



FORMULÁRIO PARA RELATÓRIO FINAL

1. Identificação do Projeto

Título do Projeto PIBIC/PAIC

ANALISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO AQUOSO ORIUNDO DE FOLHAS DE *Eugenia punicifolia* (KHUNT)

Orientador

Profa. Dra. Denise Moraes Lopes Galeno

Aluno

Maíra Soares Biváqua de Araújo

2. Informações de Acesso ao Documento

2.1 Este documento é confidencial?

SIM NÃO

2.2 Este trabalho ocasionará registro de patente?

SIM NÃO

2.3 Este trabalho pode ser liberado para reprodução?

SIM NÃO

**2.4 Em caso de liberação parcial, quais dados podem ser liberados?
Especifique.**

3. Introdução

O gênero *Eugenia* é bem representada na Amazônia e apresenta uma grande variedade de espécies. Uma delas é a *Eugenia punicifolia* (Kunth) D.C, conhecida popularmente como pedra-ume-caá, onde suas folhas, raízes e frutos são utilizados frequentemente na medicina popular amazônica, no tratamento da diabetes e outras patologias (BRITO, 20014)



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

Estudos na década de 90 demonstraram sua habilidade para reduzir os níveis de insulina no plasma de ratos, assim ficou demonstrada sua habilidade em reduzir a hiperglicemia, polifagia, polidipsia, volume de urina e excreção urinária de glucose e uréia em ratos diabéticos. O estudo demonstra que "extratos aquosos tem um efeito benéfico sobre o estado de diabetes, principalmente incrementando os parâmetros metabólicos da homeostases de glucose" (FERREIRA, 2006).

Diante das espécies catalogadas ao longo dos últimos anos, demonstraram que *E. puniceifolia* é frequente nas referências populares de ação terapêuticas, entre elas, ação colinérgica em receptores nicotínicos (GRANGEIRO et al., 2006), ação antioxidante (KADE et al., 2008; GALENO et al., 2014), ação antiparasitária (FICHI, 2007), ação antimicrobiana, ação analgésica (ÁVILA-PENHA et al., 2007), ação anti-hipertensiva (GALENO et al., 2014), ação hipoglicemiante e antilipidogênica (RAVI et al., 2005), porém não foram encontrados estudos que identifiquem os metabólitos que provem tais efeitos terapêuticos.

Os metabólitos secundários vegetais destacam-se na área da farmacologia devido a seus efeitos biológicos sobre a saúde da espécie humana. São interligados com fatores externos como influência direta para quantificar os mesmos, entre eles, temperatura, radiação ultravioleta (UV), índice pluviométrico, altitude, composição atmosférica, sazonalidades e além destes, os fatores nas condições de coleta, estabilidade e estocagem podem interferir na qualidade e então, no valor terapêutico dos que possivelmente apresentam como fitoterápicos (NETO, 2006).

A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o funcionamento normal dos organismos vivos, por isso, uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres são removidos pelas defesas antioxidantes da célula que incluem enzimas e moléculas não enzimáticas (FERREIRA e ABREU, 2007). Os radicais livres ou espécies reativas do oxigênio (ERO) são substâncias altamente reativas, por apresentarem um elétron desemparelhado na última camada eletrônica, e tendem a reagir rapidamente com substratos oxidáveis (FERREIRA e MATSUBARA et al. 1997)

Com base nesses achados químicos/terapêuticos, justifica-se a importância de se estudar os metabólitos secundários envolvidos nessas atividades encontradas visto que são benéficas terapêuticamente a população e ainda, interessantes para futuros isolamentos e procedências farmacêuticas.



UFAM

4. Justificativa

Por suas propriedades medicinais, a *Eugenia punicifolia* revela-se uma espécie com elevado potencial mercadológica, principalmente considerando a crescente preocupação da população com a alimentação saudável. Porém, mesmo considerando suas potencialidades e a ampla utilização em sua região de origem, aplicações tecnológicas da folha ou do extrato ainda são muito pouco estudadas. Assim, um dos objetivos desse trabalho foi caracterizar o extrato aquoso de *Eugenia punicifolia* (EEP) quanto a sua composição centesimal, onde foram determinados os teores de umidade, proteínas, lipídeos, cinzas, assim como também a prospecção fitoquímica do EEP.

Segundo Oliveira et al.(2006), estudos fitoquímicos realizados com espécies de *Eugenia* revelaram a presença de flavonóides, taninos, terpenóides e óleos essenciais. Os flavonóides são compostos da família dos polifenóis, e em relação as suas propriedades terapêuticas, pode-se citar a atividade antioxidante, além de atuarem na inibição da enzima lipoxigenase -5, conversora do ácido araquidônico em leucotrienos, que são mediadores de asma, alergias e inflamação, bem como a inibição da via da ciclo oxigenase (COX) (SIMÕES, 1984). Além deste, os terpenóides podem tanto na medicina popular, como na terapêutica, serem usadas como sedativas, tranqüilizantes e anticonvulsivantes. Muitos óleos voláteis possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas, tais como ansiolítica, anticonvulsivante e antinociceptiva (SOUSA *et al.*, 2007).

Os prováveis efeitos a partir destes metabolitos secundários possibilitam, por exemplo, redução da taxa de absorção de hidratos de carbono e diminuição de riscos de fatores de doenças cardiovasculares, oferecendo então uma oportunidade inovadora de retardar a síndrome metabólica, na qual é comum na população (Galeno et al., 2014).

A prospecção fitoquímica e a cromatográfica em camada delgada contribuem diretamente na identificação da espécie e fornecem parâmetros de ausência ou presença de metabolitos secundários que poderão ser aplicados futuramente de forma direta a população, através da síntese de um produto biotecnológico de interesse comercial, auxiliando na ampliação do mercado de fitoterápicos.

5. Objetivos

5.1 Geral

- Realizar prospecção fitoquímica do extrato aquoso de *Eugenia punicifolia* (EEP).



