

## ESTUDO DAS FRAÇÕES HEXÂNICA E CLOROFÓRMICA DAS PARTES AÉREAS DE *STEVIA LEPTOPHYLLA*

Yasmin Rodrigues Chierici<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/Uem), Anderson Valdiney Gomes Ramos<sup>1</sup> (PG), Marta Regina Barrotto do Carmo<sup>2</sup> (PQ), Maria Helena Sarragiotto<sup>1</sup> (Co-orientadora), Debora Cristina Baldoqui<sup>1</sup> (Orientadora), e-mail: dcbaldoqui@uem.br.

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Química/Maringá, PR.

<sup>2</sup>Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia/Ponta Grossa, PR

### Ciências Exatas e da Terra – Química

**Palavras-chave:** *Stevia*; Asteraceae; CLAE;

### Resumo:

Para dar continuidade aos estudos de espécies pertencentes a família Asteraceae encontradas nos Campos Gerais do Paraná, a espécie *Stevia leptophylla* foi selecionada para estudo fitoquímico. Esta planta não é endêmica do Brasil e tem ocorrência confirmada apenas no estado do Paraná. Durante o desenvolvimento do projeto PIBIC 2110/2015 foi realizado um estudo preliminar desta espécie, da qual foi isolado um dímero de cumarina, com esqueleto inédito. Sendo assim, o desenvolvimento deste trabalho buscou isolar outras substâncias que ocorrem nas partes aéreas de *Stevia leptophylla*, além de submeter a substância inédita a ensaios biológicos.

### Introdução

O gênero *Stevia*, pertencente à família *Asteraceae*, compreende aproximadamente 230 espécies (BRANDLE, 2007). Na literatura são descritos deste gênero substâncias pertencentes a classe de lactonas sesquiterpênicas, derivados de longuipinenos, diterpenos, além de flavonoides. Além disso, este gênero é considerado não uniforme, devido a presença de diversas classes de metabólitos secundários (MERALGEMAN, 2004), entretanto, as lactonas sesquiterpênicas podem ser consideradas como marcadores quimiotaxômicos para este gênero, sendo que os principais núcleos encontrados são os guaianolideos, heliangolideos e eusdemanolideos

A espécie *Stevia leptophylla* é uma erva nativa do Brasil, todavia não é endêmica (NAKAJIMA, 2015). Não há registros na literatura de estudos químicos ou biológicos desta espécie de *Stevia*.

## Materiais e métodos

### Material vegetal

As partes aéreas de *S. leptophylla* foram coletadas em março de 2019 na região dos Campos Gerais do Paraná, e identificado pela Profa. Dr<sup>a</sup>. Marta Regina Barrotto do Carmo, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

### Preparação e fracionamento do extrato bruto

Inicialmente, o material vegetal foi seco a temperatura ambiente, e em seguida triturado em moinho de facas e armazenado em local seco. O material seco e moído (110 g) foi submetido à extração com etanol P.A, a frio, por maceração exaustiva. Após a remoção do solvente em evaporador rotativo à temperatura de 35°C, obteve-se o extrato bruto etanólico (14,74 g). O extrato bruto foi dissolvido em MeOH/H<sub>2</sub>O 1:1 (200mL) e submetido à partição com 3 x 50 mL de cada um dos solventes orgânicos: hexano, clorofórmio, acetato de etila e butanol. Após a remoção dos solventes utilizando um evaporador rotativo, foram obtidas as seguintes frações: hexânica (2,63 g), clorofórmica (4,70 g), acetato de etila (0,45 g), butanólica (2,85 g), e hidrometanólica (1,75 g).

