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* MARTIUS.

Bolsita: Paulo Senna Taylor Bittencourt, CNPQ

MANAUS

2012

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/0083/2011

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

Bolsista: Paulo Senna Taylor Bittencourt, CNPQ

Orientador (a): Dra. Prof.ª Rita de Cássia Saraiva Nunomura

MANAUS

2012

Resumo

A *Caesalpinea ferrea* também conhecida popularmente como jucá, é uma árvore encontrada principalmente 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. Devido ao seu alto potencial como planta medicinal, e poucos estudos realizados sobre o perfil químico dos frutos, foi iniciado o estudo químico e da atividade antioxidante do fruto de jucá encontrado na região centro-sul de Manaus. Os extratos da caca e das sementes de jucá foram obtidos através de extração continua via sohxlet utilizando metanol como solvente e em seguida particionado com solventes em ordem crescente de polaridade. Estudos anteriores mostraram que a casca do fruto apresenta maior atividade antioxidante comparado a semente, portanto, nesse projeto serão estudadas as frações da casca do fruto. O ensaio de captura de radicais livres foi realizado nas frações da casca do fruto de jucá e mostrou que a fração de acetato de etila obteve o melhor resultado na captura de 50% dos radicais livres de DPPH (7,8 µg/mL), já a fração hexânica, obteve o pior resultado de (73,1 µg/mL). Através da técnica de cromatografia em camada delgada de fase reversa pode-se afirmar a presença de compostos polares influência na eficiência da captura dos radicais livres. Os ensaios em CG-EM permitiram criar perfis da amostra da semente já que ela apresenta maior quantidade de substâncias apolares, porém, as condições utilizadas na reação de sililação não foram eficazes para que a reação ocorresse. Os perfils cromatográficos revelaram a presença de ácidos graxos, sigmasterol, lupeol e lupenona, estes últimos podem estar relacionados com a atividade anti-inflamatória e anticancerígena do fruto.

Palavra chave: Jucá, DPPH, EM/ESI

.

Sumário

Resumo 3
1. Introdução 5
2.1. A espécie Caesalpinia ferrea Martius 6
2.2. Substâncias fenólicas como antioxidantes 6
2.3. Métodos de isolamentos de substâncias orgânicas de origem natural 7
3. Metodologia 9
3.1. Teste para captura de radicais livres (DPPH) 9
3.2. Análise dos constituintes apolares das sementes por cromatografia em fase gasosa 9
3.3. Tratamento da fração hexânica por extração em fase sólida (EFS) 10
3.4. Sililação 10
3.5. Condições de análise 10
3.6. Análise dos constituintes de média a alta polaridade por cromatografia em camada delgada de fase reversa 11
3.7. Espectrometria de massas 11
4. Resultados e discussões 12
4.1. Teste para captura de radicais livres (DPPH) 12
4.2. Cromatografia em fase gasosa 13
4.3. Sililação 13
4.4. Identificação estrutural dos constituintes da fração hexânica do extrato metanolico da semente de jucá. 13
4.5. Cromatografia em camada delgada de fase reversa 14
4.6. Espectro de massas 17
5. Conclusão 19
6. Referências bibliográficas 20

1. Introdução

A região amazônica reserva provavelmente o bioma mais importante do planeta devido a sua enorme área e seu complexo ecossistema. A floresta amazônica mesmo com um solo pobre consegue se estabilizar através de fatores como a umidade, alta precipitação e reciclagem da matéria orgânica gerada, apesar dessa estabilidade qualquer atividade descontrolada pode acarretar a destruição da floresta. (Seidl, Gottlieb & Kaplan, 1993)

O Brasil contribui com 120 mil espécies de plantas no qual cerca de 2 mil destas são conhecidas pela medicina popular e 10% tem estudos científicos realizados. Muitas dessas plantas são consumidas pelo homem há séculos como forma de melhorar a suas chances de sobrevivência, e com o passar do tempo percebeu-se que a utilização de certas partes das plantas na forma de tinturas, chás e etc, têm propriedades que beneficiam o organismo e resultavam na recuperação da saúde. (Harri Lorenzi, 2002)

Aliar o conhecimento popular ao cientifico é de suma importância uma vez que o conhecimento popular vem sendo modificado com o passar do tempo e até mesmo extinto, principalmente pela influência dos meios de comunicações em massa e pela própria destruição da floresta, que vem crescendo em números alarmantes nos últimos anos devido à mineração, o garimpo e outras atividades extrativistas. (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. 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). Apesar do vasto conhecimento sobre a utilização medicinal da planta, poucos são os estudos realizados para garantir a sua eficiência na cura de doenças e até mesmo os malefícios que ela pode gerar se consumida demasiadamente. Este projeto tem como objetivo traçar o perfil químico do fruto de jucá, assim como, realizar testes de atividade antioxidante nas frações do extrato metanolico bruto.

2. Revisão bibliográfica

2.1. A espécie *Caesalpinia ferrea* Martius

A espécie *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. Possui diversas propriedades medicinais, entre elas cicatrizantes, ajuda no tratamento de cólicas intestinais, bronquite, diabetes e entre outros. Na forma de chá, utiliza-se essa planta 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., 1996), antiúlcera (Bachi et al., 1995) e inibidora da aldose redutase, uma enzima relacionada à diabetes (Ueda et al., 2001). Dos frutos dessa espécie, foram isolados o ácido gálico, o galato de metila (Nakamura et al., 2002) e o ácido elágico (Ueda et al., 2004).

