

EXTRAÇÃO, IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS NA PLANTA DE NIM (*Azadirachta indica*).

Luana Martins de Mello (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Érica Marusa Pergo Coelho (Orientadora). E-mail: empcoelho@uem.br, Martha Freire da Silva (Coorientadora), Fabiane de Paiva Silva Coqueiro e Amanda Garcia e Silva.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Agrárias, Umuarama - PR.

Agronomia, Fitotecnia.

Palavras-chave: Espectrofotômetro de massas; estágio de desenvolvimento; planta medicinal

RESUMO

A *Azadirachta indica*, conhecida como “nim” ou “nime”, é uma planta que apresenta características medicinais, utilizada como matéria prima nas indústrias de remédios, cosméticos e fungicidas. O trabalho conduzido no laboratório de bioquímica (DCA/Fazenda), UEM/Fazenda Umuarama-PR, teve como objetivo extrair, identificar e quantificar compostos fenólicos para a detecção de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência da planta jovem e adulta de nim. Frutos de nim foram coletados, processados e germinados em câmara B.O.D. para obtenção das plântulas e cotilédones. Também foram coletadas folhas, para representar a planta adulta. Os extratos foram obtidos a partir da infusão ou ultrassom, e foram submetidos a dois métodos de diluição para a análise no Espectrofotômetro de massas. Alguns compostos só foram detectados no extrato diluído em metanol e suas concentrações variaram conforme a parte da planta utilizada. Conclui-se que o estágio de desenvolvimento, bem como o método de diluição influenciaram na quantidade de compostos identificados e nas concentrações.

INTRODUÇÃO

A *Azadirachta indica*, pertence à família Meliaceae, é uma planta medicinal, que vem sendo bastante utilizada em diversas áreas da indústria e na agricultura, por apresentar metabólitos secundários diversos, que são sintetizados por fatores bióticos e abióticos (SCHMUTTERER, 1990). Embora as folhas de nim já tenham sido amplamente estudadas, ainda não há pesquisas com plântulas desta espécie, estes estudos são importantes para traçar um perfil metabólico e talvez descobrir moléculas novas ou até quantidades de moléculas em maiores concentrações.

Por esta razão o presente trabalho teve por objetivo extrair, identificar e quantificar compostos fenólicos para a detecção de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência da planta jovem e adulta de nim.

MATERIAIS E MÉTODOS

O experimento foi conduzido no Laboratório de Bioquímica da UEM, Campus Umuarama-PR (latitude 23°47'28"S e longitude 53°15'21"W). Frutos de nim foram coletados, processados e germinados em câmara B.O.D. (27 ± 2 °C; fotoperíodo 16h/8h). Após 10 dias, plântulas e cotilédones foram separados, armazenados a -34 °C e posteriormente liofilizados; folhas também foram coletadas, congeladas e liofilizadas. As amostras foram submetidas a extração por infusão (60–70 °C, 2 h) (OLIVEIRA, 2016) e por ultrassom (40 °C, 1 h, 10 g/100 mL em água ultrapura) descrita por Sandhu, (2021).

Os extratos foram filtrados, centrifugados e preparados em água ou metanol (80%) para análise em UHPLC-MS (Shimadzu 8050 MS, NEXERA X2 HPLC), utilizando gradiente linear e 38 padrões fenólicos. Os metabólitos foram processados no software Lab Solution integrado ao programa Insight.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 01 apresenta os dados obtidos no HPLC/MS e a análise do software Lab Solution (Shimadzu) acoplado ao programa Insight, após a corrida de 20 minutos. Foram identificados 30 compostos nos cotilédones, 26 nas plântulas e 25 nas folhas.

A maioria dos compostos foram indentificados tanto em água, quanto em metanol. Os casos de compostos indentificados apenas no extrato diluído em metanol, como isovanilina, naringina e naringenina nas folhas, pode estar associado com as características químicas destes compostos. Segundo Silva (2019) o solvente utilizado pode influenciar na solubilidade e estabilidade dos compostos, tornando-os mais estáveis e mais solúveis, favorecendo a identificação. Nas folhas também houve o maior caso de compostos que ultrapassaram a curva de calibração de 250 ppb, (sendo: ácido fumárico, ácido málico, ácido quínico e rutina) por mais que isso impeça a quantificação exata, os valores obtidos mostram que estes metabolitos estão presentes em abundância nas folhas de *A. indica*, estando associado com as funções fisiológicas desempenhadas no metabolismo vegetal, como defesa contra estresses oxidativos, regulação osmótica, e metabolismo secundário. (FUMAGALI *et al*, 2008)

A relação entre o estágio de desenvolvimento da planta e a presença de fenólicos também pôde ser observada. O ácido resorcílico, por exemplo, foi exclusivo dos cotilédones, enquanto a epicatequina foi detectada em todas as fases, embora com variações entre os solventes utilizados. Isso reforça que tanto o estágio fenológico quanto o tipo de solvente influenciam diretamente no perfil dos compostos extraídos.

Além das funções fisiológicas, muitos dos compostos identificados, como o ácido gálico e o ácido sirínico, apresentam potenciais aplicações antioxidantes e antimicrobianas, com interesse industrial e agrícola.

Tabela 1 - Identificação e quantificação de compostos fenólicos no extrato aquoso

das Folhas de nim, Cotilédone e plântula, diluído em água (DA) e metanol (DM) utilizando curva de calibração de 38 fenólicos no HPLC/MS.

