UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

Variabilidade química e atividade antioxidante dos frutos de *Caesalpinia ferrea* Mart.

Bolsista: Paulo Senna Taylor Bittencourt, CNPQ

MANAUS
2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL
PIB-E/0019/2010

Variabilidade química e atividade antioxidante dos frutos de *Caesalpinia ferrea* Mart.

Bolsista: Paulo Senna Taylor Bittencourt, CNPQ
Orientadora: Profª. Drª. Rita de Cássia Saraiva Nunomura

MANAUS
2011

RESUMO

A *Caesalpinea ferrea* também conhecida popularmente como jucá, é uma árvore encontrada na região norte-nordeste do Brasil, onde seus frutos são utilizados na medicina popular no tratamento de infecções, bronquite, diabetes além de possuir propriedades cicatrizantes. Uma vez que essa espécie possui potencial como planta medicinal, neste trabalho foi iniciado o estudo da atividade antioxidante e dos perfis químicos do fruto de jucá encontrado na região centro-sul de Manaus. Após classificação dos frutos, no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), foram armazenados em baixa temperatura e posteriormente colocados em uma estufa com circulação a 60 ºC para retirar a umidade. As amostras do fruto de jucá foram separadas entre casca da vagem e semente, ambas foram moídas, e então foi realizada a extração dos constituintes em sohxlet utilizando metanol como solvente. Após 18 horas de extração as amostras de extrato bruto foram armazenadas e então submetidas à análise de cromatografia em camada delgada. As placas cromatográficas revelaram a presença de atividade antioxidante no extrato da casca e sementes, e também destacou a presença de compostos fenólicos e flavonóides. No extrato bruto da semente foi possível apenas observar a presença de substâncias apolares e atividade antioxidante na parte polar. As amostras dos extratos brutos foram particionadas e submetidas novamente a análise em cromatografia de camada delgada utilizando reveladores específicos para substâncias antioxidantes, flavonóides e fenólicos. Todas as frações da casca apresentaram atividade antioxidante, nas frações de acetato de etila, clorofórmica e hidroalcoólica foi observada a presença de flavonóides e fenólicos. No extrato da semente apenas na fração de acetato de etila foi observada possível atividade antioxidante. A quantificação de fenólicos totais mostrou que na casca do fruto possui maior concentração de fenólicos chegando ter em média de 0,3 mg/mL equivalentes de ácido gálico e para a semente a média foi de 0,03 mg/mL. E por fim no teste de DPPH as amostras dos extratos de cascas e sementes de jucá necessitam em média de 8 µg/mL e 194,5 µg/mL de extrato, respectivamente, para capturar 50% de radicais livres presentes em uma solução de DPPH 0,2 mg/mL. Esse resultado da casca se mostrou equivalente ao resultado da quercetina de 7,76 µg/mL. Através destes resultados conclui-se que a casca da vagem do jucá apresenta um grande potencial antioxidante, e estudos mais aprofundados para a caracterização e isolamento dos princípios ativos na casca da vagem são necessários, assim como o estudo toxicológico e de outras atividades para validação dessa espécie como planta medicinal e se possível futuramente contribuir para o desenvolvimento de um fitoterápico.

Sumário

RESUMO 3
Sumário 4
INTRODUÇÃO 5
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 6
Atividade antioxidante 6
METODOLOGIA 7
Preparo de amostras 7
Extrato alcoólico 7
Extrato aquoso 7
Cromatografia de Camada Delgada 7
Partições das amostras de extratos alcoólicos. 8
Teste para fenólicos totais 9
Teste para captura de radicais livres (DPPH) 9
Cromatografia em fase gasosa 9
RESULTADOS E DISCUSSÕES 10
Extrato metanólicos 10
Estudo dos extratos metanólicos e análise em CCD de fase normal. 10
Partições das amostras de extratos alcoólicos. 12
Teste para fenólicos totais 14
Teste de captura de radicais livres (DPPH) 15
Cromatografia em camada gasosa 15
CONCLUSÕES 16
REFERECIAS BIBLIOGRÁFICAS 17
CRONOGRAMA REALIZADO ..... **Erro! Indicador não definido.**

INTRODUÇÃO

A Amazônia é conhecida pela sua grande biodiversidade de espécies de plantas, e somado ao uso tradicional de suas espécies pela população local, tem sido um importante alvo de estudo na busca de constituintes químicos e de suas possíveis atividades biológicas. Das espécies vegetais amazônicas, calcula-se que 10 a 20% são conhecidas e das espécies de uso popular, muitas não foram estudadas quimicamente ou não tem sua atividade biológica comprovada (Gottlieb e Kaplan, 1990).

As plantas representaram, durante séculos, a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No inicio do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todas as novas drogas. (Hostettmann, 2003).

Aliar o conhecimento popular ao científico em busca de novos medicamentos farmacoterápicos e fitoterápicos é um dos principais caminhos para o sucesso de pesquisas na área de plantas medicinais. Isso é benéfico para as famílias que habitam os ecossistemas florestais, que podem obter dos recursos naturais e da sua conservação seu desenvolvimento sustentado, e para a população em geral, pelo acesso a novos e eficazes medicamentos (Di Stasi e Himura-Lima, 2002).