5.2 Específicos

- Coleta botânica e preparo do extrato;
- Realizar triagem fitoquímica preliminar das principais classes de metabolitos secundários por meio de reações químicas características;
- Quantificar fenóis e flavonoides totais;
- Quantificar atividade sequestradora de radical 2,2- difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)
- Determinar os teores de umidade, proteínas, lipídeos e cinzas.
- Fazer partição de líquido-líquido a partir do extrato aquoso;
- Analisar as partições por cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC);

6. Metodologia

6.1 Material

O material vegetal foi fornecido pela Embrapa-AM Ocidental, colhidas em diferentes épocas do ano, com aproximadamente um ano de idade e em fase reprodutiva e identificadas pelo botânico Valdely Ferreira Kinupp do Herbário do Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Amazonas, através do número da exsicata (6789). A coleta do material biológico proposto para estudo foi autorizada pelo CGEN (AUTORIZAÇÃO nº. 34/2008).

O material coletado foi submetido à inspeção visual, excluindo-se material orgânico estranho e partes não sadias, comprometidas por insetos, fungos ou oxidadas. Em seguida foi realizado os procedimentos de acordo com a metodologia de Bastos (2011).

6.2 Procedência da droga vegetal

O extrato aquoso de *Eugenia Punicifolia* foi preparado a partir da metodologia de Bastos (2011). O produto seco foi obtido por aspensão, utilizando uma solução extrativa aquosa, em equipamento Mini Spray drier (modelo MSD 1,0 de Labmaq, São Paulo, Brazil). Após o preparo do produto, o EEP foi protegido da luz e da umidade, sendo acondicionado em frasco opaco, hermético e armazenado em dessecador.

6.3 Prospecção fitoquímica

Este ensaio analisou todas as características qualitativas dos principais grupos químicos que constituem os princípios ativos das drogas vegetais, utilizando em cada caso, reações de coloração e ou precipitação. O ensaio sistemático de análise em



fitoquímica foi pelo método de maceração, extrato aquoso a 20% (vinte por cento) e extrato hidroalcoólico a 20% (vinte por cento) do vegetal em estudo. A partir desses extratos foram determinados a presença dos principais grupos químicos (MATOS, 1997).

6.3.1 Prospecção de heterosídeos cianogénicos

Pesou-se 10,0 g de amostra vegetal e transferir para um erlenmeyer de 250 mL com tampa esmerilhada (ou erlenmeyer com rolha). Adicionou-se 50,0 mL de água destilada e 1 mL de ácido sulfúrico (H₂SO₄) concentrado. Prendeu-se uma fita de papel de picrato de sódio, previamente preparado, à tampa do erlenmeyer, evitando seu contato com o líquido. Deixou-se em banho-maria a uma temperatura de 60 °C por duas horas. Observou-se o aparecimento de cor no papel.

6.3.2 Prospecção de saponinas

Preparou-se 100 mL de extrato aquoso a 2% de droga vegetal por infusão ou decocção. Deixou-se arrefecer e transferiu-se 5 mL para um tubo de ensaio. Agitou-se vigorosamente por 15 segundos e observou-se a formação de espuma persistente por 15 minutos. Acrescentou-se gotas de ácido clorídrico 2 N sobre a espuma e observou novamente.

6.3.3 Teste para alcalóides

Preparou-se um extrato por decocção a partir de 1,00 g da matéria prima vegetal e 20 mL de ácido clorídrico a 10%. Filtrou-se para um funil de separação. Alcalinizou-se o extrato obtido até pH 11 com hidróxido de amônio. Adicionou-se 10 mL de éter etílico e agitar. Deixou-se repousar até separação das fases. Retirou-se a fase etérea. Acidulou-se a fase aquosa com ácido clorídrico a 10%. Distribuiu-se a fase aquosa em 4 tubos de ensaio de 10 mL, e a 3 deles acrescentar algumas gotas dos reagentes de Mayer, Bertrand, Hager e Dragendoff, respectivamente, observando a formação de precipitados.

6.3.4 Prospecção de antraquinonas

6.3.4.1 Reação de Bornträger direta (antraquinonas livres)

Colocou-se 0,5 g da amostra vegetal em um tubo de ensaio. Adicionou-se 10 mL de éter etílico. À solução etérea, adicionou-se 1 mL de NH₄OH 10% e agitou-se até observar mudança na coloração.

6.3.4.2 Reação de Bornträger com hidrólise (glicosídeos antraquinônicos)

Ferveu-se 1 g de amostra vegetal em 10 mL de etanol a 70 % e 5 mL de ácido clorídrico 10% por 3 minutos. Filtrou-se para um erlenmeyer e deixou-se arrefecer. Extraíu-se com porções de 3 mL de benzeno. Transferiu-se 3 mL da fase benzênica a um



tubo de ensaio. Acrescentou-se de 2-3 mL de hidróxido de amônio 10% e observou-se o aparecimento de cor.

6.2.5 Prospecção de cumarinas e flavonoides

6.2.5.1 Extração

Preparou-se um extrato hidroetanólico com 2,5 g de amostra vegetal e 50 mL de etanol a 70% por decocção por 10 minutos, filtrou e deixou arrefecer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com etanol a 70 %. Distribuiu-se alíquotas de 3 mL em sete tubos identificados.

6.2.5.2 Identificação de cumarinas

Despejou-se, separadamente, duas gotas do extrato recém-preparado sobre um pedaço de papel de filtro comum (mancha teste e mancha controle). Sobre uma delas (mancha-teste), gotejou-se solução de hidróxido de potássio N em etanol. Sob UV λ 365, observou-se o aparecimento de fluorescência.

6.2.5.3 Identificação de taninos

Adicionou-se da solução de cloreto férrico ao tubo 1, agitando bem. Observou-se a formação de precipitados.

