

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

ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CASCAS DE *Brosimum*
parinarioides (Ducke)

Bolsista: Berna Almeida de Souza, 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 – 0026/2010
ESTUDO FITOQUÍMICO E DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CASCAS DE *Brosimum*
parinarioides (Ducke)

Bolsista: Berna Almeida de Souza, CNPq
Orientadora: Profª Drª Rita de Cássia Saraiva Nunomura

MANAUS
2011

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas ao Departamento de Apoio a Pesquisa, Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos.

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas foi desenvolvida em parceria com o pelo grupo de pesquisa de Prospecção e Aplicação de Micromoléculas Naturais da Amazônia, no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia– INPA.

RESUMO

Dentre a vasta diversidade da flora brasileira, o presente trabalho vem destacar a espécie vegetal *Brosimum parinarioides* (Ducke), pertencente à família Moraceae e oriunda da Região Amazônica. O látex (Leite de Amapá) dessa espécie é geralmente consumido como alimento e para usos etnofarmacológicos contra asma e tuberculose. A busca por atividade antioxidante com o látex desta espécie apresentou baixo potencial antioxidante. O objetivo principal desse trabalho foi o estudo fitoquímico e da atividade antioxidante das cascas de *Brosimum parinarioides* Ducke através da preparação de extratos em metanol por extração contínua em aparelho Soxhlet e isolamento dos constituintes químicos por cromatografia em coluna, acompanhados por ensaios de atividade antioxidante. O extrato metanólico foi particionado com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade e submetido a coluna cromatográfica de sílica gel 60 (MERCK, F₂₅₄, 63-200 µm) e em coluna filtrante de Sephadex LH-20, as frações obtidas foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) e borrifados com diferentes reveladores químicos. Após o fracionamento, verificou-se que as frações acetato de etila, alcoólica e hidroalcoólica apresentam suposta presença de flavonóides, quando revelados com NP-PEG (Produto Natural-Polietilenoglicol). Para avaliação da atividade antioxidante dos extratos e frações da casca de *B. parinarioides* foram empregados ensaios para a quantificação de fenólicos totais com o reagente Folin-Ciocalteu e o método FRAP (Atividade Antioxidante pelo Poder de redução do Ferro). Os extratos e frações acetato de etila, alcoólica e hidroalcoólica, mostraram-se bastante ativos no ensaio pelo método FRAP, principalmente as frações acetato de etila. Os resultados de atividade antioxidante pelo método FRAP, foi de acordo com presença de substâncias fenólicas a partir da quantificação de fenólicos totais, indicando uma correlação entre a atividade antioxidante e a presença de substâncias fenólicas no extrato.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
3.	OBJETIVOS	9
3.1.	Geral	9
3.2.	Específicos.....	9
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	10
4.1.	Obtenção do extrato bruto da casca de <i>B. parinarioides</i>	10
4.2.	Extração líquido-líquido do extrato metanólico da casca de <i>B. parinarioides</i>	10
4.3.	Comparação por análise cromatográfica em camada delgada (CCD) do extrato e das frações obtidas da partição do extrato metanólico dos espécimes <i>B. parinarioides</i>.....	10
4.4.	Fracionamento cromatográfico em coluna filtrante (CCF) do extrato metanólico da casca (BP04) da espécie <i>B. parinarioides</i>.	11
4.5.	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração 7 obtida da CCF 11	11
4.6.	Ensaio de atividades antioxidantes.....	11
4.6.1.	Quantificação de Fenólicos Totais	11
4.6.2.	Atividade Antioxidante pela Capacidade redutora do Ferro - FRAP (Fe³⁺/Fe²⁺) 12	12
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
5.1.	Obtenção do extrato metanólico bruto (BP04) da casca de <i>B. parinarioides</i>..	12
5.2.	Extração líquido-líquido do extrato metanólico da casca de <i>B. parinarioides</i>	12
5.3.	Comparação por análise cromatográfica em camada delgada (CCD) do extrato e das frações obtidas da partição do extrato metanólico dos espécimes <i>B. parinarioides</i>.....	13
5.4.	Fracionamento cromatográfico em coluna filtrante (CCF) do extrato metanólico da casca (BP04) da espécie <i>B. parinarioides</i>.	13
5.5.	Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da Fração 7 obtida da coluna filtrante	14
5.6.	Ensaio de atividades antioxidantes.....	15
5.6.1.	Quantificação de Fenólicos Totais	15
5.6.2.	Atividade Antioxidante pela Capacidade redutora do Ferro - FRAP (Fe³⁺/Fe²⁺) 16	16
6.	CONCLUSÃO	18
7.	CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO FÍSICA E ATIVIDADES DA BOLSISTA.....	18
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	19

1. INTRODUÇÃO

O conhecimento popular sobre plantas medicinais geralmente é um dos únicos recursos terapêuticos de muitas comunidades e grupos étnicos (Maciel, Pinto e Veiga Jr, 2002). Destacando-se a região amazônica, as comunidades ribeirinhas normalmente utilizam recursos etnofarmacológicos para suprir a inópia do atendimento médico. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de chás de ervas, folhas e cascas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (Viegas Jr e Bolzani, 2006).