A *Caesalpinia ferrea* é um exemplo de planta que apresenta várias indicações pela população local. Na região amazônica, várias são as utilizações medicinais dessa espécie. Suas folhas, na forma de decocto, são utilizadas externamente no combate contra hemorróidas, enquanto o uso interno dessa decocção é indicado contra amebíase e problemas hepáticos, além de ser empregado como fortificante para crianças. O sumo das folhas é usado internamente para problemas cardíacos. A infusão conjunta das folhas e frutos é útil para tratar inflamações do fígado e tuberculose, enquanto a decocção da casca é usada internamente como antidisentérico. O preparado da casca com um litro de água e um quilo de açúcar, aquecido até formar um xarope, é utilizado contra asma e bronquite. A infusão conjunta da raspa da casca com folhas de manga é útil como antigripal e antitussígeno, ao passo que o preparado de casca de jucá, casca de jatobá, folhas de manga, açúcar e água, após aquecimento, é utilizado como anticatarral. A vagem crua é útil contra tosse, inflamações do fígado e baço, bem como contra desarranjo menstrual e problemas renais e pulmonares. .(Di Stasi e Himura-Lima, 2002).

Sabendo que as atividades biológicas do jucá estão relacionadas com a atividade antioxidante este projeto tem como objetivo analisar o perfil químico da casca e da semente do fruto de jucá através de métodos cromatográficos qualitativos, além de realizar testes de atividade antioxidante nos extratos e frações a fim de relacioná-las a classe de substâncias apresentadas.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A *Caesalpinia ferrea*, conhecida popularmente como jucá, é uma espécie vegetal da região amazônica que recebe várias indicações da população local para o tratamento de doenças. Possuem propriedades cicatrizantes, ajuda no tratamento de cólicas intestinais, bronquite, diabetes e entre outros. Na forma de chá, é utilizado para tratar hemorragias, inflamações problemas renais e pulmonares (Di Stasi e Himura-Lima, 2002).

Estudos comprovam que os frutos apresentam atividade quimiopreventiva contra o câncer (Nakamura et al., 2002), atividade antiinflamatória (Carvalho, et al., 1992), antiúlcera (Bachi et al., 1995) e inibidora da aldose reductase, uma enzima relacionada à diabetes (Ueda et al., 2001). Dos frutos dessa espécie, foram isolados ácido gálico, o galato de metila (Nakamura et al., 2002) e o ácido elágico (Ueda et al., 2004).

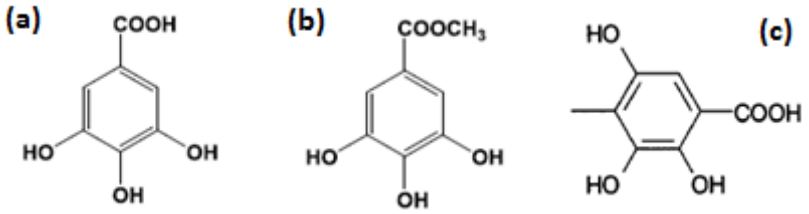


Figura 1. *Estrutura molecular do (a) ácido gálico, (b) galato de metila e (c) ácido elágico.*

Atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes ser enzimáticos ou não enzimáticos, tais como que α-tocoferol (vitamina E), β-caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) (Halliwell, 2001). O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos presentes na maioria das plantas que inibem a formação de radicais livres, também chamados de substâncias reativas, tem sido associado a uma menor incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo (Droge, 2002).

Existem muitos tipos de doenças que podem ser causadas por processos degenerativos no organismo. Esses processos ocorrem devido a espécies altamente reativas de oxigênio, que se comportam como radicais livres, presentes após o metabolismo nas células. Portanto, as plantas merecem uma atenção especial, pois sintetizam uma grande quantidade de metabólitos que podem capturar esses radicais livres. O estudo fitoquímico dessas plantas é essencial para o desenvolvimento de novas drogas, já que esses estudos visam à descoberta de possíveis princípios ativos provenientes de espécies com potencial medicinal (Di stasi, 1995).

METODOLOGIA

Os frutos foram coletados nas regiões sul e centro-oeste de Manaus, as exsicatas foram enviadas ao herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA onde serão identificadas.

Todos os ensaios foram realizados no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), na Coordenação de Pesquisas de Produtos Naturais – CPPN. Durante o período decorrido foram realizadas as extrações da casca da vagem do jucá e das sementes, assim como, estudos realizados em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) de fase normal e de ensaios químicos para a quantificação de fenólicos e de seqüestro de radicais dos extratos obtidos.

Preparo de amostras

As amostras dos frutos, armazenadas em baixa temperatura, foram lavadas em água corrente e em seguida secadas em uma estufa com circulação a 60 ºC. Após secos, os frutos foram separados em três tipos de amostras: casca do fruto, sementes e fruto inteiro. Com o auxilio de um moinho de facas as amostras foram trituradas para extração.

