

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
Faculdade de Ciências – Departamento de Química**

Gustavo Soares de Oliveira

**Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a padronização do extrato de
Eugenia speciosa Cambess**

**Bauru
2016**

Gustavo Soares de Oliveira

**Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a padronização do extrato de
Eugenia speciosa Cambess**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de
Licenciatura em Química da
Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, como
requisito para obtenção do título de
Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

GUSTAVO SOARES DE OLIVEIRA

**Desenvolvimento de métodos cromatográficos para a padronização do extrato de
Eugenia speciosa Cambess**

Trabalho de conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Daniel Rinaldo – Orientador
Faculdade de Ciências – Unesp/Bauru



Prof.ª. Dr.ª. Silvia/Regina Quejeda Aro Zuliani
Faculdade de Ciências – Unesp/Bauru



Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari
Faculdade de Ciências Agrônômicas – Unesp/Botucatu

Bauru, 25 de janeiro de 2016.

Dedico este trabalho à minha família que nunca deixou de me incentivar e apoiar, em especial meu pai Paulo, que sempre soube o que dizer nos momentos difíceis e minha mãe Zenilda, uma fonte de inspiração particular.

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram para que este trabalho pudesse ter sido realizado, direta ou indiretamente, em especial meu orientador e os técnicos de laboratório da UNESP de Bauru Ralph Moreira e David Souza.

Agradeço a Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos coordenadora do Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara e toda sua equipe, que muito me ajudou para que esta pesquisa fosse realizada.

Agradeço a todos os meus amigos, de todos os cursos, que tive o prazer de conhecer na UNESP de Bauru, em especial minha grande amiga Daniele Ferreira Risetto, que sempre me mostrou que as dificuldades nos fazem mais fortes.

Agradeço toda a equipe do Projeto de Extensão Curso Pré-Vestibular Gratuito Primeiro de Maio, que sempre me apoiou em minhas decisões.

Resumo

O uso de plantas medicinais é comum em muitos grupos étnicos no Brasil, já que a diversidade de espécies vegetais no país é grande. Mas a utilização dessas plantas como fitoterápicos padronizados não ocorre com a mesma frequência, devido à falta de estudos ligados a essas terapias, classificadas como alternativas. Devido ao alto custo de alguns medicamentos sintéticos para o tratamento de doenças crônicas, a fitoterapia é uma alternativa de baixo custo e eficiente, desde que o fitomedicamento tenha estudos científicos comprovados e sua produção obedeça critérios rígidos de fabricação e controle de qualidade para garantir sua segurança e eficácia. Dentre as espécies medicinais utilizadas para o tratamento de doenças crônicas, como dores e inflamação, está a *Eugenia speciosa* Cambess, conhecida popularmente como “laranjinha do mato”. Diante deste contexto, este trabalho realizou estudos preliminares e desenvolveu o perfil cromatográfico do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Fotodiodos (CLAE-DAD). Os resultados qualitativos preliminares e o perfil cromatográfico permitiram identificar algumas classes de metabólitos presentes e alguns constituinte como: ácido homogentísico, homorientina, isovitexina e quercetrina.

Palavras-chave: *Eugenia speciosa*; laranjinha do mato; perfil cromatográfico; CLAE-DAD.

Abstract

The use of medicinal plants is common in many Brazil's ethnic groups, because the diversity of plant species in the country is large. But the utilization of these plants as standardized herbal doesn't occur with the same frequency, due to the lack of studies related to these therapies, classified as alternatives. Due to the high cost of some synthetic medicines for the treatment of chronic diseases, phytotherapy is a low-cost alternative and efficient, since the phytomedication has proven scientific studies and its production meets strict criteria for manufacturing and quality control to ensure its safety and efficacy. Among the medicinal species used for the treatment of chronic diseases, such as pain and inflammation, is *Eugenia speciosa* Cambess, popularly known as the bush "laranjinha". Against this context, this paper held preliminary studies and developed the chromatographic profile of the hydroalcoholic extract of the leaves of *E. speciosa* by High Performance Liquid Chromatography coupled to photodiode array detector (CLAE-DAD). Preliminary qualitative results and the chromatographic profile have identified some metabolites classes present and some constituent as: homogentisic acid, homorientina, isovitexin and quercetrin.

Keywords: *Eugenia speciosa*; "laranjinha" the bush; chromatographic profile; CLAE-DAD.

Lista de Ilustrações e Tabelas

- Figura 1 - *Eugenia speciosa* Cambess.....11
- Figura 2 - Fluxograma da preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa*.....14
- Figura 3 - Cromatografia em camada delgada de sílica gel das reuniões das frações obtidas pelo fracionamento do EH₂O das folhas de *E. speciosa* por coluna de Sephadex LH-20. Fase móvel: CHCl₃/MeOH/n-PrOH/H₂O (5:6:1:4,v/v/v/v).....18
- Figura 4 - Cromatograma inicial da fr. 1:9 do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 0-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 240 nm].....20
- Figura 5 - Cromatograma inicial da fr. 1:1 do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 0-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 254 nm].....21
- Figura 6 - Cromatograma inicial da fr. 100%MeOH do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 0-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 300 nm].....21
- Figura 7 - Cromatograma otimizado da fr. 1:9 do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 0-25% de B em 30 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 240 nm].....22
- Figura 8 - Cromatograma otimizado da fr. 1:1 do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 5-30% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 254 nm].....23

Figura 9 - Cromatograma otimizado da fr. 100% MeOH do <i>clean-up</i> do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>E. speciosa</i> [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C ₁₈ , 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Isocrático 70% de B em 15 min; vazão de 1,00 mL.min ⁻¹ , λ = 300 nm].....	24
Figura 10 - Espectros no UV (a) da substância 9 e (b) do padrão ácido homogentísico.....	24
Figura 11 - Espectros no UV (a) da substância 20 e (b) do padrão homorientina.....	25
Figura 12 - Espectros no UV (a) da substância 25 e (b) do padrão isovitexina.....	25
Figura 13 - Espectros no UV (a) da substância 29 e (b) do padrão quercetrina.....	25
Tabela 1 - Rendimento do extrato em relação ao material vegetal coletado.....	18
Tabela 2 - Resultado da triagem fitoquímica preliminar.....	19

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. OBJETIVO.....	12
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Reagentes utilizados.....	12
3.2. Coleta e identificação do material vegetal.....	12
3.3. Preparação do extrato.....	13
3.4. Equipamentos utilizados.....	14
3.5. Triagem fitoquímica preliminar.....	15
3.6. <i>Clean-up</i> do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>E. speciosa</i>	16
3.7. Triagem cromatográfica preliminar.....	17
3.8. Análise do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>E. speciosa</i> por CLAE-DAD.....	17
4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	18
4.1. Rendimento do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>E. speciosa</i>	18
4.2. Triagem fitoquímica preliminar e fracionamento por Sephadex.....	18
4.3. Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análise das frações do <i>clean-up</i> do extrato hidroalcoólica das folhas de <i>E. speciosa</i> por CLAE-DAD.....	19
4.4. Identificação prévia das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de <i>E. sepciosa</i>	24
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	25
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

Desde a existência da humanidade e o surgimento de patologias, o homem busca a cura dessas enfermidades, que ao longo da história foram responsáveis até mesmo por dizimar civilizações. As doenças são tão antigas quanto a espécie humana, assim como as formas de tratamento encontradas. (MACIEL et al., 2002).

