

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA PLANTA JOVEM DE ESPINHEIRA SANTA (*Maytenus ilicifolia*) PARA IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

Cleverton Timóteo de Assunção (PIBIC/Fundação Araucária/FA/UEM), e-mail: ra117359@uem.br, Victor Hugo Borsuk Damião, Érica Marusa Pergo Coelho (Orientadora).

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

Centro de Ciências Agrárias, Agronomia

Palavras-chave: Ultrassom, Infusão, HPLC.

Resumo

O trabalho teve por objetivo desenvolver e validar métodos de extração para a detecção de metabólitos secundários por HPLC, da planta jovem de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*). Em laboratório, as sementes foram dispostas em gerbox e levadas para câmara de germinação. Após 18 dias de incubação, das sementes germinadas, separou-se plântulas e cotilédones e foram postos em ultrafreezer a (-34 °C) e posteriormente liofilizadas. As amostras foram separadas em partes para extração por maceração, infusão e ultrassom em H₂O ultrapura e Etanol 99%. Da alíquota retirada do extrato, resultou que para plântulas o método de ultrassom com H₂O obteve maiores picos cromatográficos e com maiores intensidades e para cotilédones foi infusão com H₂O. Assim, conclui-se que o método de extração por ultrassom com H₂O é mais eficiente para plântulas e o método de extração por infusão com H₂O é mais eficiente para o cotilédone, comparados com os outros métodos testado neste trabalho.

Introdução

Dentre as plantas medicinais, a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), é uma espécie nativa do Brasil e vem sendo utilizada a décadas pela medicina popular no tratamento várias patologias, devido ao seu potencial farmacológico promovido pelos metabólitos secundários, como compostos fenólicos, terpenos e alcaloides, identificados em estudos realizados anteriormente com extratos das folhas. Esses compostos são produzidos naturalmente pelas plantas em resposta a fatores bióticos ou abióticos e possuem um elevado interesse econômico.

Sabendo da importância dos compostos naturais, conhecer os métodos de extração é crucial, visto que a quantidade e a qualidade do extrato vão depender do método de extração empregado. De acordo com

Gori et al. (2021), extração são métodos utilizados para retirar a fração ativa de um material vegetal, utilizando líquidos apropriados. Dentre os métodos de extração convencionais mais utilizados estão: ultrassom, maceração e infusão. Porém, ainda não existem estudos que determinam qual o método mais eficaz de extração de metabólitos secundários da planta jovem.

Assim, o trabalho teve por objetivo desenvolver e validar métodos de extração para a detecção de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência da planta jovem de espinheira santa.

Materiais e métodos

Em laboratório, as sementes de espinheira santa (*Maytenus ilicifolia*), foram dispostas em caixa de gerbox 11 × 11 cm, contendo substrato com vermiculita e umedecidas com 40 mL água destilada, cada placa. Após a semeadura, as sementes foram levadas para câmara de germinação, com fotoperíodo 12h claro e 12h escuro com temperatura constante de 27 °C. Após 18 dias de incubação, separou-se plântulas e cotilédones das sementes germinadas e foram mantidos em ultrafreezer a (-34 °C). em seguida realizou-se a liofilização, utilizando o liofilizador Freeze dryer.

Com as amostras liofilizadas, estas foram divididas em partes para a obtenção das extrações por Infusão, Maceração e Ultrassom. Para cada método de extração utilizado foi separado uma amostra para extrair em água (m/v) e a mesma amostra para extrair em etanol 99%, seguindo a metodologia descrita pelos autores a seguir.

Para ultrassom, empregou-se a metodologia descrita por Sandhu, (2021) onde as amostras de cotilédones e plântulas foram mantidas em agitação pela sonda por uma hora com temperatura máxima de 40 °C. Na infusão, os solventes foram aquecidos em torno de 60°C e cada amostra se manteve em agitação no escuro por duas horas, com temperatura variando entre 60 a 70 °C (OLIVEIRA, 2016). Já na maceração, os solventes não foram aquecidos e agitou-se as amostras por 24 horas em temperatura ambiente, no escuro (FERREIRA, 2020).

