Erick Urano Braga

Estudo Fitoquímico de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.

Araraquara

2015

Erick Urano Braga

Estudo Fitoquímico de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de graduação em Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para obtenção do grau de Farmacêutico-Bioquímico.

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Araraquara

2015

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus pais Sergio e Isis, meu irmão Victor e meus avós Luiz e Maria, os quais nunca mediram esforços para sempre estarem ao meu lado me apoiando, ensinando e incentivando nos momentos felizes e nos momentos de dificuldade. Obrigado pelo carinho e confiança depositada em mim.

AGRADECIMENTOS

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho.

Á minha família pelo apoio.

Ao Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos pela orientação, paciência, compreensão, dedicação e amizade durante esses anos.

Aos pós-graduandos Flávio, Juhan, Elaise, Ana Carolina, Isabela e Gabriela do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP pela amizade, paciência e auxilio nas técnicas realizadas no laboratório. Agradeço também ao professor José Ricardo pela ajuda com as análises espectrofotométricas.

Ao técnico do Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP Caio Perego por toda a ajuda para a execução dos experimentos.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

Aos amigos e colegas de graduação Márcio, Jhohann, Fernando, Rodrigo, Larissa, Flavio, Barbara, Henrique e Luiza pela amizade apoio e incentivo.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro

Lista de figuras

Figura 1: Foto de exemplar de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. Fonte: COSTA, 2010. 13

Figura 2: Foto mostrando detalhe das folhas e do fruto de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. Fonte: COSTA, 2010.....13

Figura 3: Esquema de um percolador. Fonte: CHAVES, 2010.....19

Figura 4: Esquema de uma partição líquido-líquido. Fonte: AZEVEDO, 2011. 21

Figura 5: Ilustração de uma coluna cromatográfica clássica. Fonte: DEGANI et al., 1998. 23

Figura 6: Representação da estrutura química da dextrana hidroxipropilada (Sephadex® LH-20). Fonte: GE Healthcare, 2007. 24

Figura 7: Esquema do mecanismo de separação por exclusão molecular. Fonte: LI et al., 2013.....25

Figura 8: Esquema das partes que constituem um espectrofotômetro. Fonte: MARTINEZ, 2015. 27

Figura 9: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico. 30

Figura 10: Esquema do procedimento realizado no teste de determinação do teor de fenólicos totais.....31

Figura 11: Esquema do procedimento realizado no teste de determinação do teor de flavonoides totais.....32

Figura 12: Esquema do procedimento realizado no teste de determinação de atividade antioxidante.....33

Figura 13: Curva analítica do ácido gálico (padrão) utilizada no cálculo do teor de fenólicos totais.....36

Figura 14: Curva analítica da quercetina (padrão) utilizada no cálculo do teor de flavonoides totais.....36

Figura 15: Gráfico comparativo das atividades antioxidantes do extrato metanólico, da fração n-butanol e do ácido ascórbico (padrão). 37

Figura 16: CCD das frações 1 a 51. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%. 39

Figura 17: CCD das frações 52 a 94. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%. 39

Figura 18: CCD das frações 95 a 144. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%. 40

Figura 19: CCD das frações 145 a 193. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%. 40

Figura 20: CCD das frações 194 a 230 e frações A, B, C e D. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%. 41

Figura 21: CCD das frações 80 a 94. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%. 41

Figura 22: CCD das frações 80 a 94. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com anisaldeido sulfúrico. 42

Figura 23: CCD das frações 16 a 230. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com FeCl3 2%. 42

Figura 24: Fluxograma demonstrando as etapas do trabalho e os respectivos experimentos realizados.....43

Lista de abreviaturas

DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

CCD: Cromatografia em camada delgada

K: Coeficiente de partição

CG: Cromatografia gasosa

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

A: Absorbância

UV-Vis: Ultra Violeta - Visível

$CI_{50:}$ Concentração inibitória de 50%

CC: Cromatografia em coluna

P: Padrão

B: Branco

A: Amostra

$FeCl_3$: Cloreto férrico

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Resumo

Lista de Ilustrações

Lista de abreviaturas

1. Introdução 11

1.1. Plantas medicinais 11

1.2. O cerrado brasileiro e seu potencial biológico 12

1.3. *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. 12

1.4. Estudo fitoquímico 16

1.4.1. Identificação botânica 16

1.4.2. Coleta e preparo da droga vegetal 16

1.4.3. Preparo do extrato 18

1.4.4. Fracionamento do extrato 20

1.4.4.1. Partição líquido-líquido 20

1.4.4.2. Métodos cromatográficos 21

1.4.4.2.1. Cromatografia líquida em coluna clássica 22

1.4.4.2.1.1. Sephadex® LH-20 24

1.4.4.2.2. Cromatografia em camada delgada 25

1.4.5. Espectrofotometria no UV-Vis 26

2. Objetivo 28

3. Materiais e Métodos 28

3.1.Preparo da droga vegetal e extração 28

3.2. Extração líquido-líquido 30

3.3. Teor de Fenólicos Totais 30
3.4. Teor de Flavonoides Totais 31
3.5. Atividade antioxidante (DPPH) 32
3.6. Cromatografia em coluna clássica por exclusão molecular (CC) 33
3.7. Cromatografia em camada delgada (CCD) 34
4. Resultados 35
4.1. Teor de fenólicos totais 35
4.2. Teor de flavonoides Totais 36
4.3. Atividade antioxidante (DPPH) 37
4.4. Cromatografia em coluna por exclusão molecular (CC) 38
4.5. Cromatografia em camada delgada (CCD) 38
5. Fluxograma do trabalho 43
6. Discussão 46
7. Conclusão 46
8. Referências Bibliográficas 47

Resumo

A utilização de plantas para fins terapêuticos data de antes da invenção da escrita e seu uso perdura até os dias de hoje, sendo utilizado de forma tradicional *in natura* através de chás, ou por meio de extratos, medicamentos fitoterápicos ou substâncias isoladas. O cerrado brasileiro, segundo maior bioma da América do Sul, possui uma flora muito rica em espécies, dentre as quais se destaca a *Byrsonima pachyphylla* A. Juss, popularmente conhecida como “murici”. O gênero apresenta diversos registros etnofarmacológicos de uso no tratamento de infecções de pele, febre, ulceras gástricas, diarreia, doenças tropicais, entre outros. Em estudos farmacológicos apresentou atividades anti-inflamatória, antifúngica, bactericida, entre outros. Trabalhos realizados previamente por nosso grupo de pesquisa mostraram que a espécie apresenta, para extratos e frações atividades antibacterianas relevantes. Nesse trabalho foi realizado um estudo fitoquímico do extrato metanólico de folhas de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss o qual foi comparado com sua fração n-butanol. O extrato foi preparado por percolação e após secagem foi submetido a uma partição líquido-líquido com água, acetato de etila e n-butanol. O extrato metanólico e a fração n-butanol foram submetidas a testes espectrofotométricos de quantificação de teor de compostos fenólicos totais, flavonoides totais e atividade antioxidante (teste DPPH). A fração n-butanol foi então submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna clássica por exclusão molecular, utilizando como eluente metanol e como fase estacionária Sephadex® LH-20. Foram obtidas 230 frações as quais foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). Nos testes espectrofotométricos tanto o extrato metanólico quanto a fração n-butanol apresentaram valores significativos de compostos fenólicos e de atividade antioxidante, apesar da quantidade de flavonoides, tanto no extrato quanto na fração,

ter sido comparativamente baixa. O fracionamento de n-butanol por cromatografia em coluna por exclusão molecular não foi eficiente, considerando-se as análises das frações por CCD. Apesar disso pudemos identificar alguns grupos de substâncias presentes nesta fração como: taninos hidrolisáveis ou ácidos fenólicos e saponinas e/ou terpenos.

1. Introdução

1.1. Plantas medicinais

A utilização e o conhecimento acerca das plantas vêm acompanhando a história da humanidade, sendo que começamos a utilizar as plantas primeiramente como fonte de alimentação. Conforme o homem observou diferentes espécies as informações sobre efeitos terapêuticos e tóxicos de algumas delas começaram a ser descobertos empiricamente e foram sendo passados oralmente de geração para geração, muitos dos quais chegaram até os dias de hoje. O conhecimento sobre as plantas de uso terapêutico data desde antes da invenção da escrita, os primeiros registros existentes sobre o relato de utilização de plantas para fins medicinais estão em documentos babilônicos e sumérios datados de 3000 anos a.C em registros feitos em placas de barro, atualmente conservadas no “British Museum”, onde se encontram copiados em caracteres cuneiformes por ordem do rei da Assíria Assuirbanípal (CUNHA, 2009).

Ao longo da história documentos sobre plantas e seus efeitos medicinais e curativos foram escritos e sua importância só aumentou desde então, mas o estudo das plantas medicinais só tomou um carácter mais científico a partir do Renascentismo, sendo que em 1673 com a publicação da “*Histoire general des Drogues”* pelo farmacêutico francês Pierre Pomet, o estudo da Farmacognosia começou a adotar classificações e descrições taxonômicas, o que se traduziu numa identificação botânica mais precisa para as drogas vegetais, ponto de partida essencial desta disciplina (CUNHA, 2009).

Em 1815, SEYDLER em sua Analecta Pharmacognostica, criou o termo FARMACOGNOSIA para designar a ciência que estudava as matérias de origem natural, usadas no tratamento de enfermidades. Este termo, que atualmente se refere

com exclusividade as matérias de origem vegetal e animal, é formado de duas palavras gregas, a saber: PHARMACON, que significa droga, medicamento, veneno e: GNOSIS, conhecimento (OLIVEIRA, AKISUE, AKISUE, 1998).

No entanto, somente em finais do século XVIII que a Farmacognosia começou a se preocupar de uma forma sistemática com o isolamento e identificação de estruturas moleculares dos compostos ativos provenientes dos produtos de origem natural; dinâmica essa que é praticada até os dias de hoje (CUNHA, 2009).

1.2. O cerrado brasileiro e seu potencial biológico

O cerrado é um bioma típico do Brasil e o segundo maior da América do Sul. Ocupa uma área equivalente a 22% do território brasileiro, possuindo grande biodiversidade de espécies de plantas, aproximadamente 10 mil, sendo 4400 endêmicas, o que corresponde a 1,5% da flora mundial. Apesar de ser um domínio bastante ameaçado, abriga espécies importantes do ponto de vista ecológico e econômico, como plantas com propriedades medicinais e frutíferas que são utilizadas pela população como fonte de alimento e no tratamento de muitas doenças. Uma das famílias típicas dessa vegetação é a Malpighiaceae (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2014; BALLESTRA, et al., 2012).

1.3. *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.

A família Malpighiaceae possui aproximadamente 71 gêneros e 1.250 espécies. No Brasil ocorrem, aproximadamente, 300 espécies pertencentes a 32 gêneros (LOMBELLO; FORNI-MARTINS, 2003; BARROSO et al., 1991). Dentre estas espécies, foi escolhida para o presente estudo *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. (Figuras 1 e 2), dentre outros motivos pela quase inexistência de trabalhos científicos

a seu respeito, apesar de ser uma espécie amplamente distribuída pelo Cerrado brasileiro (MELO; OLIVEIRA; FRANCESCHINELLI, 2013).

Figura 1: Foto de exemplar de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. Fonte: COSTA, 2010.

Figura 2: Foto mostrando detalhe das folhas e do fruto de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. Fonte: COSTA, 2010.

As espécies desse gênero, popularmente conhecidas como “murici”, são diferenciadas por suas áreas de ocorrência e cores de seus órgãos, recebendo, assim, denominações populares específicas e variadas. Há uma gama de diferentes usos de cada espécie, dentre os quais estão ornamentação e matéria-prima para construção civil (GUILHON-SIMPLICIO, PEREIRA, 2011). Existe um considerável consumo sob a forma de alimentos como bebidas e doces (LIMA et al., 2008), além da apreciação dos frutos *in natura* de espécies como *Byrsonima crassifolia* e *Byrsonima verbascifolia* (VALLILO et al., 2007).