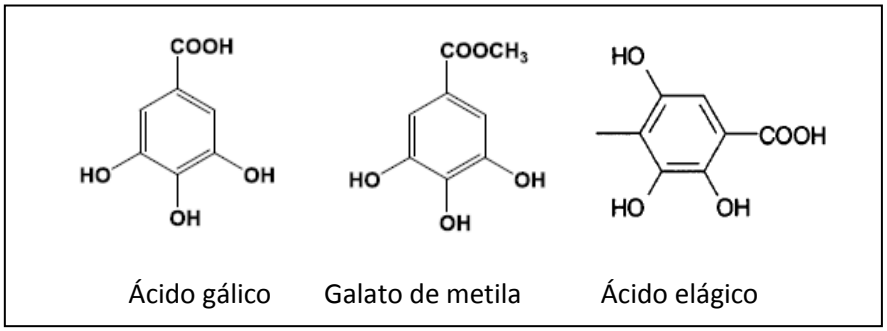

Figura 1: *Substâncias isoladas do fruto de jucá. (FONTE: Ueda et al., 2004)*

2.2. Substâncias fenólicas como antioxidantes

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estes, serem 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. A presença de antioxidantes ajuda a estabilizar os radicais livres gerados pela peroxidação dos ácidos graxos, constituintes da dupla camada lipídica das células, que podem levar morte da célula que é um dano irreversível (Podda, 2001). 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).

Os antioxidantes podem ser classificados em dois tipos. Os antioxidantes primários são capazes de interromper a cadeia de radicais, cedendo hidrogênio a um radical livre e assumindo a forma de radical estável. Pode-se incluir nesse grupo os compostos fenólicos, que apresentam grupos doadores de elétrons nas posições orto e para de sua cadeia cíclica. Os secundários reduzem o processo de iniciação, utilizando agentes quelantes de metais como, por exemplo, o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e o ácido cítrico (GORDON, 1990). A presença de antioxidantes ajuda a estabilizar os radicais livres gerados pela peroxidação dos ácidos graxos, constituintes da dupla camada lipídica das células, que podem levar morte da célula.

A obtenção de compostos fenólicos e flavonóides com propriedades químicas ou farmacêuticas podem ser comercialmente interessantes, a quantificação e identificação desses compostos também é importante, pois, podem apresentar riscos se consumidos em excesso e até mesmo apresentar toxicidade. As técnicas de cromatografia, aliada aos métodos espectroscópicos, são comumente utilizadas na quantificação e determinação de substâncias fenólicas e flavonóides. (Xinying Li et al., 2009).

2.3. Métodos de isolamentos de substâncias orgânicas de origem natural

A cromatografia é uma técnica utilizada para separar componentes de uma mistura complexa, essa separação ocorre devido à afinidade das substâncias presentes na amostra com a fase estacionária ou a fase móvel. A fase estacionária pode ser um sólido, um líquido retido sobre um sólido ou um gel. A fase móvel pode ser líquida ou gasosa. O perfil cromatográfico para cada tipo de amostra, como extratos de plantas, é como se fosse a impressão digital dessas, esses perfis são utilizados para quantificação e controle de qualidade de determinadas espécies de plantas.

Na cromatografia líquida a fase móvel é líquida e é dividida em duas técnicas: *Planar* e *em coluna*. Na cromatografia planar ou *cromatografia em camada delgada* as separações ocorrem em um material adsorvente finamente dividido, estendido sobre um suporte rígido. É uma técnica de baixo custo e tempo de análise, porém, a quantificação exige procedimentos especiais e acaba se tornando pouco reprodutível e de baixa resolução. Na cromatografia em coluna a separação ocorre dentro de uma coluna que pode conter sílica-gel, óxido de alumínio ou celulose cristalina. A cromatografia em coluna pode ser dividida em *convencional*, onde a amostra é eluida em uma coluna vertical e a gravidade faz com que a fase móvel desça pela coluna, e de a*lta eficiência*, onde são utilizadas microcolunas recheadas com materiais preparados e a fase móvel é submetida a altas pressões. A cromatografia de alta eficiência (CLAE) é uma técnica com alta reprodutibilidade, rapidez na análise e sensibilidade, entretanto, uma de suas desvantagens são o custo do equipamento, o alto preço da sua manutenção, a ausência de um detector universal e o emprego de solventes com alto grau de pureza (Freddy, 2000).

Na cromatografia gasosa a fase móvel é um gás inerte e permite a separação de identificação e quantificação de uma amostra entre duas fases imiscíveis. A fase estacionária necessita ser um sólido ou um líquido não-volátil para que a fase móvel flua arrastando somente amostras voláteis que são separadas de acordo com a afinidade pela o adsorvente presente. No aparelho a amostra é injetada manualmente ou automaticamente, em seguida a amostra aquecida de forma que todo o solvente seja evaporado e é arrastada pelo fluxo de gás inerte, na microcoluna a amostra é separada e então é detectada para formar um sinal na forma de cromatograma. A cromatografia gasosa possui a vantagem de ser uma técnica rápida e altamente sensível, porém, é limitada somente para amostras voláteis, cerca de somente 20% das substâncias orgânicas podem ser caracterizadas pela técnica. A derivatização é um método utilizado para tornar substancias mais voláteis e é bastante empregado na cromatografia gasosa. (Freddy, 2000)

A derivatização altera grupos funcionais para tornar o composto mais volátil e com maior estabilidade térmica facilitando a análise em CG/MS. No método de análise CG/MS os grupos carbonilas não apresentam desafios para serem detectados, entretanto, os grupos hidroxilas necessitam ser substituídos. Como os esteróides possuem várias combinações de grupos carbonilas e hidroxilas, uma analise compreensiva depende da derivatização seletiva dos grupos hidroxilas. Uma das técnicas utilizadas na derivatização de esteróides é a sililação onde o hidrogênio ativo da hidroxila é substituído por um grupo trimetilsilil. A temperatura e o tempo reacional devem ser controlados para não promover substituições indesejadas. A derivatização sônica é uma técnica que aumenta e eficiência do método. (Bowden et al., 2009)

3. Metodologia

As amostras dos extratos brutos da cascas e das sementes de jucá foram obtidas anteriormente através de extração continua via sohxlet por 18 horas utilizando metanol como solvente. As frações dos extratos foram obtidas através do método de extração líquido-líquido utilizando solventes de diferentes polaridades.