Extrato alcoólico

Das amostras trituradas foram pesadas 40 g de casca do fruto e 10 g da semente, elas foram transferidas para um cartucho e extraídas em metanol em aparelho tipo soxhlet. A extração foi realizada durante 18 horas seguidas utilizando metanol como solvente. O solvente foi trocado a cada 6 h.

Passado o tempo de extração, as soluções dos extratos foram filtradas e em seguida concentradas em um rotaevaporador. Todo o procedimento foi realizado para as amostras de frutos da mesma espécie da planta de 3 indivíduos diferentes.

Extrato aquoso

Das amostras dos frutos previamente trituradas e separadas foram pesadas 40g e 10g de casca do fruto e semente. Logo após foi adicionado 500 mL de água destilada aproximadamente 100 ºC. A extração ocorreu pelo método de infusão, após 15 minutos as soluções contendo os extratos foram filtradas e armazenadas a baixa temperatura, para prevenir o ataque de fungos.

As amostras dos extratos aquosos foram concentradas em um rotaevaporador, adicionando pequenas quantidades de metanol a fim de facilitar a evaporação da água na solução.

Cromatografia de Camada Delgada

Fase estacionária: foram utilizadas, para análise em fase normal, cromatofolhas de sílica gel G 60 F_{254} (Merck)

Fase móvel: Como fases móveis foram utilizadas os eluentes a seguir:

a) Hexano/Acetato de etila nas seguintes proporções (7:3), (6:4), (1:1) e (4:6);

b) Clorofórmio/Metanol nas seguintes proporções (9:1), (8:2), (7:3), (1:1) e (3:7);

c) Acetato de etila/ácido acético glacial/ácido fórmico/água (10:1,1:1,1:2,6);

d) Clorofórmio/acetona/Ácido fórmico (7,5:7,65:0,85);

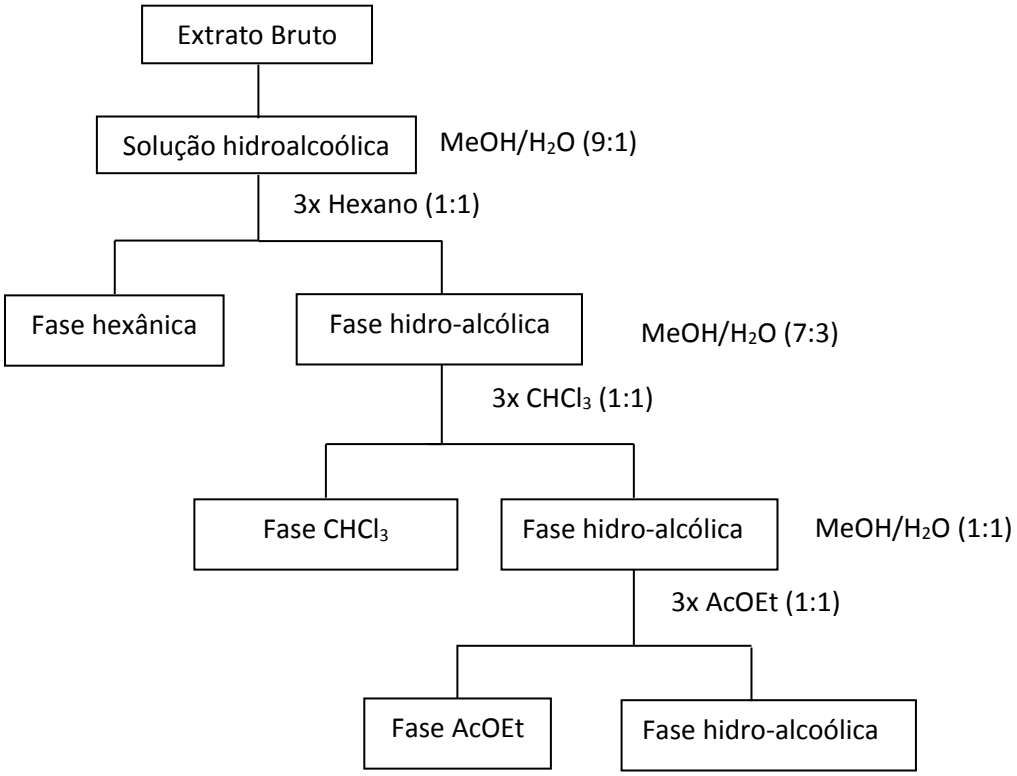
e) Clorofórmio/Acetato de etila (6:4).

Reveladores: Como reveladores universais foram utilizados vapor de iodo e anisaldeido, para revelação de substâncias fenólicas foi utilizado o $FeCl_3$, e para revelar flavonóides o NP-PEG. Os reveladores o DPPH e β-caroteno foram utilizados para detectar a presença de atividade antioxidante.

As amostras dos extratos aplicadas na placa foram preparadas na concentração de 1 mg/mL.

Partições das amostras de extratos alcoólicos.

As partições das amostras dos extratos brutos do jucá foram realizadas utilizando solventes em ordem crescente de polaridade e com volumes proporcionais de acordo com a quantidade de material particionado. As amostras foram solubilizadas inicialmente em uma solução metanol água (9:1) em um volume de 200 mL para o extrato da casca e 50 mL para os extratos das sementes.