Há diversos usos etnofarmacológicos do gênero relatados na literatura como: tratamento de infecções de pele e febre (CASTILLO-AVILA et al., 2009), gastrites, úlceras gástricas e pépticas (CARDOSO et al., 2006), atividade adstringente nas diarréias e disenterias (RODRIGUES & CARVALHO, 2001), tratamento de doenças tropicais como esquistossomose, leishmaniose, malária, doenças fúngicas e bacterianas entre outras (FERREIRA, 1980; CORRÊA, 1984; GRANDI et al., 1989; DI STASI, 1989; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990; BRANDÃO, 1991; CARIBÉ; CAMPOS, 1991; MARTINS et al., 1994). Como atividades farmacológicas apresentadas podemos destacar: atividade anti-inflamatória (MALDINI et al., 2009), anti-hiperglicêmica e anti-hiperlipidêmica (PEREZ-GUTIERREZ et al., 2010), ação antifúngica e antibacteriana (MICHELIN et al., 2008; MARTINEZ-VÁZQUEZ et al., 1999), antioxidante (CASTILLO-AVILA et al., 2009), imunoestimuladora (BONACORSI et al., 2009) dentre outras.

Em relação aos metabólitos secu

ndários produzidos pelo gênero foram encontrados na literatura as seguintes substâncias: rutina, quercetina, isoquercetina, flavanonas, flavonas, flavonóis, catequinas, protocianidinas, biflavonoides, triterpenos, ácido gálico, saponinas,

terpenos, derivados do ácido gálico e do ácido quínico (RODRIGUES et al., 2012; GUILHON-SIMPLÍCIO, PEREIRA, 2011; GEISS et al., 1994; MALDINI et al., 2011; GORDON et al., 2011; SANNOMIYA, CARDOSO, 2007; SANNOMIYA et al., 2004; COSTA, 2010; VALLILO et al., 2007).

Estudos realizados por Costa (2010) e por nosso grupo de pesquisa em parceria com o Laboratório de Fisiologia de Micro-organismos da FCF-UNESP, sob a responsabilidade da Prof. Dra. Taís Maria Bauab, sugeriram a presença de derivados do ácido gálico, catequinas e flavonoides no extrato metanólico bruto das folhas de *B. pachyphylla*. Além disso, o trabalho demonstrou a atividade bacteriostática do extrato metanólico bruto e de sua fração acetato de etila em *Bacillus subtilis, Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, da fração aquosa em *P. aeruginosa* e da fração butanólica em *P. aeruginosa* e *S. aureus*. As frações acetato de etila e butanólica apresentaram atividade bactericida, sendo a primeira em *B. subtilis* e *S. aureus* e a segunda apenas em *S. aureus*.

A partir das informações acima descritas podemos levantar alguns pontos que nos motivaram a estudar esta espécie em particular como: sua importância e relevância como gênero e espécie botânica presente em grande quantidade e variedade de espécies, as atividades farmacológicas apresentadas no gênero em diversos estudos, dentre eles a atividade antibacteriana apresentada por *B. pachyphylla* em estudos conduzidos em nossa Instituição, além do grande potencial que a espécie pode possuir em virtude da quase inexistência de estudos a seu respeito, mas que ainda carece de mais estudos.

1.4. Estudo fitoquímico

O estudo fitoquímico tem como objetivo o isolamento e a elucidação estrutural de metabólitos secundários presentes em uma espécie vegetal (BRAGA et al., 2003). Para tanto são necessários vários passos antes de se alcançar esse objetivo, tais como os apresentados abaixo.

1.4.1. Identificação botânica

Quando se trabalha com plantas, a identificação da espécie e sua perpetuação como testemunho são os passos mais importantes para que qualquer investigação possa ser produzida. Estudos que envolvam plantas medicinais, quer sejam na área de etnobotânica, etnofarmacologia, farmacologia, farmacognosia, fitoquimica, agronomia ou biotecnologia, para que mereçam confiabilidade, devem partir da certeza de que as espécies envolvidas estejam corretamente identificadas e depositadas no herbário de uma instituição. Esse procedimento é tão importante porque dentro do reino vegetal existem espécies que aparentemente são muito parecidas, mas quando as analisamos em relação aos seus constituintes químicos, podem apresentar diferenças significativas (CUNHA, 2009).

1.4.2. Coleta e preparo da droga vegetal

A coleta é o primeiro passo na produção de uma droga vegetal. Este processo é especialmente importante por ser determinante para a constituição química do produto final a ser estudado ou comercializado, assim como o plantio a coleta precisam ser cuidadosamente planejados para que se tenha um bom rendimento em quantidade e qualidade de metabólitos e substância ativa de interesse. Os fatores que devem ser levados em consideração são: órgão coletado, idade da planta, época de

coleta, período do dia da coleta. Após a coleta é necessário que o material vegetal seja limpo, estabilizado (se necessário), seco e moído (se necessário), para ser transformado em droga vegetal (SIMÕES, et al. 2007).

A limpeza da planta e remoção de terra e de outros possíveis contaminantes após a coleta é muito importante para que os constituintes de interesse presentes no material não sofram degradação por micro-organismos e para que não haja contaminações. O material vegetal pode ser lavado com água para a remoção da terra e colocado em um banho de hipoclorito para a desinfecção do material (SIMÕES et al., 2007).

A estabilização tem a função de desnaturação de enzimas provenientes de micro-organismos ou mesmo da própria planta, para evitar reações enzimáticas que possam alterar os metabólitos da planta. Pode ser feito por imersão em etanol ou através da exposição a alta temperatura (acima de 60 Cº) por curto período de tempo (SIMÕES et al., 2007).

A secagem tem por finalidade a retirada de água e com isso impedir reações de hidrólise e de crescimento microbiano. A umidade residual dependerá do tipo de órgão que constitui o material vegetal (BACCHI, 1996). O processo de secagem ocorre a baixas temperaturas e durante longo tempo, em geral em torno de 7 dias. A secagem pode ser realizada ao ar livre e à temperatura ambiente ou em estufa, sendo essa última mais rápida (SIMÕES et al., 2007).

A moagem tem por finalidade reduzir mecanicamente, o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-o, assim, para a próxima etapa, a extração. O aumento da área de contato entre o material sólido e o liquido extrator torna mais eficiente a operação. A escolha das dimensões mais apropriadas depende também da textura do órgão vegetal, quanto mais rígidos forem os tecidos, maior será

o grau de divisão necessário. A metodologia utilizada para reduzir de tamanho o material vegetal é escolhida conforme as características deste (SIMÕES et al., 2007).

1.4.3. Preparo do extrato

O preparo de um extrato vegetal é o ponto de partida para um estudo fitoquímico ele é o produto da extração, e apresenta substâncias que foram retiradas do material vegetal através de um solvente adequado, resultando em uma solução extrativa, solução essa que é posteriormente concentrada através da retirada do solvente (SIMÕES et al., 2007).

O solvente escolhido deve ser o mais seletivo possível. É graças a seletividade que se pode extrair as substâncias desejadas. Como a seletividade depende principalmente da polaridade, o conhecimento da polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair determina o solvente ou mistura de solventes que mais se aproxima do ótimo de seletividade para aquela extração (SIMÕES et al., 2007).

Além dos solventes utilizados no processo devemos levar em consideração o método e a técnica de extração que será utilizada. Existem vários métodos de extração, e são classificados em métodos a quente e métodos a frio, cada um deles possui vantagens e desvantagens e possuem como diferencial entre si o fato de trabalharem ou não com aquecimento e/ou agitação (SIMÕES et al., 2007).

O aumento de temperatura em um método extrativo favorece a extração, já que a solubilidade das substâncias aumenta com o aumento de temperatura. A agitação também favorece a extração, já que ela aumenta a superfície de contato do solvente com a droga vegetal (SIMÕES et al., 2007).

Apesar do aumento de temperatura e da agitação favorecerem a extração devemos considerar que algumas substâncias de interesse podem sofrer degradação com o aquecimento, além do que, métodos que envolvam aquecimento e agitação são mais caros, portanto devemos levar em conta também o custo operacional (SIMÕES et al., 2007).

Os principais métodos a quente são: infusão, decocção e extração com Sohxlet; os principais métodos a frio são: percolação e maceração. Nesse trabalho foi utilizado o método de percolação (SIMÕES et al., 2007).

A percolação é um método de extração exaustiva que permite o esgotamento da matéria-prima (Figura 3). A planta é colocada em um percolador através do qual é passado o líquido extrator. É indicada para substâncias muito ativas farmacologicamente, presentes em pequena quantidade ou de baixa solubilidade (SIMÕES et al., 2007).

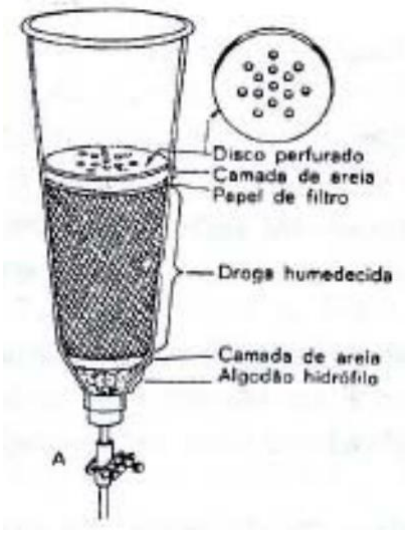

Figura 3: Esquema de um percolador.
Fonte: CHAVES, 2010.

À solução resultante é dada o nome de solução extrativa, ela então é concentrada e seca. Dependendo da volatilidade do solvente utilizado na extração

este processo pode ser feito a temperatura e pressão ambiente em capela ou através de equipamentos como dessecador, rotaevaporador ou liofilizador.

1.4.4. Fracionamento do extrato

O extrato vegetal pode ser estudado e utilizado em sua forma não purificada, mas é muito mais interessante trabalhar com uma substância isolada, porque a partir dessa é possível elucidar a sua estrutura molecular e consequentemente com uma única substância é possível se avaliar o efeito farmacológico de forma mais precisa, além de possibilitar a síntese química dessa substância e até mesmo a sua modificação, modulando assim seu efeito farmacológico.

Partindo-se de um extrato vegetal que é uma mistura altamente complexa de substâncias podemos chegar ao isolamento de uma única molécula através de uma série de técnicas de separação e purificação.

1.4.4.1 Partição líquido-líquido

É comum iniciar-se o fracionamento de um extrato vegetal através de partição por solventes orgânicos de polaridade crescente. A partição implica em uma dissolução seletiva e distribuição entre dois solventes imiscíveis. Esse fenômeno pode ser aplicado a separação de componentes de uma mistura. A concentração de cada um dos componentes em cada um dos solventes está relacionada com o coeficiente de partição (K) de cada substância. Os melhores rendimentos de extração são obtidos quando o volume total de solvente utilizado é dividido em alíquotas e procede-se com extrações sucessivas. Esse processo de extração é conhecido como partição líquido-líquido e é realizado em um funil de separação, como apresentado na figura 4.

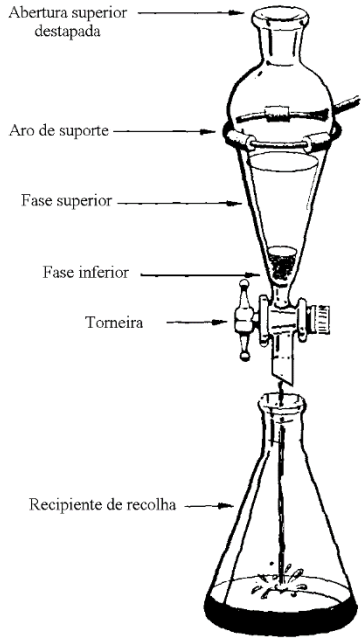

Figura 4: Esquema de uma partição líquido-líquido. Fonte: AZEVEDO, 2011.

1.4.4.2. Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos são os métodos mais utilizados na separação de misturas. Podem ser utilizados tanto para fins analíticos quanto para o isolamento de substâncias de interesse, sendo dessa maneira denominadas de cromatografia analítica e cromatografia preparativa respectivamente (CUNHA, 2009; SIMÕES et al., 2007).

