



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

Autorizada pelo Decreto Federal nº 77.496 de 27/04/76

Recredenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



XXVII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2023

Estudo Fitoquímico e Avaliação *in vitro* dos Extratos Polares da *Passiflora malacophylla*

Ana Catarina Santana de Oliveira¹ ; Clayton Queiroz Alves² ;

1. Bolsista PIBIC/CNPq, Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: anacatr@gmail.com
2. Clayton Queiroz Alves, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: cqalves@uefs.br

PALAVRAS-CHAVE: produtos naturais; passiflora; fitoquímica.

INTRODUÇÃO

Passiflora malacophylla é uma espécie vegetal amplamente encontrada no território brasileiro, conhecida por suas propriedades medicinais que incluem ação ansiolítica, antiespasmódica, anti-inflamatória e sedativa. E isso se dá pela presença de metabólitos secundários importantes, entre eles, flavonoides e saponinas, compostos responsáveis por determinadas atividades (AKHONDZADEH et al, 2001; MADOGLIO, 2011). A análise fitoquímica das espécies pertencentes a este gênero desempenha um papel crucial na ampliação do nosso entendimento sobre suas propriedades biológicas. Isso ocorre porque essa análise possibilita a identificação de substâncias potencialmente responsáveis pelos efeitos farmacológicos observados, bem como pode conduzir à descoberta de novos componentes relevantes em espécies ainda não exploradas. Portanto, é fundamental continuar a realizar estudos químicos nesse contexto, como enfatizado por Hamburger e Hostettmann (1991).

MATERIAL E MÉTODOS

Fracionamento: O extrato aquoso de *Passiflora malacophylla* (APM) foi previamente obtido por integrantes do Grupo de Pesquisa em Substâncias Bioativas, bem como a fração selecionada (F3:1,544g) para ser submetida a Cromatografia em Coluna (CC), utilizando como fase estacionária sílica gel 60, e como fase móvel misturas de clorofórmio e metanol em gradiente de polaridade. Para a realização da Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), as frações foram dissolvidas com solvente adequado. Realizamos um processo de fracionamento em cromatografia em coluna (CC), que resultou em 227 frações que, em seguida, foram agrupadas em 8 subfrações. Das 8 amostras, as seis primeiras frações foram combinadas.

Fração	Agrupamento	Massa (g)	Fração	Agrupamento	Massa (g)
APM-3A	1-44	0,5556	APM-3E	80-106	0,0582
APM-3B	45-63	0,0954	APM-3F	107-153	0,0552
APM-3C	64- 73	0,0455	APM-3G	154-174	0,0410
APM-3D	74-79	0,0659	APM-3H	175-227	0,0391

Tabela 1. Frações obtidas da CC de F3

A fração APM-3A foi submetida a Cromatografia por Exclusão (CE) utilizando gel de dextrana Sephadex® LH-20 como fase estacionária, e como fase móvel, uma mistura isocrática de diclorometano:metanol (1:1). A partir da cromatografia em Sephadex, obtivemos 30 frações, que foram agrupadas em 2 subfrações: APM-3A-1 e APM-3A-2. A subfração APM-3A-2 foi submetida a um novo fracionamento por cromatografia por exclusão, desta vez utilizando metanol como eluente. Isso resultou em 40 frações, agrupadas em duas subfrações APM-3A-1A e APM-3A-1B. A segunda amostra, foi submetida à cromatografia em exclusão com metanol, o que resultou em mais 60 frações, agrupadas em 4 subfrações distintas. Destas, a APM-3A-2B e a APM-3A-2A foram selecionadas para uma etapa subsequente de cromatografia em exclusão. A APM-3A-2B resultou em 25 frações, que foram agrupadas em 3 amostras, enquanto a APM-3A-2A gerou 37 frações, agrupadas em 2 amostras. Esses processos de separação foram monitorados e analisados usando o sistema de CCDC.

