

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

CLEIDIANE DA SILVA

FRACIONAMENTO BIOGUIADO DE FOLHAS DE *Syzygium
malaccense*

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO
2018

CLEIDIANE DA SILVA

**FRACIONAMENTO BIOGUIADO DE FOLHAS DE *Syzygium
malaccense***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Pato Branco, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni.

PATO BRANCO

2018

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado **Fracionamento bioguiado de folhas de *Syzygium malaccense*** foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N° **10.2.2018** de 2018.

Fizeram parte da banca os professores.

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Orientador

Marina Leite Mitterer Daltoe

Membro da Banca

Sirlei Dias Teixeira

Membro da Banca

AGRADECIMENTOS

Aos que seguem, gostaria que soubessem que têm minha infindável gratidão.

Aos meus pais, Leonildes e Avelino, por todo o cuidado e amor dedicados desde sempre. Por todos os conselhos, ensinamentos, permissões e restrições, sem os quais eu não poderia ter chegado onde estou e, principalmente, pelo exemplo de força e superação que me proporcionam todos os dias.

Aos meus irmãos Cleverson, Eliane e Elisangela, por estarem sempre comigo, mesmo longe. Por todo o cuidado, conselhos, carinho e paciência ao longo desses vinte e dois anos. Por me ensinarem a contar, a dançar e, entre tantas outras coisas, a respeitar e valorizar a nossa família.

Ao meu querido e amado Tobias, por ser meu companheiro todos os dias. Pelo amor incondicional e despretensioso, com o cuidado e o carinho dos abraços que nos tornam mais fortes. Por me presentear diariamente com seu sorriso, sua compreensão e seu talento.

À linda Maria Ivoly, por toda a assistência e conhecimento, proporcionados desde a sala de aula até hoje. Por me tornar parte do seu dia-a-dia, estendendo a mim o zelo que tem com seu filho. Por me proporcionar o Tobias, o Bob, o Lennon e o Ozzy, junto às palavras e flores que tornam os meus dias melhores.

À minha professora orientadora, Tatiane Oldoni, pela oportunidade e confiança concedidas, por todo o conhecimento compartilhado, além dos valiosos conselhos e experiências repassados ao longo desses três anos. Por me mostrar um mundo de oportunidade e beleza na simplicidade das plantinhas.

A todos os meus professores, desde o ensino básico até o ensino superior, que independente da área contribuíram imensamente para a minha formação pessoal e profissional. Muitos foram e ainda são exemplos para mim.

Aos meus amigos e parceiros científicos Matheus, Anaclara, Thariane, Bruno e Diego por estarem me auxiliando diariamente ao longo dessa caminhada e por me repassarem tantos conhecimentos e experiências, sempre acompanhados de muito carinho e paciência. Vocês são peças fundamentais do meu amor pela ciência.

Ao querido Matheus, responsável pela minha iniciação no laboratório e por me ensinar os princípios básicos de um químico analítico.

À linda Thariane, pela indicação à iniciação científica, por todo auxílio ao longo desses anos e por idealizar este trabalho.

À maravilhosa Anaclara, por compartilhar o *S. malaccense* e realizar todo esse estudo comigo, compartilhando ideias e inúmeras horas no laboratório, auxiliando na realização das análises e na discussão dos resultados.

Aos meus colegas e amigos, especialmente Ana Paula, Emily, Marcos, Pedro, Vitor, Kamyla e Vanessa, por toda a amizade, companheirismo, conversas, tristezas e alegrias que compartilhamos e às ruivas maravilhosas da minha vida, Mariane e Beatriz, por serem o meu porto seguro ao longo dessa caminhada.

À Alexandra Asanovna Elbakyan, por toda sua inteligência, coragem e determinação.

À todas as pessoas que, de alguma forma, foram capazes de me acalmar ou entusiasmar ao longo dos meus vinte e dois anos de vida.

Ao laboratório Central de Análises pelo espaço e equipamentos cedidos e à UTFPR pelo auxílio financeiro.

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

E, finalmente, à Força maior que nos rege nesse mundo.

Muito Obrigada!

“Resplandecente é a sabedoria, e sua beleza é inalterável: os que a amam descobrem-na facilmente. Os que a procuram encontram-na. Ela antecipa-se aos que a desejam. Quem, para possuí-la, levanta-se de madrugada, não terá trabalho, porque a encontrará sentada à sua porta.”

Livro da Sabedoria 6:12-14

RESUMO

SILVA, Cleidiane da. Fracionamento bioguiado de folhas de *Syzygium malaccense*. 2018. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (grau de bacharel em Química) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2018.

O *Syzygium malaccense* é uma planta de origem asiática que se adaptou ao clima das regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil, utilizada pela medicina popular na alimentação e no tratamento de distúrbios gastrintestinais, em inflamações e no diabetes. As plantas são consideradas matrizes complexas de estudo pois, em geral, apresentam uma composição química bastante complexa e variada. Para um completo estudo de caracterização química e determinação dos compostos responsáveis pelas atividades biológicas do material em estudo, torna-se necessário separar os compostos para, na sequência, determinar suas atividades biológicas. A separação das substâncias bioativas pode ser realizada a partir do fracionamento bioguiado, que tem como principal característica concentrar a bioatividade nos compostos purificados, facilitando e viabilizando o estudo de substâncias bioativas em amostras complexas. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar um fracionamento sólido-líquido bioguiado a partir do extrato das folhas de *S. malaccense* coletadas na cidade de Jacupiranga – SP, utilizando a atividade antioxidante como ferramenta para a bioatividade. O fracionamento foi realizado a partir do extrato hidroalcoólico liofilizado da planta utilizando seis solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, etanol e etanol:água) e os extratos obtidos foram avaliados quanto a capacidade antioxidante a partir das técnicas *in vitro* (DPPH•, ORAC e FRAP), pelo teor de compostos fenólicos totais e flavonoides e por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os melhores resultados para a atividade antioxidante foram obtidos para as frações com características mais polares como a fração em etanol, que apresentou a maior capacidade de captura do radical DPPH (3412 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$) e de redução do ferro pela análise de FRAP (17173 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{g}^{-1}$); a fração em acetato de etila, com a maior capacidade de sequestro dos radicais peroxila (4785 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$) e a fração em acetona, com teor de compostos fenólicos totais de 349,3 mg EAG g^{-1} e teor de flavonoides de 581,7 mg EQ g^{-1} , frações nas quais foram identificados os compostos fenólicos catequina, miricitrina, quercetina e ácido gálico.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Bioatividade. Estudo bioguiado. Produtos naturais.

ABSTRACT

SILVA, Cleidiane da. Bioguided fractionation of the jambo (*Syzygium malaccense*) leaf extract. 2018. 43 f. Course Conclusion Paper (bachelor's degree in Chemistry) – Federal Technological University of Paraná. Pato Branco, 2018.

Syzygium malaccense is a plant of Asian origin that has adapted to the climate of the northern, northeastern and southeastern regions of Brazil, used in popular medicine for food and in the treatment of gastrointestinal disorders, inflammation and diabetes. The plants are considered complex matrices of study because, in general, they present a very complex and varied chemical composition. For a complete study of chemical characterization and determination of the compounds responsible for the biological activities of the study material, it is necessary to separate the compounds in order to determine their biological activities. The separation of bioactive substances can be performed from the bioguided fractionation, whose main characteristic is to concentrate the bioactivity in the purified compounds, facilitating and making feasible the study of bioactive substances in complex samples. In this context, the objective of this work was to perform a solid-liquid fractionation bioguided from the extract of *S. malaccense* leaves collected in the city of Jacupiranga - SP, using the antioxidant activity as a tool for bioactivity. The fractionation was performed from the lyophilized hydroalcoholic extract of the plant using six solvents in increasing order of polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, acetone, ethanol and ethanol: water) and the extracts obtained were evaluated for antioxidant capacity from in vitro techniques (DPPH•, ORAC and FRAP), total phenolic compounds and flavonoids, and high performance liquid chromatography (HPLC). The best results for the antioxidant activity were obtained for the fractions with more polar characteristics, such as the fraction in ethanol, which presented the highest capacity of capture of the radical DPPH (3412 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$) and iron reduction by the analysis of FRAP (17173 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{g}^{-1}$); the fraction in ethyl acetate, with the greater scavenger capacity of peroxil radicals (4785 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$), and the acetone fraction with total phenolic compounds content of 349.3 mg EAG g^{-1} and flavonoid content of 581.7 mg EQ g^{-1} , fractions in which the phenolic compounds catechin, myricitrin, quercetin and gallic acid were identified.

Keywords: Antioxidant activity. Bioactivity. Bioguided study. Natural products.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Folhas do <i>S. malaccense</i>	15
Figura 2 – Compostos fenólicos a) Estrutura básica de um composto fenólico não flavonoide, b) Estruturas básicas dos ácidos fenólicos	17
Figura 3 – Flavonoides a) Estrutura básica dos flavonoides composta por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C), b) Estado de oxidação e padrão de substituição do anel C nos subgrupos de flavonoides.....	18
Figura 4 – Reação entre o composto fenólico e um radical livre	19
Figura 5 – Reação de redução do radical DPPH• por um composto antioxidante AOH	20
Figura 6 – Reação de um composto antirradical AH com radicais peroxila gerados na decomposição térmica do ABAP	20
Figura 7 – Reação de oxirredução envolvida no ensaio de FRAP	21
Figura 8 – Reação de um composto antioxidante (ácido gálico) com molibdênio VI, formando o molibdênio V.....	22
Figura 9 – Reação de formação de um complexo entre um flavonoide e Al (III)	22
Figura 10 – Estruturas dos compostos fenólicos identificados no extrato e frações das folhas <i>S. malaccense</i> : ácido gálico, catequina, miricitrina e quercetina	32
Figura 11 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD-FL para a Fr-Ace das folhas de <i>S. malaccense</i> , apresentando os sinais de ácido gálico (1), catequina (2), miricitrina (3), quercetina (4) e o sinal majoritário desconhecido (260, 340 nm)	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições cromatográficas	27
Tabela 2 – Rendimento do extrato e frações da folhas de <i>S. malaccense</i>	28
Tabela 3 – Atividade antioxidante (DPPH•, ROO• e FRAP), teor de compostos fenólicos e flavonoides do extrato e frações do <i>S. malaccense</i>	29
Tabela 4 – Dados analíticos obtidos pela técnica de CLAE para compostos fenólicos em folhas de <i>S. malaccense</i>	31
Tabela 5 – Concentração de compostos fenólicos no extrato e frações das folhas de <i>S. malaccense</i>	32