A cromatografia é uma técnica tão importante e utilizada nos dias de hoje que a gama de técnicas, equipamentos e insumos para cromatografia são cada vez maiores, para o uso em pesquisas ou na produção e controle de qualidade na indústria farmacêutica, de biotecnológica, entre outros (CUNHA, 2009; SIMÕES et al., 2007).

Basicamente todas as técnicas cromatográficas atuam da mesma forma, separando os constituintes de uma mistura através da interação entre a fase móvel, a

fase estacionária e a amostra. Essas técnicas podem ser divididas e classificadas de várias formas, por exemplo em relação a forma física do sistema cromatográfico (planar ou em coluna), ou em relação a fase móvel utilizada (gasosa, líquida ou supercrítica) ou segundo o seu modo de separação (adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou mistura desses mecanismos) (DEGANI, et al. 1998). No presente trabalho foram utilizadas as técnicas cromatográficas a seguir.

1.4.4.2.1. Cromatografia líquida em coluna clássica

A cromatografia líquida em coluna clássica é uma técnica de separação muito utilizada no isolamento de produtos naturais. Em comparação com outras técnicas cromatográficas em coluna como a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) possui uma eficiência de separação menor, além de necessitar de uma análise posterior, por cromatografia em camada delgada (CCD) por exemplo, porém é uma técnica mais simples e barata do que as acima mencionadas, sendo ainda uma técnica muito utilizada (DEGANI et al., 1998).

Diferentemente das demais técnicas cromatográficas em coluna, a cromatografia em coluna clássica é realizada à temperatura ambiente e à pressão atmosférica ou a uma baixa pressão fornecida por uma bomba convencional. A “coluna clássica” é uma coluna feita de vidro podendo ter comprimentos e largura variados, uma das extremidades do tubo é aberta e a outra possui uma torneira para coleta (DEGANI et al., 1998).

A primeira etapa da realização dessa técnica é o “empacotamento” da coluna, ele pode ser a seco (fase estacionaria empacotada sem o solvente) ou a úmido (fase estacionaria empacotada em suspensão no solvente). O “empacotamento” consiste no preenchimento da coluna com a fase estacionária. E, dentre outros fatores, definirá

a eficiência de separação da coluna. À coluna adiciona-se um pequeno pedaço de algodão que deve ser depositado na extremidade inferior da coluna para impedir a passagem de partículas da fase estacionária para a amostra. Procede-se então com o empacotamento da coluna, ele deve ser o mais uniforme possível evitando-se que fiquem espaços com ar entre as partículas. A existência de ar na coluna forma canais que acabam alargando as bandas eluídas (DEGANI et al., 1998).

A fase móvel é então adicionada de forma que toda a fase estacionaria fique adsorvida no solvente. Adiciona-se a amostra quando o limite da fase móvel estiver o mais próximo da fase estacionaria possível (mas em nenhum momento pode-se deixar que a fase estacionária fique sem solvente). Após a completa adsorção da amostra pela fase estacionaria pode-se adicionar o eluente de forma cuidadosa e constante ao sistema (DEGANI et al., 1998).

O volume das frações a serem recolhidas é função da quantidade de amostra e do grau de dificuldade da separação. A cromatografia é feita até a completa eluição da amostra pela coluna, ou até a obtenção da fração desejada (DEGANI et al., 1998).

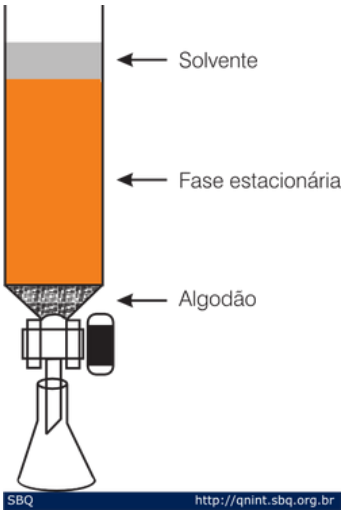

Figura 5: Ilustração de uma coluna cromatográfica clássica. Fonte: DEGANI et al., 1998.

Hoje em dia existe uma gama muito grande e variada de fases estacionárias que podem ser adquiridas, cada uma possuindo suas características de separação próprias e portanto sendo algumas mais e outras menos eficientes para a separação de uma determinada mistura. Para o presente trabalho foi utilizada como fase estacionária a Sephadex® LH-20.

1.4.4.2.1.1. Sephadex® LH-20

A Sephadex® LH-20 é uma fase estacionária constituída por dextrana hidroxipropilada ligada através de ligações cruzadas formando um polímero de polissacarídeo (GE HEALTHCARE, 2007).

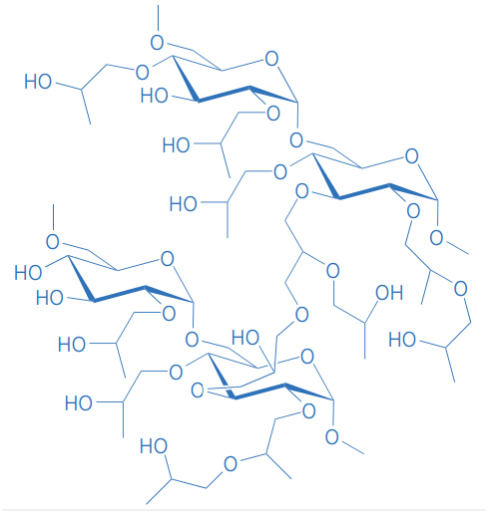

Figura 6: Representação da estrutura química da dextrana hidroxipropilada (Sephadex® LH-20). Fonte: GE Healthcare, 2007.

O polímero de dextrana forma pequenas esferas porosas, as quais atuam separando as moléculas de uma mistura através do mecanismo de exclusão ou filtração molecular (GE HEALTHCARE, 2007).

Na separação por exclusão molecular as moléculas maiores eluem primeiro porque como elas não conseguem penetrar nos poros das partículas da fase estacionaria o caminho que elas percorrem até o fim da coluna é feito por entre as partículas, resultando em uma distância menor a ser percorrida. Já as partículas menores que são capazes de penetrar pelos poros das partículas da fase estacionária acabam percorrendo um caminho maior, já que acabam tendo que percorrer um longo caminho pelos poros das partículas para que possam chegar ao final da coluna cromatográfica como ilustrado na figura a seguir (DEGANI et al., 1998).

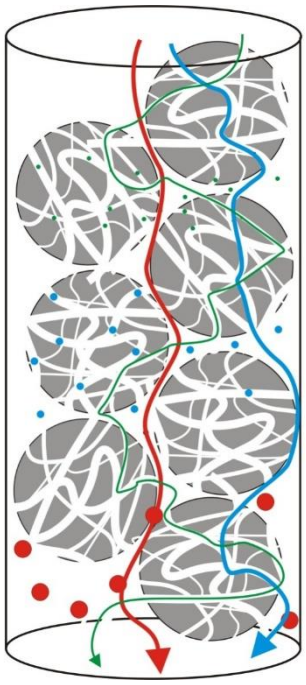

Figura 7: Esquema do mecanismo de separação por exclusão molecular. Fonte: LI et al., 2013.

1.4.4.2.2. Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (CCD) é um tipo de cromatografia planar. Juntamente com a cromatografia em coluna clássica é um dos métodos cromatográficos mais utilizados. É uma técnica de adsorção líquido-sólido (DEGANI et al., 1998).

A sílica gel é a fase estacionária mais utilizada, ela possui propriedade de elevada polaridade por conta dos grupos silanóis presentes, portanto nesse caso a força da fase móvel utilizada será tanto maior quanto maior for a polaridade do mesmo. As placas cromatográficas podem ser adquiridas pré-fabricadas ou podem ser feitas em laboratório sob suporte de vidro. A CCD pode ser feita tanto para fins analíticos quanto preparativos, variando conforme a espessura da placa (0,25mm ou 1,0mm respectivamente). Após a eluição da amostra pela placa ela deve ser revelada para tornar as “manchas” visíveis. Existem vários tipos de reveladores que podem ou não revelar as amostras de forma seletiva para determinados grupos de substâncias (DEGANI et al., 1998).

1.4.5. Espectrofotometria no UV-Vis

A espectrofotometria no ultravioleta e no visível se baseia na lei de absorção mais conhecida como Lei de Lambert-Beer. A lei diz que quantitativamente a atenuação de radiação que atravessa uma solução depende da concentração das moléculas absorventes e da extensão do caminho sobre o qual ocorre a absorção. A partir dessa afirmação podemos calcular a concentração de uma determinada solução (SKOOG et al., 2007).

A unidade de medida utilizada na espectrofotometria é a absorbância (*A*), ela relaciona a quantidade de radiação incidente em uma determinada solução e a quantidade de radiação que atravessa essa solução. A partir dessa informação podemos medir quantitativamente a concentração de uma solução. Cada substância possui um perfil de absorbância específico, isso significa que as substâncias absorvem a radiação com mais ou menos intensidade dependendo do comprimento de onda incidente (SKOOG et al., 2007).

Para a realização da espectrofotometria é utilizado um equipamento que se chama espectrofotômetro. Ele é basicamente constituído de uma fonte de luz, um dispersor de luz, um monocromador, cubeta (local para se colocar a amostra) e um detector (SKOOG et al., 2007).

O esquema a seguir ilustra as partes que constituem um espectrofotômetro e seu funcionamento. Primeiramente a luz proveniente de uma fonte (normalmente uma lâmpada de tungstênio) passa por uma fenda. E incide em um sistema chamado de monocromador, que consiste basicamente de um prisma que dispersa a luz em seus vários comprimentos de onda e de uma fenda de saída (dispositivo óptico que transmite apenas uma estreita faixa de comprimento de onda), para que apenas um comprimento de onda possa incidir na amostra. Por fim, a luz incide na amostra e a luz transmitida é medida em um detector (SKOOG et al., 2007; MARTINEZ, 2015).

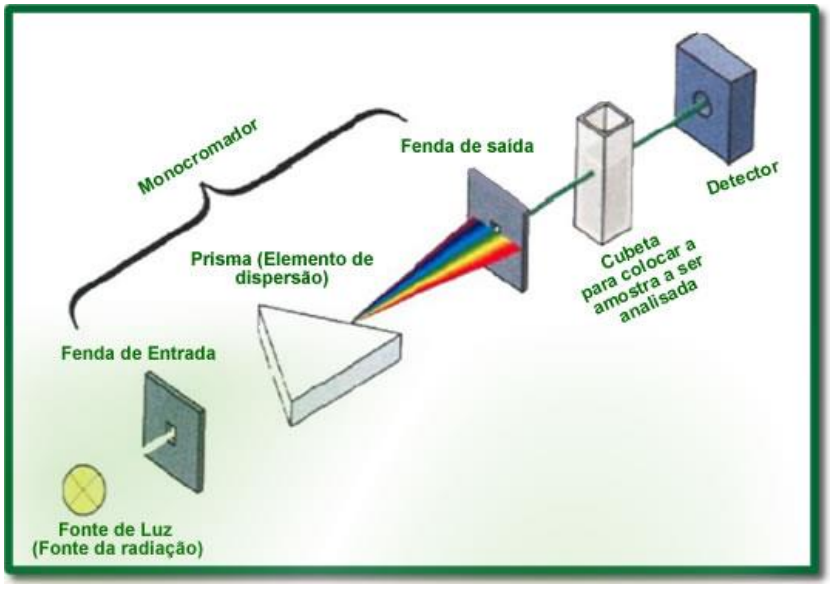

Figura 8: Esquema das partes que constituem um espectrofotômetro. Fonte: MARTINEZ, 2015.

A espectrofotometria é muito utilizada na quantificação de substâncias em produtos naturais, principalmente metabólitos secundários, sendo muito utilizada em

estudos de farmacologia, farmacognosia, cosmetologia, na área de alimentos e também na indústria para a quantificação, caracterização e padronização de matérias primas e produtos acabados (AZEVEDO, 2011).

2. Objetivo

O objetivo do trabalho foi investigar e identificar metabólitos secundários presentes no extrato metanólico e na fração n-butanol de folhas de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.

Para a realização do estudo foram utilizadas técnicas espectrofotométricas para a quantificação e técnicas cromatográficas de fracionamento para a identificação de substâncias presentes no extrato metanólico e na fração n-butanol.

