



ESTUDO TECNOLÓGICO E ANALÍTICO PARA OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Calophyllum brasiliense*

Otto Mauricio Santos Gerlach, Ruth Meri Lucinda da Silva, Guilherme Moreschi Gerhardt

Química - Química Analítica

Resumo

O “guanandi”, árvore de ocorrência local e em outros biomas brasileiros, tem em seus frutos, casca e principalmente folhas, o uso popular medicinal. Sua utilização prática se dá por diferentes formas, mas todas utilizando da mesma composição fitoquímica presente na espécie. A forma de extrair os compostos é essencial na produção de um fitoterápico, assim como a elucidação de moléculas ativas e a quantificação dessas. O presente estudo buscou entender melhor a composição das folhas da *Calophyllum brasiliense* Cambess, selecionando alternativas ecológicas e escalonáveis para a extração. As folhas secas foram coletadas em Serra (ES) e pulverizadas, as extrações foram realizadas com solução etanol absoluto, 70, 50, 30% (EEt100, EEt70, EEt50 e EEt30 respectivamente), com agitação mecânica durante 4 horas, na proporção de material vegetal solvente 1:10. Depois de filtradas as amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada com detector de arranjo de diodo (DAD). Uma curva para quantificação de amentoflavona (AMF) foi realizada ($Y=17842x - 40415$, $R^2=0,999$). O EEt70 foi também particionado com hexano e acetato de etila, aquosa residual, gerando 3 frações (Fr hex, Fr AE, Fr Aq). O EEt70 apresentou 59 picos, onde a AMF tem 18% da área total desses, apresentando 403µg/mL de AMF em sua composição. A quantidade de AMF foi menor nos EEt30 e EEt100, por volta de 2,5 vezes. Já o EEt50 apresentou uma maior extração da AMF (aproximadamente 3 vezes). A AMF ficou concentrada na Fr. AE e, em menor quantidade, na Fr. Aq. Considerando futuras utilizações para o extrato, optou-se pela utilização do EEt70 devida boa extração do potencial ativo, AMF, e por sua característica antisséptica que dificulta a perda de material por contaminação. A partição do EEt70 com acetato de etila, após posterior purificação e isolamento, pode servir como fonte de AMF para novos testes farmacológicos além de um controle de qualidade de um futuro fitoterápico desenvolvido das folhas da *Calophyllum brasiliense* Cambess.

Introdução

A busca por novos medicamentos, em algum momento, passa pela observação e pesquisa científica de espécies vegetais, principalmente a partir do conhecimento e uso popular. Em nosso país, o mais biodiverso de todos, destaca-se a árvore *Calophyllum brasiliense* Cambess, pertencente à família *Clusiaceae* e popularmente conhecida como “guanandi” ou “jacareúba”. A árvore pode atingir de 20 a 30 m de altura e entre 40 e 60 cm de diâmetro em estágio avançado de desenvolvimento. Existem relatos do uso tradicional dos frutos, casca e principalmente das folhas para fins medicinais. Diferentes extrações feitas com as folhas e outras partes demonstram uma complexa composição fitoquímica, se tornando um desafio para a indústria de fitoterápicos, por outro lado, seu potencial de produção de material vegetal, composto por folhas, a torna uma importante fonte de bioativos.



A indústria de fitoterápicos ganha espaço e traz consigo pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, necessitando de condições iniciais favoráveis, como definição de marcador químico, processo de extração com uso de solventes verdes, garantindo a atividade farmacologia diferenciada, em um produto estável, ecologicamente e farmacologicamente escalonável.

Visto os desafios, o presente trabalho teve como objetivo a obtenção de extrato a partir das folhas secas de *Calophyllum brasiliense* Cambess tendo etanol, em diferentes concentrações, como solvente.

Métodos

O material vegetal foi coletado em Serra (ES). As folhas foram secas, acondicionadas em embalagem plástica e pulverizadas antes da extração (tamanho de partícula igual e menor que 2mm). Para extração foi utilizado agitador mecânico, a 500 rpm, pás do tipo hélice, usando como solvente etanol absoluto (100%), 70, 50 e 30% em água (EEt100, EEt70, EEt50 e EEt30, respectivamente). A extração se deu na temperatura ambiente durante 4 horas ininterruptas. A proporção de material vegetal:solvente foi 1:10 m:v. As soluções foram filtradas em papel filtro qualitativo e armazenados em frasco âmbar, em geladeira (4°C).