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1	PRODUTOS NATURAIS	14
3.1.1	<i>Syzygium malaccense</i>	14
3.2	FRACIONAMENTO BIOGUIADO	15
3.3	COMPOSTOS ANTIOXIDANTES	16
3.4	ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	19
3.4.1	Capacidade antioxidante frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•)	19
3.4.2	Capacidade antioxidante frente a radicais oxigenados (ORAC)	20
3.4.3	Capacidade antioxidante pela redução do Fe ³⁺ a Fe ²⁺	21
3.4.4	Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu	21
3.4.5	Teor de flavonoides totais	22
3.5	ESTUDO BIOGUIADO PELA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1	FRACIONAMENTO	24
4.1.1	Folhas de <i>S. malaccense</i>	24
4.1.2	Extrato hidroalcoólico de Jambo (EHJ)	24
4.1.3	Extração sólido-líquido	24
4.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EHJ E FRAÇÕES	25
4.2.1	Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH•	25
4.2.2	Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical peroxila (ROO•)	25

4.2.3	Atividade antioxidante pela capacidade de redução do ferro (FRAP)	25
4.2.4	Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT).....	26
4.2.5	Determinação do teor de flavonoides.....	26
4.2.6	Análise em CLAE-DAD-FL	27
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO	28
5.2	ESTUDO BIOGUIADO	29
5.2.1	Determinação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	29
5.2.2	Identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD-FL ...	31
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados desde a antiguidade no tratamento de doenças e males do corpo humano. Nos últimos anos, os produtos naturais têm se tornado fonte para o desenvolvimento de novas drogas, permitindo o avanço na descoberta de agentes terapêuticos contra doenças infecciosas como câncer, imunodeficiências entre outras. Nesse sentido, a importância dos produtos naturais é evidente, sendo atribuído aos pesquisadores desta área o estudo para identificação de novos compostos bioativos e elucidação dos seus mecanismos de ação em organismos vivos.

O jambo (*Syzygium malaccense*) é uma planta encontrada nas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil, sendo utilizado pela medicina popular para combater dores de cabeça e fígado (SILVA et al. 2011), como diurético e no tratamento de infecções do trato gastrointestinal, respiratório e em inflamações (MELO et al. 2009), além disso, é muito conhecido por ser utilizado, segundo Zambelli et al. (2006), como laxante e no tratamento contra diabetes.

Poucos trabalhos com o *S. malaccense* são encontrados na literatura. Alguns desses estudos indicam a presença de compostos fenólicos e flavonoides nas folhas do jambo (ZAMBELLI et al., 2006; ARUMUGAM et al., 2014), responsáveis por sua capacidade antioxidante. É importante separar estes compostos do extrato bruto e caracterizá-los química e biologicamente (OLDONI, 2010; KARLING, 2017), determinando o teor de compostos fenólicos totais, de flavonoides e a atividade antioxidante dos mesmos, a fim de que se possam intensificar os benefícios que as folhas de Jambo oferecem a partir de compostos mais bioativos.

Os compostos com capacidade antioxidante, principalmente os compostos fenólicos e flavonoides, têm despertado muito interesse, pois os mesmos, de acordo com Haida et al. (2011), proporcionam inúmeros benefícios à saúde humana sequestrando os radicais livres e reduzindo o processo oxidativo no corpo humano, o que previne o surgimento de doenças que degradam o organismo. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo de fracionamento bioquímico, avaliando a atividade antioxidante por técnicas *in vitro* e por cromatografia líquida de alta eficiência das frações obtidas por fracionamento sólido-líquido do extrato hidroalcoólico liofilizado das folhas de Jambo coletadas na região sudeste do Brasil.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar estudo de fracionamento bioguiado a partir do extrato hidroalcoólico das folhas de Jambo (*Syzygium malaccense*) coletadas em Jacupiranga – SP, visando a extração de compostos com atividade antioxidante.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Purificar o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. malaccense* por meio de fracionamento sólido-líquido;
- Avaliar a influência da polaridade dos solventes utilizados durante o fracionamento;
- Avaliar a bioatividade do extrato hidroalcoólico e frações pela quantificação da atividade antioxidante e de compostos fenólicos;
- Avaliar a capacidade antioxidante do extrato hidroalcoólico e frações utilizando métodos de análise *in vitro*;
- Determinar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides do extrato hidroalcoólico e frações;
- Identificar e quantificar os compostos bioativos do extrato hidroalcoólico e frações utilizando a técnica de cromatografia.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRODUTOS NATURAIS

A medicina popular no Brasil, desde as civilizações indígenas, é muito utilizada para tratar inúmeras doenças (PINTO et al., 2006) e, após a colonização, esse conhecimento foi usado para desenvolver o comércio de especiarias, que consiste na venda e compra de produtos naturais. (ETHUR et al., 2011) que contêm propriedades alimentícias, curativas, entre outras.

Desde então, o uso das propriedades farmacológicas de plantas medicinais é comum em diversas culturas e lugares do mundo. O desenvolvimento de novos fármacos a partir de produtos naturais é cada vez maior, o que de acordo com Viegas et al. (2006), propicia a abertura de um campo de pesquisa cada vez mais amplo que utiliza a flora natural específica de cada região, estado ou país.

A atividade biológica da maioria das plantas medicinais conhecidas é atribuída, de acordo com Simões et al. (2017), à presença dos metabólitos secundários ou micromoléculas, que em geral apresentam estruturas complexas, de baixa massa molecular, com atividades biológicas marcantes e são encontrados em concentrações relativamente baixas quando comparados às macromoléculas como os lipídeos, protídeos e glicídios.

Atualmente, a industrialização de plantas medicinais origina os fitoterápicos, que de acordo com a Resolução nº 26 da Anvisa (2014), são produtos que não incluem na sua composição substâncias ativas isoladas ou altamente purificadas. Ao isolar uma substância ativa pura, têm-se então os fitofármacos.

3.1.1 *Syzygium malaccense*

O *Syzygium malaccense* (Figura 1), conhecido popularmente como Jambo Vermelho ou apenas Jambo pertence à família *Myrtaceae* e tem origem asiática, mais especificamente na Malásia (MELO et al., 2009). Ainda segundo Melo et al. (2009), o gênero *Syzygium* é um dos maiores gêneros da família *Myrtaceae*, compreendendo cerca de 500 espécies de árvores e arbustos. A planta adaptou-se no Brasil principalmente nas regiões quentes do norte, nordeste e sudeste (COSTA

et al., 2006). É uma árvore frutífera exótica, sendo também utilizada como sombreiro, pois é perenifólia de copa densa e piramidal, podendo atingir de 7 a 13 metros de altura, com folhas simples, duras e sem pelos, verde-escuras brilhantes, medindo de 20 a 22 cm de comprimento por 6 a 9 cm de largura (NUNES, 2015).

Figura 1 – Folhas do *S. malaccense*



Fonte: tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Syzygium+malaccense (2014).

Os estudos científicos do *S. malaccense* são bastante recentes, apesar do mesmo já ser largamente conhecido na medicina popular. Augusta et al. (2010) caracterizaram, por meio de técnicas de espectroscopia e cromatografia, o extrato produzido a partir da casca do jambo e identificaram compostos com atividade antioxidante. Um estudo com o fruto do jambo foi realizado por Costa (2010), onde os resultados também demonstraram elevada atividade antioxidante, além de um alto teor de compostos fenólicos totais e flavonoides. Ao trabalhar com as folhas de *S. malaccense*, Sharma et al. (2013) realizou fracionamento em coluna aberta do extrato etanólico destas e obteve frações com elevada atividade antimicrobiana.

3.2 FRACIONAMENTO BIOGUIADO

Ao estudar uma matriz química complexa como a das plantas, técnicas de separação e purificação dos compostos químicos são necessárias (SIMÕES et al.,

2017). Uma dessas técnicas é o fracionamento bioguiado, que consiste na separação de substâncias químicas bioativas presentes no extrato da planta a partir da solubilidade (MERLIN, 2017), obtendo frações que concentram a atividade biológica de interesse. Porém, ao longo de um processo de purificação é possível que se obtenham compostos purificados com menor atividade que a do extrato bruto, o que de acordo com Simões et al. (2017), pode ocorrer quando a atividade biológica em estudo é resultado de sinergias entre diferentes constituintes da amostra.

De modo geral, o estudo bioguiado inicia a partir da escolha da planta, baseada no uso medicinal popular e em bibliografias que relatam suas características, seguida da coleta e envio desta para a identificação botânica. Posteriormente, um extrato bruto da planta é preparado de acordo com a natureza química dos compostos bioativos de interesse, ou seja, de forma a solubilizar a maior quantidade possível de substâncias com alguma atividade biológica.

Seguindo o mesmo conceito, pode-se realizar a separação dos compostos químicos do extrato bruto a partir da solubilização destes em solventes com diferentes polaridades, obtendo-se frações e subfrações com bioatividade concentrada, facilitando e viabilizando o estudo de substâncias bioativas em amostras complexas (KARLING, 2017; MERLIN, 2017; OLDONI et al., 2016).

Extrato e frações então são submetidos à análises químicas, capazes de determinar a atividade biológica em estudo identificando os grupamentos químicos presentes (SIMÕES et al., 2017). Neste estudo bioguiado inicial do fracionamento das folhas de jambo, a bioatividade avaliada está relacionada à atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico e suas frações, seguida da identificação desses compostos.

