

## *Campus Realengo*

### Curso de Graduação em Farmácia

**NAYARA SALES RICARDO**

**Estudo da Seletividade de Sistemas de Solventes no  
Isolamento de Metabólitos Especiais do Extrato em  
Diclorometano de folhas de *Siparuna glycyarpa* por  
Cromatografia Contracorrente**

Rio de Janeiro

2023

NAYARA SALES RICARDO

**Estudo da Seletividade de Sistemas de Solventes no Isolamento de Metabólitos Especiais do Extrato em Diclorometano de folhas de *Siparuna glycyarpa* por Cromatografia Contracorrente**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Orientador(es):  
Prof Dr. Eduardo Rodrigues da Silva  
Profa Dra. Gilda Guimarães Leitão

Rio de Janeiro  
2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Elaborada por Bibliotecária

CIP - Catalogação na Publicação  
Bibliotecária: Alane Elias Souza – CRB-7/6321

R488e Ricardo, Nayara Sales  
Estudo da Seletividade de Sistemas de Solventes no  
Isolamento de Metabólitos Especiais do Extrato em  
Diclorometano de folhas de Siparuna glycyarpa por  
Cromatografia Contracorrente / Nayara Ricardo - Rio de Janeiro,  
2023.

50 f. : il.

Orientação: Eduardo Rodrigo da Silva.

Coorientação: Gilda Guimarães Leitão.

Trabalho de conclusão de curso (graduação), Bacharelado  
em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e  
Tecnologia do Rio de Janeiro, Campus Realengo, 2023.

1. Produtos Naturais. 2. Cromatografia Contracorrente. 3.  
Siparuna glycyarpa. 4. Siparunacea. I. Rodrigo da Silva,  
Eduardo. II. Guimarães Leitão, Gilda. III. Instituto Federal de  
Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro. IV. Título

CDU 615

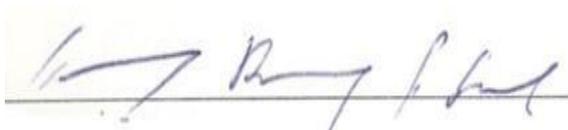
NAYARA SALES RICARDO

**Estudo da Seletividade de Sistemas de Solventes no Isolamento de Metabólitos Especiais do Extrato em Diclorometano de folhas de *Siparuna glycyarpa* por Cromatografia Contracorrente**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Federal do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Farmácia.

Aprovado em: 12/12/2023.

Banca Examinadora



---

Profº Drº Eduardo Rodrigues da Silva  
(Orientador – IFRJ / *Campus* Realengo)



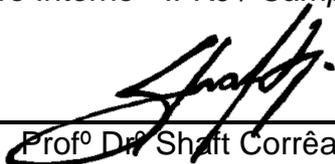
---

Profª Drª Gilda Guimarães Leitão  
(Orientadora – UFRJ / Instituto de Pesquisa em Produtos Naturais)



---

Profª Drª Meriane Pires Carvalho  
(Membro Interno - IFRJ / *Campus* Realengo)



---

Profº Drº Shaft Corrêa Pinto  
(Membro Externo - UFRJ / *Campus* Macaé)

Rio de Janeiro  
2023

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus.

À minha mãe, Andreia, por todo o seu apoio incondicional e incentivo nos estudos.

Ao meu irmão, Anderson Junior, por ter ajudado minha mãe a me criar e todo suporte durante a minha vida. Eu não teria entrado na faculdade sem você. Desejo que um dia eu possa retribuir.

A minha cunhada, Jocilene, por todo apoio durante o percurso até aqui, tenho um grande carinho por você.

Aos meus sobrinhos, Miguel e Lucas Gabriel, por serem crianças tão maravilhosas, espero um dia poder ajudá-los a ter as mesmas oportunidades que eu tive.

A minha família e a meu pai, Anderson, por todos os incentivos durante meus estudos.

Aos meus orientadores, professor Eduardo Rodrigues da Silva e professora Gilda Guimarães Leitão, por aceitarem a me ajudar durante o desenvolvimento desse trabalho e por todos os ensinamentos e conselhos.

Agradeço a todos funcionários e professores do *campus* Realengo - IFRJ, por serem acolhedores e solícitos durante a minha graduação.

Aos amigos e colegas que adquiri durante o curso de Farmácia e que tiveram contribuição durante a minha formação profissional.

A pós-doutoranda, Dra. Diégina Araújo Fernandes, por ser responsável por meu treinamento no laboratório e por compartilhar seus conhecimentos comigo durante a Iniciação Científica. Eu aprendi muito com a senhora.