6.2.5.4 Identificação de antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonois, xantonas, chalconas, auronas e flavononois

Ajustou-se o pH dos tubos 2, 3 e 4 a 3, 8,5 e 11 por meio da adições de ácido sulfúrico, hidróxido de sódio 2 N e hidróxido de potássio 2 N, respectivamente. Observou-se e interpretou-se o aparecimento de cores.

6.2.5.5 Teste para leucoantocianinas, catequinas e flavanonas

Ajustou-se o pH dos tubos 5 e 6 a 1 e 11 por meio da adição de ácido clorídrico 2 N e hidróxido de sódio 2 N, respectivamente. Foram aquecidos os tubos por 2-3 minutos em uma lâmpada de álcool e observou-se o aparecimento de cores.

6.2.5.6 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Adicionou-se ao tubo 7 alguns centigramas de magnésio e 0,5mL de HCl concentrado.

6.3 Fracionamento do extrato bruto.

Para obtenção das frações, o extrato foi fracionado a partir de filtração a vácuo com a utilização de solventes de diferentes polaridades. Foi submetido a uma partição líquido-líquido e extraído com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Após esse período, foi realizada a concentração do extrato em um evaporador rotativo a vácuo.



UFAM

6.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O extrato seco foi diluído em água a 1%, retirou-se 10 µL, em triplicata, e foi colocado em microplacas de 96 poços de fundo chato e adicionado 50 µL do reagente Folin Cicalteal e encubadas por 8 minutos no escuro. Após, 0,4% de carbonato de sódio (m/v) (240 µL) foi adicionado à mistura e a reação foi novamente incubada por 5 minutos e seguiu-se a primeira leitura no leitor de microplacas. O ácido gálico foi utilizado como substância padrão da reação utilizando as mesmas condições do extrato. (XU e CHANG, 2009)

O ácido gálico foi utilizado como substância padrão da reação utilizando as mesmas condições do extrato e o etanol como controle negativo da reação. A atividade foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ de fenóis} = 100 - (\text{Abs } A_2 - A_1 / \text{Abs controle}) \times 100$$

6.5 O ensaio de teor total de flavonoides

Primeiramente, adicionou-se na placa de 96 poços, o extrato aquoso a 1% (30 µL) e em seguida adicionado 270 µL de etanol e fez-se a primeira leitura da absorbância. Em outros poços, foi adicionado 30µL do extrato aquoso diluído a 1% e foi acrescido de 90 µL de etanol em cada cavidade da microplaca de 96 poços de fundo chato. Logo após, foi adicionado 6µL de cloreto de alumínio a 10% (m/v) e 6µL de acetato de potássio a 1M, ambos diluídos em água destilada. Para finalizar, foi adicionado 168 µl de água destilada. A placa foi incubada por 30 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, foi feita a determinação da segunda absorbância. A quercetina foi utilizada como padrão da reação utilizando as mesmas condições do extrato (DE CHANG, 2002).

A quercetina foi utilizada como padrão da reação utilizando as mesmas condições do extrato e o etanol como controle negativo da reação. A determinação da concentração de flavonoides foi feita pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de flavonoides} = 100 - (\text{Abs } A_2 - A_1 / \text{Abs controle}) \times 100$$

6.6 Atividade sequestradora do radical DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazila)

Foi pesado 2 mg de DPPH e dissolvido em 12mL de etanol absoluto. Colocou em uma placa de 69 poços de fundo chato, 170 µL da solução, mais 30 µL de etanol. E verificou-se a absorbância no leitor de microplaca (DTX 800, Beckman) em aproximadamente 1,00. Em seguida, adicionou-se na mesma placa, 100 µL do extrato



aquoso da *Eugenia punicifolia*, mais 100 μL de água para o proceder da diluição em 16 poços da placa. Foi retirado 30 μL de cada diluição (em triplicata) e adicionado 170 μL da solução etanólica de DPPH. Na preparação do controle, foi adicionado 30 μL de etanol com 170 μL de solução etanólica de DPPH. Também em triplicata. A placa foi levada para encubação em temperatura ambiente e no escuro por 30 min. Após a encubação, foi verificada cada DPPH no leitor de microplaca, passado os dados para EXCEL e calculado %, desvio padrão, concentração da amostra necessária para varrer 50% dos radicais livres (CI_{50}) e seu desvio padrão (MAHMOUDI *et al.*, 2009)

A atividade antioxidante foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH} = 100 - (A2 - A1 / \text{Abs controle}) \times 100$$

Com o resultado de % de inibição obtido na leitura da absorbância das diferentes concentrações de cada uma das amostras foi possível calcular o índice capaz de inibir 50% dos radicais livres (IC_{50}) (Lee *et al.*, 2003).

6.7 Composição centesimal

O teor de umidade foi realizado gravimetricamente, até peso constante, da dessecação em estufa a 105°C. Pesou-se 5,0 g de amostra em cápsula contendo camada de areia. O resíduo obtido foi reservado para a extração de lipídeos. Para o teor de lipídeos totais, foi determinado gravimetricamente, após extração com éter etílico, em aparelho de Soxhlet. Em determinação de proteínas totais foi pelo método de Kjeldahl e o teor de nitrogênio presente na amostra foi convertido em proteína multiplicando-se pelo fator de conversão indicado pelo método. E teor de cinzas pelo método gravimétrico, com base na perda de peso, por incineração em mufla a 550°C (AOAC, 2005).

6.8 Análises por técnica cromatográfica

6.8.1 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

As frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol foram submetidas a possível fases móveis especificamente a fim de separar para posteriores isolações.

6.8.2 Análise em HPLC

As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência em Cromatógrafo Shimadzu com detector de arranjo de diodo, empregando uma coluna Luna 5u C18 (2) 100 A 250 x 4,6 mm, modelo Phenomenex. As amostras foram analisadas por dois gradientes diferentes, A (45 minutos) e B (30 minutos), compostos por variação da mistura acetonitrila: água com fluxo 0,8 mL/min. Esses são métodos que estão sendo



validados pelo Laboratório de Fitoquímica e Semissíntese da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FITOPHAR-FCF). O volume de injeção foi de 20 µL da amostra a 1 mg/mL. Os picos obtidos tiveram seu tempo de retenção e absorvância comparados com os dados de substâncias padrão disponíveis no FITOPHAR-FCF, analisadas sob as mesmas condições.