3.3 COMPOSTOS ANTIOXIDANTES

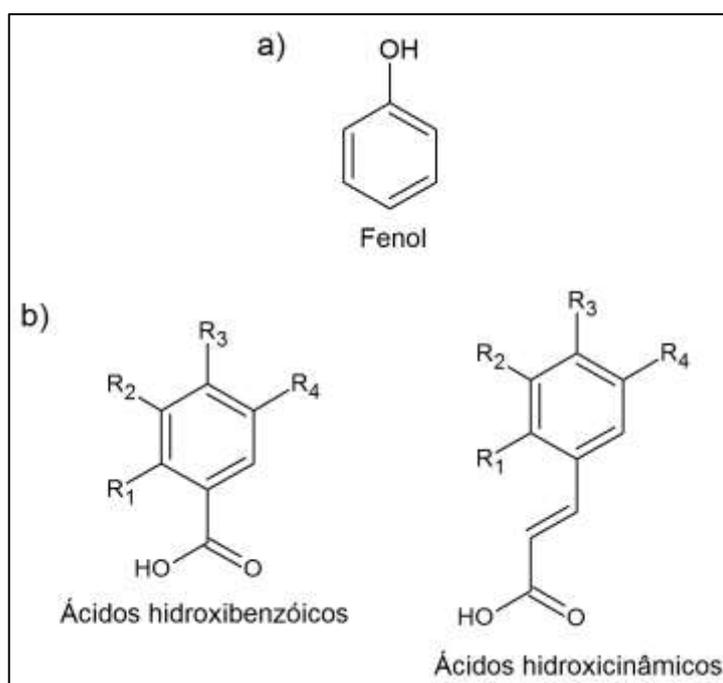
Os compostos com capacidade antioxidante são capazes de reduzir o estresse oxidativo causado pela presença de radicais livres no organismo (CASTRO et al., 2014). Os radicais livres consistem em espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) geradas pelo metabolismo celular (OLIVEIRA, 2011), que são benéficas a níveis moderados, mas em concentrações altas podem

prejudicar os tecidos com o estresse oxidativo causado pelo desequilíbrio entre pró-oxidantes e antioxidantes (BARBOSA et al., 2010), resultando, de acordo com Cerqueira et al. (2007), em perda de funções biológicas dos tecidos e desequilíbrio da homeostase do organismo.

O corpo humano tem vários mecanismos para prevenir o estresse oxidativo com a neutralização de radicais livres por compostos antioxidantes, os quais são produzidos naturalmente no organismo ou fornecidos externamente através de alimentos ou suplementos (PHAM-HUY et al. 2008). Em geral, a atividade antioxidante é atribuída aos metabólitos secundários presentes em partes comestíveis e não comestíveis de plantas e, segundo Mandal et al. (2009), os compostos fenólicos são exemplos de uma grande variedade de compostos antioxidantes que pode ser encontrada em fontes naturais incluídas na dieta, tais como frutos, vegetais e chás.

Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais de fontes vegetais e podem ser classificados em dois grandes grupos: os flavonoídicos e os não flavonoídicos (OLIVEIRA, 2011). As estruturas do grupo dos compostos fenólicos não flavonoídicos estão apresentadas na Figura 2, do qual fazem parte os ácidos fenólicos caracterizados pelas estruturas dos ácidos hidroxibenzoicos e dos ácidos hidroxicinâmicos.

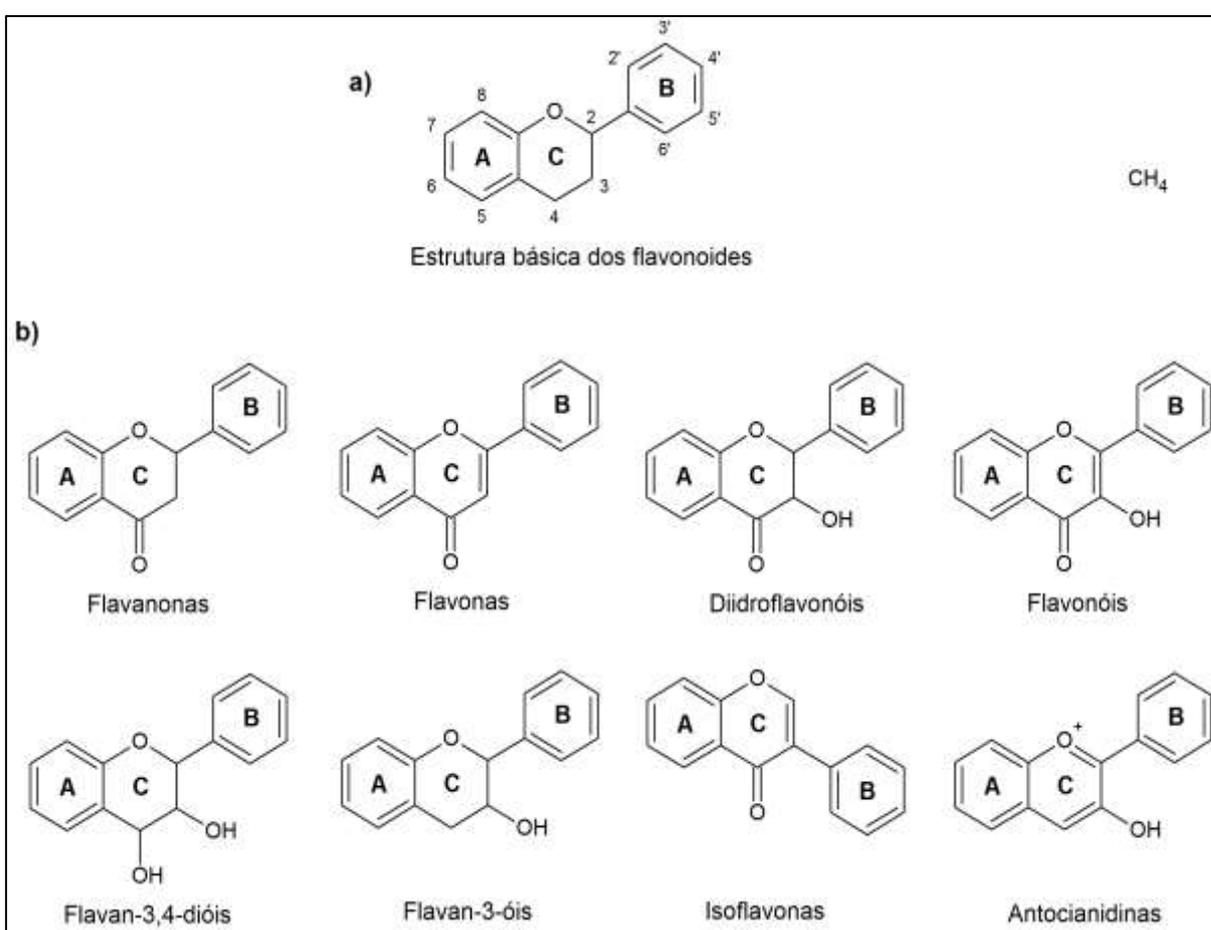
Figura 2 – Compostos fenólicos a) Estrutura básica de um composto fenólico não flavonoídico, b) Estruturas dos ácidos fenólicos



Fonte: autoria própria (2018).

Os flavonoides são compostos orgânicos, encontrados normalmente em origem vegetal. Esse grupo apresenta cerca de 4000 polifenóis e, de acordo com as diferenças nos grupos funcionais e suas posições relativas do esqueleto de 15 carbonos (agliconas), os flavonoides podem ser classificados em vários subgrupos (SHARMA e JANMEDA, 2017), alguns destes representados na Figura 3.

Figura 3 – Flavonoides a) Estrutura básica dos flavonoides composta por dois anéis aromáticos (A e B) e um anel intermediário (C), b) Estado de oxidação e padrão de substituição do anel C nos subgrupos de flavonoides

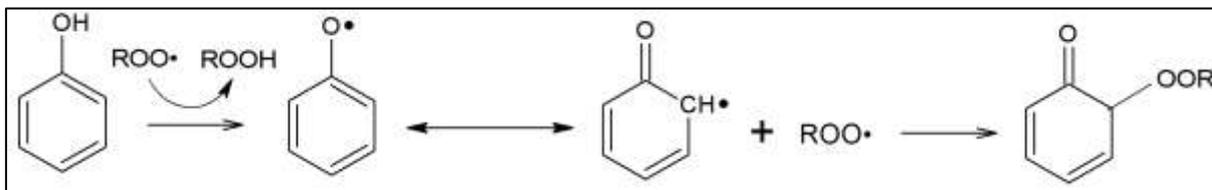


Fonte: adaptado de Merlin (2017, p. 28).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos pode ser explicada pelas propriedades de oxirredução, que podem desempenhar um importante papel na absorção e neutralização de radicais livres. Segundo Deng, Cheng e Yang (2011), o fenol é um ótimo doador de átomos de hidrogênio e de elétrons. Sua reação com uma espécie reativa produz um radical intermediário estável devido à ressonância em torno do anel aromático (MERLIN, 2017). De acordo com Decker (2002), o

radical fenólico estável ainda pode sofrer reações adicionais com outras espécies reativas, eliminando-as do sistema (Figura 4).

Figura 4 – Reação entre o composto fenólico e um radical livre



Fonte: adaptado de Decker (2002, cap. 16).

Sen et al. (2010) salientam que os antioxidantes oriundos de fontes naturais apresentam pouco ou nenhum efeito colateral para o uso na medicina preventiva e na indústria alimentícia, diferenciando-se dos antioxidantes sintéticos que, de acordo com Deng, Cheng e Yang (2011), podem acumular no organismo e resultar em danos no fígado e na geração de tumores. Em função disso, atualmente os antioxidantes naturais estão sendo largamente estudados como uma alternativa aos antioxidantes sintéticos.

3.4 ESTUDO BIOGUIADO PELA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

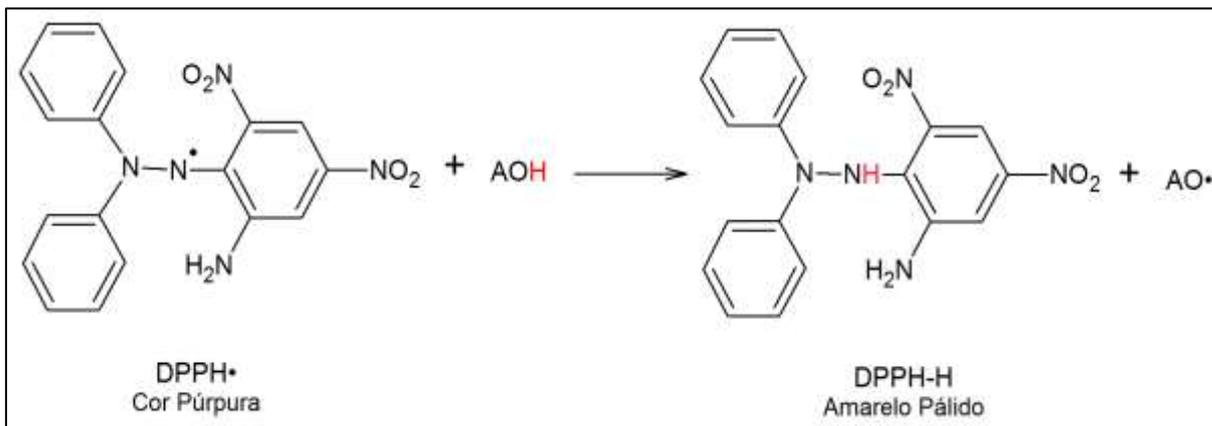
Existem diferentes tipos de radicais livres que podem estar presentes e atuando de diversas maneiras em um organismo vivo. Em função disso, diversos métodos podem ser utilizados para determinar a atividade antioxidante *in vitro* de substâncias bioativas (ALVES et al., 2010), de forma a abranger os diferentes mecanismos de interação entre antioxidantes e radicais livres. Neste estudo, os métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico e suas frações seguem descritos.

