

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
CAMPUS PATO BRANCO
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

LUCAS CORAL FERREIRA

**EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES
DAS FOLHAS DE *Syzygium malaccense* UTILIZANDO TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS.**

Pato Branco – PR
2019

LUCAS CORAL FERREIRA

**EXTRAÇÃO E ISOLAMENTO DE COMPOSTOS ANTIOXIDANTES
DAS FOLHAS DE *Syzygium malaccense* UTILIZANDO TÉCNICAS
CROMATOGRÁFICAS.**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Co-orientadora: M^a. Anaclara Prasniewski

TERMO DE APROVAÇÃO

O trabalho de diplomação intitulado Extração e Isolamento de Compostos Antioxidantes das folhas de *Syzygium malaccense* utilizando técnicas cromatográficas foi considerado APROVADO de acordo com a ata da banca examinadora N°1.2.2019-B de 2019.

Fizeram parte da banca os professores.

Tatiane Luiza Cadorin Oldoni

Sirlei Dias Teixeira

Davi Costa Silva

DEDICATÓRIA

Dedico a todos os sonhadores que independente dos obstáculos, sempre conseguem o que querem com muito foco e objetivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a professora Tati por me guiar e auxiliar, com habilidade e experiência na orientação, durante a realização do trabalho.

A minha coorientadora e amiga, Anaclara Prasniewski que soube passar todo seu conhecimento e aprendizado adquirido durante a pós-graduação com maestria.

A professora Sirlei por me fornecer sempre uma luz em relação as práticas, principalmente, cromatografia em camada delgada preparativa.

A Cleidi, por me dar grande auxílio no laboratório para que fosse possível realizar as práticas no tempo hábil.

Aos meus familiares, principalmente minha mãe (Inês), tia Lúgia e minha irmã (Ludmila) por sempre me apoiarem e motivarem até atual momento.

A Anna Clara Albiero Rubira com seu apoio que foi de extrema importância para que eu pudesse dar continuidade ao trabalho e por fim, conclui-lo.

Agradeço aos meus amigos que me apoiaram quando precisei.

EPÍGRAFE

“A persistência é o caminho do êxito.”

Charles Chaplin

RESUMO

FERREIRA, L. C. **Extração e isolamento de compostos antioxidantes das folhas de *Syzygium malaccense* utilizando técnicas cromatográficas**. 2019. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco. 2019.

O interesse nas plantas, especialmente as medicinais, vem crescendo pois graças ao metabolismo secundário, conhecido como um mecanismo de defesa e sobrevivência das plantas, há uma rica composição de compostos fenólicos que possuem diversas atividades biológicas que despertam grande interesse econômico e científico e com isso muitos estudos são desenvolvidos a partir de extratos brutos ou com solventes orgânicos para extrair e isolar esses diferentes compostos para possíveis aplicações. A fim de investigar o perfil químico da *Syzygium malaccense*, a fração acetona, foi estudada e a purificação foi testada utilizando duas fases estacionárias de sílica com diferentes granulometrias (70-230 mesh e 230-400 mesh tipo flash). A sílica que proporcionou melhor purificação foi a 70-230 mesh onde foi possível coletar 96 N-subfrações com o objetivo de isolar compostos com capacidade antioxidante comprovada em outros estudos. As N-subfrações foram analisadas e agrupadas da 80-83 N-subfrações por apresentarem as bandas dos compostos de interesse do estudo, miricitrina e composto C3. Após o agrupamento, foi realizada uma nova purificação, utilizando coluna por exclusão molecular (Sephadex LH-20) onde foram obtidas 250 EM-subfrações que após análises, resultou no agrupamento das 99-115 EM-subfrações em 3 novas subfrações (DP-subfrações). As DP-subfrações geradas foram aplicadas em cromatografia em camada delgada preparativa para o isolamento dos compostos a partir do processo de coleta das bandas de interesse. A pureza dos compostos isolados foi avaliada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A partir dos resultados obtidos foi possível isolar um composto majoritário da *S. malaccense* utilizando técnicas clássicas cromatográficas. Assim é possível concluir que as técnicas empregadas neste trabalho foram capazes de extrair e isolar composto biologicamente ativo utilizando técnicas de baixo custo, alta reprodutibilidade e fácil execução.

Palavras-chave: Jambo, flavonoides, cromatografia preparativa, purificação.

ABSTRACTS

FERREIRA, L. C. **Extraction and isolation of antioxidants compounds from leaves of *Syzygium malaccense* using chromatographic techniques.** 2019. 53 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química), Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco. 2019.

The interest of plants, especially those medicinal, has been growing up because the secondary metabolism, known as a mechanism of defense and survival of plants, there are a rich composition of phenolic compounds which have various biological activities that arouse great economic and scientific interest and with it, too many studies are developed from crude extracts or with organic solvents to be able to extract and isolate those different compounds for possible applications. In order to investigate the chemistry profile *Syzygium malaccense*, the acetone fraction was studied by fractionation and the purification, were tested two stationary phases of silica with different granulometry (70-230 mesh and 230-400 mesh flash). The silica which provided best purification was 70-230 mesh where it was possible to collect 96 N-subfractions with the objective of to isolate compounds with antioxidant capacity compared in other studies, those N-subfractions were analysed and aggrouped of 80-83 N-subfractions because they presented the bands of the interest compounds of the study, miricitrine and compound C3. After aggrouped N-subfractions, was realized a new purification, using molecular exclusion column (Sephadex LH-20) where were obtained 250 EM-subfractions which after were analysed, resulted in a new aggroupment of 99-115 EM-subfractions in 3 new subfractions (DP-subfractions). Those DP-subfractions generated were applied in preparative layer chromatography to isolation of the compounds starting the process of collect of interest bands. The purity of the isolated compounds were evaluated using high performance liquid chromatography (HPLC). Through of obtained results was possible to isolate one majority compound from *S. malaccense* using classic chromatographic techniques. Thus can be conclude which techniques used in this work were able to extract and isolate biologically active compound with low costs techniques, high reproducibility and easy execution.

Keywords: Jambo, flavonoids, preparative chromatography, isolation, purification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Flor (A), Fruto (B) e árvore (C).	20
Figura 2. Relação do metabolismo primário, secundário e os compostos produzidos.	22
Figura 3. Ácido fênico (A), Pirocatequina (B), Hidroquinona (C) e Quinona (D).	23
Figura 4. Ácido Siríngico (A) e Ácido Isovanílico (B).	23
Figura 5. Ácido Cumárico (A) e Eugenol (B).	24
Figura 6. Esqueleto básico de um núcleo flavano.	24
Figura 7. Estrutura molecular: flavona(A), flavanona(B), isoflavona(C) e flavonol(D).	25
Figura 8. Esquema da cromatografia líquida clássica.	26
Figura 9. Fluxograma da sequência metodológica utilizada no presente trabalho. ..	30
Figura 10. mistura de fração acetona e sílica gel antes da aplicação em coluna aberta.	31
Figura 11. Tratamento pré-coluna da resina LH-20.....	32
Figura 12. Coluna cromatográfica aberta no modo normal-flash em luz visível (A) e irradiada com lâmpada $\lambda = 365$ nm.	35
Figura 13. Cromatografia em camada delgada analítica realizada com as NF-subfrações produzidas, (A) NF-44 a NF-54, (B) NF-55 a NF-69, (C) NF-70 a NF-83 e (D) NF-84 a NF-88.	36
Figura 14. Coluna cromatográfica aberta no modo normal em luz visível (A) e irradiada com a lâmpada (B).	37
Figura 15. N-subfrações obtidas no processo de fracionamento da fração acetona 1-36 (A), 37-72 (B) e 73-108 (C).....	38
Figura 16. Cromatografia em camada delgada analítica a partir das N-subfrações produzidas com luz visível, (A.1 e A.2) N-61 a N-79, e irradiadas com lâmpada de raio UV ($\lambda = 258$ nm), (B.1 e B.2) N-80 a N-96.....	39
Figura 17. Coluna de purificação SEPHADEX-LH-20 no início (A), durante (B) e no final (C) da eluição.	40
Figura 18. Cromatografia em camada delgada analítica a partir das EM-subfrações produzidas e comparadas com a subfração 15 irradiadas com lâmpada UV ($\lambda = 258$ nm). (A.1 e A.2) EM50-140 e (B.1 e B.2) EM149-239.	41

Figura 19. Cromatografia em camada delgada analítica realizada a partir das EM-subfrações selecionadas. (A) luz visível e (B) irradiada com lâmpada UV ($\lambda = 258$ nm).....	42
Figura 20. EM-subfrações após o agrupamento.....	43
Figura 21. DP-subfrações aplicadas na CCD-PREP e eluídas.....	44
Figura 22. Cromatograma do composto 3 isolado da CCD-PREP e comparação com a biblioteca do software no canal PDA.....	45
Figura 23. Cromatograma do composto isolado 3 pelo canal PDA de pureza.	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre as EM-subfrações e as DP-subfrações	43
--	----

LISTA DE ACRÔNIMOS

CCD-PREP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLC	Cromatografia líquida clássica
DP-subfração	Subfração agrupada para aplicação na cromatografia em camada delgada preparativa
EM-subfração	Subfração da coluna por exclusão molecular
NF-subfração	Subfração da coluna modo normal-flash
N-subfração	Subfração da coluna modo normal
RF	Retention fator (fator de retenção)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO	17
2.1 Geral	17
2.2 Específicos	17
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
3.1 Biodiversidade brasileira.....	18
3.2 Plantas medicinais	19
3.3 <i>Syzygium malaccense</i>	20
3.4 Metabolismo vegetal	21
3.5 Compostos fenólicos	22
3.6 Cromatografia líquida clássica	25
3.7 Cromatografia por exclusão molecular	27
3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	27
3.9 Cromatografia em camada delgada.....	27
3.10 Cromóforos.....	28
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Fracionamento cromatográfico em coluna aberta de sílica gel	30
4.1.1 Modo normal	30
4.2 Purificação em coluna aberta por exclusão molecular.....	31
4.3 Cromatografia em camada delgada (ccd) analítica.....	32
4.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-PREP).....	33
4.4.1 Confeccção da placa de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	33
4.4.2 Aplicação e eluição das amostras.....	33
4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos e fluorescência (CLAE-DAD-FL).....	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Fracionamento e purificação.....	34
5.1.1 Cromatografia em coluna aberta no modo normal-flash.....	34
5.1.2 Cromatografia em coluna aberta no modo normal	36
5.1.3 Cromatografia por exclusão molecular	40
5.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-PREP).....	43
5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência.....	44

1. INTRODUÇÃO

O Brasil, país de clima tropical, possui em seu território diversos biomas, o que faz com que diferentes espécies da fauna e da flora se adaptem resultando em cerca de 20% da biodiversidade total do planeta em seu território nacional. No final do século XX, houve uma atenção maior para a natureza, meio ambiente e a sustentabilidade, a fim de garantir a conservação da biodiversidade e seu uso sustentável, pois além de ser um patrimônio genético nacional, há um valor econômico agregado em diferentes atividades, como o campo de desenvolvimento de novos medicamentos. (SIMÕES *et al.*, 2017; CALIXTO, 2003; PIMENTEL *et al.*, 2015; FRANÇA *et al.*, 2007; MAGNUSSON *et al.*, 2016).

Em se tratando da flora, há um grande interesse pelos cientistas, em função do crescimento da fitoterapia e uso de plantas como medicamentos, denominadas plantas medicinais, que apresentam em sua composição, uma grande variedade de compostos químicos com propriedades medicinais. (JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018; BOLZANI, 2016; FRANÇA *et al.*, 2007).

Tais compostos químicos, são produzidos por meio do metabolismo secundário que tem como função, dentre outros aspectos, garantir a sobrevivência das plantas. Os produtos do metabolismo secundário podem ser divididos em 3 diferentes classes, sendo eles os terpenos, os compostos nitrogenados e compostos fenólicos. (TAIZ, 2013).

Os compostos fenólicos, são divididos em diferentes subclasses, dentre as quais destacam-se os flavonoides, como por exemplo a catequina, miricitrina, quercitrina e a mearnsitrina (MELO *et al.*, 2009; WENZEL, 2013).

A *Syzygium malaccense* (L.) Merry & Perry, popularmente chamada de jambo-vermelho, pertence à família Myrtaceae e possui origem asiática, especificamente da Índia e Malásia e pode ser encontrada no Brasil nas regiões Norte, Nordeste e nas regiões quentes do Sudeste. A atividade antioxidante e antiglicêmica no extrato de folha e atividade antibacteriana em extrato de caule foram comprovadas. (MELO *et al.*, 2009; ARUMUGAM *et al.*, 2014).