3.1. Teste para captura de radicais livres (DPPH)

Os ensaios de captura de radicais livres de DPPH foram realizados nas frações obtidas por partição do extrato em metanol da casca de jucá. Como o extrato bruto da semente não apresentou boa capacidade de captura de radicais livres suas frações não foram utilizadas no ensaio.

O ensaio, descrito por Braga et al. (2002), consiste em 1,0 mL de uma solução metanólica de DPPH 0,2 mg/mL em 2,5 mL de cada amostras das frações dos extratos brutos da casca de jucá em concentrações diferentes. O branco foi preparado adicionando 1,0 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. Através dos valores de absorbância obtidos foram construídas, utilizando a ferramenta Microsoft Excel 2007, curvas analíticas por regressão linear, para a obtenção dos valores de concentrações nos quais as amostras têm a capacidade de captura de 50% dos radicais livres (CS_{50}). A porcentagem de captura de radicais livres é obtida através da formula:

$$\% \text{ inibição} = \frac{100-(A_{amostra}-A_{branco})}{A_{controle}} \quad \text{(Equação 1)}$$

Para todas as frações, exceto a fração hexanica, foram utilizadas as concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL e 25 µg/mL. Para a fração hexânica foram utilizadas as concentrações de 50 µg/mL, 60 µg/mL, 70 µg/mL, 80 µg/mL e 90 µg/mL.

3.2. Análise dos constituintes apolares das sementes por cromatografia em fase gasosa

Nas amostras de fases hexânicas das sementes foi realizada a análise em CCD de fase normal e esta revelou a presença de substâncias apolares que se separavam de forma eficiente quando eluidas em um sistema Hexano/Acetato de Etila (9:1). A fim de caracterizar essas substancias e gerar um perfil cromatográfico das amostras, estas foram submetidas a um tratamento por EFS (Extração em fase sólida) e após purificação e derivatização foram

injetadas num aparelho de cromatografia em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM).

3.3. Tratamento da fração hexânica por extração em fase sólida (EFS)

O tratamento das amostras da fase hexânica por EFS foi realizado com a finalidade de remover interferentes presentes, de maior polaridade, uma vez que essas substâncias interferentes não são voláteis e podem danificar a coluna capilar. Para isso, uma solução 0,1 mL da amostra foi obtida solubilizando 1,0 mg das amostras de frações hexânicas em 10 mL de uma solução hexâno/Acetato de etila (9:1). Após homogenização a amostra foi inserida, com o auxilio de uma seringa, e então foi conectada a um extrator de fase sólida com sílica de fase normal da marca SEP-PAK (Waters Associates Inc.). A eluição da coluna ocorreu em três etapas, adicionando 10 mL de solução (9:1) de Hex/AcOEt, 10 mL da mesma solução e 10 mL de AcOEt, respectivamente. Após eluição foi realizada a analise em CCD de fase normal para garantir a remoção dos interferentes.

3.4. Sililação

Das amostras tratadas por EFS foram preparadas soluções na concentração de 1,0 mg/mL, e em seguida foram adicionados 200 µL do reagente N-O-bis-(trimetilsilicio)-trifluoroacetamida (BSTFA) com 1% de trimetilsilano (TMCS), e 200 µL de piridina para aumentar a eficácia da derivatização. Após misturar o reagente, a amostra foi submetida ao banho no ultrasom por 30 minutos à temperatura de 70 ^{o}C.

3.5. Condições de análise

A análise em CG/MS foi realizada usando um cromatografo gasoso (Trace CG Ultra, Thermo Scientific) com analisador quadrupolo simples acoplado a um espectrômetro de massas (DSQ II, Thermo Scientific) com um auto-amostrador (AI 3000, Thermo Scientific). A coluna utilizada foi uma coluna capilar Zebron ZB-5MS 20m x 0,18 µm com uma camada fina de 0,18 µm (Phenomenex). A temperatura da fonte de íons e da linha de transferência estava em 200 ^{o}C e 300 ^{o}C , respectivamente. O injetor foi utilizado na forma split (1:10) com temperatura de 280 ^{o}C e o fluxo de 10 mL min^{-1}. A temperatura do forno foi programada para começar em 120 ^{o}C por 2 minutos, depois foi elevada 15 ^{o}C.min^{-1} até 250 ^{o}C, e finalmente aumentada em 5 ^{o}C.min^{-1} até 300 ^{o}C, e foi mantida por 5 minutos. O gás de arraste utilizado foi o Hélio com fluxo de 0,6 mL.min^{-1} utilizando o software Xcalibur 1.4 para aquisição de dados. O eletrodo de ionização foi utilizado a 70 eV e o espectrômetro de

massa foi programado para fazer varredura total na faixa de 50-650 m/*z*. A amostra sililizada foi injetada obtendo-se um cromatograma apresentado nos resultados (Figura 4).

3.6. Análise dos constituintes de média a alta polaridade por cromatografia em camada delgada de fase reversa

A técnica de cromatografia em camada delgada de fase reversa foi utilizada para observar o comportamento das substâncias polares, contidas no extrato metanólico bruta, frente a uma fase móvel. O sistema com melhor separação será testado para a realização da análise em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Na fase reversa a fase móvel utilizada deve ser polar. O sistema Acetonitrila/Água (6,5:3,5) removeu da origem todas as substâncias presentes na placa, porém, a separação destas substâncias não foi visível. A adição de ácido fosfórico proporcionou uma melhor separação das moléculas em pH igual a 2. Para vizualização das manhcas foram utilizados os seguintes reveladores:

- NP-PEG para flavonóides;
- UV 256 nm e 366 nm para substâncias com ligações insaturadas;
- $FeCl_3$ 10% para fenólicos;

3.7. Espectrometria de massas

A análise em espectroscopia de massas foi realizada utilizando as amostras dos extratos brutos da casca de jucá e suas frações e em seguida foram analisados os padrões de ácidos fenólicos e flavonoides para que estes fossem comparados com os espectros das amostras de jucá obtidos.

