

PROPRIEDADES DO ÓLEO DE *Carapa guianensis*, Aubl., 1775 E SUAS APLICAÇÕES POTENCIAIS

PROPERTIES OF Carapa guianensis, Aubl., 1775 OIL AND ITS POTENTIAL APPLICATIONS

Plúcia Franciane Ataíde Rodrigues^{1*}; Sara Nascimento dos Santos²; Iasmini Nicoli Galter²; Ramila Tainara de Araújo Ataíde Wanzeler³; Carine Coneglian de Farias Colman⁴; Silvia Tamie Matsumoto²; Hildegardo Seibert França⁴

¹Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências Humanas e Naturais, Departamento de Ciências Biológicas, Vitória/ES. ²Universidade Federal do Espírito Santo, Laboratório de Mutagênese e Toxicologia Ambiental, Vitória, ES. ³Faculdade de Macapá, Macapá, AP. ⁴Instituto Federal do Espírito Santo, Vila Velha, ES, Brasil. pluciargds12@gmail.com

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo avaliar a composição química, a atividade sequestradora de radicais livres, a citotoxicidade do óleo puro de *Carapa guianensis* (andiroba), bem como, testar as diversas condições de reação de Folin-Ciocalteu para quantificação de fenóis totais em óleo e óleo-resina (*in natura*). A atividade citotóxica usou células epiteliais CHO-K1. A capacidade antioxidante foi pelos métodos de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) e 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS). O método de Folin-Ciocalteu foi modificado para avaliar fenóis totais em óleos e substâncias resinosas. Diferentes abordagens foram testadas, incluindo a adição de tween 80 e a substituição de solventes, a fim de analisar os fenóis totais presentes nos óleos-resinas testados. Quanto a composição química utilizou-se cromatografia em camada delgada e cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa. A análise da citotoxicidade do óleo de andiroba não resultou perda significativa da função mitocondrial com porcentagem de células viáveis variando de 82 a 127% da viabilidade celular. O óleo de *C. guianensis* apresentou concentração inibitória (IC₅₀) de 254,2 ± 10 mg/mL e 274,9 ± 6,19 mg/mL para DPPH e ABTS, respectivamente. Em fenóis totais, para aplicação em óleos e substâncias resinosas foi substituído progressivamente a água por solvente apolar, possibilitando a análise quantitativa de fenóis totais presentes nas amostras testadas. Na prospecção fitoquímica pode-se observar somente a presença de ácidos graxos com mancha no mesmo fator de retenção do padrão de ácido oleico. Os compostos identificados por cromatografia de fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa foram derivados de ácidos graxos, como o ácido oléico, ácido palmítico, ácido esteárico e o ácido linoléico com área relativa de 32.85; 26.06; 13.28; 11.79 %, respectivamente. Com base no estudo, conclui-se que o óleo de andiroba possui atividade antioxidante *in vitro*, não apresenta citotoxicidade em células epiteliais CHO-K1 e é composto

principalmente por ácido oleico e palmítico. Os dados obtidos no estudo podem ser úteis para metodologias realizadas em meio aquoso.

PALAVRAS-CHAVE: antioxidante, fenóis totais, produtos naturais, óleo-resina, citotoxicidade.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the chemical composition, free radical scavenging activity and cytotoxicity of pure *Carapa guianensis* oil (andiroba) (*in natura*), as well as to test the various Folin-Ciocalteu reaction conditions for quantifying total phenols in oil and oil-resin (*in natura*). Cytotoxic activity was measured using CHO-K1 epithelial cells. Antioxidant capacity was measured using the DPPH and ABTS methods. The Folin-Ciocalteu method was modified to evaluate total phenols in oils and resinous substances. Different approaches were tested, including the addition of tween 80 and solvent substitution, in order to analyze the total phenols present in the oil-resins tested. As for the chemical composition, thin layer chromatography (SLC) and gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC/MS) were used. The analysis of the cytotoxicity of andiroba vegetable oil did not result in any significant loss of mitochondrial function, with the percentage of viable cells ranging from 82 to 127% of cell viability. *C. guianensis* oil showed an IC_{50} of 254.2 ± 10 mg/mL and 274.9 ± 6.19 mg/mL for DPPH and ABTS, respectively. In terms of total phenols, for application to oils and resinous substances, water was progressively replaced by an apolar solvent, making it possible to quantitatively analyze the total phenols present in the samples tested. In the phytochemical prospecting, only the presence of fatty acids with a stain at the same R_f as the oleic acid standard could be observed. The compounds identified by gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC/MS) were fatty acid derivatives such as oleic acid, palmitic acid, stearic acid and linoleic acid with a relative area of 32.85; 26.06; 13.28; 11.79 %, respectively. Based on the study, it can be concluded that andiroba vegetable oil has antioxidant activity *in vitro*, does not show cytotoxicity in CHO-K1 epithelial cells and is mainly composed of oleic and palmitic acid. The data obtained in this study could be useful for methodologies carried out in aqueous media.

KEYWORDS: Antioxidant. Total phenols. Natural products. Oil-resin. Cytotoxicity.

INTRODUÇÃO

O óleo de *Carapa guianensis* Aubl., 1775 (Meliaceae), conhecida como andiroba, é amplamente utilizado na medicina popular, indústrias farmacêuticas e em cosméticos por possuir ampla atividade biológica, como a ação analgésica, antibacteriana, anti-inflamatória, antifúngica, antialérgica, antimalárica, sendo

eficaz contra feridas, hematomas, úlceras de herpes, reumatismo, infecções de ouvido e repelente de insetos¹, podendo ser utilizado puro ou em mistura com outros produtos naturais.

O Óleo de andiroba apresenta compostos como flavonoides, frequentemente referenciados por sua ação antioxidante, assim como diterpenos reconhecidos pela cicatrização de machucados². Os compostos fenólicos são normalmente encontrados nos vegetais, atuando no mecanismo de defesa contra herbívoros, patógenos e radiação ultravioleta, outros tem a capacidade de atrair polinizadores ou dispersores de frutos, podendo ainda influenciar no crescimento de plantas adjacentes, controle de germinação de sementes e atuar como antioxidantes³.

