



**IV Encontro Nacional da
Agroindústria
27 a 30 de Novembro de 2018**

Área 4: Biotecnologia e/ou desenvolvimento de novos produtos agroindustriais

**PERFIL FITOQUÍMICO, DOSEAMENTO DE FENÓIS, TANINOS,
FLAVONOIDES TOTAIS, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DO PALMITO DO PAU-CARDOSO (*Cyathea
atrovirens*)**

**SILVA, A.V. F¹; SANTANA, E.J.²; SENA, A. R.³; MELLO, M.R.F⁴; LEITE, T.C. C⁵;
CAVALCANTE, A.M.M.⁶**

Fazenda Sapé, S/N - Zona Rural - Barreiros/PE - CEP: 55560-000

^{3;4;6} Docente/pesquisador do IFPE, *Campus* Barreiros;

^{1;3} Estudantes do IFPE-*Campus* Barreiros, Departamento de Desenvolvimento Educacional (DDE)

⁵ Técnico do Laboratório de Bromatologia, IFPE-*Campus* Barreiros

E-mail do autor correspondente: acsaferreira.silva@live.com

RESUMO:

A espécie vegetal *Cyathea atrovirens* mais conhecida por pau cardoso é utilizada tanto para a alimentação sendo consumida como palmito, tanto para a fabricação de lambedores utilizados nas afecções respiratórias. Devido a importância na sua utilização este trabalho teve como objetivo analisar a fitoquímica do palmito desta espécie e avaliar sua atividade antimicrobiana e antioxidante. O resultado foi que a espécie apresentou as classes de flavonoides, taninos, triterpenos e cumarinas. Destacando-se taninos que são biossintetizados em elevada concentração bem como os fenólicos e que estão relacionados a relevante atividade antioxidante apresentada e também a boa atividade antimicrobiana frente a alguns microrganismos.

PALAVRAS-CHAVE: antioxidante; pau-cardoso; antimicrobiana

1.INTRODUÇÃO

A família Cyatheaceae possui cerca de 480 espécies sendo as mesmas distribuídas pela área pantropical do Brasil, porém se encontra praticamente em todas as regiões do país (TRYON, 1982). Trata-se de um grupo de plantas predominantemente arborescentes que podem atingir acima de 25 m de altura (SPORNE, 1970).

O palmito *Cyathea atrovirens* é constituído por um tecido parenquimatoso percorrido de nervuras fibrosas com medula mole e de coloração amarelada sendo utilizado como recurso terapêutico sob a forma de lambedor, prevenindo e combatendo afecções respiratórias como bronquites, rouquidões, defluxos, catarro pulmonar e asma (THEODOR, 2016).

Cyathea atrovirens é bastante utilizada por suas propriedades ornamentais e também é empregada no artesanato de fibras. Os estudos sobre esta espécie são bastante escassos no Brasil (FERNANDES, 2000; SCHMITT, 2005).

Em virtude do seu uso popular como lambedor e uso alimentício o presente trabalho teve como objetivo analisar a fitoquímica da espécie e avaliar as suas atividades biológicas.



IV Encontro Nacional da Agroindústria 27 a 30 de Novembro de 2018

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal.

Foram coletadas aproximadamente 100 g do caule de *Cyathea atrovirens* e da sua parte aérea foi feita uma exsiccata submetida a identificação pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) e esta exsiccata foi depositada do herbário deste.

2.2 Obtenção dos extratos.

O palmito da espécie coletada foi seco por 4 dias, em estufa com temperatura controlada (40 °C) e renovação constante de ar. A mesma foi moída em moinho de facas e extraída por maceração exaustiva por um período de 7 dias em temperatura ambiente e protegida da luz. Os solventes utilizados foram hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH).

2.3 Perfil Fitoquímico.

A análise do perfil fitoquímico foi realizada por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) segundo WAGNER e BLADT (2001). Os extratos foram testados na concentração de 5 mg/mL, como fase fixa foram utilizadas placas com sílica gel F₂₅₄ e como fase móvel solventes orgânicos em modo gradiente de polaridade. Os extratos foram aplicados na base da placa de sílica e colocados para eluir na cuba cromatográfica com a fase móvel. As placas já cromatografadas foram aspergidas com os reveladores específicos para cada classe (Tabela 1) a presença da classe é considerada positiva depois que reage com o revelador e apresenta coloração específica esperada na faixa do visível (VIS) ou ultravioleta (UV).