Foram preparadas soluções de 1,0 mg/mL em metanol na qual 10,0 µL foram retirados e diluídos em 2,0 mL de metanol, o procedimento foi realizado individualmente para cada amostra. Com o auxilio de uma seringa as amostras foram injetadas manualmente no espectrômetro de massas e no intervalo entre cada injeção, a seringa foi lavada com metanol a fim de que não houvesse contaminação por parte da amostra anteriormente injetada.

O aparelho utilizado para análise foi um espectrômetro de massas (thermo scientific) com ionizador eletrospray modelo DSQ III. As massas foram detectadas na faixa de 50-1000 m/z usando hélio gás de bombardeamento.

4. Resultados e discussões

4.1. Teste para captura de radicais livres (DPPH)

Com os valores de absorbância obtidos neste ensaio, de acordo com a equação 1, foi possível calcular a capacidade de captura (%) dos radicais livres das amostras. Esses valores foram utilizados para a obtenção de uma curva por regressão linear, cuja equação foi utilizada para obter os valores das concentrações das amostras capazes de capturar 50 % dos radicais de DPPH. A TABELA 1 apresenta os valores de concentração das amostras capazes de seqüestrar 50 % dos radicais livres de uma solução de DPPH 0,2 M das frações do extrato da casca. Quanto menor o valor da concentração da amostra capaz de seqüestrar 50 % dos radicais, maior a atividade antioxidante.

Tabela 1: valores de concentração das frações do extrato metanólico das cascas dos frutos de jucá capazes de seqüestrar 50 % de radicais de DPPH.

Fração	CS_{50} (µg/mL)
Hidro	11,5
AcOEt	7,8
CHCl3	14,4
Hexano	73,1
*extratro bruto	7,4

*O valor da captura de radicais livres do extrato bruto foi obtido no projeto passado;

** Controle positivo (quercetina) – CS_{50} = 9,19 µg/mL.

Nota-se que as partições com solventes de média polaridade, possuem menores valores de $CS_{50\%}$ indicando que possuem tanta eficiência quanto o extrato bruto, isso ocorre porque grande parte dos flavonóides agliconas é solúvel nesse tipo de solvente, principalmente em acetato de etila. A fração hidroalcoólica, a de acetato de etila e a clorofórmica possuem maior capacidade na captura de radicais livres sendo que a fração de acetato de etila possui a menor concentração de sequestro de 50% dos radicais livres devido à afinidade dos flavonóides pelo solvente. Na fração hidroalcoólica a presença de compostos fenólicos glicosilados pode ter influenciado no aumento da $CS_{50\%}$ da amostra, de acordo com a literatura os heterosídeos ligados em alguns grupos hidroxilas podem diminuir a eficiência da captura de radicais livres do flavonoide (King, 1999). A fração hexânica apresentou maior valor de $CS_{50\%}$, indicando a ausência das substâncias antioxidantes em frações apolares.

4.2. Cromatografia em fase gasosa

O tratamento da fração hexânica foi realizado por extração em fase sólida utilizando cartuchos de SEP-PAK de silicagel em fase normal e conseguiu retirar as substâncias mais polares, porém muitos compostos com coeficiente de retenção (RT) menor que 0,3 permaneceram, por isso o método de derivatização foi aplicado para aumentar a volatilidade das substâncias.

4.3. Sililação

Após realizar a reação de sililliza ção a análise em cromatografia de camada delgada a presença de compostos sililados foram confirmados utilizando como revelador anisaldeido.

4.4. Identificação estrutural dos constituintes da fração hexânica do extrato metanolico da semente de jucá.

A fração hexânica do individuo CFM03 foi analisada através do método de CG-EM utilizando a biblioteca MAINLAB. Foi possível identificar na fração hexânica as seguintes substâncias: 1) Metil hexadianoato (TR=8,90 min); (2) ácido hexadecanóico (TR=9,16 min), (3) ester metilico do ácido esteárico (TR=10,19 min), o ester (4) bis-2-etil-hexilico do ácido hexadecanóico (TR=11,87 min), (5) τ-sitosterol (TR=20,66 min), (6) Lup-20[29-en-3-ona] (TR=21,33 min) e o (7) Lupeol (TR=21,68 min). TR= Tempo de Retenção. A seguir o cromatograma é apresentado na FIGURA 2.

