



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76
Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016



PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XXIV SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS **SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2020**

Avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora *in vitro* do extrato etanólico de *Psidium guajava*

Marília Ribeiro da Silva¹; Sônia Carine Cova Costa²

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail:

marilia_rib@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: scarinecc@hotmail.com

PALAVRAS-CHAVE: *Psidium guajava*; antioxidante; fotoproteção.

INTRODUÇÃO

A luz solar é um fator fundamental para a existência de vida na Terra, onde seus efeitos sobre o homem resultam das propriedades individuais da pele exposta, intensidade, frequência e tempo de exposição, circunstâncias estas que, por sua vez, dependem da localização geográfica, sazonalidade, período do dia e condição climática. Esses fatores são demonstrados em benefícios ao ser humano, como sensação de bem-estar físico e mental, estímulo à produção de melanina com conseqüente bronzeamento da pele e tratamento de icterícia, dentre outros. No entanto, a quantidade de radiação solar incidente e seus efeitos acumulativos, ao atingir a pele desprotegida, comina em um processo complexo associado a reações químicas e morfológicas que ocasionam danos ao organismo, como a formação de espécies reativas de oxigênio, alterações histoquímicas, além de alterações epidérmicas, a exemplo do espessamento da camada espinhosa e retificação da junção dermoepidérmica (SGARBI et al., 2007).

Na natureza existe dois tipos de radiação, a radiação UVB (que causa queimaduras solares) e a radiação UVA que é muito perigosa, e é encontrada em níveis muito elevado e mais expressivos. Além disso, distintamente da UVB, a radiação UVA ultrapassa vidros e janelas e adentra profundamente na pele, conseguindo alcançar até a derme, camada mais profunda da pele e onde se encontra as fibras de colágeno e elastina, gerando uma quantidade altíssima de radicais livres, os quais são responsáveis por ocasionar o avanço da degradação das fibras de colágeno e elastina, que dão sustentação à pele, sendo as principais responsáveis pelo fotoenvelhecimento, incluindo rugas, linhas de expressão, flacidez e manchas. (PORTILHO, 2018).

Outro fator que contribui para o fotoenvelhecimento e a produção excessiva de radicais livres. Os radicais livres são moléculas resultantes dos processos metabólicos contínuos que ocorrem no organismo humano e atuam como conciliadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes ao metabolismo (BAE *et al.*, 1999). No entanto, seu excesso apresenta efeitos nocivos, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares, provocando alterações na estrutura e funções celulares e conseqüentemente coadjuvando no surgimento de diversas patologias a exemplo de câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, entre outras (HALLIWELL; GUTTERIDGE; CROSS, 1992).

A partir dessas abordagens pode-se notar que a pele, órgão protetor do corpo humano, também necessita de cuidados. Não apenas para finalidades estéticas, uma vez que, a mesma expõe algumas características do indivíduo, mas ainda para sua própria manutenção, de tal modo que a pele consiga continuar desempenhando, melhor, o seu papel.

Uma das importantes ações de contribuem justamente para promoção do cuidado com a pele, além do uso de adereços e peças de vestuário, é justamente a utilização de fotoprotetores e produtos que possuem ação antioxidante, visto que, os protetores solares possuem filtros que são moléculas ou complexos moleculares que podem absorver, refletir ou dispersar a radiação UV e os antioxidantes atuam interferindo na transferência de elétrons do processo oxidativo, que é um dos processos químicos mais fundamentais para a sobrevivência das células, impedindo a produção em excesso de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO), que podem causar dano oxidativo (BAE *et al.*, 1999; BALOGH, 2011).

No desenvolvimento de produtos cosméticos, a busca pela inclusão de matérias-primas oriundas de recursos naturais em formulações inovadoras e eficientes, principalmente na área de fotoproteção, cuidado e manutenção da pele, é cada vez mais pronunciada, uma vez que, a utilização dessas matérias-primas naturais é considerada mais seguras e ecologicamente aceitáveis do que os elementos de origem sintética, por oferecer uma menor agressão ao meio ambiente. Este fator também favorece, para maior aceitação pela população e pelos meios de comunicação, que conseqüentemente, consegue induzir ampliação de estudos na área, da diversidade do mercado cosmético, e da sua exploração de forma racional a biodiversidade brasileira (POLONINI; BRANDÃO; RAPOSO, 2014).