7 Resultados e Discussões

7.1 Prospecção fitoquímica

Os resultados das análises fitoquímica com espécies *E. puniceifolia*, Amazonas, Brasil, estão representados com detalhes na Tabela 1.

Tabela 1: Resultados da prospecção fitoquímica

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	POSITIVO	NEGATIVO
Alcaloides		-
Antocianidinas		-
Antocianinas		-
Antraquinonas		-
Aurora		-
Catequinas (taninos catequicos)	+	
Chalcona		-
Cumarinas		-
Esteroides	+	
Flavonas	+	
Flavonóis	+	
Flavononas	+	
Flavononois	+	
Glicosídeos cardioativos	+	
Heterosídeos cianogenéticos	+	
Leucoantocianidinas		-
Saponinas	+	
Tanino condensados		-
Taninos hidrolisáveis	+	
Triterpenos	+	
Xantonas	+	

O extrato em análise apresentou a coloração vermelha, esperada para resultados positivos de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas. Como descrito, existem

diferentes classes de flavonoides, como: antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas e flavanas, com múltiplos efeitos biológicos, como atividade antioxidante, antiinflamatória e antitumoral, poder de redução a fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno a agregação plaquetária. Assim, a ingestão de flavonóides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares (ARAÚJO, 2008).

A rica presença de diversos flavonoides justifica a continuação da presente pesquisa com a cromatografia delgada visando identificar as substâncias devidos conhecimentos e futuros procedimentos farmacêuticos.

A presença de heterosídeos cianogénéticos são compostos que por hidrólise fornecem um ou mais açúcar, sendo a mais comum a D-glicose. Muitos glicosídeos são importantes na terapêutica e estão presentes em plantas medicinais, tais como os cardiotônicos, destacando-se a digitoxina isolada de espécies do gênero *Digitalis*, no caso a *D. purpurea*, conhecida como dedaleira, e a digoxina, isolada de *D. lanata* onde tem sido utilizada no tratamento da insuficiência cardíaca (SILVA, 2012).

A presença de saponinas (figura 1), logo, o extrato é constituído de saponinas, na qual possui propriedades tensoativas, ao dissolver-se em água e por agitação formam espuma persistente, tem propriedades detergentes (SULEYMAN et al., 2003).



Figura 1: Identificação de saponinas. Fonte : própria.

As principais atividades apresentadas por plantas que possuem saponinas são: anti-inflamatória, larvicida, hipocolesterolemiantes, moluscicida (pesticidas usados no controle de moluscos, como as lesmas e caracóis) e expectorante. (SULEYMAN et al., 2003).

Os taninos hidrolisáveis possuem um grupo poliol central (em sua maioria, é β -D-glicose, mas também o ácido quínico, outros fenóis e outros glicósidos); e hidroxilas esterificadas pelo ácido gálico (parte fenólica) (CASTEJON, 2011).

Têm sido atribuídas aos taninos muitas atividades fisiológicas humanas, como a estimulação das células fagocíticas e a ação tumoral, e atividades anti-infectivas (LOGUERCIO, 2005). Em processos de cura de feridas, queimaduras e inflamações, os taninos auxiliam formando uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre tecidos epiteliais lesionados, permitindo que, logo abaixo dessa camada, o processo de reparação tecidual ocorra naturalmente. Em patologias estomacais, o mecanismo de ação é bem semelhante, com a formação de uma camada de tanino-proteína complexados que envolvem a mucosa estomacal (MELLO & SANTOS, 2001).

7.2 Fracionamento de extratos

A fase em metanol (figura 2) obteve maior rendimento devido coloração, consistência e quantidade evidenciando rica presença de substâncias. As demais fases, hexânica, acetato de etila e de diclorometano, apresentaram coloração transparente e em pouquíssimas quantidades desfavorecendo posteriores análises, como a cromatografia.

A amostra foi devidamente armazenada em ambiente climatizado e controlado, preparada para o desenvolvimento das demais análises.



Figura 2 : Fração em metanol. Fonte: própria.



UFAM

7.3 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O extrato aquoso apresentou teor de fenóis de $39,55 \pm 3,97$ mg equivalentes de ácido gálico. Segundo Galeno (2014), o EEP apresentou teor de fenóis $21,6 \pm 1,0$ mg por equivalente de ácido gálico (GAE/g).

Os dados adquiridos propõe que ao longo dos anos os compostos fenólicos foram influenciados pelo ambiente e refletidos na quantificação das atividades antioxidantes, sendo crescente proporcionalmente ao passar do tempo (HENDRIKS, 1997).

Este mecanismo de ação dos antioxidantes, presentes em extratos de plantas, possui um papel importante na redução da oxidação lipídica em tecidos, vegetal e animal, pois quando incorporado na alimentação humana não conserva apenas a qualidade do alimento, mas também reduz o risco de desenvolvimento de patologias, como aterosclerose e câncer, o que justifica o estudo dos polifenóis mesmo sendo um componente dietético não essencial (MANACH *et al.*, 2005).

7.4 O ensaio de teor total de flavonoides

O extrato aquoso apresentou teor flavonoides de $10,71 \pm 0,42$ mg equivalentes de quercetina, respectivamente. Segundo Galeno (2014), o EEP apresentou teor de flavonoides $2,62 \pm 0,5$ mg por equivalente de quercetina (QE/g).

Os dados de flavonoides também sofreram influencia do ambiente, pois as coletas das amostras estão interligadas com fatores externos como temperatura, índice pluviométrico, composição atmosférica, sazonalidades e foi possível observar a diferença de forma benéfica ao passar do tempo visto que os resultados foram maiores comparados aos resultados de anos atrás.