3.4.1 Capacidade antioxidante frente ao radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O DPPH é um radical sintético relativamente estável que apresenta um elétron desemparelhado na sua estrutura. A solução alcoólica desse radical apresenta coloração púrpura, com uma banda de absorção máxima característica

em 517 nm. O método consiste na redução do DPPH• à hidrazina por um composto antirradicalar (Figura 5).

Figura 5 – Reação de redução do radical DPPH por um composto antioxidante AOH



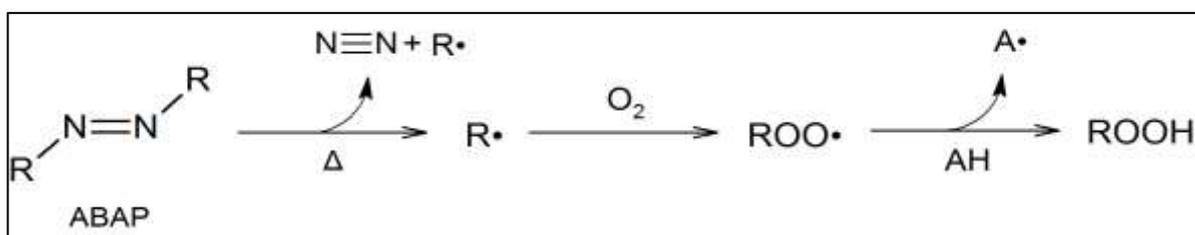
Fonte: adaptado de Oliveira (2011, p. 28).

A reação é caracterizada pela descoloração da solução de DPPH• para amarelo pálido pela redução do radical, impedindo a absorção característica em 517 nm (OLIVEIRA, 2011), reduzindo a leitura da absorção.

3.4.2 Capacidade antioxidante frente a radicais oxigenados (ORAC)

O método ORAC (do inglês: *oxygen radical absorbance capacity*) é um ensaio baseado na reação dos radicais peroxila (ROO) com um composto fluorescente, formando produtos não fluorescentes (OLIVEIRA, 2011). O método consiste na iniciação da peroxidação lipídica a partir da produção de radicais peroxila hidrossolúveis pela decomposição térmica do hidrocloreto de 2,2'-azo-bis-(2-amidinopropila) (ABAP), como apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Reação de um composto antirradical AH com radicais peroxila gerados na decomposição térmica do ABAP



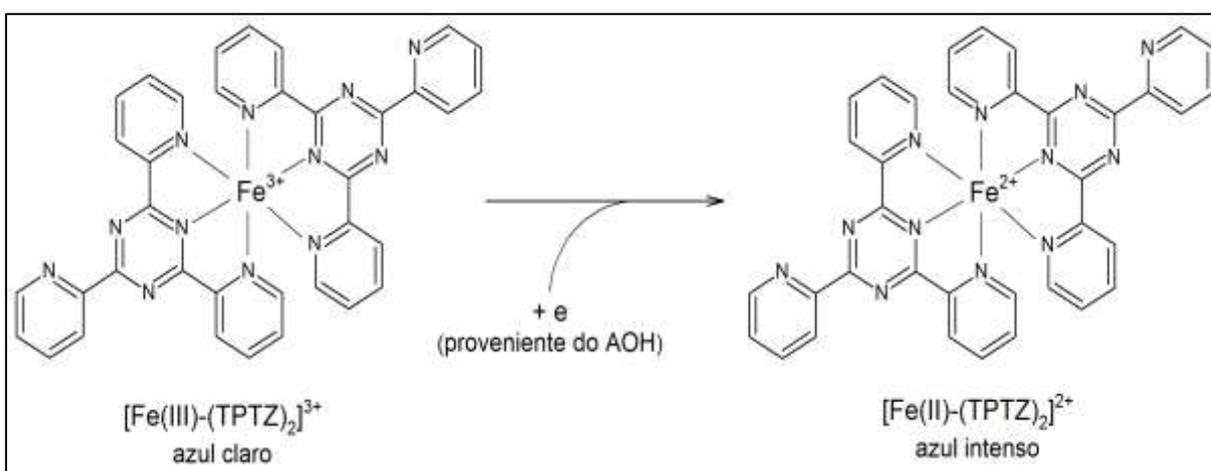
Fonte: adaptado de Oliveira (2011, p. 25).

A medida antioxidante é caracterizada pela variação da intensidade da fluorescência a partir da adição de um composto antirradicalar até seu consumo total, em comprimentos de onda característicos de excitação e emissão.

3.4.3 Capacidade antioxidante pela redução do Fe^{3+} a Fe^{2+}

O ensaio da capacidade de redução do íon ferro, FRAP (do inglês *Ferric Reducing Antioxidant Power*) é baseado na produção do complexo ferroso tripiridiltriazina (Fe^{2+} - TPTZ), através da redução do complexo ferritripiridiltriazina (Fe^{3+} - TPTZ) em meio ácido pelas substâncias antioxidantes presentes (Figura 7), apresentando variação na intensidade da cor de azul claro para azul intenso.

Figura 7 – Reação de oxirredução envolvida no ensaio de FRAP



Fonte: adaptado de Karling (2017, p. 35).

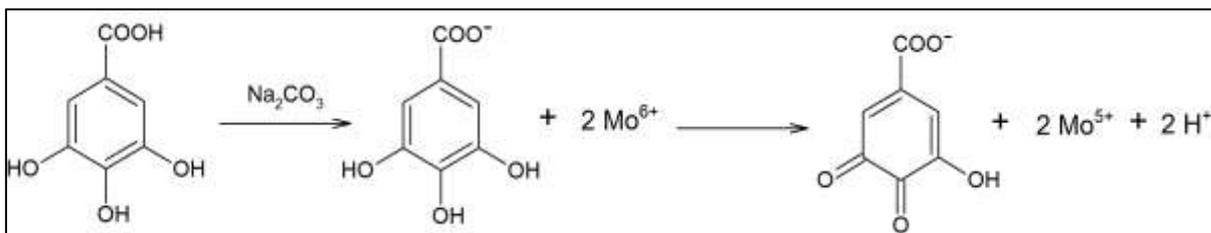
Esse método colorimétrico é bastante utilizado associado a outros ensaios antioxidantes (OLDONI, 2010), pois a reação de redução pode ser causada por outras substâncias da matriz em estudo, além disso, nem todos os compostos antioxidantes têm a capacidade de reduzir o ferro.

3.4.4 Teor de compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu

O método é baseado na reação dos fenóis com o reagente de Folin-Ciocalteu, que é a mistura de ácidos de molibdênio e tungstênio, na qual o Mo^{6+} apresenta a

cor amarela característica da solução (OLIVEIRA, 2011). Em meio básico ocorre a desprotonação dos compostos fenólicos, formando os ânions fenolatos. Estes reagem com o reagente de Folin, reduzindo o molibdênio para o estado de oxidação V e mudando a cor do meio reacional de amarela para azul (Figura 8).

Figura 8 – Reação de um composto antioxidante (ácido gálico) com molibdênio VI, formando o molibdênio V



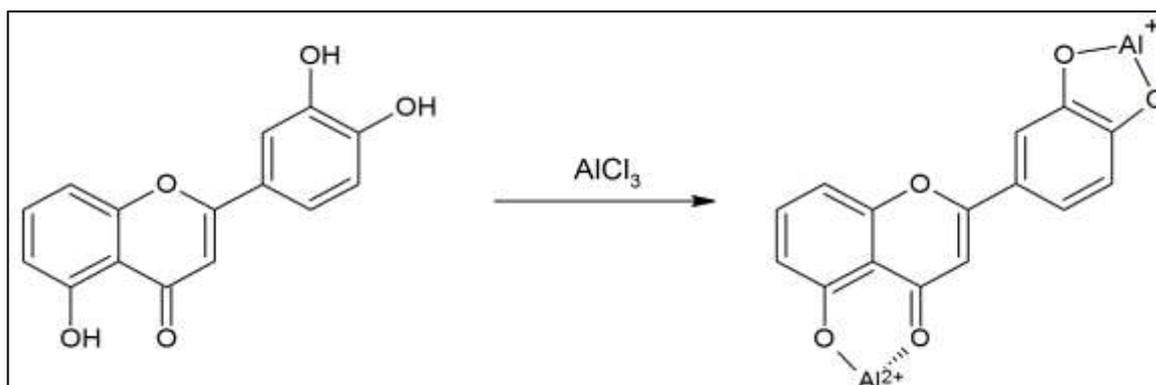
Fonte: adaptado de Oliveira (2011, p. 27).

Na presença de agentes redutores, como os ácidos fenólicos, são formados os complexos molibdênio-tungstênio azuis [(PMoW₁₁O₄)], que absorvem na região do visível, permitindo assim a quantificação do teor de compostos fenólicos.

3.4.5 Teor de flavonoides totais

Para a quantificação de flavonoides, método colorimétrico consiste basicamente na formação de um complexo de Al^{3+} com os grupos carbonila e hidroxila dos flavonoides (Figura 9), causando um deslocamento batocrômico das bandas de absorção dos flavonoides, ou seja, deslocando a absorção para um comprimento de onda maior (ÁSSIMOS, 2014).

Figura 9 – Reação de formação de um complexo entre um flavonoide e Al (III)



Fonte: adaptado de Ássimos (2014, p. 43).

O método evita a interferência de outras substâncias fenólicas na quantificação dos flavonoides, porém, de acordo com Marghitas et al. (2009), os valores são normalmente subestimados, pois o alumínio reage melhor com flavonoides dos grupos flavonas e flavonóis, do que com os demais tipos de flavonoides.

