

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**Estudos Fitoquímicos e  
Biológicos de *Melaleuca  
alternifolia***

THAISE SIBELLI SOARES

Florianópolis, agosto de 2006



**Estudos Fitoquímicos e  
Biológicos de *Melaleuca  
alternifolia***

Relatório de Estágio de  
Conclusão de Curso – Química  
Habilitação Bacharelado  
Realizado no Laboratório de Química  
de Produtos Naturais (UFSC)  
Agosto de 2006

---

Thaise Sibelli Soares (Aluna)

---

Inês Maria Costa Brighente  
(Orientadora)

## **Dedicatória**

“Depois de algum tempo você percebe que amar não significa apoiar-se,  
e que companhia nem sempre significa segurança.  
Descobre que as pessoas com que você mais se importa  
são tomadas de você muito depressa...  
Aprende que as circunstâncias e os ambientes tem influência sobre nós,  
mas nós somos responsáveis por nós mesmos.  
Aprende que não importa onde chegou, mais onde está indo,  
e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade.  
Aprende que paciência requer muita prática.  
Aprende que nunca deve dizer a uma criança que seus sonhos são bobagens.  
Portanto, plante seu jardim e decore sua alma,  
Ao invés de esperar que alguém lhe traga flores.”  
(Charlie Chaplin, em Aprender; fragmentos)

Este trabalho é dedicado ao meu pai (in memoriam)

## **Agradecimentos**

Agradeço a professora Inês e ao professor Moacir pelo espaço cedido e pelas valiosas orientações para que este trabalho pudesse ser realizado;  
Agradeço também aos colegas do LQPN: Analice, Aline, Andressa, Beatriz, Cristian, Fabiana, Henrique, Heros, Michele e Munique;  
Aos professores com quem tive o prazer e o privilégio de aprender;  
A todos os amigos: de infância, do curso, de longe e de perto;  
A todos os meus familiares, em especial ao tio Milton, tia Laurete, meus irmãos e minha mãe;  
Ao Ayrton;  
A todos, o meu muito obrigada.

## ÍNDICE DE TABELAS

**Tabela 1:** Resultado da plicação marcha analítica no extrato bruto .....24

**Tabela 2:** Atividade antioxidante do extrato bruto da *M. alternifolia*.....25

**Tabela 3:** Conteúdo de fenólicos totais do extrato e frações da *M. alternifolia*.....25

**Tabela 4:** Conteúdo de flavonóides totais do extrato e frações da *M. alternifolia*.....26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Alcalóide, a anfetamina.....	7
<b>Figura 2:</b> Cumarina, a esculetina.....	7
<b>Figura 3:</b> Flavonóide, robustoflavona.....	7
<b>Figura 4:</b> Fotos da árvore, folhas e flores de <i>Melaleuca alternifolia</i> .....	11
<b>Figura 5:</b> Estrutura química do DPPH.....	14
<b>Figura 6:</b> Reação do flavonóide com alumínio formando um complexo.....	16
<b>Figura 7:</b> Fluxograma representando a separação do extrato bruto em frações.....	19
<b>Figura 8:</b> Fluxograma da marcha analítica.....	20
<b>Figura 9:</b> %DPPH no extrato bruto e fração hexânica de <i>M. alternifolia</i> .....	21
<b>Figura 10:</b> %DPPH nas frações acetato de etila e butanólica de <i>M. alternifolia</i> .....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS

IC <sub>50</sub>	Concentração necessária para obter 50% de atividade
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CG	Cromatografia Gasosa
EM	Espectrometria de Massa
IV	Infra Vermelho
UV	Ultra Violeta
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
ERMO	Espécies Reativas de Metabolismo do Oxigênio
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil

## SUMÁRIO

1. RESUMO.....	1
2. INTRODUÇÃO.....	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
3.1. Métodos gerais para obtenção de metabólitos secundários em plantas.....	4
3.2. Gênero Melaleuca.....	10
3.3. Atividade Biológica.....	11
3.4. Atividade Antioxidante.....	12
3.5. Determinação dos Fenólicos Totais.....	14
3.6. Determinação do Conteúdo de Flavonóides.....	15
3.7. Estudos Preliminares.....	16
4. OBJETIVOS.....	17
4.1. Objetivo Geral.....	17
4.2. Objetivos Específicos.....	17
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
5.1. Equipamentos e Reagentes.....	18
5.2. Obtenção do extrato Hidroalcoólico Bruto.....	18
5.3. Particionamento do Extrato Bruto.....	18
5.4. Investigação Química Preliminar.....	19
5.5. Ensaio Atioxidantes.....	21
5.6. Determinação de Fenólicos Totais.....	22
5.7. Determinação de Flavonóides.....	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
6.1. Análise do Estudo Preliminar.....	24
6.2. Análise do Ensaio para Avaliação de Fenólicos Totais.....	25
6.3. Análise do Ensaio para Avaliação de Flavonóides.....	25
6.4. Análise do Bioensaio para Atividade Antioxidante.....	26
6.5. Análise do estudo Espectroscópico do Filtrado.....	27
7. CONCLUSÃO.....	30
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

## 1. RESUMO

O gênero *Melaleuca*, pertencente à família Myrtaceae inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico. *Melaleuca alternifolia* Cheel é comumente conhecida na Austrália como "árvore de chá", florescendo principalmente em áreas de pântano, próximas de rios. A constituição química do óleo essencial das folhas de *M. alternifolia* é bem conhecida, sendo este rica em terpinen-4-ol, um dos principais compostos responsável por suas propriedades medicinais, principalmente antifúngicas e antibacterianas, garantindo-lhe importância comercial. Embora vários trabalhos relatando a composição química de óleos essenciais de folhas de *M. alternifolia* sejam encontrados na literatura, poucos estudos químicos de outras partes desta planta são relatados. Dessa forma, objetiva-se o desenvolvimento de um estudo fitoquímico prévio para detectar os possíveis metabólitos secundários, assim como a avaliação de sua atividade antioxidante e isolamento de possíveis compostos.

O material botânico (folhas de *Melaleuca alternifolia*) foi submetido à secagem com posterior maceração em etanol 70% e assim obteve-se o extrato bruto das folhas de *M. alternifolia*. O extrato bruto foi suspenso em metanol/água 1:1 para posterior particionamento líquido-líquido. Nesta etapa obteve-se um precipitado que foi filtrado e analisado por métodos espectroscópicos. O filtrado foi particionado com solventes de diferentes polaridades, obtendo-se as frações hexano, acetato de etila, n-butanol e aquosa. O extrato bruto e as frações de *M. alternifolia* foram submetidos a testes para avaliar o conteúdo de fenólicos e flavonóides totais, assim como sua atividade antioxidante utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

A quantidade de fenólicos totais é determinada misturando-se o reagente Folin-Ciocalteu com extrato, água destilada e carbonato de cálcio. Os resultados são expressos em mg de ácido gálico/ g de extrato, que é obtido através de uma curva de calibração com ácido gálico. As frações que obtiveram maior concentração de ácido gálico por grama de extrato foram acetato de etila e hexânica com valores muito próximos uns dos outros.

Quanto à determinação do conteúdo de flavonóides, foram feitos testes misturando-se cloreto de alumínio 2%, com extrato e etanol. A quantidade de flavonóides é obtida através de uma curva de calibração feita com quercetina, e o resultado expresso em equivalentes de quercetina/ g de extrato. As frações com maior concentração de quercetina por grama de extrato foram a butanólica e a acetato de etila respectivamente

A atividade antioxidante foi avaliada através da mistura de DPPH 0,004% com soluções de extratos em diferentes concentrações. A concentração necessária para se obter 50% de atividade antioxidante ( $IC_{50}$ ) foi determinada através de gráficos de % DPPH em função da concentração de extrato. *Melaleuca alternifolia* apresentou uma evidente atividade antioxidante em seu extrato bruto, sendo que a fração acetato de etila foi a mais ativa.

Através do estudo químico preliminar utilizando a marcha analítica, observou-se que *Melaleuca alternifolia* contém como principais metabólitos secundários os fenóis, taninos, flavonóides, glicosídeos esteroidais e triterpênicos. Análises conjuntas por espectroscopia de Infravermelho e Ressonância Nuclear Magnética sugerem que o precipitado obtido a partir da suspensão do extrato bruto em metanol/água seja um triterpeno ácido, o ácido betulínico.

Considerando que, um triterpeno precipitou em grande quantidade sem precisar de métodos convencionais de fracionamento, e que esta planta é rica em flavonoides com atividade antioxidante, um estudo fitoquímico mais aprofundado deve ser incentivado no sentido de separar os principais compostos encontrados no estudo preliminar.

## 2. INTRODUÇÃO

A grande diversidade e a fantástica complexidade das estruturas moleculares apresentadas pelos metabólitos secundários, considerados por alguns como metabólitos especiais, são capazes de apontá-los como modelos de potencialidade e versatilidade indescritíveis. Por este motivo, indubitavelmente, que a exploração racional desses compostos micromoleculares biossintetizados pelas plantas poderiam providenciar significativos avanços científicos. Para atender esta eminente necessidade aparece a Fitoquímica, o mais importante segmento da Química dos Produtos Naturais que tem como objetivo o conhecimento adquirido sobre essas substâncias com a importância e a potencial aplicabilidade em outros campos científicos correlatos.

Há muito tempo o homem faz uso dos vegetais para aquisição de nutrientes necessários à sua dieta, como fonte de matéria prima para produtos manufaturados, como suporte para edificações e construções ou mesmo como fonte de energia térmica. Obviamente por essas razões, o estudo científico das plantas tornou-se necessário e imprescindível, entretanto, o motivo fundamental capaz de sustentar e impulsionar as pesquisas sobre o conteúdo químico dos referidos organismos é a sua utilização milenar e empírica no tratamento dos mais diferentes tipos de doenças e moléstias que acometem o ser humano. Em sua grande maioria, os estudos químicos que envolvem vegetais, iniciados já no século XIX, têm como objetivo primário o isolamento e a elucidação das estruturas moleculares de possíveis substâncias, visando dessa forma a descoberta de fármacos ou protótipos que possam dar suporte para o planejamento de novos fármacos ou a formulação de composições de medicamentos naturais. Trabalhos desse tipo, onde prevalece o caráter multidisciplinar, vem demonstrando que dentre todos os constituintes químicos são os metabólitos secundários os principais responsáveis pelas propriedades terapêuticas apresentadas pelas plantas medicinais.

Sendo assim, fica nitidamente evidenciado que os resultados advindos das investigações de substâncias naturais produzidas a partir de metabólitos secundários de organismos vegetais assumem importância e interesse interdisciplinar em função das inúmeras contribuições, principalmente, para os ramos da Medicina, Farmácia, Agronomia, Botânica, Ecologia e da própria Química.

Portanto, este trabalho visa o estudo fitoquímico preliminar da espécie vegetal *Melaleuca alternifolia*, como também avaliar seu potencial de antioxidante.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Métodos gerais para obtenção de metabólitos secundários em plantas

Uma investigação fitoquímica tem como objetivo o isolamento de um metabólito secundário a partir de plantas, e o primeiro passo é a escolha do material vegetal.<sup>1</sup> Esta escolha pode ser através de: a) abordagem randômica – escolha da planta sem qualquer critério, tendo como fator determinante a disponibilidade da planta; b) abordagem quimiotaxonômica ou filogenética – seleção da espécie correlacionada com a ocorrência de uma dada classe química de substâncias em um gênero ou família; c) abordagem etnofarmacológica – seleção de espécies de acordo com o uso terapêutico evidenciado por um determinado grupo étnico. Também é necessário fazer um estudo bibliográfico da planta, e este deve abordar os seguintes aspectos: família, gênero e classes de substâncias predominantes na espécie vegetal.

