

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

ESTUDO QUÍMICO DOS FRUTOS DE *Eschweilera ovalifolia* (DC.) Nied.
(LECYTHIDACEAE)

Bolsista: Marcos Henrique Gurgel Rodrigues

MANAUS

2013

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

RELATÓRIO FINAL

PIB-S/0135/2012

ESTUDO QUÍMICO DOS FRUTOS DE *Eschweilera ovalifolia* (DC.) Nied.
(LECYTHIDACEAE)

Bolsista: Marcos Henrique Gurgel Rodrigues
Orientador: Prof. Dr. Pierre Alexandre dos Santos

MANAUS

2013

RESUMO

Eschweilera Mart. ex DC. pertence à Lecythidaceae A. Rich., uma família pantropical de árvores encontradas nos trópicos das Américas do Sul e Central. Estudo químico de espécies de Lecythidaceae levou à identificação de triterpenos pentacíclicos, saponinas, ácido elágico e alcaloides do tipo indolo quinazolínicos. No entanto estudos químicos das plantas de *Eschweilera* são muito escassos sendo os poucos estudos realizados responsáveis pela identificação de esteróis, triterpenos e saponinas. A fim de acrescentar informações químicas a Lecythidaceae e ao gênero *Eschweilera*, procedeu-se o estudo obtendo inicialmente o pó dos frutos secos para se realizar a prospecção dos metabólitos presentes e obtendo, posteriormente os extratos hexânicos e metanólicos dos frutos de *E. ovalifolia*, fracionando-os para identificar os metabólitos secundários presentes. Os frutos do estudo foram colhidos em Maués, em fevereiro e agosto e passaram por processo de secagem e moagem para a realização da prospecção fitoquímica e em seguida passaram pelo processo de extração para a obtenção dos extratos. O teste preliminar para identificação química incluiu cromatografia de camada delgada (CCD) para a escolha do melhor meio de fracionamento por partição e fracionamento em coluna aberta. A prospecção fitoquímica indicou a presença de diversos metabólitos dentre os quais já previstos na literatura como flavonoides, terpenoides, esteróis e saponinas. As análises em CCD iniciais com extrato hexânico apresentaram coloração roxa sugestiva de terpenóides, azul sugestivo de diterpenos e amarela sugestiva de flavonóides na revelação com anisaldeído sulfúrico, enquanto as análises em CCD para a fração acetato de etila do extrato metanólico demonstrou colorações rosa, lilás e amarelo para o mesmo revelador químico sugestivas de terpenoides, esteróis e flavonoides respectivamente sendo compatíveis com a literatura consultada indicando os terpenos como classe química majoritária em *Eschweilera*.

Palavras chaves: Estudo fitoquímico, *Eschweilera ovalifolia*, Lecythidaceae.

1. INTRODUÇÃO

Eschweilera Mart. ex DC. pertence a Lecythidaceae A. Rich., uma família pantropical de árvores encontradas nos trópicos das Américas do Sul e Central; Sudeste da Ásia e África, incluindo Madagascar (Mori, 2004). No Brasil, *Eschweilera* tem distribuição no Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste, no entanto *E. ovalifolia* tem domínio apenas nos estados do Acre, Amazonas e Roraima (Smith et al., 2012).

Populações tradicionais ao redor do mundo utilizam órgãos de espécies de Lecythidaceae para diversos fins terapêuticos, como por exemplo, *Barringtonia racemosa*, cujo habitat natural é a Ásia, utilizada na medicina tradicional da Malásia no tratamento de tosse, diarreia, asma, cólicas, icterícia e problemas oftálmicos (Behbahani et al., 2007), na medicina tradicional de outras populações, as folhas de *Lecythis pisonis* Camb. é utilizado no banho para o tratamento de prurido (Silva et al., 2011). A utilização das plantas de Lecythidaceae por populações tradicionais com finalidades terapêuticas faz com que haja sobre tais plantas um interesse do ponto de vista farmacológico e, por se tratar de um produto natural, ocorre também interesse de estudos fitoquímico, uma vez que é importante o conhecimento da composição química de tais produtos vegetais, a fim de se conhecer também, as respostas tóxicas provenientes da utilização da planta ou até mesmo respaldar o uso popular a partir identificação de metabólitos ativos já descritos na literatura.