A tabela 01 apresenta as classes e os seus respectivos reveladores do perfil fitoquímico realizado.

Tabela 01: Classes e respectivos reveladores do perfil fitoquímico

CLASSES	REVELADOR	COLORAÇÃO	UV/VIS
Alcaloides	Dragendorff	Laranja	VIS
	Mayer	Branco	VIS
	Wagner	Marrom	VIS
Antraquinonas	KOH 5%	Laranja-avermelhadas	UV/VIS
Cumarinas	KOH 5%	Verde-azuladas	UV/VIS
Flavonoides	AlCl ₃	Amarelo-esverdeado	UV
	Anisaldeído-sulfúrico	Amarelo	VIS
	Sulfato cérico	Amarelo	VIS
Óleos essenciais	Anisaldeído sulfúrico	Vermelho-amarronzadas	VIS
Terpenoides: esteroides e triterpenos	Liebermann-Burchad	Rosa/roxo: triterpenos, Azul/verde: esteroides	VIS
	Vanilina-sulfúrica	Roxo: terpenos	VIS
Taninos	FeCl ₃	Preto	VIS

AlCl₃: cloreto de alumínio, FeCl₃: cloreto férrico, KOH: hidróxido de potássio.



IV Encontro Nacional da Agroindústria 27 a 30 de Novembro de 2018

2.4 Doseamento dos fenólicos, taninos e flavonoides totais.

2.4.1 Doseamento de fenólicos totais

Esta análise foi realizada segundo Silva et al (2006) com algumas modificações. Em um tubo de ensaio foram adicionados 0,2 mL do extrato (1,0 mg/mL), 0,5mL de Folin-Ciocalteu a 10% v/v e 1 mL da solução de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 7,5% p/v, após agitação as amostras permaneceram por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente. Ao fim dos 30 minutos, adicionou-se 1mL de água destilada e então foi efetuada a leitura da absorbância a 760nm. O teor de fenóis foi expresso em miligramas equivalentes de Ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g).

2.4.2 Doseamento de taninos totais.

A análise foi realizada segundo Shad et al. (2012). Em um tubo de ensaio adicionou-se 500 µL do extrato e 2,5 mL de Folin-Ciocalteu (10 %). Após agitação por 3 minutos adicionou-se 2 mL de Na₂CO₃ (20 %). Posteriormente ao repouso de 2 horas as leituras foram efetuadas a 725 nm. O teor de taninos totais foi expresso em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama de amostra (mg EAT/g).

2.4.3 Doseamento de Flavonoides totais.

A análise foi realizada segundo Barroso et al. (2011). Em um tubo de ensaio adicionou-se 1 mL de extrato (10 µg/mL), 4 mL de água destilada e 300 µL de NaNO₂ (25 %). Após 5 minutos foram adicionados 300 µL de AlCl₃ (10 %), 2 mL de NaOH (1 mol/L) e 2,4 mL de água destilada e após agitação foi efetuada a leitura a 510 nm.

2.5 Atividade Antioxidante

2.5.1 Avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH

O ensaio para a determinação da atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) seguiu o método descrito por Cavin et al. (1998) com algumas modificações. Uma solução de DPPH 0,004 % foi adicionada a amostra nas concentrações de 5 a 200 ppm. A absorbância das soluções será medida em espectrofotômetro UV-VIS (517 nm) após 30 min.

Para descobrir a atividade antioxidante total foi realizado o seguinte cálculo:

$$\frac{Cn - AA}{Cn} \times 100$$

Onde: Cn: é a absorbância do controle negativo (DPPH + Etanol) e AA é a absorbância da amostra.

2.5.2 Poder redutor

O ensaio para avaliação da atividade antioxidante mediante a determinação do poder redutor seguiu o método proposto por Waterman e Mole (1994). Adicionou-se num tubo de ensaio 100 µL da amostra (1 mg/mL), 8,5 mL de água destilada, 1 mL da solução



IV Encontro Nacional da Agroindústria 27 a 30 de Novembro de 2018

de FeCl_3 0,1 M, e após 3 minutos, 1 mL da solução de ferricianeto de potássio 0,08 mol/L. Após 15 minutos, fez-se a leitura da absorbância da solução em espectrofotômetro a 720 nm.