3.5 ESTUDO BIOGUIADO PELA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS

A identificação e quantificação de substâncias bioativas em matrizes complexas como as de plantas, normalmente exigem a aplicação de técnicas cromatográficas (SIMÕES et al., 2017). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica capaz de separar os compostos de misturas bastante complexas, de acordo com a afinidade química de cada molécula, bem como a análise quantitativa destes com alta resolução, eficiência e detectabilidade (COLLINS et al., 1997).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 FRACIONAMENTO

4.1.1 Folhas de *S. malaccense*

As amostras das folhas de Jambo foram coletadas em maio de 2017, na cidade de Jacupiranga – São Paulo, região sudeste do Brasil (coordenadas geográficas: 24° 42' 12,9" S e -48° 00' 24,3" O). Após a coleta, as folhas foram secas a 40 °C, separadas, trituradas em moinho de facas e armazenadas sob refrigeração (-6 °C). A planta foi catalogada (HPB 1173) e depositada no Herbário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (Pato Branco – PR, Brasil)

4.1.2 Extrato hidroalcoólico de Jambo (EHJ)

A extração das folhas de *S. malaccense* foi preparada a partir da otimização para esta matriz, realizada anteriormente pelo grupo de pesquisa. O método consistiu na mistura de 150 g de folhas trituradas a 1,875 L de solvente água:etanol (60:40 v/v). A mistura extratora foi submetida a aquecimento em banho termostatizado a 80 °C, por 45 minutos e, ao final, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo para retirada do solvente e em liofilizador para retirada da água.

4.1.3 Extração sólido-líquido

A partir do EHJ liofilizado, 30 g foram submetidas ao fracionamento por extração sólido-líquido, permanecendo sob agitação constante (130 rpm), em temperatura ambiente, de 3 a 5 dias com cada solvente, trocados diariamente. Utilizando solventes de polaridade crescente, foram geradas seis frações: hexano (Fr-Hex), diclorometano (Fr-CH₂Cl₂), acetato de etila (Fr-EtOAc), acetona (Fr-Ace), etanol (Fr-EtOH) e etanol:água (40:60 v/v) (Fr-EtOH:H₂O). As frações foram concentradas e armazenadas sob refrigeração (-6 °C).

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO EHJ E FRAÇÕES

4.2.1 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical DPPH

A metodologia selecionada para a determinação da atividade sequestrante do DPPH• seguiu o método descrito por Brand-Williams et al. (1995), com algumas modificações. A reação consistiu na adição de 500 µL de amostra, 3,0 mL de etanol:água 80:20 v/v e 300 µL do radical sintético DPPH (0,5 mmol L⁻¹, em etanol). A mistura foi armazenada por 45 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm, utilizando como branco o etanol. Os resultados foram expressos em µmol equivalente de trolox por g de extrato ou fração (µmol ET g⁻¹).

4.2.2 Atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical peroxila (ROO•)

O ensaio da capacidade de sequestro do ROO• foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Chisté et al. (2011). Em uma microplaca foram transferidos 30 µL de amostra, 60 µL de fluoresceína (508,25 nmol L⁻¹) e 110 µL de solução de ABAP (76 mmol L⁻¹). Utilizou-se tampão fosfato de potássio (75 mmol L⁻¹, pH 7,4) para diluir a amostra, também utilizado como branco. A absorbância foi medida a cada minuto durante 2 h a 485 e 528 nm, comprimentos de onda de excitação e emissão, respectivamente, usando um leitor de microplacas (*Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, CA, EUA*). O Trolox foi utilizado como padrão em concentrações que variaram de 12,5 a 400 µmol L⁻¹ e os resultados foram expressos em µmol equivalente de trolox (ET) por g de extrato ou fração (µmol ET g⁻¹).

4.2.3 Atividade antioxidante pela capacidade de redução do ferro (FRAP)

Este ensaio foi baseado na metodologia de Benzie e Strain (1996). O reagente de FRAP foi preparado no momento da análise a partir da mistura de 25 mL de tampão acetato (300 mmol L⁻¹, pH 3,6), 2,5 mL de solução do complexo Fe³⁺ - TPTZ (TPTZ 10 mmol L⁻¹ em HCl 40 mmol L⁻¹) e 2,5 mL de FeCl₃ (20 mmol L⁻¹ em água). Uma alíquota de 100 µL das amostras foi adicionada a 3,0 mL do reagente

FRAP. A mistura permaneceu incubada por 45 minutos a 37 °C em banho termostaticado. As absorbâncias foram medidas em espectrofotômetro a 593 nm, tendo como branco o reagente FRAP. Os resultados foram expressos em μmol de Fe^{2+} por g de extrato ou fração.

4.2.4 Determinação do teor de compostos fenólicos totais (CFT)

O teor de compostos fenólicos totais foi avaliado pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton et al. (1999). Foram adicionados 500 μL da amostra em 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu (solução 10% em água). A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos e, em seguida, adicionou-se 2 mL de carbonato de sódio 4%. A mistura de reação permaneceu em repouso por 2 horas, ao abrigo da luz. Uma amostra em branco foi conduzida nas mesmas condições, apenas substituindo-se o volume de amostra por igual volume de água destilada. As absorbâncias foram obtidas em espectrofotômetro a 740 nm e os resultados expressos em miligrama equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato ou fração (mg EAG g^{-1}).

4.2.5 Determinação do teor de flavonoides

A quantificação do teor de flavonoides totais presentes no extrato e frações de *S. malaccense* foi baseada no método colorimétrico descrito por Park et al. (1995). O método consistiu no preparo de duas séries de tubos de ensaio contendo 500 μL da amostra e identificados pela adição ou não de solução salina de alumínio. Na série identificada para receber alumínio, foram adicionados 4,3 mL de etanol:água (80:20 v/v) e 0,1 mL de cloreto de alumínio 10%. Na série que não recebeu o sal metálico, foram adicionados 4,4 mL etanol:água (80:20 v/v). Em todos os tubos de ensaio adicionou-se 100 μL de acetato de potássio (1 mol L^{-1}). Uma amostra em branco foi preparada com 4,9 mL de etanol:água (80:20 v/v) e 100 μL de acetato de potássio. A reação foi incubada ao abrigo da luz, por 40 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro a 415 nm. O resultado foi expresso em mg equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato ou fração (mg EQ g^{-1}).

4.2.6 Análise em CLAE-DAD-FL

A identificação e quantificação de compostos fenólicos foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo e fluorescência (CLAE-DAD-FL), em cromatógrafo Varian 920-LC, com coluna Agilent Microsorb-MV 100 C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm de tamanho de partícula).

O método cromatográfico foi anteriormente otimizado pelo grupo de pesquisa, para separação de compostos fenólicos especificamente na matriz de folhas de *S. malaccense*. As condições do método estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Condições cromatográficas

Volume de injeção	10 µL (25 mg de amostra mL ⁻¹)
Fase móvel	(A) H ₂ O:H ₃ PO ₄ (99,9:0,1 v/v) (B) C ₂ H ₃ N (100%)
Gradiente	0 – 15 min: 5 – 15% B 15 – 25 min: 15 – 25% B 25 – 35 min: 25 – 40% B 35 – 38 min: 40 – 95% B 38 – 42 min: 95% B 42 – 46 min: 95 – 5% B
Fluxo	1 mL min ⁻¹
Temperatura da coluna	30 °C

Fonte: dados da pesquisa (2018).

Os padrões fenólicos e flavonoides utilizados foram os ácidos gálico, cafeico, vanílico, sirínico, cumárico, ferrúlico e *trans*-cinâmico, além de catequina, epicatequina, miricitrina, rutina, miricetina, quercetina e canferol.

A identificação foi feita pela comparação do espectro de absorção na região ultravioleta e o tempo de retenção (t_R) dos padrões analíticos citado. A quantificação dos teores de ácidos fenólicos e flavonoides no EHJ e nas frações foi calculada utilizando as curvas de calibração obtidas para cada padrão, bem como a área de cada sinal analítico em concentrações de 50, 30 18, 12 e 6 µg mL⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 EXTRAÇÃO SÓLIDO-LÍQUIDO

O fracionamento foi realizado pelo processo de extração sólido-líquido a partir do extrato hidroalcoólico de jambo (EHJ) liofilizado das folhas de *S. malaccense*. Foram obtidas seis frações a partir dos solventes hexano (Fr-Hex), diclorometano Fr-CH₂Cl₂, acetato de etila (Fr-EtOAc), acetona (Fr-Ace), etanol (Fr-EtOH) e etanol:água 40:60 v/v (Fr-EtOH:H₂O). A Tabela 2 apresenta o rendimento do extrato e das frações obtidos a partir de uma massa inicial de 150 g de folhas de *S. malaccense* trituradas. A fração obtida a partir do solvente hexano apresentou um rendimento muito baixo e por isso não foi avaliada.

Tabela 2 – Rendimento do extrato e frações das folhas de *S. malaccense*

Amostra	Massa (g)	% (m.i. de folhas de <i>S. malaccense</i>)
EHJ	30,000	20,0
Fr-CH ₂ Cl ₂	0,0553	0,04
Fr-EtOAc	0,0619	0,04
Fr-Ace	2,2829	1,52
Fr-EtOH	11,519	7,68
Fr- EtOH:H ₂ O	4,8093	3,21

Fonte: dados da pesquisa (2018). Notas: m.i. massa inicial.

O rendimento de cada fração variou de acordo com o solvente em que a amostra foi extraída. Observa-se que a Fr-EtOH apresentou um rendimento de 7,68%, o qual foi elevado quando comparado com os solventes de menor polaridade, seguido pela Fr-EtOH:H₂O com rendimento de 3,21%. Arumugam et al. (2014) obtiveram um rendimento de 8,87% na extração de folhas de Jambo com etanol, porém a 37 °C, diferente das condições utilizadas neste estudo. Pode-se sugerir que os compostos com característica apolar não foram muito solúveis no

EHJ e, portanto, não estavam disponíveis para serem extraídos pelos solventes de menor polaridade como hexano, diclorometano e acetato de etila.

5.2 ESTUDO BIOGUIADO

Neste trabalho, o estudo bioguiado do extrato e frações foi realizado a partir das análises de atividade antioxidante DPPH•, ROO• e FRAP. O teor de compostos fenólicos foi avaliado por métodos *in vitro*, e na sequência, foi realizada a determinação dos compostos fenólicos individuais por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência.

