

MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DA PLANTA ADULTA NIM (*Azadirachta indica*) PARA IDENTIFICAÇÃO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.

Loara Martins Frasquete (PIBIC-AF/CNPq/FA/Uem), Cleverton Timóteo de Assunção, Érica Marusa Pergo Coelho (Orientadora), e-mail: empcoelho@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Agrônômicas e da Medicina Veterinária/Umuarama, PR.

Ciências Agrária, Medicina Veterinária e Medicina Preventiva

Palavras-chave: Nim, liofilizador, ultrassom.

Resumo:

O presente trabalho teve como propósito apresentar os métodos de extração de metabólitos secundários da planta adulta *Azadirachta indica*. É válido destacar que, estes metabólitos são compostos que ajudam na atividade farmacológica. Ao desenvolver este trabalho foram realizadas coletas de *A. indica* no horto da UEM, logo após sua limpeza foram selecionadas e levadas para o ultra-freezer à temperatura de -34°C, logo em seguida foram liofilizadas, e permaneceram no ultra-freezer. Após, foram separadas em partes para fazer extrações por infusão, maceração e ultrassom, amostras com água ou etanol 99%. Logo em seguida de todos os protocolos de extração foram realizadas coletadas de 1 mL de cada amostra, e centrifugadas. Ao fazer a cromatografia notou-se que os picos maiores eram das amostras extraídas com água. O método de extração por ultrassom com água mostrou melhores resultados nesta pesquisa no comprimento ondas de 281 nm e 254 nm.

Introdução

A quantidade metabólitos e as classes de compostos que serão produzidas pelas plantas são influenciadas por vários fatores, como clima, temperatura, etc., o que pode causar mudanças no perfil químico. É importante ressaltar que, os metabólitos secundários são os principais compostos que contribuem para a atividade farmacológica dos produtos naturais, os metabólitos secundários então são divididos em classes de acordo com sua via metabólica: Terpenos, Compostos Fenólicos e Alcaloides (Compostos nitrogenados).

A *Azadirachta indica* pertence à família Meliaceae, é conhecida como “nim” ou “nime”, podendo chegar de 15 a 20 metros de altura (MOSSINI & KEMMELMEIER, 2005). Suas sementes e folhas são utilizadas em controle de praga e são inseticidas biodegradáveis e não deixam substâncias tóxicas (SCHMUTTERER, 1990, MARTINEZ, 2003). No Brasil é encontrada no Centro-oeste, Norte e Nordeste (MARTINEZ, 2003). Métodos de extração etanólica da

folha de nim indicam a presença de vários metabólitos secundários como glicosídeos, terpenos, taninos, flavonoides, compostos fenólicos, cumarinas e antraquinonas (NETO et al., 2021).

Então, este presente trabalho teve como objetivo analisar e validar métodos de extração para a detecção de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência da planta adulta nim, sendo os métodos de extração, infusão, maceração e ultrassom.

Materiais e Métodos

Preparação do Material Vegetal e Extrações

A coleta da planta Nim (*Azadirachta indica*) foi realizada ao horto da UEM/ fazenda Estr. Paca - Jardim São Cristóvão, Umuarama - Paraná, 87507-190. Após a coleta do material foi levado até o laboratório de bioquímica e separados quanto a viabilidade, cortadas e colocados em recipientes para ir no ultra freezer à temperatura de -34°C , onde foram armazenadas. Após alguns dias foram liofilizadas no Liofilizador LS 3000 e permaneceram no ultra-freezer à -34°C , após isto estas foram divididas em partes para a obtenção das extrações por Infusão, Maceração e Ultrassom. Para cada método eram realizadas amostras para extrair com água e etanol. Na extração por infusão foram utilizados água e etanol (m/v) na temperatura de $60-90^{\circ}\text{C}$, deixados em agitação por 2 horas e por último filtrados com gaze e deixados no ultra freezer sem luz. Na maceração e ultrassom foi utilizado a mesma quantidade, diferenciando apenas o tempo e temperatura de agitação, na maceração a agitação ocorreu durante 24 horas em temperatura de 25°C , no ultrassom as amostras foram agitadas por sonda e mantida em 28°C constante, tendo o mesmo processo de filtragem.

Preparo e Análise das amostras para HPLC

Após todos os protocolos de extrações realizados, foram coletadas 1 mL de cada amostra em eppendorfs, e estas foram centrifugadas a 3.000 rpm. Após a centrifugação foi coletado o sobrenadante das amostras que foi diluído em metanol P.A. (25%). Logo após, estas foram filtradas (filtro de seringa PFLE L 0,45 μm), e coletadas em vials para fazer a análise e HPLC/UHPLC (Shimadzu modelo NEXERA X2), utilizando o Método de gradiente linear para análise de extratos (fases móveis: água de mili K (A) e acetonitrila (B)), faixa do PDA 190-800nm, temperatura 35°C , injeção de 10 μl amostra, coluna C18 Shimadzu $5\mu\text{m}$ 150 x 4,6 mm), Scan total de 30 minutos, na seguinte programação: 1-9 min (20% B), 10-15 min (40% B) e 16-30min (10% B).