Estudos para verificação do potencial antioxidante de *Eschweilera tenuifolia* também foram feitos com extratos de galhos, folhas, frutos e sementes, apresentando significativa atividade antioxidante nos ensaios realizados (Tavares et al., 2012) permitindo que haja também interesse de estudos químicos a respeito dessa planta a qual não possui nenhum relato na literatura a respeito de pesquisas desenvolvidas nessa área. A despeito de outras plantas da família, o número de estudos fitoquímicos de plantas do gênero *Eschweilera* é bastante pequeno.

Dentre os poucos trabalhos existentes na literatura a respeito de *Eschweileras*, está o trabalho realizado com *Eschweilera longipes* por Carvalho et al. em 1998 onde, foram relatadas as presenças de dez triterpenoides, em novo estudo realizado com *Eschweilera longipes*, em 2003 por Costa e Carvalho, conduziu a identificação um novo triterpeno além de uma saponina. Já em estudo realizado com *Eschweilera rabeliana* foram identificados triterpenos pentacíclicos (Carvalho et al., 1995).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Realizar a prospecção fitoquímica dos frutos e obter os seus extratos para se realiza os ensaios de cromatografia em camada delgada (CCD).

2.2. Objetivo Específico

- Realizar a prospecção fitoquímica dos frutos;
- Obter os extratos Hexânicos e Metanólicos dos frutos de *Eschweilera ovalifolia*.
- Realizar os ensaios em CCD;
- Comparar os metabólitos detectados com os relatados na literatura;
- Realizar o fracionamento dos extratos;

3. REVISÃO DA LITERATURA

A Lecythidaceae pertencem espécies vegetais de grande importância extrativista como a castanha do Brasil, *Bertholletia excelsa* Bonpl., cujas sementes representam o produto florestal não madeireiro mais importante da Amazônia (Shepard-Jr & Ramirez, 2010). Lecythidaceae possui três subfamílias: Foetidioideae, Planchonioideae e Lecythidoideae, sendo que esta última possui espécies localizadas na América Tropical. Ao todo, esta subfamília possui 210 espécies (Huang et al., 2011). Plantas de Lecythidoideae são mais comuns em florestas primárias não inundadas (Huang et al., 2011) e são caracterizadas também por cascas fibrosas, folhas simples e alternas, androceu actinomorfo ou zigomorfo e o ovário pode ser ínfero ou semi-ínfero (Huang et al., 2011). As plantas desta Família variam em seu tamanho, podendo ser árvores pequenas ou grandes que apesar de serem mais comuns em várzeas e florestas não inundadas, a família é encontrada também em números reduzidos em florestas de altitude, ambientes periodicamente inundados às margens de rios e em savanas. (Tsou & Mori, 2002). *Eschweilera* consiste em 83 espécies que se distribuem do México até a América do Sul, mas com poucos relatos a respeito de sua constituição química na literatura. Apesar dos poucos estudos químicos, estas espécies compõem uma das mais importantes famílias de árvores da Amazônia Central (Tsou & Mori, 2002).

Apesar de poucos estudos a respeito de plantas do gênero *Eschweilera*, há trabalhos relatando as presenças de fridelina, fridelinol, α -amirina, β -amirina, 3β -O-cinamoil- α -amirina, 3β -O-cinamoil- β -amirina, α -amirenona, β -amirenona, 3- α -hidroxi-lupeol, 3- α -hidroxi-taraxasterol, além de sitosterol, estigmasterol, α -tocoferol e tocotrienol em *Eschweilera longipes* (Carvalho et al., 1998) bem como a presença do novo triterpeno 3- β , 24-diidroxifriedelano e do triterpeno 3- β , 24-diacetilifriedelano nas folhas e do ácido 1 β -hidroxieucáfico e a saponina 3β O- β D-glucopiranosil-sitosterol no caule de *E. longipes* (Costa e Carvalho, 2003). Já em *Eschweilera rabeliana* foram identificados os triterpenos pentacíclicos fridelina e 3-epi-fridelinol nas cascas do caule e β amirina nas folhas desse mesmo vegetal (Carvalho et al., 1995). Em se tratando de *ovalifolia*, não existe nenhum relato na literatura sobre sua constituição química, portanto a realização deste trabalho é de fundamental importância para acrescentar informações químicas à *Eschweilera* bem como conhecer o perfil químico da espécie.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Material vegetal