Aos meus amigos do Laboratório Fitoquímica de Cromatografia Contracorrente, Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia da Faculdade de Farmácia da UFRJ, do Laboratório de Cromatografia Contracorrente, Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia (CA-DPNA) da UFRJ e da Central Analítica do IPPN, por me ajudarem durante a elaboração dessa pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) por ter financiado essa pesquisa e a minha bolsa de Iniciação Científica.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Folhas de *Siparuna glycyarpa*
- Figura 2 2',6'-dihidroxi-4'-O-metil-dihidrochalcona [M-H<sup>-</sup> 271 m/z]
- Figura 3 2',6'-dihidroxi-4,4'-di-O-metil-dihidrochalcona [M-H<sup>-</sup> 301 m/z]
- Figura 4 Estrutura básica dos flavonoides
- Figura 5 Estrutura básica das chalconas
- Figura 6 Fracionamento do extrato de folhas de *Siparuna glycyarpa*
- Figura 7 Perfil cromatográfico do extrato bruto em diclorometano das folhas de *Siparuna glycyarpa* (SGD) por UHPLC/DAD em comprimento de onda de 280nm e curvas absorção no U.V dos sinais em Tr = 35.908, 35.323, 34.949 min
- Figura 8 Perfil cromatográfico do extrato em diclorometano de folhas de *S. glycyarpa* (SGD) por U.V em comprimento de onda de 280nm
- Figura 9 Placa de cromatografia em camada delgada (CCDA) visualizadas em luz U.V de 254nm referente ao teste de sistema de solventes HEMWat
- Figura 10 **A.** Funil de separação com a pré-purificação do extrato bruto de SGD. **B.** CCDA com aplicação das SGDS e SGDI
- Figura 11 Frações do fracionamento 1 em cromatografia contracorrente do extrato SGD aplicas em CCDA e reveladas com NP-PEG
- Figura 12 Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400MHz) em MeOD das frações 37-40 do fracionamento 1
- Figura 13 Frações selecionadas do fracionamento 2 do extrato SGD aplicadas em CCDA e reveladas com NP-PEG e visualizadas através de U.V em 365nm
- Figura 14 Espectro de CLAE-EM/EM da fração 38 do fracionamento 2 com a presença das duas substâncias majoritárias presentes no extrato SGD
- Figura 15 Frações selecionadas do fracionamento 5 do extrato SGD aplicas em CCDA e reveladas com NP-PEG e visualizadas através de U.V em 365nm
- Figura 16 **A.** Fracionamento 6 do extrato SGD aplicas em CCDA e visualizadas através de U.V em 254nm. **B.** CCDA revelada com

NP-PEG e visualizadas através de U.V em comprimento de onda de 365nm.

- Figura 17 Espectro de CLAE-EM/EM da fração 33-40 do fracionamento 6 em modo negativo
- Figura 18 Espectro de CLAE-EM/EM da fração 57-69 do fracionamento 6 em modo negativo
- Figura 19 Fracionamento do extrato SGD aplicas em CCDA e reveladas com NP-PEG e visualizadas através de U.V em comprimento de onda 365nm
- Figura 20 CCDA com frações reunidas da filtração em gel por Sephadex LH-20 da fração 33-40 do CCC6
- Figura 21 CCDA com frações reunidas da filtração em gel por Sephadex LH-20 da fração 57-69 do CCC6

**LISTA DE TABELAS**

- Tabela 1 Condições cromatográficas dos fracionamentos isocráticos do extrato em diclorometano de folhas de *S. glycyarpa* (SGD) por cromatografia contracorrente (CCC1-CCC7)
- Tabela 2 Adaptação da tabela de proporções de sistemas de solventes HEMWat
- Tabela 3 Comparação dos sinais dos espectros de RMN <sup>1</sup>H em MeOD da fração 33-40 do fracionamento 1 de SGD com a chalcona 2',6'-dihidroxi-4,4'-di-O-metil-dihidrochalcona

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AcOEt	Acetato de Etila
CCC	Cromatografia contracorrente
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada
CH <sub>3</sub> Cl	Clorofórmio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CLAE/DAD	Cromatografia Líquida em Alta Eficiência acoplado a diodos
CLAE/DAD/EM	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a diodos e massas
FE	Fase Estacionária
FI	Fase Inferior
FM	Fase Móvel
FS	Fase Superior
Hex	Hexano
HEMWat	hexano-acetato de etila-metanol-água
IMPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<i>K</i>	Coeficiente de partição
MeOH	Metanol
NP-NEP	Difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SGD	Extrato diclorometano de <i>Siparuna glycyarpa</i>
SGDI	Fase inferior da pré-purificação do extrato bruto em diclorometano das folhas de <i>Siparuna glycyarpa</i>
SGDS	Fase superior da pré-purificação do extrato bruto em diclorometano das folhas de <i>Siparuna glycyarpa</i>
SS	Sistema de Solventes
Tr	Tempo de retenção
TSS	Teste de Sistema de Solventes