No Brasil, há uma grande diversidade de plantas com potencial terapêutico, o que estimula os pesquisadores no estudo de suas possíveis ações terapêuticas, bem como a toxicidade, a fim de produzir medicamentos com garantia de eficácia e segurança (Wall & Wani, 1996). Dentre a vasta diversidade da flora brasileira, o presente trabalho vem destacar a espécie vegetal *Brosimum parinarioides* (Ducke), pertencente à família Moraceae, conhecida popularmente como amapá, cujo o látex geralmente é utilizado como tônico e cicatrizante. Estudos iniciados com as cascas dessa espécie revelaram atividade antioxidante nos extratos em metanol(Quadros, *et al.*,2008). Portanto, neste trabalho deu-se continuidade ao estudo fitoquímico e da atividade antioxidante das cascas da espécie vegetal *Brosimum parinarioides* (Ducke).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Na Amazônia, o uso de plantas medicinais ainda é muito difundido, principalmente por causa da existência de diferentes povos indígenas e comunidades que contribuem consideravelmente para o uso popular de plantas medicinais uma vez que o acesso a um tratamento específico em postos de saúde é muito mais difícil, oferecendo a essas comunidades uma única opção de tratamento, que é através do uso tradicional de plantas (Borrás, 2003). Entretanto, o uso indiscriminado de plantas medicinais, sem comprovação científica, pode ser perigoso uma vez que muitas das espécies consagradas pela medicina popular podem não apresentar a atividade biológica indicada e até mesmo apresentar toxicidade. Entre as espécies nativas da região, queremos destacar a espécie *Brosimum parinarioides* Ducke pertencente à família Moraceae e nativa da região amazônica, popularmente conhecida como amapá. É uma árvore de grande porte podendo atingir 40 m de altura, suas folhas são de tamanhos variáveis com no máximo 22 cm de comprimento e 10 cm de largura (Revilla, 2002; Correa, 1978). O látex dessa espécie é utilizado popularmente como cicatrizante de feridas, como tônico e como antitussivo (Revilla, 2001). Estudos iniciados com o extrato metanólico das cascas dessa espécie revelaram atividade antioxidante (Quadros, *et al.*, 2008). No látex foi atestado a presença de alcaloides, antraquinonas, derivados de cumarina, purinas esteroides e triterpenóides, todos esses compostos associados a diferentes tipos de aplicação farmacológicas (Yano *et al.*, 2007).

A busca de atividade antioxidante em espécies vegetais tem sido o alvo entre muitos pesquisadores uma vez que o estresse oxidativo pode levar ao desenvolvimento de várias doenças tais como câncer, e várias doenças degenerativas (Braça *et al.*, 2002). O estresse oxidativo ou redox é comumente definido como o desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e enxofre, entre outras, e a remoção destas pelos sistemas químicos e enzimáticos de defesa antioxidante e, também, pelo reparo enzimático das biomoléculas lesadas (Oliveira *et al.*, 2009). 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) (Asolini, Tedesco e Carpes, 2006). Os radicais podem ser gerados através de várias fontes como radiação solar, metabolismo de oxigênio, respiração mitocondrial e reações metabólicas intra e extracelulares. A formação de radicais livres *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante o processo de transferência de elétrons que ocorre no metabolismo celular aeróbio (Vila, 2006).

Espécies reativas de oxigênio (EROs), tais como radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion radical superóxido (O_2^-) e hidroperoxila ($\text{ROO}\bullet$), causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios e do colesterol, retirando um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos. Os hidroperóxidos formados na peroxidação lipídica têm vida curta e, quando reagem com metais, formam aldeídos (isto é, malonaldeído, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos, os quais são reativos e causam danos *de novo* ao DNA (Souza *et al.*, 2007, p. 351).

Assim, pode-se dizer que antioxidantes são quaisquer substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações, comparadas com aqueles substratos oxidáveis, significativamente retardam ou inibem a oxidação deste substrato e podem agir em diferentes níveis da sequência oxidativa (Souza *et al.*, 2007).