Como as plantas são matrizes complexas, a uma dificuldade em se trabalhar com a disponibilidade de seus compostos puros, assim as técnicas cromatográficas utilizadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência preparativa que possui alto

consumo de solvente e valor agregado limita o acesso a investigação, porém as técnicas cromatográficas clássicas acabam se tornando uma grande aliada nessa investigação química, pois possuem baixo custo. Assim explanado, o objetivo deste trabalho foi isolar e identificar compostos antioxidantes presentes nas folhas de *S. malaccense* utilizando diferentes técnicas cromatográficas.

2. OBJETIVO

2.1 Geral

Isolar e identificar compostos antioxidantes das folhas de *Syzygium malaccense* utilizando cromatografia em coluna aberta, cromatografia em camada delgada preparativa e cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2 Específicos

Purificar a fração acetona de *Syzygium malaccense* em coluna aberta preenchida com sílica gel.

Otimizar a eluição e separação de compostos presentes nas subfrações por meio da cromatografia em camada delgada analítica (modo normal).

Isolar compostos a partir das subfrações utilizando cromatografia em camada delgada preparativa.

Avaliar a pureza dos compostos isolados utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Biodiversidade brasileira

A biodiversidade pode ser considerada como a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, e compreende ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e ecossistemas, e pode variar conforme outros fatores como a estocagem de carbono, ciclagem de nutrientes, polinização e seleção genética crítica para a viabilidade de indústrias extrativistas, biotecnológicas e agropecuárias, (MAGNUSSON *et al.*, 2016; SIMÕES *et al.*, 2017).

A história dos estudos sobre a biodiversidade no Brasil é tão antiga quanto a história da própria nação e essa biodiversidade já despertava o interesse da coroa portuguesa desde o período colonial. Há diversos exemplos sobre o estudo da biodiversidade e plantas na antiguidade, como o livro de Fernão Cardim, padre jesuíta, que escreveu “Tratados da Terra e gente do Brasil” 1548-1625, que dedica um capítulo inteiro ao uso de plantas para o tratamento de doenças, e outro estudo envolvendo a diversidade biológica e a descoberta de bioprodutos ocorreu em 1533, e foi realizado pelos portugueses sobre o *Caesalpinia echinata*, popularmente conhecido como pau-brasil, com grande aplicação como corante pelos índios, e primeiro exemplo de um produto natural com valor agregado que não trouxe qualquer impacto econômico ao país, (MAGNUSSON *et al.*, 2016; BOLZANI, 2016; SANTOS, 2008).

Há relatos de bandeirantes sobre a desconhecida variedade biológica brasileira, além de uma grande quantidade de amostras levadas do Brasil para museus da Europa por naturalistas, (MAGNUSSON *et al.*, 2016). O Brasil não possui uma bioeconomia vigorosa e baseada em inovações, porém é a nação com a maior biodiversidade do planeta, composto por 7 biomas em seu território (amazônia, cerrado, caatinga, mata atlântica, pampa, pantanal e zona costeira e marinha), correspondente a cerca de 13% da riqueza mundial, e por isso deve ser protegida e conservada pois há estudos sobre a velocidade de perda da biodiversidade, ocorrendo de forma nunca vista. As plantas estão entre os grupos mais bem estudados no Brasil, (MAGNUSSON *et al.*, 2016; BOLZANI, 2016; PIMENTEL *et al.*, 2015; SIMÕES *et al.*, 2017).

Com isso, em um evento da conferência das nações unidas e desenvolvimento, foram propostas regras para assegurar a conservação da biodiversidade, seu uso sustentável, justa repartição dos benefícios provenientes do uso econômico dos recursos genéticos, que fora assinada por 168 países, incluindo o Brasil na conferência das nações unidas e desenvolvimento, conhecida como RIO-92, (SIMOES *et al*, 2017).

3.2 Plantas medicinais

Uma das áreas em destaque atualmente e continua em constante evolução, é o estudo das plantas medicinais e sua aplicação no desenvolvimento de novos produtos, já que, aproximadamente, 50 mil espécies de plantas são utilizadas na composição de produtos farmacêuticos ou cosméticos, (JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018).

A utilização de plantas medicinais pelo homem ocorre desde os tempos mais remotos e acredita-se que o povo egípcio iniciou a utilização de plantas medicinais por meio de drogas que, atualmente, são consideradas benéficas à saúde, além de indícios físicos de que diferentes povos, como os gregos, chineses e indianos que incluíram diferentes plantas medicinais, sendo elas consideradas o método mais antigo de tratamento. Para os chineses, essa interação com as plantas medicinais era sinal de influência e respeito, (HALBERSTEIN, 2005; JAMSHIDI-KIA *et al.*, 2018).

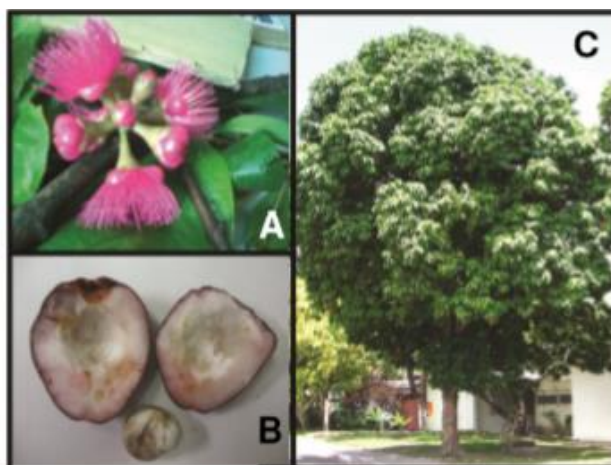
No Brasil, o conhecimento do uso de plantas medicinais se dava por diferentes práticas culturais como as europeias, que foram trazidas por colonizadores portugueses, ou as africanas trazidas por escravos de origens distintas e as indígenas, além da grande abundância da flora, as plantas usadas para fins medicinais destacaram-se por serem utilizadas como cura dos males do corpo e do espírito, (SANTOS, 2008).

O termo “planta medicinal” tem origem em plantas que possuem qualquer propriedade medicinal e que contêm uma grande variedade de compostos que podem ser usados para a síntese de drogas quando há uma possível aplicação farmacêutica da planta estudada. O extrato é fracionado e em seguida os compostos são isolados e identificados. Os países desenvolvidos, mesmo não sendo grandes detentores da biodiversidade terrestre, nunca tiveram dúvidas sobre a riqueza molecular escondida na natureza. (JAMSHIDI-KIA *et al*, 2018; BOLZANI, 2016)

3.3 *Syzygium malaccense*

A planta que será utilizada neste trabalho é a *Syzygium malaccense* (L.) Merry & Perry (Figura 1), popularmente conhecida como jambo vermelho, pertencente à família *Myrtaceae*. Ela pode atingir de 12 a 15 metros de altura, com tronco reto e copa densa piramidal e seu fruto pode ser consumido *in natura* ou em forma de compotas. Apesar de ter origem asiática, Índia e Malásia, conseguiu se adaptar ao Brasil nos estados da região Norte, Nordeste e nas regiões quentes do Sudeste, (MELO *et al.*, 2009.).

Figura 1. Flor (A), Fruto (B) e árvore (C).



Fonte: MELO *et al.*, 2009.

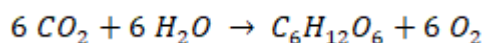
Segundo relatos da literatura, isolou-se quatro flavonoides (catequina, mearnsitrina, miricitrina e quercitrina) da folha de *Syzygium malaccense* através de estudos fitoquímicos (MELO *et al.*, 2009), do extrato etanólico que, através de fracionamento de bioensaio-guiado foi possível identificar compostos majoritários que apresentaram atividade antioxidante e antiglicêmica, sendo eles, o ácido gálico e miricitrina (ARUMUGAM *et al.*, 2014) e a identificação de 17 metabólitos secundários do extrato metanólico, incluindo flavonols glicosilados, di-glicosilados e ácidos fenólicos que possuíam atividade antioxidante e hepatoprotetiva, (MANSOUR *et al.*, 2018).

3.4 Metabolismo vegetal

O metabolismo vegetal, de maneira geral, tem como função auxiliar no crescimento, desenvolvimento e proteção das plantas, podem ser divididos em metabolismo primário e secundário, (TAIZ, 2013).

O metabolismo primário é encontrado em maior proporção nas plantas, pois os compostos produzidos por ele são de extrema importância para o crescimento, respiração e desenvolvimento vegetal e estão presentes em todas as espécies do reino vegetal, (TAIZ, 2013).

Como exemplo de metabolismo primário, temos a reação de fotossíntese, que tem como definição “síntese utilizando a luz”, onde a planta usa de compostos pigmentados como a clorofila para que possa absorver luz e utilizá-la para oxidar a água, liberando oxigênio, reduzindo o dióxido de carbono e conseqüentemente formando grandes compostos carbonados, como os açúcares (Equação 1)

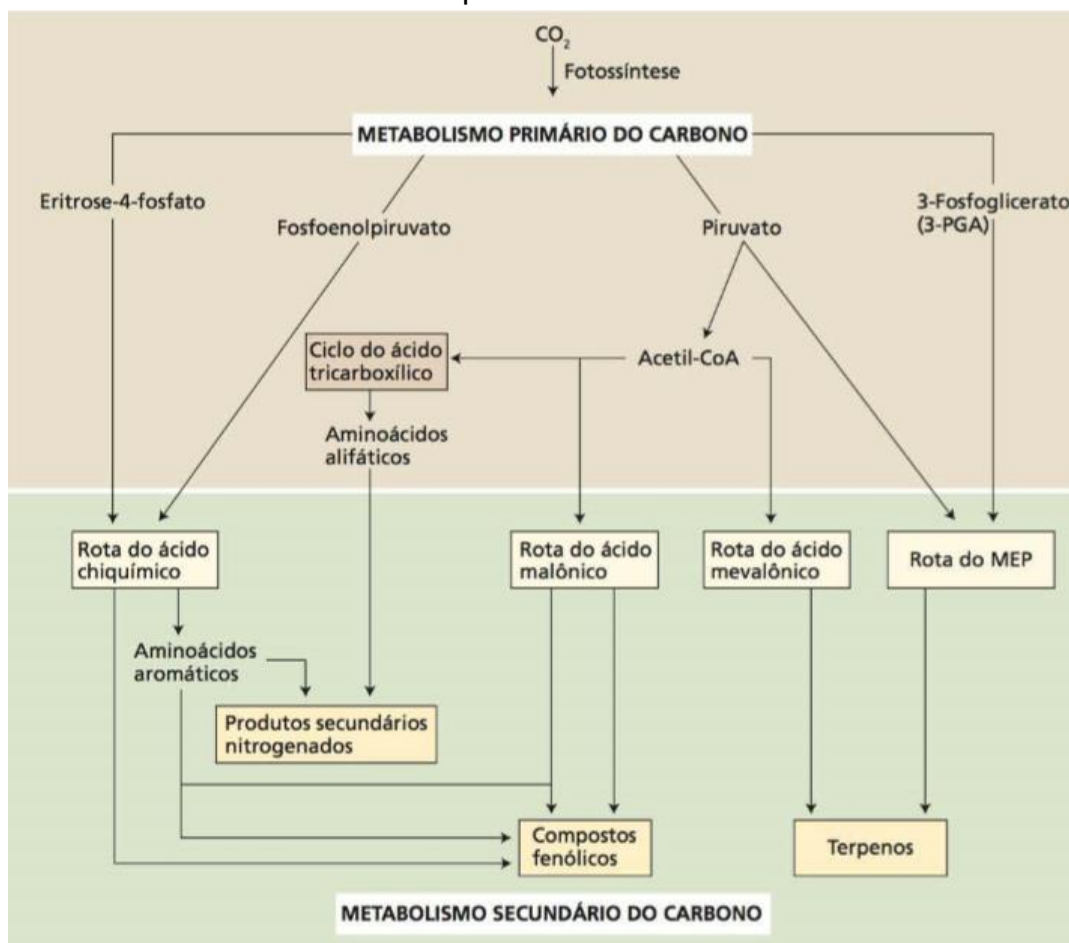


O metabolismo e os metabólitos secundários, por sua vez, foram considerados por muitos anos como produtos finais, comparando-os a resíduos, das reações que ocorrem no metabolismo primário e sem função aparente, porém em meados do século XIX, os estudos foram iniciados por químicos orgânicos que possuíam interesse nesses compostos pela importância em drogas medicinais, venenos, aromatizantes e entre outras propriedades que esses metabólitos poderiam apresentar, (TAIZ, 2013).

Os metabólitos secundários não apresentam relação direta com o processo de fotossíntese, respiração, transporte de solutos ou síntese de proteínas como os metabólitos primários. Suas principais funções são a proteção contra herbívoros e infecções de microrganismos patogênicos, ação como atrativos (odor, cor e sabor) para animais polinizadores e dispersores de sementes, atuação como agentes nas competições entre plantas (alelopatia) e nas simbioses plantas-microrganismos, (TAIZ, 2013; DEWICK 2002).