O advento da tecnologia e o avanço científico possibilitaram a cura de muitos males e a produção em larga escala de fármacos sintéticos é comum. Mas sintetizar um fármaco demanda muitas pesquisas e recursos e as moléculas que hoje são produzidas em um laboratório tem base natural. Não é recente o uso de plantas para fins medicinais e esta pode ser a forma de tratamento mais antiga para as doenças encontradas pelo homem. São desses tratamentos e da observação científica dos mesmos que muitas moléculas puderam ser isoladas, estudadas e reproduzidas em laboratório para fins curativos. (MACIEL et al., 2002).

A medicina popular, baseada na ação de plantas sobre determinadas enfermidades ainda é o caminho que muitas comunidades e grupos étnicos seguem.

“Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais. Na região Amazônica foram catalogadas em duas comunidades que vivem nas margens da Baía de Marajó-PA, 260 plantas entre nativas e cultivadas; 1200 são comercializadas no mercado Ver-o-peso, em Belém-PA; outras 242 espécies são cultivadas em quintais residenciais, em Belém. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos.” (MACIEL, et al. p. 429-438, 2002).

As doenças crônicas desenvolvem-se lentamente e estão relacionadas principalmente ao envelhecimento e ao estilo de vida do paciente. A cura nem sempre é possível e o tratamento feito em longo prazo, associando medicamentos e a adoção de hábitos de vida mais saudáveis, como a prática de exercícios físicos e mudanças na alimentação. (NOVARTIS BRASIL, 2013).

A dinâmica das sociedades contemporâneas é fator fundamental para o surgimento dessas doenças, que hoje representam mais de 60% das mortes no mundo. No Brasil, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) cerca de 75% de pessoas com mais de 60 anos apresentam alguma doença crônica. Esses dados apontam para um crescimento de

17% da mortalidade de indivíduos nessa faixa etária em um prazo de 10 anos, o que reforça a importância de investimentos nos tratamentos desses males. (NOVARTIS BRASIL, 2013).

A ampliação do acesso aos medicamentos, como parte do cuidado integral aos portadores de doenças crônicas, inclui-se entre as estratégias implementadas, tendo em vista que o tratamento medicamentoso possibilita o controle das doenças, redução da morbimortalidade e melhoria da qualidade de vida dos usuários portadores de diversas condições de saúde. (TAVARES et al., 2013).

Os impactos causados por essas doenças não são apenas sociais, mas também econômicos, uma vez que estão relacionados aos gastos públicos por meio do Sistema Único de Saúde (SUS), às aposentadorias por invalidez e a morte da população economicamente ativa. (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O tratamento medicamentoso é o mais procurado e faz parte das estratégias de ação dos órgãos públicos ligados à saúde buscar alternativas que possam baratear os custos desses medicamentos, por essa razão o investimento em fitoterápicos padronizados é uma fonte promissora para este fim. (TAVARES et al., 2013).

Nesse contexto, o estudo do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia speciosa* Cambess (Figura 1) foi realizado. Esta planta pertence a família Myrtaceae da ordem Myrtiliflorae (Myrtales) que tem cerca de 100 gêneros com aproximadamente 3000 espécies, sendo a maior família da ordem, com dois grandes centros de dispersão, nas Américas e na Austrália, embora ocorram em todo mundo. (JOLY, 2002).



Figura 1: *Eugenia speciosa* Cambess.
Fonte: Rosângela Gonçalves Rolim (FLORA DIGITAL, 2015).

E. speciosa ocorre naturalmente no Sudeste do Brasil (Minas Gerais, São Paulo) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) e é conhecida popularmente como “Ibajuba”, “Laranjinha do mato”, “Ingabuá” ou “Araçazeiro”, sendo encontrada como arbusto de 1 a 3 m de altura na restinga, podendo atingir até 20 m de altura na floresta; com copa arredondada ou

mais ou menos piramidal. O tronco mede de 10 a 30 cm de diâmetro com casca pardo acinzentada que se desprende em escamas desuniformes. As folhas são simples, cartáceas (como cartolina), glabras (sem pelos) e descolores, sendo verde marcante na face superior e verde amarelada na face inferior ou dorsal. A lamina é larga com base afunilada e ápice obtuso apiculado (arredondado com pequena ponta), medindo 3 a 5,5 cm de comprimento por 2 a 3 cm de largura. As flores são solitárias, axilares, brancas com estames (tubos masculinos) e anteras (glândulas que carregam os grãos de pólen) amarelas. O fruto é uma drupa monosperma (com uma semente) de coloração amarelada com 1,5 a 2,5 cm de diâmetro. (COLECIONANDO FRUTAS, 2015).

Na medicina popular o chá das folhas de *E. speciosa* é indicada para o tratamento de afecções da garganta, atonia intestinal, azia, dispepsia, cólica do estômago e intestinos, diarreia, febre intermitente, gases, náuseas, reumatismo, tontura, vômito, dor de dente. (COLECIONANDO FRUTAS, 2015).

Estudos da composição química das folhas e frutos de *E. speciosa* são escassos. Um relato da composição de *E. speciosa* descreve o estudo do óleo essencial das folhas, o qual apresentou α -pineno (47,3%) e limoneno (23,0%) como constituintes químicos majoritários. (APEL et al., 2004).

Portanto, o estudo de *E. speciosa* é pertinente e necessário para contribuir para o avanço nos estudos de fitoterápicos eficazes e seguros.

2. OBJETIVO

Contribuir para a produção de fitoterápicos padronizados (melhoramento na qualidade de extratos) e ampliação do número de espécies vegetais utilizadas pelo SUS, investigando a composição química do extrato de *E. speciosa*, utilizada na medicina popular.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes utilizados

Solventes PA

Clorofórmio (CHCl_3), metanol (MeOH), *n*-propanol (*n*-PrOH), etanol (EtOH) e água destilada (H_2O).

Solventes grau HPLC

Metanol (MeOH) (TEDIA[®]), Acetonitrila (ACN) (TEDIA[®]), água ultrapura e ácido trifluoroacético (TFA) (TEDIA[®]).

Reagentes para reveladores e triagem preliminar

Anisaldeído, ácido acético (HAc), MeOH, ácido sulfúrico (H₂SO₄), reativos de Hager, Mayer e Dragendorff, anidrido acético (Ac₂O), hidróxido de potássio (KOH), cloreto férrico (FeCl₃), cloreto de alumínio (AlCl₃), hidróxido de sódio (NaOH), ácido clorídrico (HCl) e magnésio metálico (Mg).

Padrões comerciais

Ácido homgentísico, isovitexina e quercetrina (todos da SIGMA ALDRICH[®]).

3.2. Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *E. speciosa* foram coletadas na reserva Campo Novo Vargem Limpa, área de proteção ambiental da Unesp, campus Bauru, junto ao Jardim Botânico Municipal de Bauru (JBMB). A identificação foi realizada pelo Prof. Dr. Marcos Vinícius de Almeida por comparação taxonômica e morfológica com exsicata mantida junto ao Herbário do Jardim Botânico de Bauru (n^o. 20372).

3.3. Preparação do extrato

Após coletadas, as folhas de *E. speciosa* foram colocadas em uma estufa de ar circulante a 45°C, durante sete dias, para secagem. O processo foi monitorado e as folhas foram mexidas periodicamente a fim de garantir uma secagem uniforme. Após o período de sete dias as folhas foram submetidas a moagem em moinho de facas e separados em partículas de tamanhos entre 250 a 850 µm de acordo com a Farmacopeia Brasileira. (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O pó da planta padronizado foi macerado em que: 50,0 g do pó foram imersos em 500,0 mL da mistura extratora de etanol/água (7:3, v/v) na proporção 1:10 (material vegetal/mistura extratora) durante 144 horas. A mistura extratora foi substituída a cada 48 horas.

