



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE EDUCAÇÃO E SAÚDE
UNIDADE ACADÊMICA DE SAÚDE
CURSO DE BACHARELADO EM FARMÁCIA

THIAGO ARAÚJO DE MEDEIROS BRITO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Libidibia ferrea* COMO FONTE DE MOLÉCULAS
BIOATIVAS ÚTEIS À SOCIEDADE**

CUITÉ - PB

2018

THIAGO ARAÚJO DE MEDEIROS BRITO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Libidibia ferrea* COMO FONTE DE MOLÉCULAS
BIOATIVAS ÚTEIS À SOCIEDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, *Campus Cuité*, como requisito indispensável para obtenção do título de bacharel em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros

CUITÉ

2018

B862e Brito, Thiago Araújo de Medeiros.
Estudo fitoquímico de *Libidibia ferrea* como fonte de moléculas bioativas úteis à sociedade / Thiago Araújo de Medeiros Brito. – Cuité, 2018.
56 f. : il. color.

Monografia (Bacharelado em Farmácia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Educação e Saúde, 2018.
"Orientação: Profa. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros".
Referências.

1. Plantas Medicinais. 2. Fitoquímica. 3. Quimiotaxonomia.
4. Moléculas Bioativas I. Medeiros, Francinalva Dantas de. II. Título.

CDU 633.8(043)

THIAGO ARAÚJO DE MEDEIROS BRITO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Libidibia ferrea* COMO FONTE DE MOLÉCULAS
BIOATIVAS ÚTEIS À SOCIEDADE**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Coordenação do Curso de Farmácia da Universidade
Federal de Campina Grande, Centro de Educação e
Saúde, *Campus Cuité*, como requisito indispensável para
obtenção do título de bacharel em Farmácia.

APROVADO EM: 28/11/2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Francinalva Dantas de Medeiros
Universidade Federal de Campina Grande
Orientadora

Profa. Dra. Júlia Beatriz Pereira de Souza
Universidade Federal de Campina Grande
Avaliadora

Prof. Dr. Marciano Henrique de Lucena Neto
Universidade Federal de Campina Grande
Avaliador

CUITÉ- PB

2018

Acima de tudo, agradeço a Deus por mais esta realização.

Dedico este trabalho aos meus Pais e demais familiares, que me apoiaram na realização desse sonho

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo seu profundo amor que nos tem dado primeiramente e gratuitamente. Por me permitir realizar os meus sonhos. Por todas as graças que nos são dadas todos os dias.

À minha família, especialmente a minha mãe Telma Maria de Medeiros Fernandes, meu pai Maynard Araújo Brito por serem meu alicerce e por me proporcionarem a oportunidade de realizar esse sonho.

A minha avó Maria e meu avô Emanuel por seu exemplo de superação que me fortifica nas minhas decisões no dia a dia. Por mostrarem que condições difíceis não são desculpas quando se tem fé e amor, podemos superar todas as adversidades.

À meu Avô (*in memoriam*) Francisco Pedro de Medeiros que apesar não estar vivo fisicamente foi fundamental para esse meu despertar pela área da saúde e ciências naturais. Foi maravilhoso ver sua determinação em criar a família dominando conhecimentos básicos da farmácia, odontologia e medicina voltada a promoção da saúde em uma época que o acesso era tão escasso.

À minha namorada Monike Ellen Caetano Gomes por todo o apoio nos momentos difíceis. Os estresses que as vezes se fizerem presentes foram apaziguados pelo seu carinho. Toda essa empreitada foi mais leve por ter você.

À professora Francinalva Dantas de Medeiros por ter me aceitado como seu orientando mesmo com tantas tarefas acumuladas pelos docentes no CES, por todo o tempo que dedicou em me ajudar, por me proporcionar aprender outra forma desenvolver a fitoquímica com técnicas que eu nunca tinha realizado.

Ao professor Marciano Henrique de Lucena Neto por me ajudar no processo de inserção no âmbito das pesquisas.

À professora Danielly Albuquerque da Costa por me receber no terceiro período em um PIBIC e por compartilhar comigo seus conhecimentos relativos à pesquisa fitoquímica.

Ao professor Carlos Alberto Garcia Santos pelo seu auxílio na identificação da planta e na produção da exsicata do material coletado.

À Widson Santos por me auxiliar nos testes semi-quantitativos e a Cayo Lamarq Araújo Maia por me ajudar na pesquisa em muitos trabalhos braçais principalmente na coleta e processamento da planta, além de ter sido meu parceiro no laboratório nos dias de pesquisa.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que fizeram parte dessa minha trajetória e contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desse trabalho.

*Ora, a fé é o firme fundamento das coisas que se esperam, e a prova das coisas que não se vêem.
(Hebreus 11:1).*

RESUMO

As plantas medicinais desde a antiguidade são utilizadas com finalidades terapêuticas. Atualmente muitas espécies de plantas e derivados vegetais são objetos de estudos fitoquímicos, tendo em vista o seu vasto potencial como fonte de materiais econômicos. *Libidibia ferrea* é uma planta medicinal conhecida por seu uso na medicina popular voltado ao tratamento de ferimentos, contusões, diarreia, asma, bronquite e tosse crônica. Entretanto, há necessidade de estudos para compressão de sua composição química. Vislumbrando esse potencial a ser explorado e seus grandes benefícios na medicina popular esse trabalho teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico de *L. ferrea* como fonte de moléculas bioativas úteis à sociedade, promovendo a extração de metabólitos secundários, identificação de grupos de metabólitos secundários presentes no extrato, realizando o fracionamento líquido-líquido do extrato obtido e caracterizando por técnica cromatográfica o extrato e frações obtidas. Para tanto foram utilizados, métodos extrativos, cromatográficos e espectrofotométricos. Foi possível obter um extrato hidroetanólico bruto de frutos de *L. ferrea* com rendimento estimado 67,74 g. Por meio do fracionamento líquido-líquido do extrato hidroetanólico bruto foi possível obter 2,7 g da fase acetatoetílica, 918,8 mg da fase éter etílica, 119,6 mg da fase clorofórmica e 22,7 mg da fase hexânica. A análise de semi-quantificação fitoquímica permitiu sugerir a presença de baixas quantidades de flavonoides e alta quantidade de polifenóis no extrato obtido. A prospecção preliminar aliada aos relatos na literatura levou à observação sobre as concentrações de taninos nos extratos e frações obtidas, e indicou a ausência de alcaloides e flavonoides nas frações. Além disso, o perfil cromatográfico, a fim de caracterizar o extrato e frações obtidas, foi obtido a partir de cromatografia líquida de alta eficiência. O trabalho contribuiu com o conhecimento quimiotaxonômico de *L. ferrea*, para o melhor entendimento de sua utilização na medicina popular e para posteriores estudos de atividade biológica e de isolamento de moléculas bioativas úteis à sociedade.

Palavras-chaves: Fitoquímica. Quimiotaxonomia. Produtos naturais. Moléculas bioativas

ABSTRACT

Medicinal plants from ancient times are used for therapeutic purposes. Currently many plant species and plants are objects of phytochemical studies, given their vast potential as a source of economical materials. *Libidibia ferrea* is a medicinal plant known for its use in folk medicine for the treatment of wounds, bruises, diarrhea, asthma, bronchitis and chronic cough. However, there is a need for studies to understand its chemical composition. The objective of this study was to study the potential of this potential to be explored and its great benefits in folk medicine. The objective of this work was to study the phytochemical of *L. ferrea* as a source of bioactive molecules useful to society, promoting the extraction of secondary metabolites, identification of groups of secondary metabolites present in the extract, making the liquid-liquid fractionation of the obtained extract and characterizing by chromatographic technique the extract and fractions obtained. For that, extractive, chromatographic and spectrophotometric methods were used. A crude hydroethanolic extract of fruits *L. ferrea* was obtained in an estimated yield of 67.74 g. In the case of the liquid-liquid fractionation of the crude hydroethanolic extract, it was possible to obtain 2.7 g of the acetate phase, 918.8 mg of the ethyl ether phase, 119.6 mg of the chloroform phase and 22.7 mg of the hexane phase. The analysis of phytochemical semi-quantification allowed the presence of low amounts of flavonoids and high amount of polyphenols in the obtained extract. Preliminary prospecting together with reports in the literature led to the observation of tannin concentrations in the extracts and fractions obtained, and indicated the absence of alkaloids and flavonoids in the fractions. In addition, the chromatographic profile, in order to characterize the extract and fractions obtained, was obtained from high performance liquid chromatography. The work contributed with the chemotaxonomic knowledge of *L. ferrea*, for a better understanding of its use in folk medicine and for further studies of biological activity and isolation of bioactive molecules useful to society.

Key-words: Phytochemistry. Chemiotaxonomy. Natural products. Bioactive molecules.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Ácidos graxos de <i>Libidibia ferrea</i> isolados e/ou identificados.....	19
Quadro 2 - Ácidos fenólicos de <i>Libidibia ferrea</i> isolados e/ou identificados.....	20
Quadro 3 - Polifenóis de <i>Libidibia ferrea</i> isolados e/ou identificados.....	21
Quadro 4 - Flavonóides provenientes de folhas e frutos de <i>Libidibia ferrea</i> isolados e/ou identificados.....	22
Quadro 5 - Flavonóides provenientes de caule ou cascas do caule de <i>Libidibia ferrea</i> isolados e/ou identificados.....	23
Quadro 6 - Ácidos orgânicos, terpenoides, esteroides e outros compostos orgânicos de <i>Libidibia ferrea</i> isolados e/ou identificados.....	24
Quadro 7 - Taninos de <i>Libidibia ferrea</i> isolados e/ou identificados.....	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – <i>Libidibia ferrea</i> utilizada como objeto de estudo nessa pesquisa.....	18
Figura 2 – Método de diluição seriada no sentido de A até H de uma microplaca.....	35
Figura 3 – Coluna do branco e colunas da triplicata obtidas por diluição seriada.....	35
Figura 4 – Processo de obtenção do extrato mole e particionamento do extrato hidroetanólico bruto.....	37
Figura 5 – Equipamento utilizado para cromatografia líquida de alta eficiência.....	39
Figura 6 – Cápsulas com amostras para determinação do resíduo seco.....	40
Figura 7 – Curva de calibração para quantificação do ácido gálico.....	41
Figura 8 – Curva de calibração para quantificação de quercetina.....	42
Figura 9 – Curva de calibração para quantificação de catequina.....	42
Figura 10 – Fases obtidas por particionamento do extrato etanólico bruto.....	44
Figura 11 – Teste de identificação de taninos pelo método do cloreto férrico, antes do teste (A), depois do teste (B).....	45
Figura 12 – Teste de identificação de taninos pelo método de precipitação de proteínas da gelatina, antes do teste (C), depois do teste (D).....	46
Figura 13 – Teste de identificação de flavonoides, antes do teste (E), depois do teste (F). Teste de identificação de alcalóides, antes do teste (G) e depois do teste (H).....	46
Figura 14 – Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico bruto de <i>Libidibia ferrea</i>	47
Figura 15 – Perfil cromatográfico da fase acetatoetílica de <i>Libidibia ferrea</i>	47
Figura 16 – Perfil cromatográfico da fase éter etílico de <i>Libidibia ferrea</i>	48
Figura 17 – Perfil cromatográfico da fase clorofórmica de <i>Libidibia ferrea</i>	48
Figura 18 – Perfil cromatográfico da fase hexânica de <i>Libidibia ferrea</i> parte 1.....	49
Figura 19 – Perfil cromatográfico da fase hexânica de <i>Libidibia ferrea</i> parte 2.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de polifenóis e flavonoides quantificados.....	43
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg – Micrograma