RICARDO, Nayara Sales. Estudo da Seletividade de Sistemas de Solventes no Isolamento de Metabólitos Especiais do Extrato em Diclorometano de folhas de *Siparuna glycyarpa* por Cromatografia Contracorrente. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), *Campus Realengo*, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

## RESUMO

*Siparuna glycyarpa*, uma planta amazônica, pertence à família Siparunaceae. Espécies de *Siparuna* são utilizadas na medicina popular brasileira no tratamento e profilaxia de resfriados e dores reumáticas. Estudos recentes mostram atividades antivirais em vários extratos de *Siparuna sp.*, sendo o extrato em diclorometano de folhas de *Siparuna glycyarpa* (SGD) o mais ativo na inibição da replicação *in vitro* do vírus influenza A (H1N1)pdm09 despertando o interesse no isolamento de metabólitos secundários desta espécie. Dentre as técnicas analíticas empregadas em processos de isolamento de produtos naturais destaca-se a cromatografia contracorrente (CCC), uma técnica de separação por meio de partição da amostra em um sistema líquido-líquido, sem envolver um suporte sólido. A escolha de sistema de solvente (SS) e do modo de operação do equipamento (eluição isocrática x gradiente, normal ou reversa) são fundamentais para o sucesso da separação por essa técnica, sendo sua escolha a parte mais crítica no desenvolvimento analítico. Assim, a seletividade do sistema de solventes hexano-acetato de etila-metanol-água foi avaliada para o isolamento das substâncias presentes no extrato em diclorometano de folhas de *S. glycyarpa* por CCC. Outras técnicas cromatográficas também foram utilizadas nas purificações e análise dos compostos isolados tais como a Cromatografia em Camada Delgada (CCDA) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrofotometria de Massas (CLAE-EM/EM). A identificação estrutural das substâncias isoladas foi feita por ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ) uni- e bidimensionais evidenciando sinais característicos de dihidrochalconas.

**Descritor:** Siparunaceae. *Siparuna glycyarpa*. Cromatografia contracorrente. Seletividade de Solvente. Atividades antivirais.

RICARDO, Nayara Sales. Estudo da Seletividade de Sistemas de Solventes no Isolamento de Metabólitos Especiais do Extrato em Diclorometano de folhas de *Siparuna glycyarpa* por Cromatografia Contracorrente. 50f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Farmácia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (IFRJ), Campus Realengo, Rio de Janeiro, RJ, 2023.

### ABSTRACT

*Siparuna glycyarpa*, an Amazonian plant, belongs to the Siparunaceae family. *Siparuna* species are used in Brazilian folk medicine in the treatment and prophylaxis of colds and rheumatic pain. Recent studies show antiviral activities in several extracts of *Siparuna* sp., with the dichloromethane extract of *Siparuna glycyarpa* (SGD) leaves being the most active in the inhibition of *in vitro* replication of the influenza A (H1N1)pdm09 virus, arousing interest in the isolation of secondary metabolites of this species. Among the analytical techniques used in natural product isolation processes, countercurrent chromatography (CCC) stands out, a separation technique through partition of the sample in a liquid-liquid system, without involving a solid support. The choice of solvent system (SS) and equipment operating mode (isocratic x gradient, normal or reverse elution) are crucial for the success of the separation when using this technique, its choice being the most critical part of analytical development. Thus, the selectivity of the hexane-ethyl acetate-methanol-water solvent system was evaluated for the isolation of substances present in the dichloromethane extract of *S. glycyarpa* leaves by CCC. Other chromatographic techniques were also used in the purification and analysis of isolated compounds, such as Thin Layer Chromatography (TLC) and High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrophotometry (HPLC-MS/MS). The structural identification of the isolated substances was carried out by one- and two-dimensional hydrogen and carbon nuclear magnetic resonance ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR) showing characteristic signals for dihydrochalcones.

**Key words:** Siparunaceae. *Siparuna glycyarpa*. Cromatografia contracorrente. Seletividade de Solvente. Atividades antivirais.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.2 OBJETIVO</b> .....	18
1.2.1 Objetivo Geral .....	18
1.2.2 Objetivo Específico.....	18
<b>2. DESENVOLVIMENTO</b> .....	19
<b>2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	19
2.1.1 Potencial antiviral do gênero <i>Siparuna</i> .....	19
2.1.2 Metabólicos Especiais .....	19
2.1.3 Cromatografia contracorrente.....	21
2.1.4 Solubilidade de substância/amostras .....	23
2.1.5 Critérios para a escolha do sistema de solventes .....	23
<b>2.2 METODOLOGIA</b> .....	25
2.2.1 Coleta das espécies de <i>Siparuna sp.</i> e preparação dos extratos.....	25
2.2.2 Teste de Sistema de Solventes para fracionamento por Cromatografia Contracorrente .....	26
2.2.3 Pré-purificação do extrato em diclorometano das folhas de <i>S.glycyarpa</i> .....	26
2.2.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de fotodiodos (CLAE/DAD) .....	27
2.2.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de fotodiodos e massas (CLAE/DAD/EM) .....	28
2.2.6 Fracionamento de SGD por Cromatografia Contracorrente .....	29
2.2.7 Cromatografia em Camada Delgada e visualização por revelador NP-PEG .....	31
2.2.8 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C.....	31
2.2.9 Purificação das frações 33-40 e 57-69 do fracionamento 6 por filtração em gel de Sephadex LH-20 .....	31
<b>2.3 RESULTADOS E DISCURSÃO</b> .....	32
2.3.1 Perfil de SGD por CLAE/DAD.....	32
2.3.2 Escolha de sistema de solvente para o fracionamento de SGD através de testes de partição em tubos de ensaio .....	33

2.3.3 Pré-purificação do extrato em diclorometano das folhas de <i>Siparuna glycyarpa</i> .....	35
2.3.4 Fracionamento por Cromatografia Contracorrente .....	36
2.3.5 Filtração em gel Sephadex LH-20 .....	44
2.3.6 Determinação estrutural das substâncias isoladas por RMN <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C .....	45
<b>3 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	46
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	47

## 1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são amplamente usados mundialmente para fins terapêuticos. Os conhecimentos adquiridos dessas plantas perante as primeiras civilizações humanas foram passados de geração em geração durante décadas. Entretanto, a utilização desenfreada dessas plantas potencialmente descritas como medicinais, pode ser nociva para a saúde humano, tendo em vista que diversas plantas possuem o mesmo nome popular (o que pode ocasionar erro na utilização por parte da população) ou na forma de manuseio inadequado da espécie vegetal (ARGENTA *et al*, 2011).

As espécies da família Siparunaceae são encontradas principalmente na região Amazônica do Brasil, sendo utilizadas na Medicina Popular Brasileira para o tratamento e profilaxia de febres, resfriados, dores reumáticas, cefaléia e reumatismo (LEITÃO, 2000). *Siparuna* são conhecidas popularmente no Brasil com “limão-bravo” e “negramina” (RENNER e HAUSNER, 2005). Alcaloides, ácidos fenólicos, chalconas, flavonóides livres e glicosilados estão entre os metabólitos secundários descritos na literatura para as espécies desse gênero (COSTA, 2013; LEAL *et al*, 2022).

*Siparuna apiosyce* (*S. brasiliensis*) é citada na primeira Farmacopeia Brasileira de Rodolpho Albino (1926), tendo sido comercializado no passado na forma de pastilhas e xarope para tosse (LEITÃO *et al*, 1999). Entretanto a falta de comprovação científica dessa espécie fez com que sua monografia fosse retirada de edições seguintes da Farmacopeia Brasileira. No uso tradicional algumas descrições mostram que plantas da família Siparunaceae foram utilizadas por curandeiros para o tratamento de picadas de cobras e pequenas feridas, além do uso de *Siparuna schimpffii* no preparo de chá para a fadiga (RENNER e HAUSNER, 2005; LEAL, 2022).

Nos últimos anos, estudos recentes referentes à família Siparunaceae demonstraram a inibição da replicação *in vitro* do vírus influenza A (H1N1)pdm09 por vários extratos de *S. glycyarpa*, sendo as frações mais ativas com a presença de flavonoides glicosilados e de alcaloides benzilisoquinolínicos e aporfínicos (LEAL *et al*, 2022). Dada a boa atividade dos extratos de *Siparuna* frente ao vírus influenza, somada aos poucos estudos com esses extratos, o uso da técnica de cromatografia contracorrente foi fundamental para o rápido isolamento de metabólitos secundários presentes no extrato em diclorometano de *Siparuna glycyarpa* (SGD) na busca e descoberta de novos fármacos potenciais para o tratamento de enfermidades virais.