Fluxograma 1: *Extração liquído-liquído dos extratos metanólicos da casca e das sementes de jucá.*

Teste para fenólicos totais

Este ensaio consiste na quantificação por espectrofotometria na região do ultravioleta/visível dos compostos fenólicos presentes nas amostras dos extratos metanólicos brutos, através da reação destes com o reagente Folin-Ciocalteu. As amostras foram preparadas na concentração de 0,1 mg/mL, em seguida é adicionado 0,75 mL do reagente Folin-Ciocalteu, diluído 10 vezes, passados 5 minutos é adicionado 0,75 mL de solução bicarbonato de sódio 60 g/L. Após 90 minutos de incubação as amostras são introduzidas em cubetas de vidro e são inseridas no espectrofotômetro FEMTO 800 XI analisando na faixa de 725 nm. Com os valores de absorbância dos padrões e das amostras a curva de calibração e as concentrações das amostras, respectivamente, foram obtidas utilizando a ferramenta do Windows, Microsoft EXCEL 2007.

Teste para captura de radicais livres (DPPH)

O ensaio, descrito por (Braga et al., 2002), foi utilizado para realizar o teste de capacidade de captura de radicais livres pelas amostras dos extratos metanólicos do jucá. Este teste consiste em 1 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,2 mg/mL em 2,5 mL de cada amostras dos extratos brutos do fruto de jucá em concentrações diferentes. O branco foi preparado adicionando 1 mL de DPPH 0,2 mg/mL em 2,5 mL da solução mãe a ser analisada, e o controle da mesma maneira trocando a solução mãe por uma solução de MeOH. Após adicionar à solução de DPPH a amostra foi incubada por 30 minutos e foi inserida na cubeta de vidro. O aparelho utilizado para leitura de absorbância foi o FEMTO 800 XI a 517 nm. Com os dados obtidos foram descobertas as concentrações nos quais as amostras têm a capacidade de captura de 50% dos radicais livres ($CS_{50\%}$) de cada uma das amostras. A ferramenta do Windows, Microsoft EXCEL 2007 foi utilizada para construir os gráficos e as equações da reta para cada amostra. A porcentagem de captura de radicais livres é obtida araves da formula:

$$\% \text{ inibição} = 100-(A_{amostra}-A_{branco}) \times 100/A_{controle}$$

Cromatografia em fase gasosa

Das amostras de frações hexânicas das sementes de jucá foram pesados 10 mg e foram solubilizados em uma solução Hexano/AcOEt (9:1). As amostras então foram inseridas em uma seringa de 10 mL e foram eluidas em uma coluna SEP-PAK de fase normal. A lavagem da coluna foi realizada em 3 etapas onde a primeira e a segunda etapa foi injetado 10 mL de solução Hexano/AcOEt (9:1), e na terceira etapa foi injetado 10 mL de AcOEt 100%. Em cada etapa o líquido na saída foi recolhido em frascos diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Extrato metanólicos

Os extratos metanólicos, após concentrados, foram pesados e então calculados os rendimentos de cada um, a tabela 1 a seguir representa o peso e o rendimento dos extratos metanólicos obtidos. Os indivíduos são de árvores localizadas na zona centro-oeste de Manaus.

Tabela 1: *Valores dos pesos e rendimentos dos extratos alcoólicos de cascas da vagem e sementes do jucá.*

	SEMENTES			CASCA DA VAGEM		
	CFM01	CFM02	CFM03	CFM01	CFM02	CFM03
Peso da amostra (g)	10,0016	10,0085	7,3966	40,0099	40,0085	40,0128
Peso do extrato (g)	0,8968	0,9974	0,8812	18,5745	25,0545	18,1602
Rendimento (%)	8,96657	9,96553	11,9136	46,4248	62,6229	45,386

A utilização de metanol como solvente extrai com mais eficiência, das amostras de cascas e de sementes, substâncias de média à alta polaridade. Ao concentrar os extratos metanólicos das sementes notou-se presença de cristais amarelados o fundo do recipiente translúcido, entretanto, não foi possível recristalizar-los. O maior rendimento foi observado nas cascas dos frutos e o menor foi encontrado nas sementes, sendo que entre os frutos, o indivíduo CFM 02 apresentou maior rendimento e entre as sementes a amostra CFM 03 apresentou maior rendimento. O maior rendimento por parte das amostras de casca ocorre porque nela existe uma grande quantidade de substâncias polares como ácidos orgânicos, compostos fenólicos e flavonóides. Já nas amostras das sementes os rendimentos foram menores devido à predominância de substâncias apolares, isso explica a presença de substâncias insolúveis em metanol no extrato.

Estudo dos extratos metanólicos e análise em CCD de fase normal.

Nas placas cromatográficas obtidas foi possível identificar atividade antioxidante pra todas as partes do fruto, e sugere que a maior atividade antioxidante está presente na casca do fruto. Para os extratos das cascas das vagens (1,2 e 3) e das sementes (4 e 5) foi possível visualizar em CCD, utilizando como Hexano/Acetato de etila (7:3), a presença de atividade antioxidante (Figura 2a).

