



## UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA

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

Rede credenciamento pelo Decreto nº 17.228 de 25/11/2016

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COORDENAÇÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA



### XXVI SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UEFS SEMANA NACIONAL DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA - 2022

#### INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE FOLHAS DE *Myrcia splendens* Tayrinne Silva Carneiro Almeida<sup>1</sup>; Ingrid Estefania Mancia de Gutiérrez<sup>2</sup>; Angélica Maria Lucchese<sup>3</sup>; Aline do Nascimento Silva<sup>4</sup> e Larissa Miranda Santos Matos<sup>5</sup>

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: tayrinne.tay@hotmail.com
2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: far\_gutierrez@yahoo.com
3. Participante do projeto, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com
4. Participante do projeto, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: enilaans@gmail.com
5. Participante do projeto, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: larissa.matos2@hotmail.com

**PALAVRAS-CHAVE:** *Myrcia splendens*; Fracionamento; Isolamento

#### INTRODUÇÃO

Estima-se que existam de 250.000 a 500.000 espécies de plantas, porém apenas uma pequena parcela delas foram utilizadas em estudos de identificação da composição química e uma parcela ainda menor dessas espécies foram submetidas a testes farmacológicos (MAHESH; SATISH, 2008). *Myrcia* DC. é um dos gêneros de Myrtaceae e possui uma quantidade superior a 300 espécies que estão distribuídas do México até o sul do Brasil (SILVA, 2010).

Alguns estudos envolvendo *Myrcia splendens* (Sw.) DC. demonstram que a mesma possui diversas propriedades, dentre elas, pode-se citar, a atividade citotóxica (*in vitro*) em células tumorais (MONTALVÃO, 2022); potencial fitotóxico, antioxidante e antifúngico (PONTES, 2015); antinociceptiva (QUINTANS-JÚNIOR *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2018); antifúngico e antioxidante (PONTES *et al.*, 2019) e antimicrobiana frente a bactérias Gram positivas e Gram negativas (SILVA; UETANABARO; LUCHESE, 2013).

Este plano de trabalho investigou a composição química e atividade antioxidante de extrato e frações das folhas da espécie *M. splendens* coletada em remanescente de floresta secundária, localizado no município de Alagoinhas-BA.

#### METODOLOGIA

##### Obtenção das frações

O extrato metanólico das folhas de *Myrcia splendens* já estava disponível no laboratório e foi fracionado por partição líquido-líquido para a obtenção das frações. Primeiramente, 20g do extrato bruto foram solubilizadas em metanol (MeOH) na quantidade mínima para solubilizar completamente, a temperatura ambiente. Logo após, os solventes de diferentes polaridades, foram adicionados, um a um, e três vezes consecutivas, num funil de separação, com prévia adição de água destilada, nas proporções MeOH/H<sub>2</sub>O (v/v) 8:2 (fração hexano), 7:3 (fração diclorometano), 6:4 (fração acetato de etila) e 5:5 (fração butanol). Todas as frações foram

concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e com temperatura do banho entre 35 e 40 °C, em seguida foram acondicionadas em frascos de vidro e transferidas para capela de exaustão, onde o resíduo dos solventes foi evaporado. Quando necessário, os frascos contendo as frações foram mantidos num dessecador até secarem por completo, sendo prontamente armazenados sob refrigeração. A fração residual constituiu-se na fração hidrometanólica, que teve o metanol evaporado em capela de exaustão e a solução final armazenada sob refrigeração para posterior liofilização.

#### **Atividade antioxidante**

Foi empregado o método de sequestro do radical ABTS, segundo Rufino e colaboradores (2007), com algumas adaptações, utilizando trolox como controle positivo. As amostras dos extratos e frações das folhas, em diferentes concentrações, foram solubilizadas em etanol absoluto e 30 µL de cada amostra foi adicionada a uma solução etanólica de ABTS com persulfato de sódio (3mL) de absorvância  $0,70 \pm 0,05$ . Após 6 minutos de reação, as leituras foram feitas em espectrofotômetro com absorvância de 734 nm. Os resultados foram expressos em mmol de trolox/g de amostra. A média  $\pm$  desvio padrão dos resultados foram calculados e em seguida, avaliados por meio da Análise de Variância (ANOVA) realizando-se o teste de Tukey, a 95% de probabilidade, mediante o programa estatístico Sisvar v5.6.