3. Materiais e Métodos

3.1.Preparo da droga vegetal e extração

Tanto o extrato metanólico (COSTA, 2010) quanto a fração n-butanol (BERTOLDI, 2012) foram disponibilizadas pelo laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP – Araraquara.

O espécime vegetal utilizado neste experimento encontra-se no Campus de Araraquara da Universidade Estadual Paulista, localizado na Rodovia Araraquara/Jaú km 01, tendo sido identificada preliminarmente pelo Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento do Laboratório de Farmacobotânica do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP. Uma exsicata foi feita para identificação confirmativa pelo Dr. Pedro Fiaschi do Laboratório de Taxonomia do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Campus de São Paulo. A exsicata foi depositada no

Herbário do Departamento de Botânica, SPF-IB/USP, sob o registro *B. pachyphylla*, Costa , nº 195628.

As folhas coletadas foram submetidas à lavagem e posterior imersão por 20 minutos em solução de hipoclorito de sódio (0,2% de cloro ativo) para promover a desinfecção. Para se obter a droga vegetal, as folhas lavadas e desinfetadas foram secas em estufa de circulação de ar com temperatura controlada (35-40°C) durante 72 horas. Depois do processo de secagem, as folhas foram trituradas em moinho de facas (COSTA, 2010).

A droga vegetal passou pelo processo de percolação com metanol 100% como solvente. A percolação visou a extração exaustiva da maior quantidade e variedade de metabólitos secundários presentes no extrato (CUNHA, 2009).

A operação iniciou-se com o intumescimento prévio da droga vegetal com metanol para umedecê-la e facilitar o empacotamento dentro do percolador. Este procedimento durou aproximadamente 24 horas. Dentro do percolador foi colocada uma placa circular de aço perfurada envolvida com papel de filtro evitando que partículas da droga vegetal passassem para a solução extrativa. Após este processo, a droga foi empacotada de maneira uniforme e então o líquido extrator foi adicionado. A torneira do percolador foi aberta para que ocorresse o gotejamento da solução extrativa. A percolação foi interrompida quando houve o esmaecimento da cor da solução que gotejava (COSTA, 2010).

A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida em temperatura máxima de 40°C para eliminação de grande parte do solvente. O restante foi deixado em capela de exaustão até secura completa, obtendo-se o extrato metanólico (COSTA, 2010).

3.2. Extração líquido-líquido

O extrato metanólico de *B. pachyphylla* foi fracionado através de partição líquido-líquido utilizando os solventes acetato de etila, água e n-butanol. Inicialmente o extrato vegetal (10,006g) foi solubilizado em 70 mL de metanol, acrescentando-se posteriormente 500mL de água deionizada. A suspensão resultante foi transferida para um funil de separação e prosseguiu - se com a partição líquido-líquido de acordo com o fluxograma abaixo (BERTOLDI, 2012).

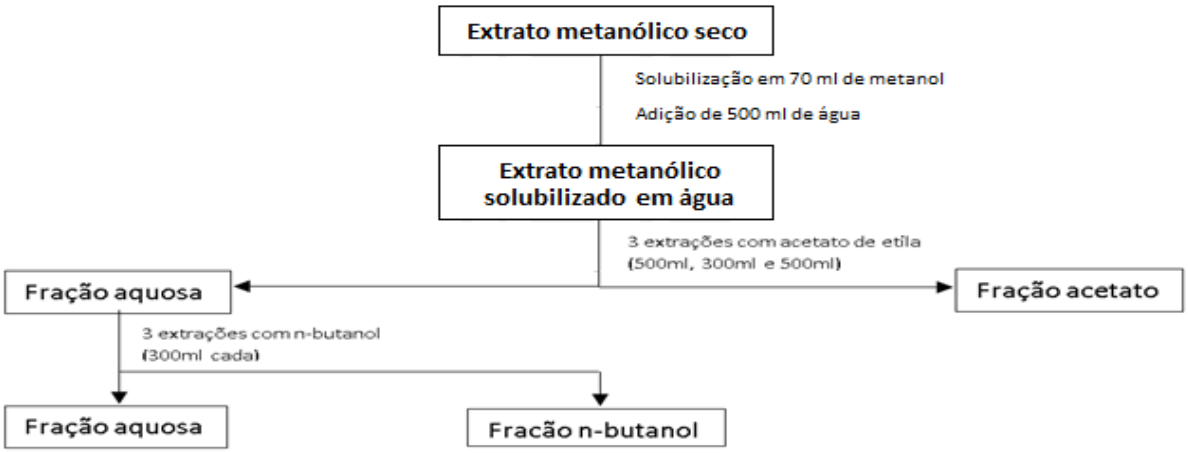

Figura 9: Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato metanólico.

Essa partição líquido-líquido resultou nas frações aquosa, fração acetato e fração n-butanol; das quais essa última foi utilizada juntamente com o extrato metanólico nos experimentos que se seguiram.

3.3. Teor de Fenólicos Totais

O teor de fenólicos totais presentes no extrato metanólico e na fração n-butanol foram determinados com a utilização do reagente Folin-Ciocalteu segundo método adaptado de Singleton (1999).

Foi utilizado o ácido gálico como padrão para a construção da curva analítica, em solução de etanol 50 % nas concentrações de 1,25; 2,5; 4,0; 5,0; 7,5; 10,0 e 20,0 µg/mL.

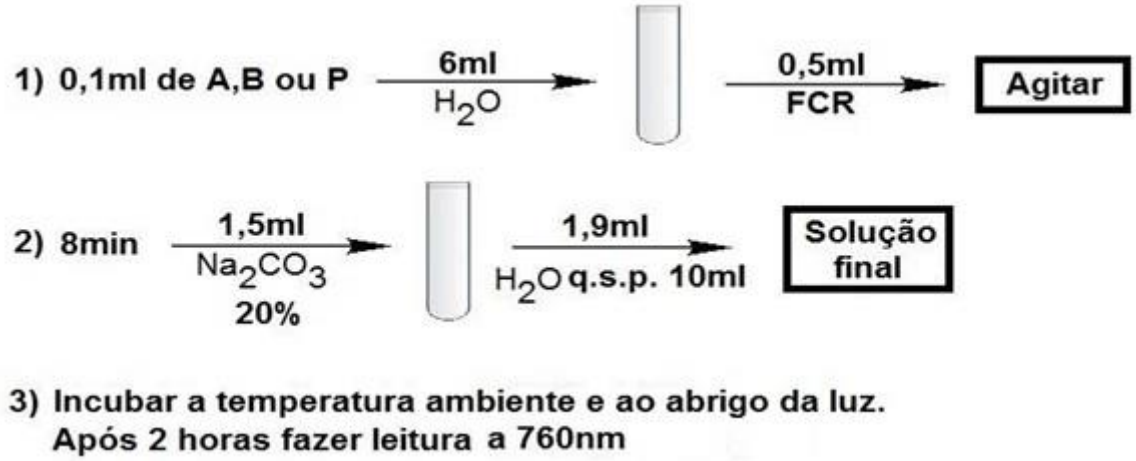

Figura 10: Esquema do procedimento realizado no teste de determinação do teor de fenólicos totais.

Primeiramente 0,1 ml da solução a ser analisada (amostra - A, padrão - P ou branco/etanol 50 % - B) foi misturada a 6 ml de água. Em seguida, adicionou-se à mistura 0,5 ml do reagente Folin-Ciocalteu e agitou-se bem. A mistura resultante foi deixada em repouso por 8 minutos e após esse tempo adicionou-se 1,5 ml de solução de Na_2CO_3 20 %. O volume foi completado com água para 10 ml. A solução foi mantida à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2 horas. As absorbâncias das soluções foram medidas a 760 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800. As análises foram feitas em triplicata e os resultados expressos em porcentagem de µg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por µg de amostra (extrato metanólico e fração butanólica).

3.4. Teor de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado segundo metodologia ‘’A’’ de Yu-Chi Ho (2012). O método foi utilizado para quantificar o teor de flavonoides presentes no extrato metanólico e na fração n-butanol.

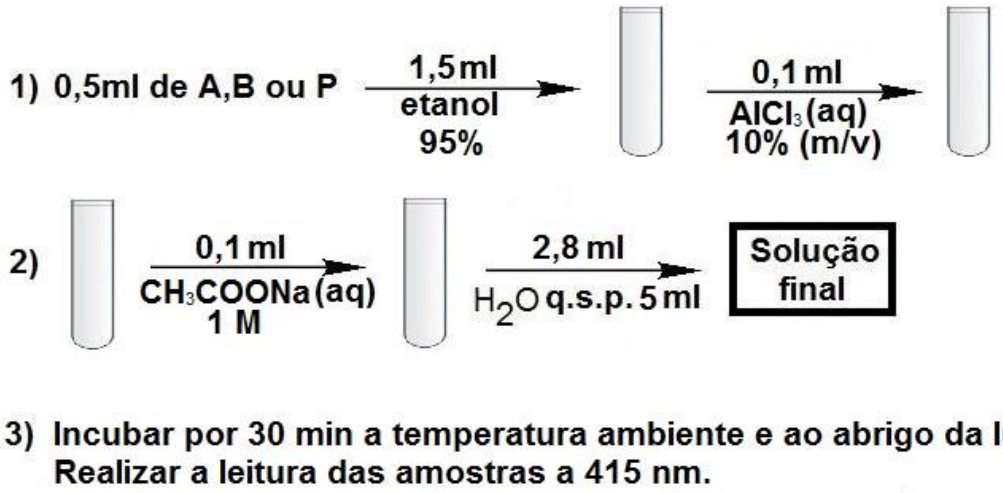

Figura 11: Esquema do procedimento realizado no teste de determinação do teor de flavonoides totais.

Foi utilizado quercetina como padrão para a construção da curva analítica. Foram feitas diluições da quercetina (0,30; 0,90; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0; 8,0; 10,0; 12,5; e 15,0 µg/ml) em metanol.

Primeiramente 0,5 da amostra foi misturada a 1,5 ml de etanol 95%. Foi adicionada a mistura 0,1ml de solução aquosa de cloreto de aluminio 10% (m/v) e 0,1 ml de acetato de potássio 1 M. Completou-se com água para 5 ml. A mistura foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 30 min.

A absorbancia da solução foi medida a 415 nm em espectrofotometro Shimadzu UV-1800. Os testes foram feitos em triplicata e expressos em porcentagem de µg de flavonoides totais equivalentes a quercetina por µg de amostra (extrato metanólico e fração butanólica).

3.5. Atividade antioxidante (DPPH)

O ensaio da atividade antioxidante do extrato metanólico e da fração n-butanol foi realizado segundo metodologia de Sharma et al. (2009), com a utilização do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).

Foram feitas soluções das amostras em metanol - extrato metanolico: 8,0; 6,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/ml; fração n-butanol: 8,0; 6,0; 4,0; 2,0; 1,0; 0,5 e 0,25 µg/ml; padrão (ácido ascórbico): 5,28; 4,4; 3,52; 2,64; 1,76 e 0,88 µg/ml.

Figura 12: Esquema do procedimento realizado no teste de determinação de atividade antioxidante.

Para a realização do ensaio primeiramente preparou-se uma solução metanólica 200 µM de DPPH, adicionou-se 1 ml dessa solução a 3 ml da solução a ser analisada (extrato metanólico, fração n-butanol ou ácido ascórbico), incubou-se a solução resultante por 30 min. A leitura foi feita a 517 nm em espectrofotômetro Shimadzu UV-1800 e os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH. O teste foi feito em triplicata e ao abrigo da luz para prevenir a degradação do radical DPPH.

3.6. Cromatografia em coluna clássica por exclusão molecular (CC)

A fração n-butanol foi submetida a um fracionamento por cromatografia em coluna. Foi aplicada como amostra 2,0 g da fração n-butanol solubilizada em metanol em uma coluna de vidro com 4cm de diâmetro e preenchida com fase estacionária com altura de 100cm. A fase estacionária utilizada foi a Sephadex® LH-20, a qual foi empacotada a úmido em metanol; como fase movel foi utilizado metanol. A vazão utilizada foi de 2ml/min, sendo coletadas frações de 5ml. A eluição durou aproximadamente 10h resultando em 230 frações.