Após a extração, a solução foi colocada em um evaporador rotativo, sob pressão reduzida, em temperatura de 50 °C para eliminação dos solventes, resultando no extrato

hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa*. O extrato foi transferido para um vidro tarado e deixado em estufa a 45°C até completa eliminação de água, resultando em 16,2 g de massa. O extrato foi armazenado em freezer para posteriores análises, conforme descrito no esquema representado pela Figura 2.

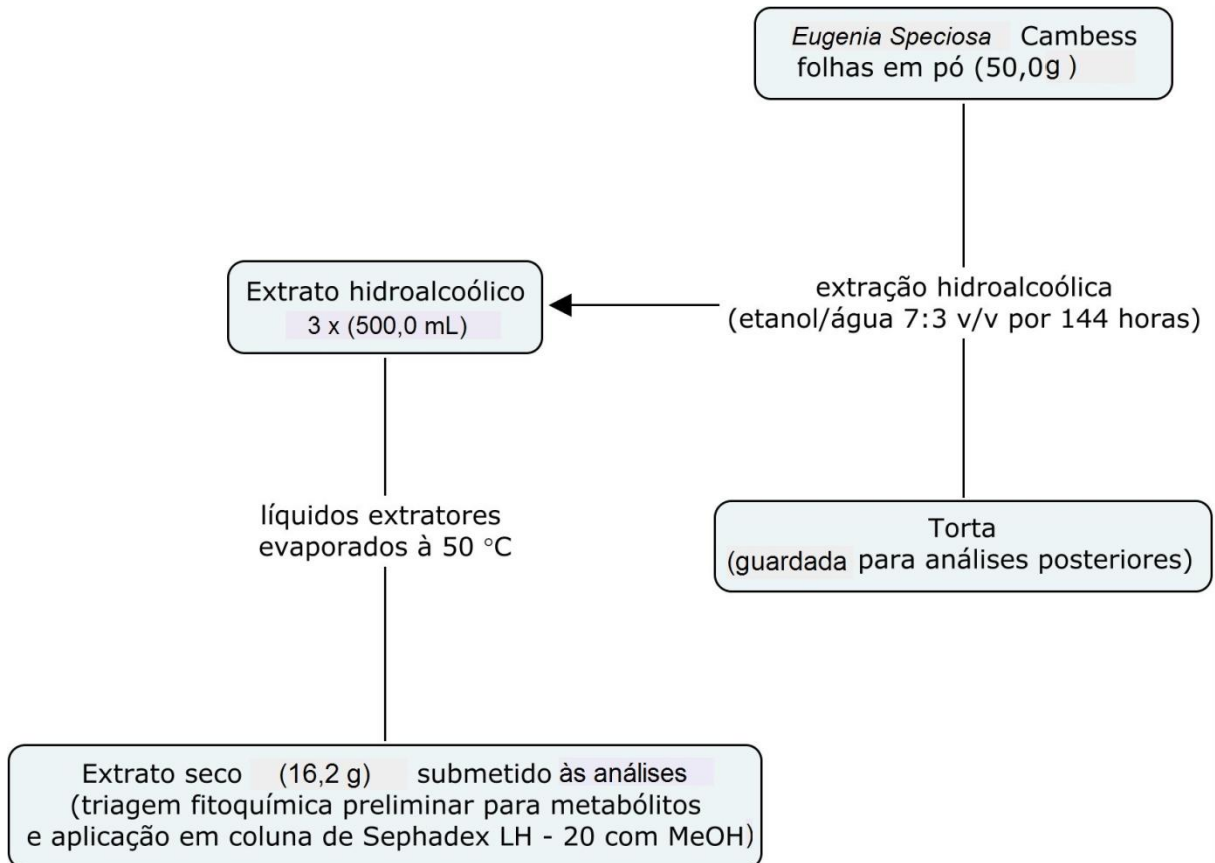


Figura 2: Fluxograma da preparação do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa*.

3.4. Equipamentos utilizados

Preparo do extrato

As folhas da planta foram moídas em moinho de facas e os líquidos extratores foram evaporados em evaporador rotativo da marca FISOTOM[®] 802 e secos em estufa de ar circulante da marca Nova Ética[®].

Fracionamento por coluna de Sephadex

O extrato de *E. speciosa* foi fracionado em coluna de Sephadex LH – 20, utilizando como fase móvel metanol.

Análises cromatográficas

Para o *clean-up* do extrato a amostra foi preparada em uma centrífuga da marca CELM[®], modelo COMBATE e feito em cartucho C₁₈ – E Strata da marca Phenomenex[®].

Para as análises realizadas por CLAE utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector de arranjo de foto diodos (CLAE-DAD) da marca Jasco[®], equipado com bomba quaternária modelo PU – 2089 plus, detector DAD modelo MD – 2010 plus, injetor automático modelo AS – 2055 plus, coluna analítica de fase reversa C₁₈ Synergi Hydro (Phenomenex[®], 250 x 4,6 mm, 4 µm) com uma pré-coluna (Phenomenex[®], 4 x 3 mm, 4 µm).

3.5. Triagem fitoquímica preliminar

Aproximadamente 100 mg do extrato foram solubilizados em metanol para identificação das classes de metabólitos secundários presentes, conforme descrito por Matos (1997) com adaptações:

- **Alcaloides:** Em uma placa de Elisa, 150 µL da amostra foram adicionados em três frascos diferentes e 50 µL de diferentes reagentes utilizados para identificação de alcaloides (Reativos de Hager, Mayer e Dragendorff) foram adicionados em cada frasco. O aparecimento de turvação branca com os reativos de Hager e Mayer e de cor alaranjada com o reativo de Dragendorff indica a presença de alcaloides.
- **Triterpenoides e Esteroides:** Foram colocados 150 µL da amostra em poços de uma placa de Elisa. Em seguida acrescentou-se uma gota de anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico. O aparecimento de cor azul-esverdeada indica a presença de esteroides.
- **Saponinas:** Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL da amostra e aproximadamente 2 mL de água destilada. O tubo foi agitado vigorosamente por 30 min e colocado em repouso por 20 min. A presença de espuma persistente com aproximadamente 1 cm de altura indica a presença de saponinas.
- **Cumarinas:** A amostra foi gotejada em papel de filtro. Em seguida, 1 gota de solução de KOH 10% foi adicionada à amostra. A observação da coloração azul sob luz UV 365 nm indica a presença de cumarinas.
- **Compostos fenólicos:** Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida de uma solução de FeCl₃ 2%. O aparecimento de uma mancha azul escura indica a presença de compostos fenólicos.

- **Taninos:** Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL da amostra e gota a gota, foi acrescentada uma solução de gelatina 2,5%. O aparecimento de precipitado branco indica a presença de taninos.
- **Flavonoides:** Em uma tira de papel de filtro a amostra foi gotejada seguida da adição de uma solução de AlCl_3 5%. O aparecimento de cor amarela sob luz UV 365 nm indica a presença de flavonoides.
- **Antraquinonas:** Em uma placa de Elisa, 150 μL da amostra foram colocados em um frasco. Em seguida adicionou-se 50 μL de solução NaOH $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$. A observação da coloração vermelha indica a presença de antraquinonas.
- **Antocianidinas e Chalconas:** Em três tubos de ensaio foram adicionados 1 mL da amostra. O tubo 1 foi acidificado com solução de HCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 3). Os tubos 2 e 3 foram alcalinizados com solução de NaOH $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 8 e 11). A coloração vermelha, lilás e azul púrpura nos tubos 1, 2 e 3, respectivamente, indica a presença de antocianidinas. A coloração vermelha nos tubos indica a presença de chalconas.
- **Leucoantocianidinas e Catequinas:** Um tubo de ensaio com 1 ml da amostra foi acidificado com solução de HCl $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ (pH 3). Em seguida, o tubo foi aquecido, em bico de Bunsen, cuidadosamente. O aparecimento da coloração vermelha e amarela indica a presença de leucoantocianidinas e catequinas, respectivamente.
- **Flavononas:** Em uma placa de Elisa foram adicionados 150 μL da amostra e alguns pedaços de magnésio metálico. Em seguida, adicionou-se uma gota de HCl concentrado. O aparecimento da coloração vermelha indica presença de flavononas.