μL – Microlitro

AlCl_3 – Cloreto de alumínio

EEB – Extrato etanólico bruto

EHEB – Extrato hidroetanólico bruto

EtOH – Etanol

FC – Folin-Ciocalteu

g – Grama

H_2O – Água

HCl – Ácido clorídrico

m – Massa

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MS – Metabólitos secundários

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius

RPM – Rotações por minuto

SUS – Sistema Único de Saúde

UV – Ultravioleta

UV - VIS – Ultravioleta –Visível

v – Volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos gerais	16
2.2 Objetivos específicos	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Plantas medicinais	17
3.2 Taxonomia e aspectos botânicos e químicos	18
3.3 Fitoquímica	25
3.4 Metabólitos secundários	26
3.4.1 Polifenóis	26
3.4.2 Flavonoides	27
3.4.3 Taninos	28
3.5 Métodos extrativos e partição por solventes	28
3.5.1 Extração	28
3.5.2 Extração por maceração.....	28
3.5.3 Partição por solventes.....	29
3.6 Análise fitoquímica preliminar por semi-quantificação	29
3.6.1 Leitor de microplacas	29
3.6.2 Fenóis totais	30
3.6.3 Flavonoides	30
3.6.4 Taninos	31
3.7 Métodos cromatográficos	31
4 METODOLOGIA	33
4.1 Coleta, estabilização, secagem e identificação do material vegetal	33
4.2 Obtenção da droga vegetal e padronização da granulometria	33
4.3 Extração	33
4.4 Determinação de resíduo seco	34

4.5 Estudo fitoquímico	34
4.5.1 Polifenóis	34
4.5.2 Taninos	36
4.5.3 Flavonoides	36
4.6 Secagem por rotaevaporação e obtenção do extrato mole	37
4.7 Particionamento do extrato hidroetanólico bruto	37
4.8 Prospecção preliminar das fases obtida por particionamento	37
4.8.1 Identificação de flavonoides	38
4.8.2 Identificação de Alcaloides	38
4.8.3 Identificação de taninos	38
4.9 Caracterização fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais têm sido utilizadas há séculos como alternativa de tratamento para problemas de saúde (FACCIN et al., 2016). Atualmente, muitas espécies de plantas e preparados vegetais medicinais tiveram pesquisas fomentadas com o objetivo de promover o conhecimento quimiotaxonômico, isolamento de princípios ativos, assim como, para a obtenção de outros materiais econômicos tais como, fitocosméticos, óleos essenciais e praguicidas (FEITOSA et al., 2015; MEDINA; LOUCHARD; GONÇALVES, 2016; OLIVEIRA et al., 2016; COSTA et al., 2017).

No desenvolvimento dessas pesquisas se faz importante os estudos fitoquímicos, que através de métodos extrativos e espectroscópicos, promovem a extração de constituintes químicos, a realização da triagem fitoquímica qualitativa e/ou quantitativa que direcionam os métodos cromatográficos e espectroscópicos a um promissor isolamento, purificação e caracterização estrutural dos metabólitos secundários (PICOLLI et al., 2015).

A triagem fitoquímica nos extratos revela ainda, a presença de metabólitos secundários essenciais à justificação e adequação do uso na medicina popular e aplicações na pesquisa por moléculas com atividade biológica úteis à sociedade, tais como compostos fenólicos, flavonoídicos, taninos, alcaloides, saponinas, entre outros. Essa prospecção preliminar pode ainda complementar estudos sobre um grupo de plantas medicinais nativas com suspeita de potencial farmacoterapêutico (BESSA et al., 2013).

Até meados de 2011, não se tinha conhecimento sobre a composição química de 99,6% das plantas da flora nacional, estimadas entre 40 mil a 55 mil espécies, sendo que 10 mil podiam ser consideradas medicinais, aromáticas e úteis. Dentre as espécies vegetais existentes nesse período no Brasil, menos de 1% foram estudadas adequadamente (SCHULTES, 1991; STANGARLIN et al., 1999 apud BANDEIRA et al., 2011). Atualmente, apesar da grande diversidade da flora nacional, nos últimos 20 anos, as informações obtidas sobre essas plantas têm crescido apenas 8% anualmente (FONSECA, 2012 apud CARNEIRO et al., 2014).

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 (LEWIS et al., 2005). No Brasil, 222 gêneros e 2848 espécies constituem a família Fabaceae (FLORA DO BRASIL, 2018).

O gênero *Libidibia* (*Caesalpinia*) como é conhecida 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 (MAIA, 2004; KOBAYASHI et al., 2015; CARVALHO et al., 2016).

Ensaio farmacológico com *L. ferrea* demonstraram atividade analgésica, anti-inflamatória, atividade inibitória contra patógenos da cavidade oral tais como, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e atividade cicatrizante. Entretanto, pesquisas adicionais para identificar e estudar componentes sejam necessárias, o que justifica essa pesquisa (SAMPAIO et al., 2009; CARVALHO et al., 2016).

Vislumbrando os grandes benefícios decorrentes do uso dessa espécie *L. ferrea* na medicina popular e a necessidade de novos estudos fitoquímicos para comprovar as propriedades medicinais atribuídas à planta, além de subsidiar pesquisas posteriores na descoberta de novas moléculas com potencial atividade biológica, essa pesquisa visa realizar um estudo fitoquímico da espécie *Libidibia ferrea*, como fonte de moléculas bioativas úteis à sociedade, de forma a promover o conhecimento quimiotaxonômico da espécie e possivelmente fornecer mais conhecimento acerca de sua composição química.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Realizar um estudo fitoquímico da espécie *Libidibia ferrea*, como fonte de moléculas bioativas úteis à sociedade.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar extração dos metabólitos secundários de *L. ferrea*;
- identificar os grupos de metabólitos secundários presentes no extrato obtido;
- realizar fracionamento líquido-líquido do extrato obtido e;
- caracterizar por técnica cromatográfica o extrato e frações obtidas.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Plantas medicinais

A utilização de plantas no tratamento de enfermidades é uma prática da medicina tradicional, entretanto, sofre ação de um pensamento de que plantas medicinais, devido sua origem natural, não oferecem riscos aos usuários, e ao contrário, o seu uso inadequado pode ocasionar efeitos adversos ou interações medicamentosas (CAETANO et al., 2015), sendo importante garantir seu uso racional.

Em conformidade com as recomendações propostas pela Organização Mundial de Saúde, foi aprovada, em 2006, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Entre as ações para implementação das diretrizes dessa política nacional, almejam ofertar produtos e serviços relacionados à fitoterapia no Sistema Único de Saúde, de forma segura e racional, por profissionais de saúde qualificados, considerando os princípios da integralidade, universalidade e equidade (BRASIL, 2012).

No Brasil, cerca de 82% da população utiliza produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, seja pelo conhecimento tradicional de povos originais, como indígenas, quilombolas, seja pelo uso através da transmissão oral entre gerações, ou nos sistemas oficiais de saúde, como prática de cunho científico, orientada pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (GADELHA, 2013).

Para além da utilização de plantas medicinais de forma segura e racional, a vertente da pesquisa fitoquímica tem progredido, estima-se que pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas, interligadas ao conhecimento tradicional (RODRIGUES, AMARAL., 2012).

Há um significativo crescimento de estudos relacionados a plantas medicinais no Brasil, tendo em vista um grande potencial inexplorado. Esses estudos possuem um enfoque maior em áreas voltadas à produção de fármacos e praguicidas. Por mais, que seja significativo esse crescimento, se faz necessário ainda mais pesquisas, para promoção do uso racional dessas plantas, como preconiza a política nacional de práticas integrativas e complementares. O acúmulo de substâncias ativas, mistura e redundâncias terapêuticas, podem causar intoxicações manifestadas por uma simples dermatite até a morte (CARNEIRO et al., 2014).

3.2 Taxonomia e aspectos botânicos e químicos

A espécie *Libidibia ferrea* (Figura 1), como é concebida atualmente, antes teve como basônimo *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. Sua hierarquia taxonômica se inicia com o reino plantae e sucessivamente, filo: angiosperma, família: Fabaceae Lindl., subfamília Caesalpinioideae e gênero: *Libidibia* (DC.) Schldtl (FLORA BRASIL, 2018).

A subfamília Caesalpinioideae possui como aspectos botânicos mais marcantes inflorescências em racemos ou panículas, flores relativamente grandes, com corola constituindo a parte atrativa (FERREIRA; TROVÃO; MELO, 2015; FLORA BRASIL, 2018).

L. ferrea apresenta folhas bipinadas e pétala vexilar diferenciada por máculas vermelhas ou alaranjadas. Essa planta nativa se apresenta na forma de árvore e quanto ao substrato é classificada como planta terrícola. Sua distribuição se dá pelos domínios fitogeográficos da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e tem ocorrências confirmadas nas regiões do Nordeste e Sudeste (FERREIRA; TROVÃO; MELO, 2015; FLORA BRASIL, 2018).

Reconhecendo-se o potencial terapêutico da espécie, alguns estudos foram realizados com a finalidade de caracterizar também quimicamente a espécie. As partes selecionadas para estudos foram essencialmente frutos, sementes, folhas, caule e cascas do caule. Assim foram isolados e/ou identificados ácidos graxos (Quadro 1), ácidos fenólicos (Quadro 2), compostos fenólicos (Quadro 3), flavonoides (Quadro 4) e (Quadro 5), ácidos orgânicos, terpenoides, esteroides somados a outros compostos orgânicos (Quadro 6) além de taninos (Quadro 7).

Figura 1 – *Libidibia ferrea* utilizada como objeto de estudo nessa pesquisa.



Fonte: Dados da pesquisa.

Quadro 1 - Ácidos graxos de *Libidibia ferrea* isolados e/ou identificados.

Parte da planta	Extrato	Substância isolada	Citações
Fruto	Benzênico	Ácido palmítico	COSTA; GUILHON-SIMPLICIO; SOUZA, 2015.
Fruto	Benzênico	Ácido octosanóico	COSTA; GUILHON-SIMPLICIO; SOUZA, 2015.
Semente	Hexânico	Ácido palmítico	(SIANI et al., 2013)
Semente	Hexânico	Ácido esteárico	(SIANI et al., 2013)
Fruto	Flúido supercrítico	Ácido linoleico	(DIAS et al., 2013)
Fruto	Flúido supercrítico	Ácido palmítico	(DIAS et al., 2013)
Fruto	Flúido supercrítico	Ácido esteárico	(DIAS et al., 2013)
Fruto	Flúido supercrítico	Ácido elaidico	(DIAS et al., 2013)
Sementes	Aquoso e acetônico	Ácido linoleico	(SAWADA et al., 2014)
Sementes	Aquoso e acetônico	Ácido linolênico	(SAWADA et al., 2014)
Sementes	Aquoso e acetônico	Ácido palmitoleico	(SAWADA et al., 2014)
Sementes	Aquoso e acetônico	Ácido palmítico	(SAWADA et al., 2014)
Sementes	Aquoso e acetônico	Ácido esteárico	(SAWADA et al., 2014)
Sementes	Aquoso e acetônico	Ácido cáprico	(SAWADA et al., 2014)

Quadro 2 - Ácidos fenólicos de *Libidibia ferrea* isolados e/ou identificados.