As análises químicas quali e quantitativas dos extratos foram realizadas em cromatógrafo líquido de alta performance (CLAE), Shimadzu (LC-20AT) com bomba quaternária, acoplado de um detector de arranjo de fotodiodo (SPD-M20A), forno (CTO-10vp) e coluna de fase ligada Kinetex® Core-Shell C18, 150x4,6 mm, tamanho de partícula de 2,6 µm. Volume de injeção de 20 µL, temperatura de 40 °C, fluxo de 1,0 mL/min, com detecção em 280 nm, tempo total de 30 minutos em modo gradiente adaptado de Vanegas, Trujillo e Jaramillo (2019), que segue descrito: Acetonitrila (A) e Ácido fórmico em água (0,1% v:v), 0 min 55:45 A:B, 10 min 87:13 A:B, 20 min 100:0 A:B, 25 min 55:45 A:B permanecendo isocrático por 5 min. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A curva de quantificação da amentoflavona (AMF) foi realizada com oitos pontos ($Y=17842x - 40415$, $R^2=0,999$), na faixa de concentração de 0,2 a 650 µg/mL partindo de uma solução estoque de 1000 µg/mL em metanol. O padrão utilizado foi obtido através de isolamento e confirmação por RMN em trabalhos realizados anteriormente no grupo (CECHINEL FILHO; MEYRE-SILVA; NIERO, 2009; MOLIN, 2009). Uma parte (50 mL) do EEt70 foi particionado com igual volume com o hexano e acetato de etila, nessa ordem. Ambas as frações e o resíduo aquoso foram evaporadas (FrHEX, FrAE, FrAQ, respectivamente) e posteriormente analisadas tendo teor de amentoflavona quantificado. Antes das análises cromatográficas todas as amostras foram filtradas com membrana de celulose regenerada com diâmetro de 0,45 µm (Sartorius).

Resultados e Discussões

As extrações, em diferentes concentrações alcoólicas, produziram soluções extrativas com aspectos visuais distintos, variando de coloração âmbar escuro a âmbar claro. Quando avaliadas quando a composição, pode-se observar mais de 59 picos diferentes, sendo distribuído majoritariamente em 7 picos (25; 19; 18; 8; 7; 5 e 3%) de diferentes



classes, para o EEt70, que apresentaram perfil de UV que remete a flavonoides e cumarinas em sua maioria. Dentre os compostos descritos para extrações feitas com as folhas, a AMF é encontrada em diferentes solventes. Com isso, fez-se a comparação da AMF isolada e caracterizada em outros trabalhos, e pelo perfil UV junto com tempo de retenção, foi possível confirmar a presença do composto e quantificar.

A concentração de AMF no EEt70 foi de 403µg/mL, sendo em área responsável por 18% de todos os picos. A quantidade de AMF nos EEt30 e 100 foi de aproximadamente 2,5 vezes menor em relação ao EEt70. Já para o EEt50 essa quantidade foi aproximadamente 3 vezes maior. A AMF se concentrou na partição realizada com acetato de etila e, em menor quantidade, no resíduo aquoso. Já na fração de hexano se encontram 4 possíveis cumarinas.

Considerações Finais

Os resultados obtidos a partir da obtenção e análise das soluções extrativas das folhas de *Calophyllum brasiliense* apontam a solução hidroetanólica 70% v/v como solvente com maior teor de AMF, o possível marcador químico devido ao composto já possuir atividade apresentada na literatura (YU e colab., 2017) e com testes farmacológicos em andamento dentro do grupo de pesquisa. O menor risco de contaminação devida característica antisséptica do solvente auxiliaram na escolha para etapas de partição e facilitarão a manipulação da solução extrativa em etapas posteriores de secagem e obtenção de um extrato padronizado. O particionamento do EEt70 para FrAE pode servir como etapa facilitadora para aquisição de AMF como padrão interno de controle de qualidade assim como para futuros testes farmacológicos, além de inúmeras outras possibilidades com os outros componentes, como as cumarinas, concentradas na Fr. Hex.

Palavras-chave: *Calophyllum*; Amentoflavona; Etanol.

CECHINEL FILHO, Valdir; MEYRE-SILVA, Christiane; NIERO, Rivaldo. Chemical and Pharmacological Aspects of the Genus *Calophyllum*. *Chemistry & Biodiversity*. Itajaí, p. 313-328. jun. 2009.

MOLIN, Marvola Manhabosco da. ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE EXTRATOS, FRAÇÕES E COMPOSTOS OBTIDOS DAS PARTES AÉREAS DA *Garcinia achachairu* Rusby (Clusiaceae). 2009. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Univali, Itajaí, 2009.

VANEGAS, Ana María Mesa; TRUJILLO, Silvia Blair; JARAMILLO, Carlos Peláez. Chemical Standardization of Extracts of *Calophyllum brasiliense* with Antiplasmodial and Cytotoxic Activity. *Journal Of Medicinal Plants And By-Products*. Medellín, p. 171-179. 14 abr. 2019.

YU, S., YAN, H., ZHANG, L., SHAN, M., CHEN, P., DING, A., LI, S.F.Y. A Review on the Phytochemistry, Pharmacology, and Pharmacokinetics of Amentoflavone, a Naturally-Occurring Biflavonoid. *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 22. 2017.

XXII SEMINÁRIO
DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

XI Mostra Científica de Integração
Pós-Graduação e Graduação

I Jornada de Tecnologia e Inovação



ISSN 1983-117X

UNIVALI; CAPES; CNPq