

ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS POLIFENÓLICAS A PARTIR DE FRAÇÃO SEMIPURIFICADA DE RIZOMAS DE BAICURU

Natalia Castelhana de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Naiara Cássia Gancedo (Coorientadora), João Carlos Palazzo de Mello (Orientador), e-mail: mello@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: Cromatografia, Fitoquímica, *Limonium brasiliense*.

Resumo:

Limonium brasiliense (Boiss.) Kuntze, Plumbaginaceae, é conhecida popularmente por “baicuru” ou “guaicuru”. É uma planta encontrada na América do Sul, no litoral, de preferência em terrenos baixos. Os rizomas são empregados no uso popular. Este trabalho objetivou isolar substâncias polifenólicas a partir dos rizomas de *L. brasiliense*. Para isso, foram utilizadas diferentes técnicas cromatográficas, incluindo cromatografia em coluna, cromatografia em camada delgada e cromatografia líquida de alta eficiência. O teor de umidade ($11,82\% \pm 0,047$, CV% 0,39) da droga vegetal apresentou-se adequado, assim como os rendimentos do extrato bruto (31,25%) e da fração acetato de etila (9,43%). A cromatografia em coluna resultou em 27 subfrações e permitiu a separação de diferentes substâncias polifenólicas semipurificadas provenientes da fração acetato de etila de *L. brasiliense*. Os resultados demonstram eficiência dos métodos utilizados, a qualidade da matéria-prima e a obtenção de substâncias polifenólicas aparentemente isoladas.

Introdução

Plumbaginaceae é uma família das angiospermas que abrange cerca de 650 espécies e 27 gêneros, com apenas dois gêneros registrados no Brasil: *Plumbago* e *Limonium*. A espécie vegetal *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze, conhecida popularmente por “baicuru” ou “guaicuru”, é uma planta encontrada na América do Sul e que vegeta no litoral, de preferência em terrenos baixos, banhados com água salgada.

Os rizomas são utilizados popularmente para normalizar os períodos menstruais em mulheres com atraso ou irregularidades na menstruação e, empregados nas formas de decocto, como antisséptico nas infecções genito-urinárias. Por meio de um minucioso estudo morfoanatômico, Antonelli-Ushirobira et al. (2015) comprovaram ser o rizoma a porção do vegetal utilizada como farmacógeno. Este trabalho objetivou isolar e identificar compostos presentes na fração acetato de etila, obtida a partir do extrato

bruto dos rizomas de *L. brasiliense*, utilizando diferentes técnicas cromatográficas.

Materiais e Métodos

O rizoma de *L. brasiliense* foi coletado na ilha dos Marinheiros (31°59'33" S, 52°10'43" W), município de Rio Grande (RS), Brasil, em fevereiro de 2013. A exsicata, nº 27725 foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Autorização da coleta IBAMA-SISBIO (nº 11995-3, 2010, código de autenticação 46367613), sob responsabilidade de João Carlos Palazzo de Mello. O acesso ao material botânico foi autorizado e licenciado pelo CNPq (nº 010252/2015-0). A espécie foi identificada pela Prof. Dra. Lilian Auler Mentz (UFRGS). O material vegetal foi seco em estufa de circulação forçada de ar (37±2 °C), fragmentado em moinho de martelos (Tigre ASN6), e acondicionado ao abrigo da luz e umidade (BLAINSKI et al., 2017).

O teor de umidade do pó do rizoma de *L. brasiliense* foi determinado em balança por infravermelho, à 105 °C por 30 min (n=3) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2019).

O extrato bruto (EB) foi preparado por turbólise (Ultra-Turrax® UTC115KT), utilizando 1 kg de droga vegetal e acetona:água (7:3, v/v), na proporção de 1:10 (m/v), durante 20 min, intervalos de 5 min e temperatura <40 °C. O extrato foi filtrado em funil de Büchner, concentrado em evaporador rotatório (Büchi® R-200) sob pressão reduzida e liofilizado (Christ® Alpha 1-2), obtendo-se o EB. Repetiu-se o método duas vezes.

A partição líquido-líquido foi realizada utilizando a mistura de acetato de etila:água (1:1, v/v). Foram dissolvidos 50 g do EB em 500 mL de água destilada (1:10, m/v). Adicionaram-se 500 mL de acetato de etila em funil de separação, realizando a extração por dez vezes. Repetiu-se a partição duas vezes, durante três dias, totalizando 300 g de EB. As fases acetato de etila foram reunidas, concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizadas, assim como as fases aquosas, obtendo-se as frações acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ).