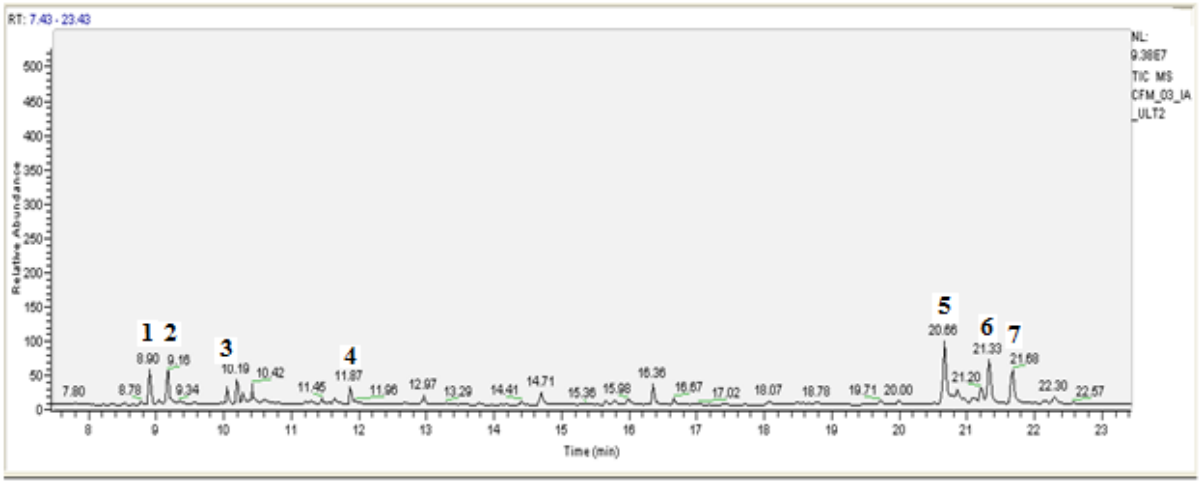

Figura 2*: Cromatograma da fração hexânica do extrato metanólico do Jucá (individuo 3) após SPE (Hex/OAc) após reação com BSTFA TMCS/PYR.(FONTE: Biblioteca MAINLAB do software XCalibur.)*

Nas frações hexânicas dos indivíduos restantes não foi possível observar a composição estrutural das amostras. No projeto anterior, foram realizados testes de

atividade antioxidante nas sementes do fruto de jucá. O teste de seqüestro de radicais DPPH e fenólicos totais apresentaram em média $CS_{50\%}$ 158 µg/mL e 30,67 µg/mL equivalentes de ácido gálico, respectivamente. O cromatograma (Figura 2) apresentou diversos ácidos graxos, esteróides e triterpenos. O Lupeol, encontrado na semente do fruto, é um triterpeno que possui atividade anti-inflamatória e anticancerígena (Mohammad, 2009) processos que podem estar relacionados com a as propriedades anti-inflamatórias do fruto, uma vez que o preparo do chá e da tintura do jucá é realizado com o fruto inteiro.

4.5. Cromatografia em camada delgada de fase reversa

A análise em cromatografia de fase reversa foi realizada a fim de obter um perfil preliminar para detectar a presença de substâncias fenólicas na amostra. Os reveladores foram NP-PEG (flavonoides), UV 254nm e $FeCl_{3(aq)}$ 10% (substancias fenólicas). A FIGURA 3 apresenta a análise dos extratos metanólicos das cascas de três espécimes de jucá onde pode-se observar o perfil de substâncias polares bastante similares e a possível presença de um mesmo flavonóide nos três indivíduos.

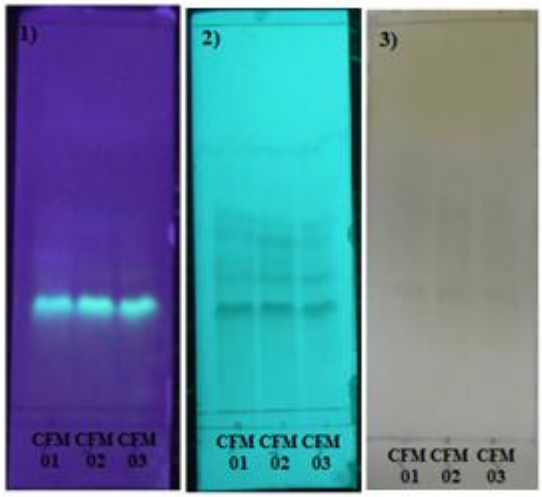

Figura 3**:** *Amostras dos extratos metanólicos da casca revelados com 1) NP-PEG no UV à 366 nm; 2) UV 254 nm; 3) $FeCl_{3(aq)}$ 10% . no sistema Acetonitrila/$H_3PO_{4\,(aq)}$ (6,5:3,5) em pH 2. Onde CFM = Caesalpenea ferrea Martius; 01 02 e 03 representa o numero de cada indivíduo.*

O mesmo sistema foi utilizado nas frações dos extratos brutos das cascas de jucá do individuo 03, e foi possível observar que a presença do mesmo flavonoide nas frações acetato de etila e clorofórmica. A fração hidroalcoólica, embora tenha maior concentração de substâncias, não indica a presença de flavonoides e baixa concentração de substâncias fenólicas (FIGURA 4). A legenda a seguir descreve o nome das frações presentes na placa cromatográfica:

Hidro - Fração hidroalcoólica.

AcOEt - Fração de acetato de etila.

$CHCl_3$ – Fração clorofórmica.

Hex – Fração hexânica.

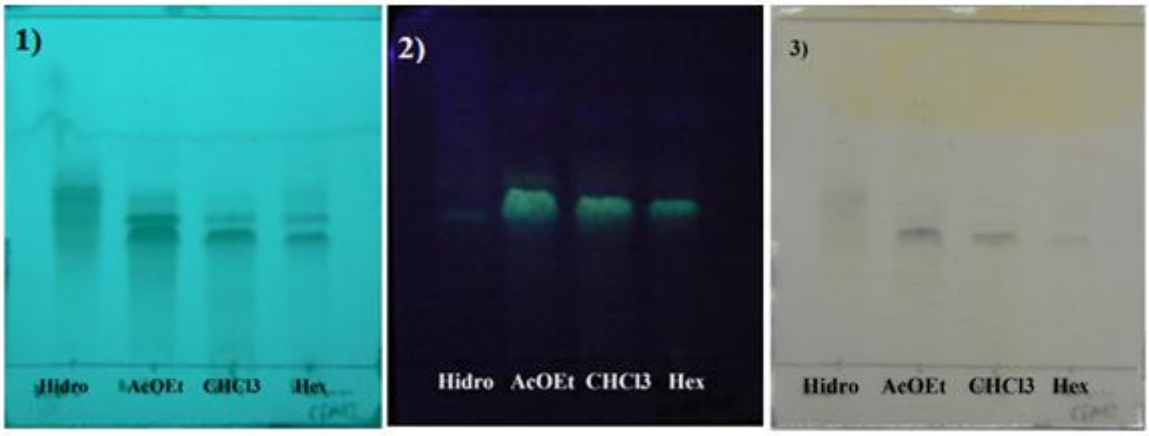

Figura 4: *Amostras das frações do extrato metanolico da casca revelados com 1) UV 254 nm, 2) NP-PEG em UV à 366 nm e 3) $FeCl_{3(aq)}$ 10% . no sistema Acetonitrila/$H_3PO_{4\,(aq)}$ (6,5:3,5) em pH 2.*