Os metabólitos secundários são produzidos por diferentes rotas bioquímicas (Figura 2) e podem ser divididos em três grupos quimicamente distintos, os terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos, (TAIZ, 2013).

Figura 2. Relação do metabolismo primário, secundário e os compostos produzidos.



Fonte: (TAIZ, 2013)

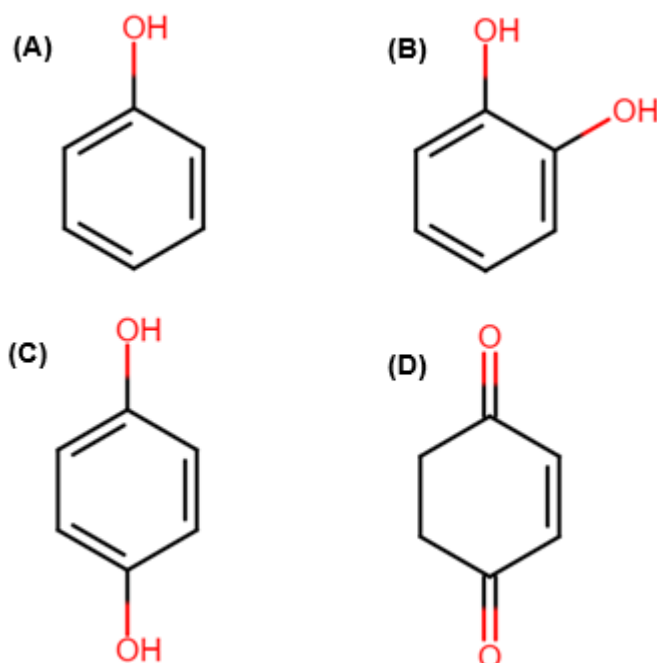
3.5 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são produzidos como metabólitos secundários nas plantas, e muitos desses compostos fenólicos apresentam propriedades químicas e biológicas, como atividade antioxidante e capacidade de eliminar espécies de oxigênio ativa, (SHAHIDI, 2005; SLÁMOVÁ *et al.*, 2018).

O termo “fenólico” ou “polifenólico” corresponde a substâncias que possuem pelo menos um anel aromático com uma ou mais hidroxilas ligadas ao anel. Quando se fala em compostos fenólicos há fenóis simples, ácidos fenólicos, fenilpropanóis, e em compostos polifenólicos/policíclicos, temos os flavonoides, (SHAHIDI 2005; WENZEL, 2013).

Para que o composto seja considerado um fenol simples, ele necessita apresentar apenas um único anel aromático com uma ou mais hidroxilas ligadas ao mesmo em sua estrutura molecular. Alguns exemplos de fenol simples estão representados a seguir na figura 3, (WENZEL, 2013).

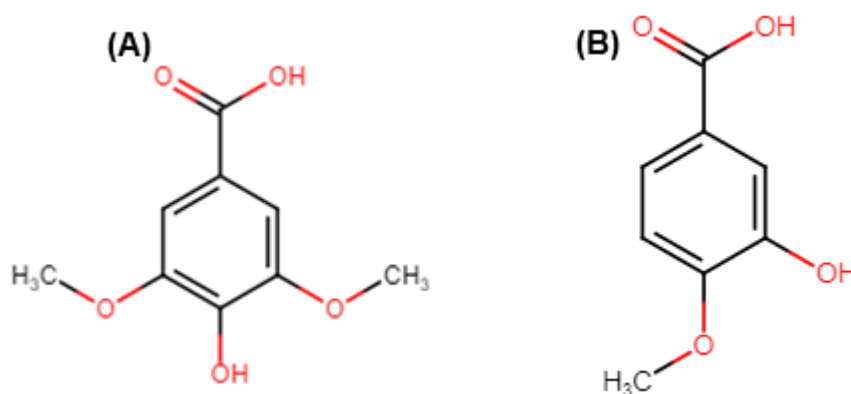
Figura 3. Ácido fênico (A), Pirocatequina (B), Hidroquinona (C) e Quinona (D).



Fonte: Autoria própria

A classe dos ácidos fenólicos é definida por um grupo carboxílico ligado direta ou indiretamente ao anel aromático, além de uma ou mais oxidrila fenólica como mostra a figura 4 (WENZEL, 2013).

Figura 4. Ácido Siríngico (A) e Ácido Isovanílico (B).



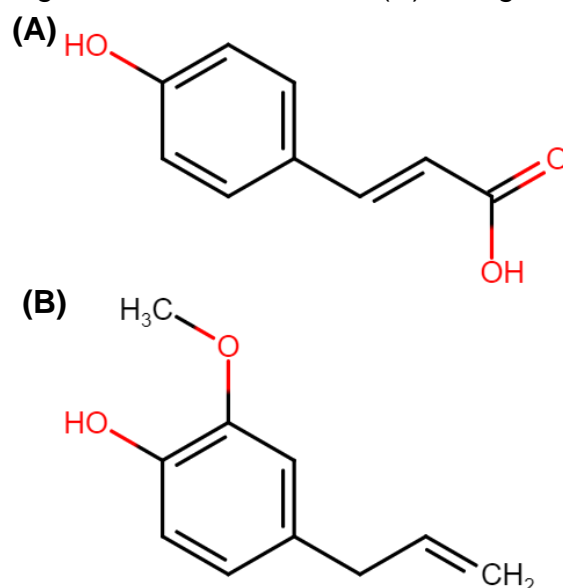
Fonte: Autoria própria.

A classe do 2,3-fenilpropanol, também conhecido como a classe do fenilpropanol, é compreendida por fenol monocíclico como os anteriores

demonstrados e é definida por possuir uma cadeia de três carbonos (propano), ligados ao anel aromático. A

cadeia pode ser saturada ou insaturada e pode ou não terminar com um grupo carboxílico, a seguir na figura 5 (WENZEL, 2013).

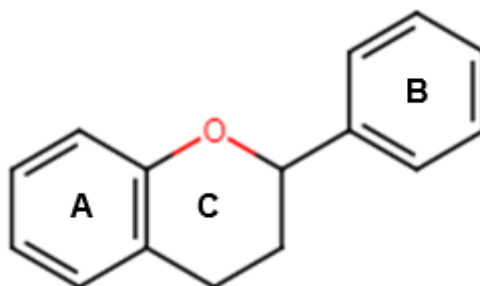
Figura 5. Ácido Cumárico (A) e Eugenol (B).



Fonte: Autoria própria.

Já os flavonoides são os polifenóis que estão presentes em maior quantidade na alimentação humana, já que há uma grande quantidade deles nas folhas, flores e frutos das plantas, e há associação deles com a diminuição no risco de doenças relacionadas com a idade. Sua estrutura possui um esqueleto básico de núcleo flavano, composto por 15 átomos de carbono e 1 átomo de oxigênio (Figura 6),(SLÁMOVÁ, 2018; WANG *et al.*, 2017; WENZEL, 2013).

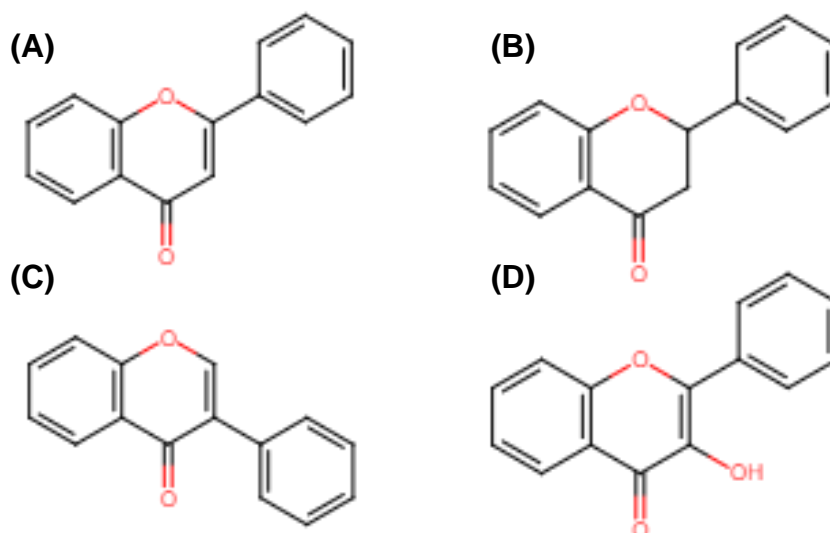
Figura 6. Esqueleto básico de um núcleo flavano.



Fonte: Autoria própria

A classe dos flavonoides compreende diferentes classes, como as flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonol, (Figura 7), (SHAHIDI, 2005; NILE, 2013).

Figura 7. Estrutura molecular: flavona(A), flavanona(B), isoflavona(C) e flavonol(D).



Fonte: A autoria própria.

O flavonol é a classe, dentre as nove constituintes, que possui maior representatividade dentro dos flavonoides. Eles, assim como as flavonas, geralmente estão ligados a um O-glicosídeo e estão amplamente distribuídos nas folhas de plantas superiores (WENZEL, 2013).

Segundo a literatura, em um extrato acetona das folhas de *Syzygium malaccense*, utilizando testes antioxidantes, método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH), poder redutor do ferro (FRAP), capacidade sequestrante do radical peróxido (ROO[•]) e sequestro do radical superóxido (O^{2-•}), foi possível identificar e isolar 22 flavonoides por meio da cromatografia líquida clássica, dentre os flavonoides identificados estão a Quercetina galoil-ramnosídeo, Isorhamnetina 3-O-ramnosídeo, catequina, miricitrina, miricetina, quercetina, quercitrina, mearnsitrina, entre outros, (PRASNIEWSKI, 2019).

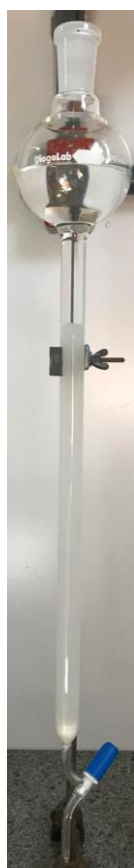
3.6 Cromatografia líquida clássica (CLC)

A cromatografia líquida clássica foi base para que houvesse o surgimento da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), e é realizada em colunas de vidro

com diâmetro interno que pode variar de 10 mm à maior que 10 cm e pode ser recheada com partículas sólidas de 60 μm à 200 μm . (COLLINS *et al.*, 2006; HOLLER *et al.*, 2009).

O funcionamento da CLC é a fluidez da fase móvel através da coluna de vidro, recheada com a fase estacionária (Figura 8), com auxílio da força gravitacional ou com aplicação de pressão reduzida, já que o tempo necessário para que ocorra a separação é longo de, no mínimo, horas. (COLLINS *et al.*, 2006)

Figura 8. Esquema da cromatografia líquida clássica.



Fonte: Autoria própria.

A princípio, a aplicação de pressão não era tão efetiva e resultava em um decréscimo na eficiência da coluna, porém em 1960, com o desenvolvimento de novos diâmetros e recheios, resultou, atualmente, na aplicação de fluxo pressurizado em todas as cromatografias líquidas, (COLLINS *et al.*, 2006; HOLLER *et al.*, 2009).

Segundo Silva & Nunomura (2016), foi possível isolar limonoides com o auxílio da técnica de cromatografia em coluna aberta (flash), na qual há aplicação de pressão.

3.7 Cromatografia por exclusão molecular

A cromatografia por exclusão molecular, também conhecida por cromatografia de filtração a gel ou cromatografia de permeação a gel, é utilizada como o último passo no processo de purificação, pois apesar de ser uma cromatografia de baixa resolução, possui alto efeito para o método de purificação sendo possível remover diversos interferentes de alto peso molecular das amostras como os lipídeos, as proteínas e pigmentos que podem estar presentes nos extratos das amostras analisadas, (WAKSMUNDZKA-HAJNOS, 2008; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, 2011).

3.8 Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida de alta eficiência, nomeada pela sigla CLAE, é a técnica mais utilizada para a identificação de aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, carboidratos, drogas, terpenoides, agrotóxicos, antibióticos, esteroides, e por isso é indispensável sua presença em laboratório de produtos naturais, indústria e amostras complexas, graças a sua amplitude de aplicação de amostras, (COLLINS *et al.*, 2006; SIMÕES *et al.*, 2017; HOLLER *et al.*, 2009).

3.9 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada, também pode ser nomeada pela sigla CCD, é um método físico-químico que é baseado na adsorção da amostra à fase estacionária, adsorvente, que se encontra na superfície da placa, podendo assumir diferentes composições químicas como a sílica gel (SiO_2) ou a alumina (Al_2O_3), e a fase móvel, solventes orgânicos, tem como objetivo eluir os compostos sob a placa com auxílio do fenômeno da capilaridade, (COLLINS *et al.*, 2006).