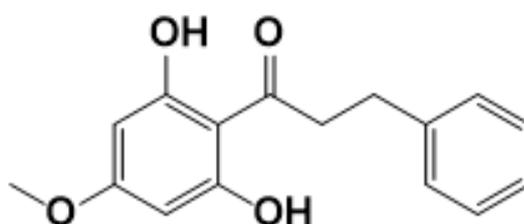
*Siparuna glycyarpa* (Ducke) é uma espécie nativa do Brasil sendo distribuídas na América Central e América do Sul, tendo sua maior ocorrência na Mata Atlântica e na Amazônia. A espécie se apresenta como uma árvore monóica de 8-30 cm, com pecíolo aplanado na face adaxial e folhas em crescimento opostas (**FIGURA 1**).



**FIGURA 1:** Folhas de *Siparuna glycyarpa*.

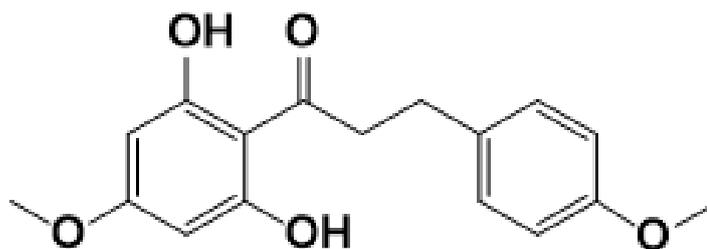
Disponível em: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77075392-1>

O perfil cromatográfico do extrato em diclorometano das folhas de SGD por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a Espectrofotometria de Massas (CLAE-EM/EM) evidenciou a presença de chalconas isoladas e/ou anotadas anteriormente nessa espécie (LEAL, 2022). Os dados de espectrometria de massas ratificaram a presença dessa classe, evidenciada através de fragmentações características da 2',6'-dihidroxi-4'-O-metil-dihidrochalcona [M-H<sup>-</sup> 271 m/z] (**FIGURA 2**) e da 2',6'-dihidroxi-4,4'-di-O-metil-dihidrochalcona [M-H<sup>-</sup> 301 m/z] (**FIGURA 3**) (COSTA, 2013; LEAL, 2022).



**FIGURA 2:** 2',6'-dihidroxi-4'-O-metil-dihidrochalcona [M-H<sup>-</sup> 271 m/z].

Fonte: LEAL *et al*, 2022.



**FIGURA 3:** 2',6'- dihidroxi-4,4'-di-O-metil-dihidrochalcona [M-H<sup>-</sup> 301 m/z].

Fonte: LEAL *et al*, 2022.

O uso de extratos brutos nem sempre é indicado para fins terapêuticos e para tal são empregadas técnicas que possibilitem a separação e o isolamento dos metabólitos secundários, como as diversas técnicas de cromatografia. A fundamentação de técnicas cromatográfica consiste na separação de substâncias através da afinidade que a amostra tem por cada fase, sendo uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM). Nos métodos cromatográficos tradicionais são utilizados suportes sólidos como FE, isso pode acarretar adsorção da amostra ou alteração na estrutura química. A cromatografia contracorrente por utilizar sistema bifásico líquido, permite a injeção de amostras em sua forma bruta, sem perda por adsorção.

A cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica de partição líquido-líquido, na qual a fase estacionária líquida é retida no equipamento sem a utilização de suporte sólido (CONWAY, 1990; BERTHOD, 1991). A escolha de sistemas de solventes para o CCC e o modo de preparo da amostra a ser injetada são etapas essenciais e de suma importância para o bom desempenho da técnica de isolamento e purificação de substâncias. Dentre as principais vantagens desse método está o fácil escalonamento, alta reprodutibilidade da técnica, recuperação total da amostra, ademais pode ser considerado um método verde de isolamento, já que, durante a técnica pouca quantidade de solvente é consumida durante o isolamento em comparação a outras técnicas clássicas (LEITÃO, 2000; COSTA, 2013).

Nesse sentido, o nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Fitoquímica e Cromatografia Contracorrente (LabFitoCCC) vem desenvolvendo estudos sobre a seletividade de sistemas de solventes (SS) para o isolamento de metabólitos secundários do extrato em diclorometano das folhas de *S. glycyarpa* por cromatografia contracorrente visando isolar e identificar as substâncias com potenciais atividades biológicas do extrato, contribuindo para o estudo da escolha de

sistemas de solventes em CCC e ressaltar as vantagens no isolamento de produtos naturais.