5.2.1 Determinação da atividade antioxidante *in vitro*

Os resultados obtidos para a capacidade antioxidante do extrato e frações das folhas de *S. malaccense* estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Atividade antioxidante (DPPH•, ROO• e FRAP), teor de compostos fenólicos e flavonoides do extrato e frações do *S. malaccense*

Amostra	DPPH• ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	ROO• ($\mu\text{mol ET g}^{-1}$)	FRAP ($\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{g}^{-1}$)	CFT (mg EAG g^{-1})	Flavonoides (mg EQ g^{-1})
EHJ	3159 \pm 435 ^{ab}	1224 \pm 69,9 ^c	7490 \pm 141 ^c	355,5 \pm 0,86 ^a	18,40 \pm 1,32 ^e
Fr-CH ₂ Cl ₂	157,0 \pm 14,4 ^e	181,6 \pm 74,5 ^d	2145 \pm 128 ^e	121,2 \pm 2,84 ^e	n.d.
Fr-EtOAc	881,1 \pm 10,9 ^d	4785 \pm 363 ^a	2990 \pm 33,1 ^e	197,4 \pm 1,55 ^c	498,3 \pm 17,7 ^b
Fr-Ace	2816 \pm 152 ^b	3642 \pm 597 ^b	9142 \pm 291 ^b	349,3 \pm 2,17 ^a	581,7 \pm 14,4 ^a
Fr-EtOH	3412 \pm 146 ^a	785,1 \pm 20,5 ^{cd}	17173 \pm 300 ^a	251,3 \pm 5,18 ^b	340,7 \pm 19,7 ^c
Fr- EtOH:H ₂ O	1470 \pm 44,2 ^c	551,6 \pm 66,8 ^{cd}	4948 \pm 130 ^d	129,12 \pm 1,72 ^d	227,5 \pm 36,1 ^d

Fonte: dados da pesquisa (2018). Notas: n.d. não detectado; ET equivalente de trolox; EAG equivalente de ácido gálico; EQ equivalente de quercetina; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$).

A atividade antioxidante avaliada pela capacidade de sequestro dos radicais DPPH e ROO apresentou os melhores resultados para as frações obtidas a partir de etanol, acetona e acetato de etila. Os resultados para DPPH• variaram entre 3412 e 157,0 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ para as Fr-EtOH e Fr-CH₂Cl₂, respectivamente, sendo a Fr-EtOH mais eficiente em sequestrar radicais DPPH que o EHJ, enquanto a fração em acetona (2816 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$) não apresentou variação significativa. A maior capacidade de sequestro dos radicais peroxila foi observada na Fr-EtOAc (4785 $\mu\text{mol ET g}^{-1}$), porém o rendimento da fração foi muito baixo (0,04%), o que dificulta o isolamento de compostos presentes nessa fração. A ação antioxidante frente ao ROO• indica a atividade biológica do *S. malaccense*, pois segundo Shahidi e Zhong (2015), radicais oxigenados são as principais espécies encontradas em sistemas biológicos.

Avaliando o poder antioxidante redutor de ferro (FRAP) das amostras, observa-se que as frações obtidas utilizando etanol e acetona apresentaram maiores potenciais de redução de íons Fe³⁺, com valores de 17173 e 9142 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$, respectivamente, ambas superiores ao EHJ (7490 $\mu\text{mol Fe}^{2+} \text{ g}^{-1}$). Batista et al. (2016) quantificaram FRAP em casca, semente e folhas de *S. malaccense* coletadas no Brasil e concluíram que as maiores atividades foram obtidas no extrato metanólico das folhas, com teor de 1100 $\mu\text{mol de Trolox g}^{-1}$, inferiores aos obtidos neste estudo.

.As frações Fr-CH₂Cl₂ e Fr-Ace apresentaram teores de compostos fenólicos de 121,2 e 349,3 mg EAG g^{-1} , respectivamente, sem diferença estatística entre os grupos Fr-Ace e EHJ. Arumugam et al. (2014) obtiveram 125,81 mg de EAG g^{-1} quando estudaram o extrato etanólico de folhas de *S. malaccense* da Malásia. O teor de flavonoides também foi maior na fração acetona (581,7 mg EQ g^{-1}), seguido pela fração acetato de etila (498,3 mg EQ g^{-1}). A Fr-CH₂Cl₂ não foi compatível com o meio reacional da análise, provavelmente em função da sua polaridade, portanto o teor de flavonoides não pode ser determinado nessa fração.

A partir dos resultados dos testes *in vitro*, observa-se que as frações obtidas a partir de solventes orgânicos de menores polaridades, como hexano e diclorometano, apresentaram baixo potencial de extrair compostos bioativos, enquanto solventes com polaridades médias a altas como acetona e etanol são mais eficientes em extrair compostos fenólicos com atividade antioxidante. Estes resultados podem ser indicativos da presença de flavonoides com características mais polares e de flavonoides glicosilados, uma vez que esses compostos

apresentam maior afinidade com solventes polares.

5.2.2 Identificação e quantificação de compostos fenólicos por CLAE-DAD-FL

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência foi empregada para detectar e quantificar compostos fenólicos presentes no extrato e frações obtidos das folhas de *S. malaccense*. O método utilizado foi otimizado para separação de 14 compostos fenólicos (Tabela 4), dos quais 7 compostos pertencem ao grupo de ácidos fenólicos (os ácidos gálico, vanílico, cafeico, siríngico, cumárico e ferúlico e *trans*-cinâmico) e os outros 7 compostos ao subgrupo dos flavonoides (catequina, epicatequina, miricitrina, rutina, miricetina, quercetina e canferol). As figuras de mérito do método cromatográfico foram obtidas para os padrões de compostos fenólicos analisados e estão apresentadas na Tabela 4. O limite de detecção (LD) variou de 0,015 a 0,495 mg L⁻¹, enquanto o limite de quantificação (LQ) apresentou valores entre 0,047 e 1,5 mg L⁻¹.

Tabela 4 – Dados analíticos obtidos pela técnica de CLAE para compostos fenólicos em folhas de *S. malaccense*

Compostos Fenólicos	t _R (min)	Absorção no UV (nm)	Curva de Calibração	R ²	LD	LQ
Ácido gálico	4,3	269	y = 0,1624x - 0,0101	0,990	0,099	0,300
Catequina	10,2	278	y = 116,22x - 17,789	0,996	0,495	1,500
Ácido vanílico	11,3	260; 290	y = 0,3998x - 0,4009	0,984	0,110	0,332
Ácido cafeico	12,1	322	y = 0,3498x + 0,0193	0,980	0,072	0,216
Ácido siríngico	13,2	275	y = 0,5010x - 0,2231	0,988	0,057	0,173
Epicatequina	14,6	278	y = 90,594x - 5,9755	0,990	0,015	0,047
Ácido Cumárico	16,4	309	y = 0,5353x + 0,1693	0,974	0,074	0,223
Ácido ferúlico	18,8	321	y = 0,3375x - 0,1814	0,989	0,020	0,060
Miricitrina	21,5	257; 350	y = 0,2064x + 0,4520	0,994	0,046	0,138
Rutina	22,3	255; 356	y = 0,2131x - 0,1253	0,977	0,094	0,028
Miricetina	25,9	252; 371	y = 0,6169x + 0,7876	0,991	0,184	0,553

Ácido <i>trans</i> -cinâmico	29,1	216; 276	$y = 1,0808x - 2,0975$	0,990	0,013	0,039
Quercetina	30,0	254; 371	$y = 0,4339x + 0,2532$	0,982	0,028	0,093
Canferol	34,0	262; 366	$y = 0,4711x + 0,0892$	0,979	0,072	0,216

Fonte: dados da pesquisa (2018). Notas: t_R tempo de retenção; R^2 coeficiente de determinação; LD limite de detecção (mg L^{-1}); LQ limite de quantificação (mg L^{-1}).

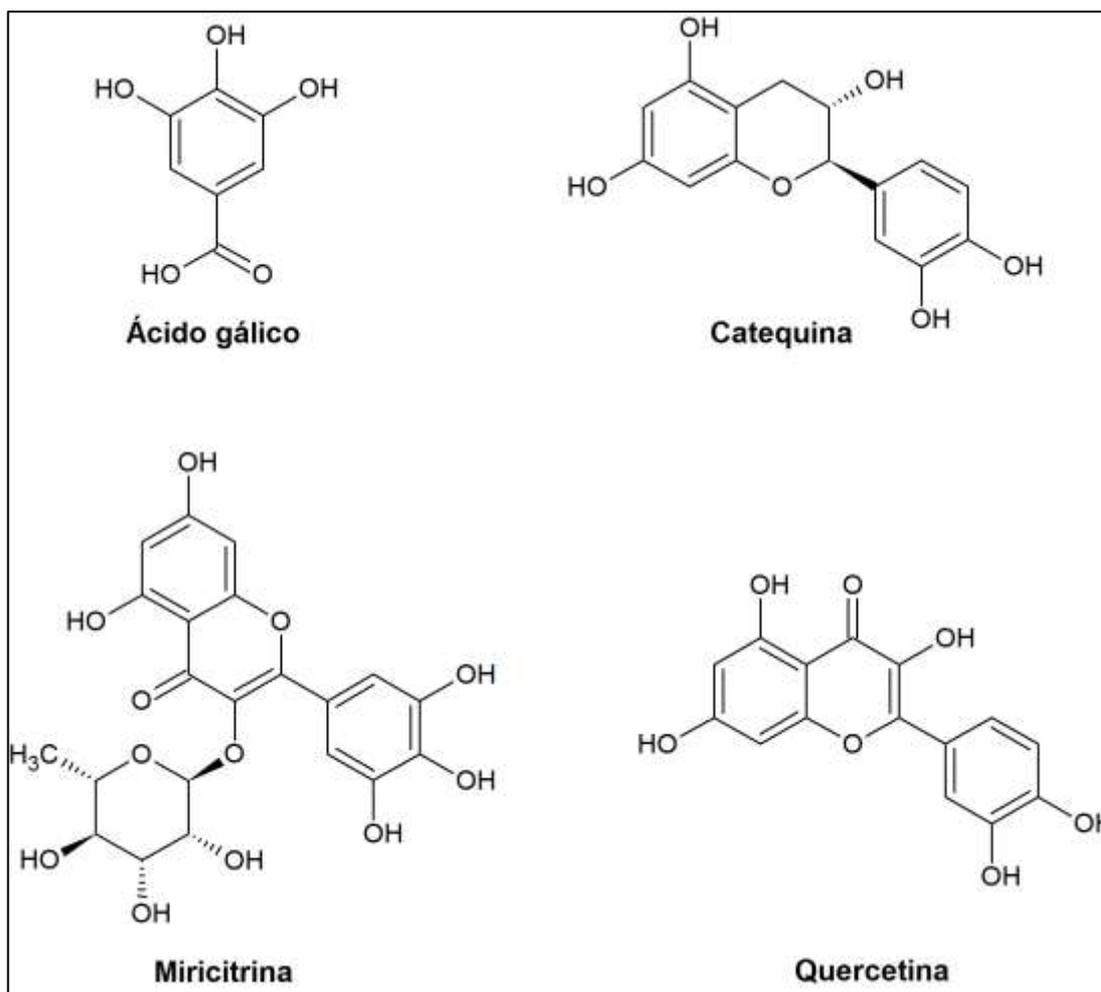
A eficiência da extração foi avaliada pela detecção e quantificação das substâncias bioativas presentes no extrato e nas frações do *S. malaccense* (Tabela 5 e Figura 10). Na Fr-Ace foram identificados ácido gálico, catequina, miricitrina e quercetina, com teores de 3,57; 0,84; 14,1 e 0,88 mg de composto g^{-1} de fração, respectivamente, na qual pode-se destacar o elevado teor de miricitrina. A Fr-EtOAc também apresentou teor de miricitrina elevado (11,1 mg g^{-1}), além de concentrar a maior quantidade de ácido gálico (7,46 mg g^{-1}), porém os flavonoides catequina e quercetina não puderam ser quantificados. Ambas as frações foram capazes de concentrar os compostos fenólicos em maior quantidade que o extrato hidroalcoólico das folhas de *S. malaccense*.

