GK, Sing RP, Sakariah KK. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. *Food Chem.* 2001;73:285-90.
- Kiendrebeogo M, Coulibaly AY, Nebie RCH, Zeba B, Lamien CE, Lamien-Meda A, Nacoulma, OG. Antiacetylcholinesterase and antioxidant activity of essential oils from six medicinal plants from Burkina Faso. *Braz J Pharmacogn.* 2011;21(1):63-9.
- Lee J, Choi Y, Woo ER, Lee DG. Isocryptomerin, a novel membrane-active antifungal compound from *Selaginella tamariscina*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379(3):676-80.
- Lin LC, Kuo YC, Chou CJ. Cytotoxic biflavonoids from *Selaginella delicatula*. *J Nat Prod.* 2000;63(5):627-30.
- Ma SC, But PPH, Ooi VEC, He YH, Lee SHS, Lee SF, Lin RC. Antiviral Amentoflavone from *Selaginella sinensis*. *Biol Pharm Bull.* 2001;24:311-312.
- Matos FJA. Introdução à fitoquímica experimental. 2. ed., Fortaleza: Edições UFC; 1997.
- Mensor LL, Menezes FS, Leitao GG, Reis AS, dos Santos TC, Coube CS, Leitao SG. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytother Res.* 2001;15(2):127-30.
- Pietta PG. Flavonoids as Antioxidants. *J Nat Prod.* 2000;63:1035-42.
- Rathee JS, Hassarajani SA, Chattopadhyay S. Antioxidant activity of *Mammea longifolia* bud extracts. *Food Chemistry.* 2006;99(3):436-43.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2010.
- Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult.* 1977;28:49-55.
- Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr.* 2002;15(1):71-81.
- Sousa CMM, Silva HR, Vieira-Jr. GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LC, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Quim Nova.* 2007;30(2):351-5.
- Sun CM, Syu WJ, Huang YT, Chen CC, Ou JC. Selective cytotoxicity of ginkgetin from *Selaginella moellendorffii*. *J Nat Prod.* 1997;60(4):382-84.
- Xu JC, Liu XQ, Chen KL. A new biflavonoids from *Selaginella labordei* Hiero.ex. *Christ. Chinese Chemical Letters.* 2009;20(8):939-41.
- Zheng X, Du J, Xu Y, Zhu B, Liao D. A new steroid from *Selaginella pulvinata*. *Fitoterapia.* 2007;78(7-8):598-9.
- Zheng JX, Wang NL, Gao H, Liu HW, Chen HF, Fan M, et al. A new flavonoid with a benzoic acid substituent from *Selaginella uncinata*. *Chinese Chemical Letters.* 2008;19(9):1093-5.

Recebido em 29 de janeiro de 2012

Aceito para publicação em 22 de junho de 2012