3.6. *Clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa*

Para a realização do *clean-up*, 20 mg do extrato foi solubilizado em 2 mL de uma mistura de $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ na proporção 1:9 e centrifugado.

O cartucho de C_{18} foi ativado com MeOH e na sequência ambientado com a fase estacionária (1:9 $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) e logo em seguida o sobrenadante da amostra foi aplicado no cartucho.

Com a amostra no cartucho, três frações diferentes da amostra foram obtidas: fr. 1:9, fr. 1:1 ($\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$) e a fr. 100% MeOH .

3.7. Triagem cromatográfica preliminar

As frações obtidas no *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* foram submetidas a uma triagem cromatográfica preliminar por cromatografia em camada delgada (CCD) a fim de corroborar com os resultados obtidos pela triagem fitoquímica e, também, obter parâmetros sobre a polaridades dos constituintes deste extrato com o objetivo de desenvolver estratégias para análises cromatográficas posteriores.

As frações analisadas por CCD foram eluídas com o sistema $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ 5:6:1:4 (v/v, fase orgânica). A placa foi revelada com anisaldeído/ H_2SO_4 (flavonoides, saponinas, terpenoides, esteroides, catequinas, taninos e ácidos fenólicos).

As classes de substâncias foram determinadas pela comparação das colorações das manchas observadas na placa quando revelada com as colorações das classes descritas na literatura (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984; MATOS, 1997).

3.8. Análise do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* por CLAE-DAD

As análises cromatográficas por CLAE-DAD foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, sob responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Lourdes Campaner dos Santos.

As três frações obtidas no *clean-up* foram filtradas em discos de membrana de PTFE com poros de 0,45 μm (Phenomenex) e alíquotas de 20 μL foram injetadas no sistema de CLAE.

Inicialmente o modo de eluição, para cada fração, foi gradiente com a seguinte programação de fase móvel: 100:0 a 0:100 % ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 0,1% de TFA) em 60 min, vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

A partir do gradiente inicial, foi possível avaliar outras programações de eluição, para cada fração. As programações estabelecidas foram:

a) fr. 1:9: gradiente 100:0 a 75:25 % ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 0,1% de TFA) em 30 min, vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $\lambda = 240 \text{ nm}$;

b) fr. 1:1: gradiente 95:5 a 70:30 % ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 0,1% de TFA) em 60 min, vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $\lambda = 254 \text{ nm}$;

c) fr. 100% MeOH: isocrático 30:70 % ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$, 0,1% de TFA) em 15 min, vazão de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ e $\lambda = 300 \text{ nm}$;

4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Rendimento do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa*

Com a maceração das folhas de *E. speciosa* foi possível obter um rendimento de 32% do extrato hidroalcoólico (Tabela 1).

Tabela 1: Rendimento do extrato em relação ao material vegetal coletado.

Folhas moídas	107,7 g
Pó utilizado na extração	50,0 g
Líquidos extratores	1000,0 mL
Extrato	16,2 g
Rendimento	32,3 %

4.2. Triagem fitoquímica preliminar e fracionamento por Sephadex

Na CCD das reuniões das frações obtidas pelo fracionamento do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* por coluna de Sephadex LH - 20 apresentou manchas pretas, cinzas, amareladas e marrons (Figura 3), que são características de açúcares livres, ácidos fenólicos, flavonoides e taninos (WAGNER; BLADT; ZGAINSKI, 1984;).

As classes avaliadas e identificadas no extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* pelas triagens por reações específicas e por CCD estão informados na Tabela 2.

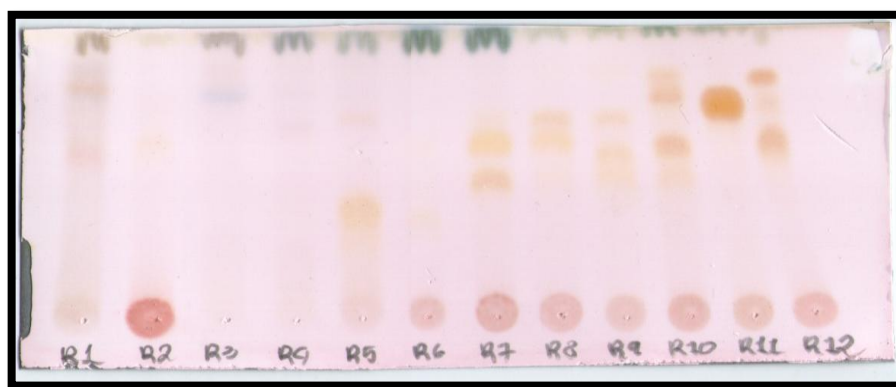


Figura 3: Cromatografia em camada delgada de sílica gel das reuniões das frações obtidas pelo fracionamento do extrato das folhas de *E. speciosa* por coluna de Sephadex LH-20. Fase móvel: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$ (5:6:1:4,v/v/v/v).

Tabela 2: Resultado da triagem fitoquímica preliminar.

Classes Químicas	Resultados
Alcalóides	POSITIVO
Triterpenóides	POSITIVO
Esteróides	NEGATIVO
Compostos fenólicos	POSITIVO
Taninos	POSITIVO
Antraquinonas	NEGATIVO
Flavononas	POSITIVO
Saponinas	POSITIVO
Cumarinas	NEGATIVO
Antocianidinas	NEGATIVO
Leucoantocianidinas	NEGATIVO
Chalconas	NEGATIVO
Flavonoides	POSITIVO
Catequinas	NEGATIVO

Estudos realizados com *E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora* também relataram a presença de flavonóis, flavonas, taninos, triterpenoides, saponinas e compostos fenólicos em geral (MAGINA, 2008), o que demonstra uma certa similaridade na composição química em plantas do gênero *Eugenia*.

4.3. Desenvolvimento de métodos cromatográficos para análise das frações do *clean-up* do extrato hidroalcoólica das folhas de *E. speciosa* por CLAE-DAD

Inicialmente, o extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* foi submetido a *clean-up*, com extração em fase sólida (EFS) utilizando cartuchos *Sep-pack* de C₁₈ para a remoção de substâncias apolares que podem ficar adsorvidas na coluna de fase reversa do sistema CLAE e também para obtenção de frações enriquecidas com substâncias de polaridades semelhantes (seção 3.6).

Nas análises por CLAE-DAD foi empregada fase móvel acidificada para evitar encaudamento dos picos, já que na triagem preliminar, as frações mostraram ser constituídas por substância polares (Tabela 2). Portanto, a função do ácido na fase móvel, além de protonar os silanóis residuais presentes na coluna de C₁₈, também tem a função de suprimir a ionização

de compostos de caráter ácido. A escolha do TFA foi baseada no estudo realizado por Rodrigues (2007), em que o autor avaliou a eficiência de três ácidos (ácido acético, ácido fórmico e TFA) nas análises de extratos vegetais por CLAE, e observou melhores resultados com o TFA na concentração de 0,1%.