Essa técnica é muito empregada para isolamento de um ou mais compostos de interesse de uma amostra complexa e é vantajosa, pois além de ser um método de fácil compreensão, é de fácil execução, versatilidade, grande repetibilidade e baixo custo, (COLLINS *et al.*, 2006; WAKSMUNDZKA-HAJNOS *et al.*, 2008, p. 5).

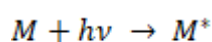
A técnica pode ser empregada para análises qualitativas, onde se faz uso de placas cromatográficas analíticas, ou pode ser empregada para análises quantitativas. Outra maneira de trabalhar com a CCD, é pela utilização de placas

cromatográficas preparativas, que possuem maior espessura da camada do adsorvente, resultando na possibilidade de aplicar uma maior quantidade de amostra para ser analisada, (COLLINS, C. H. *et al.*, 2006). Esta técnica permite o isolamento de compostos fenólicos, triterpenos, ácidos carboxílicos e ácidos graxos, (LÓPEZ *et al.*, 2019; PRASNIEWSKI, 2019; ANISAH *et al.*, 2017; LIMA, 2018; MACIEL, 2018; SILVA *et al.*, 2007).

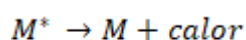
Assim que a eluição das amostras é concluída, é necessário a utilização de reveladores por métodos químicos ou físicos com o intuito de tornar visíveis compostos incolores presentes na amostra. O método químico pode ser realizado por meio da aplicação de compostos, como o H₂SO₄, KMnO₄, e são mais indicadas para separações analíticas, porém é um método destrutivo de revelação. Já o revelador físico, é um método não destrutivo e consiste na irradiação de raios ultravioleta com o auxílio de uma lâmpada, geralmente no comprimento de onda de 254 a 365 nm, pois muitos compostos possuem em sua estrutura grupos cromóforos que absorvem a radiação e podem ser visualizados, e é especialmente indicada para cromatografia preparativa, (COLLINS *et al.*, 2006).

3.10 Cromóforos

Quando se fala da química, há uma grande variedade de átomos que podem compor diferentes espécies atômicas ou moleculares (M), seja inorgânica ou orgânica, que ao absorver um fóton ($h\nu$) resulta em uma excitação de elétron livre, n , ou de elétrons presentes no orbital ligante, σ ou π , como mostra a equação abaixo:



Gerando uma espécie excitada (M^*), resultando em um salto quântico do elétron para o orbital de maior energia σ^* ou π^* , e que, na sequência passa pelo processo de relaxação da espécie liberada, a forma mais comum é através da conversão de energia em calor, descrito na equação abaixo:



Esse processo de reemissão poderá envolver a fluorescência e a fosforescência, (HOLLER *et al.*, 2009).

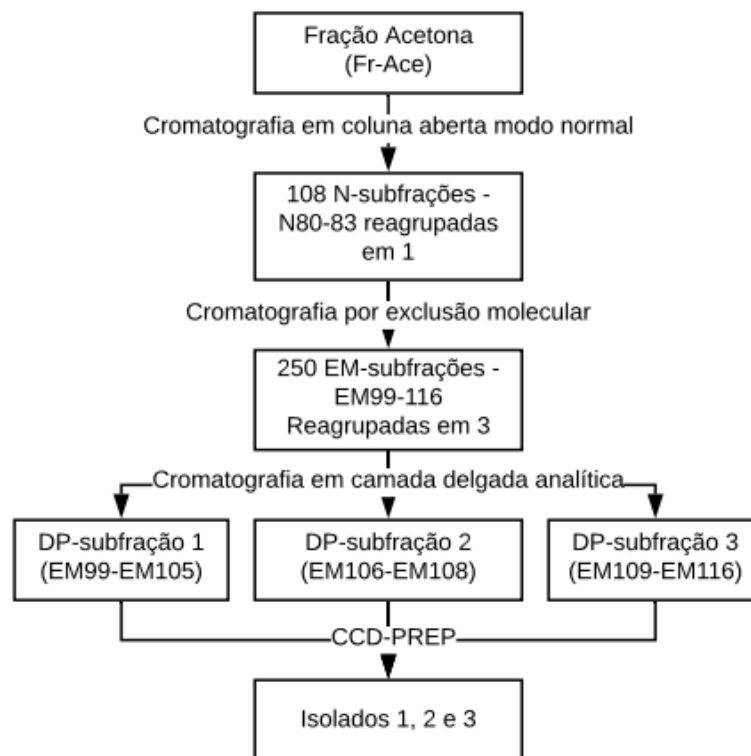
A energia, que faz com que ocorra essa transição, e o comprimento de onda da radiação absorvida, geralmente, são propriedades da excitação dos elétrons livres ou de ligação de um grupo de átomos e não dos elétrons individualmente, e esse grupo de átomos que promovem tal absorção são chamados de grupos cromóforos, que podem estar presentes desde compostos orgânicos saturados a compostos orgânicos insaturados ou substâncias com pares de elétrons livres. A absorvidade molar até $10^5 L \cdot mol^{-1} cm^{-1}$ pode ser observada na região do ultravioleta e do visível, (PAVIA *et al.*, 2010; HOLLER *et al.*, 2009).

Quando falamos de compostos orgânicos que possuem insaturações em suas estruturas químicas, há maior probabilidade de ocorrer dois tipos de transição, $\pi \rightarrow \pi^*$ ou $n \rightarrow \pi^*$, (PAVIA *et al.*, 2010; HOLLER *et al.*, 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O principal objetivo deste trabalho foi propor uma metodologia de fácil execução para o isolamento de compostos com potencial antioxidante a partir das folhas de *S. malaccense*. Em estudo realizado anteriormente por nosso grupo de pesquisa, PRASNIEWSKI, 2019, obteve compostos com elevada atividade antioxidante a partir de isolamento bioguiado. A fração que apresentou o maior potencial de bioatividade, foi a obtida a partir do extrato bruto utilizando o solvente acetona, que foi denominada fração acetona (Fr-Ace). Desta forma, o fluxograma utilizado para o desenvolvimento deste estudo partiu da referida fração (Figura 9).

Figura 9. Fluxograma da sequência metodológica utilizada no presente trabalho.



Fonte: Autoria própria.

4.1 Fracionamento cromatográfico em coluna aberta de sílica gel

4.1.1 Modo normal

Para o fracionamento cromatográfico, foi utilizada uma coluna de vidro na proporção pré-estabelecida de 15:1 sílica:amostra em gramas. Nesta etapa foram testadas duas composições de sílica:

1. Sílica gel Merck, 70-230 mesh: por apresentar maior diâmetro de poro, foi eluída no modo normal (com ação da gravidade);
2. Sílica gel Sigma-Aldrich, 230-400 mesh: por apresentar menor diâmetro de partícula, foi eluída com auxílio de pressão e então denominada “flash” pelo fato de desenvolver mais rapidamente.

A fração acetona previamente liofilizada (Figura 10) foi redissolvida, em 2 mL de acetona, acrescentando-se 4 g de sílica gel. Assim que o solvente volatilizou, a amostra foi aplicada no topo da coluna preenchida com 25 g de sílica gel para dar sequência ao processo de purificação, (PRASNIEWSKI, 2019).

A eluição da coluna foi realizada em modo gradiente com o uso de solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade. O processo foi iniciado com hexano

para ambientar a sílica e a amostra à coluna, e na sequência hexano:diclorometano (40:10), hexano:diclorometano (10:40), diclorometano (50), diclorometano:acetato de etila (40:10), diclorometano:acetato de etila (50:50), diclorometano:acetato de etila (10:40), acetato de etila (100), acetato de etila:metanol (40:10), acetato de etila:metanol (50:50), acetato de etila:metanol (10:40) e metanol (50). As amostras foram coletadas com um volume fixo, de aproximadamente, 5 mL ou por diferença de coloração visualizadas sob luz natural ou com auxílio de uma lâmpada de ultravioleta ($\lambda = 365 \text{ nm}$), (PRASNIEWSKI, 2019).

Figura 10. mistura de fração acetona e sílica gel antes da aplicação em coluna aberta.



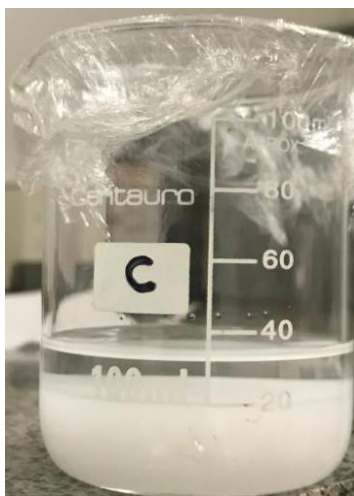
Fonte: Autoria própria.

4.2 Purificação em coluna aberta por exclusão molecular

Para a o processo de purificação por exclusão molecular em coluna foi utilizada a resina SEPHADEX™ LH-20 em proporção pré-estabelecida de 2% (m/m) de amostra por resina.

Antes do processo de eluição dos compostos, a resina foi condicionada, em proporção pré-estabelecida de 1:4 resina:metanol ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com metanol por 3 horas (Figura 11) e em seguida foi adicionada à coluna para realizar o processo de ambientação por 2 horas.

Figura 11. Tratamento pré-coluna da resina LH-20.



Fonte: Aatoria própria

Após o processo de ambientação, a amostra, N-subfrações 80 a 83 após serem agrupadas, foi adicionada à coluna com auxílio de uma pipeta de pasteur e, na sequência, iniciado o processo de eluição. Todas as etapas do processo (tratamento pré-coluna, ambientação e a eluição) foram realizadas com o solvente metanol.

Definiu-se o fluxo do processo de eluição por 12 cm/h por meio da equação 2:

$$\text{fluxo linear (cm/h)} = \frac{\text{fluxo volumétrico (cm}^3/\text{h)}}{\text{Área transversal (cm}^2\text{)}} \quad \text{(Equação 2)}$$

4.3 Cromatografia em camada delgada (CCD) analítica.

A cromatografia em camada delgada foi utilizada para que fosse possível unir os compostos com fator de retenção e coloração semelhantes. Foram utilizadas cromatofolhas de sílica gel da DC-Fertigfolien Alugram Xtra SIL G/UV254 (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) com espaçamento de 0,5 cm entre as amostras e extremidades horizontais, e 1 cm das extremidades verticais. A eluição dos compostos ocorreu por meio da fase móvel, direcionada aos compostos menos polares, que será composta por Benzeno:Acetato de etila:Metanol:Ácido fórmico (75:25:10:6), (PRASNIEWSKI, 2019).

4.4 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-PREP)

4.4.1 Confeccção da placa de cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

Foi realizada uma mistura contendo sílica gel:água destilada (1:2 m/m) e a placa foi confeccionada em uma placa de vidro 20 cm x 20 cm com SílicaGel 60 G – F254 PARA CROMATOGRAFIA EM CAMADA FINA da marca Vetec.

Após a confecção, as placas foram mantidas por 24 horas à temperatura ambiente para o processo de secagem e em seguida foram colocadas em uma estufa a 105 °C por 24 horas para o processo de ativação para que pudessem ser utilizadas no processo de isolamentos de compostos.

4.4.2 Aplicação e eluição das amostras

As subfrações foram diluídas em 100 µL de metanol e em seguida, aplicadas à CCDP, a fase móvel utilizada foi composta por Benzeno:Acetato de etila:Metanol:Ácido fórmico (75:25:10:6).

Após o processo de eluição das subfrações na CCDP, as bandas de interesse foram raspadas da placa e devidamente preparadas com clorofórmio:metanol (1:1).