Parte da planta	Extrato	Substância isolada	Citações
Fruto	Alcoólico	Ácido gálico	COSTA; GUILHON-SIMPLICIO; SOUZA, 2015.
Folha	Hidroetanólico	Ácido gálico	(NAWWAR et al., 2015)
Casca do caule	Hidroetanólico	Ácido gálico	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Ácido 3-O-galloyl quinico	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Ácido galoilchiquímico	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Fruto	Hidroetanólico	Ácido 2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) elágico	(UEDA et al., 2001)
Fruto	Metanólico	Ácido gálico	(NAKAMURA et al., 2002)
Casca do caule	Aquoso	Ácido gálico	(VASCONCELOS et al., 2011)
Frutos	Hidroetanólico	Ácido gálico	(SILVA et al., 2013)
Folhas	Etanólico	Ácido gálico	(SILVA et al., 2014)
Folhas	Metanólico	Ácido gálico	(PORT'S et al., 2013)
Não relatada	Aquoso e hidroacetônico	Ácido gálico	(ARAUJO et al., 2014)
Frutos	Hidroalcoólico	Ácido gálico	(SILVA et al., 2013)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Ácido gálico	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Ácido cafeico	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Ácido quinico	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Ácido clorogênico	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Ácido gálico	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Ácido caféico	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Ácido 2-(2-etil-3-hidroxi-6-propionilciclohexil) acetico	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Ácido quinico	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Ácido clorogênico	(PEDROSA et al., 2016)

Quadro 3 - Polifenóis de *Libidibia ferrea* isolados e/ou identificados.

Parte da planta	Extrato	Substância isolada	Citações
Fruto	Alcoólico	Galato de etila	COSTA; GUILHON-SIMPLICIO; SOUZA, 2015.
Caule	Acetônico	Paufferol	COSTA; GUILHON-SIMPLICIO; SOUZA, 2015.
Folha	Hidroetanólico	Ácido Brevifolina Carboxílico	(NAWWAR et al., 2015)
Folha	Hidroetanólico	Brevifolina	(NAWWAR et al., 2015)
Folha	Hidroetanólico	Ácido elágico	(NAWWAR et al., 2015)
Caule	Hidroetanólico	Trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno	(MAGALHÃES et al., 2014)
Casca do caule	Hidroetanólico	Galato de etila	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Ácido elágico	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	ácido 3-O-metilelágico 4'-O-β-D-arabinopiranosídeo	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	ácido Metilelágico ramnosídeo	(WYREPKOWSKI et al., 2014)
Caule	Acetônico	Paufferol B	(OHIRA et al., 2013)
Caule	Acetônico	Paufferol C	(OHIRA et al., 2013)
Caule	Acetônico	Paufferol A	(NOZAKI et al., 2007)
Fruto	Metanólico	Galato de metila	(NAKAMURA et al., 2002)
Casca do caule	Aquoso	Ácido elágico	(VASCONCELOS et al., 2011)
Frutos	Hidroetanólico	Galato de metila	(SILVA et al., 2013)
Frutos	Hidroetanólico	Ácido 2-(2,3,6-trihidroxi-4-carboxifenil) elágico	(UEDA; KAWANISHI; MORIYASU, 2004).
Frutos	Hidroetanólico	Ácido elágico	(UEDA; KAWANISHI; MORIYASU, 2004)
Frutos	Hidroalcoólico	Ácido elágico	(SILVA et al., 2013)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Ácido elágico	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Ácido elágico	(PEDROSA et al., 2016)

Quadro 4 - Flavonóides provenientes de folhas e frutos de *Libidibia ferrea* isolados e/ou identificados.

Parte da planta	Extrato	Substância isolada	Citações
Folha	Hidroetanólico	isovitexina 2''-O-β-[xilopiranosil-(1''''→2''')-O-β-xilopiranosil	(NAWWAR et al., 2014)
Folha	Hidroetanólico	Vitexina 2''-O-β-[xilopiranosil-(1''''→2''')-O-β-xilopiranosil	(NAWWAR et al., 2014)
Folha	Hidroetanólico	orientin 2''-O-β-[xilopiranosil-(1''''→2''')-O-β-xilopiranosil	(NAWWAR et al., 2014)
Folha	Hidroetanólico	vitexina	(NAWWAR et al., 2015)
Folha	Hidroetanólico	2''-O-galloylorientin	(NAWWAR et al., 2015)
Folha	Hidroetanólico	orientin	(NAWWAR et al., 2015)
Folhas	Metanólico	Quercetina	(PORT'S et al., 2013)
Não relatada	Aquoso e hidroacetônico	Catequina	(ARAUJO et al., 2014)
Fruto	Hidroetanólico	Catequina	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Epicatequina	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Rutina	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	taxifolin	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Miricetina	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Quercetina	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Canferol	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Apigenina	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Isoramnetina	(PEDROSA et al., 2016)

Quadro 5 - Flavonóides provenientes de caule ou cascas do caule de *Libidibia ferrea* isolados e/ou identificados.

Parte da planta	Extrato	Substância isolada	Citações
Caule	Hidroetanólico	Amentoflavone	(MAGALHÃES et al., 2014)
Casca do caule	Hidroetanólico	Epicatequina	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Aquoso	Catequina	(VASCONCELOS et al., 2011)
Casca do caule	Aquoso	Epicatequina	(VASCONCELOS et al., 2011)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Catequina	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Epicatequina	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	rutina	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	taxifolin	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Miricetina	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Quercetina	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Canferol	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Apigenina	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	isoramnetina	(PEDROSA et al., 2016)

Quadro 6 - Ácidos orgânicos, terpenoides, esteroides e outros compostos orgânicos de *Libidibia ferrea* isolados e/ou identificados.

Parte da planta	Extrato	Classe de MS	Substância isolada	Citações
Fruto	Benzênico	Esteróide	Sitosterol	COSTA; GUILHON-SIMPLICIO; SOUZA, 2015.
Semente	Aquoso	Polissacarídeo	Galactomanana	(GALLÃO et al., 2013), (MARQUES et al., 2015)
Fruto	Flúido supercrítico	Triterpeno	Lupenone	(DIAS et al., 2013)
Fruto	Flúido supercrítico	Esteróide	Gamma-sitosterol	(DIAS et al., 2013)
Fruto	Flúido supercrítico	Aldeído	3,4-dimetilbenzaldeído	(DIAS et al., 2013)
Fruto	Flúido supercrítico	Ftalato	di-2-etilhexilftalato	(DIAS et al., 2013)
Sementes	Aquoso	Monossacarídeo	D-galactose	(LOPES et al., 2013)
Sementes	Aquoso	Monossacarídeo	D-manose	(LOPES et al., 2013)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Ácido orgânico	Ácido 2-(2-etil-3-hidroxi-6-propionilciclohexil) acético	(PEDROSA et al., 2016)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Ácido orgânico	ácido 12-oxofitodienoico	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Ácido orgânico	Ácido gluconico	(PEDROSA et al., 2016)
Fruto	Hidroetanólico	Ácido orgânico	Ácido 12-oxofitodienoico	(PEDROSA et al., 2016)

Quadro 7 - Taninos de *Libidibia ferrea* isolados e/ou identificados.

Parte da planta	Extrato	Substância isolada	Citações
Folha	Hidroetanólico	tellimagrandin-I, 2''-O-galloylvitexin	(NAWWAR et al., 2015)
Cascas do caule	Hidroetanólico	Monogaloilglicose	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Digaloilglicose	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Ácido digaloilquinico	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Galoiltanino	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Trigaloilglicose	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Tetragaloilglicose	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Castalagin derivative	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Ácido dilactona valonico	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Acido hexahidroxidifenil-digaloilglicose	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Pentagaloilglicose	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Procianidina trimérica	(WYREPKOWSKI et al., 2014).
Casca do caule	Hidroetanólico	Ácido digaloilchiquimico	(WYREPKOWSKI et al., 2014).

3.3 Fitoquímica

Os estudos fitoquímicos tem a finalidade de caracterização, isolamento e/ou identificação dos metabólitos secundários presentes nas plantas. Quando não se conhece metabólitos secundários presentes em uma espécie realiza-se uma triagem fitoquímica, a fim de identificar a quais grupos esses metabólitos pertencem. Esses estudos envolvem a utilização de técnicas, cromatográficas e espectroscópicas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

3.4 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários fazem parte do metabolismo vegetal o qual é definido como o conjunto de reações químicas que continuamente estão ocorrendo em cada célula dos vegetais. Muitas dessas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio, apesar de não serem essenciais à vida. Já foram reconhecidas como funções específicas de alguns metabólitos secundários, a defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios ultravioleta (UV), a atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Devido ao longo tempo de adaptação e a seleção natural, essas substâncias produzidas geralmente apresentam mecanismos sofisticados de atuação, úteis na obtenção de moléculas com potencial farmacológico. A possibilidade de utilização dessas moléculas como protótipos na semi-síntese proporciona maior potencial farmacológico associado (SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013).

3.4.1 Polifenóis

Os polifenóis são agentes redutores e, portanto, oxidam-se com facilidade, resultando em substâncias coradas. A cor desses produtos de oxidação deve-se ao elevado grau de conjugação. Oxidantes, tais como o cloreto férrico (FeCl_3). Esses são empregados para a caracterização de polifenóis em geral; nesse caso, a positividade é evidenciada pelo desenvolvimento de coloração azul ou verde-azulada. Em solução aquosa, os monofenóis progenitores assim com os demais podem funcionar como antioxidantes. Por esse motivo, tem-se a importância de que os ensaios de fenóis totais incluam monofenóis, bem como mais facilmente polifenóis oxidados. A classe específica a que pertencem os polifenóis assim detectados, deve ser melhor caracterizada por reações particulares de cada grupo. (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTOS, 1999; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Os compostos fenólicos são também chamados de polifenóis. Consiste em um grupo de substância com estruturas químicas variáveis, porém simples e/ou complexas. As classes de polifenóis são denominadas de acordo com a natureza química, sendo classificados como fenóis simples e benzoquinonas, ácidos e aldeídos fenólicos, fenil propanóides, ácidos cinâmicos, cumarinas, cromonas, lignanas, xantonas, antraquinonas, flavonoides, taninos

hidrolisáveis e taninos condensados (POTRICKOS et al., 2013; FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

3.4.2 Flavonoides

São compostos heterocíclicos aromáticos possuidores de grupamentos hidroxila ligado a um anel aromático o que o caracteriza como um composto fenólico, essa estrutura fenólica é variável, e por tanto, de elevado interesse científico e terapêutico para os pesquisadores da área da farmacocômica (SILVA et al., 2015). De forma complementar Georgiev; Ananga e Tsoleva (2014) demonstraram que o núcleo que constitui os flavonoides geralmente é formado por três anéis provenientes de um esqueleto carbônico ($C_6-C_3-C_6$), que possibilita a variação da estrutura molecular em consequência de hidroxilação, hidrogenação, metilação e sulfonação, proporcionando a formação de mais quatro mil compostos flavonoídicos, que são agrupados em classes.

A classe dos flavonoides está presente em diversos vegetais, conferindo às flores, aos frutos e as outras partes da planta colorações diversificadas e muitas vezes atrativas, que vão desde o branco até o violeta intenso. São um dos grupos fenólicos mais diversificados, sendo classificados em flavonas, flavonóis e seus O-glicosídeos; flavonoides, isoflavonoides, neoflavonoides; chalconas; antocianidinas; catequinas; auronas; flavononas, biflavonoides. Os flavonoides podem além da forma aglicona se apresentar na forma de heterosídeo, ou seja, uma fração aglicona ligada a um açúcar diferente da glicose. Esse açúcar geralmente agrega pigmentação ao metabólito. A pigmentação principal é a de coloração amarela de onde se originou a denominação de *flavus*. Essa aparente complexidade de suas estruturas químicas possibilita sinergismos farmacológicos e uma variedade de grupos farmacofóricos que propiciam atividade sobre a permeabilidade capilar, antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antitumoral e hormonal. (SOUZA; MELLO; LOPES, 2012).