#### **Determinação do perfil cromatográfico**

O perfil cromatográfico dos extratos e frações foi determinado através da Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para escolha de eluentes para a separação cromatográfica. Reveladores específicos (NP-PEG), foram empregados para a detecção de classes de metabólitos secundários conforme Wagner e Bladt (1995).

#### **Fracionamento e purificação das frações**

A fração em acetato de etila das folhas de *Myrcia splendens* foi submetida a Cromatografia por Exclusão, Sephadex LH-20, utilizando-se apenas metanol. Esse processo gerou 140 frações, que após análise por CCD foram reunidas em 4 grupos: AA, AB, AC, AD.

Após as reuniões e análise por CCD, notou-se que o grupo AC (frações 34 a 50, com 0,17g de massa) foi o que indicou melhor perfil de separação, por isso, foi submetido a cromatografia em coluna (CC), com sílica gel 60 ( $<0,063$  nm) como fase estacionária, na proporção 1:100 (amostra:sílica) e misturas de eluentes (fase móvel) de polaridade crescente (diclorometano/acetona), em seguida do metanol, com o intuito de purificação e isolamento de metabólitos da fração. As frações que possuíam o perfil cromatográfico semelhantes foram reunidas após análise por CCD, com auxílio de reveladores químicos e luz ultravioleta, resultando em 6 grupos.

O grupo AB (frações 17 a 33, com 0,61g de massa) também foi submetido a cromatografia em coluna (CC), com sílica gel 60 ( $<0,063$  nm) como fase estacionária, na proporção 1:50 (amostra:sílica) e misturas de eluentes (fase móvel) de polaridade crescente (diclorometano/acetona), em seguida do metanol, com o intuito de purificação e isolamento de metabólitos da fração. As frações que possuíam o perfil cromatográfico semelhantes foram reunidas após análise por CCD, com auxílio de reveladores químicos e luz ultravioleta, resultando em 7 grupos.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Obtenção das frações**

O fracionamento por partição é o primeiro método que deve ser utilizado quando se deseja isolar substâncias de interesse. Essa técnica acarreta uma dissolução seletiva dos compostos, pois os mesmos se separam, de acordo com a sua polaridade entre os solventes orgânicos, sendo estes imiscíveis com água. A eficiência do fracionamento depende da afinidade dos compostos (solutos) pelo solvente extrator, da razão das fases, como também do número de extrações (QUEIROZ *et al.*, 2001).

A escolha dos solventes foi realizada de acordo com as suas polaridades para a partição, e as frações em hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol foram obtidas com teores de extrativos de 6,44%; 5,03%; 10,78% e 36,94%, respectivamente. Dessa forma, pode-se observar que a fração que possui maior rendimento é a em butanol, seguido de acetato de etila, hexano e por fim, de diclorometano, indicando assim uma quantidade mais elevada de compostos polares neste extrato.

### **Atividade antioxidante**

Para avaliar a atividade antioxidante utilizou-se o método de sequestro do radical ABTS (Quadro 1). Esse método possui grande estabilidade e é considerado um dos testes mais rápidos para a avaliação da atividade antioxidante, além disso, permite que sejam realizadas análises de compostos que possuem tanto natureza hidrofílica quanto lipofílica e oferta resultados que podem ser reproduzidos (KUSKOSKI *et al.*, 2005). A estabilidade do radical ABTS ocorre por meio da oxidação do sal de persulfato de potássio ou sódio com a solução aquosa do radical (RUFINO *et al.*, 2007; SUCUPIRA *et al.*, 2012).

Os valores encontrados para esse teste estão apresentados a seguir, com o valor da média  $\pm$  desvio padrão mmol de trolox/g de amostra: extrato metanólico  $4,05 \pm 1,24^a$ ; hexano  $0,22 \pm 0,02^c$ ; diclorometano  $0,57 \pm 0,21^c$ ; acetato de etila  $4,57 \pm 0,08^a$ ; e butanol  $2,51 \pm 0,46^b$ . A análise da variância foi realizada pelo teste de tukey  $p < 0,05$ . A quantidade de trolox é diretamente proporcional a atividade antioxidante, ou seja, quanto maior o valor de trolox encontrada por cada grama de extrato/fração, maior é a quantidade de antioxidantes na amostra em análise. Com isso, percebe-se que a fração em acetato de etila e o extrato metanólico foram os que mais se destacaram frente a oxidação, sendo que as mesmas não se diferem significativamente entre si, em seguida a fração em butanol, e por fim, diclorometano e hexano, ambas iguais estatisticamente. Dessa forma, a fração em acetato de etila e o extrato metanólico apresentaram o melhor perfil antioxidante, sendo amostras de interesse para futuros testes com essa espécie.