As amostras das frações foram comparadas com padrões de fenólicos encontrados no laboratório. Utilizando os seguintes padrões:

1- Ácido cafeico;
2- Ácido clorogenico;
3- Ácido sinapico;
4- Ácido gálico;
5- Ácido 3,4 diidrobenzóico;
6- Ácido siringico;
7- Ácido *p*-cumárico;

A CDD das amostras em comparação com os padrões é apresentada na FIGURA 5 e cada padrão segue a numeração descrita na legenda.

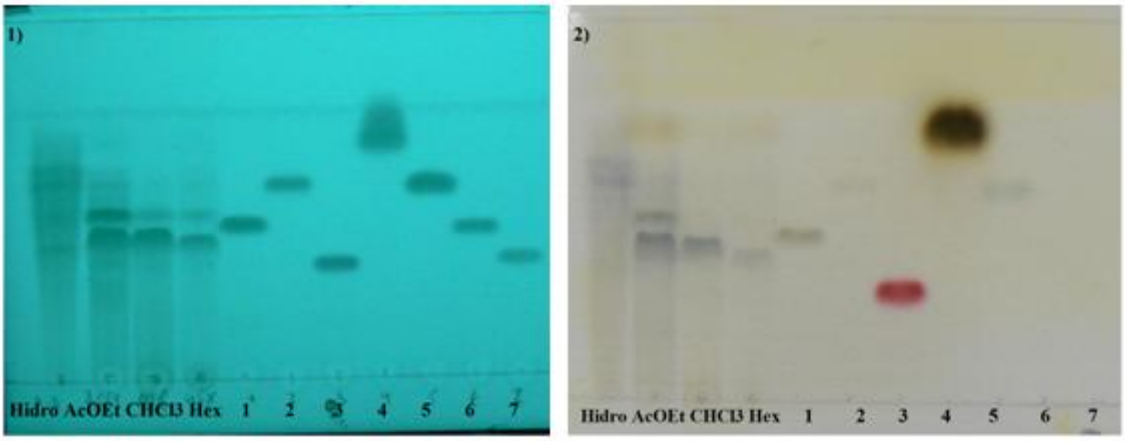

Figura 5: *Amostras das frações do extrato metanolico da casca comparados com padrões de fenólicos revelados com 1) UV 256 nm e 2) $FeCl_{3(aq)}$ 10% . no sistema Acetonitrila/$H_3PO_{4\ (aq)}$ (6,5:3,5) em pH 2.*

Os padrões ácidos cafeico (1), clorogênico (2) e o 3,4 diidrobenzóico (5), aparentam apresentar o mesmo coeficiente de retenção com substâncias presentes no extrato hidroalcoólico e no caso do padrão 5, também na fração AcOEt em menor quantidade. Também podemos sugerir que o ácido siríngico possua o mesmo fator de retenção que uma substância presente nas frações AcOEt e clorofórmica. A análise preliminar por CCD dessas frações podem indicar a presença dessas substâncias nas frações de média a alta polaridade do extrato metanólico das cascas de jucá do indivíduo 03.

O mesmo procedimento de análise em CCD foi realizado utilizando padrões de flavonóides. A legenda a seguir representa a identificação destes na placa cromatográfica (FIGURA 6):

Fl1 - (±) Nariginina;

Fl3 - (+) Narigina;

Fl9 - Catequina;

R - Rutina;

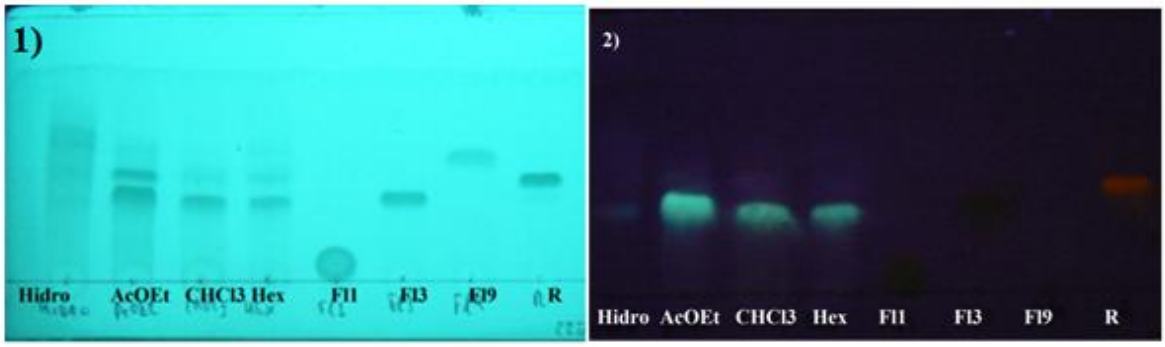

Figura 6: *Amostras das frações do extrato metanólico da casca comparados com padrões de fenólicos revelados com 1) UV 256 nm e 2) NP-PEG em UV 356 nm, no sistema Acetonitrila/H_3PO_4 $_{(aq)}$ (6,5:3,5) em pH 3.*

Os padrões Fl3, Fl9 e R apresentam grandes chances de estarem presentes na amostra de extrato metanólico. Comparado os coeficientes de retenção dos padrões com as amostras pode-se notar que o extrato possui flavonoides glicosilados, fato que pode ser confirmado pelos padrões rutina e narigina. Os dois padrões são derivados glicosilados da quercetina e da narigenina respectivamente. No caso da rutina a presença do glicosídeo faz com que o fator de retenção seja próximo ao dos compostos do extrato, enquanto que a quercetina,por não conter o glicosídeo, continua perto da origem na placa demonstrando não ter muita afinidade pelo sistema de eluição.