Dentro dos compostos fenólicos, os flavonóides compreendem ao grupo mais importante. A estrutura química dos flavonóides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/ malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina. Variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonóides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos 27 dentro de cada classe de flavonóides. Estas substituições podem incluir oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação (HOLLMAN *et al.*, 1999).

Os alvos biológicos principais dos radicais livres e das ROS são as proteínas, cuja oxidação conduz à perda de função ou à degradação prematura nos proteossomas; os



lipídios, cuja oxidação altera as propriedades físicas das membranas celulares e, conseqüentemente, a sua função; e o DNA, cuja oxidação pode conduzir a mutações gênicas, a síntese protéica anormal, a alteração na expressão gênica, a apoptose e à morte celular (MACEDO, 2012).

7.5 Atividade sequestradora do radical DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazila)

No presente estudo científico, o ensaio do DPPH com a amostra apresentou CI_{50} de $8,13 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$, frente a $3,4 \pm 0,1 \mu\text{g/mL}$ apresentada pelo padrão de ácido gálico, usado no teste.

Segundo Sousa (2004), o chá de boldo (*Pneumus boldus*, Mold.) possui 2,04 mg/mL de CI_{50} , onde compõe quimicamente de alcaloides, taninos, flavonoides e eugenol, a camomila (*Matricaria recutita* L.) possui 47,41 mg/mL de CI_{50} , compõe de ácidos fenólicos, esteroides, cumarinas e flavonoides, o cravo (*Eugenia aromática*, Baill) possui 0,46 mg/mL de CI_{50} , constituído de diversos óleos essenciais como: cariofileno, metil-eugenol, oxido de cariofileno e chavicol.

As variações encontradas nos testes antioxidantes podem ser decorrentes do desenvolvimento foliar e/ou surgimento de novos órgãos concomitante a uma constância no conteúdo total de metabólitos secundários. Pois isto pode levar à menor concentração destes metabólitos por diluição, podendo, no entanto, resultar em maior quantidade total, devido ao aumento de biomassa. Além disso, alguns dos fatores discutidos apresentam correlações entre si e não atuam isoladamente, podendo influir em conjunto no metabolismo secundário, como por ex.: desenvolvimento e sazonalidade; índice pluviométrico e sazonalidade; temperatura e altitude, entre outros (HENDRIKS, 1997)

7.6 Composição centesimal

Na análise centesimal realizada a partir do extrato aquoso da *E. puniceifolia* (DC), constou $10,55 \pm 0,26$ de umidade, $7,81 \pm 0,22$ de resíduo mineral, $0,12 \pm 0,02$ de lipídeos e $4,55 \pm 0,22$ de proteínas. Estudos com outra espécie, *Eugenia uniflora* L. (pitanga), constou 90% de umidade, 0,23% de lipídios, 0,76% de proteínas, 0,28 de resíduo mineral.

O excesso de umidade em matérias-primas vegetais permite a ação de enzimas, podendo acarretar na degradação de constituintes químicos, além de possibilitar o desenvolvimento de fungos e bactérias (FARIAS, 2004).

As cinzas, resíduos não voláteis, isentos de carbono, que se originam da combustão das substâncias orgânicas em condições apropriadas, provêm, basicamente,



dos constituintes minerais e dos organo-metálicos que integram as plantas (cinzas fisiológicas) e, ainda, de materiais estranhos, especialmente areia e terra aderente à superfície da droga (cinzas não-fisiológicas). Portanto, o teor de cinzas totais de acordo com o estabelecido, como parâmetro para uma determinada matéria-prima vegetal, indica que não há presença de impurezas inorgânicas não-voláteis que podem estar presentes como contaminantes (PAULA *et al.*, 2008).

A identificação de espécies vegetais ricas em proteínas contribui para diminuir as carências nutricionais para população geral (VIEIRA, 1983).

O baixo teor lipídico contribui para o reduzido valor energético indicando a possibilidade de inclusão em dietas com restrições calóricas. (CHAVES *et al.*, 2004)

7.7 Análise por técnicas cromatográficas

7.7.1 Cromatografia em Camada Delgada

As frações de hexano e diclorometano não foram possíveis procederem a metodologia por deficiência nos rendimentos, pois não atingiram massas suficientes. Na fração de acetato de etila foi possível separar através da fase móvel Hexano:Acetato de Etila (3:7), seguiu-se para cromatografia em coluna com as respectivas fases e foi isolado para as seguintes análises em HPLC e na metanólica, não obteve-se a separação adequada em nenhuma das fases móveis testadas ao longo do prazo determinado.

7.7.2 Análises em HPLC

A fase em metanol (extrato) e extrato aquoso de *E. puniceifolia* seco (pó) foi identificada os seguintes picos (figura 3).

As substâncias identificadas na fase metanólica e no extrato seco são ricas em diversos derivados dos ácidos fenólicos. Estudos observaram um aumento na capacidade antioxidante do plasma após o consumo destes compostos. No entanto, condizem com todos os testes antioxidantes realizados ao longo da pesquisa e altos desempenhos nos respectivos resultados (MANACH *et al.*, 2005).