O isolamento de substâncias por CCC pode ser realizado com diferentes sistemas de solventes bifásicos, logo as misturas imiscíveis de solvente apolares e polares desempenham papel importante para o fracionamento dos metabólicos. A escolha do sistema de solvente (SS) é importante para a realização da técnica, sendo a parte mais crítica. A presente pesquisa utilizou a família de SS hexano-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O (HEMWat) para o fracionamento do extrato em diclorometano de folhas de *S. glycyarpa* por CCC por ser descrito no isolamento de substâncias de média a alta polaridade (FOUCALT, 1998; CARNEIRO, 2021).

Considerando-se que o preparo de amostra em processos cromatográficos é uma etapa importante e determinante no resultado de uma separação e que, em CCC a amostra a ser injetada deve ser dissolvida em ambas as fases do sistema bifásico respeitando-se as proporções de cada solvente no sistema utilizado, nosso estudo avaliou possíveis efeitos na separação das substâncias do extrato SGD por CCC quando o preparo de amostra favorece uma maior proporção de um dos solventes do sistema bifásico em prol da melhora da solubilidade da amostra.

## 1.2 OBJETIVO

### 1.2.1 Objetivo Geral

Estudar a seletividade do sistema de solventes hexano-acetato de etila-metanol-água no isolamento de metabólitos especiais bioativos do extrato em diclorometano de folhas de *Siparuna glycyarpa*.

### 1.2.2 Objetivo Específico

- Avaliar o perfil cromatográfico de SGD por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de UV/DAD;
- Analisar o extrato SGD por CLAE/DAD/EM;
- Realizar testes de sistemas de solventes através do teste de partição em tubo de ensaio visando encontrar o melhor sistema para o isolamento dos metabólitos bioativos de SGD;
- Realizar o fracionamento de SGD por CCC com o sistema de solventes adequado, escolhido através do teste de partição em tubo de ensaio;
- Realizar a purificação final das substâncias utilizando outras técnicas cromatográficas como a cromatografia de permeação em gel usando Sephadex LH-20;
- Identificar os metabólitos secundários isolados de SGD por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ ;

## 2. DESENVOLVIMENTO

### 2.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 2.1.1 Potencial antiviral do gênero *Siparuna*

*Siparuna* pertence à família Siparunaceae, composta por 75 espécies de apenas dois gêneros: um originário da África (*Glossocalyx*) e o outro da América (*Siparuna*) (RENNER e HAUSNER, 2005; COSTA *et al*, 2013). Na medicina popular brasileira, as espécies de *Siparuna* são conhecidas como “limão-bravo” e “negramia”, sendo frequentemente usados para preparar infusões ou chás medicinais para profilaxia e tratamentos de resfriados e doenças respiratórias (LEITÃO, 2000).

Na década 1990, um laboratório farmacêutico comercializou no Brasil na forma de xarope e pastilhas contendo extrato de *S. brasiliensis* para o tratamento da tosse, sendo essa espécie incluída na primeira Farmacopeia Brasileira (LEITÃO *et al*, 2000) e listada na formulação de produtos no Dicionário do Especialidades Farmacêuticas (DEF) (COSTA, 2013).

Nos estudos apresentados por Leal, C e Leitão, G (2021), os extratos de cinco espécies de *Siparuna* (*S. cristata*, *S. decipiens*, *S. glycyarpa*, *S. reginae* e *S. sarmentosa*) foram testados *in vitro* contra o vírus da influenza A (H1N1)pdm09. Tais extratos brutos foram obtidos a partir de maceração com os solventes etanol, acetato de etila, diclorometano, hexano ou butanol para cada uma das espécies. Como resultado, dos 25 extratos de *Siparuna* utilizados para as análises de atividades contra a influenza, o extrato em diclorometano de *Siparuna glycyarpa* foi o que apresentou a maior inibição da replicação viral *in vitro* (acima de 74%) na concentração de 100 µg.mL<sup>-1</sup> após 24 hpi (LEAL, 2022).

A atividade inibitória contra o vírus da influenza através de extratos de *Siparuna* possibilitou o fracionamento destes para o isolamento de metabólitos secundários que já foram descritos na literatura clássica. Alcaloides, flavonoide (livres e glicosilados) e chalconas estão entre os metabólicos descritos nessa espécie (LEAL *et al*, 2021).

#### 2.1.2 Metabólitos Especiais

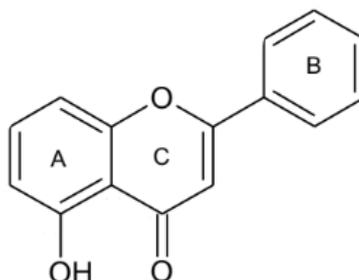
Metabólitos especiais podem ser classificados em metabolismo primário e secundário. Ao contrário dos metabólitos primários, que são essenciais para a sobrevivência e desenvolvimento da planta (AGATI, 2012), o metabolismo secundário

produz compostos que geralmente não são usados para funções básicas de sobrevivência, como crescimento celular ou produção de energia. Entretanto, os metabólitos secundários desempenham papéis importantes em interações das plantas com o ambiente, como defesa contra predadores, atrativos para polinizadores e regulação do crescimento (RASKIN *et al.*, 2002; BORGES e AMORIM, 2020).