O material vegetal foi coletado nos meses de fevereiro e agosto de 2012 para que se obtivesse uma comparação química a respeito da composição dos frutos colhidos em diferentes épocas do ano, a coleta foi realizada no município de Maués de um indivíduo previamente marcado pelo Prof. Dr. Vanderlei Antônio Stefanuto do IFAM-Maués, cuja exsicata está depositada no herbário do Instituto Federal do Amazonas, campus Zona Leste.



Figura 1: Frutos colhidos em Maués em agosto de 2012.

Preparo do material vegetal

Os frutos primeiramente foram limpos e selecionados, para que frutos sujos e contaminados por colônias de microrganismos não alterassem os resultados dos testes, em seguida os frutos foram secados em estufa de ar circulante a 50 °C, e aqueles que ainda estiverem fechados foram abertos e separados das sementes (castanhas). Em seguida o material foi fragmentado, para diminuir o tamanho dos frutos e facilitar o processo de pulverização evitando danificação ao equipamento, os frutos então foram pulverizado em moinho de facas. O pó obtido da moagem foi pesado e armazenado protegidos de luz e umidade. A primeira coleta de frutos rendeu depois da secagem e moagem a massa de 310 gramas, devido a menor presença de frutos nas árvores durante esse período. A Segunda coleta rendeu a massa de 1260 g, em consequência da maior quantidade de frutos durante esse momento.

Prospecção Fitoquímica

Devido à pequena massa de frutos coletados em fevereiro, só foi possível fazer a prospecção para os frutos coletados em agosto, onde se conseguiu maior massa de frutos. Após a secagem e a moagem dos frutos, foram produzidas soluções extrativas aquosas e

hidroetanólicas com os respectivos pós. A partir das soluções hidroetanólicas foram realizadas prospecções para alcaloides, ácidos orgânicos, fenóis, cumarinas, antraquinonas, esteróis e triterpenos. A partir das soluções aquosas foram realizadas prospecções de heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos, heterosídeos cianogenéticos, flavonoides, gomas, taninos, mucilagens, aminogrupos, ácidos voláteis e ácidos fixos. As metodologias utilizadas para a detecção dos metabólitos foram as descritas por Costa (2001).

Obtenção dos extratos

A partir do pó obtido na etapa anterior foram realizadas as extrações com hexano e metanol, por maceração a frio. Separou-se da primeira coleta, 300 g para a realização da extração, enquanto da segunda coleta foram separadas 1.000 g. As extrações ocorreram de maneira exaustiva fazendo uso do banho de ultrassom para aumentar a penetração do solvente nos interstícios do material vegetal aumentando a eficiência da extração. Em seguida, as soluções extrativas obtidas com os solventes orgânicos foram armazenadas em frascos âmbar protegidos da luz. As soluções em seguida foram submetidas à rotaevaporação para obtenção dos extratos brutos.



Figura 2: Banho de ultrassom aplicado durante a extração com hexano.

Realização dos Ensaio em CCD

O teste preliminar para identificação química inclui cromatografia em camada delgada, para posterior escolha do melhor meio de se iniciar o fracionamento por partição e ou fracionamento em coluna aberta. Desse modo realizaram-se os ensaios com o extrato Hexânico obtendo-se a melhor fase móvel composta pelos solventes Hexano:Acetato de Etila na proporção 98:02 tendo como melhor revelador químico o anisaldeído sulfúrico.