As condições do gradiente das análises iniciais das frações (fr. 9:1, fr. 1:1 e fr 100% MeOH) por CLAE-DAD foram realizadas para observar o comportamento dos analitos presentes no processo de eluição, conforme orientações descritas por Snyder; Kirkland; Glajch (1997).

No cromatograma obtido para a fração fr. 1:9 é possível observar que a separação entre os analitos não foi satisfatória, prejudicando a identificação de cada componente pela análise dos espectros UV. É possível observar também que entre 18 a 60 minutos, o cromatograma não apresentou picos com intensidade significativa e, portanto, resultou em dispêndio de solventes e tempo desnecessários (Figura 4).

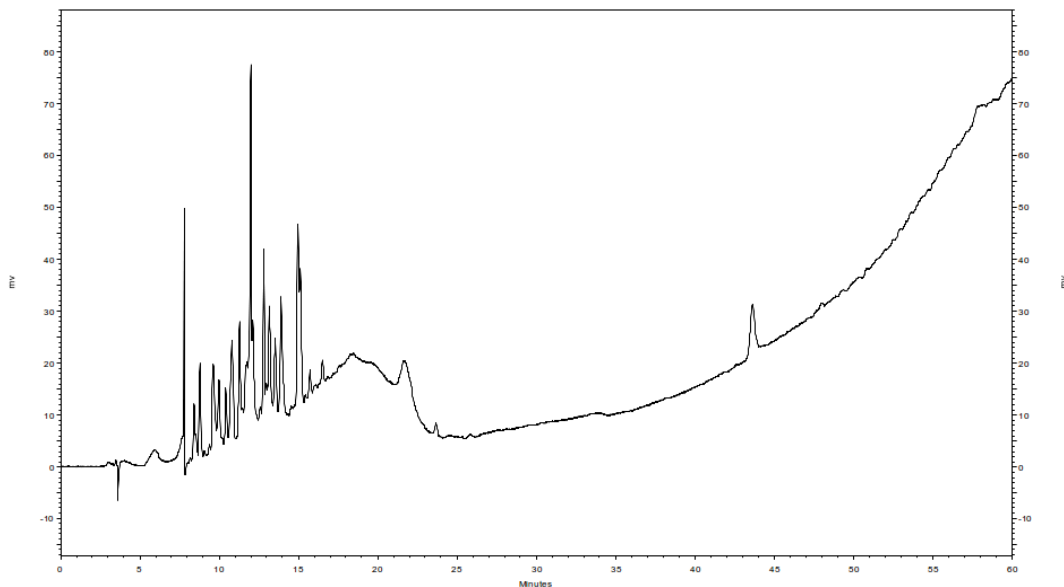


Figura 4: Cromatograma inicial da fr. 1:9 do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 0-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 240 nm].

Assim como ocorrido na fr. 1:9, é possível observar no cromatograma da fr. 1:1 que o gradiente inicial também não foi satisfatório para a separação dos analitos. No cromatograma (Figura 5) observa-se que não possui picos até 10 min e, após 20 min, novamente demonstrou tempo de análise despendido desnecessariamente.

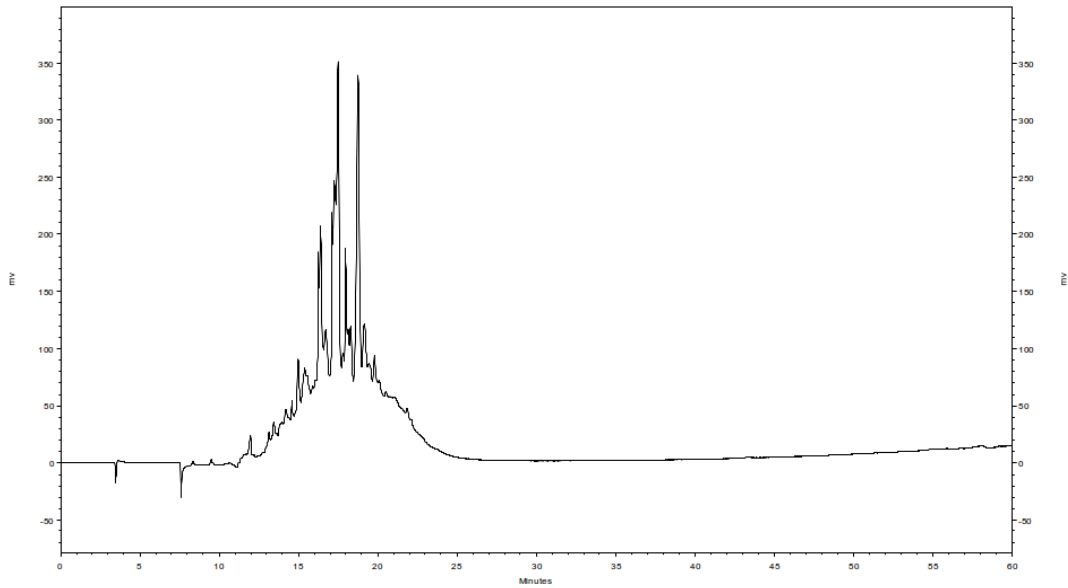


Figura 5: Cromatograma inicial da fr. 1:1 do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 0-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 254 nm].

Por fim, no cromatograma do gradiente inicial da fr. 100% MeOH (Figura 6) observa-se que somente após 48 minutos é possível visualizar dois picos com alta intensidade.

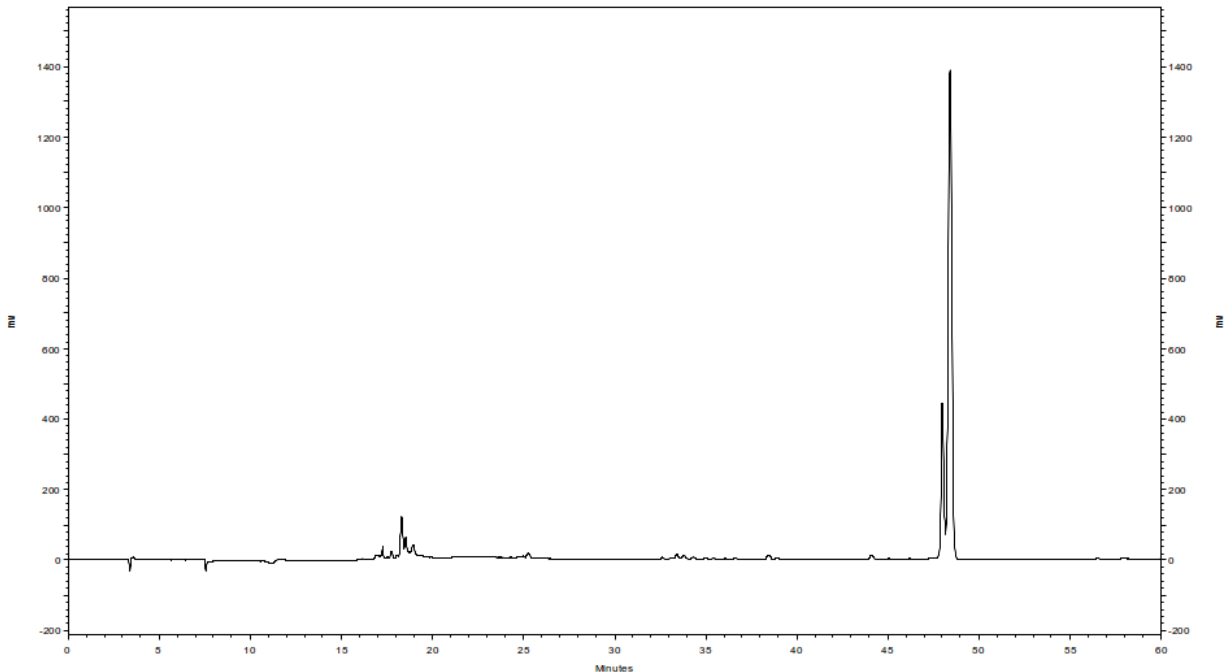


Figura 6: Cromatograma inicial da fr. 100% MeOH do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 0-100% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 300 nm].