A relação existente entre as espécies reativas do oxigênio e nitrogênio (que provocam o estresse oxidativo) com enfermidades inflamatórias também é bem conhecida (Ródenas *et al.*, 1995; Ródenas *et al.*, 2000). Já foi observado que muitas espécies vegetais que apresentam atividade antioxidante também apresentam atividade antiinflamatória. Muitos processos inflamatórios são acompanhados de anemia e hemorragias na área inflamada, que leva a pensar que a ocorrência desses processos é devido a um mecanismo protetor contra a reação dos radicais oxidativos induzidos pelo seu metabolismo. Logo, é possível que exista uma relação muito estreita entre as plantas que tem capacidade antioxidante e sua atividade antiinflamatória (Bacallao *et al.*, 2002). Embora em nossos estudos anteriores, o látex de *B. parinarioides* não tenha apresentado atividade antioxidante, as cascas dessa espécie podem indicar uma fonte alternativa de possíveis princípios antioxidantes e até mesmo antiinflamatórios. Esse projeto visou à continuidade dos estudos iniciados com as cascas de *B. parinarioides* através do estudo fitoquímico em conjunto com ensaios de atividade antioxidante.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

O objetivo principal desse trabalho foi o estudo fitoquímico de *Brosimum parinarioides* Ducke através da preparação de extratos e isolamento dos constituintes químicos, acompanhados por ensaios de atividade antioxidante.

3.2. Específicos

- Realizar testes de atividade antioxidante de extratos, frações e substâncias isoladas;
- Isolamento dos constituintes químicos de *B. parinarioides*;
- Elucidação e/ou identificação estrutural das substâncias isoladas;

4. MATERIAL E MÉTODOS

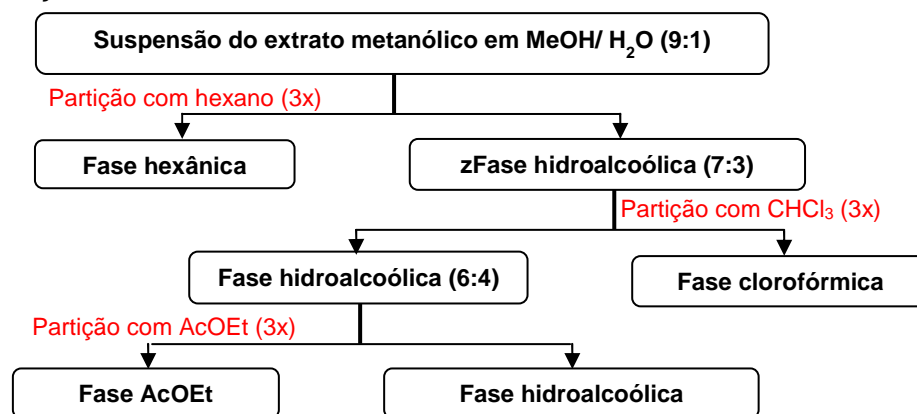
As amostras de casca da espécie *Brosimum parinarioides* foram coletadas de espécimes distintos na Reserva Adolpho Ducke. Essa espécie já havia sido previamente identificada e catalogada pelo projeto Flora da Reserva.

4.1. Obtenção do extrato bruto da casca de *B. parinarioides*

O método de extração contínua foi realizado em aparelho soxhlet, onde cada ciclo da operação deixa o material vegetal em contato com o solvente sempre renovado (ou purificado). Para extração foi utilizado cerca de 100 g de material vegetal triturado, 450 mL de etanol adicionado no aparelho Soxhlet e cerca de 300 mL de etanol no balão, com duração total de 18 h. Os extratos finais foram filtrados e concentrados sob pressão reduzida em evaporador rotatório. Os extratos foram reservados para posterior aferição do teor extrativo.

4.2. Extração líquido-líquido do extrato metanólico da casca de *B. parinarioides*

A extração foi realizada conforme o fluxograma 1. As frações obtidas foram concentradas sob pressão reduzida em evaporador rotatório. foram reservadas para posterior aferição do rendimento.



Fluxograma 1: Extração líquido-líquido ou partição em ordem crescente de polaridade.

4.3. Comparação por análise cromatográfica em camada delgada (CCD) do extrato e das frações obtidas da partição do extrato metanólico dos espécimes *B. parinarioides*

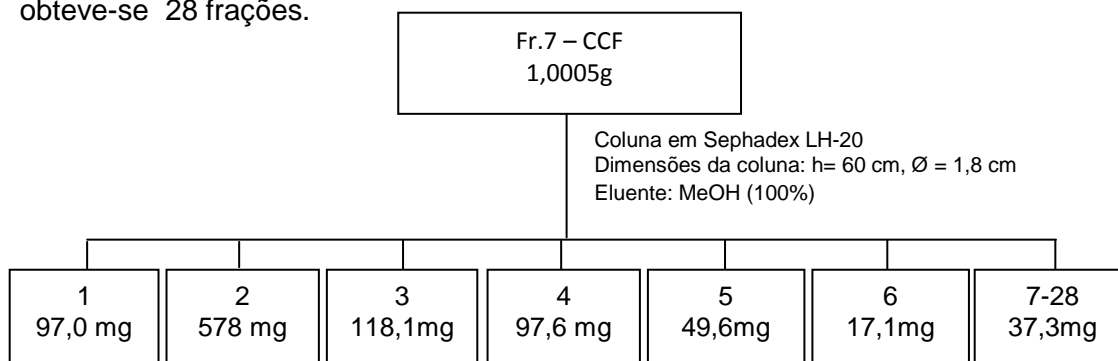
Foram feitas análises por CCD em fase normal e reversa dos extratos e das frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e hidroalcoólica dos espécimes. Para a realização das análises em CCD foram utilizadas cromatoplasmas prontas da Merck (F₂₅₄). As placas foram reveladas sob luz ultravioleta (254 e 366nm), pela exposição de vapores de iodo e borrifação com diferentes reveladores químicos, tais como (NP-PEG, DPPH, Dragendorff, anisalaldeído) (Wagner, Bladt, 1996).