As frações foram posteriormente analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD).

3.7. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As frações obtidas na cromatografia em coluna foram analisadas por CCD. Em virtude do grande número de frações coletadas foram selecionadas apenas algumas frações para serem análisadas em CCD. Para a análise em CCD as frações foram separadas em grupos de 10 frações segundo a sua ordem de coleta, em seguida foram selecionadas para a análise de 2 a 3 frações com as maiores massas dentro de cada grupo, resultando em 60 que foram analisadas.

As condições utilizadas na CCD foram: como fase estacionária foi utilizada silica gel G-60 aplicada com auxílixo de espalhador em placas de vidro com dimensões de 20x20cm; a fase movel utilizada foi n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; essa fase movel foi escolhida devido a sua força de eluição que é adequada para a separação de taninos hidrolisáveis, classe de matabolitos secundários presentes em quantidade majoritaria na fração n-butanol segundo as análises espectrofotométricas realizadas e reação química com solução de cloreto férrico (BERTOLDI, 2012).

As 60 frações selecionadas para a análise foram aplicadas em 6 placas cromatográficas contendo 10 frações em cada uma. Após a corrida das amostras segundo a fase movel acima citada, as placas foram reveladas com ácido sulfurico 10% (revelador universal) colocadas em estufa para revelação durante 10min a uma temperatura de 110^{o}C (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A partir do perfil cromatográfico apresentado nas cromatografias, foram selecionadas as frações com melhor perfil e melhor separação de possiveis

substâncias. As frações selecionadas foram as de 80 a 94, as quais foram análisadas em 2 placas (cada uma com um revelador). As condições cromatográficas de fase estacionária e de fase movel foram as mesmas utilizadas anteriormente variando somente a distância da corrida de 10cm para 15cm (para obter-se uma melhor visualização). Os reveladores utilizados, foram o anisaldeido sulfúrico (revelador de terpenos e saponinas) e o ácido sulfúrico 10% (revelador universal) (WAGNER, BLADT, 1996; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Foi feita também uma placa cromatográfica nas mesmas condições, com 14 frações escolhidas aleatoriamente de forma a compreender o perfil das 230 frações e estas placas foram reveladas com cloreto férrico 2% (revelador de compostos fenólicos) para confirmar a hipótese da presença de taninos hidrolisáveis na fração n-butanol.

4. Resultados

4.1. Teor de fenólicos totais

O teor total de fenólicos presente no extrato metanólico e na fração n-butanol foram calculados com base na equação $y = 0,1091x + 0,0675$ ($R^2 = 0,9986$), obtida a partir da curva analítica (Figura 13). Os resultados foram expressos em porcentagem de µg de compostos fenólicos totais equivalentes ao ácido gálico por µg de amostra.

Como demonstrado na tabela 1, o teor de fenólicos presentes no extrato metanolico foi de 40,47% e 47,80% na fração n-butanol.

Figura 13: Curva analítica do ácido gálico (padrão) utilizada no cálculo do teor de fenólicos totais.

4.2. Teor de flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais presente no extrato metanólico e na fração n-butanol foram calculados com base na equação y = 0,0753x + 0,0266 (R^2 = 0,9925), obtida a partir da curva analítica (Figura 14). Os resultados foram expressos em porcentagem de µg de flavonoides totais equivalentes a quercetina por µg de amostra. Como demonstrado na tabela 1, o teor de flavonoides presentes no extrato metanolico foi de 1,61% e na fração n-butanol de 0,24%.

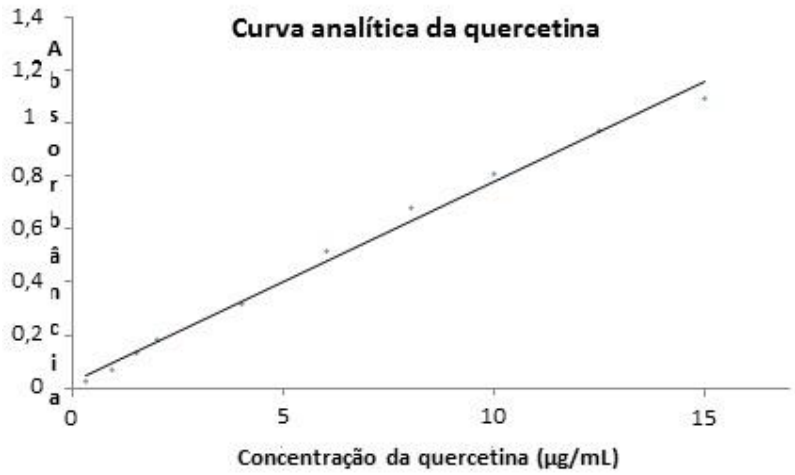

Figura 14: Curva analítica da quercetina (padrão) utilizada no cálculo do teor de flavonoides totais.

4.3. Atividade antioxidante (DPPH)

A figura 15 apresenta um gráfico de concentração das amostras versus porcentagem de inibição do radical DPPH. Os valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50%) estão descritos na tabela 1.

Para realização dos cálculos de porcentagem de inibição foram usados os 5 pontos com maior coeficiente de linearidade de cada uma das amostras e do padrão (desconsiderou-se os dois pontos de maior concentração das amostras e o ponto de maior concentração do padrão), resultando nas seguintes equações: extrato metanólico - y = 15,876x - 0,2083 (R^2 = 0,9995); fração n-butanol - y = 20,172x + 2,3333 (R^2 = 0,9987); e ácido ascórbico - y = 20,114x – 4,9 (R^2 = 0,9994).

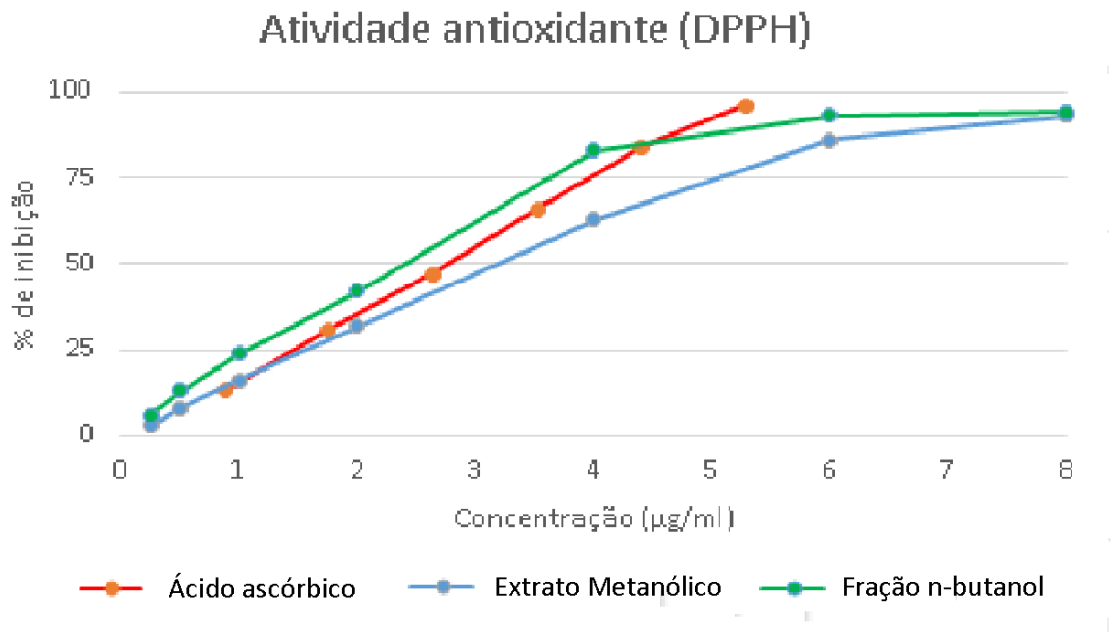

Figura 15: Gráfico comparativo das atividades antioxidantes do extrato metanólico, da fração n-butanol e do ácido ascórbico (padrão).

Tabela 1: Resultados dos testes de teor de fenólicos totais, teor de flavonoides totais e de atividade antioxidante (DPPH).

Testes	Extrato Metanólico	Fração n-butanol	Ácido Ascórbico
Teor de fenólicos totais	40,47%	47,80%	--
Teor de flavonoides totais	1,61%	0,24%	--
Atividade antioxidante DPPH (50% inibição)	3,16µg/ml	2,36µg/ml	2,72µg/ml

4.4. Cromatografia em coluna por exclusão molecular (CC)

Durante a eluição da coluna cromatográfica, notou-se que a amostra acabou ficando retida na fase estacionária, provocando uma eluição muito prolongada e em decorrência disso a cromatografia não foi feita até que a solução coletada fosse incolor. Dessa forma foi estipulado a quantidade de 230 frações que consideramos abranger um bom número de amostras para análise, e o restante da amostra que ficou retida na fase estacionaria foi sendo coletada em bequeres de 500ml, resultando em 4 grandes frações que foram divididas em A, B, C e D respectivamente em sua ordem de coleta. Após a coleta dessas frações, a solução coletada se tornou incolor, mas ainda restou uma parte da amostra que ficou permanentemente retida na fase estacionária, já que a fase estacionária que antes era de coloração branca, ficou marrom (cor da fração n-butanol).

4.5. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Foram obtidas as seguintes placas cromatográficas (Figuras 16 à 23):

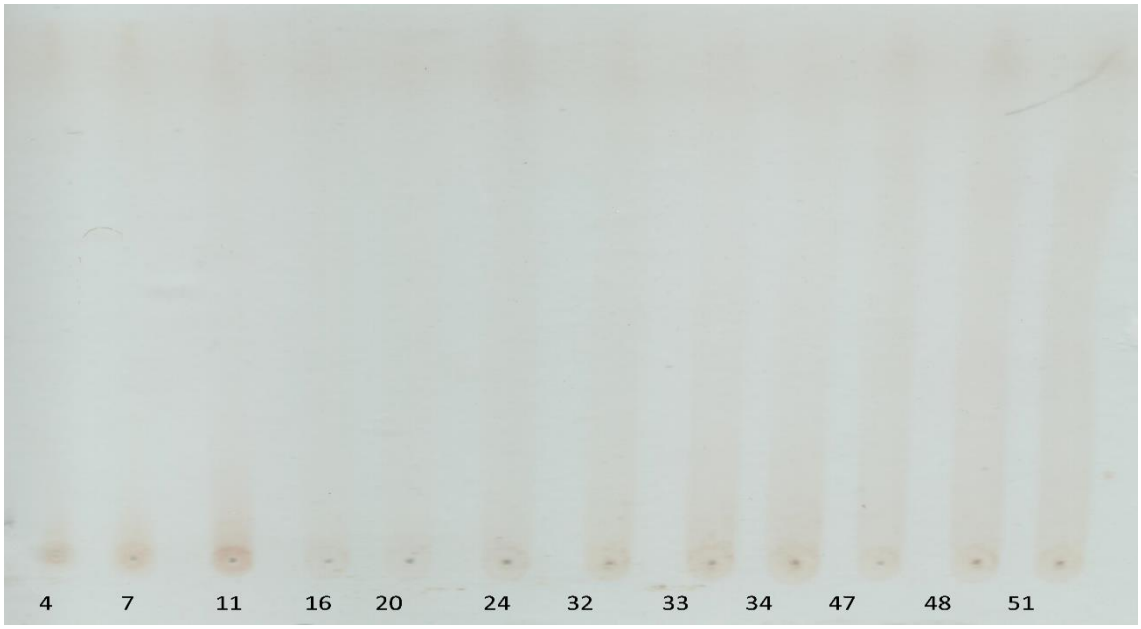

Figura 16: CCD das frações 1 a 51. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%.