FENÓLICO $\lambda = 100 - 700\text{nm}$	Cotiléd. DA [ppb]	Cotiléd. DM [ppb]	Plântula DA [ppb]	Plântula DM [ppb]	Folha DA [ppb]	Folha DM [ppb]
Ácido Cafeíco	18,77	19,48	14,78	16,82	338,77	358,15
Ácido Clorogênico	-	-	-	-	265,88	311,09
Ácido Ferúlico	319,23	293,85	92,31	97,88	452,55	390,41
Ácido Fumárico	*1.146,07	*1.160,63	*3.196,43	*3.212,08	*6.059,42	*6.670,42
Ácido Gálico	24,83	37,13	71,63	77,93	383,87	378,46
Ácido Málico	*19.369,75	*23.088,81	*6.868,73	*7.593,32	*42.095,54	*40.976,49
Ácido Nicotínico	300,45 *901,83	336,51 *996,81	348,94 *1.327,44	357,68 *1.440,72	165,12 333,78	173,91 359,01
Ácido p-cumárico	150,03	193,71	56,07	63,19	811,01	877,07
Ácido p-hidroxibenzóico	161,67	173,60	327,67	347,38	73,92	88,72
Ácido Protocatecuico	59,02	52,56	60,00	77,54	130,25	133,08
Ácido quínico	*1.266,40	*1.855,52	288,33	290,99	*12.308,87	*14.100,00
Ácido Resorcílico	-	60,37	-	-	-	-
Ácido Salicílico	<10	<10	<10	<10	-	-
Ácido Siríngico	82,81	77,22	50,36	36,25	78,89	85,94
Ácido Sinápico	74,60 22,51	71,63 21,65	- -	- -	142,49 214,80	129,36 260,59
Ácido Vanílico	160,49	187,72	88,92	71,57	83,29	5-1,94
Baicalin	<10	<10	-	-	-	-
Catecol	-	-	-	-	-	-
Catequina	33,54 28,34	76,67 67,88	14,95 -	22,80 -	124,94 97,80	378,22 289,36
Cafeína	9,97	12,01	12,95	14,22	-	-
Chrysin	<10	<10	-	-	-	-
Coníferil Aldeído	85,55 -	73,15 -	49,03 31,89	73,75 45,58	113,10 -	146,96 -
Cumarina	<10	<10	<10	<10	94,24	292,44
Epicatequina	44,96	88,49	-	32,14	38,57	26,17
Hidroxibenzaldeído	38,37 47,91	44,53 40,46	109,95 143,76	127,78 167,86	31,37 -	35,33 32,64
Isovanilina	37,72	30,29	49,13	49,31	-	-
Luteolin	-	-	-	-	10,87	217,29
Kaempferol	- -	- -	- -	<10 -	- -	- 3,83
Morina	-	-	-	-	-	2,32
Naringina	-	-	-	-	-	10,83
Naringenina	- -	- <10	- -	- -	64,33 *43.805,07	2.145,58 *45.943,74
Quercetina	<10	<10	<10	<10	-	-
Rutina	603,55	919,83	309,52	470,37	-	-
Seringaldazina	-	-	-	-	-	-
Seringaldeído	32,16	31,75	58,40	51,02	25,86	40,69
Sinapaldeído	- -	- 5,92	18,32 7,80	21,12 8,55	-	-
Teobromina	-	-	14,00	13,00	-	-
Vanilina	105,61	116,72	235,42	175,52	-	-

*concentração acima de 250 ppb (máximo ponto da curva de calibração); DA= diluído em água e DM= diluído em metanol.

CONCLUSÕES

A planta de nim apresenta uma variedade de compostos fenólicos, que podem ser utilizados na indústria e agricultura, de modo que os estádios de desenvolvimento da planta estão diretamente relacionados com a presença e as diferenças nas concentrações destes compostos. Além disso, o solvente utilizado é um ponto chave para a eficiência da identificação dos compostos. Entre os dois métodos de diluição testados, o metanol demonstrou maior eficácia na identificação dos compostos fenólicos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq que possibilitou a conquista da bolsa PIBIC, a minha orientadora Profa Dra. Érica Marusa Pergo Coelho, pela dedicação e paciência durante o projeto.

REFERÊNCIAS

FUMAGALI, E; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. DE F. P. S.; VIDOTI, G. J., & OLIVEIRA, A. J. B. DE. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 627–641, out. 2008.

OLIVEIRA, V. B; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D., & MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clausenol de *Dicksonia sellowiana* (Presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Campinas, v. 18, n.1, supl. I, p. 230 – 239, 2016. Disponível em: https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_106

SANDHU, H. K.; SUNHA, P.; EMANUEL, N.; KUMAR, N.; SAMI, R.; KHOJAH, E.; AL-MUSHHIN, A.M. Effect of Ultrasound-Assisted Pretreatment on Extraction Efficiency of Essential Oil and Bioactive Compounds from Citrus Waste By-Products. **Separations**, v. 8, p. 244, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/separations8120244>

SCHMUTTERER, H. Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 271-97, 1990.

SILVA, Francisca Manuela Santos da. Fracionamento do extrato de casca de manga (*Mangifera indica* L.) CV. Tommy Atkins para obtenção de mangiferina por HPLC-UV/VIS preparativo. 2019.