4.4. Fracionamento cromatográfico em coluna filtrante (CCF) do extrato metanólico da casca (BP04) da espécie *B. parinarioides*.

O extrato metanólico bruto (BP04) foi submetido a um fracionamento em CCF com adsorção em fase normal, empacotada com sílica gel 60 (60-210 μ M). Para esse fracionamento foi utilizado uma coluna de sílica gel 60 (MERCK, F₂₅₄, 63-200 μ m) de 10cm de comprimento, 7,7cm de diâmetro e cerca de 20,02g de amostra. A eluição foi realizada em seis distintos sistemas eluotrópicos.

4.5. Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da fração 7 obtida da CCF

A fração 7, obtida da coluna em sílica gel 60 do extrato metanólico, foi submetida a um fracionamento em coluna de permeação em gel empacotada com Sephadex LH-20, de acordo com o fluxograma 2. A coleta das amostras foram feitas a cada 50mL, em que, obteve-se 28 frações.



Fluxograma 2: Fracionamento em Sephadex LH-20 da Fr.7 obtida da CCF

4.6. Ensaio de atividades antioxidantes

4.6.1. Quantificação de Fenólicos Totais

A metodologia utilizada foi descrita por Velioglu em 1998, em uma alíquota de 200 μ L da solução padrão de ácido gálico, extrato ou fração são transferidos para um frasco âmbar. Em seguida, são adicionados cerca de 1,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (diluído 10 vezes), espera-se 5 minutos. Após esse tempo, adiciona-se 1,5 mL da solução de bicarbonato de sódio (6%) e aguarda-se 90 minutos. Após o término da reação, mede-se a absorbância no comprimento de onda a 725 nm. O branco é obtido apenas com 3,0 mL de água mili-Q. Após o término da reação, a absorbância é lida no espectrofotômetro FEMTO 800 XI no comprimento de onda a 725nm. O espectrofotômetro foi zerado com o branco, que foi obtido apenas com 3,0mL de água deionizada. As análises foram realizadas em triplicata.

4.6.2. Atividade Antioxidante pela Capacidade redutora do Ferro - FRAP (Fe³⁺/Fe²⁺)

O ensaio prosseguiu conforme descrito por Luximon-Ramma em 2002. O reagente FRAP, consiste na mistura das soluções de cloreto férrico 20mM, 2,4,6-Tri(2-piridil)-s-triazina 10mM e o tampão de acetato 0,3M em pH=3,6 respectivamente, na proporção de 1:1:10. Transfere-se 100µL (0,1mL) da solução padrão de FeSO₄, extrato ou fração para uma frasco âmbar e adiciona-se 300µL (0,3mL) de H₂O deionizada seguido de 3,0mL do reagente complexante FRAP. Após 4 minutos de incubação, a absorbância é lida no espectrofotômetro FEMTO 800 XI no comprimento de onda a 593nm. O espectrofotômetro é zerado com o branco, que é obtido com 400µL de água deionizada mais 3,0mL do reagente complexante FRAP. As análises foram realizadas em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção do extrato metanólico bruto (BP04) da casca de *B. parinarioides*

A partir de 613,0 g de material vegetal (casca), pôde-se obter 69,82 g de extrato metanólico bruto, cujo rendimento percentual foi de 11,38%. O cálculo foi realizado através da fórmula: % = (massa do extrato*100)/(massa do material).

5.2. Extração líquido-líquido do extrato metanólico da casca de *B. parinarioides*

Os dados da tabela, a seguir são referentes a extração líquido-líquido realizado com as amostras de extratos em metanol cedidas pelo grupo de pesquisa Prospecção e Aplicação de Micromoléculas Naturais da Amazônia, levando em consideração a massa inicial de cada amostra, conforme consta na tabela1.

Tabela 1: Controle dos rendimentos das frações obtidas pela extração líquido-líquido das amostras BP01, BP02 e BP03.