A quantificação do teor de fenóis totais presentes nas amostras pode ser realizada por meio de uma variedade de técnicas, no entanto, a mais utilizada é por meio do reagente de Folin-Ciocalteu. É um método espectrofotométrico simples e de baixo custo para excursão, conhecido internacionalmente por sua eficiência em diferentes extratos. No entanto, é importante lembrar que a metodologia de fenóis totais frequentemente é a base de água, no entanto alguns óleos e óleos-resinas *in natura*, como de *Carapa guianensis* Aublet, 1775 quando são utilizados em meio de preparo aquoso, esses se tornam turvos e esbranquiçados, inviabilizando leituras que tenham por base a turbidez. Castelo-Branco e Torres⁴ já falavam sobre o desafio para reproduzir certos métodos em óleos, uma vez que a maioria deles foram desenvolvidas para análises em amostras aquosas.

A análise dessas resinas (*in natura*) e outros óleos de difícil avaliação de seu conteúdo fenólico é de grande importância, tendo em vista que em muitas regiões do Brasil o óleo extraído tradicionalmente é amplamente utilizado para o tratamento de diversos males⁵. No entanto, muitos compostos podem possuir tanto propriedades terapêuticas quanto tóxicas, deste modo é importante que sejam realizados testes para avaliar o potencial citotóxico de substâncias mesmo que de origem natural, visando assim a obtenção de terapias e produtos mais seguros.

Deste modo, o presente estudo teve por objetivo avaliar a composição química, a atividade sequestradora de radicais livres, a citotoxicidade óleo puro de

andiroba (*in natura*), bem como, avaliar diversas condições de reação de Folin-Ciocalteu, com a finalidade de ajustar o método para aplicação em substâncias resinosas como óleo-resina de copaíba e andiroba (*in natura*).

MATERIAIS E MÉTODOS

O óleo de andiroba foi adquirido com cooperados do município de Mazagão/AP. A extração do óleo segue a prática tradicionalmente aplicada pelas comunidades, já descrita por Lima⁶, passando pela coleta e seleção das sementes, preparo da massa do “pão de andiroba” e extração do óleo. Para verificar a eficiência da adaptação aqui proposta na metodologia de fenóis totais foi também reproduzida no óleo-resina de *Copaifera reticulata* Benth (*in natura*), que é obtido a partir da exsudação do tronco de árvores e logo após o término da coleta o furo é vedado com uma rolha de madeira para segurança do exemplar.

A metodologia para determinação da atividade antioxidante das amostras pela Captura do Radical Livre 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico) (ABTS⁺) seguiu a metodologia de Rufino et al.⁷ Em ambiente escuro, pipetou-se 250 µL de solução de ABTS⁺ diluída e adicionou-se 30 µL do óleo puro de andiroba nas seguintes concentrações 75, 100, 150, 200, 250 e 300 mg/mL diluído em Isopropanol (99,6%) e o padrão foi Trolox nas concentrações 12, 24, 32, 40, 48 e 56 µg/mL. A placa foi mantida durante 6 minutos em ambiente escuro, em aproximadamente 29°C e em seguida lida em 732nm. O resultado foi expresso em valor de equivalência do padrão e foi calculado a porcentagem de inibição do radical livre através da equação 1.

$$\% AA_{ABTS} = \frac{A_{m\acute{a}x} - A_{amostra}}{A_{m\acute{a}x}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que: $A_{m\acute{a}x}$ é a absorbância do ABTS⁺ em 732 nm na ausência de amostra (controle), $A_{amostra}$ é a absorbância do ABTS⁺ em 732 nm na presença de amostra.

Onde a porcentagem de atividade antioxidante (%AA), é calculada pela absorbância da solução com o radical formado sem a presença de uma amostra $A_{m\acute{a}x}$

e $A_{amostra}$ é a absorvância observada na presença do radical com o analito. Para então calcular a concentração inibitória (IC_{50}) que é a quantidade de óleo em mg/mL das amostras testadas necessária para diminuir a concentração inicial de ABTS em 50%.

As amostras foram analisadas utilizando o reagente de 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) seguindo o método de Blois⁸. As amostras de andiroba foram diluídos em isopropanol e testadas nas concentrações 75, 100, 200 e 300 mg/mL. O trolox (10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 μ g/mL) foi utilizado como padrão para estabelecer a curva de calibração para a quantificação. As amostras em diferentes concentrações foram misturadas com a solução de DPPH e essa mistura foi agitada suavemente e deixada em repouso por 30 min no escuro à temperatura ambiente (aproximadamente 29°). Mediu-se a absorvância então em 517 nm usando espectrofotômetro Elisa⁽⁹⁾. Para calcular o percentual de captação do radical DPPH em termos de atividade antioxidante, foi utilizada a equação 2 e depois foi calculado a concentração de óleo necessária para capturar 50% do radical livre DPPH (IC_{50}).

$$AA (\%) = 100 - \frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) \cdot 100}{Abs_{controle}} \quad \text{Equação 2}$$

Onde: AA (%) = percentagem de atividade antioxidante; $Abs_{amostra}$ = absorvância da amostra; Abs_{branco} = absorvância do branco e $Abs_{controle}$ = absorvância do controle

Culturas de células eucarióticas

Células epiteliais derivadas do ovário do hamster chinês (CHO-K1), foram obtidas no laboratório de Laboratório de Mutagênese *in vitro* e *in vivo* da Universidade Federal do Espírito Santo, cultivadas em meio de cultura HAM-F10:D-MEN (1:1), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) mantidas em estufa de cultura a 37°C, sob uma atmosfera de 5% de CO₂. Os testes de citotoxicidade foram realizados em triplicata.

A citotoxicidade dos óleos em células CHO-K1 foi avaliada através do ensaio colorimétrico com sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5- difenil-2H-brometo de tetrazólio (MTT), tornando possível determinar o número de células viáveis. As suspensões de células CHO-K1 foram semeadas 1×10^5 em placas de 96 poços, contendo meio F12/DMEN suplementado com 10% de soro bovino fetal e

posteriormente mantidas em estufa BOD a 37°C por um período de 12 horas para a estabilização. Após este período, descartou-se o meio completo de cada poço da placa para adição do novo meio e do tratamento, onde foram adicionados 100 µl da amostra vegetal nas concentrações (50, 100, 200, 250, 300, 350, 400 mg/mL), diluídas em 1% de tween 80, a placa com tratamento foi mantida na estufa por mais 12h. Por fim, os tratamentos foram removidos e adicionou-se 100 µl de solução de MTT (5,0 mg/ml diluído em meio incompleto) para incubação por 4 horas¹⁰.