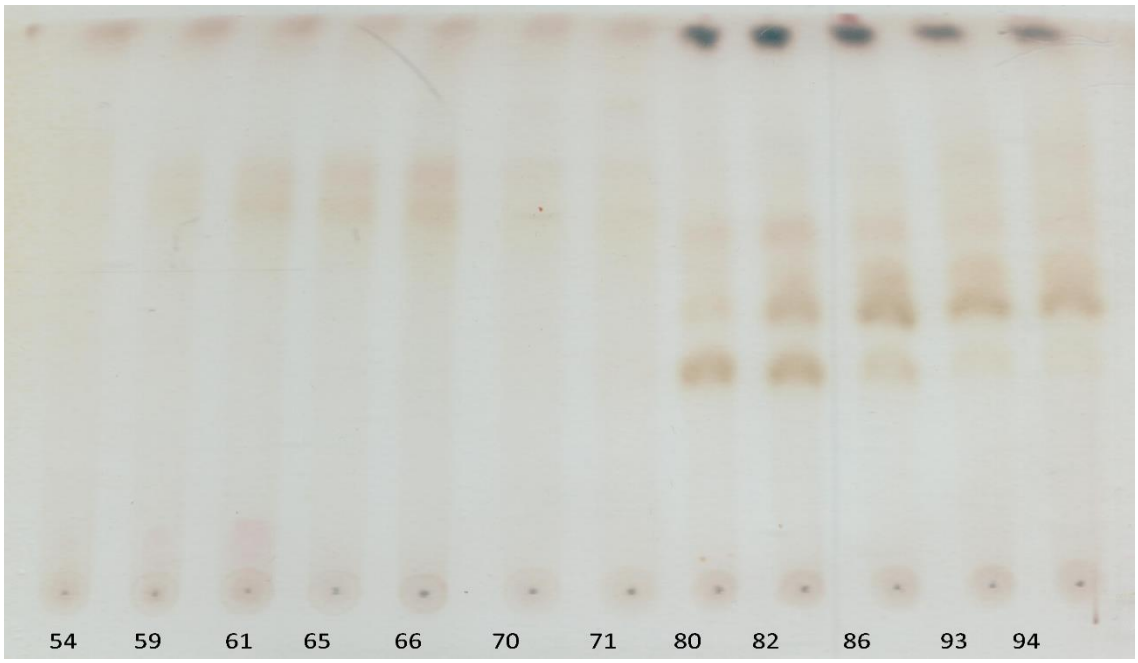

Figura 17: CCD das frações 52 a 94. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%.

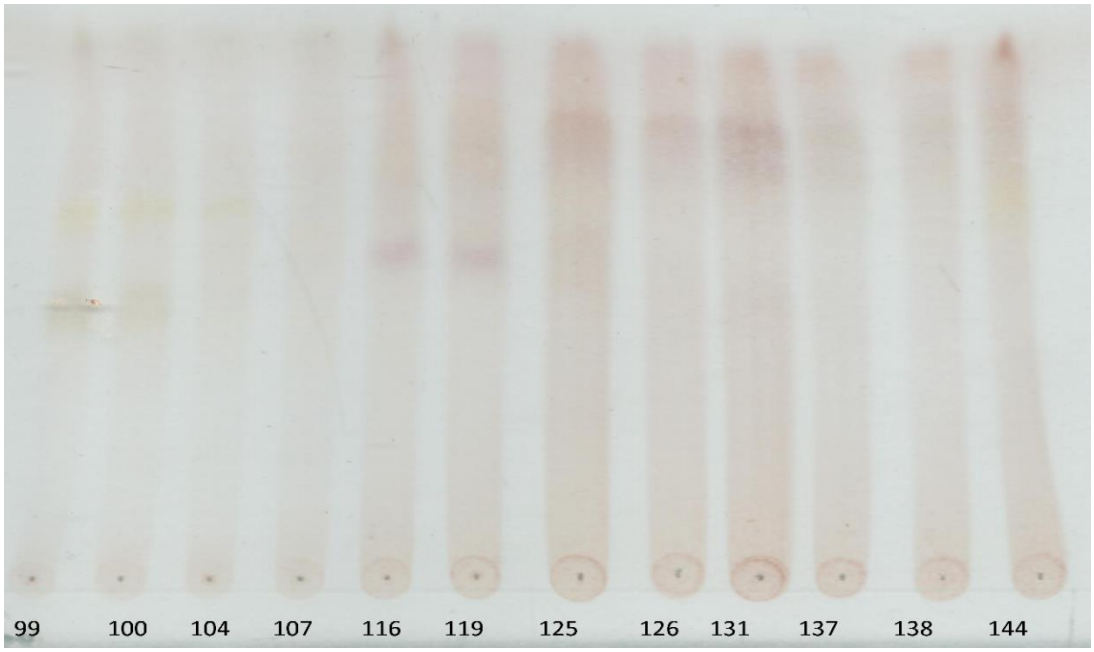

Figura 18: CCD das frações 95 a 144. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%.

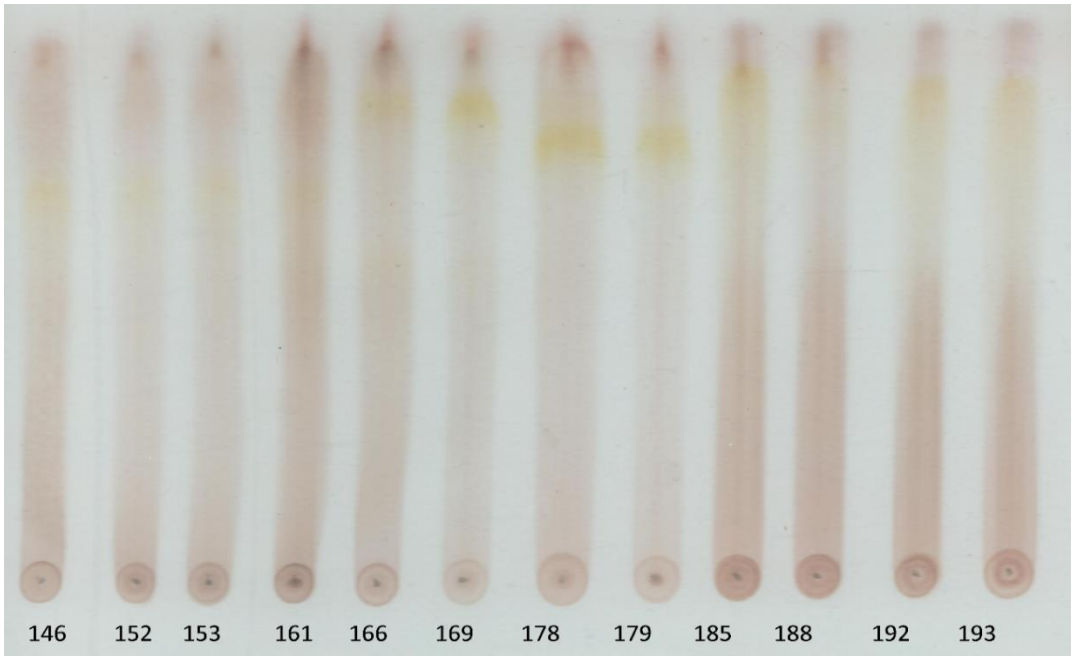

Figura 19: CCD das frações 145 a 193. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%.

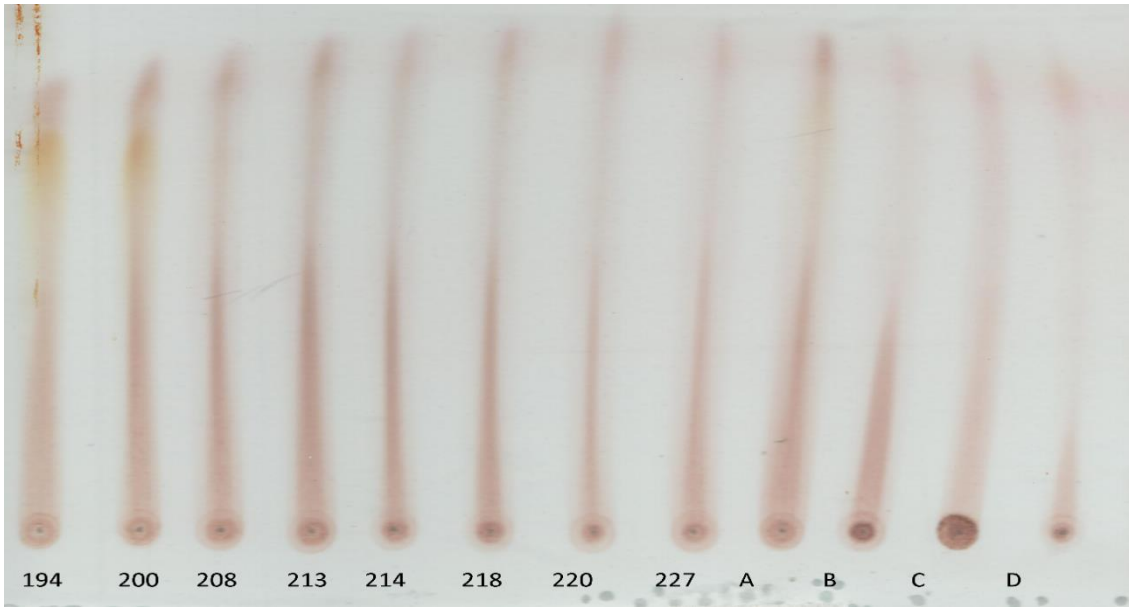

Figura 20: CCD das frações 194 a 230 e frações A, B, C e D. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%.

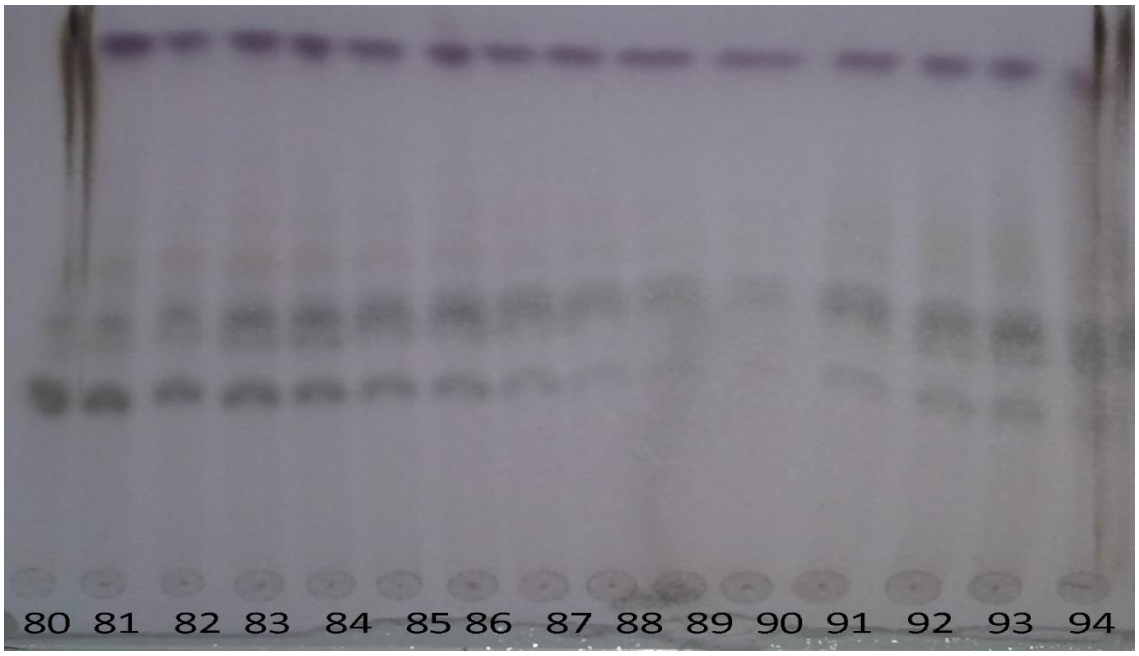

Figura 21: CCD das frações 80 a 94. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com ácido sulfúrico 10%.