A planta escolhida deve ser seguramente identificada por um botânico ou um técnico especializado, pois a falta de identificação científica ou uma identificação errônea, anulará todo o trabalho do químico, tornando-o impublicável e praticamente inútil.<sup>2,3</sup>

A primeira parte da investigação fitoquímica é a coleta do material vegetal. Na etapa que se determina o estudo fitoquímico, escolhe-se a parte da planta que será investigada e a quantidade do material que será coletado. Durante a coleta os seguintes itens devem ser cuidadosamente monitorados: separação e etiquetagem do material coletado; embalagem em sacos plásticos; transporte do material; pesagem do material úmido; secagem do material; pesagem do material seco; armazenagem; moagem; pesagem; pesagem do material triturado e obtenção de extratos.<sup>2</sup> Existem também épocas específicas para a coleta das plantas ou parte delas, e essa coleta na época certa esta relacionada com a quantidade de princípio ativo existente no seu tecido.<sup>1</sup>

A partir do momento da colheita inicia-se um processo de degradação enzimática na planta, que leva também a degradação dos princípios ativos. A secagem deve, portanto, ser procedida ao abrigo de luz, em secadores que promovam ambiente limpo, bem ventilado e protegido do ataque de insetos e outros animais. A geração de

um aumento artificial de temperatura é de extrema importância. Para a secagem das folhas e flores a temperatura deve estar em torno de 38°C. Para cascas e raízes, temperaturas de até 60°C são aceitáveis. Temperaturas acima desses limites aceleram o processo de secagem, promovendo a degradação de muitos princípios ativos. O período de armazenamento deve ser o menor possível, pois com o passar do tempo ocorre perdas qualitativas e/ou quantitativas nas substâncias ativas das plantas. Para que o material seja seco todo no mesmo tempo, faz-se a separação das partes mais úmidas como os ramos, das partes mais secas como as folhas. Caso haja interesse no óleo essencial, deve-se evitar a secagem.<sup>2</sup>

Após a secagem do material vegetal, este deve ser moído, cuja finalidade é reduzir mecanicamente o material vegetal a fragmentos de pequenas dimensões, preparando-se, assim, para a próxima etapa, a extração. Se a planta ou parte dela vai ser usada para a extração dos óleos essenciais, recomenda-se que os mesmos sejam armazenados intactos, e/ou na forma mais intacta possível, procedendo à moagem em momento imediatamente anterior à extração.<sup>1</sup>

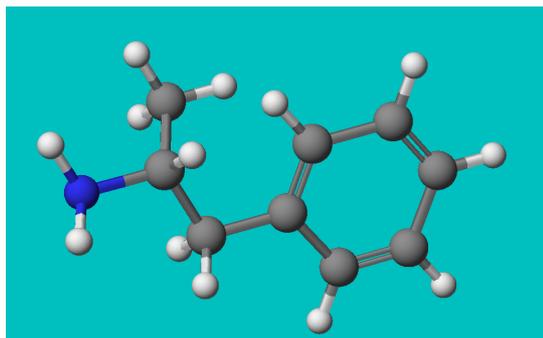
A preparação dos extratos brutos vegetais das plantas é o ponto de partida na etapa de isolamento e purificação dos constituintes químicos fixos das plantas.<sup>3</sup> Na escolha de um método extrativo, avalia-se a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas, a disponibilidade dos meios e o custo do processo escolhido, considerando a finalidade do extrato que se quer preparar. Sendo assim, deve-se primeiramente definir, o que se deseja extrair, ver qual o processo extrativo mais adequado e que tipo de solvente será empregado.<sup>2</sup>

São dois os tipos de extração mais usados: 1) operação de extração parcial (extração sem esgotamento); 2) operação exaustiva (permite o esgotamento da matéria prima). O solvente escolhido para se fazer uma extração, deve ser o mais seletivo possível, pois é essa seletividade que permite a extração das substâncias que se deseja estudar. A seletividade está ligada com polaridade, sendo assim, conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja extrair, determina o solvente mais apropriado para a extração. Portanto, quando não soubermos o conteúdo do material a ser analisado, costuma-se submeter o material a sucessivas extrações, com solventes de polaridades crescentes, conseguindo-se assim, uma extração fracionada, em que as diferentes frações contêm compostos de polaridades também crescentes. As operações extrativas mais utilizadas são: 1) a maceração: operação na qual a extração da matéria prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em diversas temperaturas, durante

horas ou dias, sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. A matéria prima vegetal não reduz ao esgotamento, seja devido a saturação do líquido extrator ou estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. É importante lembrar que se deve evitar o emprego de água ou misturas hidroalcoólicas com concentrações etanólicas inferiores a 20%, pois estas misturas são favoráveis a proliferação microbiana;<sup>1</sup> 2) Percolação: operação na qual tem característica comum a extração exaustiva das substâncias ativas. Na percolação o material vegetal é moído e colocado em um recipiente cônico ou cilindro (percolador), de vidro ou de metal, através do qual é passado o líquido extrator. Diferente da maceração, a percolação é uma operação dinâmica, indicada na extração de substâncias farmacologicamente muito ativas, presentes em pequenas quantidades ou pouco solúveis e quando o preço da substância ativa a ser extraída é relevante;<sup>1</sup> 3) Soxhlet: é usada para extrair sólidos com solventes voláteis, exigindo o emprego do aparelho Soxhlet, em nível laboratorial, também não deixa de ser um tipo de percolação cíclica, com destilação simultânea e reaproveitamento de solvente. A desvantagem dessa técnica é o emprego da temperatura.<sup>1</sup>

Os extratos vegetais devem ser submetidos a uma investigação preliminar (também conhecida como marcha analítica) dos seus constituintes químicos, através de análises qualitativas que possibilitam o conhecimento prévio da natureza das substâncias presentes no extrato, facilitando a escolha da técnica de fracionamento cromatográfico. As principais classes de constituintes químicos de plantas medicinais que podem ser detectados com aplicação de testes analíticos padrões são: alcalóides, cumarinas, fenólicos (flavonóides, taninos, lignanas e neolignanas), e xantinas, utilizando vários tipos de reveladores específicos. Esta análise fitoquímica preliminar também se constitui em um valioso instrumento utilizado no processo de seleção de plantas para estudos científicos.

As figuras 1, 2, e 3 mostram estruturas de algumas classes de metabólitos secundários encontrados em plantas medicinais, onde cada átomo é representado por uma cor da seguinte maneira: Azul nitrogênio; branco hidrogênio; cinza carbono e vermelho oxigênio.



**Figura 1:** anfetamina.



**Figura 2:** Esculetina, um exemplo de cumarina



**Figura 3:** Robustoflavona

Após a etapa da extração, e conhecimento prévio dos principais constituintes da planta através da aplicação da marcha analítica, o passo seguinte é a semipurificação do extrato bruto obtido, que pode ser realizado utilizando-se uma partição líquido-líquido e/ou métodos cromatográficos.<sup>4</sup>

1) Partição líquido-líquido: na extração líquido-líquido ocorre a partição da amostra em duas fases imiscíveis, uma orgânica e a outra aquosa. A eficiência da extração depende da afinidade do soluto pelo solvente de extração, da razão das fases e do número de extrações.<sup>5</sup> Uma vez que se obteve o extrato, os métodos de partição entre solventes eliminam uma grande parte do material indesejado. Quando se utiliza esse método combinado com testes biológicos, obtêm-se rapidamente, frações enriquecidas com a substância desejada.<sup>6</sup>

2) Métodos cromatográficos: os extratos obtidos na partição líquido-líquido, deveram ser submetidos a diferentes técnicas cromatográficas.<sup>7</sup> São elas: 1) cromatografia em coluna (CC): é um processo de separação entre duas fases, uma sólida e outra líquida, baseado na capacidade de adsorção e solubilidade, onde o equilíbrio dinâmico é estabelecido entre concentração do soluto em duas fases.<sup>8</sup> Em geral, é empregada a cromatografia em coluna aberta (CC), com sílica gel como fase estacionária que, dependendo do extrato, é eluída com uma mistura de solventes a qual foi previamente determinada por cromatografia em camada delgada (CCD). Outros suportes cromatográficos que podem ser usados são: alumina, celulose, poliamida e sephadex. A CC é muito usada devido a sua rapidez, simplicidade, eficiência e baixo custo; 2) cromatografia em camada delgada (CCD): é rápida e largamente usada como um auxílio para seguir uma síntese em laboratório, estabelece evidências presumíveis de pureza exatamente como em cromatografia gasosa (CG);<sup>9</sup> 3) a cromatografia gasosa, é uma das técnicas de análise de maior uso. É utilizada para separação e quantificação de produtos diversos, podendo também ser usada como técnica de identificação, em casos especiais. Na CG a amostra é vaporizada e injetada numa coluna cromatográfica. A eluição é feita por fluxo de um gás inerte que atua como fase móvel (a fase móvel não interage com as moléculas do analito, sua única função é transportar o analito através da coluna).<sup>5</sup>

Após o fracionamento dos extratos ou frações, pode-se obter substâncias que devem ser purificadas. O método mais usado para purificação de compostos é a recristalização. O solvente usado na recristalização deve proporcionar uma fácil dissolução da substância a altas temperaturas e pouca solubilidade da substância a

baixas temperaturas. Esta técnica de recristalização baseia-se na diferença de solubilidade que pode existir entre um composto cristalino e as impurezas presentes no produto da reação.<sup>10</sup> No processo de recristalização, o resfriamento, deve ser feito lentamente para que se permita a disposição das moléculas em retículos cristalinos, com formação de cristais grandes e puros;<sup>1</sup>

Uma vez isolados os compostos ativos, deve-se proceder à elucidação estrutural dos mesmos. Isso é possível principalmente através do uso de aparelhos espectroscópicos ou espectrométricos. O uso de técnicas espectrais em conjunto, como ultravioleta (UV), infravermelho (IV), Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono (RMN <sup>1</sup>H e RMN <sup>13</sup>C) e espectroscopia de massa (EM) aliado ao uso de técnicas sofisticadas de RMN tem permitido propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais complexas.<sup>7, 11</sup>

**Espectro de ultravioleta (UV):** O espectro de absorção de uma substância no UV, uma vez determinado o esqueleto carbonado e o tipo de composto, pode indicar a presença de certos grupos funcionais, bem como a posição dos constituintes no esqueleto da molécula;

**Espectro de Infravermelho (IV):** mostra um rico agregado de bandas de absorção situadas nas regiões de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>.<sup>11</sup> O IV de uma substância orgânica corresponde ao conjunto de bandas de absorção apresentadas pela amostra submetida a radiação infravermelho e estas bandas correspondem às mudanças na energia vibracional dos compostos orgânicos. A energia seletivamente absorvida da radiação IV provoca alterações transitórias nas ligações interatômicas, que podem sofrer estiramentos ou deformações nos ângulos de ligação. As frequências em que ocorrem as vibrações dependem da natureza das ligações em particular, mas são também afetadas pela vizinhança química e pela molécula como um todo. A presença de insaturações, sistemas aromáticos e grupos funcionais específicos, pode ser verificada através da presença de bandas características, que tem grande importância na análise estrutural;

**Espectros de Massas (EM):** este tipo de espectroscopia pode fornecer importantes informações relacionadas com sua estrutura, como a massa molecular e padrões de fragmentação. O peso molecular permite estabelecer a fórmula molecular da substância, enquanto o padrão de fragmentação pode ajudar a caracterizar a presença e cadeias laterais.