As amostras então foram filtradas, separando a sílica gel, em seguida foram solubilizadas em acetonitrila e injetou-se os compostos na cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Os compostos foram transferidos separadamente para vials de 2 mL e armazenados em refrigeração para posterior injeção em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

4.5 Cromatografia líquida de alta eficiência com arranjo de diodos e fluorescência (CLAE-DAD-FL).

Para a identificação e determinação da pureza dos compostos isolados, a análise foi realizada em equipamento Varian modelo 920-LC, onde preparou-se uma mistura de padrões, aplicada em coluna de fase reversa C-18 Microsorb MV 100 (250 x 4.6 mm, 5 µm de tamanho de partícula), em fluxo: 1 mL min⁻¹ tendo como fase móvel solvente A:água acidificada (H₃PO₄ 0,1%; pH: 2,16) e solvente B: acetonitrila, operando em modo gradiente iniciando com 5% de B para 15% de B em 15 min, 25% de B em 25 min, 40% B em 35 min, 95% B em 38 min, 95% B em 42 min e 5%

B em 46 min, estabilizando até 54 min. A coluna foi mantida a temperatura constante de 30°C. O volume de injeção de cada amostra foi de 10 µL. (PRASNIEWSKI, 2019)

A caracterização dos extratos e frações, subfrações e isolados foi realizada por comparação de tempo de retenção e absorção característica no ultravioleta (ácido gálico, ácido vanílico, ácido cafeico, ácido siríngico, ácido cúmarico, ácido ferúlico, miricitrina, rutina, miricetina, ácido trans-cinâmico, quercetina e canferol) e fluorescência utilizando λ *Ex/Em* 275/346nm (catequina e epicatequina) com padrões analíticos autênticos. Para a quantificação dos compostos identificados foi construída uma curva de calibração contendo os 14 padrões, (PRANIEWSKI, 2019).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fracionamento e purificação

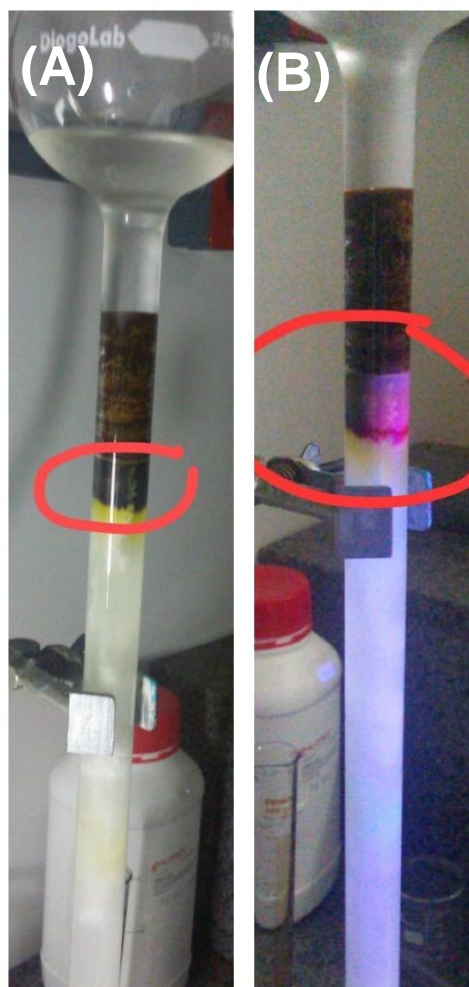
5.1.1 Cromatografia em coluna aberta no modo normal-flash

Após à eluição da fração acetona utilizando a sílica gel no modo normal, com auxílio de pressão (flash) foi possível coletar 96 NF-subfrações, o fracionamento foi controlado por meio de luz visível e lâmpada de UV ($\lambda = 365$ nm).

De acordo com Sampietro, Catalan e Vattuone, os flavonoides podem apresentar coloração amarela, laranja, marrom, verde ou azul fluorescente em $\lambda = 365$ nm, dependendo da estrutura do flavonoide. Segundo Wagner e Blat, em $\lambda = 258$ nm, os flavonoides apresentam fluorescência.

A subfração 15 que, será usada como referência na cromatografia em camada delgada analítica, contem a miricitina e composto C3 que são os compostos de interesse no presente trabalho e foi purificada em estudos anteriores por nosso grupo de pesquisa (PRASNIEWSKI, 2019) e apresentou elevado potencial antioxidante em relação as demais analisadas, por isso foi utilizada como referência nesse estudo e aplicada para fins de comparação.

Figura 12. Coluna cromatográfica aberta no modo normal-flash em luz visível (A) e irradiada com lâmpada $\lambda = 365$ nm.

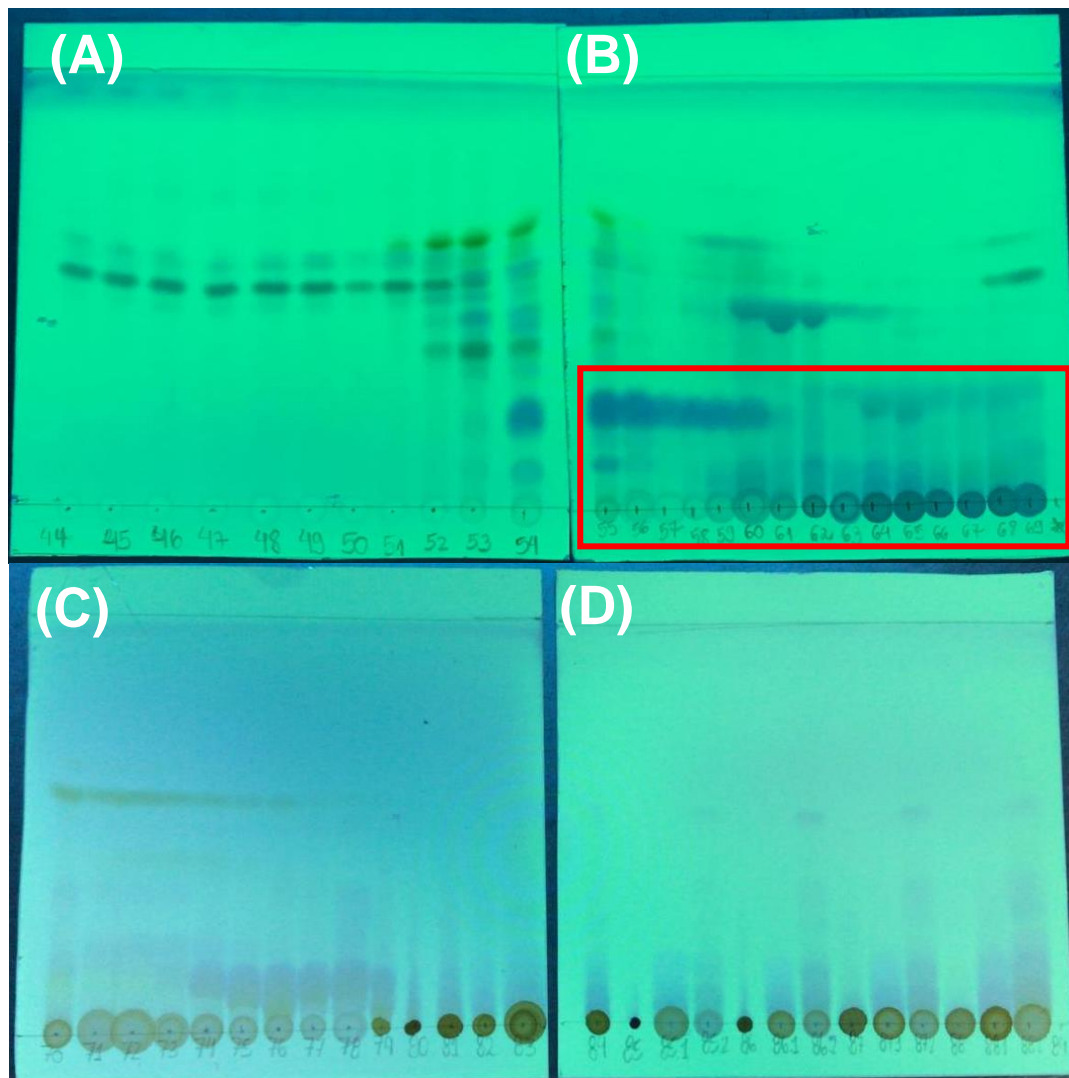


Fonte: Autoria própria.

Na sequência, as subfrações NF-44 a NF-88 (Figura 13) foram aplicadas em cromatografia em camada delgada analítica para verificar possibilidade de agrupamento das subfrações semelhantes em R_f e coloração.

É possível verificar que nos primeiros pontos de aplicação NF-44 a NF-54 (Figura 13A), os compostos apresentaram bandas bem definidas, porém como a miricitrina e composto C3 que são os compostos de interesse são mais polares, tem maior tempo de retenção na coluna. A separação dos compostos mais polares NF-55 a NF-69 (Figura 13B), não foi tão eficiente e as bandas ficaram sobrepostas. Desta forma, não foi possível identificar em quais NF-subfrações estariam a miricitrina e o composto C3 (Figura 13).

Figura 13. Cromatografia em camada delgada analítica realizada com as NF-subfrações produzidas, (A) NF-44 a NF-54, (B) NF-55 a NF-69, (C) NF-70 a NF-83 e (D) NF-84 a NF-88.



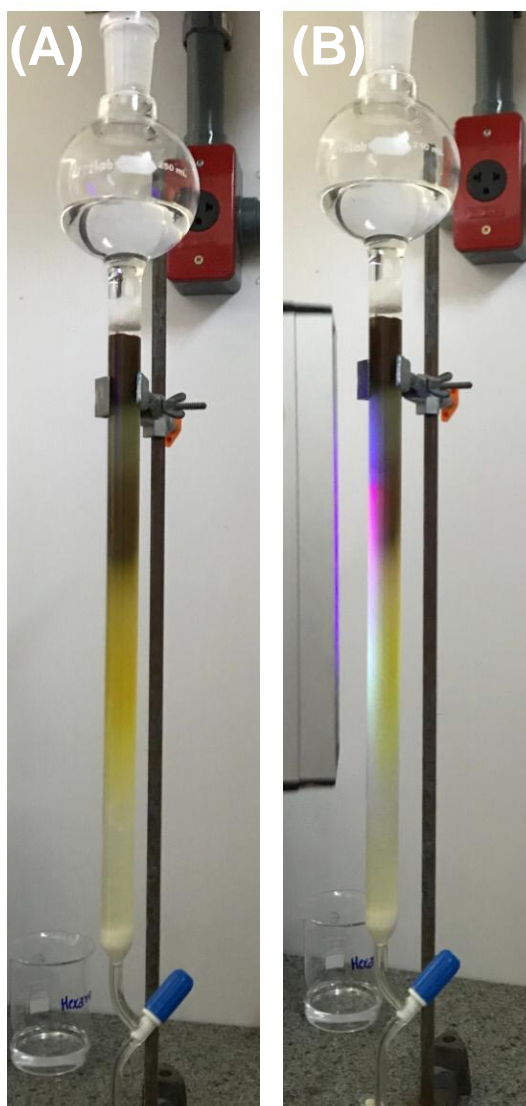
Fonte: Autoria própria.

Portanto foi preferível retornar à metodologia utilizada anteriormente pelo grupo de pesquisa sem aplicação de pressão à coluna.

5.1.2 Cromatografia em coluna aberta no modo normal

Para o modo normal, sem a pressão exercida na coluna, foram coletadas 108 N-subfrações (Figura 15) e para a realização do processo de fracionamento, foi utilizado uma lâmpada de UV ($\lambda = 365 \text{ nm}$) e luz visível (Figura 14).

Figura 14. Coluna cromatográfica aberta no modo normal em luz visível (A) e irradiada com a lâmpada (B).

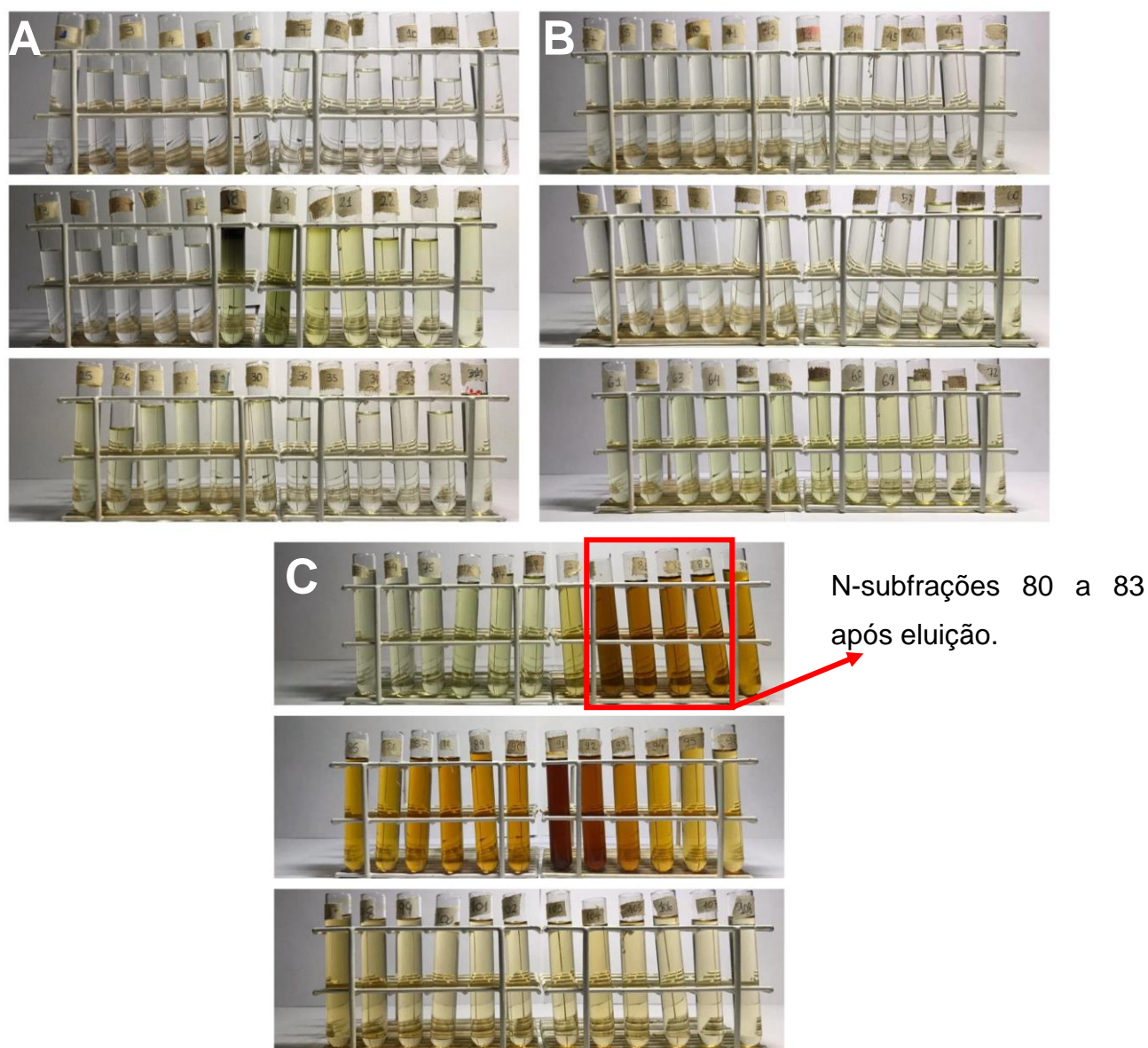


Fonte: Autoria própria.