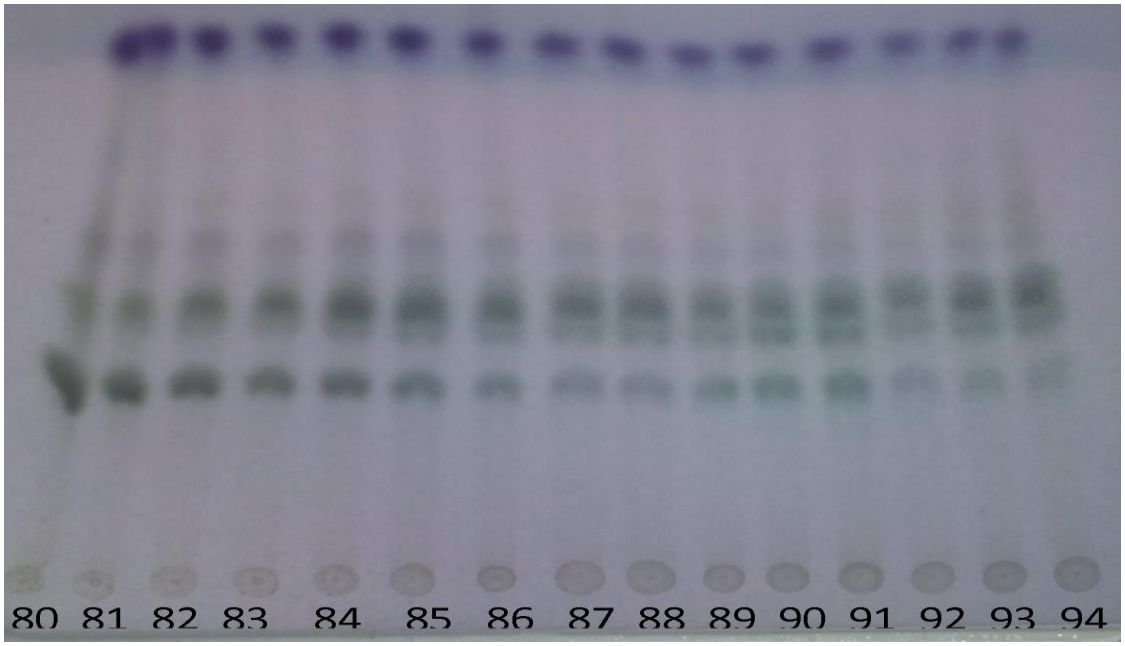

Figura 22: CCD das frações 80 a 94. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com anisaldeido sulfúrico.

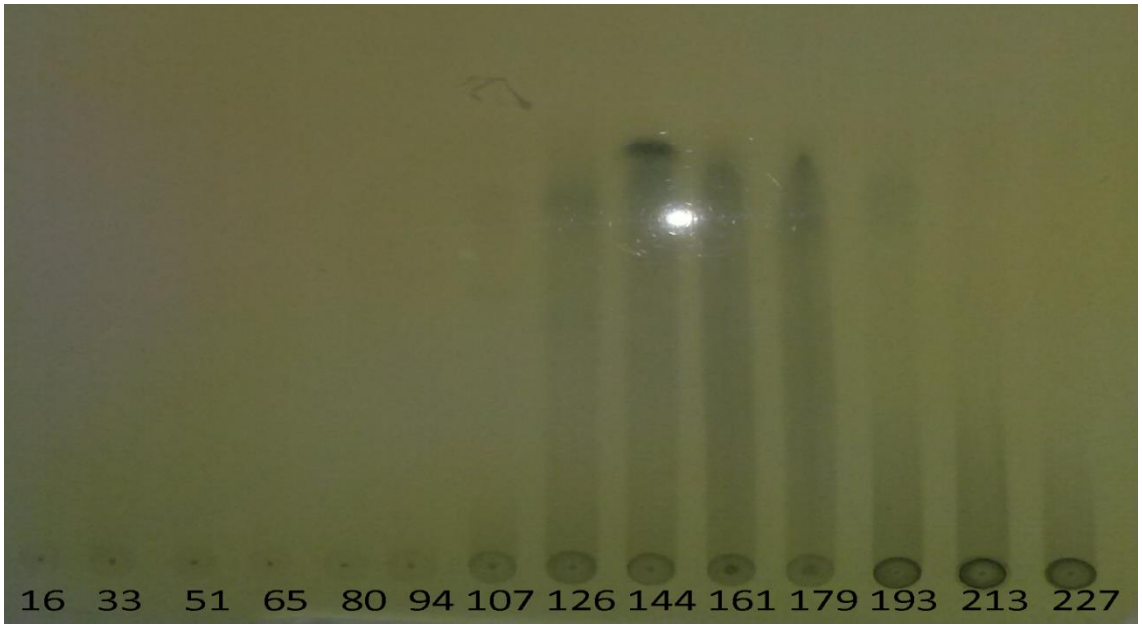

Figura 23: CCD das frações 16 a 230. Fase estacionária de silica gel G-60 e fase movel n-butanol: ácido acético: água 67:30:03; revelação com cloreto férrico 2%.

5. Fluxograma do trabalho

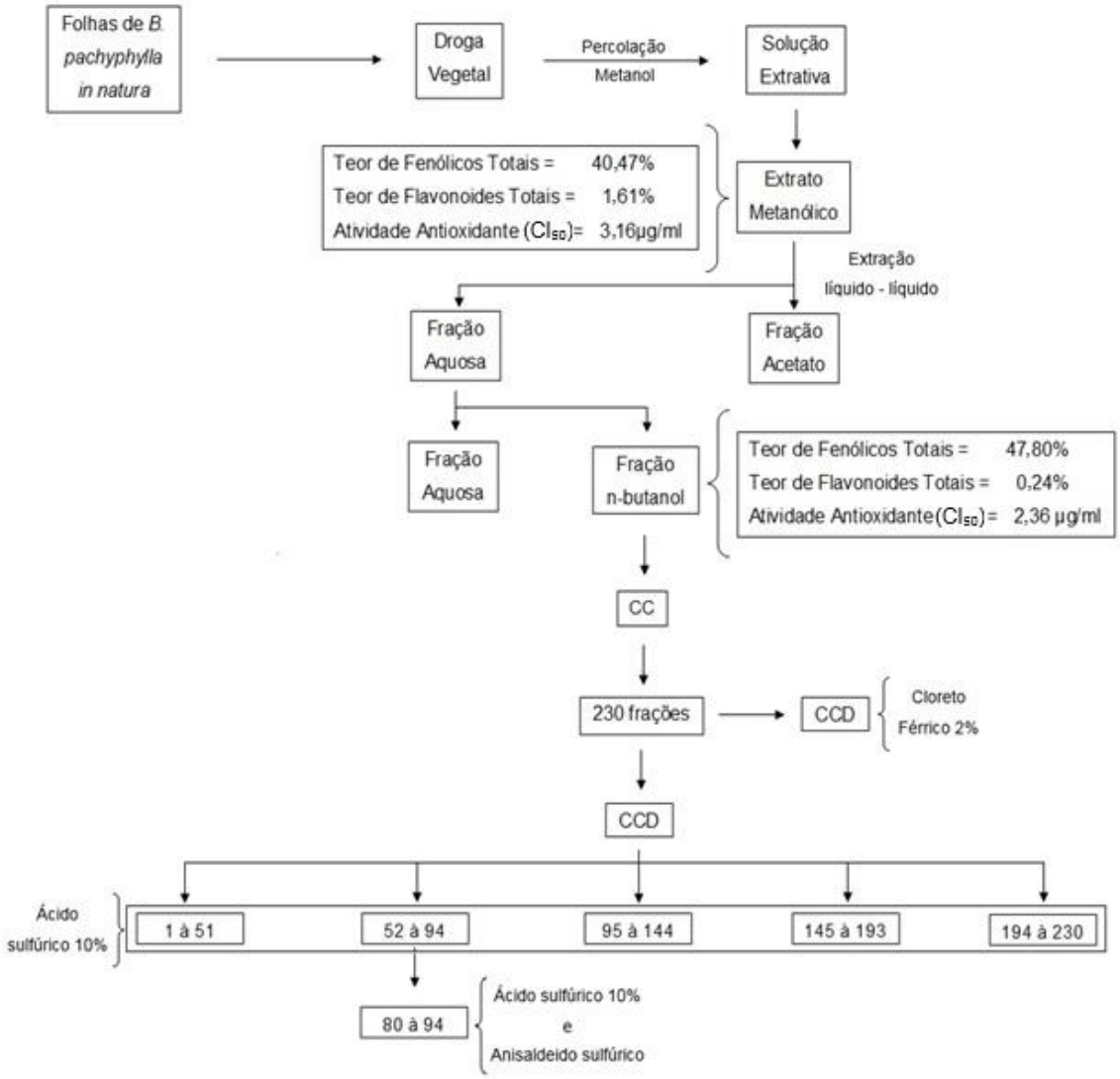

Figura 24: Fluxograma demonstrando as etapas do trabalho e os respectivos experimentos realizados.

6. Discussão

Pudemos observar que tanto o extrato quanto a fração n-butanol possuem uma quantidade considerável de compostos fenólicos (40,47% e 47,80% respectivamente) principalmente se considerarmos que o extrato metanólico e a fração n-butanol não são puras. Os compostos fenólicos são uma grande classe de metabólitos secundários caracterizados pela presença de pelo menos um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas (MALACRIDA; MOTTA, 2005). São distibuidos em diversas classes, incluindo ácidos fenólicos, fenilpropanoides, lignanas, antraderivados, estilbenos, flavonoides, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, entre outros (SIMÕES et al., 2007).

Analisando o resultado obtido no teor de flavonoides totais, pudemos observar que a quantidade de flavonoides presentes tanto no extrato quanto na fração n-butanol são muito baixas (1,61% e 0,24%, respectivamente). Portanto, os compostos fenólicos majoritários não são flavonoides, o que corrobora com outros dados deste trabalho e com estudos realizados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (BERTOLDI, 2012; COSTA, 2010) que sugerem serem taninos hidrolisáveis os compostos fenólicos majoritários. A partir dessa premissa foi conduzido o restante do estudo.

O teste de atividade antioxidante realizado pelo método de DPPH demonstrou que tanto o extrato metanólico quanto a fração n-butanol possuem uma atividade antioxidante significativa, principalmente quando comparamos com a atividade apresentada pelo ácido ascórbico (padrão), apresentando valores de CI_{50} muito proximos ao do padrão e no caso da fração n-butanol apresentando uma ação antioxidante superior.

Na execução do fracionamento da fração n-butanol em coluna cromatográfica foi escolhida a fase estacionaria Sephadex® LH-20 em virtude de nosso grupo de

pesquisa já ter tentado sem sucesso o fracionamento em cromatografia em coluna com sílica C18 (BERTOLDI, 2012).

A coluna cromatografica apresentou parcial sucesso em decorrência de uma parte da amostra aplicada ter ficado retida na fase estacionária, acreditamos que isso tenha ocorrido em virtude da amostra possuir uma afinidade maior pela fase estacionária do que pelo eluente e também pela grande quantidade de taninos presentes na fração, que podem ter ficado retidos nos poros da fase estacionária ou mesmo adsorvidos por interações diferenciais com a fase estacionária; e também ao tempo de desenvolvimento da cromatografia que poderia ter sido maior.

As placas cromatograficas representadas nas figuras 16 à 20 foram feitas para que pudessemos avaliar a eficiência do fracionamento da coluna cromatográfica. Considerando as massas das frações obtidas, as mais interessantes para prosseguir o fracionamento seriam as frações de 80 à 94. De forma geral, o fracionamento da fração n-butanol por exclusão molecular não foi eficiente, pois foram obtidas diversas frações com perfil cromatográfico semelhante e ainda complexo.

As placas das figuras 21 e 22 foram feitas com as frações 80 à 94. Ambas apresentaram um perfil muito semelhante. A revelação com anisaldeído sulfúrico sugere que as manchas observadas podem corresponder a terpenos de média polaridade ou saponinas. Bertoldi (2012) verificou a presença de saponinas na fração n-butanol através do teste de formação de espuma. Pudemos observar também que todas as 14 frações apresentaram um perfil muito semelhante, o que sugere que essas frações apresentam o mesmo conjunto de substâncias (já que existem várias manchas) portanto estando em grande quantidade na fração n-butanol.