**Espectroscopia de Ressonância Magnética (RMN):** é uma ferramenta muito valiosa para a determinação de estruturas de compostos orgânicos, contribuindo para o

estabelecimento do esqueleto da molécula.<sup>1</sup> Este sistema permite a análise de pequenas quantidades de compostos puros, com grande precisão em escala de miligramas ou microgramas.<sup>11</sup> O espectro de hidrogênio fornece os deslocamentos químicos dos vários tipos de átomos de hidrogênio presentes na molécula, o número de cada tipo de hidrogênio (integração) e as constantes de acoplamento com cada tipo de hidrogênio que ficam sobre carbonos adjacentes.<sup>11</sup> A integração permite calcular a porcentagem de cada componente em uma mistura simples. Irradiando seletivamente a frequência de ressonância de um hidrogênio, seus acoplamentos podem ser eliminados e o resultado é uma simplificação dos sinais dos átomos de hidrogênio próximos ao próton irradiado. O espectro de Ressonância Magnética Nuclear de carbono (RMN <sup>13</sup>C) fornece os deslocamentos químicos dos vários tipos de carbonos presentes na molécula. Estão distribuídos em um campo de 0-220 ppm, muito mais amplo do que os de hidrogênio que é de 0-16 ppm, permitindo uma melhor visualização dos tipos de carbono.<sup>11</sup> A grande variedade de técnicas disponíveis de RMN permite identificar a proximidade espacial ou mesmo a conectividade de alguns átomos em particular, auxiliando dessa maneira, a montagem do quebra-cabeça constituído pelas diferentes partes da molécula de um metabólito secundário.

### **3.2. *Melaleuca alternifolia***

Espécies da família Myrtaceae encontram-se distribuídas em regiões tropicais e subtropicais<sup>12</sup>, sendo divididas em duas subfamílias: Myrtoidea, de ampla ocorrência na América tropical e Leptospermoideae, que ocorre, principalmente, na Austrália, Malásia e Polinésia. O gênero *Melaleuca*, pertencente à subfamília Leptospermoideae, inclui aproximadamente 100 espécies nativas da Austrália e Ilhas do Oceano Índico<sup>13</sup>. *Melaleuca alternifolia* Cheel é comumente conhecida na Austrália como "árvore de chá", florescendo principalmente em áreas de pântano, próximas de rios<sup>14</sup>.

A constituição química do óleo essencial das folhas de *M. alternifolia* é bem conhecida<sup>14, 15</sup>, sendo este rico em terpinen-4-ol (1-3%), um monoterpenóide, principal responsável por suas propriedades medicinais, principalmente antifúngicas e antibacterianas, garantindo-lhe importância comercial há mais de 60 anos<sup>14</sup>.

Embora vários trabalhos relatando a composição química de óleos essenciais de folhas de *M. alternifolia* sejam encontrados na literatura, nenhum estudo químico de outras partes desta planta foi ainda descrito. Entretanto, para outras espécies deste gênero, tais como *M. rhapsiphylla*<sup>16</sup>, *M. leucadendron*<sup>17, 18</sup>, *M. quinquenervea*<sup>19, 20</sup> e *M. huegelii*<sup>21</sup>, vários estudos foram descritos, na qual observa-se uma predominância de flavonóides e triterpenos.



**Figura 4:** Fotos da árvore, folhas e flores de *Melaleuca alternifolia*

### 3.3. Atividade Biológica

As plantas medicinais, pelo seu amplo potencial terapêutico, tem proporcionado uma nova visão na pesquisa de produtos naturais e isto vem mudando sistematicamente a abordagem da fitoquímica clássica, pela introdução de ensaios biológicos paralelos ao estudo das propriedades químicas. Atualmente a pesquisa nesta área está voltada à

procura de substâncias com atividade biológica, no sentido de dar uma base científica à medicina alternativa. Muitos compostos novos são isolados, caracterizados e publicados sem qualquer acompanhamento biológico, podendo sua atividade ficar desconhecida por vários anos, tornando a descoberta de novos constituintes de plantas medicinais como pura fitoquímica.<sup>22</sup>

O isolamento de moléculas bioativas pode levar ao desenvolvimento de novos fármacos. Essas moléculas ainda podem servir de estrutura base para o desenvolvimento de fármacos semi-sintéticos, e estes podem ser mais seletivos e/ou não ativos que a molécula original. A orientação dessa síntese é feita através de estudos baseados na reação estrutura e atividade.<sup>23,24,25</sup> Para ser compatível com o grande número de amostras a serem testadas o fracionamento guiado pela atividade requer um bioensaio simples, reprodutível, rápido e de baixo custo.<sup>26</sup>

A literatura relata inúmeros ensaios biológicos para as mais diversas atividades, com o objetivo de monitorar as atividades biológicas das espécies vegetais, durante seu estudo fitoquímico. Entre eles destacam-se os ensaios de toxicidade à *Artemia salina*, antioxidante, alelopático, antiinflamatório, analgésico, entre outros.

### **3.4. Atividade Antioxidante**

Os radicais livres como agentes nocivos ao organismo humano têm sido amplamente discutidos nos últimos anos. São produzidos naturalmente no nosso corpo através da irradiação ionizante, luz ultravioleta, por reações catalisadas pelos metais de transição ou enzimas e também durante o metabolismo normal do oxigênio.<sup>27</sup> Esses radicais desencadeiam reações diversas e indesejáveis provocando alterações no sistema biológico e conseqüentemente, o envolvimento em processos fisiopatológicos como doenças cardiovasculares, câncer, inflamações, aterosclerose, envelhecimento, entre outros.<sup>28</sup>

Espécies reativas de metabolismo do oxigênio (ERMO) tais como oxigênio singlete, peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radicais hidroxil são frequentemente gerados como subprodutos de reações biológicas ou de fatores exógenos.<sup>29</sup> Esses radicais e outras espécies de oxigênio reativo, derivados deles, reagem com membranas biológicas induzindo a peroxidação lipídica e são responsáveis

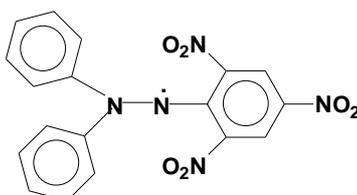
por vários efeitos deletérios nas células e tecido, que basicamente dependem da estrutura sub-celular onde eles são gerados.<sup>30</sup> O alto consumo de produtos naturais vegetais pode estar associado à baixa incidência de doenças degenerativas, incluindo câncer, cardiopatias, inflamações, artrites, deficiência do sistema imunológico, disfunção muscular e cataratas.<sup>31,32</sup> Estes efeitos protetores são considerados, em grande parte, relacionados aos vários antioxidantes contidos neles. Existem evidências indicando que os radicais livres causam danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucléicos. Portanto, antioxidantes capazes de inibir ou retardar a oxidação de um substrato oxidável na cadeia da reação, teria um papel importante na prevenção de inúmeras doenças.<sup>30,33,34</sup> Um potente capturador de ERMO certamente intervém na prevenção de doenças mediadas por radicais livres.<sup>35</sup> Este fato tem concentrado muitas pesquisas na busca de antioxidantes naturais objetivando basicamente o desenvolvimento de preparações farmacêuticas de origem vegetal.

Os antioxidantes são substâncias que podem ser de origem sintética ou natural e capazes de se unir aos radicais livres inibindo ou retardando a sua ação oxidativa. Eles reagem com os radicais livres interrompendo sua propagação, convertendo-os em produtos estáveis pela doação de átomos de hidrogênio ou elétrons. Quando o hidrogênio é capturado pelo radical livre temos aí um outro radical formado a partir do antioxidante, o qual deve ter baixa reatividade, que por sua vez depende da estabilização da estrutura por ressonância. Obviamente esse novo radical formado pela neutralização de um radical livre, não poderia potencialmente neutralizar outro radical livre como antioxidante, a menos que seja regenerado na sua forma original. Essa regeneração pode ser feita por outros antioxidantes chamados sinérgicos, que tem a capacidade de estabilizar o radical livre derivado da estabilização do primeiro antioxidante. Nesse caso se obtém um sinergismo que torna o sistema ativo e eficiente, aumentando a eficiência de um antioxidante, podendo assim, ser utilizado em concentrações menores.<sup>28,36</sup> Alguns flavonóides como a quercetina, morina, rutina e catequina são obtidos em escala industrial e utilizados como substância de partida para a síntese de diferentes produtos farmacêuticos e homeopáticos. Muitos compostos naturais estão nas linhas de pesquisa para a atividade antioxidante, principalmente os fenólicos, os quais vem mostrando ótimos resultados.<sup>37</sup>

Diversos modelos são utilizados para a avaliação prévia de substâncias ou extratos vegetais com possível atividade antioxidante.<sup>39,40</sup> Dentre eles merece destaque pela simplicidade e facilidade de ser introduzido como ensaio de bancada em

laboratórios de fitoquímica é o método espectrofotométrico utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

A redução do radical DPPH, cuja estrutura é mostrada na figura 5, é muito usado para medir a capacidade antioxidante de compostos geralmente fenólicos em um tempo relativamente curto com outros métodos.<sup>41</sup>



**Figura 5:** Estrutura química do DPPH

A atividade antioxidante nos extratos vegetais está diretamente relacionada com a presença de antioxidantes naturais, sendo os representantes mais proeminentes, os carotenóides, ácido ascórbico, tocoferóis, flavonóides e compostos fenólicos de maneira geral, que protegem o corpo humano dos radicais livres e retarda o progresso de muitas doenças crônicas.

Portanto a atividade antioxidante determinada pelo radical livre DPPH está diretamente relacionada com a presença de compostos fenólicos, entre eles os flavonóides nos extratos vegetais. O radical DPPH de coloração roxa captura um hidrogênio da hidroxila fenólica do flavonóide, por exemplo, resultando em um radical livre ariloxil estabilizado por ressonância.

### 3.5. Determinação dos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos existentes nas plantas possuem em comum um anel aromático rodeado por um ou mais grupos hidroxila. A maioria deles é solúvel em água e ocorre na forma de glicosídeos. Entre os compostos fenólicos encontram-se, por exemplo, as cumarinas, flavonóides, catequinas, taninos entre outros. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos é devida principalmente a captura de radicais livres, os quais produzem efeitos deletérios ao organismo. Portanto quanto maior a

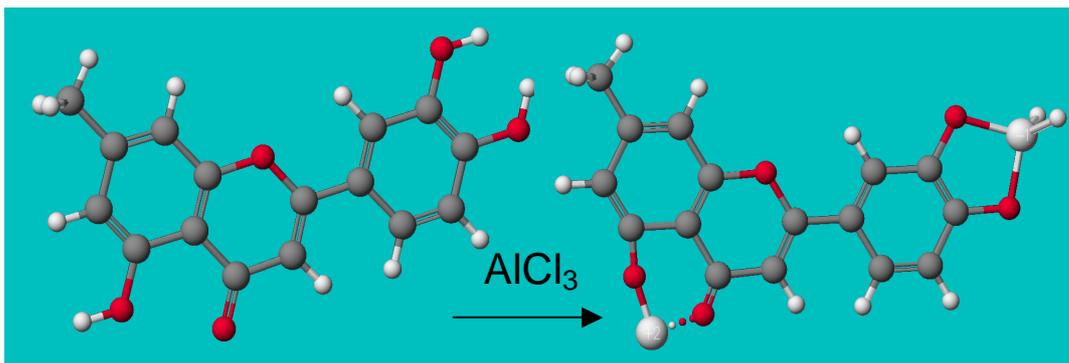
quantidade de fenólicos nos extrato vegetais deve-se esperar uma maior atividade antioxidante. Um método útil para avaliação do conteúdo de fenólicos nos extratos vegetais por sua simplicidade, é o método espectrofotométrico que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu. O reagente de Folin-Ciocalteu reage com os fenólicos existentes no extrato ou substância reduzindo-se com a formação de um complexo de coloração azul, conhecido como azul – da – Prússia

### **3.6 Determinação do Conteúdo de Flavonóides**

Os flavonóides têm ação antioxidante, minimizando a peroxidação lipídica e o efeito dos radicais livres. Foi demonstrado que indivíduos que ingerem maiores quantidades de flavonóides, os quais são encontrados em alimentos de origem vegetal (verduras, frutas, chá, mel etc.) apresentam uma diminuição considerável do risco de morte por acidentes cardiovasculares (infarto do miocárdio, trombose, derrame etc...).

As propriedades antioxidantes dos flavonóides se deve a diferentes mecanismos, tais como captura de radicais livres, pela ação de íons metálicos como o ferro e cobre, e inibição de enzimas responsáveis pela geração de radicais livres. Flavonóides são compostos fenólicos que possuem um grande número de grupos hidroxila com grande habilidade de doar hidrogênio, cujo radical ariloxil formado após a doação de hidrogênio no processo de captura de radicais livres pode ser estabilizado por ressonância .

Um método espectrofotométrico utilizado para a determinação do conteúdo de flavonóides usa o cloreto de alumínio. O cátion alumínio forma complexos estáveis com os flavonóides em metanol, ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de ondas e uma intensificação da absorção. Desta maneira, é possível determinar a quantidade de flavonóides, impedindo-se a interferência das outras substâncias fenólicas. Nestas condições o complexo Flavonóide-Alumínio como mostra a figura 6, absorve em comprimentos de ondas maiores do que o flavonóides sem a presença do complexante.



**Figura 6:** Reação do flavonóide com alumínio formando um complexo

### 3.7. Estudos Preliminares (Marcha analítica)

Os extratos vegetais devem ser submetidos a uma investigação preliminar dos seus constituintes químicos, através de análises qualitativas e de cromatografia de camada delgada (CCD), no qual possibilita o conhecimento prévio e indica a natureza das substâncias presentes no extrato, facilitando a escolha da técnica de fracionamento cromatográfico. As principais classes de constituintes químicos de plantas medicinais que podem ser detectados com aplicação de testes analíticos padrões são: alcalóides, cumarinas, fenóis (flavonóides, taninos, lignanas e neolignanas), e xantinas, utilizando vários tipos de reveladores específicos. Esta análise fitoquímica preliminar também se constitui em um valioso instrumento utilizado no processo de seleção de plantas para estudos científicos.

## 4. OBJETIVO

### 4.1. Objetivos Gerais

O objetivo central do presente trabalho é desenvolver o estudo fitoquímico preliminar de *Melaleuca alternifolia* e aplicação do teste para avaliar o conteúdo de flavonóides e fenólicos assim como sua atividade antioxidante.

### 4.2. Objetivos Específicos

- a) Fazer pesquisa bibliográfica envolvendo a espécie vegetal estudada;
- b) Obter o extrato bruto da planta por maceração em etanol;
- c) Realizar ensaios qualitativos para a determinação das classes de produtos naturais presentes no extrato, através de marcha analítica;
- d) Particionamento líquido-líquido do extrato bruto vegetal com hexano, acetato de etila e n-butanol;
- e) Aplicar os ensaios de atividade antioxidante usando DPPH, assim como determinar o conteúdo fenólico e de flavonóides no extrato e frações de *M. alternifolia*;
- e) Analisar por espectroscopia os possíveis compostos isolados a partir do vegetal.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Equipamentos e reagentes

As vidrarias necessárias para o manuseio das amostras e realização dos testes são comuns em laboratórios de química. Os solventes utilizados, como etanol, hexano, acetato de etila, foram obtidos comercialmente, os demais reagentes usados eram de pureza analítica e foram utilizados sem tratamento prévio. O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) foi obtido pela Aldrich.

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em Espectrômetro UV-VIS, Hitache 2000. Para determinação estrutural utilizou-se Infravermelho, PERKIN ELMER – FT 16 PC, Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear, BRUKER 200 MHz.

### 5.2. Obtenção do extrato hidroalcoólico bruto

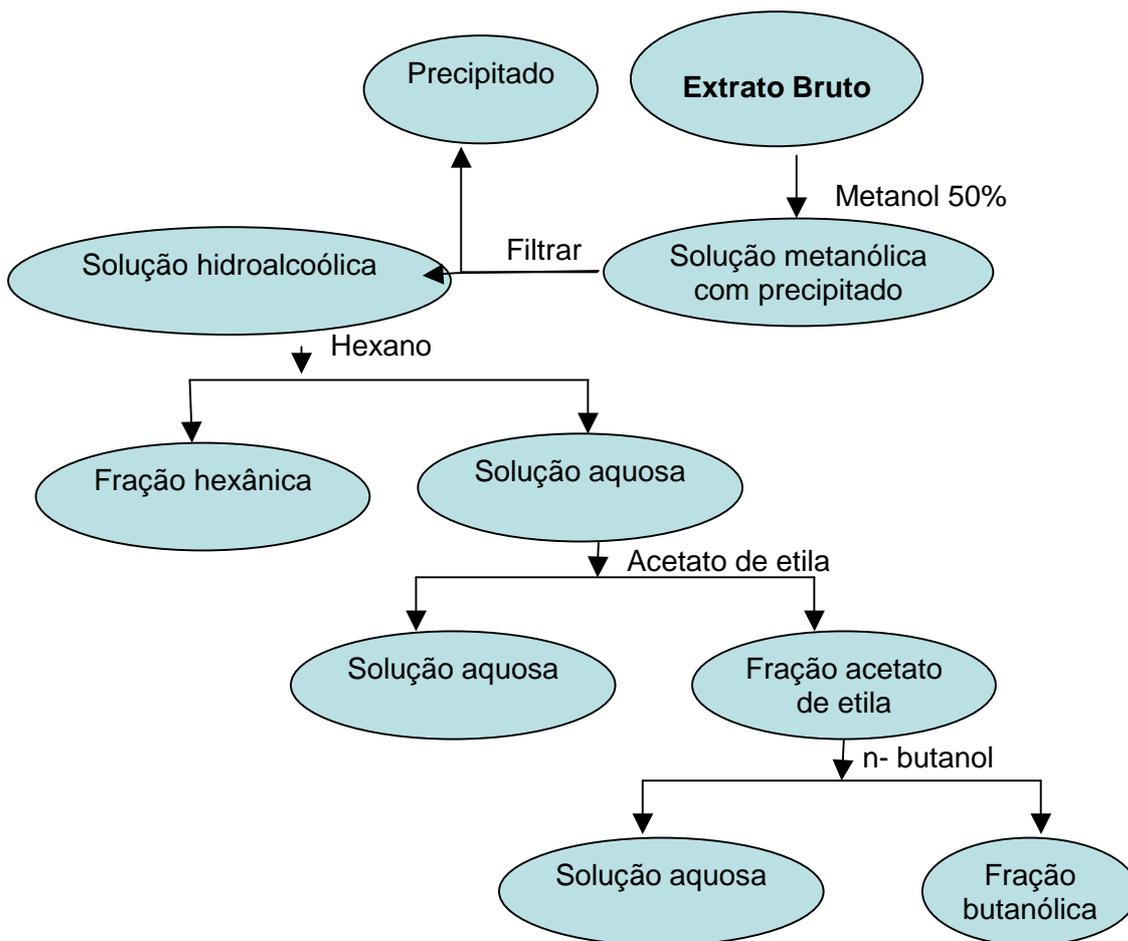
Para obtenção do extrato hidroalcoólicos bruto, foram utilizados 361g de folhas de material vegetal seco em estufa de circulação de ar a temperatura < 40 °C. O material vegetal seco foi triturado e macerado em álcool etílico de grau comercial, e acondicionados em frasco de vidro à temperatura ambiente durante dez dias. O macerado foi filtrado e evaporado em evaporador rotatório sob pressão reduzida (temperatura de aproximadamente 60°C). Obtendo-se cerca de 23,12g do extrato bruto seco.

### 5.3. Particionamento do extrato bruto de *Melaleuca alternifolia*

À 13,0 g do extrato bruto seco foram adicionados 100mL de metanol:água 1:1 obtendo-se um precipitado. Esta solução foi filtrada e após esta etapa deu-se início a uma extração líquido-líquido ao filtrado com solventes de distintas polaridades: i) n-hexano, ii) acetato de etila, iii) n-butanol para originar as frações hexano, acetato de

etila, n-butanol e aquosa. Estas frações foram concentradas sob pressão reduzida até completa eliminação do solvente e armazenadas em lugares apropriados. Figura 7.

O precipitado foi submetido a uma purificação por recristalização em acetona. o composto recristalizado foi submetido a estudos espectroscópicos.

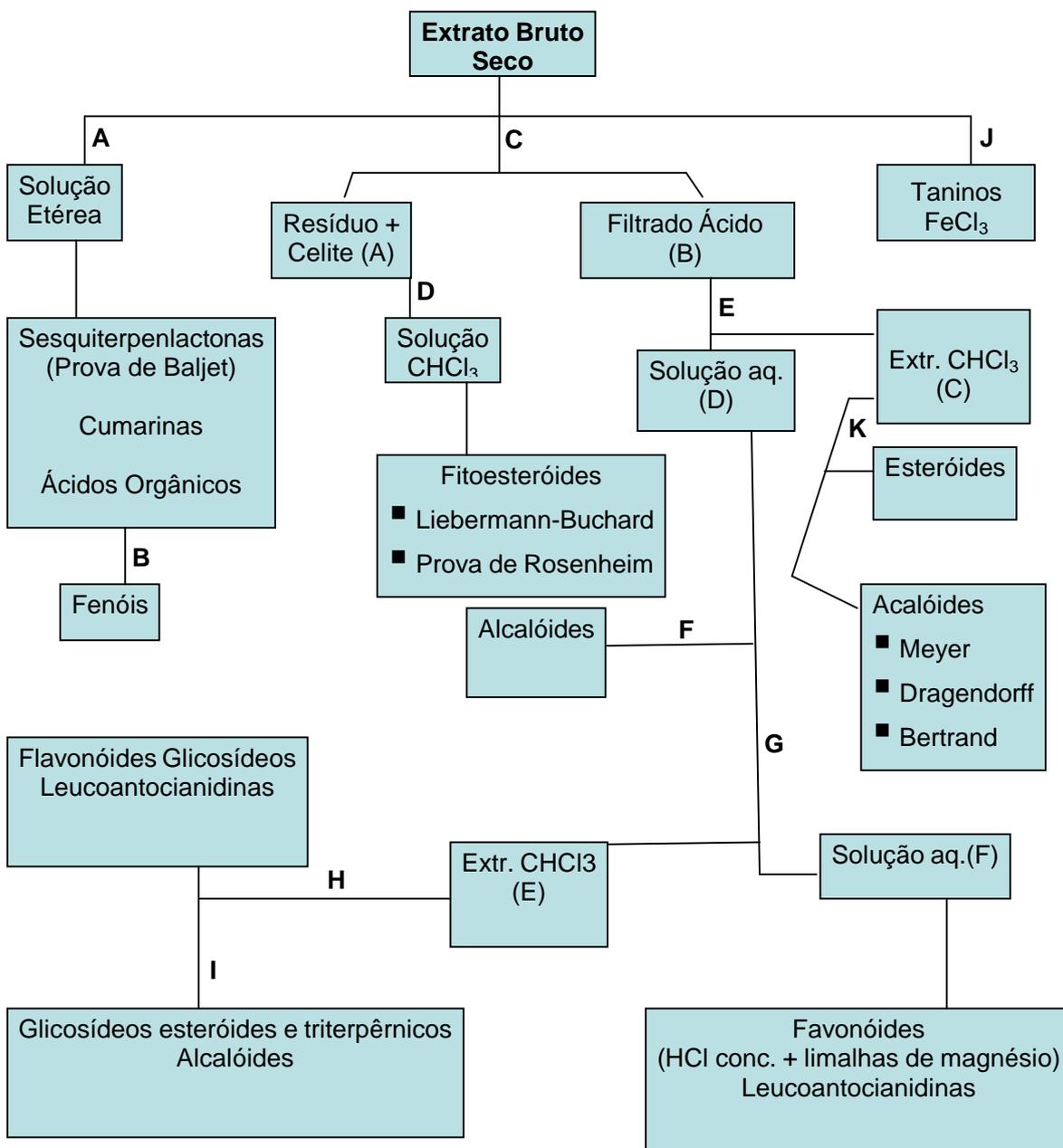


**Figura 7:** Fluxograma representando a separação do extrato bruto em frações

#### 5.4. Investigação química preliminar

Foram feitos estudos sobre os possíveis princípios ativos presentes na *Melaleuca alternifolia*, sendo realizados os ensaios qualitativos preliminares, a partir dos extratos brutos, seguindo a marcha analítica, conforme o esquema da figura 8. Esta marcha

analítica permite detectar classes de metabólitos secundários de plantas como alcalóides, flavonóides, terpenos, entre outros.