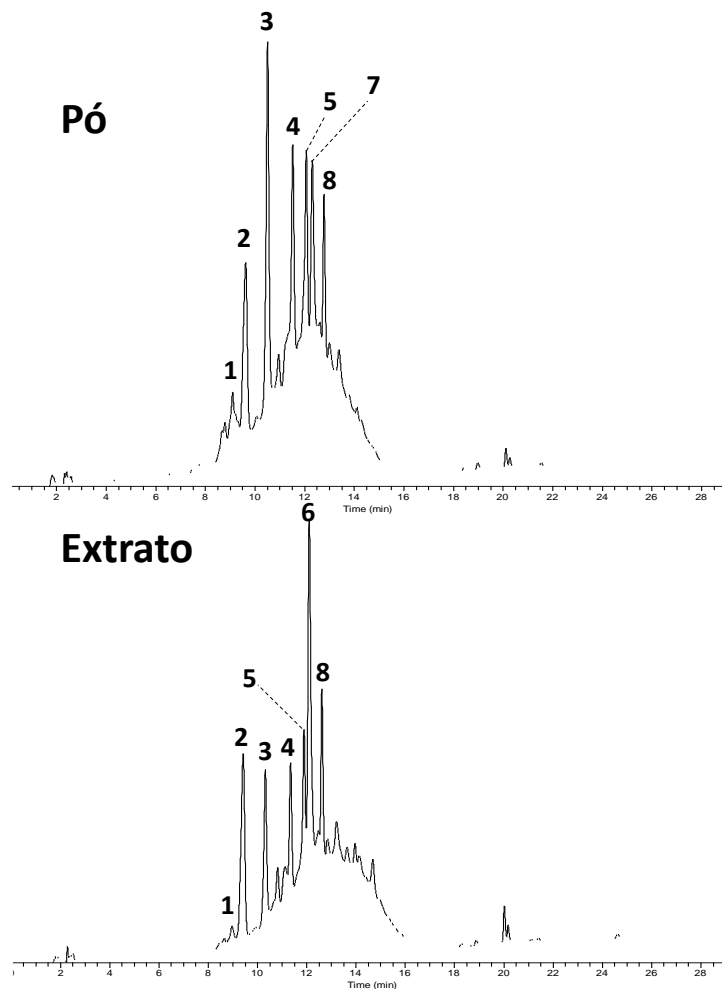
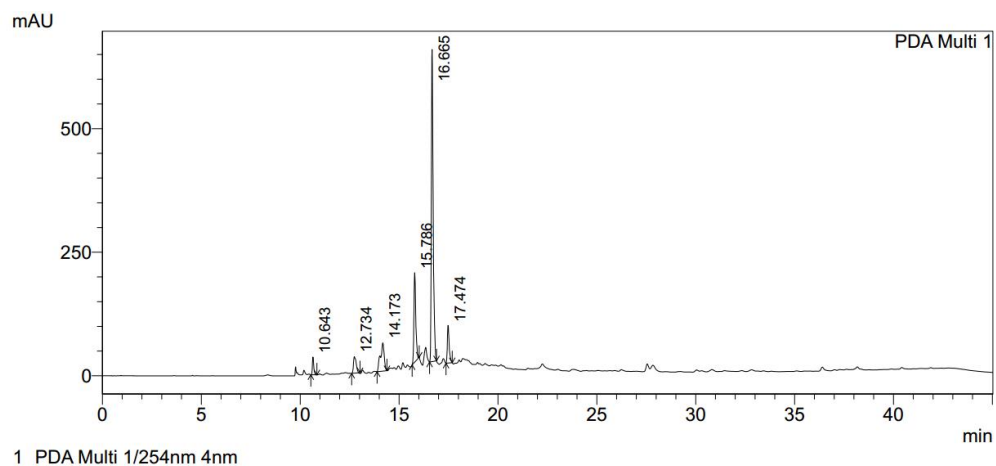


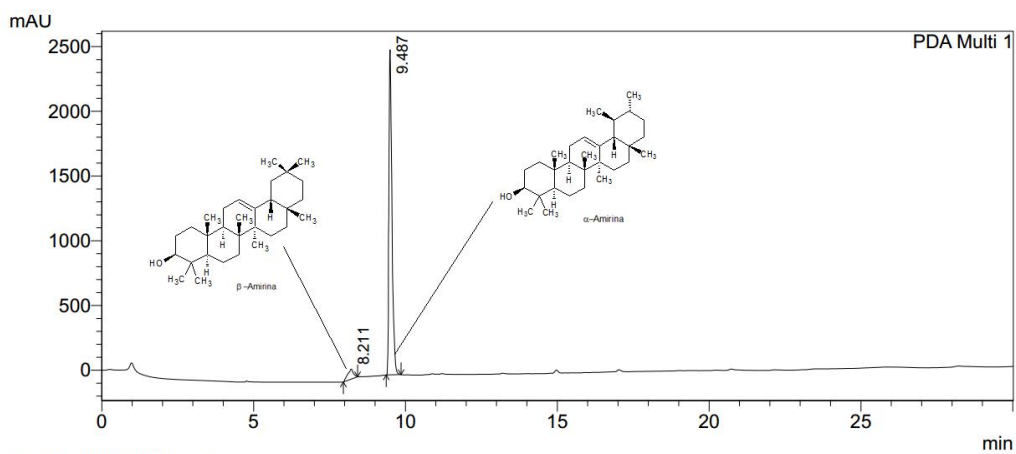
Figura 3: Perfil da fase metanólica e do extrato seco. 1 = ácido quínico; 2 = ácido clorogênico; 3 = ácido gálico; 4 = glucosídeo do ácido p-cumarico; 5 = glucosídeo do ácido gálico; 6 = ácido cafeico; 7 = ester do ácido p-cumarico; 8 = galato de etila

Na fase em acetato de etila, foi observado no cromatograma obtido com o método A (Figura 4), 6 picos bem definidos, os quais não corresponderam a nenhum dos padrões disponíveis no acervo do FITOPHAR-FCF. Contudo, esse sistema pode ser empregado em métodos preparativos para a separação e identificação das substâncias observadas. Por outro lado, no cromatograma obtido com o método B (Figura 5) observaram-se dois picos com tempo de retenção e absorvância semelhantes às das substâncias α e β -amirinas (Figura 6), o que sugere a presença das mesmas na amostra.