Tabela 5 – Concentração de compostos fenólicos no extrato e frações das folhas de *S. malaccense*

Amostra	Ácido gálico	Catequina	Miricitrina	Quercetina
(mg de composto g^{-1} de extrato ou fração)				
ECJ	$0,89^c \pm 0,02$	$0,73^a \pm 0,08$	$3,38^c \pm 0,06$	< LQ
Fr- CH_2Cl_2	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
Fr-EtOAc	$7,46^a \pm 0,19$	< LQ	$11,1^b \pm 0,34$	< LQ
Fr-Ace	$3,57^b \pm 0,32$	$0,84^a \pm 0,19$	$14,1^a \pm 1,04$	$0,88 \pm 0,07$
Fr-EtOH	$1,23^c \pm 0,15$	$0,43^b \pm 0,05$	$2,75^c \pm 0,28$	< LQ
Fr- EtOH:H ₂ O	$3,66^b \pm 0,04$	< LQ	< LQ	< LQ

Fonte: dados da pesquisa (2018). Notas: < LQ abaixo do limite de quantificação; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as amostras pelo teste *Tukey* ($p < 0,05$).

Figura 10 – Estruturas dos compostos fenólicos identificados no extrato e frações das folhas *S. malaccense*: ácido gálico, catequina, miricitrina e quercetina



Fonte: adaptado de PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>).

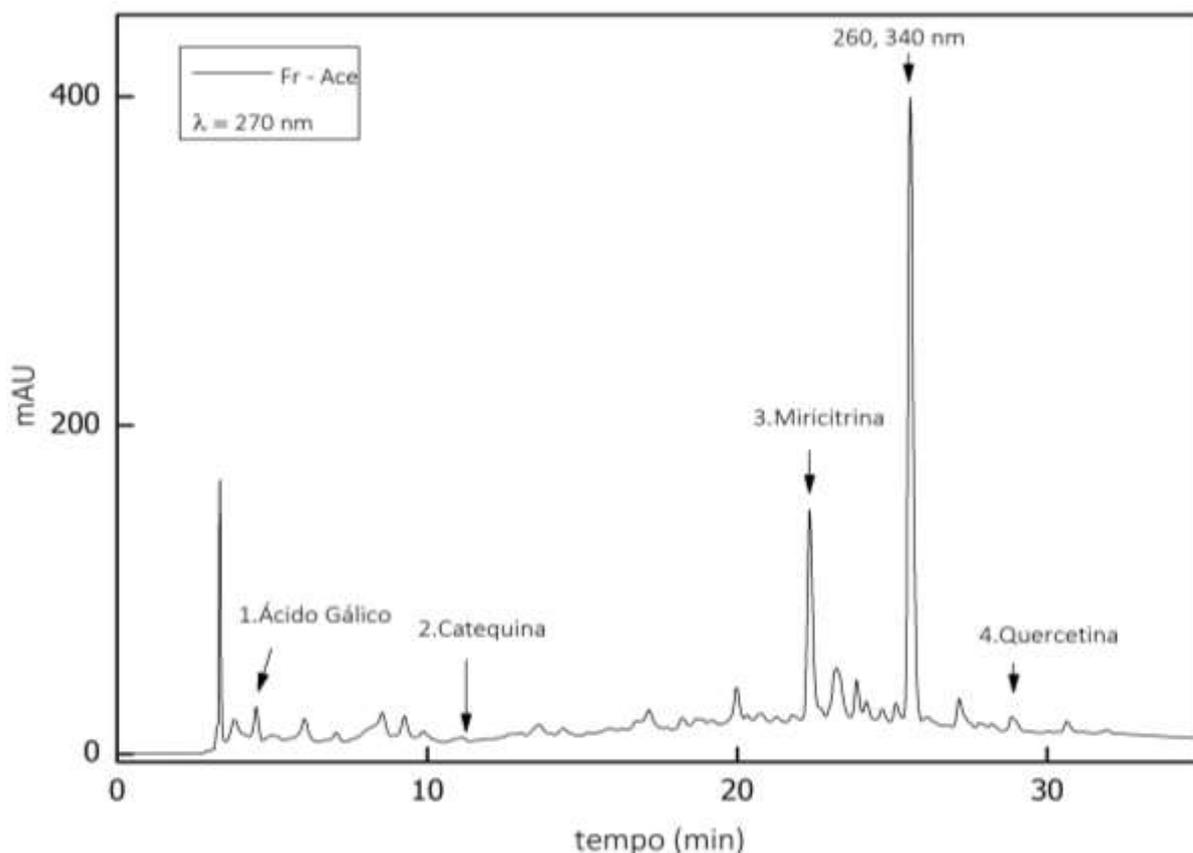
Diversos estudos relataram a presença de compostos fenólicos em diferentes partes de plantas do gênero *Syzygium*. Tian et al. (2011) identificaram derivados de quercetina e miricetina, como a micromicina na fração em acetato de etila de folhas de *Syzygium forrestii*. Hossain et al. (2016) identificaram e quantificaram quercetina e hidrato de catequina, 0,69 e 0,99 mg g⁻¹, respectivamente, em extrato etanólico de *Syzygium jambos*. Estudando também o *S. jambos*, Haque et al. (2015) relatou sobre a boa capacidade de eliminação dos radicais livres por frações do extrato metanólico das cascas do caule da planta. Kuo et al. (2004) avaliaram os compostos bioativos em folhas de *Syzygium samarangense* e identificaram a quercetina e a miricitrina entre os flavonoides isolados do extrato em acetona.

Arumugam et al. (2014) e Batista et al. (2016) relataram a presença de flavonoides em diferentes extratos do *S. malaccense*. Esses estudos mais recentes com as folhas de *Syzygium malaccense* associaram propriedades biológicas importantes à planta, como atividade antioxidante e antiglicêmica em extrato etanólico destas (ARUMUGAM et al., 2014), a partir da identificação de substâncias

derivadas dos compostos fenólicos ácido gálico e miricetina. Batista et al. (2016), também apresentou elevada atividade antioxidante para extrato metanólico das folhas de *S. malaccense*, identificando por cromatografia compostos como catequina e quercetina.

Flavonoides glicosilados são compostos derivados dos flavonoides e apresentam hidroxilas substituídas em sua estrutura flavonoídica, os quais também contribuem para a ação antioxidante de matrizes de origem vegetal. O flavonoide glicosilado miricitrina foi identificado por Arumugam et al. (2014), como o composto majoritário no extrato etanólico das folhas de *S. malaccense* coletadas na Malásia, enquanto os resultados obtidos neste trabalho determinam a presença da miricitrina em grande intensidade, mas também sugerem um sinal majoritário em 25,59 min com absorvância característica de 260 e 340 nm (Figura 11), bem como outros sinais bastante evidentes que não puderam ser identificados devido a falta de padrões analíticos correspondentes.

Figura 11 – Cromatograma obtido por CLAE-DAD-FL para a Fr-Ace das folhas de *S. malaccense*, apresentando os sinais de ácido gálico (1), catequina (2), miricitrina (3), quercetina (4) e o sinal majoritário desconhecido (260, 340 nm)



Fonte: dados da pesquisa (2018).

A miricitrina (miricetina-3-O-ramnosídeo) é um flavonoide glicosilado derivado da miricetina e pertence ao subgrupo dos flavonóis. A estrutura química da miricitrina apresenta o maior número de hidroxilas substituídas quando comparada com as estruturas dos demais compostos identificados (Figura 10). De acordo com estudo realizado por Alves et al. (2010), a atividade antioxidante é proporcional ao número de substituintes OH na estrutura da molécula. Dessa forma, é possível atribuir principalmente ao flavonol miricitrina a elevada capacidade antioxidante das frações, considerando ainda que esse composto apresentou elevados teores nas frações mais bioativas.

Estudos que utilizaram a miricitrina atribuíram a esse flavonoide ação anti-inflamatória (SCHWANKE, 2012; COUTINHO et al., 2009) e avaliando a atividade antiglicêmica de extrato com a miricitrina como composto majoritário, Arumugam et al. (2014) obtiveram bons resultados na inibição de enzimas que hidrolisam carboidratos. Esses trabalhos associaram o estudo dessas atividades biológicas à determinação da atividade antioxidante da miricitrina, para determinar sua bioatividade.

Como observou-se nos estudos *in vitro*, a polaridade do solvente utilizado na extração sólido-líquido apresentou forte influência na composição das frações. Os maiores teores de compostos fenólicos foram identificados nas frações com solventes de média a alta polaridade, como a acetona e o etanol. A partir dos resultados deste estudo bio guiado, a Fr-Ace (Figura 11) pode ser considerada a fração mais bioativa, ou seja, na qual os compostos fenólicos apresentaram maior afinidade química, sendo concentrados nessa fração.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo, foi possível verificar que solventes mais polares tiveram maior afinidade com os compostos bioativos presentes nas folhas de *S. malaccense*, os quais apresentaram características predominantemente polares, como os compostos fenólicos flavonoídicos miricitrina, quercetina e catequina, que foram identificados e quantificados com maior intensidade na fração em acetona. Além dessas substâncias, o ácido gálico e diversos sinais não identificados foram bastante evidentes, indicando a composição química rica e diferenciada do *S. malaccense*. A bioatividade avaliada pela capacidade antioxidante e pela concentração de compostos fenólicos, foi potencializada na fração acetona e também nas frações acetato de atila e etanol quando comparadas com a primeira extração hidroalcoólica, caracterizando o aumento da biodisponibilidade dos compostos de interesse. A partir desses resultados, verifica-se a importância da continuação do fracionamento e a aplicação de outras técnicas de separação, para que sejam obtidos compostos mais puros que possam ter sua bioatividade potencializada, além de demonstrarem que as folhas de *S. malaccense* são uma importante fonte de compostos fenólicos de interesse biológico, tantos de substâncias conhecidas, quanto de novos compostos que podem vir a ser identificados e aplicados como antioxidantes naturais nas indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. **Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos**. Química Nova, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010. SBQ. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010001000033&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 31/10/2018.