A fim de separar essas substâncias antioxidantes foi utilizado um sistema com eluentes de maior polaridade, $CHCl_3$/MeOH (1:1). Após eluição e evaporação do solvente, utilizando o revelador DPPH foi possível observar o “arraste” de substâncias antioxidantes, e utilizando o revelador para fenólicos ($FeCl_3$ 10%) observou-se a

presença de fenólicos nas amostras das cascas da vagem (Figura 2b). Fazendo uso de um sistema descrito por Wagner, utilizando acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético glacial/água (100:11:11:26) foi possível detectar a presença de flavonóides (Figura 2c). Revelando com β-caroteno não observou-se a presença de substâncias antioxidantes.

O teste para detectar a presença de ácido gálico nas amostras das cascas foi realizado utilizando o sistema $CHCl_3$/MeOH (1:1) em amostras diluídas na concentração de 1 mg/ml. Não foi possível detectar a presença de ácido gálico através da CCD (Figura 1d).

Nas sementes do fruto utilizando como eluentes hexano/acetato de etila (7:3) e revelando a placa com vapor de iodo, foi possível observar a presença de substâncias com ligações saturadas que foram arrastadas pela fase móvel (Figura 2e).

O DPPH revelou atividade antioxidante de substancias de maior polaridade, retidas na origem da placa, porém, não apresenta presença de fenólicos, flavonóides e substâncias capazes de impedir a descoloração do β-caroteno.

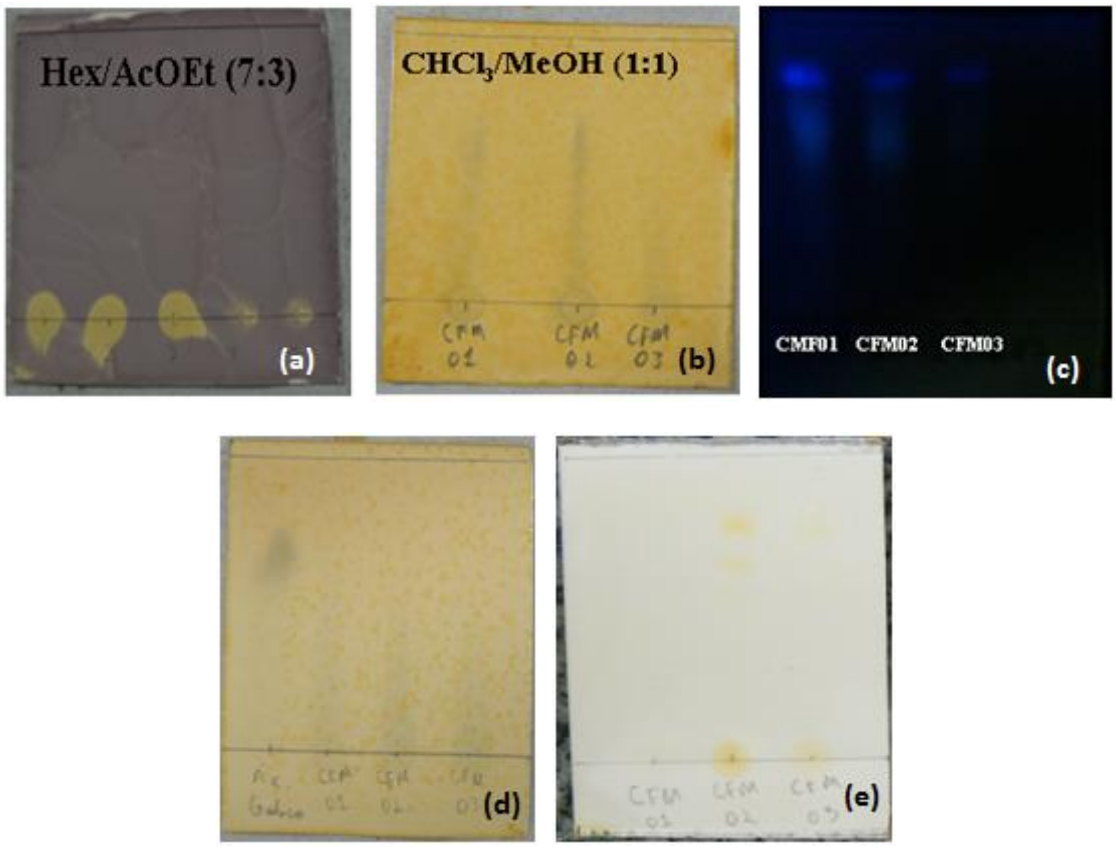


Figura 2. *Análise em CCD,em fase normal, dos extratos metanólicos brutos da casca do fruto de jucá utilizando como reveladores (a) DPPH,(b) $FeCl_{3(aq)}$,(c) NP-PEG, (d) Teste para identificar a presença de ácido gálico através do tempo de retenção e (e) análise em CCD das amostras dos extratos metanolicos das sementes de jucá revelados em vapor de iodo.*

Partições das amostras de extratos alcoólicos.