O controle positivo (CP) foi Triton X-100 e o negativo (CN) foi meio complementado com soro bovino fetal. Passando este tempo o meio foi retirado e adicionou-se 200 µL de DMSO 100% em cada poço, para dissolver os cristais de formazan, a placa então é protegida da luz e agitada em 300 rpm por aproximadamente 4 minutos e em seguida lida a absorbância no espectrofotômetro em 570 nm. Por fim, calculou-se a viabilidade celular em porcentagem¹¹. A absorbância obtida das células controle (não tratadas) foi considerada como 100% de viabilidade celular. A citotoxicidade celular do extrato foi calculada da seguinte forma:

$$\text{Células viáveis} = \frac{\text{Média da absorbância de cada concentração do extrato}}{\text{Média da absorbância do controle}}$$

A metodologia de fenóis totais frequentemente é a base de água, como descrito por Singleton e Rossi¹² e Wolff et al.¹³, no entanto quando concentrações mais elevadas de óleo de copaíba e andiroba são utilizados em meio de preparo aquoso, esses se tornam turvos e esbranquiçados, inviabilizando leituras que tenham por base a turbidez¹⁴, para que fosse possível avaliar a presença desses compostos nas amostras foram necessários alguns testes.

O ensaio foi adaptado e modificado para óleos ou óleo-resinas em três partes experimentais:

- I) Solubilização e diluição das amostras oleosas por etanol, dimetilsulfóxido, isopropanol e acetato de etila. Solventes frequentemente usados para resinas e alguns óleos^{15,16}.
- II) Adição de Tween 80: Uma vez que as amostras em estudo demonstraram

fraca solubilidade em meio aquoso e se tornaram turvas, foi utilizado tween 80 buscando solucionar esta interferência.

III) Alteração na forma de preparo da metodologia básica: Após as tentativas I e II, foi então realizada uma modificação na forma de preparo dos reagentes que compõem a metodologia básica (Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio), por meio da substituição de parte da água por solventes mais apolares.

Quanto ao item III (Alteração na forma de preparo da metodologia básica), se deu da seguinte forma: O reagente Folin-Ciocalteu manteve uma proporção já citada na literatura 1:1 (v/v), que corresponde ao Folin diluído no solvente (água). No entanto, para reduzir a quantidade de água no sistema foi substituindo gradativamente a água por solventes apolares como isopropanol, dimetilsulfóxido, metanol e etanol. Por fim, foram utilizados dois solventes para diluição de Folin: água e metanol, desta forma tem-se 50% de Folin e quanto aos diluentes 25% de água e 25% de metanol (ex.: 8 mL de Folin: 4 mL de H₂O e 4 mL de metanol).

A solução de carbonato de sódio 5% foi preparada pesando 2g e diluído em água e metanol na proporção 1:1 (20 mL de água e 20 mL de metanol), sendo necessário aguardar a formação de precipitado e filtrar a solução em filtro de papel. A proporção de água e metanol foi testada até um ponto em que interferisse minimamente na amostra, mas que também conseguisse diluir o carbonato de sódio.

Em tubos de ensaio foram adicionados 0,1 mL do padrão ou amostra diluídos em diferentes concentrações, 0,1 mL de isopropanol, 0,1 mL de folin e 0,5 mL de carbonato de sódio, finalizando com a centrifugação e leitura do sobrenadante em 732 nm, 40 minutos após a mistura dos reagentes nos tubos. Todas as análises foram realizadas em triplicata, as curvas das formas de preparo também foram testadas em triplicatas em dias diferentes e comparadas estatisticamente.

A fim de conferir se as alterações na metodologia básica iriam afetar ou resultar em efeito falso-positivo, o padrão de ácido tânico foi submetido as duas formas de preparo, a primeira com base no que é observado na literatura e a segunda aqui denominada de preparo adaptado (PA). Além disso, a adaptação foi testada em uma segunda amostra, no óleo-resina de copaíba. As concentrações para o óleo de

andiroba foram de 60, 100, 200 e 300 mg/mL. Para o óleo-resina de copaíba foram 30, 60, 100, 200 e 300 mg/mL. A solução etanólica de ácido tânico 200 µg/mL (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico; MM = 170,12 g/mol) foi testada nas concentrações 32, 48, 64, 80, 96 e 128 µg/mL.

Através da interpolação da absorbância final em curva padrão de ácido tânico, os resultados foram expressos em µg de equivalentes em ácido tânico (EAT) por mg do óleo resina (*in natura*). Além disso, para garantir a replicabilidade, estabilidade, e confiabilidade os testes foram repetidos três vezes em dias diferentes.

A cromatografia em camada delgada (CCD), foi realizada para caracterização do perfil de ácidos graxos no óleo de andiroba. Para isso foi aplicado sobre as placas aproximadamente 5µl da amostra do óleo diluído em isopropanol. Foram usadas cromatoplasmas de alumínio TLC de sílica gel 60 F254 (Merck®, Darmstadt, Alemanha). Os cromatogramas foram observados sob luz visível e ultravioleta 365nm UV-A e 254nm UV-C antes e após os reveladores químicos. Foi utilizado padrão de ácido esteárico e ácido oléico avaliar o perfil de ácidos graxos, sendo a fase móvel tolueno e acetato de etila (93:7) e o revelador solução de vanilina 1% e ácido sulfúrico 5%. As placas foram aquecidas em 110°C em um período de 5–10 min¹⁷.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) foram realizadas no Laboratório de Cromatografia do LabPetro, da Universidade Federal do Espírito Santo.

O óleo de andiroba sofreu metilação, onde 3 mg do óleo foram solubilizados em 300µL de KOH/MeOH 0.5M e deixado em refluxo com agitação por 30 minutos, a 60°C. Logo após foi resfriado e adicionou-se 300µL de BF₃/MeOH, deixado em refluxo por 30 minutos, a 60°C. A solução foi resfriada e extraída com 400 µL de hexano e 300 µL de água destilada. A fase orgânica foi recuperada e injetada diretamente em um Cromatógrafo Gasoso acoplado a um Espectrômetro de Massas da Agilent 7890B (Agilent, California, USA) e detector massa modelo 5977^a MSD com ionização eletrônica de 70eV. A coluna utilizada foi uma HP-5 de 30 m x 250 µm x 0,25 µm. O injetor foi ajustado para uma temperatura de 290 °C

e o detector para 310 °C. A eluição foi iniciada numa rampa de aquecimento iniciando a 40 °C com taxa de aquecimento de 5°C/min até 280 °C, seguido com taxa de aquecimento de 15°C/min até 310 °C permanecendo nessa temperatura por 10min.