A placa da figura 23 foi revelada com cloreto férrico 2%, revelador esse que possui afinidade por compostos fenólicos. Ao analisarmos a placa pudemos observar

que os fenólicos só estão presentes nas frações superiores a de número 107, sendo que a partir da fração 193 as manchas ficaram retidas na origem. Esse resultado em conjunto com o observado nas figuras 21 e 22 sugerem que as frações de 80 a 94 (e que se encontram em quantidade majoritaria nas frações analisadas por terem maior massa) não se tratam de compostos fenólicos, mas sim de saponinas e/ou terpenos. Já os compostos das frações 107 em diante são constituidos de compostos fenólicos, muito provavelmente taninos hidrolisáveis, por apresentarem coloração azulada ao serem revelados com solução de cloreto férrico 2%. Cabe ressaltar que a quantidade de flavonoides na fração é muito baixa (0,24%). Podemos cogitar a hipótese de que esses compostos sejam taninos hidrolisáveis de tamanho molecular pequeno ou ácidos fenólicos pequenos como: ácido galico, ácido elágico, entre outros, isso porque eles só foram coletados na coluna cromatográfica nas frações correspondentes do meio para o final da eluição. Geralmente as moleculas menores são as que saem por último quando estamos utilizando uma fase estacionária que separa por tamanho molecular já que as moléculas menores precisam transpor os poros da fase estacionária, demorando mais tempo para a sua corrida, o que corrobora com essa hipótese.

7. Conclusão

Pudemos concluir que *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. é uma espécie com potencial uso medicinal, apresentando atividade antimicrobiana contra diversos tipos de micro-organismos (COSTA, 2010), além de ser rica em metabólitos secundários, principalmente compostos fenólicos. Outra característica interessante do extrato metanólico e da fração n-butanol estudada no trabalho é o grande potencial antioxidante que foi muito semelhante ao apresentado pelo ácido ascórbico (padrão).

Também concluimos que as condições utilizadas no fracionamento em coluna por exclusão em gel não foram eficientes, sendo necessário em futuros estudos, a utilização de outras condições e/ou outras estratégias de fracionamento como por exemplo CLAE preparativa ou cromatografia contra-corrente. Foi observado também que a espécie possui outros metabólitos secundários importantes além dos taninos como as saponinas, podendo ser foco de possiveis estudos no futuro.

8. Referências Bibliográficas

AZEVEDO, A.A.A.S. Definição de parâmetros espectrofotométricos para quantificação de princípios ativos em produtos fitoterápicos. **9ª Mostra Acadêmica UNIMEP, 19º Congresso de Iniciação Científica.** 08 a 10 de novembro de 2011.

AZEVEDO, C.K. Extração com solventes. 2011. **Ebah.** Disponível em: < http://www.ebah.com.br/content/ABAAAe2OIAG/extracao-solventes>. Acessado em: 15 de janeiro de 2015.

BACCHI, E.M. Controle de qualidade de fitoterápicos. In: DI STASI, L.C. (org.). **Plantas medicinais: arte e ciência.** 1ª ed. São Paulo. Editora UNESP. 1996. p. 169-197.

BALLESTRA, C.L., SILVA, F.G., SOARES, M.P., REYS, P., VASCONCELOS FILHO, S.C. Anatomia foliar de *Byrsonima basiloba*. A. JUSS. **I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus Rio Verde do IFGoiano**. 06 e 07 de novembro de 2012.

BARROSO, G.M., PEIXOTO, A.L., ICHASO, C.L.F., GUIMARÃES, E.F., COSTA, C.G. & LIMA, H.C. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Livros Técnicos e Científicos. 1ª ed. Rio de Janeiro. Editora Universidade Federal de Viçosa. 1991.

BERTOLD, J.G. **Estudo fitoquímico e avaliação de atividade antibacteriana de *Byrsonima pachyphylla* A. Juss.** Trabalho de conclusão de curso. Farmácia-Bioquímica. UNESP Araraquara. 2012.

BONACORSI, C.; RADDI, M. S. G.; CARLOS, I. Z.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, C. Anti-*Helicobacter pylori* activity and immunostimulatory effect of extracts from *Byrsonima crassa* Nied. (Malpighiaceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.9. p. 1-7, 2009.

BRAGA, F.C., VALADARES, Y.M., COSTA, M.A., LOMBARDI, J.A., OLIVEIRA, A.B. de. Estudo fitoquímico de Erythraea centaurium, Jacaranda caroba, Remijia ferrugínea e Solanum paniculatum visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico Lerobina®. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 13 supl 2, p. 28-31, 2003.

BRANDÃO, M. Plantas medicamentosas do cerrado mineiro. **Inf Agropec.** v. 15, p. 15-20. 1991.

CARIBE, J.; CAMPOS, J.M. **Plantas que Ajudam o Homem: Guia Prático para a Época Atual**. 5ª ed. São Paulo. Editora Pensamento. 1991.

CARDOSO, C. R.; SYLLOS CÓLUS, I. M.; BERNARDI, C. C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity promoted by amentoflavone and methanolic extract of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Toxicology**, v. 225, p. 55-63, 2006.

CASTILLO-AVILA, G. M.; GARCÍA-SOSA, K.; PEÑA-RODRIGUES, L. M. Antioxidants from the Leaf Extract of *Byrsonima bucidaefolia.* **Natural product communications**, v.4, n.1, p. 83-84, 2009.

CHAVES, D. S. A. Extração de matérias primas vegetais. **Farmacognosia Aula II. UNIFESO**. Teresopolis, RJ. 2010.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Campinas. Editora da UNICAMP, 2006, p. 453.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal. 1984.

COSTA, G. T. **Caracterização do potencial antibacteriano de extratos de folhas de *Byrsonima pachyphylla* Griseb. 2010**. 26 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Farmácia Bioquímica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

CUNHA, P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 2ª ed. Av. de Berna. Fundação Calouste Gulbenkian, Serviço de Educação e Bolsas. 2009.

DEGANI, A.L.G., CASS, Q.B., Vieira, P.C. Cromatografia um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, nº7. Maio 1998. Disponivel em: <>. http://qnint.sbq.org.br/qni/visualizarConceito.php?idConceito=33. Acessado em 13 de Dezembro de 2014.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais da Amazônia**. São Paulo: Unesp, 1989, p. 39-40.

FERREIRA, M.B. Plantas portadoras de substâncias medicamentosas, de uso popular, nos cerrados de Minas Gerais. **Inf Agropec** v. 6, p. 19-23. 1980.

GE Healthcare. Sephadex LH-20. **Data File 18-1107-22 AB**. Suécia. Elanders Ôstervâla. 2007. 8.

GEISS, F.; HEINRICH, M.; HUNKLER, D.; RIMPLER, H. Proanthocyanidins with (+)-epicatechin units from *Byrsonima crassifolia* bark. **Phytochemistry,** v. 39, n. 3, p. 635-643, 1994.

GORDON, A.; JUNGFER, E.; SILVA, B. A.; MAIA, J. G.; MARX, F. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazon region. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 59, p. 7688-7699, 2011.

GRANDI, T.S.M.; TRINDADE, J.A.; PINTO, M.J.F.; FERREIRA, L.L.; CATELLA, A.C. Plantas medicinais de Minas Gerais. **Acta Botanica Brasilica.** v.3, p. 185-224, 1989.

GUILHON-SIMPLÍCIO, F.; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiacea). **Química nova**, v.34, n.6, p. 1032-1041, 2011.

HIRSCHMANN, G.S.; ARIAS, A.R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal Ethnopharmacology** v. 29, p. 159-172. 1990.

LI, J.; HAN, W.; YU, Y. Chromatography Method. **Intech**. 2013. Disponivel em: < http://dx.doi.org/10.5772/56265>. Acessado em: 15 de janeiro de 2015.

LIMA, Z. P.; DOS SANTOS, R. C.; TORRES, T. U.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; DOS SANTOS, L. C.; PELLIZZON, C. H.; ROCHA, L. R.; VILEGAS, W.; SOUZA BRITO, A. R.; CARDOSO, C. R.; VARANDA, E. A.; MORAES, H. P.; BAUAB, T. M.; CARLI, C.; CALOS, I. Z.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Byrsonima fagifolia:* an integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, p. 149-160, 2008.

LOMBELLO, R.A. & FORNI-MARTINS, E.R. Malpighiaceae: correlations between habit, fruit type and basic chromosome number. **Acta Botanica Brasilica**. v. 17, n. 2, p. 171-178. 2003.

MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Total phenolics and anthocyanins in grape juice. **Food Science and Technology**. Campinas, v. 25, n. 4, p. 659-664 2005.

MALDINI, M.; MONTORO, P.; PIZZA, C. Phenolic compounds from *Byrsonima crassifolia* L. bark: phytochemical investigation and quantitative analysis by LC-ESI MS/MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 56, p. 1-6, 2011.

MARTINEZ, M. Espectrofotômetria. **Info Escola**. Disponivel em: http://www. infoescola.com/materiais-de-laboratorio/espectrofotometro/. Acessado em: 15 de janeiro de 2015.

MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R.; CAZARES, L. L.; MORENO, M. N. G.; GARCÍA-ARGÁEZ, A. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima crassifolia* (L.) H.B.K. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 79-82, 1999.

MARTINS, E.R.; CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C. **Plantas Medicinais**. Viçosa. Editora Imprensa Universitária UFV. 1994.

MELO, M.S., OLIVEIRA, D.E., FRANCESCHINELLI, E.V., Density and fertility of *Byrsonima pachyphylla* A. Juss. (Malpighiaceae) in small fragments of the Brazilian Cerrado. **Acta Botanica Brasilica**. v. 28, n. 2, p. 259-265. 2014.

MICHELIN, D. C.; SANNOMIYA, M.; FIGUEIREDO, M. E.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C.; SOUZA-BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 690-695, 2008.

Ministério do Meio Ambiente. Disponivel em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acessado em: 28 de Novembro de 2014.

OLIVEIRA, F., AKISUI, G., AKISUI, M.K. **Farmacognosia**. 1ª ed. São Paulo. Editora Atheneu. 1998.

PEREZ-GUTIERREZ, R. M.; MUÑIZ-RAMIRES, A.; GOMEZ, Y, G.; RAMÍREZ, E.B. Antihyperglycemic, antihyperlipidemic and antiglycation effects of *Byrsonima crassifolia* fruit and seed in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. Plant **Foods Human Nutrition**, v. 65, p. 350-357, 2010

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.** Botucatu, v.9, n.2, p. 17-35, 2007.

RODRIGUES, P.A.; MARAIS, S.E.; SOUZA, C.M.; MAGALHÃES, D.V.; VIEIRA, I.G.P.; ANDRADE, G.M.; RAO, V.S.; SANTOS, F. Gastroprotective effect of *Byrsonima sericea* DC leaf extract against ethanol-induced gastric injury and its possible mechanisms of action. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** v. 84, 113-121. 2012.

SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; COELHO, R. G.; SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of

Byrsonima crassa Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography** A, v. 1035, p. 47-51, 2004.

SANNOMIYA, M.; CARDOSO, C. R. P.; Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v. 112, p.319-326, 2007.

SHARMA, O. P.; BHAT, K. B. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemestry**, v. 113, p. 1202-1205. 2009

SKOOG, D.A; WWEST, D.M; HOLLER, F.J. & STANLEY, R.C. **Fundamentos da Química Analítica**, Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Editora Thomson, 2007.

SIMÕES, M. C. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS, 2007.

SINGLETON, V.L., ORTHOFER, R., REVENTÓS, R.M.L. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in enzymology**. v. 299, p. 152-178, 1999.

VALLILO, M. I.; PASTORE, J. A.; PASTORE, J. A.; ESTON, M. R.; GARBELOTTI, M. L.; OLIVEIRA, E. Caracterização química e valor nutricional dos frutos de *Byrsonima myricifolia* Griseb (malpighiaceae) - alimento de aves silvestres. **Revista Instituto Florestal**, v. 19, n. 1, p. 39-45, 2007

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography.** 2ª ed. Berlin. Editora Springer. 384p. 1996.

YU-CHI. HO, HUI-TZU. YU, NAN-WEI. SU. Re-examination of Chromogenic Quantitative Assays for Determining Flavonoid Content. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. V. 60, n. 10, p. 2674 - 2681. 2012.

Araraquara, 07 de maio de 2015.

_____

Erick Urano Braga

De acordo:

_____

Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia