

SEMI-QUANTIFICAÇÃO DE POLIFENOIS, FLAVONOIDES E TANINOS DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz

Thiago Araújo de Medeiros Brito (1); Herbert Igor Rodrigues de Medeiros (1); Rodrigo Ribeiro Alves Caiana (2); Francinalva Dantas Medeiros (3)

¹Universidade Federal de Campina Grande – E-mail: thiago.farmacia.brito@gmail.com

¹Universidade Federal de Campina Grande – E-mail: igorpls_15@hotmail.com

²Universidade Federal de Campina Grande – E-mail: rodrigoriibeiroalves@hotmail.com

³Universidade Federal de Campina Grande – E-mail: francinalvamedeiros@gmail.com

Resumo: As plantas medicinais têm sido utilizadas há séculos como alternativa de tratamento para problemas de saúde. Por esse motivo, muitas espécies de plantas e preparados vegetais medicinais são alvos de estudos fitoquímicos para promoção do conhecimento quimiotaxonômico, isolamento dos princípios ativos, assim como pela obtenção de outros materiais econômicos tais como, fitocosméticos, óleos essenciais e praguicidas. Dentre 10 mil plantas medicinais nacionais, cerca de 1% foram alvos de estudos mais detalhados. A espécie *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz é uma planta medicinal indicada para tratar feridas cutâneas, contusões, asma, tosse crônica, diarreia e bronquite. O seu potencial terapêutico em testes preliminares é notável, embora pesquisas adicionais em estudo fitoquímico sejam necessárias. Essa pesquisa, teve por intuito a identificação e quantificação das principais classes de metabólitos secundários possivelmente relacionados com o uso na medicina popular tradicional e consequente, confirmação do uso na medicina tradicional, promoção do conhecimento quimiotaxonômico e subsídio de pesquisas posteriores no fornecimento de novas moléculas bioativas úteis à sociedade. Para tanto, foi realizada a semi-quantificação do extrato hidroalcoólico líquido produzido pelo método de maceração de *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz identificada e coletada no Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande, para polifenóis totais, flavonoides e taninos frente a curvas de calibração produzidas nos padrões ácido gálico, quercetina e catequina, respectivamente. As análises fitoquímicas mostraram maior e significativa presença de polifenóis totais seguidos de flavonoides, entretanto, não foi possível detectar e/ou quantificar taninos.

Palavras-chave: Estudo fitoquímico, *Libidibia ferrea*, Metabólitos secundários, Quantificação.

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas há séculos como alternativa de tratamento para problemas de saúde.¹ Atualmente, muitas espécies de plantas e preparados vegetais medicinais tiveram pesquisas fomentadas pelo objetivo de promover o conhecimento quimiotaxonômico, isolamento de princípios ativos, assim como, pela obtenção de outros materiais econômicos tais como, fitocosméticos, óleos essenciais e praguicidas.^{2,3,4,5}

No desenvolvimento dessas pesquisas se faz importante a fitoquímica (química dos produtos naturais) a qual através de métodos extrativos e espectroscópicos promove a extração de constituintes químicos, a realização da triagem fitoquímica qualitativa e/ou quantitativa que direcionam os métodos cromatográficos e espectroscópicos a um promissor

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

isolamento, purificação e caracterização estrutural dos metabólitos secundários (MS).⁶

A triagem fitoquímica nos extratos revelam ainda, a presença de MS essenciais à justificação e adequação do uso na medicina popular e aplicações na pesquisa por moléculas com atividade biológica úteis à sociedade, como compostos fenólicos, flavonoídicos e taninos. Essa prospecção preliminar pode ainda complementar estudos sobre um grupo de plantas medicinais nativas com suspeita de potencial farmacoterapêutico.⁷

Até o momento, pouco se conhece sobre a composição química de 99,6% das plantas da flora nacional, estimadas entre 40 mil a 55 mil espécies, sendo que 10 mil podem ser consideradas medicinais, aromáticas e úteis. Das espécies vegetais existentes no Brasil, menos de 1% foram motivos de estudos adequados.⁸

A família Fabaceae é considerada a terceira maior família de angiospermas, sendo composta por 727 gêneros e 19.325 espécies de árvores, arbustos, videiras e ervas de distribuídas por todo o mundo e dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosideae e Papilionoideae.⁹ No Brasil, 222 gêneros e 2848 espécies constituem a família Fabaceae.¹⁰

O gênero *Libidibia* (*Caesalpinia*) como é concebida atualmente, tem entre suas espécies representativas a *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz, popularmente conhecida como “jucá ou “pau-ferro”, indicada popularmente para tratar de diversas afecções à saúde. Como exemplo, pode-se destacar: o tratamento de feridas cutâneas, contusões, asma tosse crônica, diarreia e bronquite.^{11,12,13}

Ensaio farmacológico com *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz demonstraram atividade analgésica, anti-inflamatória, atividade inibitória contra patógenos da cavidade oral tais como, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e atividade cicatrizante embora, pesquisas adicionais para identificar e estudar componentes sejam necessárias, o que justifica essa pesquisa.^{11, 14, 15}

Vislumbrando os grandes benefícios decorrentes do uso de *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz na medicina popular e a necessidade de novos estudos fitoquímicos para comprovar as propriedades medicinais atribuídas à planta e subsidiar pesquisas posteriores na descoberta de novas moléculas bioativas úteis à sociedade, essa pesquisa teve por objetivo promover a identificação e quantificação das principais classes de metabólitos secundários possivelmente relacionados com o uso de *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz na medicina popular tradicional.

METODOLOGIA

Os frutos de *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz foram coletados no Centro de Educação (CES) da Universidade Federal de Campina Grande situada no acesso Profª. Maria Anita Furtado Coelho, localidade do Olho D'Água da Bica, a 2 Km do Centro do município de Cuité–PB, em 29 de maio de 2017. Esse procedimento foi realizado através da supervisão e acompanhamento do botânico Prof. Dr. Carlos Alberto Garcia Santos (UFCG - Cuité), colaborador do projeto, que possui conhecimentos sobre a localização da espécie e época adequada de coleta. Após esse processo foi feita uma exsiccata do material coletado, o qual encontra-se armazenado no Herbário do Centro de Educação e Saúde (CES), UFCG.

Para a preparação do extrato, os frutos foram higienizados com um tecido seco e deixados em temperatura ambiente para a primeira secagem. Vagens consideradas escuras, furadas ou inapropriadas foram descartadas.

Após 48 horas o material coletado foi transferido para uma estufa de circulação de ar a 40 °C durante 72 horas e posteriormente triturado em moinho mecânico, fornecendo o pó da planta. Esse por sua vez, passou por um processo de tamisação em tamisador para padronização da granulometria. Os tamises utilizados apresentavam orifícios de abertura com diâmetro de 200 µm, 180 µm, 150 µm, 106 µm e 75 µm.

O pó de granulometria entre 106-180 µm foi selecionado por possuir o menor grau de divisão associado a um rendimento suficiente para as necessidades da pesquisa, sendo, portanto, 120 g desse pó submetido à maceração em 600 mL de uma solução 50% v/v H₂O/EtOH durante 5 dias, nesse período o sistema era agitado a cada 24 horas. Ao término do processo o material foi filtrado resultando no extrato fluido.

Para determinar a concentração do extrato utilizou-se uma adaptação da metodologia farmacopeica de determinação de resíduo seco. Nesse processo, uma alíquota de 1 mL do extrato líquido é transferida para uma cápsula de porcelana previamente pesada. Em seguida, esse sistema tem seu volume reduzido a 1/3 com auxílio de aquecimento em chapa aquecedora a 60 °C. As cápsulas com conteúdo reduzido a 1/3 foram secadas em estufa por 4 horas a 100 °C e transferidas ao dessacador até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, o material teve seu peso aferido em balança analítica e foi submetido a secagem em estufa por 1 para posterior pesagem até o valor

constante.

Para a realização da semi-quantificação fitoquímica de polifenóis, taninos e flavonoides em microplacas, o extrato fluido foi diluído através do solvente metanol 1/20 da sua concentração inicial objetivando uma melhor resolução na espectrofotometria UV/Vis através do leitor de microplacas.

O procedimento para polifenóis consistiu na transferência de uma alíquota de 100 μL da solução diluída do extrato em quatro poços consecutivos na linha A de uma microplaca. Em seguida, foi adicionado 50 μL de metanol nos demais poços pertencentes às colunas utilizadas. Realizou-se uma diluição seriada no sentido de A a H, retirando 50 μL e transferindo para o poço seguinte, desprezando-se 50 μL no final de cada coluna. Então, adicionou-se 150 μL de metanol ao branco e à amostra adicionou-se 100 μL do reagente Folin-Ciocalteu tendo 2 minutos à temperatura como condição de eficiência reacional. Em seguida adicionou-se 100 μL da solução de Na_2CO_3 deixando-a reagir por 10 minutos. Por fim, realizou-se a leitura das absorvâncias em 757 nm.

Na produção da curva de calibração adaptou-se o seguinte padrão de variação de concentrações de solução padrão: 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$, 25 $\mu\text{g/mL}$, 30 $\mu\text{g/mL}$, 35 $\mu\text{g/mL}$, 40 $\mu\text{g/mL}$. A curva de calibração foi produzida através da distribuição de 3 replicatas de cada solução padrão de concentração específica na placa resultando no preenchimento de 24 poços. Aos outros 24 poços foi adicionado o branco. A solução padrão foi constituída por 50 μL da solução de ácido gálico de concentração específica, 100 μL da solução de Na_2CO_3 e 50 μL do reagente Folin-Ciocalteu. O branco apresentou-se composto por 50 μL de metanol, 100 μL solução de Na_2CO_3 e 50 μL do reagente Folin-Ciocalteu. A Leitura das absorvâncias foi realizada em 757 nm.

O procedimento para flavonoides consistiu na transferência de uma alíquota de 200 μL da solução diluída do extrato em quatro poços consecutivos na linha A de uma microplaca. Em seguida, foi adicionado metanol nos demais poços pertencentes às colunas utilizadas. Realizou-se uma diluição seriada no sentido de A a H retirando 100 μL e transferindo para o seguinte, despreza-se 100 μL no final de cada coluna. Então, adicionou-se 100 μL de metanol ao branco e 100 μL de uma solução 2 % m/v AlCl_3 /metanol. A leitura foi realizada na absorvância de 415 nm.

Na produção da curva de calibração para flavonoides utilizou-se o seguinte gradiente de concentrações: 2 µg/mL, 6 µg/mL, 10 µg/mL, 14 µg/mL, 18 µg/mL, 22 µg/mL, 26 µg/mL, 30 µg/mL. A curva de calibração foi produzida através da distribuição de 3 replicatas de cada solução padrão de concentração específica na placa resultando no preenchimento de 24 poços. Aos outros 36 poços foi adicionado o branco. A solução padrão foi constituída por 100 µL da solução de quercetina mais 100 µL da solução 2 % m/v AlCl₃/metanol. O branco apresentou-se composto por 100 µL de metanol mais 100 µL da solução 2 % m/v AlCl₃/metanol. A leitura foi realizada em 415 nm de absorvância.

O procedimento para taninos consistiu na transferência de uma alíquota de 50 µL da solução diluída do extrato em quatro poços consecutivos na linha A de uma microplaca. Em seguida, foi adicionado metanol nos demais poços pertencentes às colunas utilizadas. Realizou-se uma diluição seriada no sentido de A a H retirando 25 µL e transferindo para o poço seguinte, despreza-se 25 µL no final de cada coluna. Então, foi adicionado ao branco 225 µL de metanol. Quanto à amostra adicionou-se, consecutivamente, 150 µL de vanilina e 75 µL de HCl deixando-o reagir por 20 minutos à temperatura ambiente. A leitura das absorvâncias foi promovida em 500 nm.

Na produção da curva de calibração adaptou-se o seguinte padrão de variação de concentrações: 1 µg/mL, 30 µg/mL, 60 µg/mL, 90 µg/mL, 120 µg/mL, 150 µg/mL, 180 µg/mL, 200 µg/mL. A curva de calibração foi produzida através da distribuição de 3 replicatas de cada solução padrão de concentração específica na placa. A solução padrão foi constituída por 150 µL da solução de vanilina, 75 µL de HCl e 25 µL da solução de catequina. O branco apresentou-se composto por 150 µL da solução de vanilina, 75 µL de HCl e 25 µL de metanol. A leitura foi realizada em 500 nm de absorvância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A pesquisa possibilitou a obtenção de um extrato hidroalcoólico bruto de coloração marrom-escura. O seu rendimento foi estimado através da determinação de resíduo seco (Figura 1) que resultou em uma concentração do extrato de líquido de 11,29 % m/v por meio da qual foi deduzido o seu rendimento aproximado de 67,74 g.



Figura 1 – Cápsulas com respectivas amostras para determinação de resíduo seco

Fonte: Próprio autor

O extrato utilizado foi diluído a 5645 $\mu\text{g/mL}$. As curvas de calibração para flavonoides (Figura 3), taninos (Figura 4) se mostraram suficientemente eficientes para a semi-quantificação, embora a curva de calibração de polifenóis (Figura 2) tenha sido a de melhor coeficiente de correlação linear.

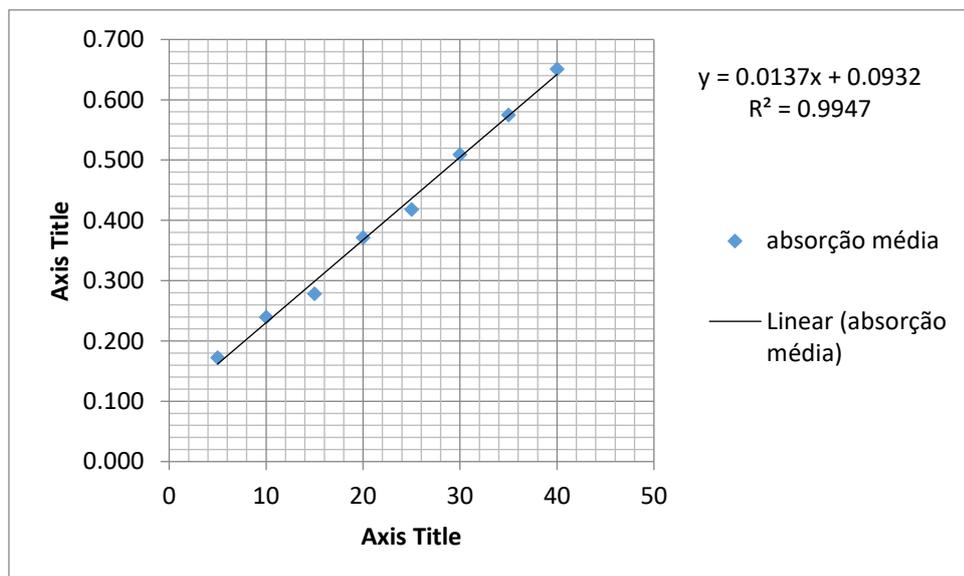


Figura 2 - Curva de calibração para detecção de polifenóis

Fonte: Próprio autor

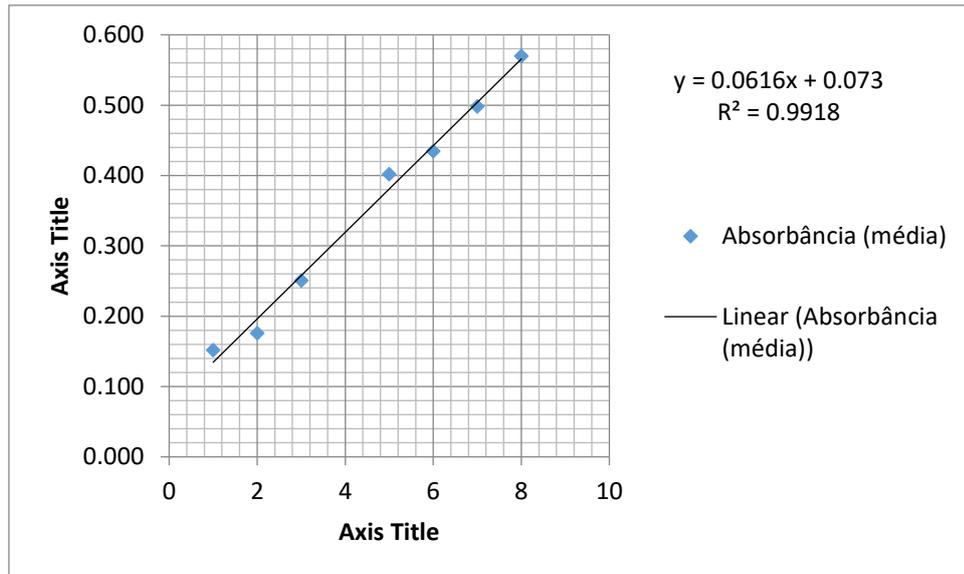


Figura 3 - Curva de calibração para detecção de flavonoides

Fonte: Próprio autor

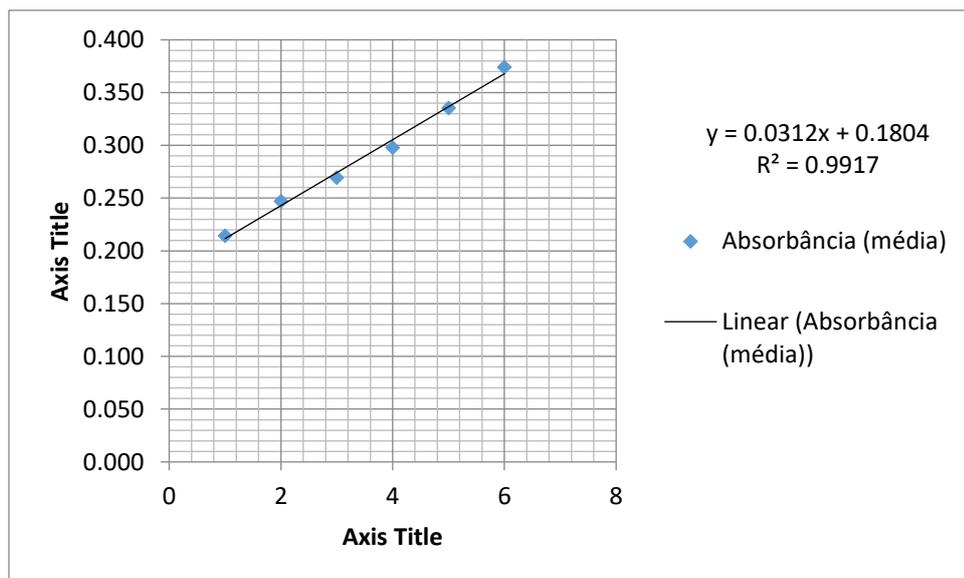


Figura 4 - Curva de calibração para detecção de taninos

Fonte: Próprio autor

As análises fitoquímicas de semi-quantificação demonstraram maior quantidade de polifenóis (Tabela 1), seguido de flavonoides (Tabela 2). Entretanto, não foi possível detectar e quantificar a presença de taninos. Kobayashi et al. (2015) em suas análises fitoquímicas revelou a presença de saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos, sesquiterpenolactonas e antraquinonas em

extrato etanólico bruto (EEB) de *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz. A ausência de detecção de taninos no presente trabalho, pode ser explicada pelo padrão catequina ser destinado à detecção de taninos condensados¹⁷ motivo esse, que nos leva a suspeitar que os taninos são hidrolisáveis. O alto teor de polifenóis detectados pelo padrão de ácido gálico (monômero de taninos hidrolisáveis) pode ser compreendido pela presença majoritária de taninos hidrolisáveis, o que confirmaria o seu uso popular como cicatrizante.^{12,18}

Os flavonoides se mostraram detectáveis e quantificáveis. Tendo em vista, o seu teor em extrato diluído, existe uma possibilidade de isolamento e purificação desses metabólitos. A atividade antifertilidade é um dos efeitos colaterais mais limitantes na utilização de flavonoides como moléculas bioativas. Entretanto, Lucinda et al. (2010) demonstrou que administração a longo de prazo de extrato aquoso de *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz não alterou significativamente o corpo vital e reprodutivo, o peso dos órgãos e a produção de gametas em experimento com ratos.

Tabela 1 - Quantificação de polifenóis

	Absorbância Média	Teor de Polifenóis (mg/g)
1	2,804667	35,06063329
2	2,538667	31,62111896
3	2,326333	28,87554173
4	2,055000	25,36706471
5	1,638333	19,97935429
6	1,029333	12,10467675
7	0,601000	6,566110439
8	0,390333	3,842084053

Fonte: Próprio autor

Tabela 2 - Quantificação de flavonoides

	Absorbância Média	Teor de Flavonoides (mg/g)
1	0,423	1,007480857
2	0,277	0,587617284
3	0,198	0,359472237
4	0,169	0,276074678
5	0,148	0,214724750
6	0,134	0,174463859
7	0,111	0,110238153
8	0,112	0,113113931

Fonte: Próprio autor

É possível que exista outra gama de classes de metabólitos secundários não fenólicos tais como alcaloides, terpenos, esteroides, saponinas, glicosídeos cardioativos, açúcares redutores representando a outra parte do rendimento do extrato. O que pode ser elucidado em novas análises fitoquímicas, destinadas a confirmar os demais usos na medicina popular.

CONCLUSÕES

Na análise fitoquímica por semi-quantificação de metabólitos secundários o extrato hidroalcoólico de *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz apresentou polifenóis totais e flavonoides quantificáveis. A ausência de taninos detectáveis pelo padrão catequina atribuiu suspeita de que os taninos hidrolisáveis e não taninos condensados sejam responsáveis pelo alto teor de polifenóis totais e pela atividade cicatrizante relatada na medicina popular tradicional e pesquisas de potencial terapêutico preliminar.

Análises fitoquímicas de quantificação devem ser realizadas para confirmação de identificação e quantificação de taninos hidrolisáveis assim como também de outros metabólitos secundários possivelmente relacionados com os demais usos na medicina popular.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos ao Centro de Educação e Saúde da Universidade Federal de Campina Grande por me proporcionar o espaço e todo material que estava ao alcance para realização da pesquisa

Agradeço a Universidade Estadual da Paraíba na pessoa de Widson Michael dos Santos por me receber em seu laboratório e me acompanhar para realização dos experimentos de semi-quantificação.

Por fim, gostaria de agradecer à professora orientadora Doutora Francinalva Dantas Medeiros por toda a orientação prestada em meu auxílio, fundamental a toda a pesquisa.

REFERÊNCIAS

- ¹ FACCIN, Â. et al. USE OF HYDROALCOHOLIC EXTRACT OF *Schinus terebinthifolius* Raddi IN PRE-AND POST-MILKING ANTISEPSIS OF THE TEAT IN DAIRY COWS. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 1, p. 90-97, 2016.
- ² COSTA, N. C. et al. Atividade antimicrobiana e análise fitoquímica preliminar do extrato vegetal de alho no controle de fungos fitopatogênicos. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 12, n. 1, p. 161-166, 2017.
- ³ OLIVEIRA, C. S. A. et al. Phenology and phytochemical prospection of Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holmes). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 621-627, 2016.
- ⁴ MEDINA, C. O.; LOUCHARD, B. O.; GONÇALVES, T. Análise espectrofotométrica da atividade fotoprotetora in vitro de extratos das folhas de *Byrsonima sericea*. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 3, 2016.
- ⁵ FEITOSA, R. M. et al. Influência do método de extração no teor de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.). **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 9, n. 4, p. 238-241, 2015.
- ⁶ PICOLLI, A. L. et al. Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso de *Salvia officinalis* L.(Lamiaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 17, n. 4 supl I, p. 774-781, 2015.
- ⁷ DE BESSA, N. G. F. et al. Preliminary phytochemical screening of native Cerrado plants of medicinal popular use by the rural community of the Vale Verde settlement-Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.
- ⁸ BANDEIRA, J.M. et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu**, v.13, n.2, p.157-164, 2011.
- ⁹ LEWIS, G. P et al. **Legumes of the World**. Royal Botanic Gardens Kew, 2005.
- ¹⁰ *Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>>. Acesso em: 05 Mai. 2018.
- ¹¹ CARVALHO, Frascisca Gomes et al. Assessment of the healing activity of jucá pods [*Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz] in cutaneous lesions of rats. **Acta Scientiarum. Technology**, v. 38, n. 2, p. 137, 2016.
- ¹² KOBAYASHI, Y. T. S. et al. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34-40, 2015.
- ¹³ MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D e Z Computação Gráfica, Leitura e Arte, 2004. 413 p.
- ¹⁴ CARVALHO, J. C.T. et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory

properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 175-178, 1996.

¹⁵ SAMPAIO, Fábio C. et al. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 2, p. 289-294, 2009.

¹⁶ KOBAYASHI, Y. T. S. et al. Avaliação fitoquímica e potencial cicatrizante do extrato etanólico dos frutos de Jucá (*Libidibia ferrea*) em ratos Wistar. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34-40, 2015.

¹⁷ MOREIRA, A. C. C. G. et al. FITOQUÍMICOS BIOATIVOS EM FRUTOS DE GENÓTIPOS DE CAJÁ-UMBUZEIRAS. **Brazilian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, 2012.

¹⁸ VERZA, S. G. et al. Avaliação das variáveis analíticas do método de Folin-Ciocalteu para determinação do teor de taninos totais utilizando como modelo o extrato aquoso de folhas de *Psidium guajava* L. **Química nova**. Vol. 30, n. 4 (2007), p. 815-820, 2007.

¹⁹ LUCINDA, L. M. F. et al. Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 907-914, 2010.