As partições das amostras dos extratos brutos foram realizadas para determinar as frações que contem substancias atividade antioxidantes. O rendimento das frações é apresentado na tabela 3 a seguir:

Tabela 3: *Rendimento das frações dos extratos metanólicos do fruto de jucá.*

Rendimento	Hexano	AcOEt	CHCl3	Hidro
CFM01 IA	22%	4%	9%	46%
CFM02 IA	10%	1%	8%	44%
CFM03 IA	18%	5%	1%	37%
CFM03 IIA	3%	18%	4%	69%

Onde CFM = *Caesalpinea ferrea* Martius; 01, 02 e 03 = indivíduos; I e II = semente e casca respectivamente; e A é o solvente metanolico.

O rendimento obtido para as frações hexânicas das sementes foram relativamente maiores comparados ao rendimento da mesma fração para a casca da vagem. Isso ocorre porque existe uma maior quantidade de substâncias apolares na semente, como observado na figura 3a. Para a casca da vagem a fração acetato de etila apresentou maior rendimento.

As análises em cromatografia de camada delgada das frações do extrato metanólico da casca da vagem foram realizadas utilizando como reveladores NP-PEG, Anisaldeido, DPPH e $FeCl_3$ 10% para a caracterização de flavonóides, compostos em geral, substâncias antioxidantes e fenólicos, respectivamente.

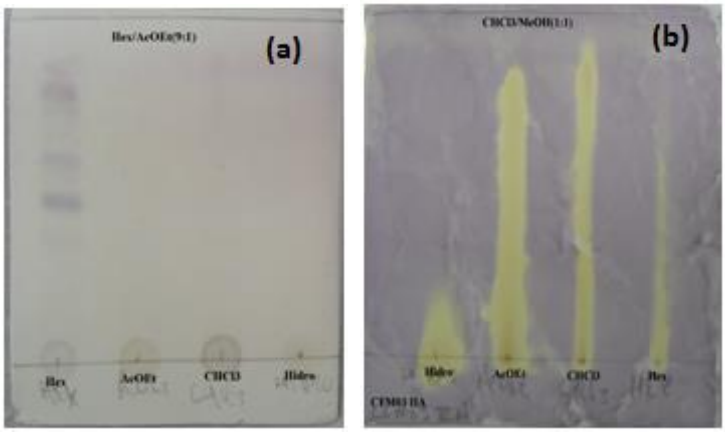


Figura 3. *Análise em CCD, em fase normal, das partições do extrato metanolico bruto da casca do fruto de jucá utilizando os reveladores (a) Anisaldeído e (b) DPPH.*

A figura 3b a atividade antioxidante nas frações obtidas, as frações de acetato de etila, clorofórmica mostraram a presença de substancias de média polaridade devido a o arraste destes quando eluidos em uma solução de média polaridade, a fração hexânica apresenta pouca atividade antioxidante. E por fim, na fração hidro-

alcoolica, notou-se a presença de substâncias polares que permaneceram na origem e que possuem atividade antioxidante.

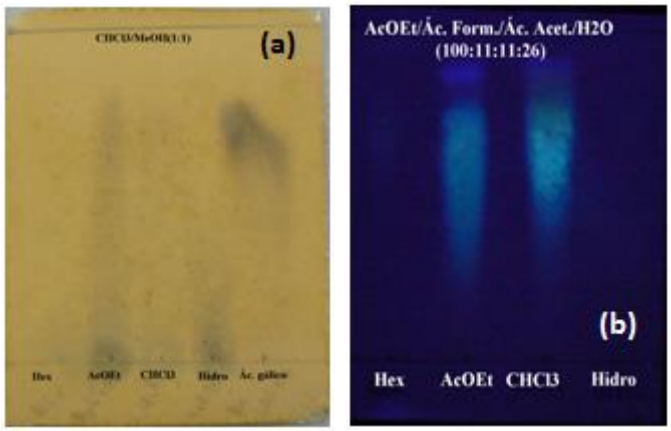


Figura 4. *Análise em CCD, em fase normal, para investigar a presença de substancias (a) fenólicas e (b) flavonóides, utilizando como reveladores $FeCl_{3(aq)}$ 10% e NP-PEG respectivamente.*

As duas placas cromatográficas mostradas nas figuras 4a e 4b mostram que as frações de acetato de etila e a clorofórmica possuem compostos fenólicos e flavonóides, que estão geralmente associadas com a atividade antioxidante. E a fração de acetato de etila possivelmente possui ácido gálico.

Nas frações das sementes não é detectado a presença de substâncias fenólicas, porém, revelando com DPPH é possível observar que na fração de acetato de etila estão contidas praticamente todas as substancias antioxidantes do extrato metanólico da semente.

Figura 5. *Atividade Antioxidante das frações da semente.*

Sabendo que na fração de acetato de etila está contida a maior parte dos compostos antioxidantes o estudo dessas substâncias ativas no fruto pode ser realizado com maior facilidade.

Teste para fenólicos totais

O teste para fenólicos totais apresentou resultados bons para a casca do fruto, comprovando que este apresenta uma maior concentração de fenólicos do que nas sementes, resultado que foi sugerido anteriormente pelas análises em CCD utilizando como revelador o $FeCl_3$ 10%.