Após as extrações, as amostras foram diluídas, filtradas e analisadas no HPLC, segundo protocolo do próprio laboratório.

Resultados e Discussão

Neste trabalho foi usado o aparelho HPLC, uma técnica de separação fundamentada na distribuição dos componentes de uma mistura entre duas fases imiscíveis, a fase móvel, líquida, e a fase estacionária sólida, contida em uma coluna cilíndrica. O tempo de retenção da amostra analisada nesta coluna, varia de acordo com as interações das substâncias presentes na amostra com as fases estacionária e móvel, por isso, cada composto foi eliminado da coluna e identificado pelo detector em um tempo diferente, gerando um pico cromatográfico. A análise dos diferentes picos nos permitiu estudar as substâncias presentes na amostra, conforme mostra as imagens a seguir.

Na Figura 1 está sendo representado o cromatograma do extrato da Plântula de espinheira santa, obtido somente com o método de ultrassom com água:

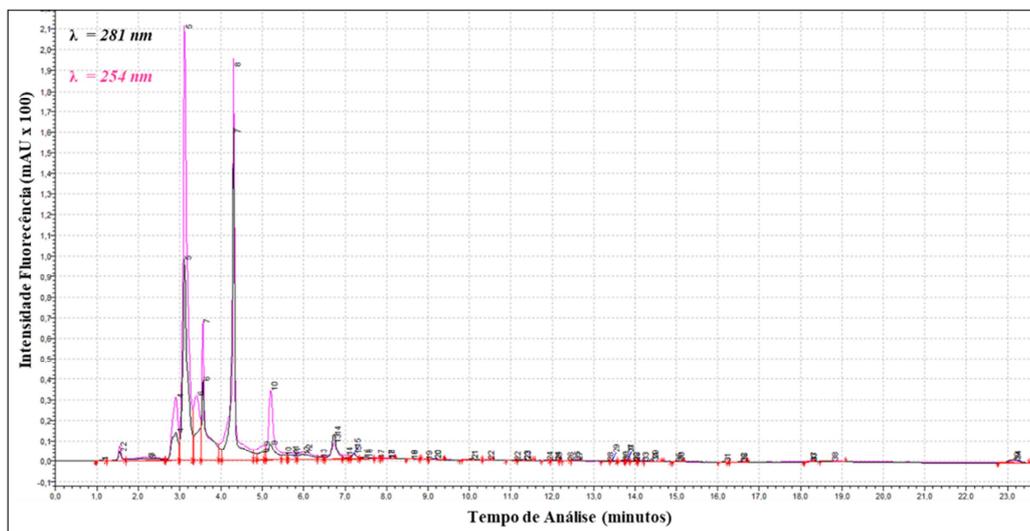


Figura 1 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato de Plântula de Espinheira Santa Ultrassom Água, em 281 nm, 254 nm.

Como resposta analítica dos extratos das Plântulas, obteve-se um número de picos cromatográficos maiores nas amostras extraídas com água, tanto para o método de extração Infusão (30 picos) como na Maceração (27 picos), (ambos, imagens não mostradas) e também no método de Ultrassom (38 picos) (Figura 1), no comprimento de onda de 281 nm. Outro fato importante é que nas amostras extraídas com água independentemente do método, os picos tiveram maiores intensidades chegando próximo de 100 mAU na Infusão e Maceração e 210 mAU na Ultrassom. Já nas amostras extraídas com etanol (imagens não mostradas) as intensidades foram 30 mAU, 20 mAU e 70 mAU, para Infusão, Maceração e Ultrassom, respectivamente.