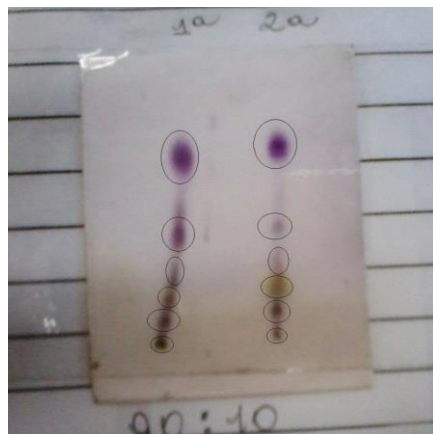


Figura 3: Cromatoplaça do extrato hexânico dos frutos de 1^a e 2^a coletas com a fase móvel hexano:acetato de etila na (9:1), revelando a similaridade do comportamento dos extratos de frutos colhidos em diferente épocas. Revelador químico: Anisaldeído sulfúrico.

Realizaram-se também os ensaios em CCD do extrato metanólico, no entanto os ensaios cromatográficos demonstraram blocos de substâncias de polaridades semelhantes nas cromatoplaças não tendo uma boa separação das substâncias. Desse modo foi necessária a realização de extração líquido-líquido na tentativa de se separar as substâncias de polaridades diferentes devidos suas afinidades pelos solventes utilizados na partição. A extração líquido-líquido ocorreu com 100 gramas do extrato metanólico da primeira coleta, solubilizando o extrato em 200 ml de metanol e 800 ml de água, a partição foi realizada respectivamente com Hexano, Acetato de Etila e Butanol em funil de separação.



Figura 4: Realização da extração líquido-líquido em funil de separação. Solução amarela: hexano. Solução preto-amarronzada: Solução hidro alcoólica.

Após a obtenção das soluções extrativas, elas passaram por evaporação para a obtenção das fases hexânicas, acetato de etila e butanólica do extrato metanólico, as soluções hexânicas

e acetato de etila foram evaporadas em rotavaporador, enquanto a solução butanólica foi evaporada em multivapor.



Figura 5: Processo de evaporação da fase butanólica em multivapor.

Para verificar a eficiência da extração líquido-líquido realizaram-se os ensaios em CCDC da fase acetato de etila da partição. Encontrando como melhor fase móvel Diclorometano (DCM):Etanol, na proporção 95:05.



Figura 6: Cromatoplate da fase acetato de etila do extrato metanólico dos frutos da 1ª coleta na fase móvel DCM:Etanol, na proporção 95,05. Na primeira imagem: revelador físico luz ultra violeta. Na segunda imagem revelador químico anisaldeído sulfúrico.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a metodologia empregada, a prospecção fitoquímica dos frutos analisados sugeriram as presenças de alcaloides, ácidos orgânicos, fenóis, heterosídeos flavônicos, esteróis e triterpenos, heterosídeos antociânicos, saponínicos, gomas, taninos, mucilagens, aminogrupos, ácidos voláteis, ácidos fixos e heterosídeos cianogenéticos. A sugestão de alcaloides na prospecção indica possível atividade moduladora do sistema nervoso central (Oliveira et al., 2009). Enquanto a sugestão de flavonoides indica possíveis propriedades antibacteriana, antiviral e antioxidante (Lustosa et al., 2008) para a espécie, justificando estudos que detectaram anteriormente altos teores de substâncias fenólicas e alto perfil antioxidante.

Após a produção dos extratos por maceração exaustiva dos frutos tanto da primeira quanto da segunda coleta primeira e da segunda coleta obteve-se os seguintes valores.

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexânico	0,780	0,26
Metanólico	126,00	42
<i>Hexânico*</i>	1,67	1,67
<i>Acetato de Etila*</i>	16,78	16,78
<i>Butanólico*</i>	23,00	23

Quadro 1: Massa dos extratos obtidos a partir do fruto colhidos em fevereiro.