Esses perfis cromatográficos serviram como guia na utilização das análises em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Espectromatria de massas com detector Quadripolo íon-trap. Assim como, a realização de colunas cromatográficas a fim de isolar possíveis marcadores químicos.

4.6. Espectro de massas

A espectrometria de massas é uma técnica muito utilizada por ser capaz de determinar a massa molecular das substancias presentes, além de elucidar suas estruturas químicas através do método de fragmentação. O cromatograma de íons totais (TIC) gerado, no software XCalibur a partir dos extratos e frações da casca de jucá é apresentado na FIGURA 7 a seguir.

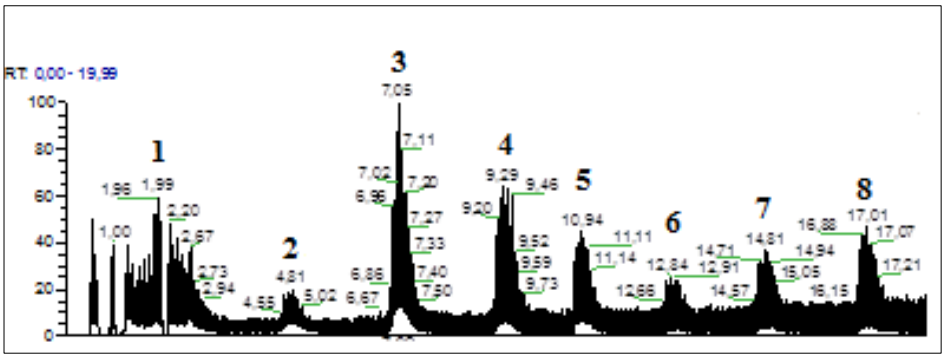

Figura 7: Cromatograma dos íons totais presentes nas amostras da casca do fruto de jucá.

O TIC nos permite ter uma visão ampla de todos os íons encontrados nas frações e nos extratos das amostras de jucá, porém, o tempo de retenção está relacionado com a ordem de injeção das amostras. As amostras foram injetadas na seguinte ordem: fração hidroalcoólica (1), fração acetato de etila (2), fração clorofórmica(3), fração hexânica (4), extrato metanólico bruto dos individuos CFM01 (5); CFM02 (6); CFM03(7); CFM04 (8).

O software também nos permite obter o espectro de massas independente para cada amostra injetada, o espectro apresenta a abundância relativa e a relação m/z de cada fragmento. No espectro de massas da fração hidroalcoólica foi possível observar a presença de fragmentos compatíveis ao do ácido gálico, e do seu ester galicina, encontrado na literatura (Yan-Xiang Gao, 2011). A figura a seguir apresenta o espectro de massas da fração hidroalcoólica.

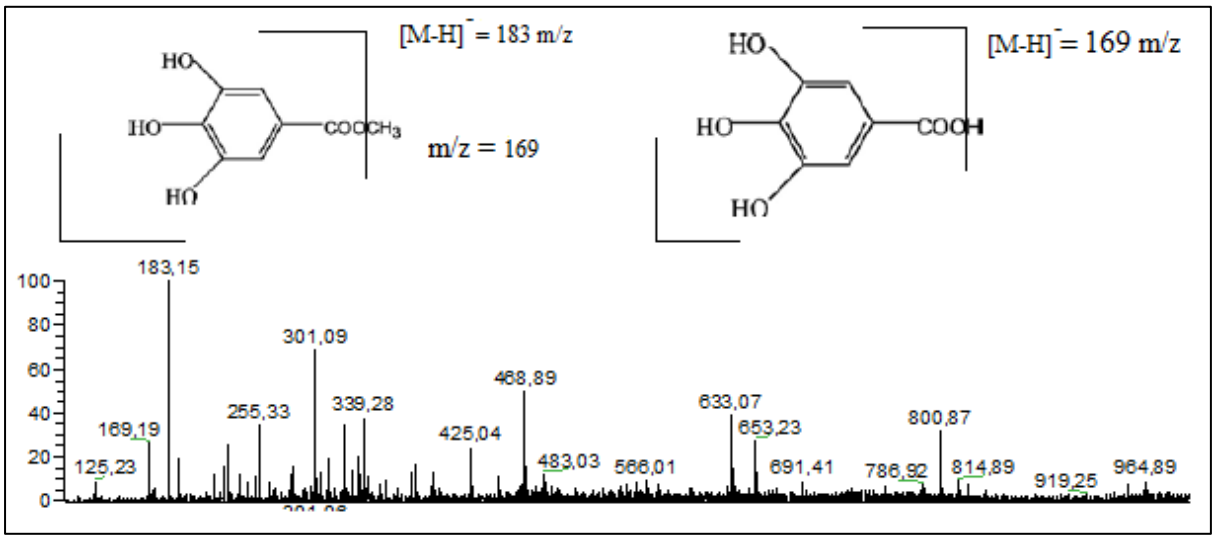

Figura 8: Espectro de massas da fração hidroalcoólica com a possível presença de ácido galico e gallicina.

Na literatura é encontrado a razão massa/carga do íon quase molecular do ácido gálico 169 m/z $[M-H]^-$, e seu fragmento 125 m/z $[M-H-COO]^-$ (Robbins, 2003). E também da gallicina 183$[M-H]^-$, 168$[M-H-CH_3]^-$ and 124$[M-H-CH_3-COO]^-$ (Shi S., Zhao, 2008). O espectro da fração hidroalcoólica do extrato metanólico da casca do fruto de jucá apresenta esses picos e possivelmente confirma a presença dessas substâncias nos indivíduos em estudo.