Para a análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a FAE foi preparada em metanol:água (1:1, v/v), à 200 µg/mL e centrifugada por 40 min (2010 x g). A CLAE foi realizada em cromatógrafo Waters, composto por um sistema de injetor automático, bomba, detector espectrofotométrico de arranjo de diodos (DAD 200-400 nm), degasser e software controlador (Waters Empower® 3). Utilizou-se coluna C18 (Agilent Zorbax, 250 mm x 4,6 mm, 5 µm), com vazão de 0,4 mL/min, detecção por UV em 210 nm, e volume de injeção de 10 µL. Para a fase móvel, utilizou-se água:ácido fosfórico concentrado (100:0,2, v/v, solvente A) e acetonitrila:ácido fosfórico concentrado (100:0,2, v/v, solvente B), empregando o sistema gradiente de eluição definido pelo método validado por Blainski et al. (2017).

Para a cromatografia em coluna (CC), empregou-se uma coluna de vidro (750 mm x 55 mm) contendo Sephadex® LH-20 (Pharmacia) como fase estacionária (FE), e etanol, metanol e acetona:água (7:3, v/v) como fase móvel (FM). A FAE (15,0 g) foi diluída em etanol, adicionada no topo da

coluna, iniciando-se a separação cromatográfica. As amostras foram coletadas em tubos de ensaio (1 mL/min; volume final de 10 mL/tubo) e monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD). As subfrações obtidas foram concentradas em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizadas. A CCD foi realizada em cromatofolhas de alumínio (sílica gel 60 F₂₅₄, 0,2 mm, Merck®). A FM utilizada foi acetato de etila:ácido fórmico:água (90:5:5; v/v). Após a eluição e secagem, as amostras foram visualizadas sob luz UV a 254 e 365 nm. A revelação química foi realizada com solução de cloreto férrico a 1% em metanol.

Resultados e Discussão

O pó do rizoma de *L. brasiliense* apresentou 11,82%±0,047, CV% 0,39 de umidade, semelhante ao encontrado por Blainski et al. (2017), 11,9%±0,04, CV% 0,4, assegurando a preservação do material vegetal.

O rendimento médio do extrato bruto de *L. brasiliense* foi de 31,25%, superior aos 27,6% obtidos no trabalho de Blainski et al. (2017). A partir da partição líquido-líquido do EB foram obtidos 258,1212 g de fração aquosa (FAQ) e 28,2205 g de fração acetato de etila (FAE), com um rendimento médio de 86% para a FAQ e 9,43% para a FAE. Os rendimentos se mostraram efetivos, conforme os resultados obtidos por Blainski (2017), com rendimentos médios de 72,4% para a FAQ e 10,4% para a FAE.

A avaliação por CLAE exibiu resultado análogo ao método utilizado por Blainski (2017) (Figura 1).

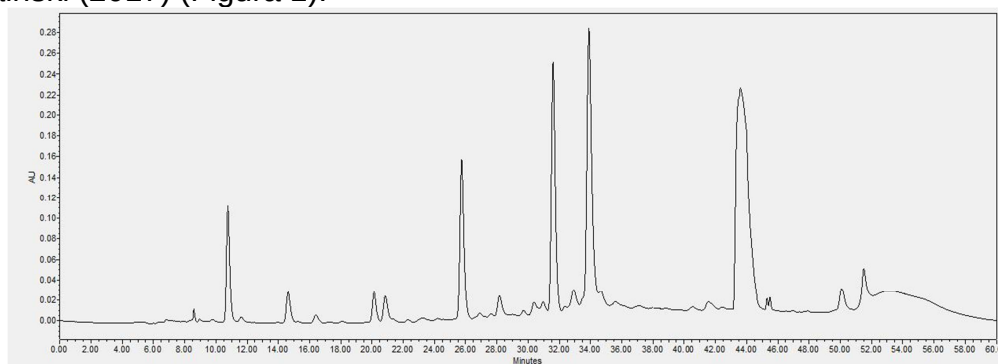


Figura 1. Perfil cromatográfico da FAE de *Limonium brasiliense* por CLAE em 210 nm.