ANVISA. **Resolução da diretoria colegiada nº 26**. 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf.

ARUMUGAM, B.; MANAHARAN, T.; HENG, C. K.; KUPPUSAMY, U. R.; PALANISAMY, U. D. **Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of Syzygium malaccense**. LWT - Food Science and Technology, v. 59, p. 707–712, 2014. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.041>>.

ÁSSIMOS, A. A. **Avaliação da Concentração e dos Tipos de Flavonoides na Própolis Utilizando Métodos Quimiométricos de Classificação e Calibração**, 2014. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/SFSA-9LKH22/disserta__o_ariane__ssimos.pdf?sequence=1>. Acesso em: 1/11/2018.

AUGUSTA, I. M.; RESENDE, J. M.; BORGES, S. V.; MAIA, M. C. A.; COUTO, M. A. P. G. **Caracterização física e química da casca e polpa de jambo vermelho (Syzygium malaccensis, (L.) Merryl & Perry)**. Ciência e Tecnologia de Alimentos, v. 30, n. 4, p. 928–932, 2010.

BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; DE CÁSSIA GONÇALVES ALFENAS, R.; et al. **Estresse oxidativo**: Conceito, implicações e fatores modulatórios. Revista de Nutricao, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

BATISTA, Â. G.; DA SILVA, J. K.; BETIM CAZARIN, C. B.; et al. **Red-jambo (Syzygium malaccense)**: Bioactive compounds in fruits and leaves. LWT - Food Science and Technology, v. 76, p. 284–291, 2016.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. **The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”**: The FRAP Assay. Analytical Biochemistry, v. 239, n. 1, p. 70–76, 1996. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003269796902924>>.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. LWT - Food Science and Technology, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643895800085>>.

CASTRO, C.; MURA, F.; VALENZUELA, G.; et al. **Identification of phenolic compounds by HPLC-ESI-MS/MS and antioxidant activity from Chilean propolis**. Food Research International, v. 64, p. 873–879, 2014. Elsevier B.V. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.08.050>>.

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. **Antioxidantes dietéticos: Controvérsias e perspectivas**. Quimica Nova, v. 30, n. 2, p. 441–449, 2007.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; GOMES, A.; et al. **In vitro scavenging capacity of annatto seed extracts against reactive oxygen and nitrogen species**. Food Chemistry, v. 127, n. 2, p. 419–426, 2011.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 7^o ed. Campinas, SP, 1997.

COSTA, M. P. DA. **Estudo da Atividade Antioxidante de Frutas Tropicais Exóticas sobre Espécies Reativas de Oxigênio de importância Biológica em Ensaio Modelos**, 2010. Dissertação (mestrado) - Unesp, São Paulo. Disponível em: <<http://www2.fcfar.unesp.br/Home/Pos-graduacao/BiocienciaeBiotecnologiasAplicadasaFarmacia/MarcianoPiresdaCosta-ME.pdf>>.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. **Flavonoids: Potential therapeutic agents for the inflammatory process**. Revista Virtual de Química, v. 1, n. 3, p. 241–256, 2009. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20090024>>.

DECKER, E. A. Antioxidant Mechanism (cap 16). In: Akoh, C. C.; Min, D. B. (Orgs.); **Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology**. 2^o ed, p.1015, 2002. New York: Marcel Dekker, Inc. Disponível em: <<http://www.crcnetbase.com/doi/book/10.1201/9780203908815>>.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. **A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay**. Food Chemistry, v. 125, n. 4, p. 1430–1435, 2011. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814610012781>>. Acesso em: 31/10/2018.

ETHUR, L. Z.; JOBIM, J. C.; RITTER, J. G.; OLIVEIRA, G.; TRINDADE, B. S. **Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de itaquí - RS.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 13, n. 2, p. 121–128, 2011.

FERN, K. **Tropical Plants Database.** Disponível em: <tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Syzygium+malaccense>. Acesso em: 31/10/2018.

HAIDA, K. S.; BARON, Â.; HAIDA, K. S.; et al. **Phenolic compounds and antioxidant activity of two varieties of guava and rue.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde, v. 9, n. 28, p. 11–19, 2011.

HAQUE, M.; BEGUM, M.; HASAN, M.; et al. **Investigation of the Medicinal Potentials of Syzygium jambos (L.) Extract and Characterization of the Isolated Compounds.** American Journal of BioScience, v. 3, n. 2, p. 12, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencepublishinggroup.com/journal/paperinfo?journalid=219&doi=10.11648/j.ajbio.s.2015030201.13>>.

HOSSAIN, H.; RAHMAN, S. E.; AKBAR, P. N.; et al. **HPLC profiling, antioxidant and in vivo anti-inflammatory activity of the ethanol extract of Syzygium jambos available in Bangladesh.** BMC Research Notes, v. 9, n. 1, p. 191, 2016. Disponível em: <<http://bmcresnotes.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13104-016-2000-z>>. Acesso em: 18/11/2017.

KARLING, M. **Isolamento bioguiado de compostos com atividade antioxidante do coproduto bagaço de uva,** 2017. Dissertação (mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco - PR.

KUO, Y. C.; YANG, L. M.; LIN, L. C. **Isolation and immunomodulatory effect of flavonoids from Syzygium samarangense.** Planta Medica, v. 70, n. 12, p. 1237–1239, 2004.

MANDAL, S.; YADAV, S.; YADAV, S.; NEMA, R. K. **Antioxidants: A Review.** Journal of Chemical and Pharmaceutical Research, v. 1, n. 1, p. 102–104, 2009. Disponível em: <<https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20103251846>>. Acesso em: 31/10/2018.

MARGHITAS, L. A.; DEZMIREAN, D.; LASLO, L.; et al. **Validated method for estimation of total flavonoids in romanian propolis.** Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj-Napoca, 2007. Disponível em: <<http://journals.usamvcluj.ro/index.php/zootehnie/article/view/2220>>. Acesso em: 1/11/2018.

MELO, R. R. de; ARAÚJO, E. R. S. de; SILVA, A. A. L. da; RANDAU, K. P.; XIMENES, E. C. P. A.. **Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & I. M. Perry**. Revista Brasileira de Farmacognosia, p. 298–302, 2009.

MERLIN, N. **Isolamento bio guiado de compostos com atividade antioxidante das folhas de *Moringa oleifera***, 2017. Dissertação (mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco - PR.

OLDONI, T. L. C. **Prospecção e identificação de compostos bioativos de subprodutos agroindustriais**. 2010. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

OLDONI, T. L. C.; MELO, P. S.; MASSARIOLI, A. P.; et al. **Bioassay-guided isolation of proanthocyanidins with antioxidant activity from peanut (*Arachis hypogaea*) skin by combination of chromatography techniques**. Food Chemistry, v. 192, p. 306–312, 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615010092>>. Acesso em: 31/10/2018.

OLIVEIRA, D. M. DE; BASTOS, D. H. M. **Biodisponibilidade de ácidos fenólicos**. Química Nova, v. 34, n. 6, p. 1051–1056, 2011.

OLIVEIRA, S. de. **Determinação da capacidade antirradicalar de produtos naturais utilizando-se a quimiluminescência do luminol e ensaios fotométricos com radicais estáveis**, 2011. Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo - São Paulo.

PARK, Y. K., KOO, M. H., SATO, H. H., CONTADO, J. L. **Survey of some components of propolis which were collected by *Apis mellifera* in Brazil**. Instituto de Tecnologia do Paraná, 1995. Disponível em: <<http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/73929>>.

PHAM-HUY, L. A.; HE, H.; PHAM-HUY, C. **Free radicals, antioxidants in disease and health**. International journal of biomedical science: IJBS, v. 4, n. 2, p. 89–96, 2008. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3614697&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PINTO, E. D. P. P.; AMOROZO, M. C. D. M.; FURLAN, A. **Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil**. Acta Botanica Brasilica, v. 20, n. 4, p. 751–762, 2006.

PUBCHEM, C. D. **National Center for Biotechnology Information**. Disponível em: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/search/>>.

SCHWANKE, R. C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória do flavonoide miricitrina na colite induzida pelo sulfato sódico de dextrana (DSS) em camundongo e estudo do seu perfil farmacocinético em roedores**, 2012. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis - SC.

SEN, S.; CHAKRABORTY, R.; SRIDHAR, C.; REDDY, Y. S. R.; DE, B. **Free radicals, antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect**. International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 2010.

SHAHIDI, F.; ZHONG, Y. **Measurement of antioxidant activity**. Journal of Functional Foods, p. 1–25, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.01.047>>.

SHARMA, R.; KISHORE, N.; HUSSEIN, A.; LALL, N. **Antibacterial and anti-inflammatory effects of Syzygium jambos L. (Alston) and isolated compounds on acne vulgaris**. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 13, n. 1, p. 292, 2013. Disponível em: <<http://bmccomplementaltermmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1472-6882-13-292>>.

SHARMA, V.; JANMEDA, P. **Extraction, isolation and identification of flavonoid from Euphorbia neriifolia leaves**. Arabian Journal of Chemistry, v. 10, n. 4, p. 509–514, 2017. Elsevier. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878535214001816#f0005>>. Acesso em: 5/6/2018.

SILVA, A. G.; PEREIRA, L.; LUCAS, F. S. **Uso, conservação e diversidade de plantas aromáticas, condimentares e medicinais para fins medicinais na comunidade Vila Princesa, Porto Velho-RO**. Revista Pesquisa e Criação, v. 10, n. 2, p. 21–35, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. DE; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. **Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent**. Methods in Enzymology, v. 299, n. 1974, p. 152–178, 1998.

TIAN, L.; XU, M.; WANG, D.; et al. **Phenolic constituents from the leaves of *Syzygium forrestii* Merr. and Perry.** *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 39, n. 2, p. 156–158, 2011. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2011.01.014>>.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** *Química Nova*, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

ZAMBELLI, A. R.; AGUIAR, L. A.; CUNHA, A. P.; et al. **Avaliação do potencial antioxidante e análise do teor de taninos totais de *Syzygium malaccense*.** Anais da 58^a Reunião Anual da SBPC. Florianópolis, 2006.