2.5.3 Avaliação da atividade antioxidante pelo método de redução do fosfomolibdênio

Foram adicionadas 2,7mL de solução do reagente de fosfomolibdênio a amostra e ao padrão. Incubou-se a 95°C por cerca de 1 hora e 30 minutos. As leituras foram feitas em espectrofotometria UV no comprimento de onda de 695nm. A capacidade de redução do fosfomolibdênio (% de Atividade Antioxidante) foi calculada utilizando a média das absorbâncias e a equação:

$$\text{Porcentagem de inibição (\%)} = 100 - \left\{ \frac{\text{Abs do controle} - \text{Abs da amostra}}{\text{Abs do controle}} \times 100 \right\} = \text{Resp}$$

2.6 Atividade antimicrobiana

2.6.1 Microrganismos

As linhagens de bactérias e do fungo leveduriforme utilizados foram obtidos da Coleção de Microrganismos do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA). Para este ensaio foram utilizadas quatro bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 01), *Micrococcus luteus* (UFPEDA 06), *Bacillus subtilis* (UFPEDA 16) e *Enterococcus faecalis* (UFPEDA 138); três bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Serratia marcescens* (UFPEDA 398) e *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 39); uma álcool-ácido-resistente: *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA 71) e a levedura *Candida albicans* (UFPEDA 1007).

2.6.2 Método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana dos extratos foi avaliada pela metodologia de difusão em ágar, utilizando discos de papel com diâmetro de 6 mm, conforme *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) para se conhecer o perfil de atividade dos extratos. Para este ensaio foram utilizadas alíquotas de 10 μL dos extratos na concentração de 300 mg/mL para impregnar os discos. Uma suspensão do microrganismo-teste foi espalhada sobre a superfície de meio sólido AMH (Ágar Müller–Hinton) em placa de Petri.

Posteriormente as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h para bactérias e a 28 °C por 48 h para leveduras. Após incubação foi avaliada a presença dos halos de inibição, pois apenas os microrganismos que foram inibidos neste ensaio foram testados para determinar sua Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM).

2.6.3 Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Mínima Microbicida (CMM)

Após conhecer o perfil de inibição dos extratos, foi realizado o ensaio de susceptibilidade pela metodologia da microdiluição em caldo para determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e Concentração Microbicida Mínima (CMM)

IV Encontro Nacional da Agroindústria



IV Encontro Nacional da Agroindústria 27 a 30 de Novembro de 2018

segundo o National Committee for Clinical Laboratory Standards-NCCLS (2002; 2003). A determinação da CIM foi feita em placas de 96 poços estéreis, próprias para microdiluição.

Inicialmente, foi adicionado em cada poço 90 μ L do meio Caldo Muller Hinton (CMH) e posteriormente, a partir da terceira coluna (A3), adicionou-se 90 μ L do extrato na concentração de 16 mg/mL. Esta alíquota foi homogeneizada e transferida para a quarta coluna (A4) e assim por diante até a décima segunda coluna (A12), que recebe o extrato na concentração de 0,03 mg/mL. Esta última alíquota (90 μ L) depois de homogeneizada é descartada. Por último, foi adicionado 10 μ L da suspensão do microrganismo preparada conforme o método anterior. Logo, cada poço recebeu como volume final de 100 μ L (90 μ L de meio e extrato e 10 μ L do microrganismo). As placas com o meio, extrato e microrganismo foram incubadas por 24 horas (37 °C) para bactérias e 48 horas (28 °C) para leveduras.

Posteriormente foram adicionados 30 μ L de rezasurina (0,1 mg/mL) para análise quantitativa do crescimento microbiano nos poços e determinação da atividade antimicrobiana relativa de cada diluição das amostras. Para a determinação da CMM repicou-se uma alíquota de 5 μ L, das concentrações que apresentaram atividade na placa do CMI, em placas de Petri contendo AMH. Estas placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para bactérias e 28 °C por 48 horas para leveduras. A CMM foi considerada a menor concentração do extrato onde não houve crescimento celular sobre a superfície do AMH.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Perfil fitoquímico

A tabela 02 apresenta as classes de compostos presentes nos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico *Cyathea atrovirens*.

Como pode ser visto na tabela 02 a espécie vegetal *Cyathea atrovirens* (pau cardoso) apresentou 04 classes de compostos das 09 pesquisadas, destacando dentre elas as cumarinas, flavonoides, e taninos presentes em mais de um extrato.