As avaliações de potencial farmacoterapêutico de flavonoides demonstram também que esses metabólitos são responsáveis por uma ampla variedade de atividades biológicas cardiovasculares, sendo os flavonóis os compostos mais ativos dentro dessa classe (DUARTE; PEREZ-VIZCAÍNO, 2015).

3.4.3 Taninos

Os taninos são polifenóis que formam compostos estáveis com proteínas. Pela classificação química, são divididos em taninos hidrolisáveis (taninos elágicos e taninos gálicos) e taninos condensados (proantocianidinas), pseudotaninos. Possuem propriedades bastante exploradas em fitocosméticos, tais como adstringentes cicatrizantes, hemostáticos, protetores e reepitelizantes, antissépticos e antioxidantes (SOUZA; MELLO; LOPES, 2012). Segundo Adetutu, Morgan, Corcoran (2011) a atividade cicatrizante dos taninos se deve a uma potencialização da regeneração tecidual devido a precipitação de proteínas da pele que provoca uma impermeabilização das camadas mais externas do órgão e das mucosas protegendo assim as camadas subjacentes. A vasoconstrição provocada é um efeito que contribui com a cicatrização.

3.5 Métodos extrativos e partição por solventes

3.5.1 Extração

Extração é um método químico que permite a separação de constituintes químicos de uma matriz segundo sua afinidade com um líquido extrator. Dentre os principais métodos de extração tem-se: maceração, infusão, decocção, extração sob refluxo e extração em aparelho soxhlet (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

O estudo de OLIVEIRA et al. (2016) demonstrou que as técnicas de extração e o solvente extrator influenciam diretamente nos rendimentos extrativos e no teor de metabólitos secundários presentes, podendo por consequência alterar o perfil das atividades biológicas de um extrato. Além disso, eles ressaltaram a importância da análise cromatográfica para avaliação qualitativa e quantitativa na caracterização da natureza de extratos fitoquímicos.

3.5.2 Extração por maceração

É um método de extração sólido/líquido classificado como método a frio (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010). Segundo Sharapin et al. (2000) conforme citado por Silva (2009), esse método permite que a droga permaneça em contato com o solvente por vários dias, sob agitação ou não e à temperatura ambiente, para a realização da extração. Um aspecto norteador do processo é o equilíbrio da concentração entre a droga e o

solvente. Esse aspecto é regido por fatores relacionados à droga vegetal e dos fatores ligados ao solvente. Quando a relação droga/solvente aumenta, o rendimento da extração diminui, devido a saturação do solvente.

O processo tecnológico da maceração pode ser dividido em estático, dinâmico e por digestão. O processo clássico é conhecido como maceração simples e utiliza o solvente em contato com a droga vegetal por determinado tempo ao abrigo da luz como princípio base. A maceração dinâmica difere da simples por promover movimentação do sistema extrativo constantemente. Dessa forma ocorre mais choque entre o líquido extrator e a droga vegetal diminuindo o tempo de extração. Um terceiro método é a maceração por digestão na qual se emprega o uso do aquecimento até uma temperatura de 40-50 °C concomitante à extração (SHARAPIN et al., 2000 apud SILVA, 2009; LIST; SCHIMIDT, 1989 apud SILVA, 2009).

3.5.3 Partição por solventes

A partição segue um princípio de que entre as fases de dois solventes imiscíveis se tem uma dissolução seletiva de constituintes regido pelo coeficiente de partição ou distribuição apresentado por cada substância. Esse fracionamento é também conhecido na prática como particionamento. No fundamento é uma extração líquido-líquido que é realizada com auxílio de funil de separação. A técnica na análise fitoquímica promove separação de constituintes segundo o gradiente de polaridade de diferentes solventes permitindo ao analista escolher com qual fase com perfil de substâncias ele prefere trabalhar e/ou dirigir sua pesquisa para isolamento de constituintes de uma classe específica (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

Segundo Trevisan et al. (2012) o particionamento pode ser realizado não somente em funil de separação como também em soxhlet modificado, utilizando os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, responsáveis por suas respectivas frações e a fração hidroalcoólica remanescente da cromatografia.

3.6 Análise fitoquímica preliminar por semi-quantificação

3.6.1 Leitor de microplacas

O leitor de microplacas, ou leitor de elisa, é um aparelho que tem a finalidade de automatizar o processo de análise fitoquímica semi-quantitativo. O aparelho contribui com o

processo uma vez que facilita o desenvolvimento de métodos, desenvolvimentos de *layouts* de placas, adição de múltiplos ensaios em uma mesma placa, adição de múltiplas placas por análise, relatório personalizado e convertido na forma de *Excel* (INSTRUMENTOS PARA LABORATÓRIOS, 2018).

3.6.2 Fenóis totais

Considerando a heterogeneidade entre os fenóis naturais e a possibilidade de interferência por outras substâncias oxidáveis, é facilmente perceptível que vários métodos de determinação de fenóis totais têm sido utilizados, embora todos apresentem limitações. A colorimetria com sais de ferro apresenta o problema referente à ausência de reação por parte dos fenóis simples. E em algumas condições difenóis vicinais e trifenóis vicinais proporcionam colorações distintas. Outro método, que tem por princípio a oxidação com permanganato de potássio, está sujeito a maiores interferências, particularmente de açúcares. Frente a todos esses, o preferível foi o método de Folin-Ciocalteu (FC) (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999).

Na técnica que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu tem-se a composição desse reagente baseada nos ácidos fosfomolibdico e fosfotungstíco, que se encontram no estado de oxidação +6, porém, em presença de agentes que provocam sua redução, como compostos fenólicos, geram substâncias de coloração azul chamadas de molibdênio e tungstênio. A média do estado de oxidação desses metais está entre cinco e seis e sua coloração permite a identificação de substâncias redutoras, sem, contudo, possuir seletividade aos fenóis totais (HOFF; SINGLETON, 1977; BRUNE; HALLBERG; SKÅNBERG, 1991).

3.6.3 Flavonoides

Existem diversas técnicas destinadas ao doseamento de flavonoides em materiais vegetais. A espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta (UV-Vis) está entre as mais difundidas devido sua ampla disponibilidade nos laboratórios, baixo custo de execução, simplicidade e rapidez para obtenção dos resultados (ALVES et al., 2010).

A limitação mais aparente da espectrofotometria é a sua baixa sensibilidade, o que acaba sendo ainda mais significativo na análise de matrizes complexas como os extratos vegetais (ROCHA; TEIXEIRA., 2004).

Por esse motivo, o método colorimétrico para detecção de flavonoides faz uso do cloreto de alumínio (AlCl_3) para o tratamento das amostras a serem analisadas. Isto porque o reagente fornece cátions que formam complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonoides, ocasionando extensão do sistema conjugado e, conseqüentemente, um desvio batocrômico, que propicia um deslocamento dos máximos de absorção para regiões de maior comprimento de onda diferindo os flavonoides dos demais fenóis (MARCUCCI; WOISKY; SALATINO, 1998).

3.6.4 Taninos

O método de Folin-Denis é semelhante ao método de FC tem por princípio base uma reação de oxido-redução. Esse método vem sendo extensivamente empregado para detecção de taninos hidrolisáveis pois são polímero formados por ácido gálico os quais são ácidos fenólicos (composto fenólico), segundo Paiva (1994); Silva e Paiva (1994); Moura (1998), conforme citado por Silveira; Lima; Lima, 2003.

No entanto, para a detecção de flavonoides monoméricos ou na forma de polímeros (taninos condensados), o uso da reagente vanilina está entre as principais escolhas. Esse se mostra específico para uma classe limitada de compostos que apresentam uma ligação simples na posição 2,3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel. Esses compostos pertencem ao grupo das leucoantocianidinas (catequinas), proantocianidinas (taninos). O princípio da reação consiste na evidência de que a vanilina tem seu grupamento de oxigênio da carbonila protonado devido o ácido clorídrico. Em contrapartida, o carbono carbonílico reage com a posição ativada do anel benzênico devido a presença das hidroxilas. Um intermediário tetraédrico é formado e o seu radical resultante da protonação recebe uma nova protonação e proporciona uma desidratação até a formação do produto final de coloração vermelha (DESHPANDE et al., 1986).

3.7 Métodos cromatográficos

A cromatografia é uma técnica de separação de componentes distintos, pertencentes a uma mistura, através da utilização de uma fase estacionária e outra móvel. A partição de substâncias entre as duas fases e seu conseqüente tempo de retenção são determinados pelas características físico-químicas dos constituintes, o que permite a separação dos analitos (MONTROYA; FLÓREZ, 2016).

Além da cromatografia preparativa que visa o isolamento, existe a modalidade analítica da cromatografia, destinada para fins de identificação, análise de misturas e de substâncias isoladas (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010). Para ambas as modalidades Carlos et al. (2011) ressalta a necessidade de etapa prévia de extração e concentração.

De acordo com os processos de separação de componentes de uma matriz, existem quatro modalidades de cromatografia, sendo elas: cromatografia de partição, cromatografia de adsorção, cromatografia de troca iônica, cromatografia de exclusão ou de filtração molecular. Nessas categorias, divergem-se várias técnicas cromatográficas, através da utilização de equipamentos distintos e pela natureza da fase estacionária. Os exemplos mais encontrados são: cromatografia líquida em coluna, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia em camada delgada e cromatografia gasosa (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2010).

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta, estabilização, secagem e identificação do material vegetal

Os frutos de *Libidibia ferrea* (Max. Ex. Tul.) L. P. Queiroz foram coletados do dia 26 de maio de 2017, nas proximidades do bloco J, no Centro de Educação (CES) da Universidade Federal de Campina Grande, situada no acesso Prof^a. Maria Anita Furtado Coelho, localidade do Olho D'Água da Bica, no município de Cuité–PB. A espécie foi identificada pelo botânico Prof. Dr. Carlos Alberto Garcia Santos (UFCEG - Cuité), a exsicata foi depositada no Herbário do CES-UFCEG e recebeu o código 256.

As vagens (frutos) foram higienizadas com um tecido seco e deixados em temperatura ambiente. Assim como descrito por Kobayashi et al. 2015, os frutos considerados escuros, furados ou inapropriados foram descartados. O material passou por um processo de secagem em estufa de circulação de ar a 40 °C durante 72 horas, sendo utilizada uma amostra como controle para verificação da diminuição do seu peso referente à desidratação. A massa foi aferida a cada 24 horas para verificação da diminuição do peso até valor constante.

4.2 Obtenção da droga vegetal e padronização da granulometria

O material vegetal seco foi triturado em moinho de facas fornecendo o pulverizado. Esse por sua vez, passou por um processo de tamisação para padronização da granulometria. Os tamises escolhidos apresentaram orifícios de abertura com diâmetro de 200 µm, 180 µm, 150 µm, 106 µm e 75 µm, respectivamente.

4.3 Extração

Foi selecionado para a extração o material pulverizado com menor grau de divisão associado a um rendimento suficiente para as necessidades da pesquisa. Para a extração foi utilizado 120 g de planta pulverizada, maceração como método extrativo, utilizando 600 mL de uma solução 50% v/v etanol/água durante 5 dias, nesse período o sistema passou por uma agitação a cada 24 horas. Ao término do processo o material foi filtrado.