Amostra	Frações	Massa das Frações (g)	Rendimento (%)
BP01 (2,9657g)	Hexano	0,5933	20,01
	Clorofórmio	0,4775	16,10
	Acetato de Etila	0,3681	12,41
	Hidroalcoólica	0,1039	3,50
	Butanólica	1,0053	33,89
BP02 (5, 0158g)	Hexano	2,2355	44,57
	Clorofórmio	0,1003	1,99
	Acetato e Etila	0,4889	9,75
	Hidroalcoólica	1,9971	39,82
BP03 (3,7871g)	Hexano	0,5953	15,72
	Clorofórmio	0,7592	20,04
	Acetato de Etila	0,4233	11,18
	Hidroalcoólica	1,1551	30,50

As frações mais polares (hidroalcoólica e butanólica) foram as que obtiveram um teor extrativo considerável, em comparação aos demais solventes, talvez porque o solvente

extrator para obtenção do extrato bruto foi o metanol. Outra fração que chama atenção é a hexânica, em que é provável que nas cascas da espécie *B. parinarioides* haja uma predominância em substâncias apolares. Contudo, vale ressaltar que o látex dessa espécie é extraído da casca e suas substâncias geralmente apresentam propriedades físicas apolares. Quanto ao rendimento das frações acetato de etila é notável a proximidade percentual dos distintos extratos.

5.3. Comparação por análise cromatográfica em camada delgada (CCD) do extrato e das frações obtidas da partição do extrato metanólico dos espécimes *B. parinarioides*

Segundo Wagner e Bladt (1996), a mistura de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água na proporção de 100:11:11:26 na presença do revelador NP-PEG, consegue detectar flavonóides quando expostos a uma irradiação de 366nm. A figura abaixo representa o cromatograma desenvolvido pelo sistema de Wagner e Bladt (1996) para os extratos brutos e frações de cascas de *B. parinarioides*, onde indicaram a presença de flavonóides após revelação em NP-PEG. Nenhuma das amostras apresentaram características fluorescentes referentes aos padrões disponíveis no laboratório.

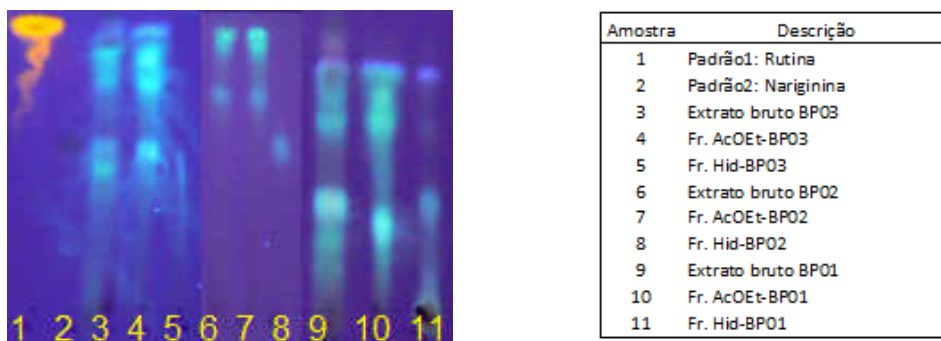


Figura 1: Análise me CCD dos extratos metanólicos brutos e das frações da partição das amostras BP01, BP02 e BP03 reveladas com NP-PEG.

5.4. Fracionamento cromatográfico em coluna filtrante (CCF) do extrato metanólico da casca (BP04) da espécie *B. parinarioides*.

Com o resultado positivo para flavonóides, as frações acetato de etila e hidroalcoólica receberam uma atenção maior. Realizou-se análise em cromatografia de camada delgada (CCD) em fase normal e reversa em vários sistemas de eluição, até mesmo com solventes bastantes polares, porém não apresentaram uma boa separação. Portanto, foi necessário realizar o fracionamento cromatográfico em coluna filtrante (CCF) de do extrato metanólico bruto BP04 obtido da coleta realizada em outubro de 2010. Os sistemas empregados foram determinados por CCD.

Tabela 2: Rendimento das frações coletadas da CCF da amostra BP04

Frações	Sistema	Massa das Frações (g)	Rendimento (%)
1	CHCl ₃ 100%	1,1769	5,87
2	CHCl ₃ /MeOH (9:1)	0,5081	2,54
3	CHCl ₃ /MeOH (8:2)	0,0809	0,40
4	CHCl ₃ /MeOH (1:1)	0,0453	0,23
5	CHCl ₃ /MeOH (2:8)	1,4675	7,33
6	MeOH 100%	2,5447	12,71
7	MeOH 100%	5,9849	29,89
8	MeOH 100%	1,7898	8,94
9	MeOH 100%	0,2288	1,14
10	MeOH 100%	0,0567	0,28
11	MeOH 100%	0,1036	0,52
		Massa inicial: 20,02g	

5.5. Fracionamento cromatográfico em Sephadex LH-20 da Fração 7 obtida da coluna filtrante

A Fração 7, resultante da coluna em sílica gel 60, foi a fração que apresentou maior rendimento e por isso foi submetida a um fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20, com objetivo separar as macromoléculas das micromoléculas, uma vez que nos estudos com produtos naturais dar-se-á importância aos princípios ativos das micromoléculas.

