

## **Avaliação qualitativa e quantitativa do extrato das folhas de *Miconia albicans* obtido por diferentes soluções extratoras**

L. N. Monteiro<sup>1\*</sup>; M. S. Mathias<sup>1</sup>, R. R. Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual do Norte Fluminense;

\*Intmonteiro@gmail.com

### **Resumo**

O método extrativo utilizado e a escolha do solvente extrator são fatores que influenciam na eficiência extrativa de uma amostra vegetal. O objetivo deste trabalho é avaliar se as soluções etanol, acetato de etila e diclorometano (62:14:24) e etanol, diclorometano e hexano (45:25:30), aplicadas para extração das folhas de *Miconia albicans*, demonstram experimentalmente o comportamento previsto por Mathias (2022). Realizou-se a comparação quantitativa e qualitativa dos extratos obtidos nessas composições com os apresentados pelo autor cujas proporções eram 1:1:1. Os rendimentos e o perfil químico dos extratos brutos das novas composições EAD e EDH foram inferiores aos dos extratos obtidos por Mathias (2022) com as mesmas composições na proporção 1:1:1. Entretanto, as áreas cromatográficas foram maiores, principalmente para taninos. Concluiu-se que a solução extrativa EAD (1:1:1) fornece maior rendimento quantitativo do extrato, enquanto a solução EDH (45:25:30) é melhor para extração de taninos, e a EDH (1:1:1) para flavonoides.

**Palavras-chave:** CLUE-EM, flavonoide, tanino, centroide simplex.

### **1. Introdução**

Os metabólitos especiais, amplamente classificados como terpenos, substâncias fenólicas e alcaloides, são elementos de diferenciação e especialização que proporcionam vantagens para a sobrevivência dos vegetais<sup>[1]</sup>. Atuam como atrativos de polinizadores, repelentes de herbívoros e na proteção contra a radiação UV e poluição ambiental. Essas substâncias biologicamente ativas apresentam potencial para desenvolvimento de novos produtos, destacando sua importância para a indústria farmacêutica<sup>[2,3]</sup>.

No Brasil, o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos propõe aprimorar todas as etapas da cadeia produtiva de fitoterápicos<sup>[4]</sup>. Entre essas etapas, o procedimento extrativo é um dos mais importantes, pois o extrato bruto utilizado para análises fitoquímicas proporciona dados qualitativos e quantitativos acerca do perfil químico do vegetal. Assim, é necessária a investigação de técnicas para aumentar a eficiência da extração, buscando maiores rendimentos do extrato, relacionados à quantidade de amostra obtida, e aos metabólitos especiais contidos nele<sup>[5]</sup>.

O método extrativo utilizado e a escolha do(s) solvente(s) extrativo(s) são fatores que modificam os resultados do processo de extração. Comparado às técnicas tradicionais, a extração assistida por ultrassom proporciona a redução do tempo do processo e da quantidade de solventes utilizados, além da economia de energia. Essas vantagens são geradas por meio da cavitação. Além disso, aspectos físico-químicos são indispensáveis para a escolha dos solventes, visto que esses devem possuir características similares aos compostos de interesse para que, assim, haja a dissolução dos componentes no líquido<sup>[6,7]</sup>.

O método simplex, um tipo de otimização sequencial de planejamento experimental multivariado, pode ser empregado em diversos procedimentos analíticos para a determinação

de substâncias de interesse. Um exemplo é na avaliação dos efeitos da utilização de diferentes solventes extratores para a aquisição de metabólitos especiais em vegetais. A análise incorpora conceitos de miscibilidade e diferença entre polaridades entre os solventes, que pode gerar sistemas ternários homogêneos com potencial de extrair compostos distintos<sup>[8]</sup>. Mathias (2022), utilizando tal planejamento, apontou estatisticamente que os sistemas etanol, acetato de etila e diclorometano (EAD) nas proporções 62: 14: 24 e etanol, diclorometano e hexano (EDH) nas proporções 45: 25: 30 apresentariam melhores rendimentos e áreas totais de flavonoides, respectivamente quando comparados à misturas ternárias (1:1:1) dos mesmos componentes<sup>[9]</sup>. O presente estudo busca avaliar se os dados teóricos apresentados por Mathias (2022) são confirmados experimentalmente seguindo o mesmo método presente no estudo.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Materiais

Os solventes utilizados para os processos de extração, fracionamento e análise cromatográfica foram: hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, álcool etílico absoluto (etanol), e álcool metílico (metanol), acetonitrila grau HPLC, ácido fórmico 96% grau HPLC, água destilada e água ultrapura. A celulose microcristalina foi utilizada no fracionamento. Como instrumentação, foram utilizados: lavadora ultrassônica, evaporador rotativo, cromatógrafo em fase líquida de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos (DAD) equipado com coluna de fase inversa. O cromatógrafo foi acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução com fonte de ionização por eletrospray (ESI) e analisador do tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF).