Avaliação de letalidade frente à *Artemia salina*: Para conduzir o experimento, criamos um ambiente controlado em um aquário contendo 5 litros de água mineral e 19,22 gramas de sal marinho. Dividimos o aquário em duas seções usando isolamento de isopor. Uma das seções foi coberta com papel alumínio para bloquear a entrada de luz, enquanto a outra foi mantida iluminada por uma lâmpada próxima ao aquário. Na parte escura do aquário, foram depositados os ovos de *A. salina*, que normalmente eclodem em um período de 24 a 48 horas após a incubação. Para realizar nossos testes, preparamos diferentes concentrações do extrato aquoso de *P. malacophylla* em triplicata. Uma vez que os ovos eclodiram, colocamos 10 nauplius de *A. salina* em cada tubo de ensaio, onde cada tubo continha uma das seguintes concentrações do extrato: 1000, 500, 250, 100 e 50 µg/mL. Também incluímos tubos de controle "em branco". Após 24 horas, contamos o número de microcrustáceos que sobreviveram e os que não sobreviveram ao tratamento. Esse procedimento permitiu avaliar o impacto das diferentes concentrações do extrato aquoso de *P. malacophylla* na sobrevivência das *Artemias*. O teste foi fundamentado no método elaborado por Meyer e colaboradores (1982) e adaptado por Serrano, Ortega e Villar (1996)". NECO (2020).

Análise por CLAE-DAD: Para a realização das análises, foi utilizado um Cromatógrafo a Líquidos de Alta Eficiência da marca Thermoscientific Ultimate 3000, com o software na versão 7.2.8, com injetor automático, acoplada a um detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Foram utilizados os solventes: acetonitrila (SigmaAldrich®) grau HPLC, ácido acético (Vetec®) grau analítico e água ultrapura (18,2 MΩcm). Os padrões analíticos utilizados foram vitexina, isovitexina, orientina e isorientina (SigmaAldrich®). O processo cromatográfico foi conduzido em uma coluna e pré-coluna Purospher® STAR RP18-e (5 µm), LiChroCART® 250-4,6 (Merck, Darmstadt, Alemanha). A taxa de fluxo foi de 1 mL.min⁻¹, e o volume de injeção foi de 10 µL. Foram utilizados Acetonitrila (Fase B) e ácido acético a 1% (Fase A) como eluentes em modo gradiente. O processo de eluição dos solventes começou com 5% da fase móvel B e, ao longo do tempo, essa porcentagem foi progressivamente incrementada até atingir 100% (Tabela 2). A detecção foi realizada na faixa de aquisição de 210 a 400 nm e registrada em 340 nm.

Nº	Tempo	Fluxo (mL/min)	%B
1	0,000	Run	
2	0,000	1,00	5
3	2,500	1,00	13
4	8,000	1,00	15
5	9,000	1,00	100
6	11,00	1,00	100
7	12,00	1,00	5
8	15,00	1,00	5
9	15,00	Stop Run	

Tabela 2: Condições Cromatográficas da Fase Móvel

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O extrato de *Passiflora malacophylla* foi avaliado quanto ao potencial de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, nas concentrações de 1000, 500, 250, 100 e 50 µg/mL. A porcentagem negativa observada nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL, 250 µg/mL e 100 µg/mL indica que os extratos causaram 100% de letalidade nas *Artemias* testadas nessas concentrações (Tabela 3). Por outro lado, a porcentagem positiva observada na concentração de 50 µg/mL sugere que houve uma sobrevivência das *Artemias* nessa concentração, em comparação com o grupo de controle. A concentração de 50 µg/mL é a única em que as *Artemias* não foram completamente mortas.