A goiabeira, espécie do gênero *Psidium*, cujo nome científico é *Psidium guajava* foi classificada por Lineu em 1753. Esta espécie popularmente conhecida como goiabeira é uma das culturas mais importantes pertencentes ao gênero *Psidium*. Distribuída por muitos países como resultado de sua capacidade de crescer em condições tropicais e subtropicais (SANTOS, 2017).

P. guajava é uma planta de origem latina, cultivada em países tropicais, seu fruto é comestível e pode ser utilizado para confecção de diversos alimentos principalmente sobremesas. De uma forma geral toda a planta possui potencial medicinal, seu uso mais conhecido é como cicatrizante e adstringente, porém seus metabólitos também possuem atividade depressora antibacteriana, hipoglicemia, anti-inflamatória, antipirética, espasmolítica e do sistema nervoso central (RATTANACHAIKUNSOPON; PHUMKHACHORN, 2010; SANDA *et al.*, 2011). No entanto, sua rica gama de compostos, como seu alto teor de vitamina C, quatro a cinco vezes superiores aos da laranja, razoáveis níveis de vitamina A e vitamina B, além de apresentar sais minerais contendo cálcio, fósforo e ferro na sua molécula e óleos rico em sesquiterpenos e ácido linoleico, torna este fruto um significante precursor em pesquisas. (OLIVEIRA, 2012).

Sendo assim, o seguinte estudo busca evidenciar substâncias promissoras derivadas de extratos vegetais encontrados abundantemente em lugares como o semiárido baiano, que possam contribuir e auxiliar no cuidado e manutenção da pele, representando um âmbito de grande importância, não somente pelos os benefícios que possivelmente agregariam no combate/controla de doenças na pele, mas também pelo desenvolvimento e valorização da região do semi-arido baiano.

MATERIAL E MÉTODOS OU METODOLOGIA (ou equivalente)

Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos extratos

Foi preparada soluções do extrato da *Psidium guajava* em diferentes concentrações (100µg, 200µg, 300µg, 400µg, 500µg) e uma solução etanólica de DPPH (50µg/mL). Os controles positivos foram feitos utilizando o BHT e o ácido ascórbico, ambos preparados em concentrações e condições idênticas ao das amostras em análise. As soluções reagentes foram incubadas no escuro e a temperatura ambiente (25°C) durante 30 min para que a reação ocorra. A redução do radical livre foi medida através da leitura da absorbância a 518 nm em e os resultados expressos em % de Sequestro do Radical Livre (%SRL) (BRAND-WILIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995 e PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

$$\% \text{ SRL} = 100 - \{ [(Abs \text{ controle} - Abs \text{ amostra}) \times 100] / Abs \text{ controle} \}$$

Onde,

Abs amostra = Absorbância da amostra

Abs controle = Absorbância do controle

Avaliação da atividade fotoprotetora UVB in vitro dos extratos

A partir das soluções preparadas com as diferentes concentrações do extrato de *Psidium guajava*, foi medida a intensidade da luz em comprimentos de onda determinados entre 290 a 320 nm (espectro da região UVB), para determinação do FPS. Em seguida foi aplicada uma equação segundo Mansur, *et al.*, 1986, representada abaixo, utilizando ainda a constante $EE(\lambda) \cdot 2 \cdot I(\lambda)$ instituída por Sayre et al. (1979) (Tabela 1).

$$FPS = FC \cdot \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \cdot 2 \cdot I(\lambda) \cdot Abs(\lambda)$$

Onde:

FC = fator de correção (= 10);

$EE(\lambda)$ = efeito eritematogênico da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

$I(\lambda)$ = intensidade da radiação solar em cada comprimento de onda (λ);

$Abs(\lambda)$ = leitura da absorbância obtida da amostra em cada comprimento de onda (λ).

Tabela 1: Relação entre o efeito eritematogênico e a intensidade da radiação para cada comprimento de onda.

Comprimento de onda (nm)	EE (λ) . I (λ)
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total	1,0000

Fonte: Adaptado SAYRE *et al.*, 1979.

As amostras devem apresentar um FPS ≥ 6 para serem consideradas fotoprotetoras segundo a RDC n. 30 de 01 de junho de 2012 (BRASIL, 2012).