### 2.2. Metodologia

A amostra de *M. albicans* foi coletada em 2018, no município de Itaboraí, região do Estado do Rio de Janeiro. As folhas foram secas e moídas, e então submetidas ao processo de extração sob duas misturas diferentes: etanol, acetato de etila e diclorometano (EAD) nas proporções percentuais 62:14:24 e etanol, diclorometano e hexano (EDH) nas proporções 45:25:30. Essas composições foram previstas estatisticamente por Mathias (2022) após a realização de um planejamento simplex centroide e posterior aplicação da Metodologia de Superfície de Resposta sob os dados, com a finalidade de determinar as composições que fornecessem maior rendimento do extrato bruto e melhor extração de substâncias fenólicas (taninos e flavonoides). Este autor, em seu trabalho, utilizou como solvente extrator misturas com proporções iguais de cada solvente como a EAD 1:1:1 e a EDH 1:1:1, que foram tomadas como referência para a comparação realizada neste trabalho.

Os extratos brutos foram preparados em triplicata sob a mesma metodologia descrita por Mathias (2022), na qual, separadamente, 60 mL de cada mistura foram adicionadas a 12g de amostra vegetal, em triplicata, e inseridas em banho de ultrassom para extração em 9 ciclos de 30 minutos cada. Ao fim de cada ciclo, a solução foi filtrada e, ao material vegetal, foram acrescidos mais 60 mL para prosseguir com a extração. Após os ciclos, os extratos foram submetidos à secagem por rotaevaporação e liofilização para obtenção da massa seca de extrato bruto.

Em seguida, foi realizado o fracionamento de cada extrato em celulose, na qual 200 mg

de cada foram dissolvidos no solvente extrator e adsorvidos em celulose, resultando em uma pastilha sólida. O fracionamento por partição por solventes foi realizado com a passagem de 200 mL de cada solvente pela fase estacionária, seguindo a ordem decrescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol e água. Após a secagem de cada fração, obteve-se a massa de cada fração concentrada, utilizadas para análise quantitativa. A fração metanólica de cada extrato foi submetida à análise por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas para separação e identificação dos constituintes químicos (análise qualitativa) e quantificação baseada na determinação das áreas cromatográficas das substâncias detectadas em 254 nm (taninos) e 340 nm (flavonoides).

### 3. Resultados e Discussão

Os rendimentos médios, obtidos por Mathias (2022), para os extrato das folhas de *Miconia albicans* obtidos com a mistura etanol, acetato de etila e diclorometano (EAD) na proporção 1:1:1 foi de 12,66%, enquanto com a mistura etanol, diclorometano e hexano (EDH) 1:1:1, foi de 6,98%. Posteriormente, o autor utilizou a Metodologia de Superfícies de Resposta para prever estatisticamente qual seria a melhor composição do solvente extrator para obter rendimento do extrato e maior concentração de substâncias fenólicas, obtendo como resposta a composição percentual de EAD (62:14:24) como melhor rendimento de extrato e a composição EDH (45:25:30) como o melhor solvente extrator para as substâncias fenólicas. Os rendimentos médios destas novas proporções foram de 9,95% para EAD e 6,43% para EDH, demonstrando assim, valores inferiores aos dos mesmos sistemas nas proporções 1:1:1.

Os extratos “A” de cada triplicata nas novas proporções foram submetidos ao fracionamento para facilitar a análise cromatográfica. Comparando os rendimentos das frações obtidas a partir dos diferentes extratos, as frações em hexano e clorofórmio renderam maior massa no extrato EDH, enquanto as frações em acetato de etila e metanol se destacaram no extrato EAD. Os resultados eram esperados devido ao caráter mais apolar dos extratos EDH comparado ao EAD.