Para caracterização foi utilizado padrão de alcano de C10 a C40 que foram submetidos às mesmas condições cromatográficas. Os compostos foram identificados através da comparação com a biblioteca da base NIST seguido pela comparação dos índices de retenção da^{18,19}.

Os dados avaliados foram expressos em média \pm desvio padrão. Para obtenção e comparação das médias foram utilizados o teste de Tukey ($P < 0,05$), a partir do programa Infostat²⁰.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O potencial antioxidante foi expresso como porcentagem de atividade antioxidante, mg de equivalência de trolox por g de extrato bruto e/ou IC₅₀⁵ Neste trabalho, o óleo fixo de andiroba analisado pelos métodos DPPH e ABTS, apresentou atividade antioxidante total de $4,80 \pm 0,01$ (mg trolox/g DPPH) e $2,14 \pm 0,07$ (mg trolox/g ABTS) e o IC₅₀ foi $254,2 \pm 10$ DPPH e $274,9 \pm 6,19$ ABTS.

Embora os dois métodos tenham como princípios básicos a reação de oxirredução, sabe-se que a ação dos radicais desses métodos é distinta²¹. Portanto, o perfil de compostos apresentados por cada amostra pode gerar resultados distintos em cada metodologia específica utilizando a mesma matriz. Souza²² relata a variação existente em outros trabalhos que assim como o dele, apresentaram diferenças nos resultados de testes antioxidantes. Desta forma, é razoável que haja diferenças de respostas frente aos radicais DPPH e ABTS.

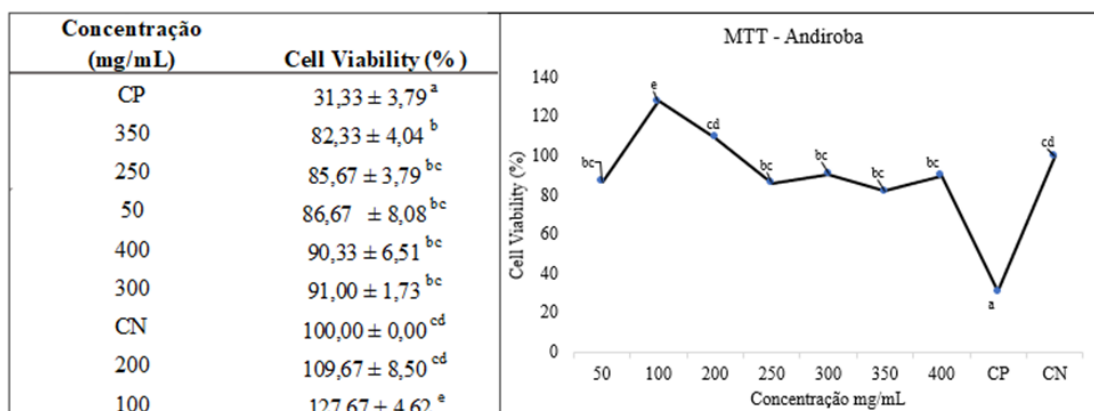
Quanto aos valores obtidos para DPPH e ABTS no IC₅₀, Milhomem-Paixão et al.²³ ao analisar a atividade antioxidante de 21 óleos obtidos a partir de sementes de andiroba, coletadas em 21 locais no estado do Pará - BR, obteve valores de IC₅₀ para as amostras entre 8913 e 43,56 $\mu\text{L/mL}$. Araújo-Lima²⁴ avaliou a atividade

sequestradora de radicais livres de óleos de *C. guianensis* obtidos por três diferentes métodos de extração, no entanto o óleo extraído sem o uso de altas temperaturas, apresentou maior atividade sequestradora contra o radical DPPH (EC₅₀ de 89,07 ± 3,67 µ L/mL). Isso demonstra que a ausência de alta temperatura para extração associada ao menor tempo de processamento evitou que componentes ativos dos extratos fossem degradados, uma vez que a extração sem calor contém maior quantidade de compostos antioxidantes.

Com base nas informações disponíveis até o momento, não é possível atribuir a atividade antioxidante a um composto específico do óleo de andiroba²³. No entanto, Wu et al.²⁵, acreditam que a atividade antioxidante de um óleo pode ser atribuída aos constituintes que estão presentes nele em maior quantidade, embora não exclua o fato de que mecanismos sinérgicos ou antagônicos também possam estar envolvidos.

As concentrações de 50 mg/mL a 400 mg/mL do óleo fixo de andiroba não apresentaram efeito citotóxico sob uma linha de células epiteliais derivadas do ovário do hamster chinês CHO-K1 (Fig. 1).

Figura 1. Citotoxicidade (mg/mL) (média +/- desvio padrão da média) do óleo de andiroba *in natura* em células epiteliais derivadas do ovário do hamster chinês CHO-K1. CP: Controle positivo, CN: Controle negativo. Médias com uma letra comum não são significativamente diferentes (p > 0,05)



A análise da citotoxicidade do óleo fixo de andiroba não resultou em perda significativa da função mitocondrial em comparação ao controle negativo, já que

os tratamentos apresentaram alta porcentagem de células viáveis. Isso está em conformidade com Milhomem-Paixão²³, que ao analisar a segurança no uso do óleo de andiroba para averiguar efeitos tóxicos adversos e os potenciais usos fitoterápicos do óleo de andiroba, tendo como organismos testes camundongos Swiss fêmeas, observou que nas condições experimentais utilizadas, o óleo de andiroba (500, 1000 e 2000 mg/kg/dia) não foi hematotóxico, genotóxico, mutagênico ou citotóxico. Acreditando ainda, que a atividade antioxidante do óleo tenderia a proteger o DNA celular do dano oxidativo.

Os resultados condizem com os achados de Wanzeler et al.²⁶, que investigou a atividade cicatrizante do óleo de *C. guianensis* contra a mucosite oral (MO) em hamsters sírios dourados e observou que o tratamento utilizando 100% de óleo de andiroba reduziu o grau de mucosite oral em relação aos demais grupos (óleo de andiroba 10% e óleo de andiroba 10% refinado), o óleo de andiroba em ambas as concentrações não foi citotóxico. No entanto, o uso desse óleo na concentração de 100% por 15 dias consecutivos demonstrou potencial genotóxico nos hamsters sírios, embora a frequência de PCE/NCE não tenha apresentado citotoxicidade em todos os grupos de andiroba.