Identificação de flavonoides por CLAE-DAD

As frações da planta foram preparados em concentração de 3 mg/mL, solubilizados em metanol e foram aquecidos em banho-maria por 20 minutos em temperatura aproximada de 70°C. Depois foram filtrados com filtros 0,45 μm , obtendo-se a parte solubilizada para análise. Em seguida, uma alíquota de 10,0 μL de cada extrato foi analisada utilizando sistema LaChrom Elite®, equipado com injetor automático L2200, bomba L2130, forno L2300, mantido a 25 °C, com detector diodo array (DAD) L2455. A separação dos componentes da amostra foi realizada em coluna de fase reversa C-18 (partículas de 5 μm , 150 mm x 4,6 mm), combinada com pré-coluna apropriada (4,0 mm x 4,00 mm; 5 μm de tamanho de partícula) (Merck®, Germany). A análise foi realizada nos comprimentos de onda 280 nm e 354 nm. Os compostos presentes nas amostras foram comparados, de acordo com seu espectro de UV-visível (230 a 400 nm) e pelo tempo de retenção, com padrões fenólicos comerciais (FRANÇA, 2018).

RESULTADOS E/OU DISCUSSÃO (ou Análise e discussão dos resultados)

Obtenção da Droga Vegetal e do extrato de *Psidium guajava*

As folhas de *Psidium guajava* (Figura 1) foram coletadas em Jaíba, distrito que pertence ao município de Feira de Santana, posteriormente foi levado para o Laboratório de Controle de Qualidade e logo colocado para secar na estufa (45 – 55°C) de ventilação forçada. Uma pequena parte do material coletado foi utilizada para fazer a exsicata que posteriormente foi depositado no herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana, sob n° HUEFS 253649.

Figura 1 - *Psidium guajava*.



Após o processo de secagem, as folhas foram destacadas dos galhos e trituradas em um liquidificador industrial, resultando no equivalente a 210,960g de extrato seco, e posteriormente o material vegetal triturado foi colocado em um recipiente de vidro e embebido com etanol, na proporção 1:3. O recipiente foi devidamente protegido contra a luz, umidade e temperatura. Depois de 72 h, o material foi filtrado, e após dezesseis dias o material foi filtrado novamente e colocado em uma capela de exaustão para que ocorresse a eliminação do solvente da solução de extrato, obtendo-se assim o extrato vegetal.

Para uma melhor análise, identificação e separação dos componentes do extrato vegetal, este foi submetido às técnicas de cromatografia, primeiramente a cromatografia em coluna, onde foi empregado como fase estacionária, Sílica gel 60Å (220-440 mesh) para cromatografia flash, e sistema de eluente em ordem de polaridade crescente: Hex, AcOET, EtOH e H₂O. Obtendo-se 15 frações. (Figuras 2 e 3)

Figura 2 e 3 – Cromatografia em coluna (2); Frações resultantes (3).



Em seguida foram analisadas a partir da cromatografia de camada delgada, onde utilizou-se, na fase estacionária, Cromatofolhas de alumínio sílica gel, e para eluição foram usados acetato de etila, etanol e hexano compondo diferentes sistemas de soluções. Posteriormente, para melhor visualização, as frações foram reveladas em câmara de luz ultravioleta (254 e 366nm) e solução metanólica de H₂SO₄ a 10%, seguida de aquecimento a 100°C.

Após análise, de acordo com o perfil cromatográfico distinto das amostras, foram selecionadas 9 frações (6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 e 14) para serem submetidas a CLAE-DAD.

A cromatografia líquida de alta eficiência que utiliza detectores com arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), é frequentemente usado em laboratórios de pesquisa por possibilitar a visualização de dados importantes sobre determinadas classes de substâncias, uma vez que, os dados de absorvância sozinhos são insuficientes para elucidação estrutural.

Para a análise CLAE-DAD utilizou-se como fase móvel H₂O/CH₃COOH 0.1% e metanol. O tempo de corrida foi 45 minutos, o volume de injeção 20 µL e a temperatura do forno 30°C e a faixa de comprimento de onda foi de 200-800.

No extrato de *P. guajava* analisado detectou-se a presença de compostos fenólicos e flavonóides. No reino vegetal existe uma grande incidência de compostos fenólicos e os flavonóides que podem ser decorrentes das atividades biológicas da planta (SILVA *et al.*, 2016). Esses compostos apresentam, estruturalmente, anéis aromáticos, além disso são capacidade de absorver a radiação ultravioleta e neutralizar os radicais livres formados pelo processo oxidativo. Nesse sentido essas características os tornam consideráveis matérias-primas a serem incorporadas em fitoprodutos inovadores, extensamente pesquisados pelas indústrias cosméticas, capazes de reduzir os danos ocasionados pela radiação solar (MUNHOZ, V. M. *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2016).