4.4 Determinação de resíduo seco

Para determinar a concentração do extrato foi utilizado uma adaptação da metodologia farmacopeica de determinação de resíduo seco. Nesse processo, uma alíquota de 1 mL do extrato líquido foi transferida para uma cápsula de porcelana previamente pesada. Em seguida, esse sistema teve seu volume reduzido a 1/3 com auxílio de aquecimento em chapa aquecedora a 60 °C. O material foi então submetido a secagem em estufa por 4 horas a 100 °C e transferidas ao dessecador até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente, o material teve sua massa aferida em balança analítica e foi submetido a secagem em estufa por 1 hora para posterior pesagem até o valor constante.

4.5 Estudo fitoquímico

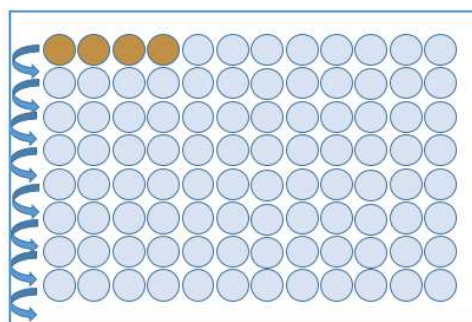
A realização da análise fitoquímica semi-quantitativa de polifenóis, taninos e flavonoides em microplacas, foi realizada em parceria com o Laboratório de desenvolvimento de medicamentos da Universidade Estadual da Paraíba sob a responsabilidade da professora Ana Cláudia e sob supervisão do mestrando Widson Santos.

Nessa análise, o extrato fluido foi diluído utilizando metanol como solvente, na proporção 1/20 da sua concentração inicial, objetivando uma melhor resolução na espectrofotometria UV/Vis utilizando leitor de microplacas para a análise.

4.5.1 Polifenóis

Foi transferido 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. Foi realizada 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 (Figura 2).

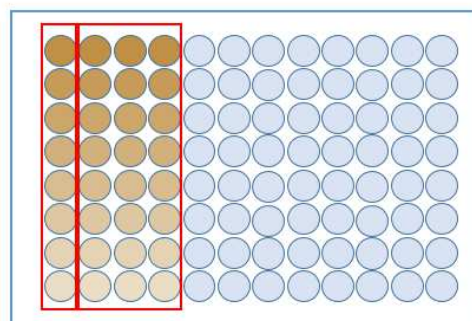
Figura 2 – Método de diluição seriada no sentido de A até H de uma microplaca.



Fonte: Dados da pesquisa.

Então, foi adicionado 150 μL de metanol ao branco e à amostra 100 μL do reagente FC tendo 2 minutos à temperatura como condição de eficiência reacional. Em seguida, foi adicionado 100 μL da solução de Na_2CO_3 deixando-a reagir por 10 minutos. Por fim, foi realizada a leitura das absorvâncias em 757 nm (Figura 3).

Figura 3 – Coluna do branco e colunas da triplicata obtidas por diluição seriada.



Fonte: Dados da pesquisa.

Para a obtenção da curva de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações de solução padrão de ácido gálico: 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 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. Para tanto, foi utilizado uma solução estoque de padrão de ácido gálico, 100 μL da solução de Na_2CO_3 e 50 μL do reagente FC. O branco foi constituído por 50 μL de metanol, 100 μL solução de Na_2CO_3 e 50 μL do reagente FC. A leitura das absorvâncias foi realizada no comprimento de onda de 757 nm.

4.5.2 Taninos

Foi transferido 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, desprezando-se 25 μL no final de cada coluna. Então, foi adicionado ao branco 225 μL de metanol. E 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 realizada em 500 nm.

Para a obtenção da curva de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações: 1, 30, 60, 90, 120, 150, 180 e 200 $\mu\text{g/mL}$. A curva de calibração foi produzida através da distribuição de 3 replicata 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 foi composto por 150 μL da solução de vanilina, 75 μL de HCl e 25 μL de metanol. Realizou-se a leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 500 nm.

4.5.3 Flavonoides

Foi transferido uma alíquota de 200 μL da solução diluída do extrato em quatro poços consecutivos na linha A de uma microplaca. Em seguida, adicionou-se metanol nos demais poços pertencentes às colunas utilizadas. Realizou-se uma diluição seriada no sentido de A até H retirando 100 μL e transferindo para o poço seguinte, despreza-se 100 μL no final de cada coluna. Então, foram adicionados 100 μL de metanol ao branco e 100 μL de uma solução 2 % m/v AlCl_3 /metanol. As leituras das absorvâncias foram realizadas no comprimento de onda de 415 nm.

Para a obtenção da curva de calibração foram utilizadas as seguintes concentrações: 2, 6, 10, 14, 18, 22, 26 e 30 $\mu\text{g/mL}$. 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 36 poços foi adicionado o branco. A solução padrão foi constituída por 100 μL da solução de quercetina, com 100 μL da solução de AlCl_3 /metanol (2 % m/v). O branco foi composto por 100 μL de metanol mais 100 μL da solução 2 % m/v AlCl_3 /metanol. As leituras das absorvâncias foram realizadas no comprimento de onda de 415 nm.

Ao término de cada análise o extrato foi envolvido com papel alumínio e armazenado sob refrigeração.

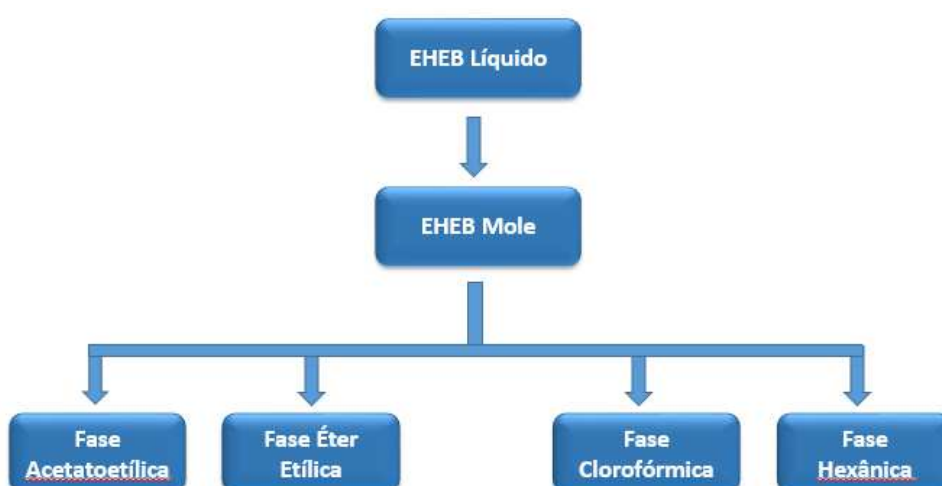
4.6 Secagem por rotaevaporação e obtenção do extrato mole

O extrato bruto, armazenado sob refrigeração, foi concentrado em evaporador rotativo da marca Quimis a 40 °C e 5 RPM de agitação. A essa temperatura todo o etanol e parte da água foi evaporada resultando no extrato mole.

4.7 Particionamento do extrato hidroetanólico bruto

O extrato mole foi submetido a um processo de particionamento por meio de um funil de separação utilizando solventes em gradiente crescente de polaridade, sendo eles, hexano, clorofórmio, acetato de etila e uma solução 70% v/v EtOH:H₂O. As respectivas fases móveis foram concentradas à secura em evaporador rotativo para a obtenção da fase hexânica, fase clorofórmica, fase éteretílica e a fase hidroetanólica (Figura 4). Então, foram aferidas as massas dessas fases através de balança analítica para avaliação do rendimento das substâncias extraíveis segundo a sua polaridade.

Figura 4 – Processo de obtenção do extrato mole e particionamento do extrato hidroetanólico bruto.



Fonte: Dados da pesquisa.

4.8 Prospecção preliminar das fases obtida por particionamento

4.8.1 Identificação de flavonoides

Nesta identificação utilizou-se a reação de Shinoda. Para tanto, adicionou-se 2 mL de cada fase (fração) em tubos identificados da seguinte forma: fase acetatoetólica (F1), fase éter etílica (F2), fase clorofórmica (F3), fase hexânica (F4) e o branco (B). Aos respectivos tubos foi adicionado um fragmento de Mg metálico e posteriormente, acidificou-se o meio através da adição de 5 gotas de HCl concentrado. Por fim, as amostras foram avaliadas quanto à mudança de coloração. A positividade é verificada pela presença de coloração rósea a vermelha.

4.8.2 Identificação de Alcaloides

A avaliação da presença de alcaloides teve por princípio a reação de precipitação frente ao reagente de Dragendorff composto por iodo bismutato de potássio. Para tanto, adicionou-se 2 mL de cada fase (fração) em tubos identificados da seguinte forma: fase acetatoetólica (F1), fase éter etílica (F2), fase clorofórmica (F3), fase hexânica (F4) e o branco (B). Então, aos respectivos tubos foram adicionadas 3 gotas do reagente da Dragendorff. A positividade é verificada pela presença de um precipitado alaranjado.

4.8.3 Identificação de taninos

Utilização de método por precipitação de proteínas. Para essa avaliação, adicionou-se 2 mL de cada fase (fração) em tubos identificados da seguinte forma: fase acetatoetólica (F1), fase éter etílica (F2), fase clorofórmica (F3), fase hexânica (F4) e o branco (B). Posteriormente realizou-se a acidificação do meio através da adição de duas gotas de HCl diluído sob uma concentração de 1%. Então foram adicionadas algumas gotas de uma solução de gelatina 2,5% para observação da formação do precipitado.

Outro método utilizado foi utilizando reagente de cloreto férrico. Para essa avaliação, adicionou-se 2 mL de cada fase (fração) em tubos identificados da seguinte forma: fase acetatoetólica (F1), fase éter etílica (F2), fase clorofórmica (F3), fase hexânica (F4) e o branco (B). Posteriormente foram adicionadas 2 a 4 gotas da solução de cloreto férrico/metanol 1%

(v/v). A observação de coloração verde é indicativa da presença de taninos condensados e a coloração azul indica a presença de taninos hidrolisáveis.

4.9 Caracterização fitoquímica por cromatografia líquida de alta eficiência

Uma alíquota de 1 mL do extrato hidroetanólico bruto, fase acetatoetílica, fase éteretílica, fase clorofórmica e da fase hexânica foram submetidas a caracterização por cromatografia líquida de alta eficiência. Foi utilizado detector de ultravioleta DGU-20A_{SR}, forno para coluna CTO-20A, amostrador automático SIL-20A_{HT} e o módulo bomba LC-20AT (Figura) (Figura 5).

Figura 5 – Equipamento utilizado para cromatografia líquida de alta eficiência.



Fonte: Dados da pesquisa.

As amostras foram submetidas a um tempo de análise de 30 minutos sob uma temperatura de 30 °C. O fluxo de bombeamento foi de 1mL/min sob uma pressão em média de 165 kgf. A fase móvel foi composta por metanol/água (v/v), no modo gradiente iniciando em 10% de metanol e aumentando para 70% em 20 min, com platô por 5 min, e retorno para a 10% até 30 min, A fase estacionária foi de fase reversa, coluna analítica C18 Shim-pack CLC-ODS (250 x 4,6 mm DI), com tamanho da partícula de 5 µm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtido uma exsicata do material coletado identificada pelo código 256, depositada no herbário do CES-UFCG. A partir da fração destinada à pesquisa fitoquímica foi possível obter um extrato hidroetanólico bruto de coloração marrom-escura, com rendimento estimado através da determinação de resíduo seco, que resultou em uma concentração do extrato líquido de 11,29 % (m/v) por meio da qual foi deduzido o seu rendimento aproximado de 67,74 g (Figura 6).