Legenda: **A:** 1-metanol/água 1:1, 2- HCl pH=1, 3-Extração c/ éter; **B:** 1- secar, 2- água; **C:** 1- HCl 1%,2 filtrar; **D:** 1- HCl<sub>3</sub>, 2- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, **E:** NH<sub>4</sub>OH, pH=10 extração c/ clorofórmio; **F:** HCl 10% manter o pH entre 2,5-3,0; **G:** extração com clorofórmio:etanol 3:2; **H:** 1- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2- secar; **I:** etanol; **J:** água; **K:** 1- Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2- secar.

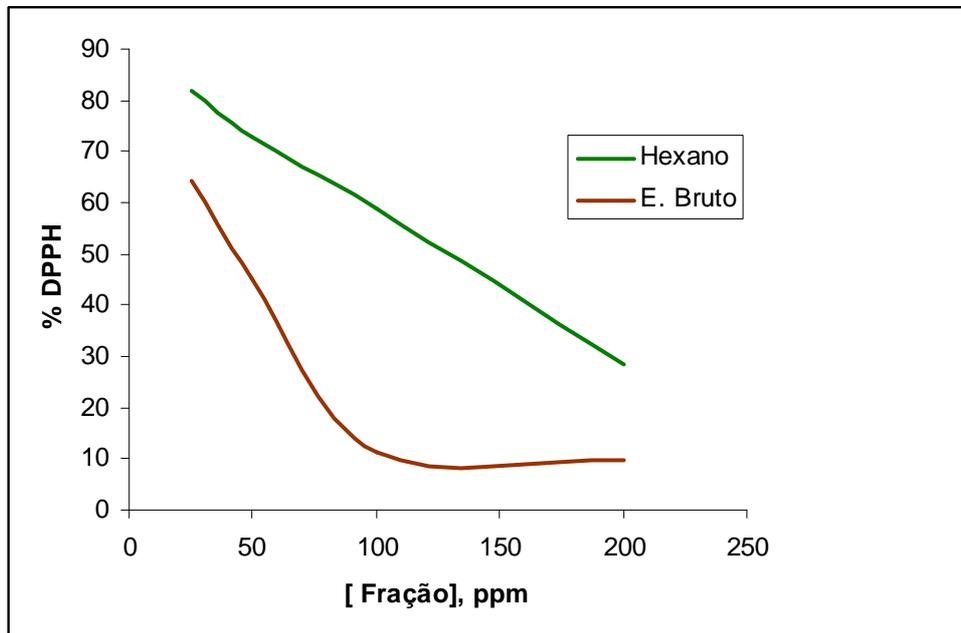
**Figura 8:** Fluxograma da marcha analítica

## 5.5. Ensaio antioxidante com DPPH

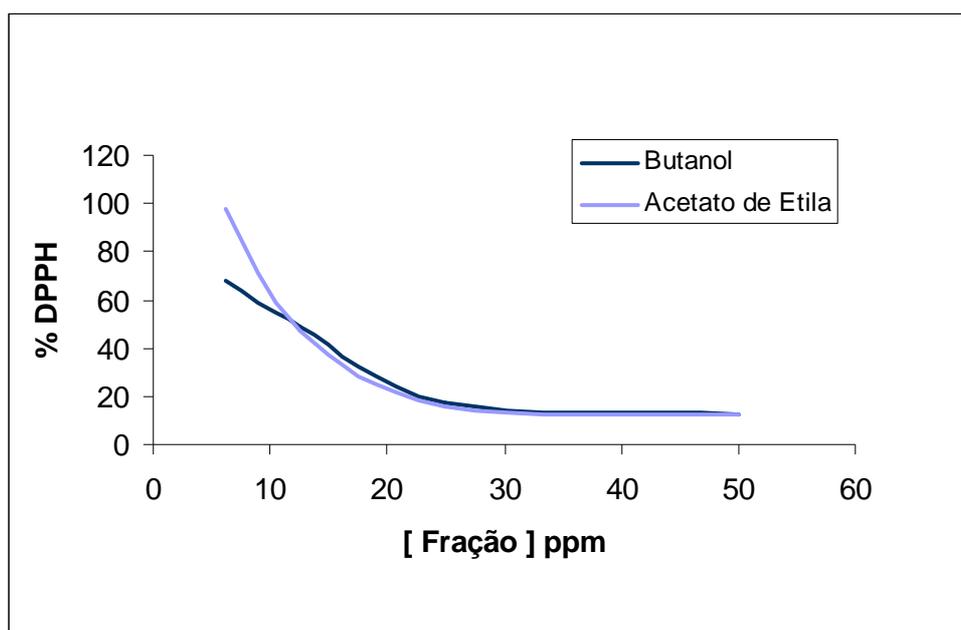
Uma solução de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 0,004% em metanol é adicionada sobre a solução teste, também em metanol, nas concentrações a 200-2,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O teste foi feito em triplicata. A mistura foi agitada e após trinta minutos, foi feita a leitura em um espectrofotômetro a 517nm. Uma solução de DPPH 0,004% (2mL) e metanol (1mL) corresponde a 100% de absorvância ( $A_{\text{controle}}$ ). A absorvância do teste é medida através da solução do extrato (1mL) e DPPH (2mL) a qual é descontada a absorvância do extrato ( $A_{\text{branco}}$ ) que consiste numa solução de extrato bruto (1mL) e metanol (2mL). A percentagem de atividade antioxidante é dada pela fórmula:

$$\%AA = 100 - [(A_{\text{teste}} - A_{\text{branco}} \times 100) / A_{\text{controle}}]$$

O gráfico da percentagem de atividade antioxidante em função da concentração do extrato vegetal, fornece a  $IC_{50}$ , a concentração do extrato necessária para causar cinquenta por cento de atividade antioxidante, que é um valor utilizado na avaliação da atividade antioxidante.



**Figura 9:** %DPPH no extrato bruto e fração hexânica de *M. alternifolia*



**Figura 10:** %DPPH nas frações acetato de etila e butanólica de *M. alternifolia*

## 5.6. Determinação de Fenólicos

A quantidade de fenólicos é determinada usando o reagente Folin-Ciocalteu. Esse método consiste na mistura de 0,5 mL do extrato, 5,0 mL de água destilada e 0,5 mL de Folin-Ciocalteu. Após o período de três minutos, 1,0 mL de carbonato de sódio saturado é adicionado. A mistura é agitada e após uma hora iniciam-se as medidas. A absorvância é medida a 725 nm no espectrofotômetro de UV-Vis. É feita uma curva de calibração com ácido gálico ( $y = 5,51x + 1,77$ ;  $r = 0,997$ ) e os resultados expressos em mg de ácido gálico / g de extrato.

## 5.7. Determinação de Flavonóides

A determinação do conteúdo flavonóides é feita através do método Quettier-Deleu. Esse método consiste na mistura de 0,5 mL de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) 2% , 0,5 mL de extrato e 2,5 mL de etanol . A Absorbância é medida em 415 nm após uma hora de espera. A quantidade de flavonóides totais é obtida através de uma curva de calibração feita com quercetina ( $y = 8,78x - 0,869$ ;  $r = 0,999$ ) e os resultados expressos em equivalentes de quercetina/g de extrato.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Embora existam vários trabalhos relatando a composição química de óleos essenciais de folhas de *Melaleuca alternifolia* encontrados na literatura, poucos estudos químicos de outras partes desta planta foram descritos. Sendo assim, torna-se interessante realizar estudos fitoquímicos desta planta, a fim de isolar possíveis compostos que exibam atividade.

### 6.1. Análise do Estudo Preliminar (Marcha Química)

A marcha analítica preliminar aplicada ao extrato bruto, das folhas de *Melaleuca alternifolia* mostrou grande diversidade de compostos secundários. Na tabela 1 encontram-se os resultados dos ensaios qualitativos realizados para a determinação das classes de produtos naturais presentes no extrato obtido. Entre eles destacam-se os esteróides, glicosídeos esteroidais e triterpênicos, flavonóides e taninos.

**Tabela 1:** Resultado da aplicação da Marcha Analítica no Extrato Bruto

Classes de Produtos Naturais	Extrato Bruto	Classes de Produtos Naturais	Extrato Bruto
Fitoesteróis (A)	Sim	Flavonóides Glicosídeos (E)	Não
Esteróides (C)	Sim	Leucoantocianidinas(E)	Não
Alcalóides (C)	Não	Glicosídeos esteroidais (E)	Sim
Alcalóides (D)	Não	Triterpênicos (E)	Sim
Flavonóides (F)	Sim	Alcalóides (E)	Não
Leucoantocianidinas(F)	Não	Taninos	Sim

### 6.2. Análise do ensaio para avaliação de fenólicos totais

Este bioensaio também é utilizado para a avaliação antioxidante dos extratos e frações, porém, ele detecta apenas os fenólicos presentes. Uma cor azul-da-prússia

indica a presença de fenólicos no extrato ou frações, portanto, quanto maior a intensificação dessa cor, maior a quantidade de fenólicos no extrato. A quantidade de fenólicos totais nos extratos e frações pode ser observada na tabela 2.

**Tabela 2:** Conteúdo de fenóis totais dos extratos e frações da *M. alternifolia*

<b>Extrato/frações</b>	<b>Fenólicos totais (mg ac.gálico/g de extrato)</b>
Extrato Bruto	69,31
Hexânico	31,58
Acetato de Etila	280,22
n- butanólica	280,13

As frações que obtiveram maior concentração de fenólicos foi a acetato de etila e n-butanólica (280,22 e 280,13 miligramas de ácido gálico por gramas de extrato), e levando em conta a quantidade de fenólicos apresentada pelas frações e extrato bruto deve-se incentivar um maior estudo dessas, a fim de isolarmos compostos responsáveis por essa atividade.