Na pesquisa desenvolvida por Araújo-Lima et al.²⁴, com três óleos de andiroba extraídos por diferentes metodologias, observou-se que o óleo obtido sem o uso de altas temperaturas na extração, mostrou ser o produto mais seguro para uso e o mais promissor em relação aos demais óleos, pois não foi mutagênico ou genotóxico. Essa descoberta indica que a temperatura de extração mais alta associada ao tempo de processamento mais longo leva a um aumento de compostos que induzem danos ao DNA²⁴.

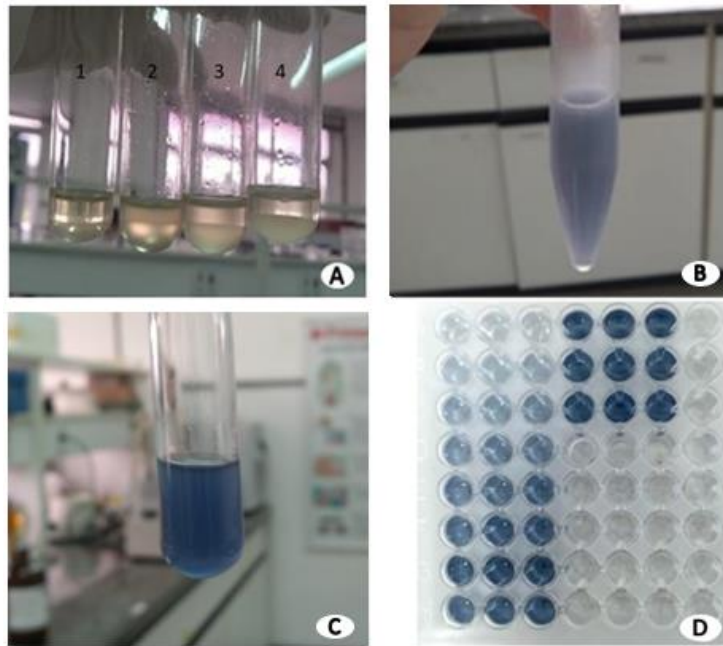
O óleo de andiroba é utilizado para diversos fins medicinais, cosméticos e no controle de pragas e parasitas, sendo em muitos casos a única opção de tratamento por comunidades tradicionais que residem longe dos centros urbanos, desejado até mesmo por aqueles que buscam métodos mais confiáveis de tratamento, com isso torna-se importante compreender até que ponto um produto natural é seguro. No presente trabalho, o óleo de andiroba não apresentou atividade

citotóxica, mas observa-se na literatura que dependendo da concentração utilizada e do modo de extração do óleo, ele pode apresentar toxicidade.

Primeira etapa do experimento teve por objetivo aumentar a solubilidade do óleo resina com solventes de diferentes polaridades, substituindo o metanol por outros solventes mais apolares como etanol, DMSO e álcool isopropílico, levando em conta estudos anteriores^{15,16}. O óleo de copaíba diluiu muito bem em todos os solventes testados, porém, andiroba somente foi solúvel em álcool isopropílico (Fig. 2A). Solventes de diferentes polaridades foram testados no ensaio de fenóis totais, no entanto, apesar da mudança não foi possível obter a melhoria esperada na qualidade da solução, uma vez que independente do solvente utilizado para diluir os dois óleos, houve uma forte turvação quando em contato com os reagentes que compõem a metodologia básica (Fig. 2B), se agravando ainda pela formação de fases e bolhas de óleo ao misturá-los. Sendo assim, mesmo que os solventes testados sejam favoráveis para diluição dos óleos-resinas o resultado foi uma turvação extensa.

Para obter uma solução límpida e resultados de ensaio confiáveis, foi então diluído o óleo utilizando 1% de tween 80, caracterizado por uma baixa ação tóxica e por ser usado em vários ramos da química e da farmácia²⁷. Wojtunik-Kulesza¹⁵, em sua pesquisa visando otimizar a metodologia Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) para testes em monoterpenos, descreve que em alguns casos, a adição de Tween 20 melhorou a solubilidade e o potencial de estudo de certos terpenos investigados, obtendo a redução ou desaparecimento da turvação. No entanto, nestes resultados as medições preparadas com o surfactante demonstraram turvação e conseqüentemente induziu um aumento no valor de absorbância.

Figura 2. Amostra do óleo resina de copaíba na metodologia de fenóis totais. A – Teste de diluições do óleo de andiroba e formação de fases diferentes reagentes: isopropanol (1), Dimetilsulfóxido (2), metanol (3), etanol (4); B - turvação do óleo de copaíba quando em contato com os reagentes da metodologia básica; C – Sobrenadante após centrifugação da amostra com os reagentes da metodologia de fenóis totais; D – amostra após pipetada na placa de 96 poços para leitura.



Foi então realizada uma modificação na forma de preparo dos reagentes que compõem a metodologia básica (carbonato de sódio e Folin-Ciocalteu), por meio da substituição de parte da água por solventes mais apolares. Notou-se que quanto menor a polaridade dos solventes utilizados para adaptar a metodologia, maior era a quantidade de corpo de fundo no tubo ao misturar todos os componentes necessários para o teste. Porém, o aumento da polaridade influenciaria negativamente na diluição do óleo, após testar diferentes combinações mantivemos então uma proporção de 1:1 v/v, ajustando os solventes utilizados na diluição, buscando manter um equilíbrio benéfico para diluição do óleo e do carbonato de sódio (onde anteriormente se fazia somente água, agora se faz ex. 20mL de água e 20mL metanol), obtendo um bom resultado para alteração.

Koivikko²⁸ demonstrou que há uma correlação positiva entre a concentração de carbonato de sódio no ensaio e o valor de absorvância, tornando o método mais

ou menos sensível conforme a quantidade utilizada, o que já era esperado por ser o catalisador do reagente de Folin-Ciocalteu. O que reforçou a necessidade de manter as proporções equilibradas.

A mesma lógica de combinações e testes de diluição foi realizada para o reagente folin, como já descrito em materiais e métodos, buscou-se manter a proporção citada em trabalhos como o de Anjos et al.²⁹, porém ajustando o solvente utilizado para diluir o folin, a fim de reduzir a quantidade de água final no sistema.

Após esta terceira opção de modificação, foi possível observar uma pequena turbidez e certa quantidade de corpo de fundo, provavelmente resultante de grandes diferenças de polaridade entre o tampão água/carbonato de sódio e o solvente orgânico, mas que após centrifugação não interferia na leitura das amostras (Fig. 2C e D). A alteração foi testada em dois óleos vegetais (*in natura*) e para que não houvesse dúvidas se o ajuste na metodologia estava realmente nos dando um resultado real e não um falso-positivo, foi então utilizado uma substância padrão que poderiam ser aplicados tanto na forma de preparo já conhecida na literatura quanto no preparo adaptado.