### Estudo da Fração Hexânica (F. Hex) de *S. leptophylla*

Parte da fração hexânica (1,60 g) foi submetida a uma separação em coluna cromatográfica ( $\Phi = 3,0$  cm x h = 28,5 cm), de sílica gel 60, utilizando misturas de hexano, acetato de etila a metanol como eluentes em gradiente crescente de polaridade, resultando em 85 frações, que foram reunidas em 12 novas frações de acordo com o perfil observado em Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A amostra denominada F. Hex - 29 (75,2 mg) foi submetida a uma purificação em coluna cromatográfica ( $\Phi = 0,8$  cm x h = 25,5 cm), de sílica flash, utilizando misturas crescentes de hexano, acetato de etila a metanol, resultando em 19 frações. As amostras denominadas F.Hex - 7 (28 mg), F.Hex - 8 (42,8 mg), e F.Hex - 9 (28,6 mg) foram submetidas a uma lavagem com hexano em banho de gelo, sendo assim possível separar os precipitados de seus respectivos sobrenadantes. As frações F.Hex - 7, F.Hex - 8, e F.Hex - 9, após a lavagem com hexano, resultaram em precipitados, que após análise de CCD, serão submetidos a análise de RMN.

### Análise das frações das partes aéreas de *S. leptophylla* por CLAE-DAD

Aproximadamente 10,0 mg das frações clorofórmica, acetato de etila, butanólica, e hidrometanólica foram solubilizadas em metanol (2 mL, v/v) grau HPLC, e em seguida foram filtradas e analisadas por Cromatografia

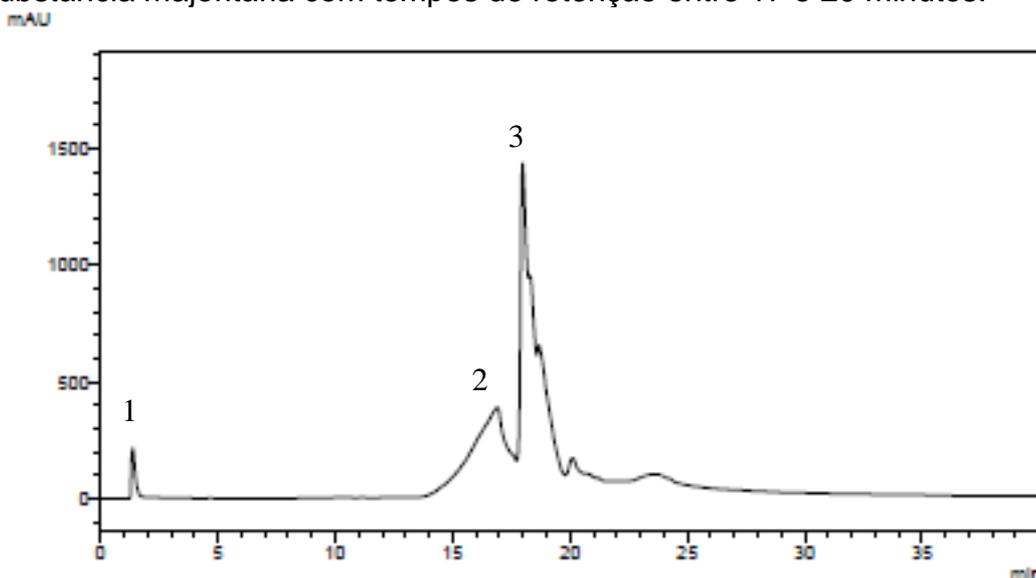
Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD), utilizando a seguinte condição cromatográfica: Volume de amostra injetado: 10  $\mu$ l; Vazão: 0,8 mL min<sup>-1</sup>; Coluna: Supelcosil LC-18 (25 cm x 4,6 mm, 5  $\mu$ m); Detecção:  $\lambda$  254 nm; Fase móvel: Água (A):MeOH (B); Gradiente eluição: 5-100% de (B) em 30 min; 100% de (B) por 10 min. Ao término da corrida utilizou-se um gradiente de retorno de 100-5% por 5 min com tempo de espera para o condicionamento da coluna de 15 min.

Os cromatogramas foram registrados com detector DAD em varredura de 190-500 nm, sendo 254 nm o comprimento de onda escolhido para a obtenção dos cromatogramas.