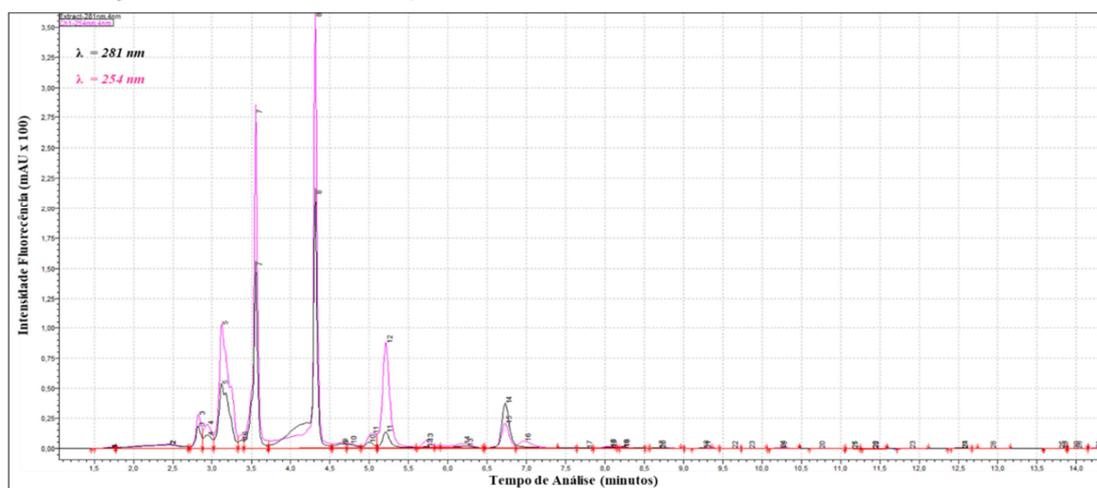


Figura 2 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato de Cotilédone de Espinheira Santa Infusão Água em 281 nm e 254 nm.

As respostas analíticas dos extratos de Cotelédones, obteve-se um número de picos cromatográficos maiores nas amostras extraídas com água também, tanto para o método de extração Infusão como na maceração (imagem não mostrada), no comprimento de onda de 254 nm. Porém, as intensidades dos picos foram maiores no método de extração Infusão com água, chegando a 350 mAU (Figura 2). Estas moléculas que apresentaram o pico com maior intensidade possuem um tempo de retenção na coluna de 4,3 minutos, ou seja, elas saíram no tempo da análise que a proporção de água era maior (80%). Isto indica que estas possui um caráter mais polar e também possuem uma resposta no comprimento de onda de 281nm. Assim, para o cotilédone o método de extração que aparentemente mostrou melhores respostas não foi a Ultrassom e sim a Infusão.

Conclusões

A partir dos resultados conclui-se que, o método de extração mais eficaz para a plântula de espinheira santa foi o ultrassom e para o cotilédone a infusão, ambos com a água como solvente.

Agradecimentos

Agradeço a Fundação Araucária por ter tornado possível a realização dessa pesquisa, minha orientadora Prof^a Dr.^a Érica Marusa Pergo Coelho por todos os ensinamentos e suporte, a técnica Andreia Paula Carneiro Martins e ao laboratório de análises cromatográficas LACE – IFPR/Umuarama.

Referências

FERREIRA, F. D., et al. Solvent-free simultaneous extraction of volatile and non-volatile antioxidants from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) by microwave hydrodiffusion and gravity. **Industrial Crops & Products**, v. 1, n. 45, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112094>

GORI, A.; BOUCHERLE, B.; REY, A.; ROME, M.; FUZZATI, N.; PEUCHMAUR, M. Development of an innovative maceration technique to optimize extraction and phase partition of natural products. **Fitoterapia**. 148 (2021) 104798. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2020.104798>.

OLIVEIRA, V. B. et al., Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por claud de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 18, n.1, supl. I, p. 230 – 239, 2016. https://doi.org/10.1590/1983-084X/15_106.

SANDHU, H. K., et al., Effect of Ultrasound-Assisted Pretreatment on Extraction Efficiency of Essential Oil and Bioactive Compounds from



CitrusWaste By-Products. **Separations**, v. 8, p. 244, 2021.
<https://doi.org/10.3390/separations8120244>.