

VALIDAÇÃO DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA PLANTA ADULTA DE *Maytenus ilicifolia* PARA IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

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

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

Centro de Ciências Agrárias, Agronomia

Palavras-chave: HPLC, Planta Medicinal, Ultrassom.

Resumo

A *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek, conhecida como espinheira santa, é uma espécie medicinal nativa do sul do Brasil. Pertencente à família Celastraceae, apresenta metabólitos secundários intimamente ligados à atividade farmacológica da espécie, sobretudo no tratamento de gastrite e úlcera gástrica. Contudo, há poucos estudos de validação de métodos de extração da folha para padronizar a identificação dos mesmos por HPLC. Sendo assim, o objetivo da pesquisa foi desenvolver e validar métodos de extração para detecção de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência na planta adulta de espinheira santa. Dividiu-se amostras vegetais para obtenção de extrações por Infusão, Maceração e Ultrassom, utilizando duas amostras (água ultrapura e etanol 99%) para cada método, respectivamente. Através do aparelho HPLC com detector DAD, concluiu-se que o método de extração por Ultrassom foi superior, apresentando mais picos (etanol) e picos mais intensos (H₂O ultrapura) em seus respectivos cromatogramas.

Introdução

A *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. é uma espécie medicinal nativa do Brasil, com maior ocorrência nos estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Pertencente à família Celastraceae, é popularmente conhecida como espinheira-santa, tendo sido intensamente explorada devido ao seu alto valor medicinal (MARIOT & BARBIERI, 2007). Apresentando metabólitos secundário diverso, é diretamente relacionado às propriedades medicinais advindas da espécie, comprovadas por pesquisas coordenadas pelo CEME (Central de Medicamentos) do Ministério da Saúde do Brasil.

Os compostos presentes no metabolismo secundário geralmente estão relacionados com a proteção de vegetais a estresses bióticos e abióticos além de serem comercialmente utilizados pelas indústrias biofarmacêutica, de corantes e aromas (RASKIN et al., 2002). Assim surge a necessidade de estudos científicos mais aprofundados, como metodologias refinadas e precisas na identificação de compostos bioativos presentes em plantas, pois dependendo do tipo de extração utilizada, pode-se obtê-los em maior ou menor quantidade. Com isso, o objetivo do projeto foi desenvolver e validar métodos de extração para a detecção de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência da planta adulta de espinheira santa.

Materiais e métodos

Primeiramente foram coletadas amostras de partes foliares da espécie *Maytenus ilicifolia*. Essas amostras foram parcialmente trituradas com o auxílio de um liquidificador e imediatamente levadas a um ultra freezer em temperatura de -34°C . Após, realizou-se um processo de liofilização nas mesmas (liofilizador Freeze dryer).

Com as amostras liofilizadas, estas foram divididas para obtenção de extrações por Infusão, Maceração e Ultrassom, utilizando duas amostras (água ultrapura e etanol 99%) para cada método, respectivamente, seguindo a metodologia descrita pelos autores a seguir.

Para ultrassom, empregou-se a metodologia descrita por Sandhu, (2021). As amostras de partes vegetativas 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 sendo que cada amostra se manteve em agitação no escuro por duas horas, mantendo a temperatura de 60°C constante durante o procedimento (OLIVEIRA, 2016). Já na maceração agitou-se as amostras por 24 horas em temperatura ambiente, no escuro (FERREIRA, 2020). Vale ressaltar que na maceração e infusão, os béqueres foram devidamente vedados, evitando a perda de material pela agitação constante.

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

Resultados e Discussão

Neste trabalho foi utilizada a CLAE para identificação e análise das amostras, uma técnica de separação que se fundamenta levando em conta a distribuição dos componentes de uma mistura inclusa em uma coluna cilíndrica, entre duas fases imiscíveis (fase móvel, líquida, e fase estacionária, sólida). 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. Com isso, cada composto presente na mesma foi eliminado da coluna e identificado pelo detector em tempos distintos, gerando picos cromatográficos. Assim, a análise dos

diferentes picos permitiu estudar as substâncias presentes na amostra, conforme imagens a seguir. Na Figura 1 está representado o cromatograma do extrato de folha de espinheira santa, obtido com o método de ultrassom com água, onde os picos ficaram mais intensos, chegando a 500 mAU.