## Resultados e Discussão

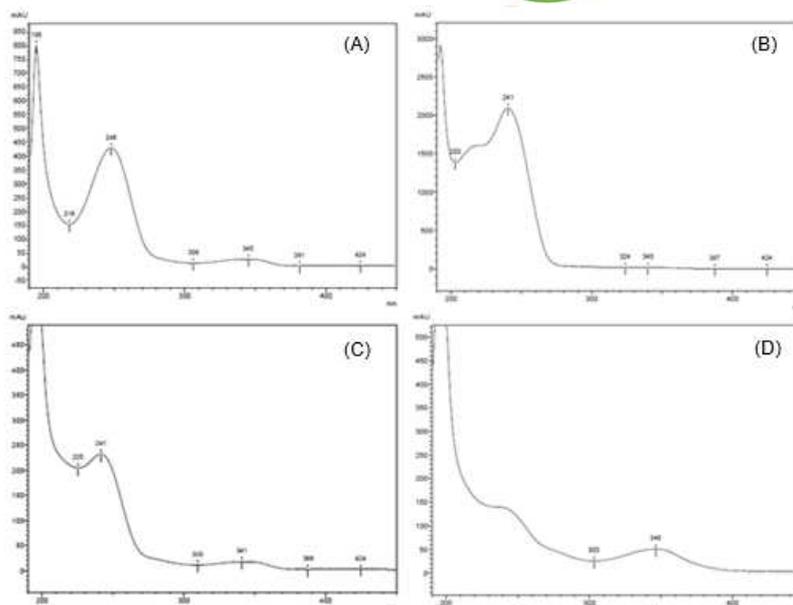
Apesar de amostras terem sido submetidas a análises de RMN, até o momento a fração hexânica não resultou no isolamento de nenhuma substância pura.

A análise do cromatograma obtido a partir da injeção da fração clorofórmica de *S. leptophylla*, obtido em  $\lambda=254$  nm (**Figura 1**), utilizando gradiente exploratório, mostrou a presença de 3 picos principais, sendo uma substância majoritária com tempos de retenção entre 17 e 20 minutos.



**Figura 1:** Cromatograma obtido após a injeção da fração clorofórmica. Condições de análise: gradiente eluição: 5-100% de (A) em 30 min; 100% de (A) por 10 min; vazão 0,8mL min<sup>-1</sup>;  $\lambda$  =254 nm.

Os espectros de UV/DAD obtidos para a fração clorofórmica de *S. leptophylla* (**Figura 2**) apresentaram bandas de absorção na região de 268-362 nm, características de flavonoides. Os flavonoides apresentam intensa absorção na região ultravioleta, exibindo duas bandas características, a primeira aproximadamente entre 320-385 nm, e a banda segunda entre 240-285 nm (MARKHAM, 1982).



**Figura 2:** Espectros UV/DAD obtidos para a fração clorofórmica; (A)  $\lambda=248$  nm e 345 nm; (B)  $\lambda=241$  nm e 387 nm; (C)  $\lambda=241$  e 341 nm; (D)  $\lambda=346$  nm.

## Conclusões

Durante a realização das análises de acordo com o perfil observado em CCD a fração hexânica apresentou possíveis substâncias puras, entretanto, quando submetidas a análise de RMN, foi observado uma mistura de compostos.

Além disso, foi possível traçar o perfil de metabólitos secundários presentes na fração clorofórmica, a partir das análises de CLAE, e seus respectivos espectros de UV/DAD, e em comparação com a literatura, visualizar a possível presença de flavonoides.

## Agradecimentos

Ao PIBIC/UEM, ao CNPq, Fundação Araucária e à organização do evento.

## Referências

- BRANDLE, J., TELMER, P. Steviol glycoside biosynthesis. **Phytochemistry**, Vol. 68 , p. 1855–1863, 2007.
- MARKHAM, K. R. Techniques of flavonoid identification. *London, Academic Press*, p. 36-51, 1982.
- MERAGELMAN, T. L.; PEDROSA, D. S.; GIL, R. R. Diterpenes from *Stevia gilliesii*. **Biochemical Systematics and Ecology**, Vol. 32, p. 45–53, 2004.
- NAKAJIMA, J.N. Stevia in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB27400>. Acesso em: 15 Jul. 2015.