Os resultados encontrados nesse estudo para o teste de ABTS foram superiores aos encontrados para os frutos de *Myrcia guianensis* (LEAL *et al.*, 2021), espécie pertencente ao mesmo gênero, com valores entre 0,10 e 0,07 mmol de trolox/g de extrato, para cada coleta realizada em sua pesquisa.

### **Perfil cromatográfico**

Após análise por CCD, a fração em acetato de etila foi escolhida pelo seu perfil de separação, como também por razão dos testes anteriores realizados pelo nosso grupo de estudo terem apontado que esta fração possui elevado teor de fenólicos e flavonoides, como também ótima atividade antioxidante e fotoprotetora.

### **Fracionamento e purificação**

O primeiro fracionamento foi por cromatografia de exclusão com a fração em acetato de etila, gerando 140 frações, que após análise por CCD foram reunidas em 4 grupos, AA a AD.

Diversos testes com proporções diferentes de eluentes foram realizados visando obter aquele que fosse mais eficiente para a separação das substâncias. A melhor mistura de solventes se deu na proporção de diclorometano/acetona 7:3 para a fração AC. Em seguida à seleção do sistema de solventes, a fração citada anteriormente (0,17 g) foi submetida à primeira Cromatografia em Coluna (CC) em sílica gel. As 217 frações obtidas foram analisadas por meio de CCD e reunidas em 6 grupos, AC1 a AC6. O grupo AC1 cristalizou na forma de cristais amarelos, apresentando uma única mancha por CCD, o que indica ser uma substância isolada, denominada SI-3.

Pelo fato desta coluna ter gerado grupo de frações com valores de massas muito baixo, optou-se por fazer uma nova CC em sílica gel com outro grupo obtido através da cromatografia por exclusão. Para essa CC em sílica gel também foi necessário os testes com proporções diferentes de eluentes objetivando a escolha daquele que fosse mais eficiente para a separação das substâncias. A proporção de diclorometano/acetona 7:3 também foi a melhor para a fração AB. Em seguida à seleção do sistema de solventes, a fração citada anteriormente (0,61 g) foi submetida à Cromatografia em Coluna (CC) em sílica gel. As 157 frações obtidas foram analisadas por meio de CCD e reunidas em 7 grupos, AB1 a AB7. Nos grupos AB1 e AB3 houve cristalização, no primeiro foi no formato de agulhas amarelas e o segundo na forma de cristais amarronzado, apresentando uma única mancha por CCD cada, o que também indica serem substâncias isoladas, denominadas SI-3 e SI-2, respectivamente.

As substâncias SI-1, SI-2 e SI-3 foram submetidas a revelação utilizando NP-PEG, com resultado positivo para flavonoides (Figura 3). As três substâncias isoladas, foram separadas e serão encaminhadas para análise por espectrometria de RMN.

### **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os dados obtidos a partir do teste da atividade antioxidante pelo sequestro de ABTS indica que *Myrcia splendens* possui substâncias com atividade antioxidante que devem ser estudadas. A presença de flavonoides foi detectada nas suas folhas e três substâncias foram isoladas. Entretanto, se faz necessários mais estudos objetivando confirmação da estrutura destas substâncias, através das técnicas de identificação e elucidação.

### **REFERÊNCIAS**

- MAHESH, B.; SATISH, S. Antimicrobial activity of some important medicinal plant against plant and human pathogens. **World journal of agricultural sciences**, v. 4, n. 5, p. 839-843, 2008.
- SILVA, A. N. **Estudo da composição química e da atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de espécie do gênero Myrcia DC. (Myrtaceae)**. 2010. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana.
- MONTALVÃO, Monalisa Martins. **Atividade citotóxica do óleo essencial das folhas de Myrcia splendens em células tumorais**. 2022. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Sergipe.
- LEAL, V. D. C. *et al.* Potencial nutricional e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos silvestres de *Myrcia guianensis*. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 33376-33388, 2021.