Baseado nos dados obtidos, os métodos de eluição para CLAE foram otimizados para melhorar a separação entre os analitos e diminuir o tempo de análise das frações do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa*.

No método da fr. 1:9 foi mantido a proporção inicial de 100:0 (H₂O/ACN) devido ao fato da fração possuir substâncias de alta polaridade, e essa proporção ser a de menor força de eluição possível em fase reversa. A taxa de aumento de ACN também foi diminuída, de 1,67 % de ACN/min para 0,83 % de ACN/min por 30 min, resultando na melhor separação entre os analitos (Figura 7).

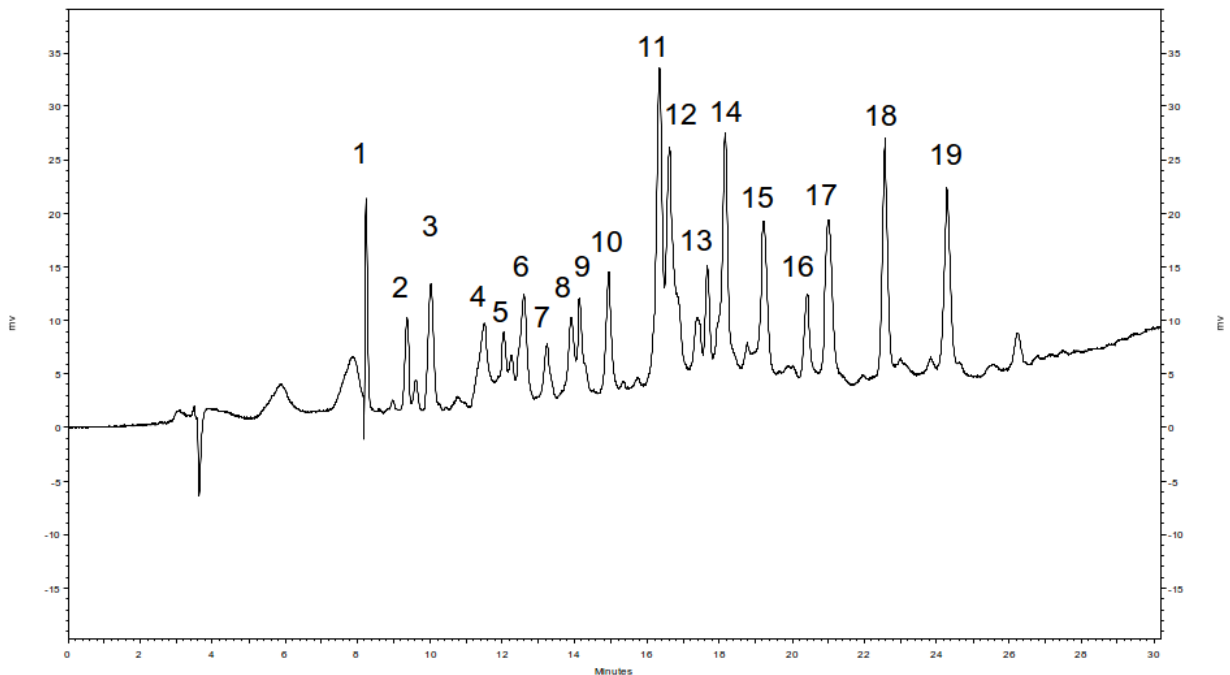


Figura 7: Cromatograma otimizado da fr. 1:9 do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 μm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 0-25% de B em 30 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 240 nm].

O método da fr. 1:1 foi otimizado para eluir os constituintes em menor tempo e melhorar a separação dos mesmos. Para isso a proporção inicial foi de 95:5 (H₂O/ACN), aumentando a força de eluição em relação ao gradiente inicial. A taxa de aumento de ACN também foi diminuída, de 1,67 % de ACN/min para 0,42 % de ACN/min, resultando na melhor separação entre os analitos (Figura 8).

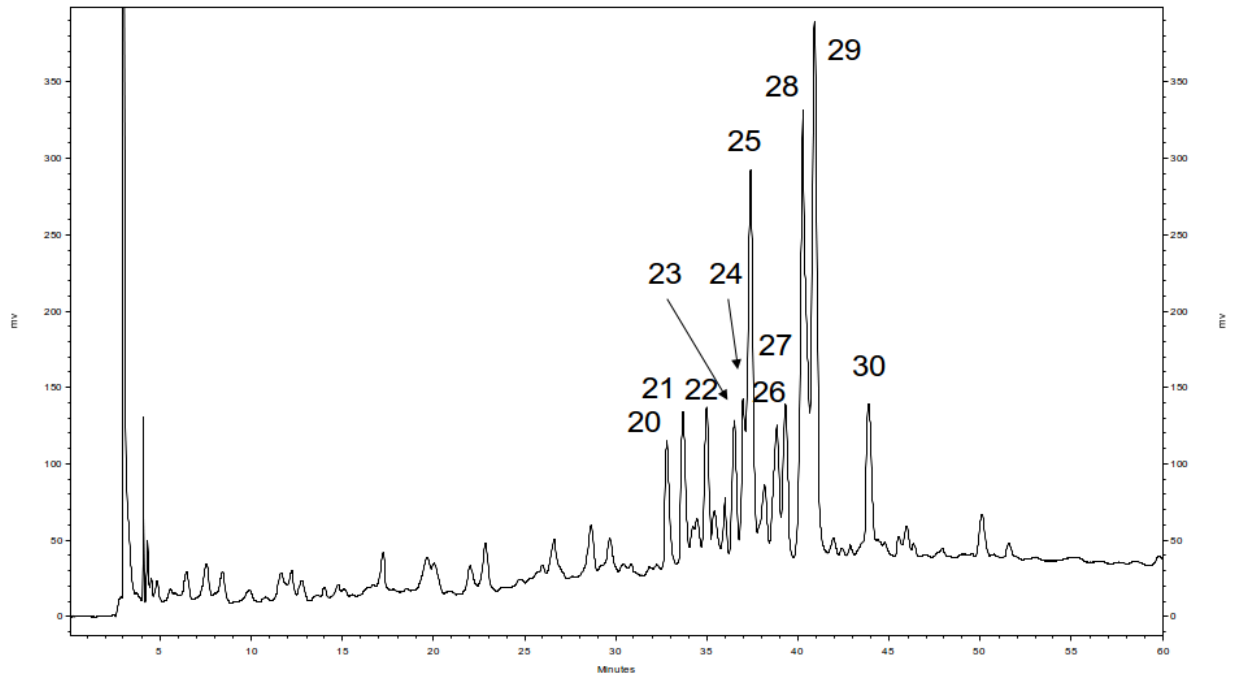


Figura 8: Cromatograma otimizado da fr. 1:1 do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Gradiente de 5-30% de B em 60 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 254 nm].