Figura 6 – Cápsulas com amostras para determinação do resíduo seco.



Fonte: Dados da pesquisa.

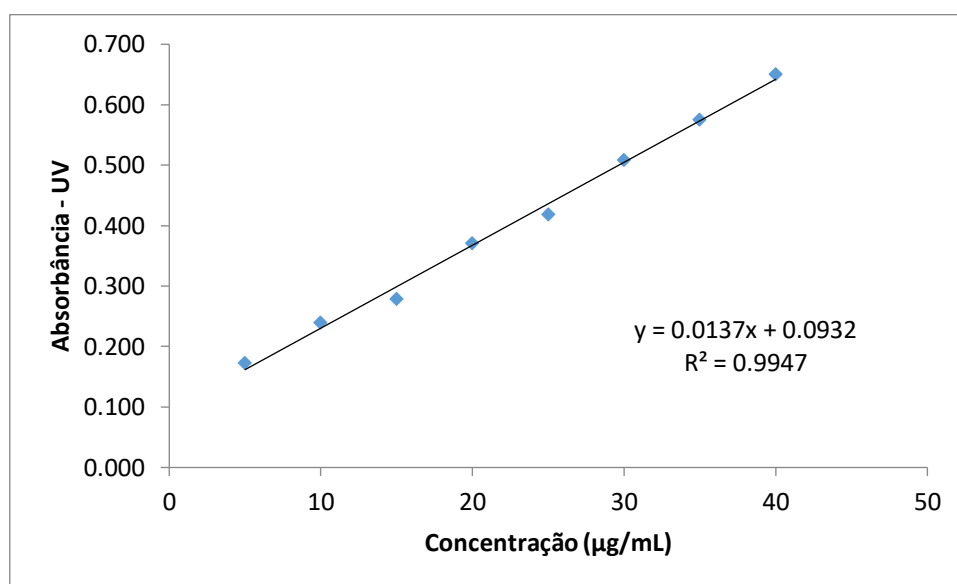
Quando comparado à extração por maceração de vagens de *L. ferrea* realizada por de Kobayashi et al. (2015), a extração desta pesquisa se apresentou mais eficiente em rendimento, tendo em vista que, utilizando uma massa de droga vegetal 8,3 vezes menor, tempo de extração inferior em 2 dias e mesma concentração de droga vegetal e líquido extrator (20% m/v) foi possível obter um valor próximo dos 152,93 g do extrato. Essa diferença pode ser explicada pela utilização de agitações periódicas a cada 24. horas e a utilização da solução hidroetanólica 50% (v/v).

A polaridade da água é maior do que a polaridade do etanol e tende a aumentar o rendimento extrativo porque toda substância apresenta alguma diferença na disposição de seus elétrons em sua estrutura molecular. Dessa forma todos os metabólitos secundários tendem a interagir mesmo que fracamente com substância de alta polaridade. Esse potencial de interação é maior com a água do que com o etanol de polaridade inferior. Barros et al. (2018) mostrou a importância da determinação do tempo de saturação do líquido extrator na escolha

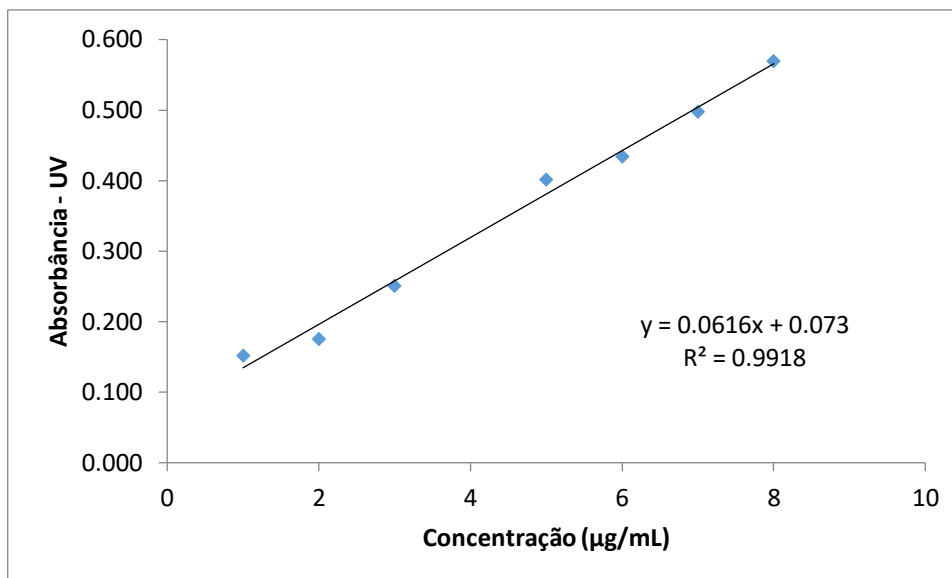
do método extrativo. Isso pode explicar porque 48 horas a mais utilizadas por Kobayashi et al. (2015) não surtiram significativo aumento de rendimento extrativo.

Para a realização do ensaio de caracterização fitoquímica, o extrato utilizado foi diluído a 5645 µg/mL. As curvas de calibração obtidas para análise de polifenóis a partir do padrão ácido gálico (figura 7), de flavonoides a partir do padrão quercetina (Figura 8), e de taninos a partir do padrão catequina (Figura 9) foram lineares, com coeficiente de correlação de 0,9947, 0,9918 e 0,9917 respectivamente.

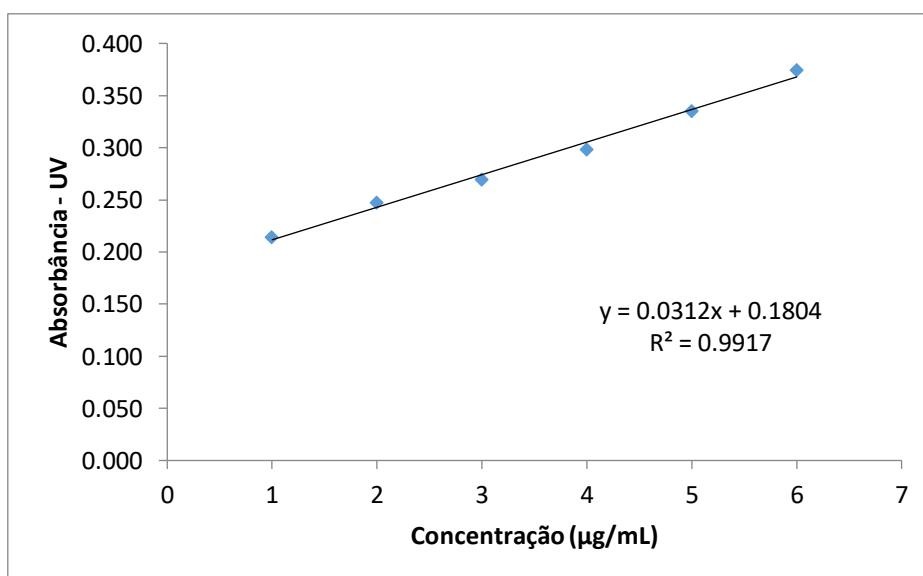
Figura 7 – Curva de calibração para quantificação do ácido gálico.



Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 8 – Curva de calibração para quantificação de quercetina.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 9 – Curva de calibração para quantificação de catequina.

Fonte: Dados da pesquisa.

As análises fitoquímicas de semi-quantificação demonstraram maior quantidade de polifenóis, seguido de flavonoides (Tabela 1). Entretanto, não foi possível detectar e quantificar a presença de taninos.

Embora Kobayashi et al. (2015) em suas análises fitoquímicas tenha revelado a presença de fenóis e taninos no extrato etanólico bruto (EEB) de frutos de *L. ferrea*. A

ausência de detecção de taninos no presente trabalho, pode ser explicada pelo padrão catequina ser destinado à detecção de taninos condensados (MOREIRA et al., 2012) motivo esse, que nos leva a suspeitar que os taninos presentes na planta 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 também o seu uso popular como cicatrizante (VERZA et al., 2007; KOBAYASHI et al., 2015).

Tabela 1 – Valores de polifenóis e flavonoides quantificados.

	Polifenóis			Flavonóides	
	Concetração (mg/mL)	Absorbância média	Teor (mg/g)	Absorbância média	Teor (mg/g)
A	5,65	2,80	35,06	0,42	1,01
B	2,82	2,54	31,02	0,28	0,59
C	1,41	2,33	28,08	0,20	0,36
D	0,71	2,06	25,37	0,17	0,28
E	0,35	1,64	19,98	0,15	0,21
F	0,18	1,03	12,10	0,13	0,17
G	0,08	0,60	6,57	0,11	0,11
H	0,04	0,39	3,84	0,11	0,11

Fonte: Dados da pesquisa.

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 *L. ferrea* não alterou significativamente o corpo vital e reprodutivo, o peso dos órgãos reprodutivos e a produção de gametas em experimento com ratos.

A composição química qualitativa e quantitativa das espécies estudadas pode ser influenciada pelo ciclo circadiano e sazonalidade. A possível ausência de detecção pode

ser explicada porque determinados compostos só são produzidos em horários e estações específicas (RIBEIRO; BONILLA; LUCENA, 2018).

Através do particionamento do extrato hidroetanólico bruto foi possível obter 2,7 g da fase acetatoetílica, 918,8 mg da fase éteretílica, 119,6 mg da fase clorofórmica e 22,7 mg da fase hexânica.

É possível observar significativo aumento de rendimento nas fases obtidas utilizando solventes de maior polaridade frente aos de menor polaridade. Isso pode ser explicado, pela natureza eletrônica dos compostos químicos. Toda substância apresenta uma diferença na distribuição dos seus elétrons (polaridade), seja por influência da disposição de átomos com eletronegatividade distintas, ou devido interações intermoleculares, que induzem a distribuição não uniforme, desses elétrons.

Os solventes de maior polaridade tendem a interagir ainda que, fracamente com todas as substâncias de forma mais significativa do que os solventes de menor polaridade. Porque essas interações são regidas pela lei de Coulomb, logo, a diferença de cargas entre os corpos é diretamente proporcional à força de atração (VOLHARDT; SCHORE, 2013).

Isso pode explicar porque os solventes de maior polaridade tendem a aumentar rendimento extrativo. A fase acetatoetílica apresentou coloração marrom levemente mais clara do que a do extrato hidroetanólico bruto. A fase éteretílica apresentou uma coloração amarelo escuro. A fase clorofórmica demonstrou uma coloração marrom escura semelhante à coloração observada no extrato hidroetanólico bruto. Enquanto isso, a fase hexânica apresentou-se com uma coloração amarelo claro (Figura 10).

Figura 10 – Fases obtidas por particionamento do extrato etanólico bruto.



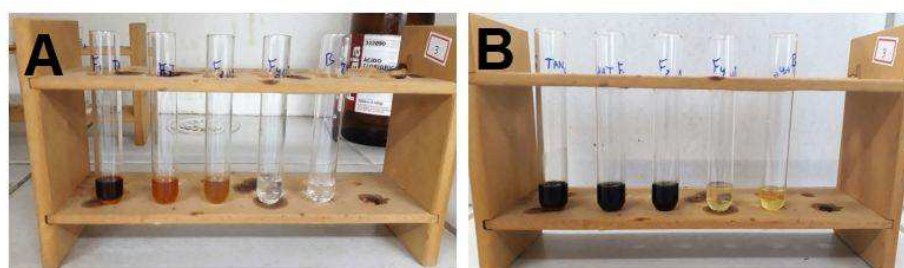
Fonte: Dados da pesquisa.