*Obtidos a partir da extração líquido-líquido

Extrato	Massa (g)	Rendimento (%)
Hexânico	0,580	0,058
Metanólico	40,01	4

Quadro 2: Massa dos extratos obtidos a partir do fruto colhidos em agosto.

Podemos então perceber que apesar da maior quantidade de frutos na segunda coleta em comparação com a primeira, as massas de extrato obtidas na primeira coleta foram maiores do que as massas dos extratos da segunda coleta, indicando que durante o mês de fevereiro ocorre uma atividade mais intensa da produção de metabólitos por parte da *Eschweilera ovalifolia*.

Os ensaios realizados em CCD para o extrato hexânico apresentaram as colorações roxa sugestiva de terpenoides (Choze et al., 2005), a coloração rosa sugestiva de terpenoides (Noldin, 2005) e a coloração amarela sugestiva de flavonoides (Chaves, 1997).

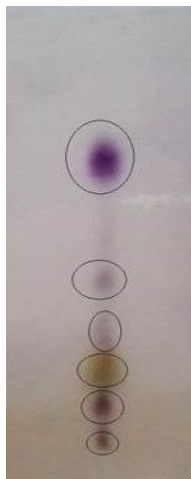


Figura 7: placa cromatográfica do extrato hexânico dos frutos da segunda coleta demonstrando as cores presentes.

Os ensaios em CCDC para a fase acetato de etila do extrato metanólico dos frutos da primeira coleta apresentaram coloração rosada sugestiva de terpenoides, lilás sugestiva de fitoesteróis (Brighente et al., 2012) e amarela sugestiva de flavonoides.



Figura 8: placa cromatográfica da fase acetato de etila do extrato metanólico dos frutos da segunda coleta demonstrando as cores presentes.

7. CONCLUSÃO

A prospecção fitoquímica realizada é fundamental para o direcionamento de futuros trabalhos com a espécie dado o pequeno número de estudos químicos com *Eschweilera*. Verificam-se a partir da prospecção que alguns componentes sugeridos não foram relatados em trabalhos anteriores com outras espécies do gênero, tais como flavonoides, taninos e alcaloides, por outro lado, esteróis, triterpenos e saponinas já haviam sido identificados em *Eschweilera longipes*. Todos os achados da prospecção sugerem grande potencial farmacológico para *Eschweilera ovalifolia*, no entanto, estudos de atividade biológica devem ser realizados para confirmação de tal potencial.

De acordo também com os dados demonstrados pode-se perceber que o maior rendimento na produção dos extratos ocorreu naqueles obtidos a partir dos frutos colhidos em fevereiro, no entanto a quantidade de frutos presentes nas árvores nessa época é inferior a quantidade presente nas árvores em agosto. Porém, apesar do baixo número, este é compensatório, tendo em vista a maior produção de extratos e seu maior rendimento.