Os metabólitos secundários têm sido objeto de pesquisa em diversas áreas devido a diversidade de produtos naturais existentes e potencial relevância para a descoberta de novos fármacos. Existe uma ampla variedade de classes de compostos secundários, como alcaloides, flavonoides, terpenos, saponinas, taninos, entre outros.

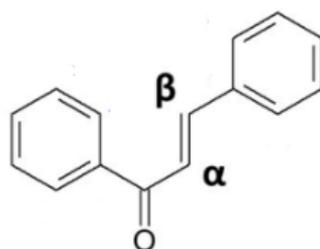
Os flavonoides são compostos fenólicos, caracterizados pela presença de anéis aromáticos hidroxilados e estão entre os compostos mais distribuídos abundantemente na natureza. Na literatura, os flavonoides são apresentados por desempenhar diversas atividades biológicas, como por exemplo, agentes anti-inflamatórios, antioxidantes e supressores de UV (PARAILLOUX *et al.*, 2023). Derivados de flavonoides são relatados em diversos produtos naturais por suas atividades antivirais (DÖMLING *et al.*, 2020) e já foram descritos na literatura como metabólitos secundários da *Siparuna* (LEAL, 2022).

Flavonoides e suas subclasses, como as chalconas, são provenientes de vias mistas de biossíntese: via do chiquimato e via do acetato, e apresentam como estrutura básica um núcleo fundamental formado por 15 carbonos e agrupados em dois anéis aromáticos (C6-C3-C6), sendo dois anéis benzênicos (A e B) conectados por uma cadeia de três carbonos (anel C) (**FIGURA 4**). As chalconas apresentam cadeia aberta com dois anéis aromáticos unidos por três carbonos com um sistema carboxílico  $\alpha$ - $\beta$  insaturado (**FIGURA 5**). Seguro Park (2015), as chalconas são precursores de diversos produtos naturais inclusive de flavonoides e possuem ampla utilização e atividades biológicas, também sendo descritas como potenciais antioxidantes, podendo ser isoladas de extratos por metodologia separativa, como a cromatografia.



**FIGURA 4:** Estrutura básica dos flavonoides.

**Fonte:** PARAILLOUX, 2023.



**FIGURA 5:** Estrutura básica das chalconas.

**Fonte:** PARAILLOUX, 2023.

### 2.1.3 Cromatografia contracorrente

A cromatografia é um método de separação de analitos com o objetivo de separar substâncias, cuja fundamentação é a utilização de uma fase estacionária (FE) e uma fase móvel (FM). Esse método é amplamente utilizado no isolamento e purificação de produtos naturais, pois o custo-benefício possibilita o isolamento e identificação de metabólitos secundários de plantas e seus derivados que podem ter atividades biológicas e, assim, contribuir para o descobrimento de novos fármacos ou para preservação do meio ambiente e a saúde (LEITÃO, 1999).

Cromatografia contracorrente (CCC) é uma técnica de cromatografia de partição líquido-líquido, no qual a FE fica retida dentro da coluna sem a utilização de suporte sólido (CONWAY, 1990; BERTHOD, 1991), evitando a adsorção irreversível de amostras. A separação dos compostos é definida através da afinidade do analito pela FE ou FM, que após o equilíbrio da amostra entre as duas fases, pode-se obter o coeficiente de partição ( $K$ ), razão de concentração de uma substância entre as duas fases líquidas imiscíveis. Desde seu surgimento na década de 1970, a CCC vem sendo aprimorada visando melhorar a eficiência e resolução das separações (COSTA, 2013).

Uma das vantagens da CCC frente às técnicas cromatográficas clássicas (como a cromatografia em coluna ou a cromatografia líquida de alta eficiência) é a possibilidade de injetar amostras brutas sem prévia purificação. Outra vantagem está no sistema de solvente utilizado, já que a CCC não utiliza grandes quantidades de solventes para o isolamento de substâncias e com um mesmo sistema de solventes (SS) é capaz de abranger uma ampla faixa de polaridade apenas mudando as proporções do SS (COSTA, 2013; BÜTTENBENDER *et al*, 2018).