Tendo em vista as análises de prospecção preliminar realizadas sobre as fases obtidas por particionamento, foi possível depreender que a fase acetatoetílica se apresentou positiva para taninos através do teste de precipitação de proteínas, utilizando gelatina, o que foi confirmado pelo teste utilizando reagente de cloreto férrico, observando uma coloração azul escura sugestiva para taninos hidrolisáveis. O que pode ser confirmado por Nakamura et al. (2002) que partindo de um extrato metanólico conseguiu por particionamento uma fase acetatoetílica, identificou nessa fase apenas ácido gálico e o galato de metila sendo o primeiro considerado pseudotanino ou precursor de tanino hidrolisável.

A Fase acetatoetílica, éter etílica e a fase clorofórmica apresentaram-se positivas para o teste de taninos e sugestiva para taninos hidrolisáveis porque, quando submetidas ao teste com reagente cloreto férrico apresentaram uma coloração escura que lembra as reações positivas para taninos gálicos (Figura 11). A ausência de detecção de taninos catéquicos na análise fitoquímica quantitativa corrobora com esse resultado encontrado.

Os taninos por serem polímeros formados por monômeros de catequina ou de ácido gálico, são compostos de alta polaridade que tendem a se concentrar nas fases de mais polares obtidas por particionamento. A fase hexânica tende a extrair em maior proporção os metabólitos secundários de óleos voláteis como os sesquiterpenos e os monoterpenos.

Figura 11 – Teste de identificação de taninos pelo método do cloreto férrico, antes do teste (A), depois do teste (B).



Fonte: Dados da pesquisa.

Quando testados sob a propriedade de precipitar proteínas da gelatina somente a fase acetatoetílica se mostrou positiva, através da formação de um precipitado esbranquiçado (Figura 12). A fase éter etílica e clorofórmica e principalmente a fase hexânica, possivelmente apresentaram baixo rendimento de taninos, impossibilitando sua detecção através desse teste.

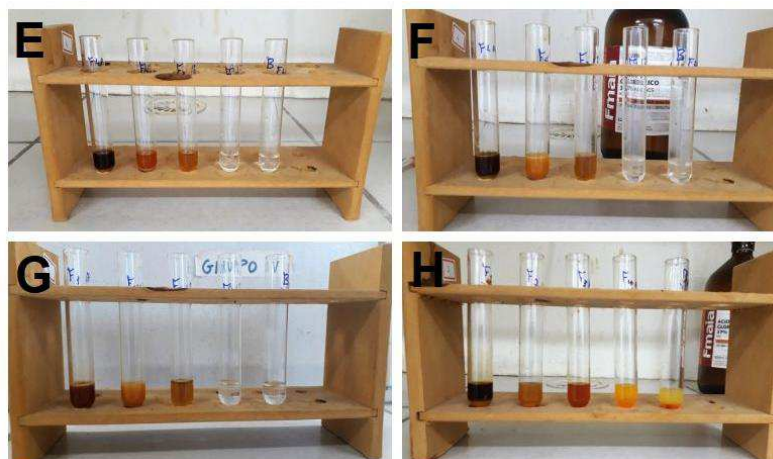
Figura 12 – Teste de identificação de taninos pelo método de precipitação de proteínas da gelatina, antes do teste (C), depois do teste (D).



Fonte: Dados da pesquisa.

A fase hexânica se mostrou negativa em todos os testes para prospecção preliminar. Quanto à presença de alcaloides e flavonoides o teste indicou negatividade em todas as fases testadas, por ausência de precipitado alaranjado e coloração róseo avermelhada, respectivamente (Figura 13).

Figura 13 – Teste de identificação de flavonoides, antes do teste (E), depois do teste (F). Teste de identificação de alcalóides, antes do teste (G) e depois do teste (H).



Fonte: Dados da pesquisa.

Embora na análise fitoquímica quantitativa tenha sido possível quantificar e estimar o teor de flavonoides no extrato hidroetanólico bruto. As fases obtidas por particionamento, não necessariamente apresentarão os mesmos metabólitos detectados no extrato hidroetanólico bruto. Os taninos podem apresentar maior afinidade pelo solvente hidroetanólico do extrato mole, quando comparado aos solventes utilizados no particionamento.

O baixo rendimento da fase hexânica pode explicar a ausência de detecção desses metabólitos, nesses testes qualitativos. Os testes qualitativos de identificação, tendem a exigir um maior rendimento de metabólitos para tornar notável macroscopicamente as transformações químicas inerentes às reações, sejam de precipitação ou coloração.

Através da análise por cromatografia líquida de alta eficiência foi possível obter os perfis cromatográficos do extrato hidroetanólico bruto (Figura 14), assim como da fase acetatoetílica (Figura 15), fase éteretílica (Figura 16), fase clorofórmica (Figura 17) e da fase hexânica (Figura 18, figura 19), sendo todos os perfis representados através de cromatogramas, que ainda não foram encontrados na literatura.

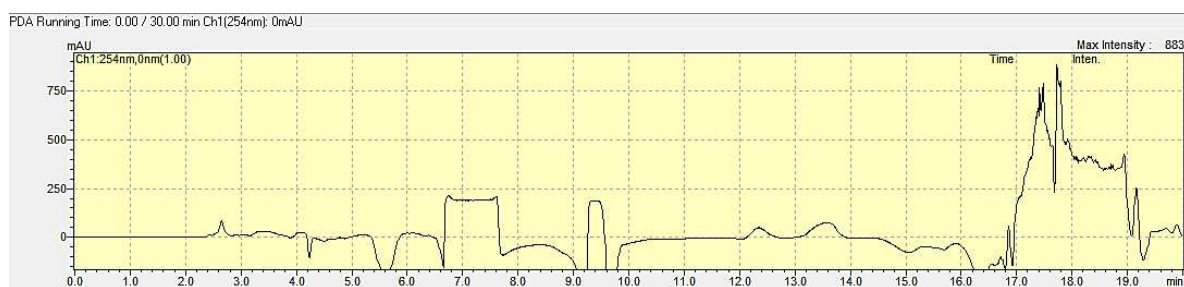
Figura 14 – Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico bruto de *Libidibia ferrea*..



Fonte: Dados da pesquisa.

O perfil cromatográfico da fase acetatoetílica demonstra uma distinção de substâncias frente ao perfil do extrato hidroetanólico bruto, devido à influência da seletividade do solvente por um grupo de substâncias, no particionamento (Figura 15).

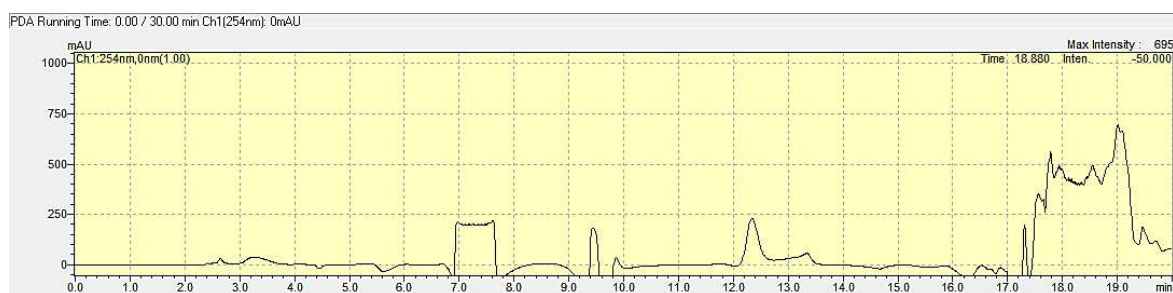
Figura 15 – Perfil cromatográfico da fase acetatoetílica de *Libidibia ferrea*.



Fonte: Dados da pesquisa.

O perfil da fase acetatoetífica quando comparada ao perfil da fase éter etífica, apresentou substâncias de menor tempo de retenção em detrimento de substâncias que tem maior afinidade pela coluna cromatográfica. Esse comportamento é esperado, porque a fase acetatoetífica apresenta substâncias polares em maior proporção do que a fase éter etífica (Figura 16)

Figura 16 – Perfil cromatográfico da fase éter etífica de *Libidibia ferrea*.

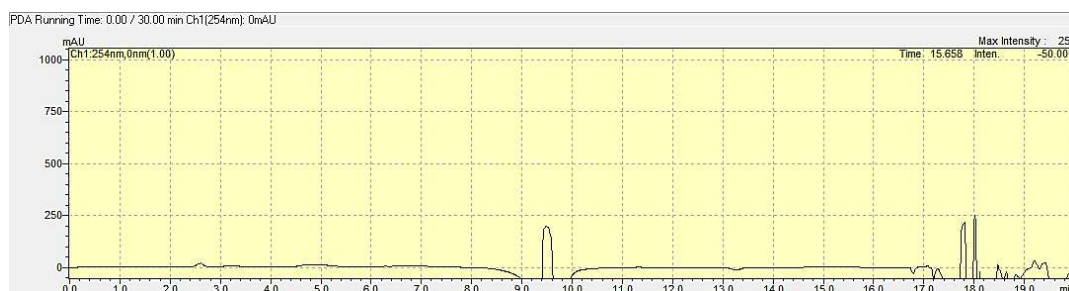


Fonte: Dados da pesquisa.

As substâncias de menor polaridade tendem a ter maior afinidade pela fase estacionária formada por siloxanos de cadeia carbônica longa (fase reversa) do que pela fase móvel composta por diferentes proporções de metanol:água., aumentando o seu tempo de retenção. Isso pode explicar porque os perfis cromatográficos das fases menos polares como hexânica, apresentam sinais intensos, em maior tempo de retenção.

O perfil cromatográfico da fase clorofórmica demonstra um comportamento próprio porque o clorofórmio nesse gradiente é considerado um solvente de polaridade intermediária, as substâncias obtidas por partição possuem uma intensidade do sinal maior no minuto dezoito, apresentando um tempo de retenção de valor intermediário, relativo às demais fases (Figura 17).

Figura 17 – Perfil cromatográfico da fase clorofórmica de *Libidibia ferrea*.



Fonte: Dados da pesquisa

A fase hexânica apresentou sinais de baixa intensidade devido ao seu rendimento inferior. Ainda assim, é possível perceber sinais fracos no minuto 17 e um aumento da intensidade do sinal conforme aproxima-se do término da análise. Esse comportamento é esperado, porque a fase hexânica é significativamente menos polar do que as demais (Figura 18) e (Figura 19).

Figura 18 – Perfil cromatográfico da fase hexânica de *Libidibia ferrea* parte 1.



Fonte: Dados da pesquisa

Figura 19 – Perfil cromatográfico da fase hexânica de *Libidibia ferrea* parte 2.



Fonte: Dados da pesquisa

Esses perfis cromatográficos funcionam como a digital da planta, e podem ser úteis no controle de qualidade de drogas vegetais e possivelmente futuros medicamentos fitoterápicos ou tradicionais fitoterápicos de *L. ferrea*. Além disso, os perfis cromatográficos contribuem para o monitoramento do rendimento extrativo, e no direcionamento do isolamento e purificação de moléculas bioativas. Através, da interpretação e correlação dos perfis cromatográficos de frações obtidas na rotina de isolamento de metabólitos secundários.