As N-subfrações 61 até 79 que apresentam menor polaridade não apresentaram uma boa separação, pois algumas bandas ficaram sobrepostas, devido à elevada complexidade das subfrações.

Os compostos de interesse, identificados nas N-subfrações 80 até 83, eluídos pela fase móvel Acetato de etila:Metanol (50:50)

Figura 15. N-subfrações obtidas no processo de fracionamento da fração acetona 1-36 (A), 37-72 (B) e 73-108 (C).



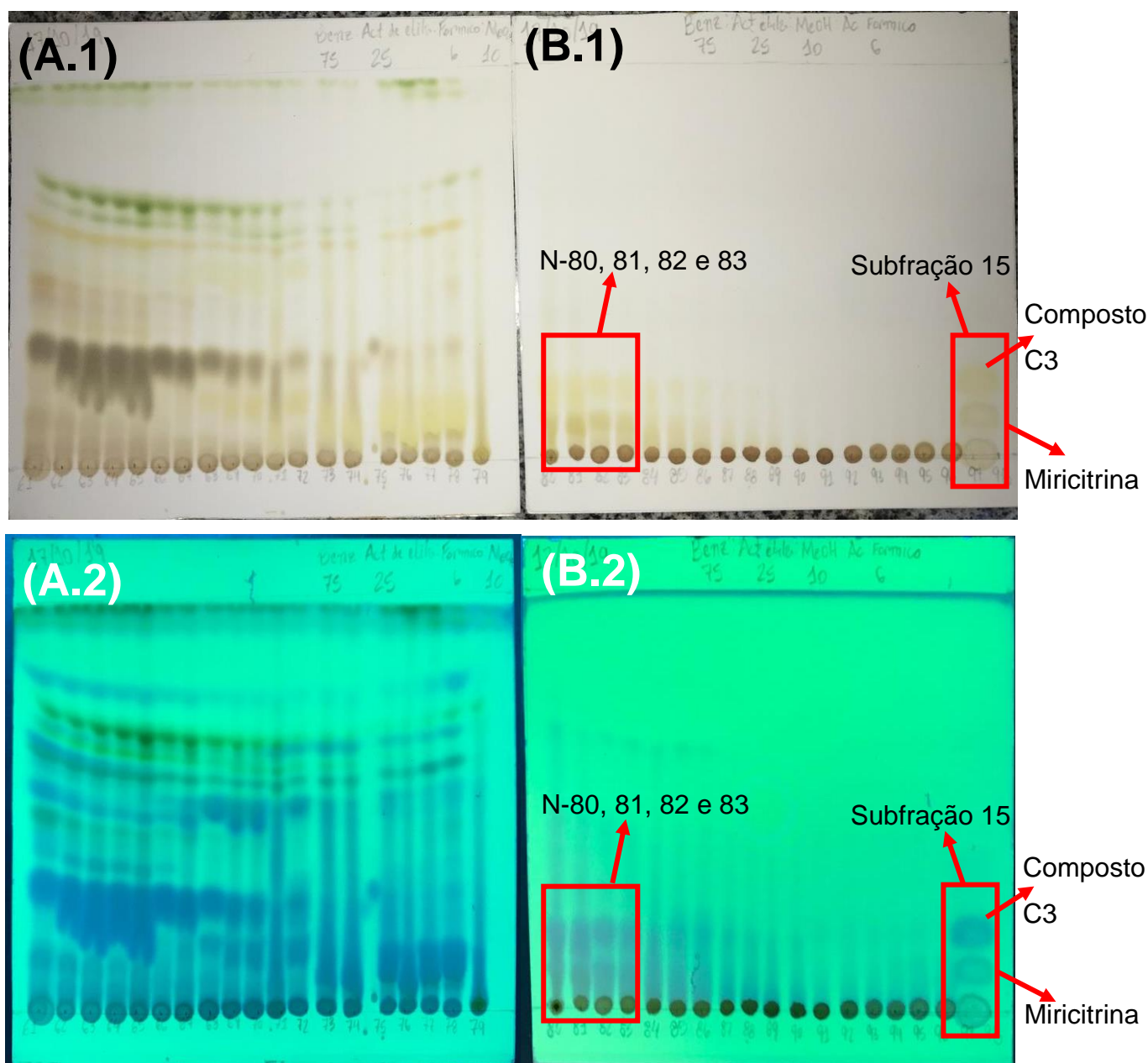
Fonte: Autoria própria.

Em seguida, as N-subfrações foram aplicadas em cromatografia em camada delgada analítica para verificar a possibilidade de agrupamento das N-subfrações semelhantes em R_f e coloração.

É possível verificar que nos primeiros pontos de aplicação (Figura 16A) os compostos não apresentaram bandas bem definidas, porém como a miricitrina e o composto C3 são mais polares, possuem maior tempo de retenção na coluna. Desta forma é possível identificar as N-80 a 83 que apresentam as bandas da miricitrina e do composto C3.

A subfração 15 foi utilizada para fins de comparação (aplicação 97). De forma comparativa, foi possível definir que as N-80 a N-83 apresentaram maior similaridade com a subfração 15 e por isso, foram agrupadas e, na sequência aplicadas na coluna por exclusão molecular para maior purificação.

Figura 16. Cromatografia em camada delgada analítica a partir das N-subfrações produzidas com luz visível, (A.1 e A.2) N-61 a N-79, e irradiadas com lâmpada de raio UV ($\lambda = 258 \text{ nm}$), (B.1 e B.2) N-80 a N-96.



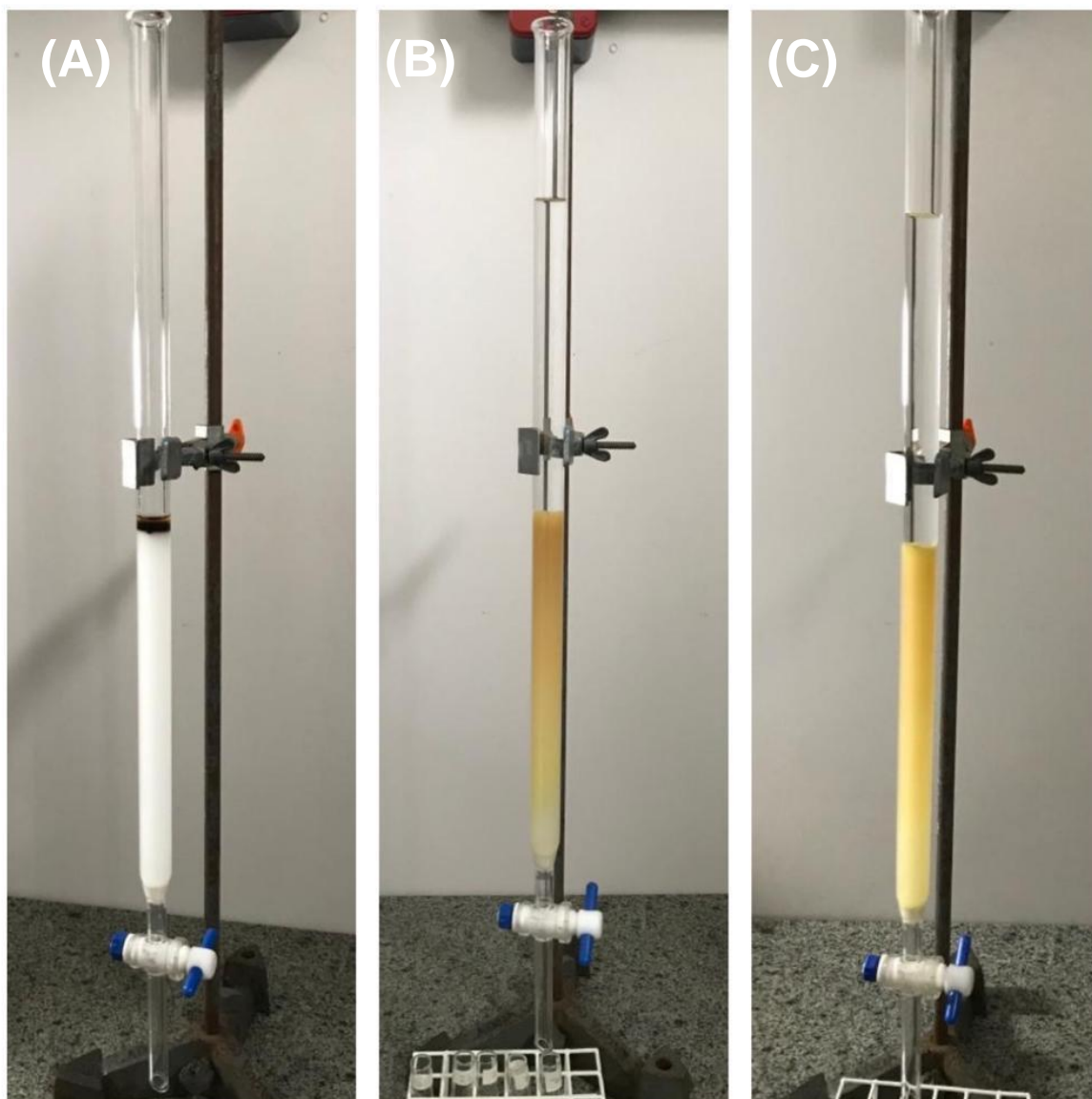
Fonte: Autoria própria.

5.1.3 Cromatografia por exclusão molecular

A cromatografia por exclusão molecular foi empregada com o objetivo de aumentar a purificação das frações N-80 a N-83 que apresentaram os compostos de interesse. Tal purificação pode garantir maior sucesso na última etapa de isolamento que será realizada na cromatografia em camada delgada preparativa.

As N-subfrações 80-83 foram agrupadas e aplicadas em coluna por exclusão molecular e permitiram a coleta de 250 EM-subfrações. Somente com a luz visível foi possível realizar o acompanhamento da eluição (Figura 17).