Os ensaios cromatográficos permitiram as sugestões de terpenoides, o que é compatível com a literatura, tendo em vista que os trabalhos realizados até o momento com plantas do gênero *Eschweilera* levaram a identificações de diversos triterpenos. No entanto ainda não foi identificada a presença de flavonoides nos trabalhos anteriores de modo que sugestão de flavonoides com as manchas amarelas nas cromatoplasmas é algo que deve ser mais bem estudado e a confirmação só será possível após métodos analíticos mais profundos, tais como espectroscopias na região do UV, IV, RMN 1H e 13C e espectrometria de massas. A mancha lilás referente a fitoesteróis também é compatível com a literatura consultada uma vez que em trabalho anterior com *E. Rabeliana* foram identificadas os fitoesteróis sitosterol e stigmasterol.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BEHBAHANI, M.; ALI, M.A.; MUSE, R. Plant regeneration from leaf explants of *Barringtonia Racemosa*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, n. 5, p. 103-108, 2007.
- BRIGHENTE, I.M.C.; MOSTADEIRO, A.V.; QUEIROZ, G.S. Estudo fitoquímico da fração hexânica de *Brunfelsia uniflora*. In: 22º SEMINÁRIO/IC/SIC/UFSC. 2012.
- CARVALHO M.G.; ALMEIDA M.E.L.; HAUPTLI M.B.; MELEIRO L.A.C. Triterpenos isolados de *Eschweilera rabeliana* Mori (Lecythidaceae). **Revista Universidade Rural Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 17, n. ½, p. 33-36, 1995.
- CARVALHO, M.G.; VELANDIA, J.R.; OLIVEIRA, L.F.; BEZERRA, F.B. Triterpenes isolated from *Eschweilera longipes* miers (Lecythidaceae), **Química Nova**, v. 21, n. 6, 1998.
- COSTA, P.M.; CARVALHO, M.G. New triterpene isolated from *Eschweilera longipes* (Lecythidaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 1, 2003.
- CHAVES, Mariana H.. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada à disciplina "química orgânica". **Química Nova**, v. 20, n. 3, p. 560-562, 1997.
- CHOZE, R.; SILVA, R.A.; LIÃO, L.M.; KATO, L.; OLIVEIRA, C.M.A. Estudo fitoquímico de *Odontadenia hipoglauca* (apocynaceae). In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG - CONPEEX. Anais eletrônicos do II Seminário de Pesquisa e Pós-Graduação da UFG [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005.
- HUANG, Y.-Y.; MORI, S.A.; KELLY, L.M. A morphological cladistic analysis of Lecythidoideae with emphasis on Bertholletia, Corythophora, Eschweilera, and Lecythis. **Brittonia**, v. 63, n. 3, p.396-417, 2011.
- LUSTOSA, S.R.; GALINDO, A.B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; NETO, P.J.R. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista brasileira de farmacognosia**. v. 18, n. 3, p. 447-454, 2008.
- MORI, S.A. Lecythidaceae. In: TROPICAL FORESTS. New York: Elsevier, 2004, p.1745-1742.
- NOLDIN, V.F.; Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de *Simaba ferruginea* ST. HIL. E avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isolados. Universidade do Vale do Itajaí. Centro de Ciências da Saúde. Itajaí, 2005.
- OLIVEIRA, J.P.C.; FERREIRA, L.F.F.; CHAVES M.H.; MILITÃO, G.C.G.; JÚNIOR, G.M.V.; COSTA, A.M.; PESSOA, C.O.; MORAES, M.O.; COSTA-LOTUFO, L.V. Chemical constituents of *Lecythis pisonis* and cytotoxic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n.5, p. 1140-1144, 2012.

- OLIVEIRA, V.B.; FREITAS, M.S.M.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I.J.C. Atividade biológica e alcalóides indólicos do gênero *Aspidosperma* (Apocynaceae): uma revisão. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 11, n. 1, p. 92-99, 2009.
- SHEPARD JR, G.H.; RAMIREZ, H. “Made in Brazil”: Human Dispersal of the Brazil Nut (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae) in Ancient Amazonia. **Economic Botany**, v. 65, n. 1, p.44-65, 2010.
- SILVA, L.L.; GOMES, B.S.; SOUSA-NETO, B.P.; OLIVEIRA, J.P.C.; FERREIRA, E.L.F.; CGAVES, M.H.; OLIVEIRA, F.A. Effects of *Lecythis pisonis* Camb. (Lecythidaceae) in a mouse model of pruritus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n.2012, p.90-97, 2011.
- SMITH, N.P. et. al. (2012). Lecythidaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008549>).
- TAVARES, C.C.; LIMA, A.S.; SOUZA, G.O.; ABRANTES, K.A.S.; RODRIGUES, M.H.G.; STEFANUTO, V.A.; LIMA E.S.; SANTOS ;P.A. Avaliação da atividade antioxidante de extratos de *Eschweilera* sp coletada em Maués-AM, in: IV WORKSHOP SOBRE O DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS, [CD-ROM], Manaus, 2012.
- TSOU, C.H.; MORI, S.A. Seed coat anatomy and its relationship to seed dispersal in subfamily Lecythidoideae of the Lecythidaceae (The Brazil Nut Family). **Botanical Bulletin of Academia Sinica**, v. 43, p..37-56, 2002.