### 6.3. Análise do ensaio para avaliação de flavonóides totais

Esse ensaio é feito usando como reagente o cloreto de ferro III, que forma um complexo com o flavonóide deixando a solução verde-escura. Quanto maior a concentração de flavonóides no extrato ou fração maior será a intensidade da coloração. A quantidade de flavonóides nos extratos e frações pode ser observada na tabela 3.

**Tabela 3:** Conteúdo de flavonóides totais dos extratos e frações da *M. alternifolia*

<b>Extrato/frações</b>	<b>Flavonóides totais (mg quercetina/g de extrato)</b>
Extrato Bruto	64,96
Hexânico	82,21
Acetato de Etila	185,17
n- butanólica	220,60

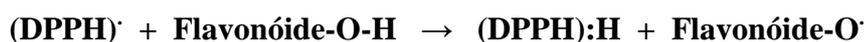
De acordo com os resultados mostrados, a fração que apresentou maior concentração de flavonóides foi a n-butanólica seguida da acetato de etila ( 220,60 e 185,17 mg quercetina por gramas do extrato) respectivamente. Devido a esses resultados, podemos dizer que a maior parte de fenólicos encontrados nessas frações é constituído de flavonóides.

Levando em conta a grande importância dos flavonóides para a prevenção de diversas doenças, devemos nos preocupar em isolar esse tipo de metabólito.

#### **6.4. Análise do Bioensaio para Atividade Antioxidante**

O bioensaio que utiliza o radical livre DPPH é utilizado para determinar possível atividade antioxidante de extratos vegetais. Este radical é relativamente estável, de forte coloração azulada e suficientemente solúvel em álcoois miscíveis em água, como o metanol.

A ação seqüestrante de elétrons de radicais livres pelo DPPH deve-se a reação deste com compostos, geralmente fenólicos, pela abstração de um radical hidrogênio de acordo com a equação:



A solução metanólica de DPPH 0,004% é progressivamente descorada com a adição do extrato, e, quanto maior for a atividade antioxidante do extrato, maior será a descoloração da solução. Foram testados o extrato bruto e as frações obtidas a partir deste extrato de *Melaleuca alternifolia*. Os gráficos de porcentagem do DPPH, medidos a 517 nm no espectrofotômetro UV-VIS em função da concentração do extrato bruto e frações (6,5 – 200ppm) é mostrado nas figuras 9 e 10. A percentagem de atividade antioxidante é dada pela diminuição da %DPPH. O valor de IC<sub>50</sub> para o extrato bruto e frações encontram-se na tabela 4. Pode-se notar que todas as frações e o extrato bruto apresentaram atividade antioxidante, sendo que fração acetato de etila foi a que apresentou maior atividade seguida da n-butanólica, sendo que ambas apresentam atividade antioxidante maior que o BHT e o ácido ascórbico.

**Tabela 4:** Atividade antioxidante do extrato e frações de *M. alternifolia*

Extrato / Frações	Folhas (IC <sub>50</sub> , µg/mL)
Extrato Bruto	46,66
Fração Hexânica	126,6
Fração Acetato de Etila	11,73
Fração n-Butanol	12,04
BHT	17,3
Ácido Ascórbico	21,5

### 6.5. Análise do estudo espectroscópico do precipitado da *Melaleuca alternifolia*

Um precipitado foi obtido após a suspensão do extrato bruto seco em uma mistura de metanol/água 1:1, sem a necessidade de técnicas de separação convencionalmente usadas em laboratório de fitoquímica. Este precipitado foi submetido a uma recristalização em acetona, a fim de purificá-lo para posterior análises espectroscópicas.

Após a recristalização do precipitado em acetona, o purificado foi submetidos à análise do infravermelho (Anexo 1), o espectro nos mostrou uma absorção em 3418 cm<sup>-1</sup> relativa a absorção de grupo –OH e outra absorção intensa em 2939 cm<sup>-1</sup> característica do estiramento da ligação C-H. A banda de absorção em 1688 cm<sup>-1</sup> indica a presença do grupo funcional carbonila. A observação da banda da C=O e do –OH sugerem a presença de um grupo ácido carboxílico na molécula. A banda intensa de C-H em relação a banda da carbonila implica que esta seja uma estrutura triterpênica (Figura 11). Observa-se também absorção devido ao grupo exo-metileno em 1639 e 883cm<sup>-1</sup>.

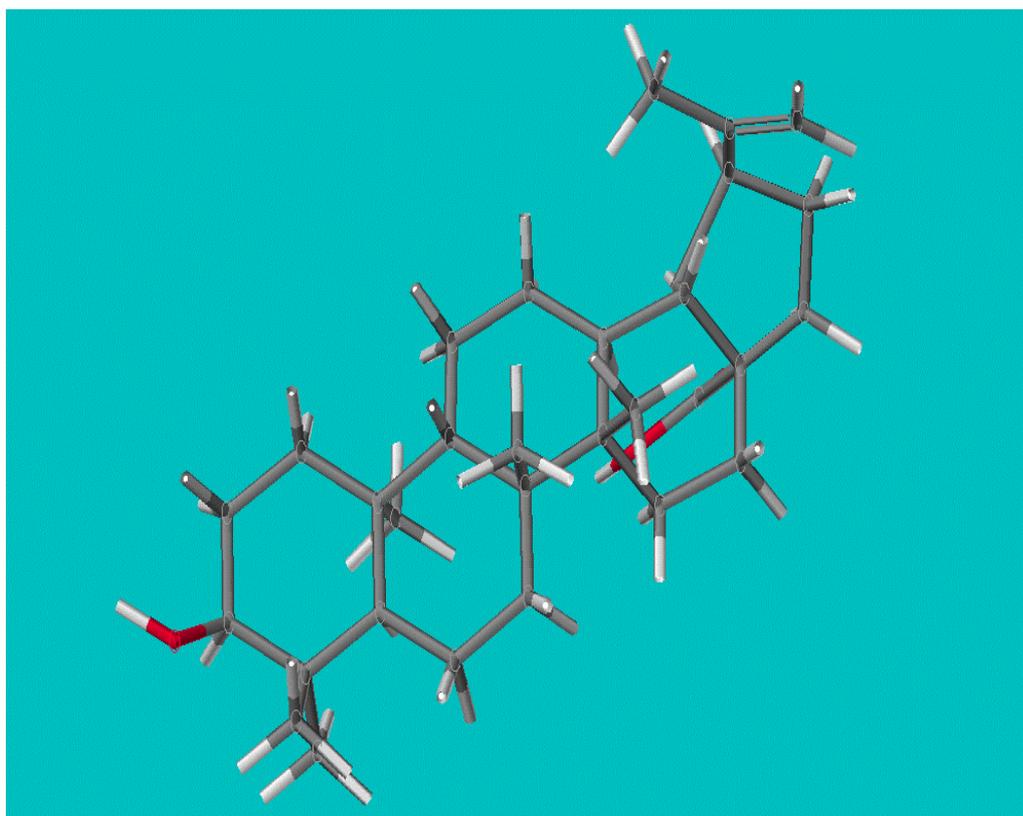
O espectro de RMN <sup>1</sup>H apresenta um perfil característico de triterpenos para esta estrutura. Pode-se observar a presença de uma ligação dupla dissubstituída (terminal) pela absorção dos átomos de hidrogênio olefínicos posicionados em δ 4,70 e 4,59 ppm. Em δ 4,70 ( 1H, s) e δ 4,59 ( 1H, s ), que juntamente com a absorção em δ 1,69 (3H, s ) caracterizam uma classe de triterpeno com o esqueleto lupeno. Um sinal para hidrogênio de carbono metínico exibindo um grupo hidroxil (δ 3,12, dd; J= 4,8 e 11,6

Hz), também este presente no espectro de RMN  $H^1$  (Anexo 2). Além disso, cinco singletos relativos a outras cinco metilas são observadas em  $\delta$  0,94 (C-23, 3H),  $\delta$  0,74 (C-24, 3H),  $\delta$  0,85 (C-25, 3H),  $\delta$  0,96 (C-26, 3H) e  $\delta$  1,00 (C-27, 3H).

O espectro de RMN  $^{13}C$  confirmou a estrutura como sendo o ácido betulínico (Figura 11). O espectro (Anexo 3) mostrou sinais apropriados para o grupo isopropileno ligado ao C-19, exibindo os valores de  $\delta$  150,80 (C-20),  $\delta$  109,00 (C-29) para os carbonos de ligação dupla. Observou-se também os sinais de  $\delta$  178,90 para o carbono carboxílico e  $\delta$  78,46 para o carbono ligado ao grupo OH.

O espectro de RMN  $^{13}C$ /DEPT (anexo 4) juntamente com o número de carbonos e os dados encontrados na literatura (tabela 5), possibilitaram a identificação da substância como sendo o ácido betulínico. (ac.  $3\beta$  hidroxil-20(29)- lupen-28-óico), um triterpenóide com esqueleto lupeno estrutura da figura 11.

Triterpenos do grupo lupeno são um dos três maiores grupos de triterpenóides pentacíclicos em fontes naturais, e mostram potente atividade anti-câncer e anti-HIV.<sup>42,43</sup>



**Figura 11:** Estrutura do ácido betulínico

**Tabela 5:** Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  e RMN  $^1\text{H}$  para ácido betulínico, comparando com dados da literatura

<b>Carbono</b>	<b>Literatura <sup>44</sup></b> RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	<b>Literatura <sup>45</sup></b> RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	<b>Dados Experimentais</b> RMN $^{13}\text{C}$ ( $\text{CD}_3\text{OD}$ )	<b>Hidrogênio</b>	<b>Literatura <sup>45</sup></b> RMN $^1\text{H}$	<b>Dados Experimentais</b>
C-1 ( $\text{CH}_2$ )	38,7	38,8	38,7	H-1 $\alpha$	0,83	
C-2 ( $\text{CH}_2$ )	27,4	27,5	26,8	H-1 $\beta$	1,57	
C-3 ( $\text{CH}$ )	78,9	77,4	78,4	H-2	1,45	
C-4 (C)	38,8	38,9	38,8	H-3	2,98	3,11
C-5 ( $\text{CH}$ )	55,3	55,4	55,6	H-5	0,60	
C-6 ( $\text{CH}_2$ )	18,3	18,4	18,3	H-6 $\alpha$	1,44	
C-7 ( $\text{CH}_2$ )	34,3	34,4	34,3	H-6 $\beta$	1,32	
C-8 ( $\text{CH}$ )	40,7	40,7	40,7	H-7	1,31	
C-9 ( $\text{CH}$ )	50,5	50,4	50,8	H-9	1,22	
C-10 (C)	37,2	37,1	37,1	H-11 $\alpha$	1,36	
C-11 ( $\text{CH}_2$ )	20,8	20,9	20,8	H-11 $\beta$	1,18	
C-12 ( $\text{CH}_2$ )	25,5	25,3	25,6	H-12 $\alpha$	0,96	
C-13 ( $\text{CH}$ )	38,4	38,0	38,4	H-12 $\beta$	1,62	
C-14 (C)	42,4	42,4	42,3	H-13	2,24	
C-15 ( $\text{CH}_2$ )	30,5	29,6	30,5	H-15	1,08	
C-16 ( $\text{CH}_2$ )	32,1	32,2	32,1	H-16	2,14	
C-17 (C)	56,3	55,8	56,2	H-18	1,49	
C-18 ( $\text{CH}$ )	46,8	47		H-19	2,96	3,01
C-19 ( $\text{CH}$ )	49,2	49,1	49,2	H-21 $\alpha$	1,32	
C-20 (C)	150,3	150,6	150,8	H-21 $\beta$	1,82	
C-21 ( $\text{CH}_2$ )	29,7	30,6	29,6	H-22 $\alpha$	1,38	
C-22 ( $\text{CH}_2$ )	37,0	37,0	36,9	H-22 $\beta$	1,82	
C-23 ( $\text{CH}_3$ )	37,9	28,4	27,4	H-23	0,87	0,96
C-24 ( $\text{CH}_3$ )	15,3	16,1	15,4	H-24	0,65	0,75
C-25 ( $\text{CH}_3$ )	16,0	16,3		H-25	0,76	0,85
C-26 ( $\text{CH}_3$ )	16,1	16,9		H-26	0,87	0,94
C-27 ( $\text{CH}_3$ )	14,7	14,8	14,9	H-27	0,92	1,00
C-28 (C)	180,5	177,6	178,9	H-29 $\alpha$	4,53	4,59
C-29 ( $\text{CH}_2$ )	109,6	109,8	109,0	H-29 $\beta$	4,66	4,70
C-30 ( $\text{CH}_3$ )	19,4	19,4		H-30	1,63	1,65

## 7. CONCLUSÃO

Neste trabalho desenvolveu-se um estudo fitoquímico preliminar da espécie vegetal *Melaleuca alternifolia*, aplicando uma marcha analítica. Avaliou-se também a atividade antioxidante usando DPPH, assim como o conteúdo de fenólicos e flavonóides.