O padrão ácido tânico (ácido 3,4,5-triidroxibenzoico) foi testado nas mesmas concentrações nas duas formas de preparo sem qualquer interferência, porém foi possível avaliar as amostras de óleos somente com o preparo adaptado, onde obtivemos um resultado satisfatório.

O experimento obteve uma boa capacidade de repetibilidade, que se caracteriza pela repetição de um determinado experimento, pelos mesmos pesquisadores, em dias distintos, no mesmo local de origem, com os mesmos insumos, onde os resultados iniciais são obtidos, dentro de uma faixa de variação aceitável, determinada em função do tipo da pesquisa³⁰. Deste modo, foram preparadas duas curvas de calibração uma para cada modo de preparo, cada concentração foi testada em triplicatas e cada curva também foi testada em triplicada em dias distintos, como não houve diferença estática entre as triplicatas de curva de um mesmo modo de preparo, foram escolhidas aquelas com melhores R^2 .

Para interpolação das absorvâncias das amostras foi construída uma curva analítica com solução padrão de ácido tânico (32, 48, 64, 80, 96, 128 µg.mL). A Equação de regressão linear obtida para ácido tânico foram $y = 0,0079x - 0,0232$ (PA) e $0,0076x - 0,0455$ (PC), e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9915$ (PA) e $0,9911$ (PC).

Após construir a curva padrão de ácido tânico em µg/mL para cada uma das formas de preparo, foi substituído o valor de Y na equação da reta da curva padrão pela absorvância da amostra e calcular o valor de X correspondente à equivalência da absorvância da amostra em µg de ácido tânico. A seguir, calculou-se a massa de amostra em grama na mistura de reação e, por fim, foi dividido o valor da amostra em equivalente de ácido gálico pela sua massa (g equivalentes de ácido tânico/mg de amostra)³¹.

Não houve diferença estatística para o valor obtido entre as duas formas de preparo, sendo $3,00 \pm 0,01$ PA e $3,03 \pm 0,01$ PC mg EAT/ g de óleo-resina de andiroba e $1,52 \pm 0,03$ PA e $1,48 \pm 0,03$ PC mg EAT/ g de copaíba, o que demonstra que independente da forma de preparo escolhido não haverá interferência na avaliação correta de fenóis totais.

Além disso, as concentrações dos componentes químicos presentes nos óleos-resinas podem ser influenciadas por diversos fatores, como o modo de extração, a diferença de táxons, características do solo, condições climáticas e a estação ou período do ano em que são extraídas³². Desta forma, por sua rica composição química e importantes alternativas de aplicações farmacêuticas e medicinais, os óleos-resinas de copaíba e andiroba são importantes fontes de princípio ativo em farmacologia.

O valor aqui encontrado para o óleo de andiroba é superior aos encontrados por nos óleos extraídos por Novello et al.³³, que avaliou o teor de compostos fenólicos em sete amostras de óleo andiroba, obtendo valores entre 0,11 e 0,35 mg GAE/ g de amostra seca. E bem próximos ao descrito por Seck et al.³⁴, para o extrato da casca de *C. guianensis* com 8,2 mg GAE/g da amostra, que é um teor maior em comparação com o obtido nas sementes de *C. procera* por Diby et al.³⁵.

Apesar da extensa literatura sobre óleo de copaíba e andiroba são poucos os dados sobre compostos fenólicos nas resinas *in natura*, que frequentemente é analisado a partir da extração do óleo por meio de solvente de diferentes polaridades ou o uso do óleo essencial para possibilitar sua diluição em diferentes compostos. No entanto, esses óleos são frequentemente utilizados pela população *in natura*, principalmente na região norte do Brasil³⁶ e a partir da adaptação da metodologia foi possível quantificar os compostos fenólicos totais, o que pode ser proveitoso também para outras resinas e óleos com difícil adaptação em metodologias realizadas em meio aquoso. A alteração na metodologia não impossibilita a comparação com outros trabalhos que utilizam o preparo convencional de quantificação de fenóis totais, uma vez que não houve diferença estatística entre elas.

A análise do perfil químico, pode-se observar a presença de ácidos graxos com uma mancha de mesmo Rf referente ao padrão de ácido oleico (Figura 3).

Figura 3. Placa revelada de cromatografia em camada delgada para óleo de andiroba. Padrões e amostra para ácidos graxos: andiroba (1), esteárico (2), oleico (3).



Um dos padrões utilizados para detecção de ácido graxos foi o ácido oleico, que apresentou presença confirmada neste estudo por CCD. O ácido oleico é

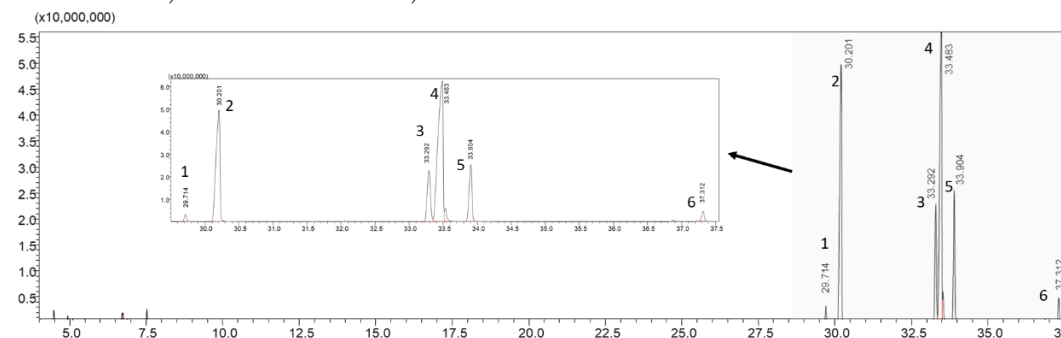
reconhecido por provocar efeitos benéficos na sensibilidade à insulina, o que pode ajudar a explicar os efeitos protetores da dieta mediterrânea contra a obesidade e o diabetes mellitus tipo 2³⁷. Ácido oleico é muito empregado em cremes e emulsões cosméticas pelas suas propriedades emolientes e para recompor a oleosidade em peles ressecadas e com problemas de escamação³⁸.

Na análise por CG/EM foi possível observar no cromatograma picos com tempo de retenção a partir de 29 minutos e que representam mais de 88% da área relativa do cromatograma, sendo identificados conforme Tabela 1 e Figura 4. A substância em proporções maiores é o ácido oleico seguido pelo ácido palmítico, esteárico e linoléico.