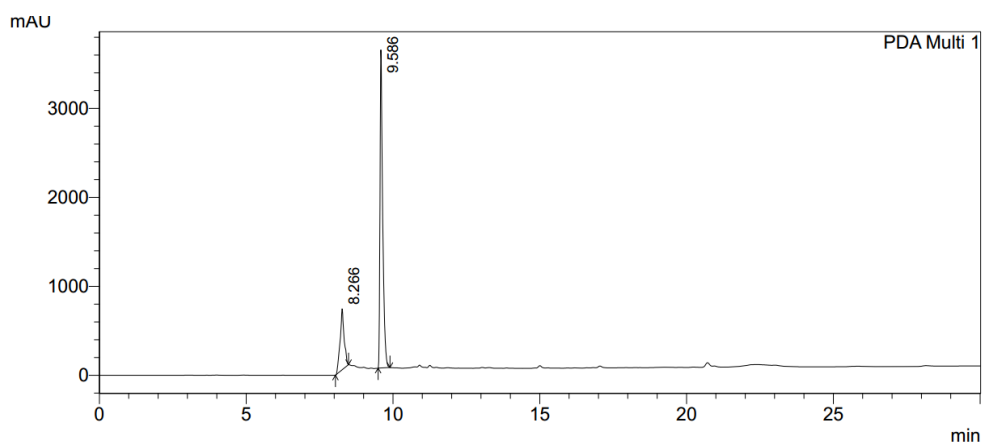
1 PDA Multi 1/254nm 4nm

Figura 4: Perfil da fase acetato de etila em método A.



1 PDA Multi 1/200nm 4nm

Figura 5: Identificação da fase acetato de etila em método B.



1 PDA Multi 1/200nm 4nm

Figura 6: Padrão beta e alfa amirina.

Ambas substâncias são triterpenóides em que têm despertado um grande interesse nos últimos anos em razão da descoberta do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas, tais como: anticâncer, antiinflamatório, antileprótico, antiviral, antibacteriano, antifúngico, antidiurético, giardicida e inibidores da enzima acetilcolinesteras (Barbosa-Filho et al., 2007). A partir da mistura binária α e β amirina, isolada em grande quantidade em um estudo, foi realizado uma série de ensaios biológicos, destacando-se potente atividade anti-inflamatória, e antiartrite. (BANDEIRA, 2002).

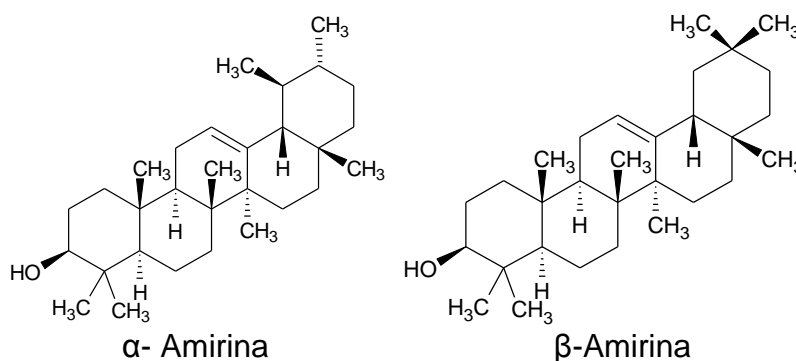


Figura 7: substâncias identificadas

Estudos demonstrando a relação estrutura química (figura 7) e atividade biológica de triterpenos encontram-se bem representados na literatura, onde modificações estruturais podem ser obtidas objetivando a potencialização da ação farmacológica do triterpeno de partida.

Os estudos científicos envolvendo produtos naturais ativos, suas indicações e contra-indicações, podem proporcionar aos fitofármacos um maior nível de aceitação médica, respaldados pela comprovação de sua eficácia terapêutica em experimentos farmacológicos pré-clínicos e clínicos. Este fato é de extrema importância, considerando-se que o Brasil se encontra atualmente nas primeiras posições no mercado mundial de fármacos, necessitando urgentemente que as indústrias de fitofármacos existentes se desenvolvam para competir inclusive a nível internacional. A instalação de indústrias envolvendo a síntese de fármacos a partir de produtos naturais poderia, assim, ser um considerável polo de crescimento para a química e a farmacologia.

8 Referências

- ARAÚJO, J. M. (2008), Química de Alimentos: Teoria e Prática. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, 477p.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

RELATÓRIO FINAL PIBIC/PAIC 2015-2016



UFAM

- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of AOAC International. 18.ed. Washington, D.C., USA: AOAC International, 2005.
- ÁVILA-PEÑA D, PEÑA N, QUINTERO L, SUÁREZ-ROCA H. Antinociceptive activity of *Syzygium jambos* leaves extract on rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 112(2): 380–385, 2007.
- BANDEIRA PN 2002. *Contribuição ao Estudo Químico de Plantas do Nordeste Brasileiro: Protium heptaphyllum March e Protium tenuifolium Engl.* Fortaleza. Tese (Doutorado): Universidade Federal do Ceará, Edições – UFC.
- BARBOSA-FILHO JM, NASCIMENTO-JÚNIOR FA, TOMAZ ACA, ATHAYDE-FILHO PF, SILVA MS, CUNHA EVL, SOUZA MFV, BATISTA LM, DINIZ MFFM 2007. Natural products with antileprotic activity. *Rev Bras Farmacogn* 17: 141-148.
- BASTOS, M. L. Avaliação da viabilidade tecnológica de obtenção de forma farmacêutica sólida contendo altos teores de produto seco por aspersão de *Eugenia punicifolia*. Dissertação mestrado (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, Manaus. 110 f. 2011.
- BRITO AU; CHAVES FCM; SENRA TV, OKA JM; BERNI RF.2014.Produção de frutos de pedra-ume-caá em função de condições meteorológicas em Manaus-AM. *Horticultura Brasileira* 31:S2373-S2379.
- CASTEJON, F. V. Taninos e saponinas. Universidade Federal De Goiás. 2011.
- CHAVES, M.C.V. et al. Caracterização físico-química do suco da acerola. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 4. n. 2, p. 55-59, 2004.
- DE CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, v.10, p.178-182, 2002.
- FARIAS MR. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: *Farmacognosia- da planta ao medicamento*. Eds. Simões CMO et al. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis:editora da UFRGS/ editora da UFSC, p. 263-288, 2004.
- FERREIRA, A. C., et al. "Inhibition of thyroid peroxidase by *Myrcia uniflora* flavonoids." *Chem. Res. Toxicol.* 2006 Mar; 19(3): 351-5.