Tabela 3: Rendimento das frações coletadas da coluna cromatográfica em SEPHADEX da Fração 7 da coluna filtrante

Frações	Massa das Frações (g)	Rendimento (%)
1	0,0977	9,76
2	0,5780	57,77
3	0,1181	11,80
4	0,0976	9,76
5	0,0496	4,95
6	0,0171	1,71
7-27	0,0373	3,73
		Massa inicial: 1,0005g

Conforme o esperado as primeiras frações coletadas foram as que apresentaram maiores rendimentos. Das frações 1-5, supõe-se que as moléculas presentes nessas frações são as macromoléculas (maiores pesos moleculares), a partir da fração 6 é possível conjecturar a presença de média e micromoléculas devido à redução da massa obtida de cada fração. No processo de separação por Sephadex LH-20, as moléculas de maior peso molecular tendem a sair primeiro da coluna, uma vez que, por serem maiores, não ficam retidas nos pequenos poros da fase estacionária.

5.6. Ensaios de atividades antioxidantes

5.6.1. Quantificação de Fenólicos Totais

Para quantificar os fenólicos totais nas amostras (extratos e frações) foi necessário realizar primeiramente a curva de calibração do padrão ácido gálico, em diferentes concentrações. Os resultados foram expostos na tabela 4, a seguir:

Tabela 4: Valores de absorvâncias obtidas do padrão de ácido gálico em diferentes concentrações.

[Ác.gálico](µg/mL)	A1	A2	A3	Média	DP	Erro%
500,00	2,796	2,796	2,795	2,7957	0,0006	0,0002
250,00	1,173	1,173	1,176	1,1740	0,0017	0,0015
125,00	0,556	0,565	0,565	0,5620	0,0052	0,0092
62,50	0,284	0,293	0,298	0,2917	0,0071	0,0243
31,25	0,190	0,151	0,154	0,1650	0,0217	0,1315

A partir da média das absorvâncias obtidas de cada concentração da solução padrão de ácido gálico foi construída a curva de calibração, conforme a Figura 1. Em seguida foi feito o cálculo da regressão linear, onde foi possível obter a equação da reta e o valor do coeficiente de correlação linear, R^2 .

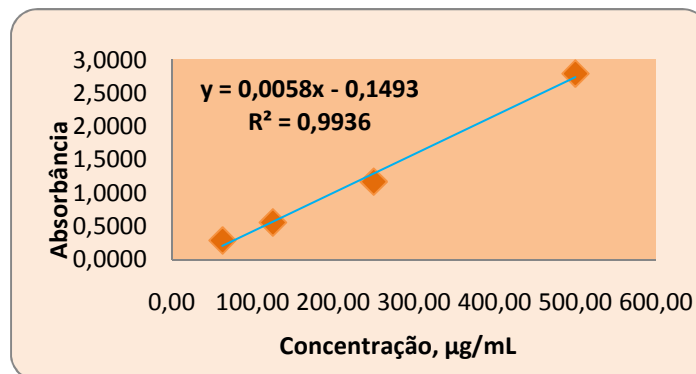


Figura 2: Curva de calibração do padrão ácido gálico.

Os resultados obtidos na determinação dos fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato bruto ou fração. Pôde-se observar que as frações 4, 5 e 6 da coluna sephadex e as frações acetato de etila da partição líquido-líquido foram as que apresentaram maior teor de fenólicos.

Tabela 5: Concentração de fenólicos nos extratos e frações das casca de *B. parinarioides*.

Amostra	[Conc.](µg/mL)	Média	DP	Erro rel.%	EAG
Ext.MeOH-BP01	1000	0,789	0,012	0,016	161,776
Ext.MeOH-BP02	500	0,301	0,001	0,004	77,695
Ext.MeOH-BP03	1000	1,121	0,002	0,002	219,017
BP04	1000	0,809	0,028	0,035	165,282
F. AcOEt - BP01	500	1,164	0,012	0,010	226,374
F. AcOEt - BP02	500	1,881	0,010	0,005	350,109

F. AcOEt - BP03	500	1,150	0,030	0,026	224,017
F.Hidro-BP01	1000	0,481	0,008	0,017	108,615
F.Hidro-BP02	1000	0,474	0,008	0,017	107,523
F.Hidro-BP03	1000	1,065	0,027	0,025	209,420
F.BuOH-BP01	1000	0,670	0,025	0,038	141,201
F. MeOH 100% - CCF	1000	0,455	0,037	0,081	104,247
F.7 – CCF	1000	0,901	0,032	0,036	181,086
F.7-2-CCS	1000	0,697	0,019	0,028	145,971
F.7-3-CCS	1000	0,377	0,008	0,021	90,684
F.7-4-CCS	1000	1,576	0,035	0,023	297,408
F.7-5-CCS	1000	1,968	0,002	0,001	365,052
F.7-6-CCS	1000	1,872	0,058	0,031	348,557

5.6.2. Atividade Antioxidante pela Capacidade redutora do Ferro - FRAP ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$)

O ensaio FRAP está baseado na capacidade de substâncias, como os fenóis, em reduzir o Fe^{3+} em Fe^{2+} . Quando isso ocorre, na presença de 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ), a redução é acompanhada pela formação do complexo corado com Fe^{2+} . Para avaliar tal atividade, primeiramente foi realizada uma curva de calibração utilizando soluções de sulfato ferroso como padrão, em diferentes concentrações. Os dados obtidos da curva foram tabelados abaixo:

Tabela 6: Valores de absorvâncias obtidas do Sulfato Ferroso em diferentes concentrações.