Usando os valores das leituras de absorbâncias dos padrões de ácido gálico foi possível montar a curva de calibração.

Com os valores das médias foi possível montar a curva de calibração.

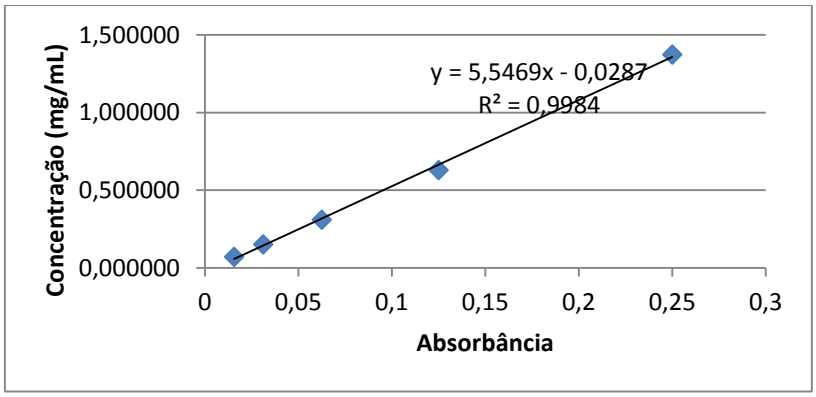


Grafico 1. *Curva de calibração do ácido gálico.*

A partir desse gráfico foi possível quantificar a concentração de fenólicos em equivalentes de ácido gálico nas amostras dos extratos alcoólicos do jucá.

Tabela 4: *Concentração de fenólicos nas amostras de extratos do fruto.*

	Abs.$_1$	Abs.$_2$	Abs.$_3$	Abs. $_{média}$	desvio	erro	C (µg/mL)
CFM01 IA	0,116	0,120	0,120	0,119	0,002	2%	24
CMF02 IA	0,171	0,131	0,142	0,151	0,021	14%	30
CMF03 IA	0,193	0,173	0,208	0,191	0,018	9%	38
CMF01IIA	1,386	1,386	1,537	1,436	0,087	6%	265
CMF02IIA	1,960	1,983	2,183	2,042	0,123	6%	376
CMF03IIA	1,900	1,831	1,863	1,865	0,035	2%	343

Os resultados das analises são expressos em µg/mL equivalentes de ácido gálico. Onde: CFM = *Caesalpinia ferrea martius;* 01,02 e 03 = *número dos indivíduos;* I e II = *Semente e casca da vagem e A = Solvente metanólico.*

A partir dos resultados obtidos, pode-se observar que na casca da vagem estão concentradas as substâncias fenólicas do fruto. Dentre as amostras de casca da vagem o individuo CFM02 apresenta maior concentração de fenólicos. A casca da vagem por estar mais exposta que as sementes necessitam de mecanismos para se defender de predadores ou até de condições geradas pelo ambiente como a radiação

ultravioleta, a presença de substancias fenólicas garantem essa proteção nas cascas do fruto

Teste de captura de radicais livres (DPPH)

O teste para captura de radicais livres pelas amostras de jucá apresentou bons resultados, principalmente para as cascas das vagens de jucá, onde se destacou o individuo CFM02 IIA que apresentou CS_{50} de 6,2 μg/mL, comparável ao controle positivo utilizado, quercetina, que apresenta CS_{50} de 7,5 μg/mL A tabela 4 a seguir exibe as CS_{50} para cada uma das amostras.

Tabela 5: *Capacidade de captura de 50% dos radicas livres em µg/mL de extratos metanólicos de cascas e sementes de Caesalpinia férrea.*

	CFM01IA	CMF02IA	CMF03IA	CMF01IIA	CMF02IIA	Quercetina
$C_{50\%}$(μg/mL)	180,75	84,30	209,98	10,93	6,20	7,76

Onde: CFM = *Caesalpinia ferrea martius;* 01,02 e 03 = *número dos indivíduos;* I e II = *Semente e casca da vagem e A = Solvente metanólico.*

As amostras das cascas das vagens de jucá apresentam maior atividade antioxidante, a concentração para que essas amostras capturem 50% de radicais DPPH 0,2 mg/mL é tão pequena que chega a ser comparável com o controle positivo utilizado. Considerando que são extratos, essa atividade é bastante significativa.

A presença de uma maior concentração de substancias antioxidantes na casca já era esperada, devido à presença de compostos fenólicos e flavonóides que são encontrados em maior quantidade na casca. Através desses dados é possível relacionar a atividade antioxidante das partes dos frutos com a quantidade de fenólicos presentes. Quanto maior a quantidade de compostos fenólicos maior será atividade antioxidante.

Cromatografia em camada gasosa

As análises não apresentaram resultados significativos devido a metodologia utilizada, a metodologia será otimizada para melhorar a identificação dos constituintes da amostra. As análises serão otimizadas e trabalhadas com a renovação do projeto se baseando nos resultados obtidos nas placas cromatográficas.