Resultados e Discussão

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é 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. Assim, o método de extração por Ultrassom, mostrou-se mais

eficiente em quantidades de picos no cromatograma como também em suas intensidades, nas amostras extraídas com água (Figura 1), no método de extração por Ultrassom, o cromatograma apresentou 68 e 61 picos nos comprimentos de onda de 281 e 254 nm, respectivamente.

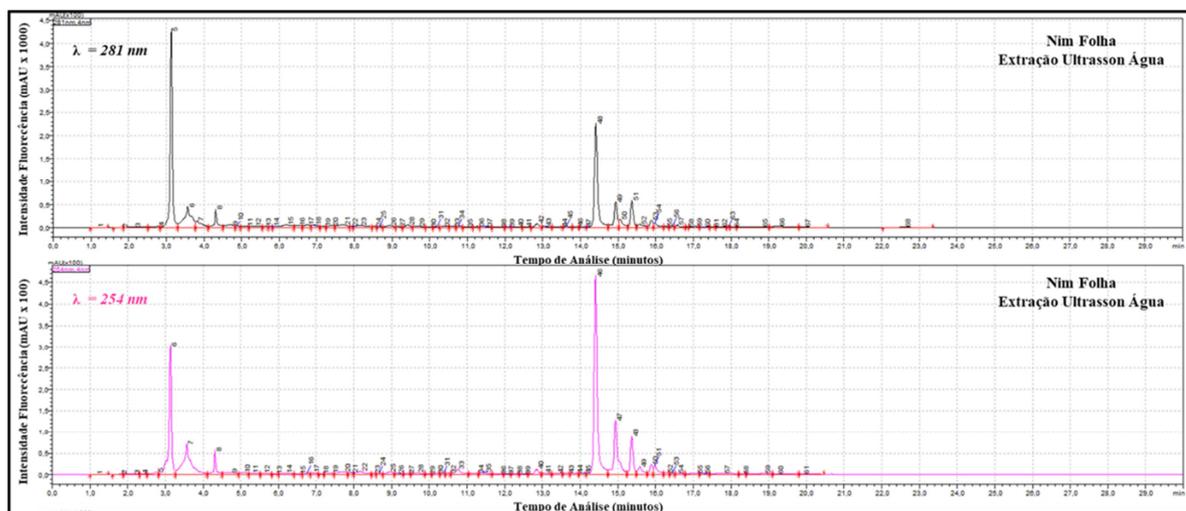


Figura 1 – Cromatograma obtido por HPLC-DAD do extrato de Folha de Nim, Extração Ultrassom Água, no comprimento de onda de 281 nm e 254 nm.

Conclusões

Pela observação dos aspectos analisados levando em consideração todos os benefícios de planta nim, frisando na farmacologia por conta de seus metabólitos secundários. Tendo visto os tipos de extrações realizadas com água a melhor eficiência, no comprimento de onda de 281 nm e 251 nm as intensidades foram maiores e todavia o método de extração por ultrassom teve resultados significativos para esta pesquisa.

Agradecimentos

Venho por meio deste agradecer a fundação Araucária por esta grande oportunidade de participar desta pesquisa, a Universidade Estadual de Maringá (UEM) por abrir portas para seus alunos, agradecer também a minha orientadora professora Dra. Érica Marusa Pergo Coelho por toda ajuda, pelas correções que me permitiram um melhor desempenho para esta pesquisa, pela qual novamente sou grata por ter feito parte, tantos ensinamentos que levarei por toda minha vida, obrigado novamente Fundação Araucária pela oportunidade.

Referências

MARTINEZ, S. S. O Uso do Nim no Café e em outras Culturas. **Revista Agroecologia Hoje**, v. 4, p. 13-14, 2003.

MOSSINI, S. A. G.; KEMMELMEIR, C. A árvore Nim (*Azadirachta indica* A. Juss): Múltiplos Usos. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 139-148, 2005.

NETO, I. F. S.; RICARDINO, I. E. F., SANTOS, Í. T. *et al.* A review of the antiviral activity of the Indian Nim and its potential in front of the new coronavirus (Sars-CoV-2). **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 17, n. 1, jan/mar 2021.

SCHMUTTERER, H. Properties and Potential of Natural Pesticides from the Neem Tree, *Azadirachta indica*. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 271-97, 1990.