Avaliação da atividade antioxidante in vitro dos extratos

Foi preparada uma solução etanólica de DPPH, utilizando 0,059g de DPPH diluídos em 50ml de álcool etílico e outra solução do extrato de *Psidium guajava*, utilizando 0,02g do extrato diluídos em 10ml. Em seguida foram feitas diluições utilizando 1ml de DPPH e diferentes concentrações da solução de extrato de *Psidium guajava* (100µg, 200 µg, 300 µg, 400µg, 500µg) que foram incubadas no escuro e a temperatura ambiente durante 30 min. Os controles positivos foram feitos utilizando o BHT e ácido ascórbico (AA) em condições semelhantes das amostras em análise. Posteriormente foram feitas as medidas através da leitura da absorvância a 518 nm, e os resultados expressos em % de Sequestro do Radical Livre (%SRL), mostradas na tabela 2 admitida abaixo.

Tabela 2 – Atividade antioxidante

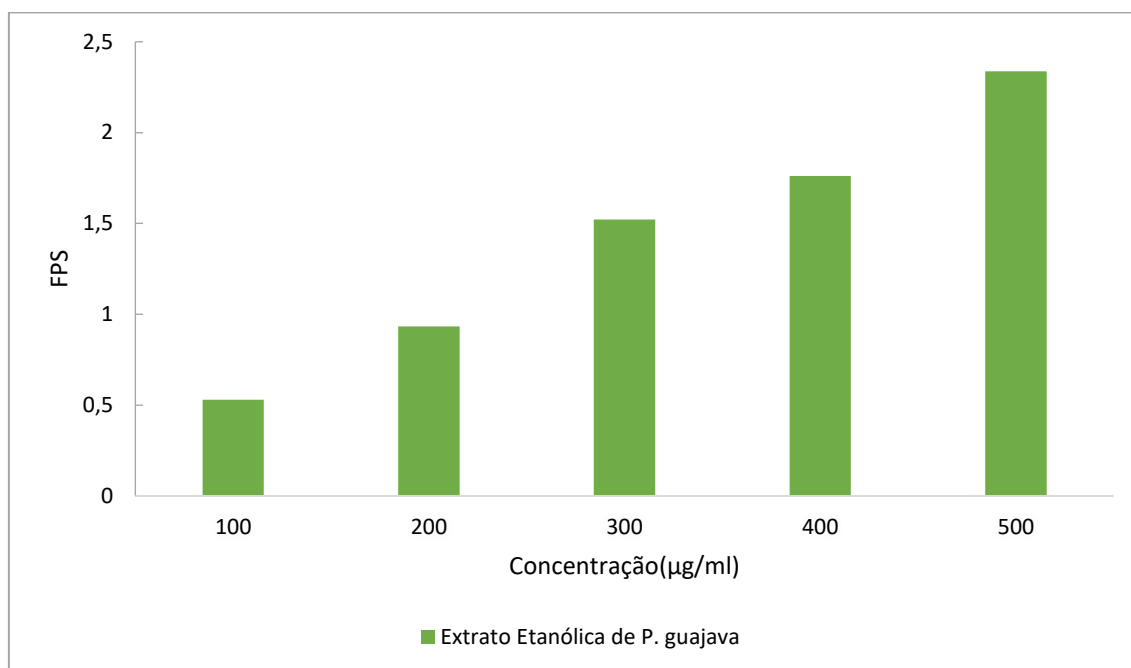
	% SRL				
	100 µg/mL	200 µg/mL	300 µg/mL	400 µg/mL	500 µg/mL
Extrato	56,805 ± 0,363	63,702 ± 0,408	77,737 ± 0,457	89,715 ± 0,638	99,153 ± 0,457

BHT	63,944 ± 0,554	30,550 ± 0,554	20,447 ± 0,554	26,436 ± 0,554	66,001 ± 0,733
AA	59,830 ± 0,105	75,862 ± 0,000	78,523 ± 0,105	77,676 ± 0,000	78,463 ± 0,105

Avaliação da atividade fotoprotetora UVB in vitro dos extratos

Utilizou-se as mesmas soluções do extrato de *Psidium guajava* para medir as absorvâncias dos comprimentos de onda estabelecidos entre 290 a 320 nm (espectro da região UVB). Em sequência, os valores encontrados foram aplicados em uma equação referenciada por MANSUR, *et al.*, 1986, empregada para determinar do FPS, como mostra o gráfico representado na figura 4 abaixo.