Finalmente, o método da fr. 100% MeOH foi otimizado para modo isocrático com proporção de 3:7 (H₂O/ACN). A força de eluição foi aumentada em relação ao gradiente inicial o que promoveu a eluição dos constituintes em menor tempo, diminuindo o tempo da análise de 60 para 15 minutos (Figura 9).

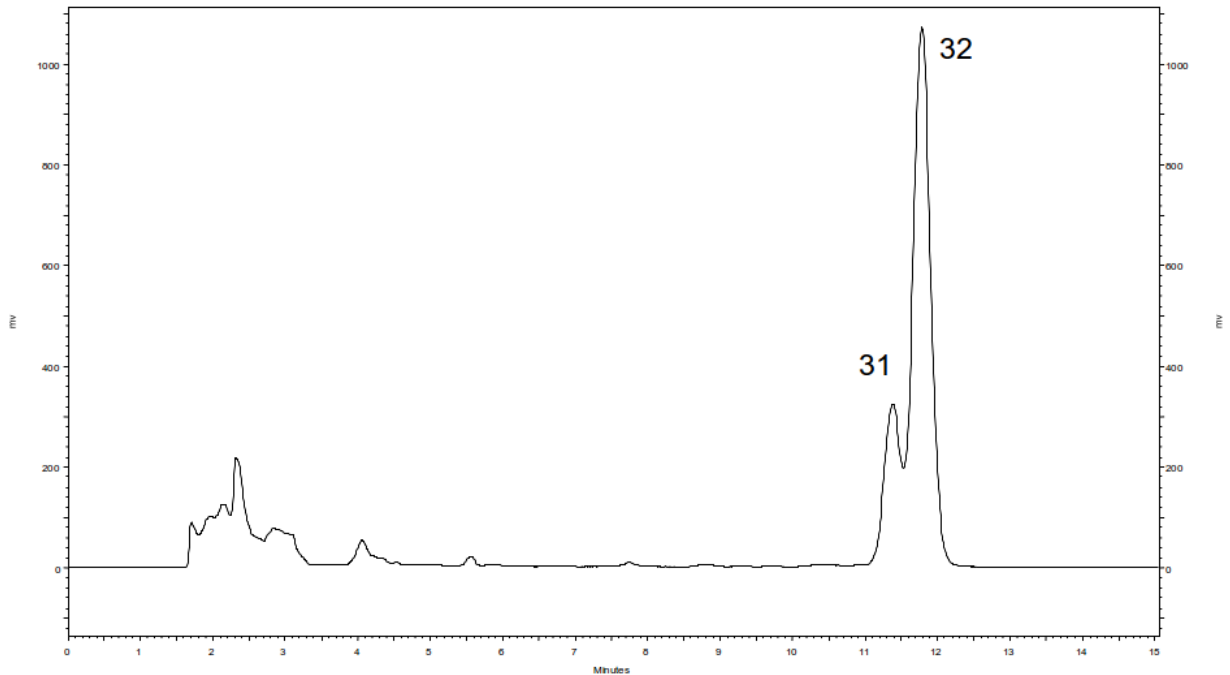


Figura 9: Cromatograma otimizado da fr. 100% MeOH do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* [Sistema CLAE-DAD; coluna analítica Phenomenex® Synergi Hydro C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 4 μm; Solvente A: H₂O + 0,1% TFA; Solvente B: ACN + 0,1% TFA. Isocrático 70% de B em 15 min; vazão de 1,00 mL.min⁻¹, λ = 300 nm].

4.4. Identificação prévia das substâncias presentes no extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa*

Algumas substâncias presentes nas frações do *clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* foram identificadas previamente por comparação do tempo de retenção (*t_r*) e espectro no UV com os de padrões autênticos, presentes na biblioteca de padrões do Laboratório de Fitoquímica do Instituto de Química da Unesp de Araraquara.

No método otimizado para a fr. 1:9 (Figura 7), a substância 9 apresentou tempo de retenção (*t_r* = 14,10 min) e espectro no UV (λ_{max} 285 nm) próximos ao do ácido homogentísico (Figura 10).

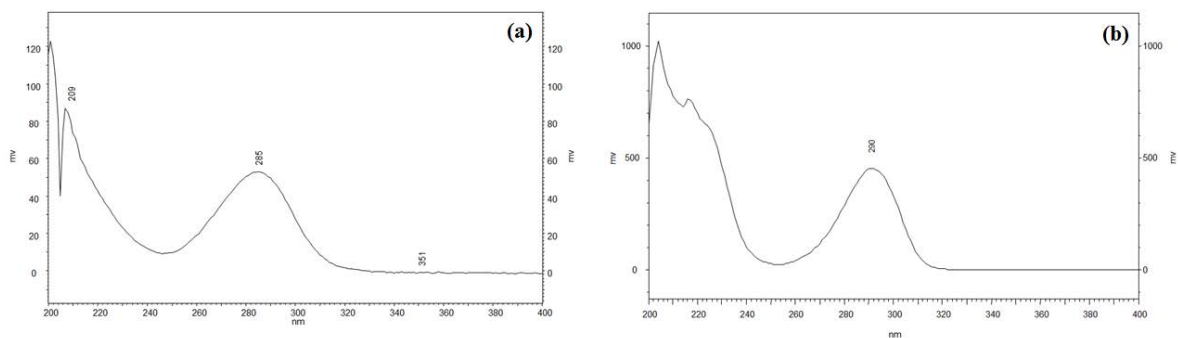


Figura 10: Espectros no UV (a) da substância 9 e (b) do padrão ácido homogentísico.

No método otimizado para a fr. 1:1 (Figura 8), as substâncias 20, 25 e 29 apresentaram tempo de retenção ($t_r = 33,00$ min, $t_r = 37,45$ min e $t_r = 41,00$ min) e espectros no UV com máximos de absorção semelhantes aos dos padrões homorientina, isovitexina e quercetrina, respectivamente (Figura 11, Figura 12 e Figura 13).

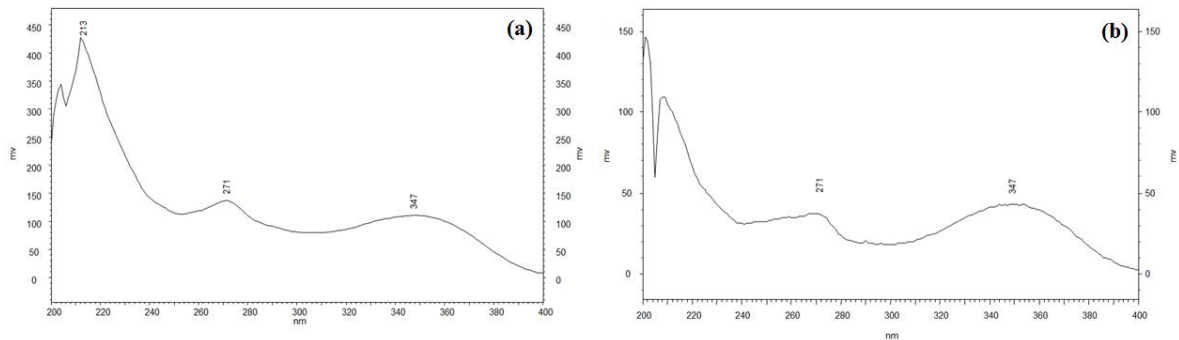


Figura 11: Espectros no UV (a) da substância 20 e (b) do padrão homorientina.