Comparando este resultado com o trabalho de Zuchetto (2014) que trabalhou com as folhas de *Cyathea atrovirens* pode se inferir uma correspondência uma vez que esta autora encontrou a presença de taninos, triterpenos e flavonoides nesta espécie, a diferença ficou apenas nas cumarinas presentes no caule e ausente nas folhas, contudo como são órgãos diferentes do vegetal esta diferença é provável.

Tabela 02: Perfil Fitoquímico de *Cyathea atrovirens*

Compostos	Hex	AcOEt	MeOH
Alcaloides	-	-	-
Cumarinas	+	+	-
Esteroides	-	-	-
Flavonoides	-	+	+
Taninos	-	+	+
Triterpenos	+	-	-



IV Encontro Nacional da Agroindústria 27 a 30 de Novembro de 2018

Lignanas	-	-	-
Quinonas	-	-	-
Óleos essenciais	-	-	-

(+): Detectado a presença da classe; (-): Não detectado; Hex: hexano;
AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol

3.2 Doseamento

A tabela 03 apresenta os resultados dos doseamentos de taninos, flavonoides e fenólicos totais de *Cyathea atrovirens* dos extratos acetato de etila e metanol, o extrato hexânico foi avaliado, contudo apresentou concentração inferior ao limite mínimo mensurável na curva e por isso o mesmo não é apresentado.

A partir da tabela pode-se inferir que os taninos estão presentes em maior concentração que os flavonoides e que está em conformidade com o órgão da planta estudada, já que elevadas concentrações de taninos são comuns em caules e raízes.

Comparando este resultado com o trabalho de Zuchetto (2014) que trabalhou com as folhas de *Cyathea atrovirens* pode se inferir que houve diferença na concentração de fenólicos uma vez que a mesma obteve melhor resultado no extrato acetato de etila que obteve concentração de 512,71 mg contudo como esta autora trabalhou com a concentração máxima de 250 µg/mL de extrato esta variação está proporcionalmente condizente com este estudo uma vez que se empregou no mesmo a concentração mínima de 500 µg/mL que é o dobro da concentração empregada no estudo das folhas.

Tabela 03: Doseamentos de taninos, flavonoides e fenólicos totais de *C. atrovirens*.

Extrato	Concentração (µg/mL)	Taninos (mg EAT/g)	Flavonoides (mg ER/g)	Fenólicos (mg EAG/g)
AcOEt	1000	468,3	21,3	1.065
	500	309,3	10,8	585,6
MeOH	1000	418,3	22,5	1.805
	500	295,3	11,3	1,091

mg EAT/g: mg equivalentes a ácido tânico por grama de extrato; mg ER/g: mg equivalentes a rutina por grama de extrato; mg EAG/g: mg equivalentes a ácido gálico por grama de extrato

3.3 Atividade Antimicrobiana

O ensaio da difusão em ágar de *C. atrovirens* frente aos microrganismos *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *E. faecalis*, *E. coli*, *S. marcescens*, *P. aeruginosa*, *M. smegmatis* e *C. albicans* só demonstrou a presença de halo frente a *S. aureus*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *S. marcescens*, *M. smegmatis*. e por isso apenas estes foram testados para determinar sua CMI e CMM.

A tabela 04 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana de *Cyathea atrovirens*. A partir dos resultados é possível inferir que o extrato acetato de etila foi o que apresentou melhor atividade comparado aos demais uma vez que conseguiu inibir os microrganismos em estudo em concentrações inferiores.

De acordo com a anatomia microbiana pode-se inferir que os extratos como era esperado foram mais ativos frente as bactérias gram-positivas, pois no ensaio da difusão em ágar apresentaram halos de inibição três gram-positivos (01, 06 e 16) e apenas um



IV Encontro Nacional da Agroindústria 27 a 30 de Novembro de 2018

gram-negativo (398). Já a levedura não foi inibida pelos extratos desta espécie (1007) e a bactéria álcool-ácido resistente (71) só foi inibida em concentração elevada.

Com relação a CMI e CMM pode-se inferir que se destacou os extratos acetato de etila frente a *M. luteus* e *S. marcescens*, e o extrato metanólico frente a *B. subtilis*, pois conseguiram inibir estes microrganismos em concentrações inferiores a 1 mg/mL. O que segundo a literatura referente é promissor para estudos futuros para o isolamento dos princípios ativos relacionados a esta atividade.

A atividade antimicrobiana apresentada deve estar relacionada aos taninos presentes em concentração elevada nestes extratos e que notadamente estão relacionados a atividade antimicrobiana de diversas espécies.