Figura 4 – Gráfico do delineamento de fotoproteção UVB



CONSIDERAÇÕES FINAIS (ou Conclusão)

A avaliação antioxidante demonstrou que o extrato das folhas de *Psidium guajava* apresentou um maior efeito antioxidante quando comparado com o BHT. Já em relação ao ácido ascórbico, o extrato em questão, apresentou valor inferiores. O fator que explica essa atividade é a presença de taninos e de flavonoides, justamente os compostos que foram encontrados nos ensaios do extrato etanólico de *P. guajava*, empregando a cromatografia.

Os resultados do FPS calculado na pesquisa não foram satisfatórios, uma vez que, todos os resultados obtidos foram inferiores a 6, no entanto existem estudos que demonstram

valores de FPS favoráveis referentes a espécie *Psidium guajava*, sendo assim, nesse contexto, observa-se que pode ter existido alguma interferência durante a pesquisa, então para uma melhor análise desse extrato seria interessante uma reavaliação considerando diferentes concentrações das soluções do extrato em questão.

REFERÊNCIAS

BAE, G. U. *et al.* Hydrogen peroxide activates p70(S6k) signaling pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 274, ed. 46, p. 32596-602, 1999.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da saúde. Resolução RDC nº 30 de 01 de junho de 2012. Aprova o Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília, 4 jun. 2012.

FRANÇA, C. F. **Perfil cromatográfico qualitativo de plantas da RENISUS**. 2018. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia) – Universidade de Brasília, Brasília, 2018.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE, J. M.; CROSS, C. E. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, v. 119, ed. 6, p. 598-620, 1992.

MANSUR, J. S. *et al.* Determinação do fator de proteção solar por espectrofotometria. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 3, n. 61, p. 121-124, 1986.

MUNHOZ, V. M. *et al.* Avaliação do fator de proteção solar em fotoprotetores acrescidos de extratos da flora brasileira rica em substâncias fenólicas. **Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.**, v. 33, p. 225-232, 2012.

OLIVEIRA, I. P.; OLIVEIRA, L. C.; MOURA, C. S. F. T.; LIMA JÚNIOR, A. F.; ROSA, S. R. A. Cultivo da goiabeira: do plantio ao manejo. **Revista Faculdade Montes Belos**, Goiás, v. 5, n. 4, p. 139-156, ago. 2012.

POLONINI, H. C.; BRANDÃO, M. A. F., RAPOSO; N. R. B. A natural broad-spectrum sunscreen formulated from the dried extract of Brazilian *Lippia sericea* as a single UV filter. **RSC Adv.**, ed. 107, p. 62566-62575, 2014.

PORTILHO, L. Pesquisa diz que 70% dos brasileiros não usam filtro solar todo dia e 80% não sabem quanto aplicar. **BBS**. 2018. Disponível em: <<https://www.segs.com.br/saude/99582-pesquisa-diz-que-70-dos-brasileiros-nao-usam-filtro-solar-todo-dia-e-80-nao-sabem-quanto-aplicar.html>>. Acesso em: 21 jul. 2020.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RATTANACHAIKUNSOPON, P.; PHUMKHACHORN, P. Contents and Antibacterial Activity of Flavonoids Extracted From Leaves of *Psidium guajava*. **Journal of Medicinal Plants Research**. v. 4, n. 5, p. 393-396, 2010.

SANDA, K. A. *et al.* Pharmacological aspects of *Psidium guajava*: An update. **International Journal of Pharmacology**. v. 7, n. 3, p. 316-324, 2011.

SANTOS, C. M. S.; SOUZA, P. H. G. Avaliação da Atividade Fotoprotetora da Curcumina. **Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia**. Rio de Janeiro-RJ: Perspectivas da Ciência e Tecnologia, v. 9, 2017.

SAYRE, R. M. *et al.* Comparison of in vivo and in vitro testing of sunscreens formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, p. 559-565, 1979.

SILVA, R. V. *et al.* Atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato bruto de casca de *Spondias purpurea* L. e sua incorporação em uma formulação farmacêutica. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 509-514, 2016.

SGARBI, F. C.; CARMO, E. D.; ROSA, L. E. B. Radiação ultravioleta e carcinogênese. **Revista de Ciências Médicas**, v. 16, p. 245-250, 2007.