A CC permitiu a separação de diferentes substâncias polifenólicas da FAE, com diferentes colorações visuais. No início da separação, tubos 61-79, observou-se um precipitado, indicando se tratar, provavelmente, de uma substância com maior grau de pureza. Ao todo foram coletados 2456 tubos, que após reunidos por CCD, resultaram em 26 subfrações. A subfração 27 foi referente a coleta da FM acetona 70%.

Por fim, o perfil de cada subfração foi analisado por CCD e comparado com a FAE. Após revelação das cromatoplas (Figura 2) sugerem que as subfrações contendo compostos com maior pureza são: 5, 7, 9, 11, 13, 16, 18, 25 e 26. Já as subfrações compostas por substâncias possivelmente isoladas, seriam: 10 e 17. A subfração precipitada (2), com alto grau de pureza, não foi visualizada após revelação com cloreto férrico (FeCl₃).

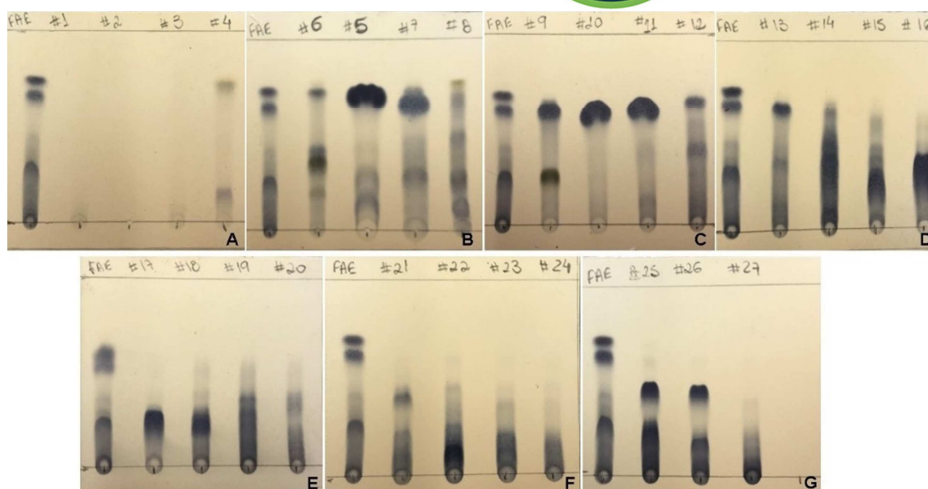


Figura 2. Perfil por CCD das subfrações provenientes da CC da FAE de *Limonium brasiliense*. FAE, 1, 2, 3 e 4 (A). FAE, 6, 5, 7 e 8 (B). FAE, 9, 10, 11 e 12 (C). FAE, 13, 14, 15 e 16 (D). FAE, 17, 18, 19 e 20 (E). FAE, 21, 22, 23 e 24 (F). FAE, 25, 26 e 27 (G).
Revelação: solução a 1 % FeCl₃ hexa-hidratado em metanol (p/v).

Conclusões

De acordo com as análises realizadas, pode-se confirmar que os resultados obtidos a partir dos rizomas de *L. brasiliense* estão dentro dos limites definidos em estudos prévios, comprovando a qualidade da matéria-prima. Tanto EB como FAE apresentaram rendimentos satisfatórios. A CC foi eficaz e separou de forma seletiva os componentes da FAE. Provavelmente, resultou em algumas subfrações substâncias isoladas, constatadas por CCD.

Agradecimentos

Ao CNPq-FA-UEM pela bolsa concedida. À Naiara Cássia Gancedo e ao João Carlos Palazzo de Mello pelo suporte e ajuda ao longo do projeto.

Referências

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; BLAINSKI, A.; GANCEDO, N. C.; GABURO, F.; CARDOSO, K. A. K.; LEITE MELO, E. V. S.; MELLO, J. C. P.; MILANEZE-GUTIERRE, M. A. Morpho-anatomical study of rhizome of *Limonium brasiliense*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, p.320-327, 2015.

BLAINSKI, A.; ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; GODOY, G.; LEITE-MELLO, E.V.S.; MELLO, J.C.P. Pharmacognostic evaluation, and development and validation of a HPLC-DAD technique for gallocatechin and epigallocatechin in rhizomes from *Limonium brasiliense*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p.162-169, 2017.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 6 ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília, DF. Brasil, 2019.