Tabela 3- Potencial da letalidade frente à *A. salina* em extrato de *Passiflora malacophylla*

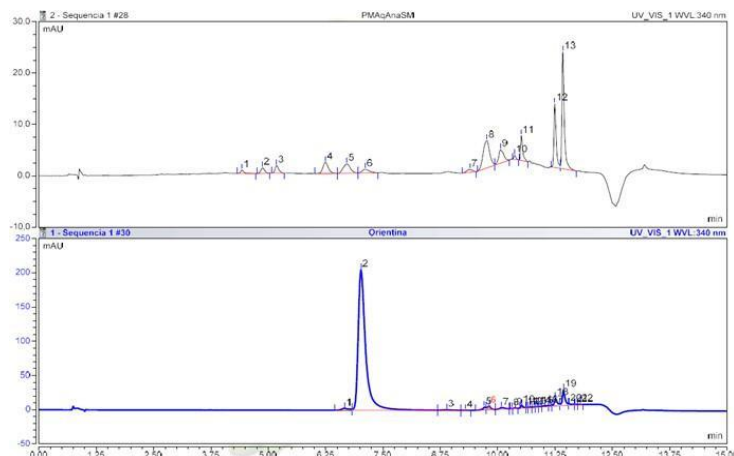
Concentração (µg/mL)	T1%	T2%	T3%
1000	100	100	100
500	100	100	100
100	100	90	100
250	100	100	100
50	40	40	40

Legenda: %LAS = $(n^\circ \text{ de mortos no teste} - n^\circ \text{ de mortos no branco}) / n^\circ \text{ de vivos no branco}$.

Isolamento dos Constituintes Químicos: A fração APM-3A-2B, foi submetida a uma coluna de Sephadex, resultando em 25 frações distintas. Estas frações foram posteriormente agrupadas em três subfrações, sendo que APM-3A-3C foi isolada e será objeto de análises por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectroscopia no infravermelho (IV) com o objetivo de identificar e determinar a estrutura da substância isolada.

Análise por CLAE-DAD: Foram analisados separadamente os padrões de vitexina, isovitexina, orientina e isoorientina, que são flavonoides considerados marcadores do gênero *Passiflora*. Utilizando a mesma metodologia para análise da amostra, foi possível observar a presença de 13 picos cromatográficos, dos quais, apenas o pico 6 apresentou similaridade com o padrão da Orientina (Figura 1).

Figura 1: Comparação do tempo de retenção do padrão Orientina com o pico 6 da amostra.



CONCLUSÃO

Através deste trabalho foi possível verificar que o extrato aquoso de *Passiflora malacophylla* apresentou letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, demonstrando que nesta espécie vegetal pode haver substâncias biologicamente ativas e de interesse para a indústria farmacêutica. Além disso, foi possível isolar uma substância, aqui denominada APM-3A-2B, que será posteriormente identificada através dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C . Através da análise por CLAE-DAD foi possível constatar que o flavonoide Orientina encontra-se presente no extrato aquoso analisado, confirmando esta substância como um marcador taxonômico do gênero. Portanto, os dados alcançados através deste trabalho contribuiram para o conhecimento das espécies que medem nossa região, bem como ajudar no aprimoramento das habilidades científicas dos estudantes de graduação da Universidade Estadual de Feira de Santana.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Aprimorar as técnicas utilizadas em laboratório no processo de isolamento e identificação dos constituintes químicos produzidos por espécies vegetais é essencial para contribuir com o conhecimento das espécies do gênero *Passiflora*. Desenvolvendo estes conhecimentos, podemos aprofundar nossa compreensão da riqueza fitoquímica dessas plantas. As informações obtidas por meio dessas abordagens não apenas enriquecem nossa base de conhecimento sobre a *Passiflora malacophylla*, mas também podem abrir portas para a descoberta de compostos bioativos com potencial farmacológico e outras aplicações valiosas.

REFERÊNCIAS

- AKHONDZADEH S, NAGHAVI HR, VAZIRIAN M, SHAYEGANPOUR A, RASHIDI H, KHANI M. Passionflower in the treatment of generalized anxiety: a pilot doubleblind randomized controlled trial with oxazepam. 2001. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*. v.26, n.5, p.363-367.
- DOS SANTOS, Verônica Vitória; ALVES, Clayton Queiroz. ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO in vitro DE PASSIFLORA MALACOPHYLLA. *Anais dos Seminários de Iniciação Científica*, n. 25, 2021.
- HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p.3864 – 3847, 1991.
- SIQUEIRA, J.M.; BOOM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*. v. 21, n.5. 1998.