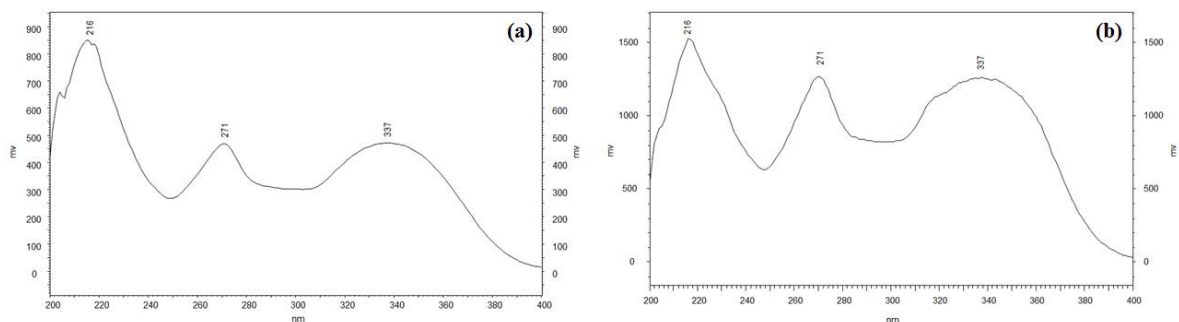


Figura 12: Espectros no UV (a) da substância 25 e (b) do padrão isovitexina.

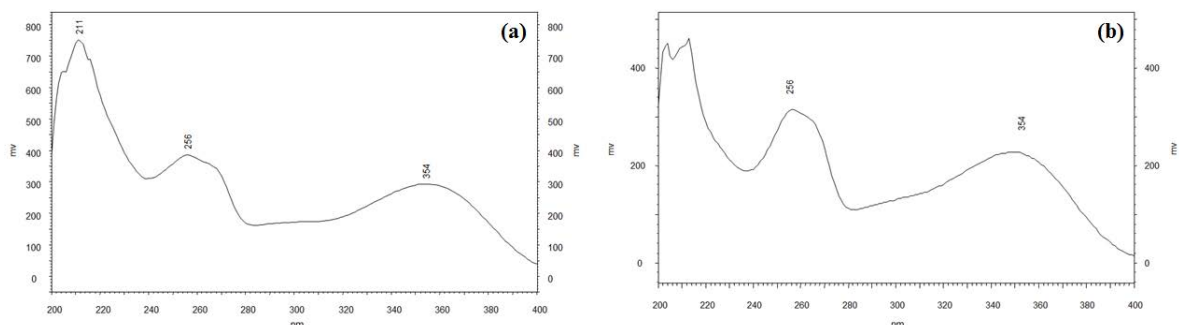


Figura 13: Espectros no UV (a) da substância 29 e (b) do padrão quercetrina.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo fitoquímico preliminar da espécie *Eugenia Speciosa* Cambess possibilitou a identificação qualitativa de um ácido fenólico, o ácido homogentísico, e três flavonoides,

homorientina, isovitexina e quercetrina. Foi possível também, por meio da triagem química preliminar, observar que esta espécie também apresenta alcaloides, triterpenoides, taninos e saponinas.

As análises realizadas poderão servir para nortear estudos posteriores para o isolamento e quantificação das substâncias previamente identificadas no extrato hidroalcoólico das folhas de *E. speciosa* e também para identificar outras substâncias que não puderam ser elucidadas devido às limitações das técnicas disponíveis.

Os estudos realizados para a espécie *E. speciosa* apresentados neste trabalho seguem uma tendência mundial em investimentos na área da fitoquímica como fonte de medicamentos para diversas doenças, uma vez que a investigação criteriosa de extratos de diversas espécies vegetais, com relatos de usos na medicina popular, proporcionam descobertas de moléculas biologicamente ativas contra doenças degenerativas, ligadas principalmente a ação de radicais livres no organismo. (FOGLIO, 2006).

O Brasil é o país com a maior diversidade genética de espécies vegetais no mundo, mas apenas 5% dessas espécies já foram estudadas em relação às suas aplicações medicinais, sendo a utilização popular dessas espécies muito difundida. Mais de 30% do tratamento de doenças é feito através de produtos naturais, por mais 15% da população brasileira, que atribui a eficácia da maioria desses tratamentos apenas a relatos populares, devido a falta de pesquisas na área. (VIEIRA, 2005).

A expectativa de vida da população mundial é crescente e com ela cresce também a busca por melhor qualidade de vida, que na sociedade moderna está diretamente ligada a capacidade e a possibilidade de se manter economicamente ativo dentro dela. Esta premissa tornou-se fundamental, não só para o desenvolvimento pessoal, mas para a economia de um país, que em muito depende da força de trabalho de sua população. Os motivos econômicos moveram grandes indústrias farmacêuticas e até mesmo o poder público para incentivar os estudos na área da fitoquímica. (FOGLIO, 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. **Farmacopéia Brasileira**. 5. ed. Brasília, DF: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010. v. 1. Disponível em:

<www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm>. Acesso em: 04 out. 2015.

APEL, M. A.; SOBRAL, M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M. Essential Oils from Eugenia Species—Part VII: Sections Phyllocalyx and Stenocalyx. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, p. 135-138, 2004.

COLECIONANDO FRUTAS **Eugenia speciosa Família das Myrtaceas**. Disponível em: <<http://www.colecionandofrutas.org/eugeniaspeciosa.htm>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

FLORA DIGITAL. **Eugenia speciosa Cambess**. Disponível em:

<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=4537>. Acesso em: 10 ago. 2015.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar.

MultiCiência: Construindo a História dos Produtos Naturais. UNICAMP. 7 out. 2006.

Disponível em: <https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf> Acesso em: 04 jan. 2016.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13ª edição. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.;

ECHEVARRIA, A.; Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares.

Química Nova, v. 25, n. 3, 429-438, 2002.

MAGINA, M. D. A. Estudo fitoquímico e biológico de espécies do gênero eugenia. 2008. 199 f. **Tese (Doutorado em Química)** – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2008.

MATOS, F. J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Ed. UFC, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Diretrizes para o cuidado das pessoas com doenças crônicas nas redes de atenção à saúde e nas linhas de cuidado prioritário**. Brasília – DF, 2013.

Disponível em:

<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/diretrizes%20cuidado_pessoas%20doencas_croocr.pdf> Acesso em: 04 jan. 2016.

NOVARTIS BRASIL. **Doenças Crônicas**. Novartis Biociências S.A. 2013. Disponível em:

<http://www.novartis.com.br/_saude/Apoio/doencas_cronicas.shtml> Acesso em: 04 jan. 2016.

RODRIGUES, C. M. R. Caracterização qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais. 2007. 197 f. **Tese (Doutorado em Química)** – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2007.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1997. 765 p.

TAVARES, N. U. L.; COSTA, K. S.; MENGUE, S. S.; VIEIRA, M. L. F. P.; MALTA, D. C.; JUNIOR, J. B. S. Uso de medicamentos para tratamento de doenças crônicas não transmissíveis no Brasil: resultados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. **Epidemiol. Serv. Saúde**. Brasília, 24(2): 315 – 323, abr – jun 2015. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/ess/v24n2/v24n2a14.pdf>> Acesso em: 04 jan. 2016.

VIEIRA, M. G. S.; MAGALHÃES, D. V.; NETO, J. S. M.; BRASIL, N. V. G. P. S. Estudo Fitoquímico e Atividade Antioxidante dos Extratos de Plantas do Parque Botânico do Ceará. **Anais da 57ª Reunião Anual da SBPC**. Fortaleza – CE. Jul. 2005. Disponível em: <http://www.sbpcnet.org.br/livro/57ra/programas/SENIOR/RESUMOS/resumo_3492.html> Acesso em: 04 jan. 2016.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984. 320 p.