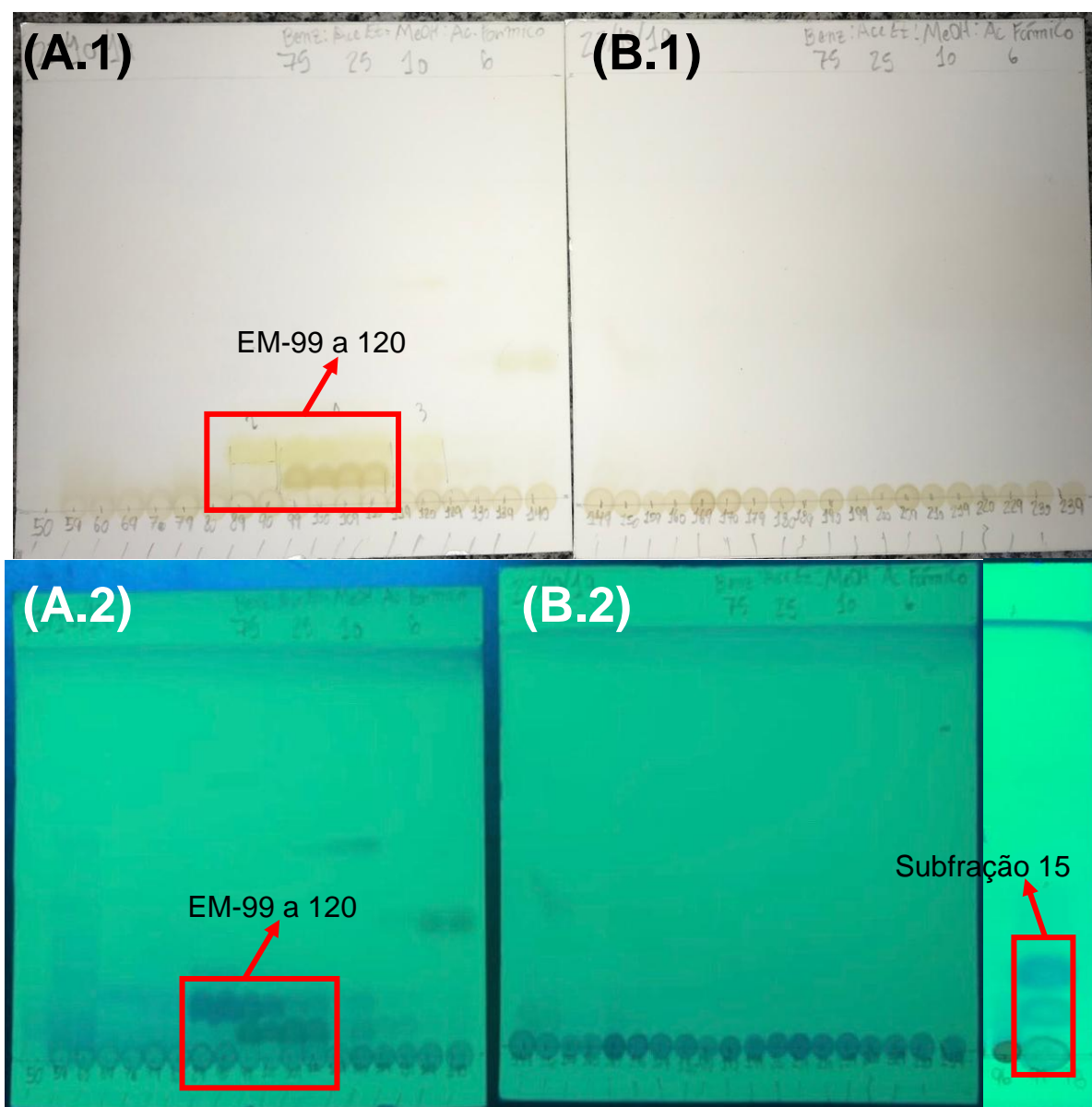
Figura 17. Coluna de purificação SEPHADEX-LH-20 no início (A), durante (B) e no final (C) da eluição.



Fonte: Autoria própria

Como houve a produção de uma quantidade expressiva de EM-subfrações, a aplicação das amostras na cromatografia em camada delgada analítica ocorreu a partir da EM-subfração 50 em intervalos de 9 e, como método de comparação, foi utilizada novamente a subfração 15 (PRASNIEWSKI, 2019) (Figura 18).

Figura 18. Cromatografia em camada delgada analítica a partir das EM-subfrações produzidas e comparadas com a subfração 15 irradiadas com lâmpada UV ($\lambda = 258$ nm). (A.1 e A.2) EM50-140 e (B.1 e B.2) EM149-239.

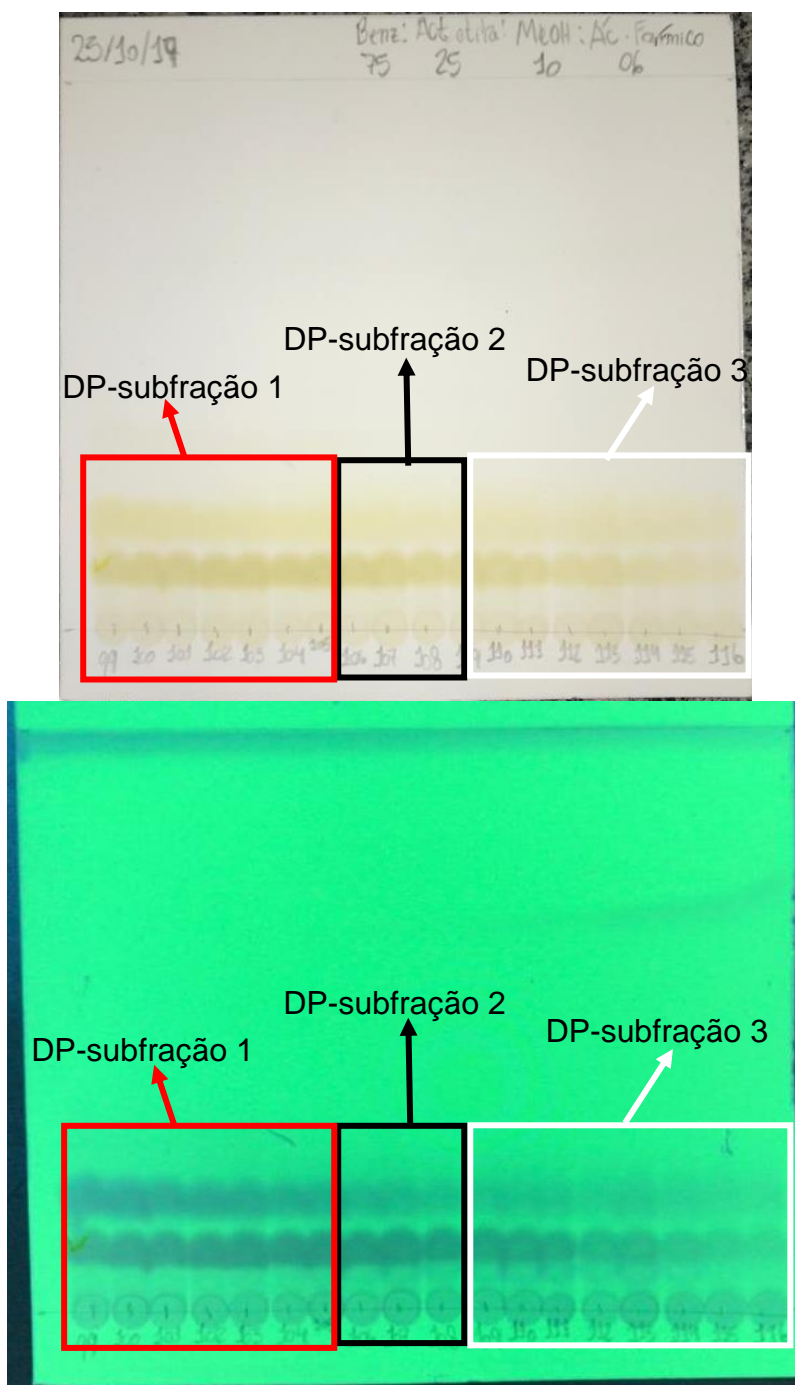


Fonte: Autoria própria

Após a aplicação em cromatografia analítica, pode-se observar que a partir da EM-99 até a 120 houve a revelação das bandas dos compostos de interesse

intensas. Com o objetivo de agrupamento e aumento do rendimento para posterior aplicação da CCD-PREP, as EM-subfrações de interesse foram aplicadas em uma nova placa de cromatografia em camada delgada analítica (Figura 19).

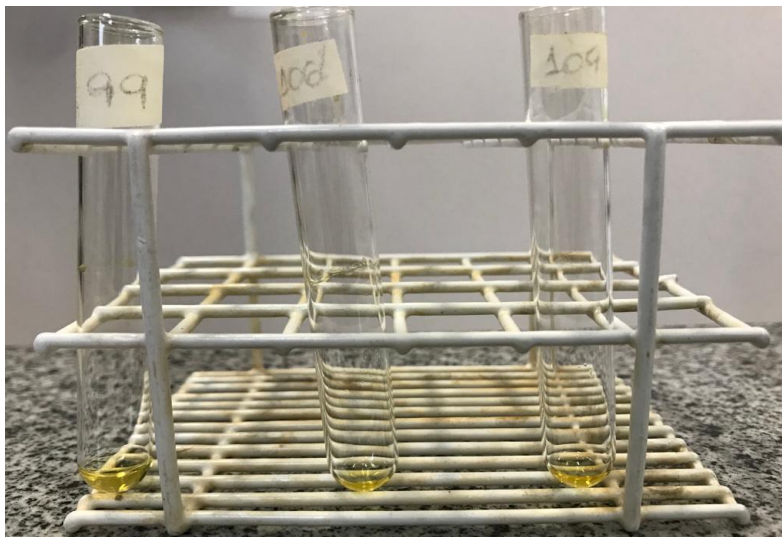
Figura 19. Cromatografia em camada delgada analítica realizada a partir das EM-subfrações selecionadas. (A) luz visível e (B) irradiada com lâmpada UV ($\lambda = 258$ nm).



Fonte: Autoria própria.

Após novo desenvolvimento cromatográfico, as EM-subfrações foram agrupadas em 3 novas subfrações (DP-subfrações) (Tabela 1 e Figura 19 e 20).

Figura 20. EM-subfrações após o agrupamento.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 1. Relação entre as EM-subfrações e as DP-subfrações

	DP-subfração 1	DP-subfração 2	DP-subfração 3
EM-subfração	99-105	106-108	109-115

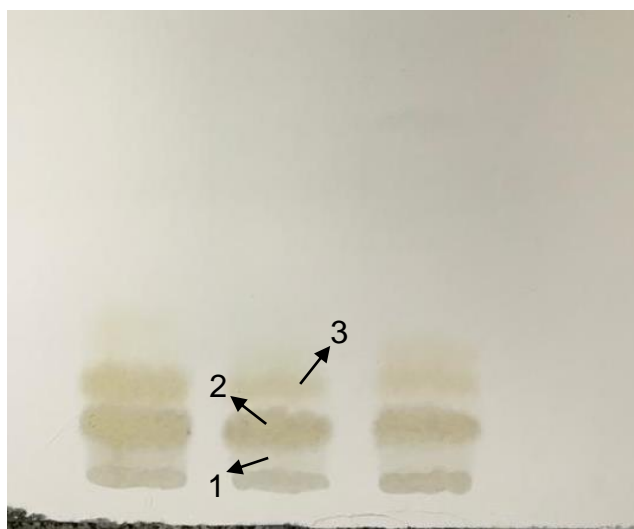
Fonte: Autoria própria.

5.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCD-PREP).

As 3 DP-subfrações resultantes foram aplicadas na placa de cromatografia em camada delgada preparativa (Figura 21). Após a eluição da placa foi possível observar a revelação, sob luz natural, de 3 compostos com coloração amarelada e distintas entre si.

As bandas foram coletadas conforme indicação na Figura 21 e nomeadas de compostos isolados 1, 2 e 3 respectivamente.

Figura 21. DP-subfrações aplicadas na CCD-PREP e eluídas.



Isolado 2	Miricitrina
Isolado 3	Composto C3

Fonte: Autoria própria.