Com a renovação do projeto os picos majoritários dos espectros serão fragmentados pela técnica MS/MS para comprovar a existência dessas substâncias e detectar a presença de outras possíveis substâncias fenólicas nos extratos.

5. Conclusão

Com os resultados obtidos foi possível determinar o grande potencial como antioxidante do jucá e também identificar algumas classes de substâncias presentes no extrato metanólico bruto do fruto de jucá

No ensaio de captura de radicais livres (DPPH), pode-se afirmar que, o extrato metanólico bruto da casca de jucá e suas frações necessitam de uma concentração pequena para sequestrar os radicais de DPPH, que são radicais estáveis. A fração acetato de etila apresentou menor concentração capaz de capturar 50% dos radicais livres presentes em solução, indicando maior atividade antioxidante. Utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada de fase reversa foi possível observar que a fração acetato de etila possui composição química semelhante a do extrato bruto. A fração hexânica apresentou maior concentração para realizar a captura de 50% dos radicais livres presentes na solução, indicando baixa atividade antioxidante. Isso ocorre devido a pouca interação das substancias fenólicas pelo solvente apolar, e essas estão diretamente relacionada à atividade antioxidante. Os ensaios antioxidantes indicaram que frações polares apresentaram maior atividade. Os resultados com os ensaios de DPPH podem indicar uma alta atividade antioxidante dos frutos de jucá e possivelmente confirmar o potencial dessa espécie como medicinal. Esses resultados podem ser utilizados como base nos ensaios de atividade biológica dos extratos do fruto de jucá , assim como, auxiliar no isolamento do principio ativo do fruto.

O perfil obtido pelo CG-EM detectou a presença de ésteres, ácidos graxos e esteroides, porém, não apresentou nenhuma substância sililada mostrando que a reação não foi realizada com sucesso devido a temperatura de 70 ^{o}C utilizada. Porém, foi possível obter o perfil cromatográfico para a semente do fruto de jucá. A presença de lupeol no extrato da semente pode estar relacionada com a atividade anti-inflamatória do fruto.

Os perfis em CCD fase reversa dos extratos brutos e das frações serviram para visualizar o comportamento dos constituintes químicos de maior polaridade. A comparação entre as frações do extrato e os padrões indicou a presença de possíveis substancias glicosiladas derivadas de quercetina e de ácidos orgänicos Esses padrões podem ser utilizados como marcadores para a quantificação dos mesmos no extrato bruto.

Os padrões analisados por espectrometria de massas com ionizador elétron-spray apresentaram fragmentos similares ao do ácido gálico e a galicina, provavelmente devido ao grande número de derivados destes. Com o espectro de massas será possível ter uma visão ampla das massas moleculares dos compostos no extrato e assim escolher a melhor técnica de separação cromatográfica em coluna.

6. Referências bibliográficas

1. Bowden, J.A., M.C. Dominic, L.S. Whitney, C.M.M. Enhanced analysis of steroids by gas chromatography/mass spectrometry using microwave-accelerated derivatization. Anal. Chem., 16: 6725-6734. 2009.
2. Braca A.; Sortino C.; Politi M.; Morelli I.; Mendez J. Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora. Journal of Ethnopharmacology.* 72, 379-381. 2002.
3. Carvalho, J. C. T.; Teixeira, J. R. M.; Souza, P. J. C.; Bastos, J. K.; dos Santos Filho, D.; Sarti, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extracts. *Journal of Ethnopharmacology,* 53, 175-178. 1996.
4. Cienfuegos, Freddy*. Análise instrumental*. 1º Edição. Rio de Janeiro: Interciência, 2000.
5. Di Stasi, Luis Claudio. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.* 2º Edição. São Paulo: Unesp, 2002.
6. Di Stasi, Luis Claudio. Plantas medicinais: Arte e ciência. São Paulo, Ed. Unesp, p.108-119, 1995.
7. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. Phsyol. Rev., 82: 47-95. 2002.
8. Halliwell, B. Role of free radicals in the neurodegenerative diseases. Therapeutic implications for antioxidant treatment. *Drugs and Aging*. 18 (9): 685-716. 2001.

9. King, A. Y; Young, G. Characteristcs and occurrence of phenolic phytochemicals. *Journal of the American Dietetic Association*. V.99, n. 2, p.213-218, 1999.
10. Lorenzi, Harri. *Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas.* 1º Edição. Nova odessa – SP: Instituto Plantarium de estudos da flora LTDA, 2002.
11. Mohammad S. Lupeol, A Novel Anti-inflammatory and Anti-cancer Dietary Triterpene. *Cancer Letters*; 285(2): 109–115. 2009.
12. Nakamura, E.; Kurosaki, F.; Arisawa, M.; Mukainaka, T.; Okuda, M.; Tokuda, H.; Nishino, H.; Pastore Jr., F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters*, 177, 119-124. 2002.
13. Robbins RJ. Phenolic acids in foods: an overview of analyticalmethodology. *J Agric Food Chem*; 2866:51–87. 2003.
14. Seidl, Peter. Chemistry of the Amazon: Biodiversity, natural products na *Environmental Issues*. Manaus, Amazonas: *ACS Symppsium Series*,1993.
15. Shi S, Zhao Y, Zhou H, Zhang Y, Jiang X, Huang K. Identification of antioxidants from Taraxacum mongolicum by high-performance liquid chromatography-diode array detection-radical-scavenging detectionelectrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance experiments. *J Chromatogr A*; 1209:145–52. 2008
16. Ueda, H.; Tachibana, Y.; Moriyasu, M.; Kawanishi, K., Alves, S. M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. *Phytomedicine,* 8(5): 377- 381. 2001.
17. Xinying Li, Shun Yao, Bin Tu, Xue Li, Chunmei Jia, Hang Song. Determination and comparison of flavonoids and anthocyanins in Chinese sugarcane tips, stems, roots and leaves. *J.Sep. Sci*, 33, 1216–1223. 2010.