Na marcha analítica, foi observado a presença de taninos, fenóis, esteróides, flavonóides, glicosídeos esteróidais e triterpênicos.

O precipitado obtido a partir do fracionamento líquido-líquido foi analisado através de análises de IV, RMN <sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C e RMN <sup>13</sup>C/DEPT e sugere a presença do triterpeno ácido, ácido betulínico.

A atividade antioxidante usando DPPH aplicada para extrato bruto e frações acetato de etila, hexânica e butanólica, mostrou que as frações acetato de etila e n-butanólica foram as mais ativas. O conteúdo de fenólicos e flavonóides foi encontrado em maior quantidade também nestas frações.

Considerando a atividade antioxidante e o conteúdo de fenólicos e flavonóides, deve-se incentivar o isolamento dos compostos responsáveis por esta atividade.

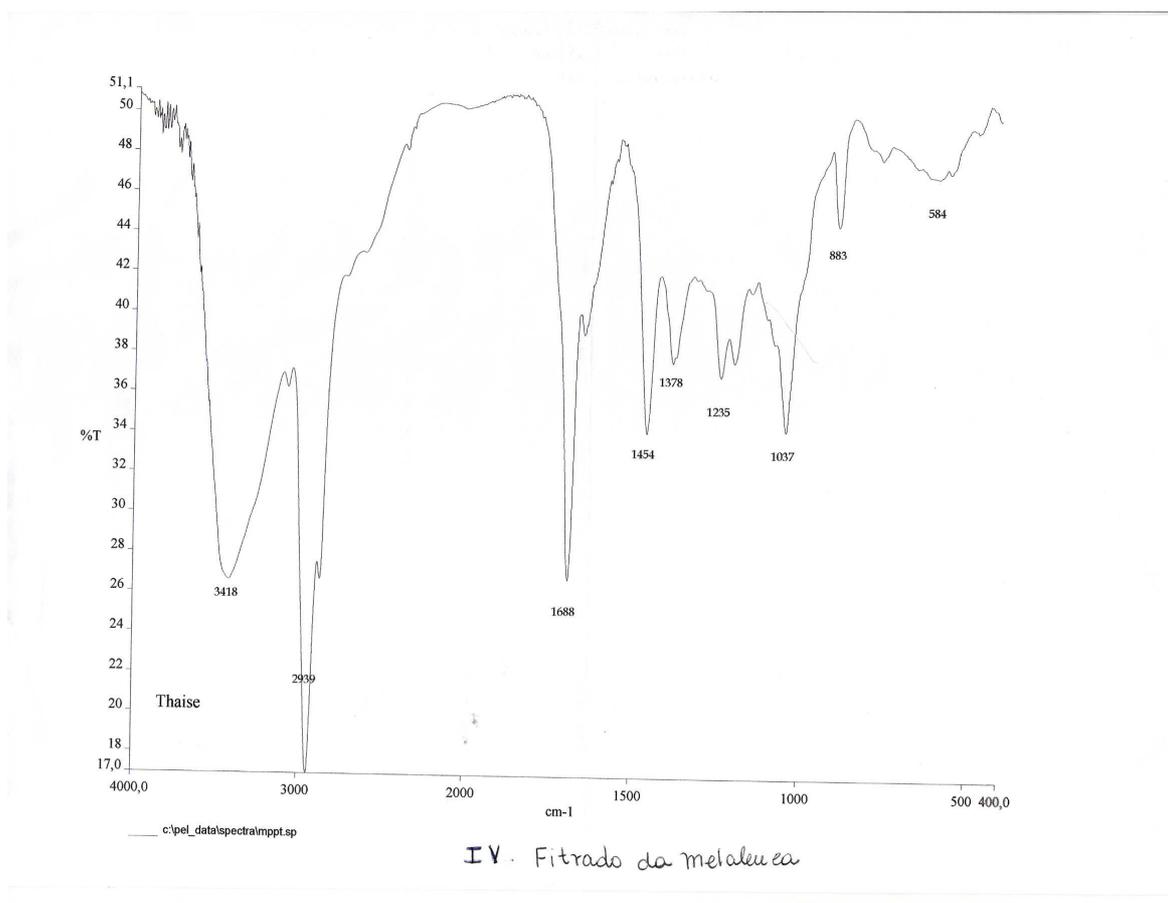
## 8. REFERÊNCIAS

1. Simões, C. M. O., Schekel, E. P., Gosman, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*, 5ª edição, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. Da UFRGS/ Ed. Da UFSC, 2000.
2. Maciel, M. A. M., Pinto, A. C., Veiga Jr, V. F. Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares, *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.
3. Matos, F. J. A. *Introdução a Fitoquímica Experimental*, Fortaleza. Ed. UFC 1998.
4. Niero, R. *Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos*. 1º Ed. Editora do Vale do Itajaí: UNIVALI, 2003.
5. Queiroz, S. N., Collins, C. H., Jardim, C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Química Nova*, v.24, n. 1, p. 68-769, 2001.
6. Hostettmann, K., Queiroz, F. E., Vieira, C. P. *Princípios Ativos de Plantas Superiores*, São Carlos, EdUFSCar, 2003. ( Série de textos da Escola de Verão em Química, v. 4)
7. Yunes, R. A. Calixto, J. B. *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*, Chapecó 2001.
8. Skoog, D. A. *Principles of Instrumental Analysis*, 4<sup>th</sup> ed., 1992.
9. Ewing, G. W. *Métodos instrumentais de Análise Química*, v. 2, ed. Edgard Blücher LMTD, Ed. da Universidade de São Paulo, 1972.
10. Ugaz, O. L. *Investigacion Fitoquímica – Métodos en el Estudio de Productos Naturales*, 1ª ed., Ed. Fondo editorial, Peru, 1988.
11. Silverstein, M. R., Webster, F. X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 6ª edição, Ed. Guanabara, 2001.
12. Cronquist, A., *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*, Columbia: New York, 1981.
13. Russel, M., Southwell, I. *Phytochemistry* , v. 59, p. 709, 2002.
14. Caboi, F., Murgia, S., Monduzzi, M., Lazzari, P. *Langmuir* v.18 p.7916, 2002,
15. Barreto, E. J. *Produtos naturais bioativos de origem vegetal e o desenvolvimento de fármacos*. *Pumice Nova*, v.13, n. 1, p. 29-39, 1990.
16. Chopra, C. S., Cole, A. R. H.; Theiberg, K. J. L., *Tetrahedron*,v. 21, p.1529, 1965.
17. Yoshida, T., Maruyama, T., Nitta, A., Okuda, T., *Phytochemistry*, v. 42, p.1171, 1996.

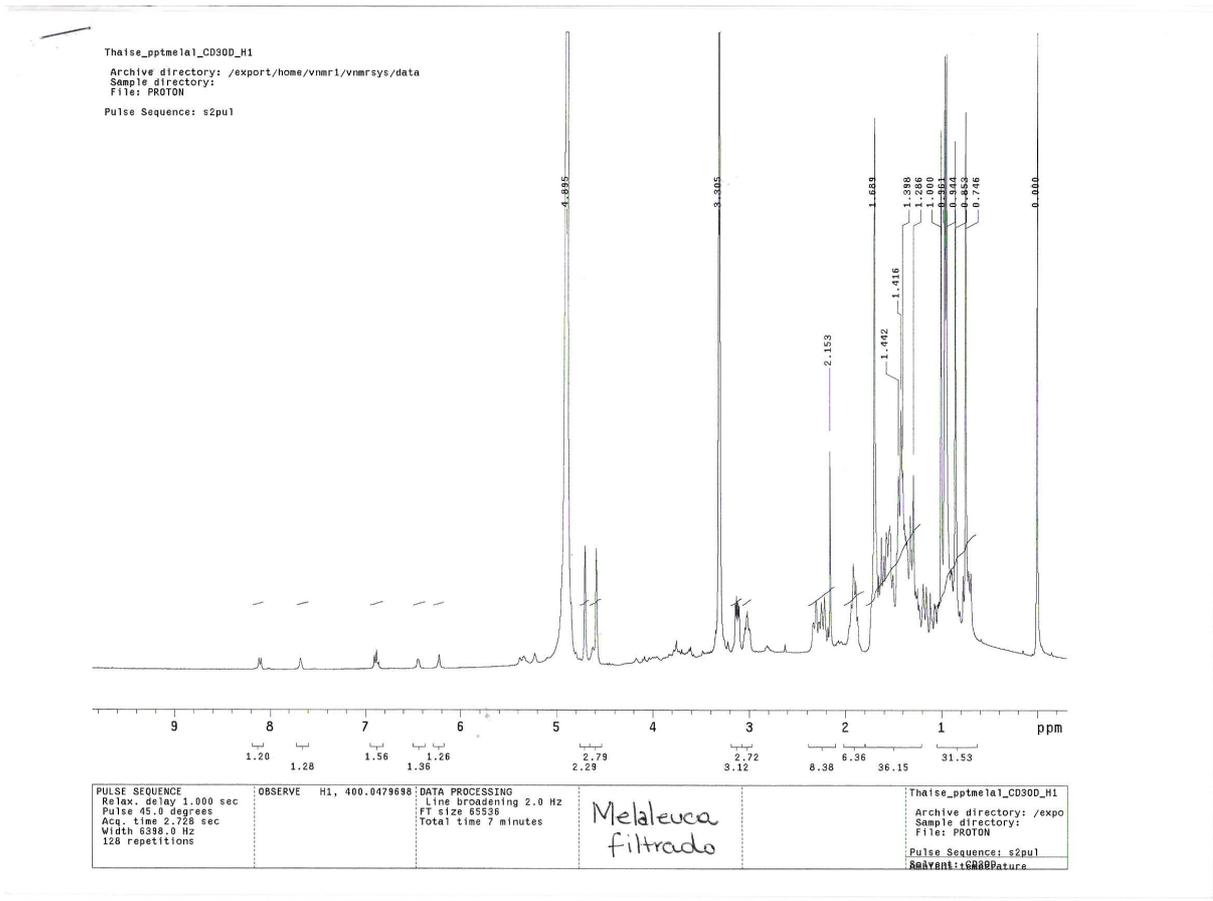
18. Lee, C. K., Chang, M. H., *J. Nat. Prod.*, v.62, p.1003, 1999.
19. El-Toumy, S. A. A., Marzouk, M. S., Moharram, F. A., Aboutabl, E. A., *Pharmazie*, v.56, p.94, 2001.
20. Seligmann, O.; Wagner, H.; *Phytochemistry*,v. 37, p.2601, 1981.
21. Wollenweber, E.; Wehde, R.; Dörr, M.; Lang, G.; Stevens, J. F.; *Phytochemistry*, v. 55, p.965, 2000.
22. McLaughlin, J. L. *Methods in plant biochemistry*. Ed. By K. Hostettmann, Acad. Press Inc, Landon, v. 6, 1981
23. Franke, R. *Theoretical Drug Sesing Method*. Elsevier, Berlin, 1984
24. Kubingi, R. H.; Qsar: *Hansch Analysis and related Aproaches*, VHC, Germany, 1993.
25. Cordel, G. *Phytochemistry*. v. 40, p. 1585, 1995.
26. Hamburger, M.; Hostettmann, K. Bioactivity in plants: The link between Phytochemistry and medicine. *Phytochemistry*, v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991
27. Araújo, J. M. A. *Química de Alimentos*. Ed. 2, Viçosa: UFV, 1999, p.416.
28. Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. *Free radicals in biology and medicine*. Ed. 2, New York: Clarendon Press, 1989, 543p.
29. Cerutti, P. A. *Oxidants estress and carcinogenesis*. Eur. J. Clin. Invest v. 21, p.1-11, 1991.
30. Sies, H. *Oxidantes estress: Introductory remarks*. In Sies, H . (Ed) Oxidative estress. Academic Press. Orlando, FL., p. 1-8, 1983.
31. Ames, B. N. *Dietary carcinogens and ant carcinogens: ogigen radicals and degenerative diseases*. Science, v. 221, p. 1256-1263, 1983.
32. Michels, K. B., Giuvannucci, E., Joshipura, K. J., Rosner, B. A., Stampfer, M. J., Fuchs, C. S., Colditz, G. A., Speizer, F. E., Willett, W. C. *Prospective study of fruit and vegetable consumption and incidence of colon and rectal cancers*. Journal of the National cancer institute, v. 92, p. 1740-1752, 2000.
33. Auroma, O. I. *Free radicals, oxidative stress and antioxidants in human health and disease*. Journal of the American Oil Chemistry Society, v. 75, p. 199-212, 1998.
34. Wang, H., Cao, G., Prior, R. L. *Total antioxidant capacity prevention of fruits*. J. agric. Food Chem.,v. 44, p. 701-705, 1996.
35. Ames, B.N., Gold, L. S., Willett, W. C. *The causes and prevention of cancer*. Proc. Natl. Acad. Sci., v. 92, p. 5258-5265, 1995