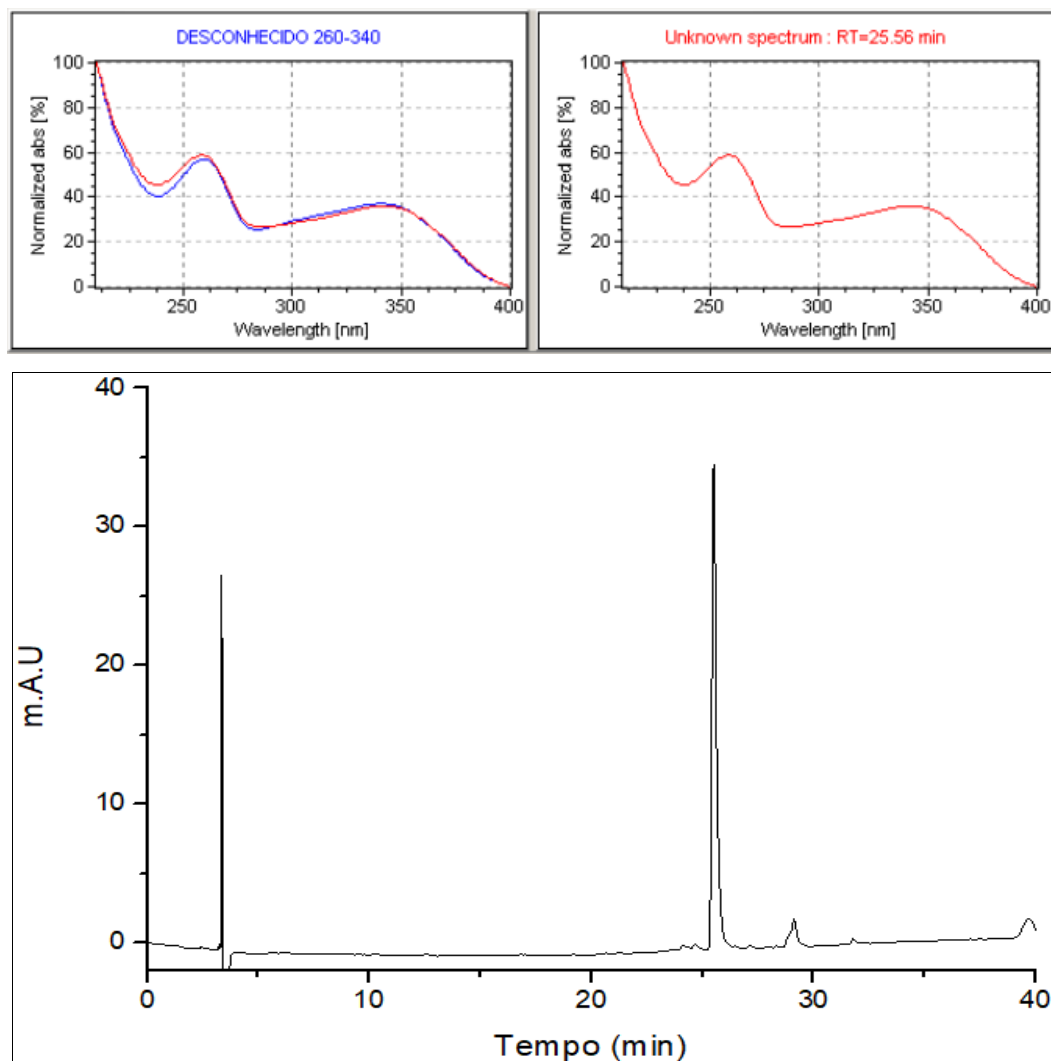
Segundo Wagner e Bladt, flavonoides glicosilados que são derivados da mesma aglicona apresentam valores de Rf ascendentes, seguindo a ordem de galactose > glucose > ramnose > apiose.

5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

Foi utilizada para identificar os compostos isolados pela cromatografia em camada delgada preparativa e avaliar o grau de pureza. Para o isolado 3 (Figura 22), o sinal com tempo de retenção de 25,56 minutos e absorbância em 260 e 340 nm, indica possível identidade de flavonoides pois, tal classe apresenta dois máximos de absorção, em 240-285 nm (Banda II) relacionado ao anel A e outro entre 300-400 nm (Banda II) podendo ser relacionado ao anel B, (SIMÕES *et al*, 2017). Prasniewski, 2019, também isolou tal compost e a fórmula estrutural está sendo analisada pelos ensaios de espectroscopia de RMN de ^1H e ^{13}C .

Porém, os compostos isolados 1 e 2, não foram possíveis ser identificados pela CLAE por apresentarem baixa concentração.

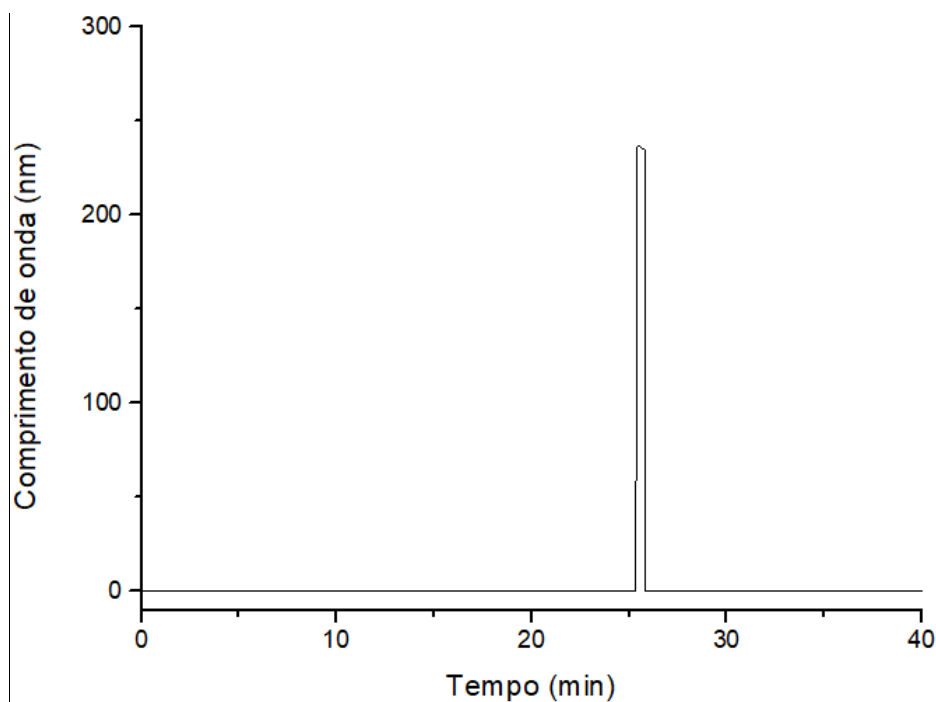
Figura 22. Cromatograma do composto 3 isolado da CCD-PREP e comparação com a biblioteca do software no canal PDA.



Fonte: Dados do software.

E foi avaliado o grau de pureza do composto analisado pelo canal PDA de pureza do composto (figura 23).

Figura 23. Cromatograma do composto isolado 3 pelo canal PDA de pureza.



Fonte: Dados do software

CONCLUSÕES

Apesar da coluna normal-flash possuir partículas de tamanhos menores fazendo com que, teoricamente, a eficiência e resolução da mesma seriam melhores, não foi possível isolar os compostos de interesse, pois as bandas ficaram sobrepostas e não tão nítidas como na coluna normal.

A eluição dos compostos em cromatografia analítica foi eficiente para determinar as bandas de interesse.

A SEPHADEX-LH-20 purificou de maneira eficiente as subfrações da cromatografia em coluna aberta do modo normal possibilitando a aplicação das subfrações na cromatografia em camada delgada preparativa.

O processo de isolamento e coleta dos compostos por meio de raspagem da cromatografia em camada delgada preparativa foi realizado com êxito.

A cromatografia líquida de alta eficiência foi de grande auxílio para a avaliação do grau de pureza dos compostos isolados com êxito.

REFERÊNCIAS

ANISAH, L. N.; SYAFII, W.; PARI, G.; SARI, R. K. Antidiabetic Activities and Identification of Chemical Compound from Samama (*Anthocephalusmacrophyllus* (Roxb) Havil). **Indonesian Journal of Chemistry**, Indonesia, p. 66-74, 2017.

ARUMUGAM, B.; MANAHARAN, T.; HENG, C. K.; KUPPSUAMY, U. R.; PALANISAMY, U. D. Antioxidant and antiglycemic potentials of a standardized extract of *Syzygium malaccense*. **LWT - Food Science and Technology**, Malaysia, p. 707-712, 2014.

BATISTA, A. G.; SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; BIASOTO, A. C. T.; SAWAYA, A. C. H. F.; PRADO, M. A.; JÚNIOR, M. R. M. Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in fruits and leaves. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], p. 284-291, 6 maio 2016.

BOLZANI, V. S. Biodiversidade, bioprospecção e inovação no Brasil. **Tendências**, [S. l.], p. 4-5, 2016.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos: -. **Ciência e cultura**, São Paulo, v. 55, n. 3, p. 37-39, 2003.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos da cromatografia**. Campinas, SP: Unicamp, 2006.

DE FRANÇA, I. S. X.; DE SOUZA, J. A.; BAPTISTA, R. S.; BRITTO, V. R. S. Medicina popular: Benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, Brasil, p. 201-208, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: A biosynthetic approach**. 2. ed. England: John Wiley & Sons, 2002. 515 p.

HALBERSTEIN, R. A. **Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns**. **Elsevier**, New York, p. 686-699, 2005.

HOLLER *et al.* **Princípios de análise instrumental**. Tradução Celio Pasquini. V.1, 6 ed., Porto Alegre: Bookman, 2009.

JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: Past history and future perspective. **Journal of Herbmed Pharmacology**, [S. l.], p. 1-7, 2018.

LIMA, R. D. **ESTUDO FITOQUÍMICO DE IPÊS AMAZÔNICOS (*Tabebuia incana* A. H. GENTRY E *Tabebuia serratifolia* (VAHL) G. NICHOLSON) E DEFINIÇÃO DE PERFIL CROMATOGRÁFICO DE AMOSTRA COMERCIAL**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica na linha de Produtos Naturais e Biomoléculas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

LÓPEZ *et al.* Anti-inflammatory and antihistaminic activity of triterpenoids isolated from *Bursera cuneata* (Schldl.) Engl. **Journal of Ethnopharmacology**, [S. l.], p. 1-30, 2019.

MACIEL, K. M. **ESTUDOS QUÍMICOS DE EXTRATOS BIOATIVOS DE PIQUIÁ (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers.)**. 2018. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica na linha de Produtos Naturais e Biomoléculas) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2018.

MAGNUSSON, E. W.; ISHIKAWA, N. K.; LIMA, A. P.; DIAS, D. V.; COSTA, F. M.; DE HOLANDA, A. S. S.; DOS SANTOS, G. G. A.; DE FREITAS, M. A.; RODRIGUES, D. J.; PEZZINI, F. F.; BARRETO, M. R.; BACCARO, F. B.; EMILIO, T.; VARGAS-ISLA, R. A linha de véu: a biodiversidade brasileira desconhecida. **Políticas do SNCTI sobre meio ambiente**, Brasília, DF, p. 45-60, 2016.

MELO, R. R.; ARAÚJO, E. R. S.; SILVA, A. A. L.; RANDAU, K. P.; XIMENES, E. C. P. A. Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & I. M. Perry. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.4, p.298-302, 2009.

NILE, S. H.; PARK, S. W. Edible berries: Review on bioactive components and their effect on human health. **Nutrition**, [S. l.], p. 1-11, 2013.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN J. R. **Introdução a espectroscopia**. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PIMENTEL, V.; VIEIRA, V.; MITIDIERI, T.; FRANÇA, F.; PIERONI, J. P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. **Revista do BNDES**, Brasil, p. 41-89, 2015.

PRASNIEWSKI, A. **Isolamento de compostos bioativos das folhas de jambo (Syzygium malaccense)**. 2019. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.

SAMPIETRO, D. A.; CATALAN, C. A. N.; VATTUONE, M. A. **Isolation, Identification and Characterization of Allelochemicals/Natural Products**. Enfield: Science Publishers, 2009.

SANTOS, L. C. A. M. S. **Antônio Moniz de Souza, o "Homem da Natureza Brasileira": ciência e plantas medicinais no início do século XIX***. História, ciências, saúde, Mangueiras, RJ, ano 2008, v. 15, n. 4, p. 1025-1038, nov. 2019.

SHAHIDI, F.; HO, C. **Phenolics in Food and Natural Health Products: An Overview**. [s.l.] ACS, 2005.

SILVA, L.; ONIKI, G. H.; AGRIPINO, D. G.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M.; MAYWORM, M. A. S.; LADEIRA, A. M. Bicyclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Brasil, p. 361-367, 2007.

SILVA, S. G.; NUNOMURA, C. S. Limonóides isolados dos frutos de *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae). **Química Nova**, Brasil, p. 1936-1939, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **FARMACOGNOSIA: Do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: 2017. v. 91

SLÁMOVÁ, K.; KAPEŠOVÁ, J.; VALENTOVÁ, K. "Sweet flavonoids": Glycosidase-Catalyzed Modifications. **Internation Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], p. 1-11, 2018.

SOBEH, M.; ESMAT, A.; PETRUK, G.; ABDELFATTAH, M. A. O.; DMIRIEH, M.; MONTI, D. M.; NAIM-ABDEL, A. B.; WINK, M. Phenolic compounds from *Syzygium jambos* (Myrtaceae) exhibit distinct antioxidant and hepatoprotective activities in vivo. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], p. 223-231, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 5ª Edição. Porto Alegre, RS: Artmed, 2013.

WAGNER H, B.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer Chromatography Atlas**. [s.l: s.n.].

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J. **Chromatographic Science series: High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis**. Boca Raton, FL: CRC Press, v. 102, 2011.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. **Thin Layer Chromatography in Phytochemistry**. V. 99. Boca Raton, FL: CRC Press, 2008.

WANG, T.; LI, Q.; BI, K. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. **Asian Journal of pharmaceutical**. China, p. 12-23, 2017.

WENZEL, G. E. **Radicais livres, antioxidantes nutraceuticos**. São Leopoldo, RS: EDITORA UNISINOS, 2013.