As frações em metanol dos novos extratos foram submetidas à análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, para avaliar se o perfil químico estava compatível com os dados obtidos para os extratos EAD e EDH nas proporções (1:1:1). As substâncias identificadas por Mathias (2022), nas frações EAD e EDH foram: ácido gálico; ácido protocatecuico; vescalagina; castalagina; rutina; quercetina galoil hexosídeo; quercetina hexosídeo; quercetina pentosídeo; camferol galoil hexosídeo; quercetina ramnosídeo; isoramnetina hexosídeo; isoramnetina ramnosídeo; quercetina galoil pentosídeo; quercetina.

As substâncias majoritárias no perfil cromatográfico das frações metanólicas dos extratos EAD e EDH nas proporções 62:14:24 e 45:25:30, respectivamente, foram identificadas pela fragmentação de massas (espectro de MS/MS) no modo negativo. O íon molecular e os fragmentos foram comparados com dados da literatura e com o banco de dados MassBank. As áreas integradas para as substâncias do extrato EAD nas novas proporções foram maiores que para os extratos referência, tanto para taninos quanto para flavonoides. Com a composição EDH nas novas proporções, o crescimento das áreas ocorreu apenas nos taninos ácido gálico, vescalagina, castalagina e o flavonoide quercetina galoil hexosídeo 1, com decréscimo marcante em todas outras substâncias. Esse efeito é atribuído ao aumento na concentração do solvente etanol, que pode favorecer a extração de

taninos.

#### 4. Conclusões

De acordo com os resultados obtidos, a partir de uma comparação quantitativa, o extrato EAD (1:1:1) seria o indicado para obtenção de maior rendimento de extrato bruto. Em casos nos quais o foco de estudo seja na aquisição de taninos, o extrato EDH (45:25:30) seria o mais indicado, enquanto o EDH (1:1:1) demonstra maior eficiência para extração de flavonoides. Para a aquisição de um perfil químico com um maior número de substâncias, a partir de um viés qualitativo, incluindo flavonoides, taninos e ácidos fenólicos, os extratos na proporção referência (1:1:1) podem ser preferencialmente utilizados.

Desta maneira, as composições previstas no trabalho de Mathias (2022) não forneceram ao todo resultados melhores do que as composições de referência. Apenas, para extração de taninos, a composição EDH (45:25:30) se mostrou mais adequada do que a referência respectiva 1:1:1. Diante disto, o autor poderia fazer alguns ajustes experimentais no planejamento simplex centrado, como a inclusão de mais composições extrativas para aplicar a Metodologia de Superfície de Resposta e possivelmente encontrar um resultado que se aproxime mais da realidade experimental.

As análises apresentadas podem ser utilizadas pelas indústrias de fitoterápicos a fim de aumentar sua aquisição de princípios ativos de forma qualitativa e quantitativa.

#### Agradecimentos

O presente trabalho foi desenvolvido com o apoio da UENF e das agências de fomento CAPES, FAPERJ.

#### Referências

- [1] MOREIRA, F. A. **Perfil na alteração na produção de substâncias fenólicas e açúcares livres na interação entre Tapirira guianensis Aubl. (Anacardiaceae) Parasitada por Phoradendron crassifolium (Pohl ex DC.) Eichler (Santalaceae)**. 2015, 122f. Tese (Mestre em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.
- [2] REZENDE, F. M. et al. **Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas**. São Paulo: Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, Departamento de Botânica, 2016, p. 93-105.
- [3] MONTEIRO, S. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: aspectos teóricos e aplicações**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2017.
- [4] BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2006.
- [5] FINÊNCIO, B. M.; MINIEL, F. J. Abordagem fitoquímica e análise cromatográfica das folhas de Bauhinia variegata L. **Revista Científica Intraciência**, ed. 17, 2019.
- [6] SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1 ed. Porto Alegre: Artmed Editora Ltda, 2017.
- [7] SILVA, C.; GARCIA, V. A. S.; FRANCISCATO, L. M. S. S. Extração Assistida por Ultrassom de Compostos Bioativos. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v. 18, n. 1, p. 81-96, 2016.
- [8] BEZERRA, M. A. et al. Simultaneous optimization of multiple responses and its application in Analytical Chemistry – A review. **Talanta**, v. 194, p. 941-959, 2019.
- [9] MATHIAS, M. S. **Investigação sobre o efeito do solvente na extração de metabólitos secundários de Miconia albicans**. 2022, 107f. Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, Campos dos Goytacazes, 2022.