6 CONCLUSÕES

- Nas condições metodológicas foi possível obter um extrato hidroetanólico bruto de *Libidibia ferrea* com rendimento estimado 67,74 g.
- Através da análise fitoquímica semi-quantitativa foi possível identificar flavonoides e polifenóis no extrato hidroetanólico bruto. Foi estimado o teor desses metabólitos contribuindo para o entendimento da proporção que os flavonoides ocupam no teor de fenóis totais e a proporção de fenóis totais relativos ao rendimento do extrato obtido.
- Frente à prospecção preliminar as fases acetatoetílica, éter etílica e clorofórmica indicaram a presença de taninos com coloração sugestiva de taninos hidrolisáveis ou gálicos, sendo a fase acetatoetílica ainda reativa quanto à precipitação de proteínas da gelatina. A fase hexânica indicou ausência de taninos, e todas as fases indicaram ausência de flavonoides e alcaloides nesses testes de identificação qualitativos.
- Por meio do fracionamento líquido-líquido do extrato hidroetanólico bruto foi possível obter 2,7 g da fase acetatoetílica, 918,8 mg da fase éter etílica, 119,6 mg da fase clorofórmica e 22,7 mg da fase hexânica.
- Os extratos e frações foram caracterizados através de cromatografia líquida de alta eficiência fornecendo seus respectivos perfis cromatográficos.

REFERÊNCIAS

- ADETUTU, A.; MORGAN, W. A.; CORCORAN, O. Ethnopharmacological survey and in vitro evaluation of wound-healing plants used in South-western Nigeria. **Journal of ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 50-56, 2011.
- ALVES, L. D. S. et al. Desenvolvimento de método analítico para quantificação do efavirenz por espectrofotometria no UVVIS. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1967-1972, 2010.
- ARAUJO, A. A. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 156, p. 88-96, 2014.
- 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.
- BARROS, Divanize Batista Sales et al. Tempo de extração para óleo essencial de *Croton* spp.(Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Meio Ambiente**, v. 3, n. 1, 2018.
- 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.
- BRASIL. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. **Departamento de Atenção Básica**. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2012. 156 p.
- BRUNE, M.; HALLBERG, L.; SKÅNBERG, A. Determination of iron-binding phenolic groups in foods. **Journal of Food Science**, v. 56, n. 1, p. 128-131, 1991.
- CAETANO, N. L. B. et al. Medicinal Plants Used by the Population of Lagarto, SE, Brazil—Emphasis in Cancer Patients. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 748-756, 2015.
- CARLOS, E. A. et al. Determination of trihalomethanes and pesticides in water by gas chromatography. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 272-278, 2011.
- CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Rev Sapiê: Soc Sab Prát Educ**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.
- CARVALHO, F. G. 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.
- 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.

COSTA, L. M.; GUILHON-SIMPLICIO, F.; SOUZA, T. P. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz var. *ferrea*: pharmacological, phytochemical and botanical aspects. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, p. 48-53, 2015.

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.

DESHPANDE, S. S. et al. Tannin analysis of food products. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 24, n. 4, p. 401-449, 1986.

DIAS, A. M. A. et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 34-45, 2013.

DUARTE, J.; PÉREZ-VIZCAÍNO, F. Protección cardiovascular con flavonoides: enigma farmacocinético. **Ars Pharmaceutica**, v. 56, n. 4, p. 193-200, 2015.

Fabaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB109828>>. Acesso em: 23 Ago. 2018.

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.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I. S.; SIMÕES, C. M. O. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÕES, C. M. O. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFSC, 2010. p. 229-262.

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.

FERREIRA, P. S. M.; TROVÃO, D. M. B. M.; MELO, J. I. M. Leguminosae na APA do Cariri, Estado da Paraíba, Brazil. **Hoehnea**, v. 42, n. 3, p. 531-547, 2015.

GADELHA, C. S. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208-212, 2013.

GALLÃO, M. I. et al. Morphological, chemical and rheological properties of the main seed polysaccharide from *Caesalpinia ferrea* Mart. **Industrial crops and products**, v. 47, p. 58-62, 2013.

GEORGIEV, V.; ANANGA, A.; TSOLOVA, V. Recent advances and uses of grape flavonoids as nutraceuticals. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 391-415, 2014.

HOFF, J. E.; SINGLETON, K. v I. A method for determination of tannins in foods by means of immobilized protein. **Journal of Food Science**, v. 42, n. 6, p. 1566-1569, 1977.

INSTRUMENTOS PARA LABORATÓRIOS. **Leitora de Elisa EZ Read 2000**. Disponível em: <
<http://www.instrulab.com.br/assets/downloads/catalogo%20leitorea%20de%20elisa%20ez%20read%202000%20%20%20pdf-cfc65.pdf>>. Acesso em: 18 Ago. 2018.

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.

KŘENEK, K. et al. Preparatory separation of the silymarin flavonolignans by Sephadex LH-20 gel. **Food research international**, v. 65, p. 115-120, 2014.

LEWIS, G. P et al. Legumes of the World. **Royal Botanic Gardens Kew**, 2005.

LOPES, N. et al. Sulfated polysaccharide of *Caesalpinia ferrea* inhibits herpes simplex virus and poliovirus. **International journal of biological macromolecules**, v. 60, p. 93-99, 2013.

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.

MAGALHÃES, I. L. et al. Chemical Constituents from *Caesalpinia ferrea*: Identification and ¹H and ¹³C Resonance Assignment. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 5, n. 10, p. 688, 2014.

MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades. São Paulo: D e Z Computação Gráfica, Leitura e Arte, 2004. 413 p.

MARCUCCI, M. C.; WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. **Mensagem doce**, v. 46, n. 3, p. 234-239, 1998.

MARQUES, Márcia Maria Mendes et al. Antiviral and Antioxidant Activities of Sulfated Galactomannans from Plants of Caatinga Biome. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, 2015.

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.

MONTOYA, J. O. C.; FLÓREZ, J. E. M. Phytochemical variability between Colombian accessions of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown. **Revista de Investigación Agraria y Ambiental**, v. 7, n. 2, 2016.

MOREIRA, A. C. C. G. et al. Fitoquímicos bioativos em frutos de genótipos de cajá-umbuzeiras. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 23, n. 2, p. 235-241, 2012

NAKAMURA, E. S. et al. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, n. 2, p. 119-124, 2002.

- NAWWAR, M. A. et al. Phenolics from *Caesalpinia ferrea* Mart.: antioxidant, cytotoxic and hypolipidemic activity. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 8, p. 553-558, 2015.
- NAWWAR, M. et al. Three New Di-O-glycosyl-C-glucosyl Flavones from the Leaves of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 69, n. 9-10, p. 357-362, 2014.
- NOZAKI, H. et al. Pauferrol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 47, p. 8290-8292, 2007.
- OHIRA, S. et al. New chalcone dimers from *Caesalpinia ferrea* Mart act as potent inhibitors of DNA topoisomerase II. **Tetrahedron Letters**, v. 54, n. 37, p. 5052-5055, 2013.
- 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.
- OLIVEIRA, V. B. et al. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por CLAE-DAD de *Dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Rev Bras Plantas Med**, v. 18, n. 1, p. 230-239, 2016.
- PEDROSA, T. N. et al. Anti-wrinkle and anti-whitening effects of jucá (*Libidibia ferrea* Mart.) extracts. **Archives of dermatological research**, v. 308, n. 9, p. 643-654, 2016.
- 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.
- PIRES, J. et al. Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 2017.
- PORT'S, P. S. et al. The phenolic compounds and the antioxidant potential of infusion of herbs from the Brazilian Amazonian region. **Food research international**, v. 53, n. 2, p. 875-881, 2013.
- POTRICKOS, R. et al. Determinação de fenóis totais em infusões aquosas de chá verde (*Camelia sinensis*) e de erva mate (*Ilex paraguariensis*) preparada na forma de chimarrão. **Revista Interdisciplinar de Estudos em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 27-38, 2013.
- RIBEIRO, S. M.; BONILLA, O. H.; LUCENA, E. M. P. Influência da sazonalidade e do ciclo circadiano no rendimento e composição química dos óleos essenciais de *Croton* spp. da Caatinga. **Iheringia. Série Botânica.**, v. 73, n. 1, p. 31-38, 2018.
- ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química nova**, v. 27, p. 807-812, 2004.
- RODRIGUES, A. G.; AMARAL, A. C. F. **Aspectos sobre o desenvolvimento da fitoterapia**. In: BRASIL. (Org). **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Editora Ministério da Saúde, 2012. 156 p.

SAMPAIO, F. 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.

SÁNCHEZ-FERNÁNDEZ, R. E. et al. Hongos endófitos: fuente potencial de metabolitos secundarios bioactivos con utilidad en agricultura y medicina. **Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 16, n. 2, p. 132-146, 2013.

SAWADA, L. A. et al. *Libidibia ferrea* mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

SCHULTES, R.E. Members of Euphorbiaceae in primitive and advanced societies. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.94, n.1, p.79-95, 1991.

SIANI, A. C. et al. Estudo Prospectivo de Leguminosas da Amazônia Central. II. Composição Química dos Óleos das Sementes. **Revista Fitos Eletrônica**, v. 1, n. 03, p. 58-64, 2013.

SILVA, A. L. **Análise química de espécies de valeriana brasileiras**. 2009. Tese (programa de pós-graduação em química) – Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVA, F. A. et al. Arbuscular mycorrhizal fungi increase gallic acid production in leaves of field grown *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) LP Queiroz. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 36, p. 1110-1115, 2014.

SILVA, L. C. N. et al. Anti-*Staphylococcus aureus* action of three Caatinga fruits evaluated by electron microscopy. **Natural product research**, v. 27, n. 16, p. 1492-1496, 2013.

SILVA, L. C. N. et al. Evaluation of combinatory effects of *Anadenanthera colubrina*, *Libidibia ferrea* and *Pityrocarpa moniliformis* fruits extracts and erythromycin against *Staphylococcus aureus*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 32, p. 2358-2364, 2013.

SILVA, L. R. et al. Flavonóides: constituição química, ações medicinais e potencial tóxico. **Acta toxicológica argentina**, v. 23, n. 1, p. 36-43, 2015.

SILVEIRA, A. C. T.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de tanino em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. In: Methods in enzymology. **Academic press**. p. 152-178. 1999

SOARES, I. J. et al. Estudo Fitoquímico das cascas de *Martiodendron excelsum* (Benth.). **RCT-Revista de Ciência e Tecnologia**, v. 4, n. 6, 2018.

SOUZA, G. H. B. de; MELLO, J. C. P. de; LOPES, N. P. (Orgs.). Farmacognosia: coletânea científica. Ouro Preto: Editora UFOP. 372 p. 2012.

TREVISAN, R. R. et al. Avaliação da atividade fitotóxica com enfoque alelopático do extrato das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent Ulmaceae e purificação de dois triterpenos. **Rev bras plantas med**, v. 14, n. 3, p. 494-499, 2012.

UEDA, H. et al. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 377-381, 2001.

UEDA, H.; KAWANISHI, K.; MORIYASU, M. Effects of ellagic acid and 2-(2, 3, 6-trihydroxy-4-carboxyphenyl) ellagic acid on sorbitol accumulation in vitro and in vivo. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1584-1587, 2004.

VASCONCELOS, C. F. B. et al. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1533-1541, 2011.

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**, v. 30, n. 4, p. 815-820, 2007.

VOLLHARDT, P.; SCHORE, N. E. **Química Orgânica-: Estrutura e Função**. Bookman Editora, 2013.

WYREPKOWSKI, C. C. et al. Characterization and quantification of the compounds of the ethanolic extract from *Caesalpinia ferrea* stem bark and evaluation of their mutagenic activity. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16039-16057, 2014.