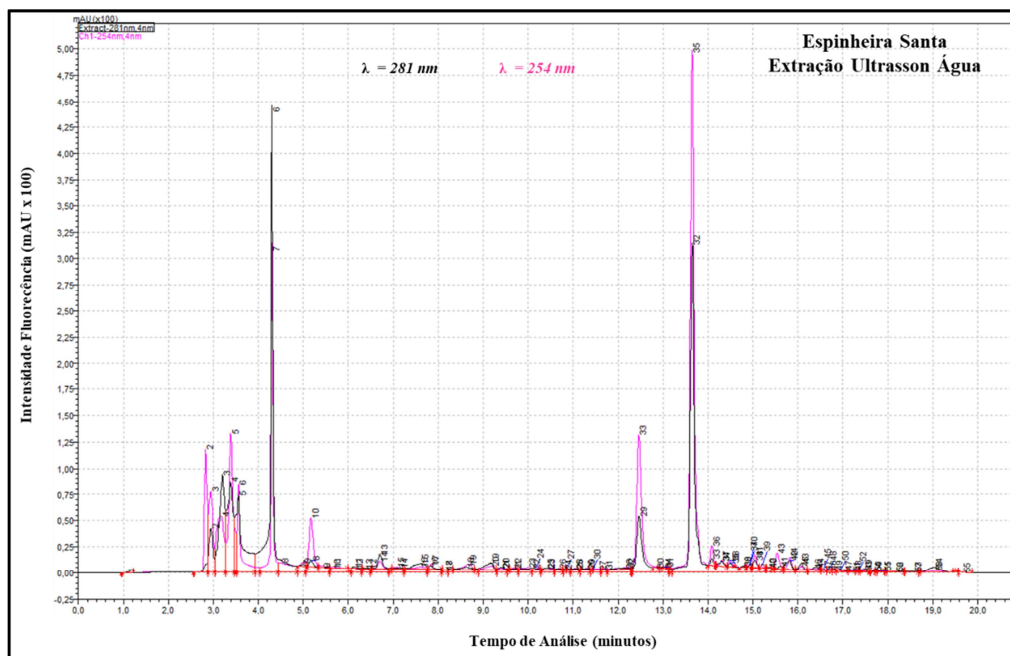


Figura 1 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato de Folha de Espinheira Santa Ultrassom Água, em 254 nm e 281 nm.

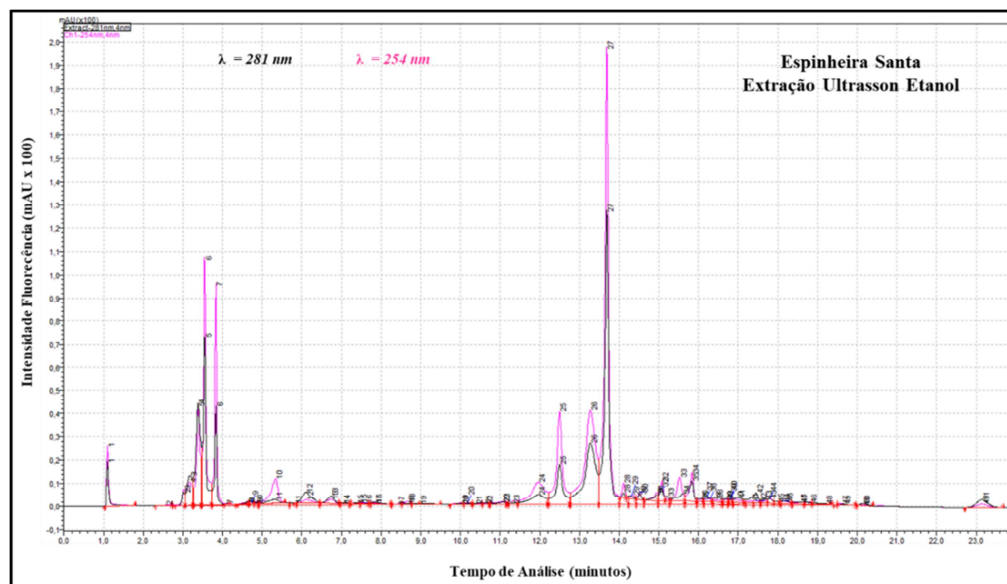


Figura 2 - Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato de Folha de Espinheira Santa Ultrassom Etanol, em 254 nm e 281 nm.

Por outro lado, como resposta analítica, obteve-se número de picos cromatográficos maiores nas amostras extraídas com água, tanto na extração por Infusão (59 picos) quanto na Maceração (52 picos), imagens

não mostradas. Porém no método de extração com etanol por Ultrassom (Figura 2) obteve-se 91 picos, indicando maior número de moléculas extraídas por este método.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que, na planta adulta de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reissek o método de extração por meio de Ultrassom apresentou maior eficiência, sendo a extração por água ultrapura a que apresentou maior intensidade de picos nos mesmos tempos de retenção, e consequentemente, maior eficácia.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela possibilidade de realização dessa pesquisa, minha orientadora Prof^a Dr^a. Érica Marusa Pergo Coelho pelo norteamento no decorrer dos meses, bem como os ensinamentos que me foram passados, a técnica Andreia Paula Carneiro Martins por todo o suporte oferecido 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>

MARIOT, M. P.; BARBIERI, R. L. Metabólitos secundários e propriedades medicinais da espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. e *M. aquifolium* Mart.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v. 3, n. 9, p. 89-99, 2007.

OLIVEIRA, V. B. et al., Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por claudação 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.

RASKIN, I. et al. Plants and Human Health in the Twenty-First Century. **Trends Biotechnology**, v. 20, n. 12, p. 522-531, 2002.

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>.