[FeSO ₄](μM)	A1	A2	A3	Média	DP	Erro%
2000	1,945	2,041	2,041	2,009	0,055	0,028
1000	1,145	1,145	0,827	1,039	0,184	0,177
500	0,530	0,559	0,500	0,530	0,030	0,056
250	0,209	0,208	0,243	0,220	0,020	0,091
125	0,084	0,095	0,105	0,095	0,011	0,111

Os valores da concentração de atividade antioxidante expressos em μmol de Fe^{2+} encontrados nas amostras foram obtidos por meio de regressão linear, resultante da curva de calibração preparada com sulfato ferroso em diferentes concentrações.

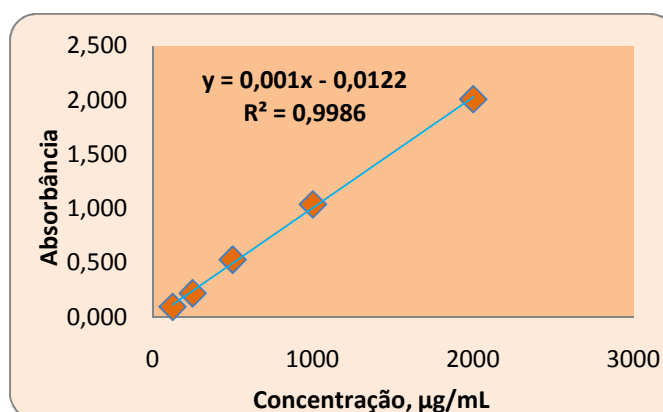


Figura 3: Curva de calibração do padrão sulfato ferroso.

Dos extratos e frações avaliados, observou-se boa capacidade redutora do ferro nos extratos brutos, exceto o indivíduo BP02. Quando os extratos foram submetidos ao fracionamento por partição líquido-líquido, observou-se que a atividade ficou concentrada nas frações em acetato de etila (inclusive a fração em acetato do indivíduo BP02, seguida da butanólica, enquanto que as frações hidroalcoólicas de alguns indivíduos tais como BP01 e BP02, apresentaram a capacidade redutora do ferro reduzida em comparação com a fração em acetato de etila. A fração 7 resultante da coluna em sílica gel 60 apresentou boa atividade pelo método FRAP. Essa fração, após separação em Sephadex LH-20, apresentou atividade nas frações 2, 4, 5 e 6. O fracionamento para isolamento dos constituintes químicos nessas frações deve ser continuado.

Tabela 7: Valores de FRAP μmol de Fe(II)/g extrato seco, dos extratos e frações de *B. parinarioides*.

Amostra	[Conc.]($\mu\text{g/mL}$)	Média	DP	Erro rel.%	FRAP μmol
Ext.MeOH - BP01	1000	1,208	0,098	0,081	1220,200
Ext.MeOH - BP02	500	0,413	0,032	0,078	424,867
Ext.MeOH-BP03	1000	1,032	0,081	0,078	1044,533
Ext.MeOH-BP04	1000	1,334	0,038	0,029	1346,200
F. AcOEt - BP01	500	1,660	0,100	0,060	1672,200
F. AcOEt - BP02	500	1,248	0,126	0,101	1259,867
F. AcOEt - BP03	500	1,654	0,042	0,025	1666,200
F.Hidro-BP01	1000	0,672	0,029	0,044	683,867
F.Hidro-BP02	1000	0,712	0,066	0,092	724,533
F.Hidro-BP03	1000	1,533	0,047	0,030	1544,867
F.BuOH-BP01	1000	1,220	0,078	0,064	1231,867
F. MeOH 100% - CCF	1000	0,596	0,170	0,285	608,533
F.7 - CCF	1000	1,538	0,005	0,003	1549,867
F.7-2-CCS	1000	1,578	0,088	0,056	1590,200
F.7-3-CCS	1000	0,711	0,061	0,086	723,200
F.7-4-CCS	1000	1,914	0,089	0,046	1925,867
F.7-5-CCS	500	1,293	0,155	0,120	1305,533
F.7-6-CCS	500	1,125	0,170	0,151	1136,867

6. CONCLUSÃO

As amostras de casca de quatro espécimes da espécie vegetal *Brosimum parinarioides* pertencente à família Moraceae, principalmente as frações acetato de etila, apresentaram boa capacidade antioxidante de redução do ferro (valores de FRAP). Um fato que corrobora tal afirmação é a correlação dos resultados de alto teor de substâncias fenólicas. Neste estudo foi possível observar que a possível atividade antioxidante, observada pelo método FRAP, está presente nas frações de média polaridade. Frações muito polares tais como as hidroalcoólicas, obtidas por partição, e a fração em MeOH 100% obtida da coluna em sílica gel 60, não apresentaram atividade antioxidante significativa. No presente estudo não foi possível isolar nenhum constituinte químico das frações e subfrações obtidas a partir dos fracionamentos cromatográficos. Contudo, verificou-se por meio de cromatografia em camada delgada F_{254} e revelador específico (NP-polietilenoglicol) a presença de substâncias fluorescentes, provavelmente flavonóides.

7. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO FÍSICA E ATIVIDADES DA BOLSISTA

ATIVIDADES	M E S E S (início agosto 2010)											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Levantamento bibliográfico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Coleta do material vegetal			R									
Preparação dos extratos			R	R	R							
Isolamento dos constituintes químicos						R	R	R	R	R		
Ensaio de atividade antioxidante											R	R
Elucidação e/ ou identificação das substâncias isoladas								NR	NR	NR	NR	
Preparação das apresentações orais			R	R							R	R
Preparação dos relatórios (parcial e final)				R	R						R	R

R= Realizado; NR= Não Realizado

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Asolini, F.C.; Tedesco, A.M. e Carpes, S.T. (2006). Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. *Braz. J. Food Technol.*, 9(3): 209-215.
- Bacallao, L. G., Domínguez, D. M. R., Gómez, L. V. G. e Angel, M. H (2003). Plantas com Propriedades Antiinflamatórias. *Ver. Cubana Invest. Biomed.*, 3, pp.214-216.
- Borrás, M. R. L. (2003) Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas – *Plantas comercializadas no Mercado Municipal Adolpho Lisboa*. Ed. Valer/Governo do Estado do Amazonas, pp. 19-27.
- Braça *et al.* (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*. 72, 379-381.
- Correa, Manuel Pio. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, 1978.
- Gottlieb, O. R.; Kaplan, M. A. C. (1990). Amazônia: tesouro químico a preservar. *Ciência hoje*, 11(6): 17-20.
- Koleva *et al.* (2002). Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study of three testing methods. *Phytochemical Analysis* 13, 8-17.
- Maciel, M.A.M.; Pinto, A.C.; Veiga Jr, V.F. (2002). Plantas Medicinais: A Necessidade de Estudos Multidisciplinares. *Quim. Nova*. 25(3): 429-438.
- Oliveira, A.C.; Valentim, I.B.; Goulart, M.O.F; Silva, C.A.; Bechara, E.J.H.; Trevisan, M.T.S. (2009). Fontes vegetais naturais de antioxidantes. *Quim. Nova*, 32(3): 689-702.
- Quadros, D. S.; Nunomura, S. M.; Nunomura, R. C. S. (2008). Atividade antioxidante da espécie *Brosimum parinarioides*, *Resumos 31ª. Reunião da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia – SP*.
- Revilla, J. (2002). *Plantas da Amazônia – Oportunidades Econômicas e Sustentáveis*. Ed. INPA e SEBRAE, Manaus-AM, pp. 89-90, 283-284.
- Ródenas, J.; Mitjavila, M. T. e Carbonell, T. (1995). Simultaneous generation of nitric oxide and superoxide by inflammatory cells in rats. *Free Radical Biology and Medicine*. 18(5): 869-875.
- Ródenas, J.; Carbonell, T. e Mitjavila, M. T. (2000). Different roles for nitrogen monoxide and peroxynitrite in lipid peroxidation induced by activated neutrophils. *Free Radical Biology and Medicine*. 28(2): 374-380.
- Shanley, P.; Medina, G. (2005). Frutíferas e Plantas Úteis na Vida Amazônica. Ed. CIFOR E IMAZON, Belém-Pa, pp. 101-102.
- Sousa, C. M. M.; Silva, H. R.; Vieira-Jr., G. M.; Ayres, M. C. C.; Costa, C. L. S.; Araújo, D. S.; Cavalcante, L. C. D.; Barros, E. D. S.; Araújo, P. B. M.; Brandão, M. S.; Chaves, M. H.

(2007). Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Medicinais. *Quim. Nova*, 30 (2): 351-355.

Viegas Jr, C.; Bolzani, V.S. (2006). Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. *Quim. Nova*. 29(2): 326-337.

Vila, F.C. (2006). *Identificação dos Flavonóides com Atividade Antioxidante da Cana-de-áçúcar (Saccharum officinarum L.)*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, 61 pp.

Yano, C.Y.B.; Mattietto, R.A.; Cordeiro, B.S.; *Resumos da 59ª da SBPC*, Belém, Brasil, 2007.

Wagner, Hildebert, 1929; Bladt, Sabine. *Plant drug analyses a thin layer chromatography atlas* 2nd ed. 1996.

Wall, M.E.; Wani, M.C. (1996). Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. *J. of Ethnopharmacol.*, 51, p.239-254.