36. Young, A. J., Lowe, G. M. *Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids*. Archives of biochemistry and biophysics, v. 385, n. 1, p. 20-27, jan. 2001.
37. NG, T. B., Liu, F., Wang, Z. T. *Antioxidative Activity of Natural Products from Plants*. Line Sciences, v. 66, n. 8, p. 709-729, 2000.
38. Larson, Richards A. The Antioxidants of Higher Plants. *Phytochemistry*, v. 27, n. 4, p. 969-968, 1998.
39. Cavin, A., Hostettmann, K., Dyatmyko, W., Poterat, O. *Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa**. *Planta Medica*, v. 64, p. 393-396, 1998.
40. Bouchet, N., Barriol, L., Fauconneau, B. *Radical scavenging activity and antioxidant proprieters of tannins from *Guiera sanegalensis**. *Phytotherapy Research*, v. 12, p. 159-162, 1998.
41. Leon, L. P., Shui, G. *En investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets*. *Food Chemistry*, v. 76, p. 69-75, 2002.
42. Ma, Z. Z.; hano, Y., Nomura, T., Chen, Y. J. *J.Nat. Prod.* v.63, p. 390-392, 2000.
43. Holz-Smith, S. L., Sun, I. C., Jin, L. et al. *Antimicrob Agents Chemother.* v. 45, p. 60-66, 2001.
44. Siddiqui, S., Hafeez, F., Begum, S. *J. Nat. Prod.* v. 51, p. 229, 1998.
45. Aguirre, M. C., Delporte C., Erazo, S., Letelier M. E., et al. *Topical anti-inflammatory activity of 2 $\alpha$  pentacyclic triterpene acids from the leaves of *ugnimolina**. *Biorganic e Medicinal Chemistry*, p. 5673-5677, 2006.

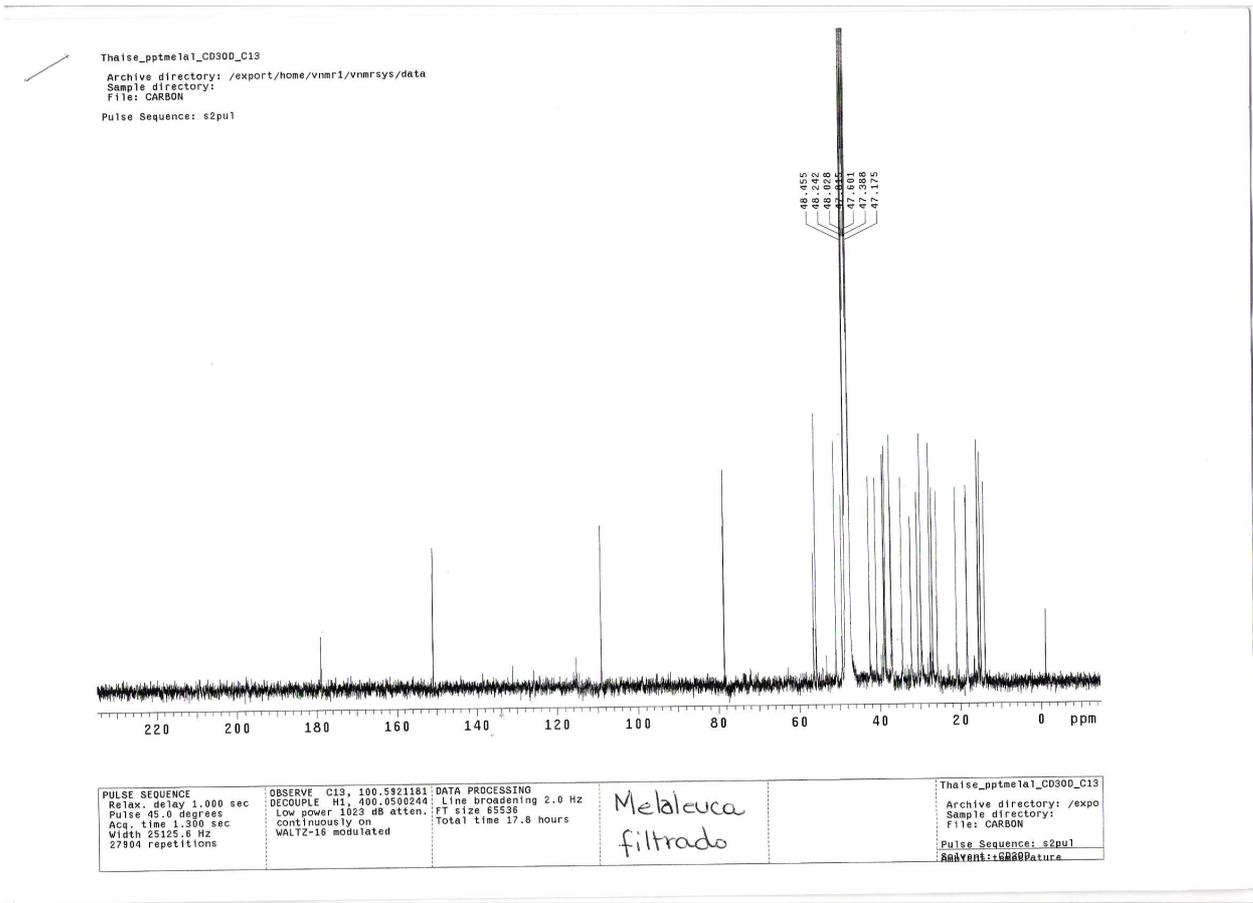
## 9. ANEXOS



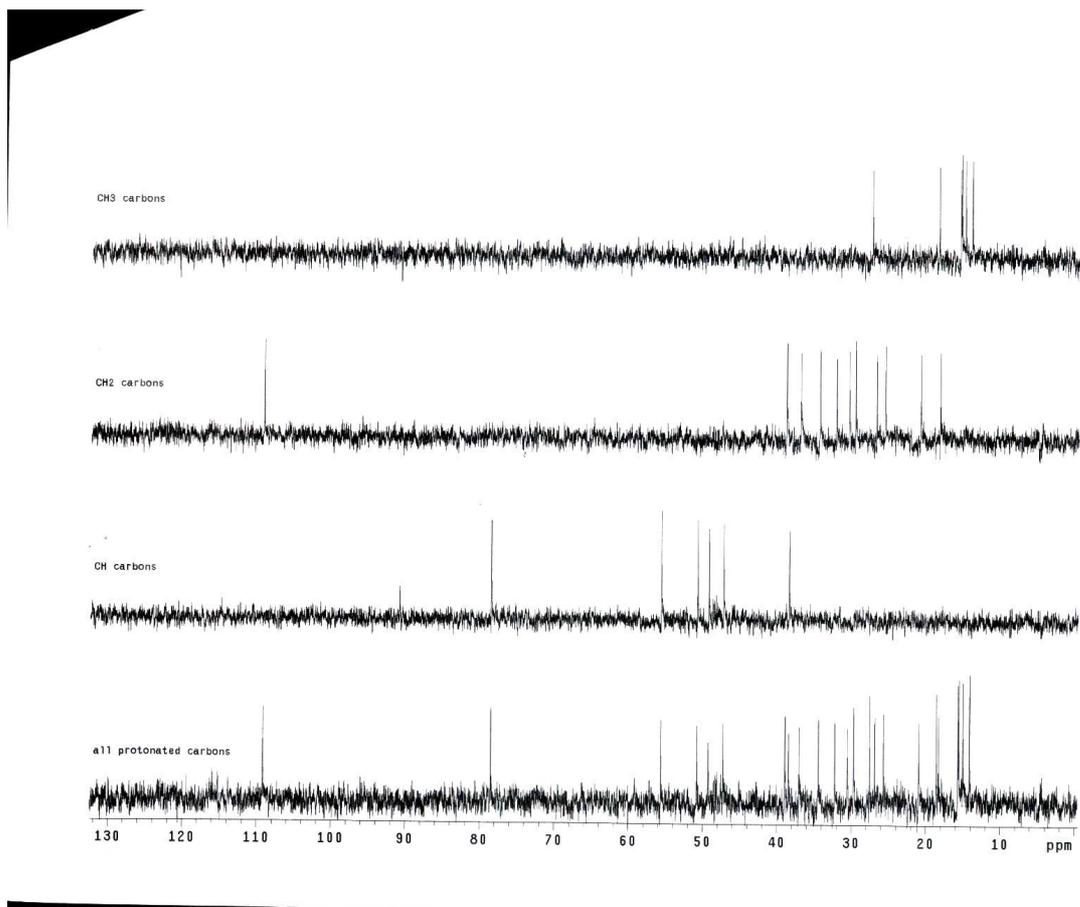
**Anexo 1:** : Espectro de IV do precipitado de *Melaleuca alternifolia* (Pastilha de KBr).



**Anexo 2:** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do precipitado de *Melaleuca alternifolia*



**Anexo 3:** Espectro de RMN <sup>13</sup>C do precipitado de *Melaleuca alternifolia*



Anexo 4: Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ /DEPT do precipitado de *Melaleuca alternifolia*