CONCLUSÕES

Dos resultados obtidos no estudo da atividade antioxidante do fruto de jucá pode-se dizer que o fruto encontrado na cidade de Manaus apresenta grande capacidade de captura de radicais livres afirmando seu potencial grande como antioxidante.

A extração contínua em aparelhagem soxhlet utilizando metanol como solvente permite retirar uma grande concentração de substâncias de média e alta polaridade, principalmente na casca da vagem. O rendimento da extração metanólica da semente apresenta rendimento menor devido à predominância de substâncias apolares.

As análises em cromatografia em camada delgada mostraram que os extratos da casca contem uma grande concentração de substancias antioxidante como fenólicos e flavonóides, já na semente a revelação com anisaldeido, em eluente apolar, comprova que na semente é encontrado substancias apolares. Também foi possível observar que esses compostos possuíam grande interação com a fase estacionaria de sílica gel, afirmando sua alta polaridade.

Nas partições dos extratos pode-se observar que na casca da vagem a atividade antioxidante está presente em todas as frações, sendo que, na fração de acetato de etila é encontrada grande parte dos compostos antioxidantes como flavonóides e fenólicos. A fração hexânica apresenta menor atividade antioxidante da casca, e a fração clorofórmica é rica em flavonóides, porém, possui baixa quantidade de compostos fenólicos. A fração hidroalcoólica, sendo a fração mais polar do extrato, é rica em compostos fenólicos. Já nas frações dos extratos das sementes a atividade antioxidante está concentrada exclusivamente na fração de acetato de etila e na fração hexânica são encontrados compostos apolares, que estão sendo analisados por CG-EM para identificação dos principais constituintes.

O teste de fenólicos totais comprova que a casca possui maior concentração de fenólicos do fruto, chegando a possuir uma concentração de 10 vezes mais fenólicos que nas sementes. Os resultados das concentrações dos compostos fenólicos dos extratos são expressos em equivalentes de ácido gálico. O teste de captura do radical DPPH mostrou que as amostras de extratos metanólicos de jucá possuem um grande poder antioxidante. A concentração para que a amostra de extrato metanólico da casca da vagem do jucá capture 50% dos radicais livres é de aproximadamente 6 μg/mL resultado que pode ser comparado a capacidade de captura de radicais livres do padrão utilizado.

Portanto, o fruto de jucá possui um grande potencial como antioxidante e o próximo passo é identificar os principais constituintes ativos presentes. Na renovação desse projeto, será possível dar continuidade ao trabalho através da obtenção do perfil cromatográfico das cascas dos frutos e sementes por métodos cromatográficos tais como CLAE-DAD (Cromatografia líquida de Alta Eficiência) e CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada a um espectrômetro de massas).

REFERECIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Blois, M. S.** Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, v.181, n.4617, p.1199-1200, 1958.
2. **Borrás, M. R. L.** Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – *Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa*. *Ed. Valer/Governo do Estado do Amazonas*, pp. 19-27. 2003.
3. **Braça et al. 2002**. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*.
4. **Carvalho, J. C. T.; Texeira, J. R. M.; Souza, P. J. C.; Bastos, J. K.; dos Santos Filho, D.; Sarti, S. J. (1996).** Premilinary studies of analgesic and anti-inflammatory proprieties of *Caesalpinia ferrea* crude extracts. *Journal of ethnopharmacology*, 53, 175-178.
5. **Di Stasi, Luiz Claudio. Hiruma-Lima Akilo Clélia.** Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica. *Editora UNESP.* 2002.
6. **Di Stasi, Luiz Claudio.** Plantas medicinais: arte e ciência. *Editora UNESP*. 1995.
7. **Droge, W**. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews*, v. 82, PP.47-95, 2002.
8. **Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C.** (1990). Amazônia: tesouro químico a preservar. *Ciência hoje*, pp. 17-20.
9. **H. Ueda, Y. Tachibana, M. Moriyasu, K. Kawanishi and S. M. Alves**. (2001). Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea Mart.* Phytomedicine, Vol. 8(5), pp. 377–381.
10. **Halliwel, B**. Free radicals and other reactive species in disease. *Encyclopedia of Life Sciences*. Nature Publishing Group, 2001. pp. 1-7.
11. **Hostettmann, Kurt. Queiroz, F. Emerson, Vieira, C. Paulo.** Principios Ativos de Plantas superiores. *EDUFUSCAR*. 2003
12. **Nakamura, E. S.** Cancer chemopreventive effects of Caesalpinia ferrea and related compounds. *Cancer Letters*, v. 177, n. 2, p. 119-124, 2002.
13. **Neto, Francisco Radler de Aquino. Nunes, Denise da S. e Souza**. Cromatografia: principios básicos e técnicas afins. *Editora Interciência ltda*. 2003. 1º Edição. pp. 30 e 31.
14. **Velioglu, Y. S., Mazza, G., Gao, L. Oomah, B. D.**. Antioxidant activity and total Phenolics in selected fruits, vegetables and grains products. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 8, 4113-4117. 1998.

15. **Wagner, H. Bladt, S.** Plant drug analysis: A thin layer Chromatography Atlas. Springer. 2º Edição**.** pp. 230. 1995.