UFAM

- FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. Revista da Associação Médica Brasileira, v.43, n.1, p.61-68, 1997
- FERREIRA, I.C.F.R.; ABREU, R.M.V. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. Bioanálise, v.4, n.2, 2007.
- FICHI G, FLAMINI G, GIOVANELLI F, OTRANTO D, PERRUCCI S. Efficacy of an essential oil of *Eugenia caryophyllata* against *Psoroptes cuniculi*. Experimental Parasitology 115(2): 168–172, 2007
- GALENO, D.M.L, CARVALHO, R.P., BOLETI, A.P.A, LIMA, A.S., PACHECO, C.C., SOUZA, T.P., LIMA, E.S. Extract from *Eugenia punicifolia* is an Antioxidant and Inhibits Enzymes Related to Metabolic Syndrome. Applied Biochemistry and Biotechnology, v.172, p. 311–324, 2014.
- GRANGEIRO, M.S.; CALHEIROS-LIMA, A.P.; MARTINS, M.F.; ARRUDA, J.F.; GARCEZ-DO-CARMO, L.; SANTOS, W.C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae) in cholinergic nicotinic neurotransmission. Journal of the Ethnopharmacology, v. 108, p. 26-30, 2006.
- HENDRIKS, H.; ANDERSON-WILDEBOER, Y.; ENGELS, G.; BOS, R.; WOERDENBAG, H. J.; *Planta Med.* 1997, 63, 356.
- HOLLMAN PCH, KATAN MB. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. Food Chem Toxicol 1999; 37 (9/10): 937-42.
- KADE IJ, IBUKUN EO, NOGUEIRA CW, ROCHA JBT. Sundrying diminishes the antioxidative potentials of leaves of *Eugenia uniflora* against formation of thiobarbituric acid reactive substances induced in homogenates of rat brain and liver. Experimental and Toxicologic Pathology 60(4-5): 365–371, 2008.
- LEE SE, HWANG HJ, HA JS, JEONG HS, JEONG HK 2003. Screening medicinal plant extracts for antioxidant activity. LifeSci 73: 167-179
- LIU, R.; HU, Y.; LI, J.; LIN, Z. (2007), Production of soybean isoflavone genistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway. Metabolic Engineering, 9, 1-7.
- LOGUERCIO, A.P.. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v.35, n.2, p 366-370, 2005.



UFAM

- MACEDO, A. C.; Efeitos fisiológicos de fungicidas no Desenvolvimento de plantas de melão rendilhado, cultivadas em ambiente protegido. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”. Campus De Botucatu. São Paulo. 2012.
- MAHMOUDI, M.; EBRAHIMZADEH, M. A.; ANSAROUDI, F.; NABAVI, S. F.; NABAVI, S. M. Antidepressant and antioxidant activities of *Artemisia absinthium* L. at flowering stage. *African Journal of Biotechnology* v.8, n.24, p. 7170-7175, 2009.
- MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C.; Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am. J. Clin. Nutr.* 2005, 81, 230S.
- MATOS FJA. (1997). Introdução à Fitoquímica Experimental. 2^a ed.-Fortaleza: UFC.
- MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.
- NETO, L. G., LOPES, N. P., Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto – SP, Brasil, 2006
- PAULA JAM, PAULA JR, BARA MTF, REZENDE MH, Ferreira HD. Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum - Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18: 1-28, 2008.
- RAVI K, RAJASEKARAN S, SUBRAMANIAN S. Antihyperlipidemic effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Food and Chemical Toxicology* 43(9): 1433–1439, 2005.
- SILVA, J. V. S.; Contribuição para o estudo molecular e morfológico de espécies do género *digitalis* L. Mestrado em Medicamentos à Base de Plantas. Universidade de Lisboa. Faculdade de farmácia. Departamento de ciências farmacológica. 2012
- Sousa DP, Nóbrega FFF, Claudino FS, Almeida RN, Leite JR, Mattei R 2007. Pharmacological effects of the monoterpene ,-epoxy-carvone in mice. *Rev Bras Farmacogn* 17: 170-175.



UFAM

- SOUSA MP, MATOS MEO, MATOS FJA, MACHADO MIL, CRAVEIRO AA 2004. Constituintes químicos ativos e propriedades biológicas de Plantas Medicinais Brasileiras, Ed. UFC, 445p
- SULEYMAN, H.; MSHVILDADZE, V.; GEPDIRE-MEN, A.; ELIAS, R. Acute and chronic anti-inflammatory profile of the ivy plant, *Hedera helix*, in rats. *Phytomedicine*, v. 10, p. 370-374, 2003
- VIEIRA, E. C. Leaf protein research in Brazil. In: TELEK, L.; GRAHAM, H. D. (Eds.). Leaf protein concentrates. Westport: AVI Publishing Co., 1983. p. 661-668.
- XU, B.; CHANG, S. K. C. Total phenolic, phenolic Acid, anthocyanin, flavan-3-ol, and flavonol profiles and antioxidant properties of pinto and black beans (*Phaseolus vulgaris* L.) as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 57, p. 4754-4764, 2009.

9 Cronograma de Atividades

	Descrição	Ago 2015	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2016	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Revisão bibliográfica	R*	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
2	Coleta do material botânico	R	R										
3	Preparação do extrato aquoso			R									
4	Screening fitoquímico			R	R	R							
5	Fracionamento do extrato						R	R					
6	Realizar CCDC								R	R			
7	Identificação dos compostos										R	R	
8	Caracterização centesimal											R	
9	Apresentação do relatório Pibic												R
10	- Elaboração do Resumo e Relatório Final - Preparação da Apresentação Final para o Congresso Conic												R

R* = Realizado;