Tabela 1. Substâncias identificadas no óleo de andiroba por cromatografia de fase gasosa acoplado ao espectrometro de massa (CG/EM).

Pico	Tempo de retenção	% área relativa	Substâncias identificadas
1	29.714	1.69	ácido 9-hexadecenoico
2	30.201	26.06	1- ácido palmítico
3	33.292	11.79	ácido linoleico
4	33.483	32.85	ácido oleico
5	33.904	13.28	ácido esteárico
6	37.312	2.36	ácido 18-metil nonadecanóico

Figura 4. Cromatograma do óleo de Andiroba por cromatografia de fase gasosa acoplado ao espectrometro de massa (CG/EM) mostrando as substâncias identificadas. 1- ácido 9-hexadecenoico; 2- ácido palmítico; 3- ácido linoleico; 4- ácido oleico; 5- ácido esteárico; 6- ácido 18-metil nonadecanóico.



Milhomem-Paixão et al²³, ao analisar o óleo de andiroba observou que os compostos saponificados representaram > 97% da amostra e os compostos não

saponificados consistiram de esteróides e derivados triterpenóides. Mais de 97% dos ácidos graxos foram representados pelos ácidos oleico, palmítico, esteárico, linoleico e araquidônico. Algumas variações encontradas geralmente estão relacionadas ao processo de extração e às características naturais desses recursos, como amadurecimento dos frutos, origem geográfica e condições climáticas durante o cultivo. O conhecimento das propriedades químicas do óleo de andiroba são fundamentais para o direcionamento na aplicação do mesmo em indústrias de cosméticos e fármacos e até mesmo para utilização segura por comunidades tradicionais.

CONCLUSÃO

No presente estudo pode-se concluir que o óleo de andiroba apresenta capacidade antioxidante. Não foi observada a ação tóxica do óleo, o que comprova que o óleo puro pode ser utilizado de forma segura e indica sua utilização para o desenvolvimento de produtos. Sua composição química indica valores elevados de compostos fenólicos, sendo o ácido oleico predominante. A melhor forma de ajustar a metodologia de fenóis totais para o uso em óleo puro ou óleo-resina utilizando o reagente Folin-Ciocalteu, foi a alterando a forma de preparo da metodologia básica, substituindo progressivamente a água por solvente apolar. Além disso o experimento obteve uma boa capacidade de repetibilidade e não houve diferença estatística entre as formas de preparo com alteração e a mais utilizada na literatura.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal do Espírito Santos e ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Espírito Santo. A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). YHWH.

REFERÊNCIAS

1. Sousa, SF de; Paes, JB; Arantes, MDC; Martinez, Lopez Y; Brocco, VF. Análise física e avaliação do efeito antifúngico dos óleos de andiroba, copaíba e pinhão-manso. Floresta. 2018;48(2): 153-162. <http://dx.doi.org/10.5380/rf.v48i2.52280>.

2. Ramalho, MP; Santos, SLF; Castro, NM; Vasconcelos, LMO; Morais, ICO; Pessoa, CV. Plantas medicinais no processo de cicatrização de feridas: revisão de literatura. Rev. Expr. Catól. Saúde. 2018; 3(2).
3. Verruck, S; Prudencio, ES; Silveira SM da. Compostos bioativos com capacidade antioxidante e antimicrobiana em frutas. Revista do Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos. 2018; 4(1):111-124. <https://doi.org/10.5965/24473650412018111>.
4. Castelo-Branco, VN; Torres, AG. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. Revista de Nutrição. 2011; 24(1):173-187. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732011000100017>.
5. Pires, LKS; Grigolin Grisotto M; Fontes Grisotto R. O uso de plantas da Amazônia na produção de bioprodutos para tratamentos de pele. Revista de Investigação Biomédica. 2017; 9(1):78-88. <https://doi.org/10.24863/rib.v9i1.91>.
6. Lima J dos S. Formulações cosméticas contendo óleo de andiroba. Centro Universitário estadual da zona Oeste. 2018: 1-51. Disponível em: <http://www.uezo.rj.gov.br/tcc/farmacia/J%C3%A9ssica-dos-Santos-Lima.pdf>. Acesso em 22 dez. 2021.
7. Rufino, M do SM; Alves, RE; Brito, ES de; et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS. Comunicado técnico EMBRAPA. Published online 2007:1-4.
8. Blois, MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature 1958 181:4617. 1958;181(4617): 1199-1200 <https://doi.org/10.1038/1811199a0>.
9. Ghafoor, K; Al Juhaimi, F; Özcan, MM; Uslu, N; Babiker, EE; Mohamed Ahmed IA. Total phenolics, total carotenoids, individual phenolics and antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) rhizome as affected by drying methods. LWT. 2020; 126:109354. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109354>.
10. Brandão, CMM; Hass, V; Zago, PW; et al. Action of *Arrabidaea chica* extract on *Candida albicans* biofilms, cytotoxic effect on fibroblasts and keratinocytes, and on physical/mechanical properties of poli(methylmethacrylate) resin. Research, Society and Development. 2021; 10(13): e292101320667-e292101320667. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.20667>.
11. Galter, IN; Matsumoto, ST; David, JA de O. Avaliação da água do Rio Itapemirim/ES: aspectos abióticos e toxicogenéticos. Universidade Federal do Espírito Santo; 2016. Disponível em: <https://repositorio.ufes.br/items/b7eb99b0-8968-43ce-a77a-04597fbcf24b>. Acesso em: 03 fev. 2021.