Tabela 04: Atividade antimicrobiana de *Cyathea atrovirens*

<i>C. atrovirens</i> Microrganismo/ext.	CMI/CMM (mg/mL)		
	Hex	AcOEt	MeOH
01	16/16	1/2	2/2
06	2/2	0,25/1	2/2
16	1/1	1/1	0,5/1
398	1/1	0,5/0,5	1/1
71	4/8	4/8	16/16

01: *S. aureus*, 06: *M. luteus*, 16: *B. subtilis*, 398: *S. marcescens*, 71: *M. smegmatis*

3.5 Atividade Antioxidante

A tabela 05 apresenta os resultados das atividades antioxidantes realizadas em *Cyathea atrovirens*, sendo elas atividade de poder redutor, atividade sequestradora do radical DPPH e atividade fosfomolibdênio, com isso é notório que o Pau cardoso possui um bom teor de antioxidantes em sua composição.

Nestas análises destaca-se a atividade antioxidante frente o mecanismo de ação do complexo fosfomolibdênio que se fundamenta na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V). Nesta análise o extrato se mostrou mais ativo que o padrão rutina na mesma concentração. Comparando este resultado novamente com o trabalho de Zuchetto (2014) que trabalhou com as folhas de *Cyathea atrovirens* pode se inferir que o palmito foi mais ativo uma vez que esta autora teve maior atividade no extrato acetato de etila com 77% de inibição comparado ao padrão. Já neste trabalho a inibição foi maior que o padrão.

Tabela 05: Atividades antioxidantes de *Cyathea atrovirens*.

	Poder Redutor (mg AA/g)	DPPH (%)	Fosfomolibdênio (%)
AcOEt	209,10	41,90	105,87
MeOH	166,13	61,43	90,33

AcOEt: acetato de etila; MeOH: metanol; mg AA/g: miligramas equivalentes á ácido ascórbico por grama de extrato;

CONCLUSÕES



IV Encontro Nacional da Agroindústria 27 a 30 de Novembro de 2018

Com base nos resultados obtidos em todas as análises realizadas é possível afirmar que o palmito de *Cyathea atrovirens* demonstrou relevante atividade antioxidante e boa atividade antimicrobiana frente a alguns microrganismos, e isto se deve a sua elevada concentração de taninos e fenólicos presentes nos extratos acetato de etila e metanólico.

REFERÊNCIAS

BARROSO, M. et al. Flavored Waters: influence of ingredients on antioxidant capacity and terpenoid profile by HS-SPME/GC-MS. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, 2011. 5062-5072 p. v. 59.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, p. 588-594, 2009.

CAVIN, A.; HOSTETTMANN, K.; DYATMYKO, W.; POTTERAT, O. Antioxidant and lipophilic constituents of *Tinospora crispa*., **Planta Medical**. V. 5, p. 393-396, 1998.

ALMEIDA, J. M. D.; SANTOS, R. J.; GENOVENE, M. I.; LAJOLO, F. M.; Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 446-452, 2006.

FERNANDES, I. Taxonomia dos representantes de Dicksoniaceae no Brasil. **Jornal de Pesquisas Botânicas**, v. 50, p. 5-26, 2000.

PECKOULT, T. PECKOUT, G. **História das plantas medicinais e úteis do Brasil**. Belo Horizonte, 2016.

SCHIMITT, J. L. **Estudos florísticos, ecológicos e do desenvolvimento em Cyatheaceae (PTERIDOPHTA) no Rio Grande do Sul, Brasil**. (Doutorado em Ciências Botânicas)-UFRS, UFRS, Porto Alegre, 2005. 50.

SHAD, M. Optimization of extraction efficiency of tannins from *Cichorium intybus* L.: Application of response surface methodology. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.6, p 4467- 4474, 2012.

SILVA, T. M. S. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition And Analysis**,v. 19, p. 507-511, 2006.

SPORNE, K. R. **The morphology of pteridophytes: the structure of ferns and allied plants** Hutchinson University Library. 3 ed. London: Hutchinson University Library., 1970.

TRYON, R. M.; TRYON, A. F. **Ferns and allied plants with special reference to Tropical America**. Springer-Verlag. New York: 1982.



**IV Encontro Nacional da
Agroindústria
27 a 30 de Novembro de 2018**

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed. ed. New York: Springer-Verlag., 2001.