12. Singleton, VL; Rossi, JA. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am J Enol Vitic.* 1965; 16 (3): 144-158. <https://doi.org/10.5344/ajev.1965.16.3.144>.
13. Wolff, SM; Silveira, AC da; Lazzarotto, M. Metodologia para extração de fenólicos totais e antioxidantes da erva-mate. *Iniciação Científica Cesumar.* 2019; 21(1):45-54. <https://doi.org/10.17765/1518-1243.2019v21n1p45-54>.
14. Mussi, MCM. Análise da atividade antimicrobiana dos óleos de copaíba (*Copaifera Officinalis*) e da Melaleuca (*Melaleuca Alternifolia*) Sobre *Fusobacterium Nucleatum* e *Porphyromonas Gingivalis*: determinação das concentrações inibitórias e bactericidas mínimas e efeito de concentrações subinibitórias sobre a agregação. Bauru/ SP. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/25/25150/tde-06122011-101438/pt-br.php>.
15. Wojtunik-Kulesza, KA; Drasar, PB; Khripach, VA. Approach to optimization of FRAP methodology for studies based on selected monoterpenes. *Molecules* 2020; 25: 5267. 2020; 25(22): 5267. <https://doi.org/10.3390/molecules25225267>.
16. Shigihara, TH; Pires, EF; De Assunção Justo D; et al. Otimização da extração de própolis verde pela atividade antifúngica e incorporação em biofilme de quitosana. *Revista Univap.* 2022; 28(59). <https://doi.org/10.18066/revistaunivap.v28i59.4366>.
17. Sobreir, RCB. *Piptadenia Stipulacea* (BENTH) Ducke: Investigação fitoquímica e ensaios toxicológicos *in vitro* e *in vivo*. Recife/PE. Universidade Federal de Pernambuco. 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/34243>.
18. El-Sayed AM. The Pherobase: Database of pheromones and semiochemicals. Published 2022. Disponível em: <https://www.pherobase.com/>. Acesso em: 09 jan. 2023.
19. National Institute Of Standars And Technology. NIST Chemistry WebBook. Published 2018. DOI: <https://doi.org/10.18434/T4D303>.
20. Di Rienzo JA; Casanoves F.; Balzarini, MG; Gonzalez, L., Tablada, M; Robledo, CW. InfoStat versão 2011. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Disponível em: <https://www.scirp.org/reference/ReferencesPapers?ReferenceID=1463425>. Acesso em: 05 jun. 2024.

21. Alves, ME; De Souza, O; Da M; et al. Influence of different extraction techniques on the antioxidant capacity of dehydrated watermelon rind. *Research, Society and Development*. 2021; 10(13): e323101321333-e323101321333. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i13.21333>.
22. Souza, DS. Caracterização e Avaliação da capacidade antioxidante da polpa liofilizada enriquecida com extrato Aquoso da semente de tamarindo (*Tamarindus Indica*). Campinas/SP. Universidade Estadual de Campinas. 2015. Disponível em: <https://bv.fapesp.br/pt/dissertacoes-teses/137118/caracterizacao-e-avaliacao-da-capacidade-antioxidante-da-pol>.
23. Milhomem-Paixão, SSR; Fascineli, ML; Roll, MM; Longo, JPF; Azevedo, RB; Pieczarka, JC; Salgado, HLC; Santos, AS; Grisolia, CK. The lipidome, genotoxicity, hematotoxicity and antioxidant properties of andiroba oil from the Brazilian Amazon. *Genet Mol Biol*. 2016; 39(2):248-256. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2015-0098>.
24. Araujo-Lima, CF; Fernandes AS; Gomes, EM; et al. Antioxidant activity and genotoxic assessment of crabwood (andiroba *Carapa guianensis* Aublet) seed oils. *Oxid Med Cell Longev*. 2018: 3246719. <https://doi.org/10.1155/2018/3246719>.
25. Wu Z; Li H; Yang, Y; Zhan Y; Tu D. Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity. *Ind Crops Prod*. 2013; 46: 311-316. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.02.015>.
26. Wanzeler, AMV; Júnior, SMA; Gomes, JT; et al. Therapeutic effect of andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl.) against oral mucositis: an experimental study in golden Syrian hamsters. *Clin Oral Investig*. 2018; 22(5): 2069-2079. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2300-2>.
27. Hamza, MA; Abou-Gamra, ZM; Ahmed, MA; Medien, HAA. The critical role of Tween 80 as a 'green' template on the physical properties and photocatalytic performance of TiO₂ nanoparticles for Rhodamine B photodegradation. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*. 2020; 31(6): 4650-4661. <https://doi.org/10.1007/s10854-020-03017-2>.
28. Koivikko, R. Brown algal phlorotannins: Improving and applying chemical methods. 2008: 61. Disponível em: <https://www.utupub.fi/handle/10024/36054>. Acesso em: 05 mar. 2024.
29. Anjos, JC dos; Munhoz, MP; Silva, VN da; Tirapeli, KG; Pereira, AAF; Nakamune AC de MS. Estudo *in vitro* da atividade antioxidante de *Hibiscus Sabdariffa* L. *Revista Saúde UniToledo*. 2017; 1(1): 20-30.

30. Costa, MAF; Costa, M de FB. Replicação das pesquisas científicas no contexto da qualidade: contribuições para estudos em saúde. *Revista Humanidades e Inovação*. 2021; 8(44): 148-157.
31. Harb, TB; Torres, PB; Pires, JS; Santos, DY dos; Chow, F. Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do sistema quelante de metais para extratos de algas. São Paulo: Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo: 2016.
32. Teixeira, FB; Silva, R de B; Lameira, OA; et al. Copaiba oil-resin (*Copaifera reticulata* Ducke) modulates the inflammation in a model of injury to rats' tongues. *BMC Complement Altern Med*. 2017; 14(1):1-8. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1820-2>.
33. Novello, Z; Scapinello, J; Magro, JD; et al. Extraction, chemical characterization and antioxidant activity of andiroba seeds oil obtained from pressurized n-butane. *Ind Crops Prod*. 2015; 76:697-701. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.07.075>.
34. Seck, I; Hosu A; Cimpoi, C; et al. Phytochemicals content, screening and antioxidant/pro-oxidant activities of *Carapa procera* (barks) (Meliaceae). *South African Journal of Botany*. 2021; 137:369-376. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.11.019>.
35. Diby, LA; Katou SY; Dere, LAK; N'da PK; Tiahou, GG. Biochemical composition of the seed of *Carapa procera* (meliaceae) of Côte d'Ivoire. *International Journal of Green and Herbal Chemistry*. 2019; 8(3):333-342.
36. Maurmann, N; Lund DG; Pereira, DP; Pranke, P. Avaliação da composição química de um óleo de copaíba (*Copaifera* spp) e seu efeito em células-tronco mesenquimais. *Rev med (São Paulo)*. 2022; 101(5):e-185868. doi: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v101i5e-185868>.
37. Palomer, X; Pizarro-Delgado, J; Barroso, E; Vázquez-Carrera, M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab*. 2018; 29(3):178-190. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.11.009>.
38. Rani, KNP; Neeharika, TSVR; Kumar, TP; Satyavathi, B; Sailu, C; Prasad, RBN. Kinetics of enzymatic esterification of oleic acid and decanol for wax ester and evaluation of its physico-chemical properties. *J Taiwan Inst Chem Eng*. 2015.