- **Equipamentos de CCC**

Os primeiros equipamentos de cromatografia contracorrente desenvolvidos para a separação de analitos de uma amostra possuem como princípio a diferença de densidade através da força gravitacional, como exemplo o CCC de rotação locular e o CCC de gotículas. Atualmente, os equipamentos de CCC usam a força centrífuga para retenção da fase estacionária dentro da coluna, assim possibilitando maior fluxo de fase móvel, sem perder a resolução da análise (MARSTON e HOSTETTMANN, 1994).

Existem dois tipos de sistemas: hidrodinâmico e hidrostático. No sistema com equilíbrio hidrodinâmico dois eixos de rotação são utilizados no qual o eixo periférico vai girar em torno do eixo central, mimetizando o sistema planetário. Esse movimento faz que haja variação da força centrífuga ao longo da coluna. Já no sistema com equilíbrio hidrostático a coluna gira ao longo de apenas um eixo de rotação, e o campo de força centrífuga é geralmente constante. A FE retida na coluna é alocada em vários canais presentes na coluna conectados por dutos e a FM é dispersa através desses canais.

- **Modo Isocrático X Modo Gradiente**

A eluição da fase móvel em cromatografia pode ser executada de duas formas: no modo isocrático e no modo gradiente. Na CCC, entretanto, frente ao modo isocrático (onde a polaridade da fase móvel se mantém constante durante toda a corrida) o modo gradiente é mais difícil para equilibrar as fases, tendo em vista que a polaridade da fase móvel é variável, o que acarreta mudanças também na fase estacionária (COSTA *et al*, 2013). Entretanto, este último é tão eficiente quanto o

modo isocrático e deve ser levado em consideração no isolamento de misturas de substâncias com média e alta polaridade.

Na literatura, alguns trabalhos relatam a purificação de flavonoides e seus derivados por coluna de permeação em gel utilizando Sephadex LH-20 após fracionamento por CCC, assim aumentando seu poder de resolução (HOSTETTMANN *et al.*, 1986).

#### **2.1.4 Solubilidade de substância/amostras**

A solubilidade de amostras é um processo essencial para entender a variedade de fenômenos e propriedades químicas presentes na amostra. Assim, envolvendo desde as forças de atração intermoleculares (como de Van de Waals) até o fornecimento de energia necessário para quebrar ligações que constituem as moléculas do soluto (MARTIAS, 2013).

Extratos vegetais geralmente contêm uma mistura complexa de compostos orgânicos, a solubilidade desses extratos em solventes depende das características e interações químicas das substâncias envolvidas. A escolha do solvente adequado é crucial, pois diferentes compostos podem requerer solventes diferentes para dissolver-se adequadamente.

A polaridade e a estrutura molecular de uma substância orgânica são de suma importância para a compreensão das forças intermoleculares. Geralmente, moléculas com caráter polar ou com maiores cadeias carbônicas polares tendem a ter maior afinidade por compostos polares e se solubilizar com mais facilidade em seus semelhantes (BRONW, 2007; MARTIAS, 2013). As interações entre soluto e solvente devem ter ganho energético satisfatório para justificar o rompimento de ligações entre moléculas do soluto e favorecer a solubilização (VOGEL *et al*, 2022).

#### **2.1.5 Critérios para a escolha do sistema de solventes**

Escolher um sistema de solventes (SS) para a CCC é uma tarefa que exige tempo e dedicação. O SS deve ter afinidade com a amostra a ser injetada. Para assegurar a eficiência da técnica, os ensaios de solubilidade são de extrema importância, pois serão responsáveis pela verificação da polaridade relativa de substâncias orgânicas, identificação da classe funcional e, também, pela determinação dos solventes (ou mistura de solventes) (MATIAS, 2013).

Na literatura clássica, dados mostram que a dissolução da amostra deve respeitar as proporções de fase estacionária (F.E) e fase móvel (F.M) utilizadas durante um fracionamento por CCC, resultando na melhor qualidade da separação de metabólitos secundários e substâncias de interesse (COSTA, 2013). A utilização da CCC é extremamente vantajosa considerando o alto rendimento e elevadas taxas de pureza de substâncias isoladas (BÜTTENBENDER *et al*, 2018).

A escolha do sistema de solventes deve satisfazer algumas condições, dentre elas (ITO, 2005; MARSTON e HOSTETTMANN, 2006; COSTA, 2013):

- a. O SS deve ser composto por líquidos que formem duas fases imiscíveis;
- b. A amostra deve ser solúvel e estável no sistema;
- c. O tempo de separação das duas fases deve ser inferior a 30 s;
- d. O SS não deve formar emulsões;
- e. O coeficiente de partição das substâncias de interesse deve estar na faixa de  $0,5 < K < 2,0$ .

Para a escolha do SS existem diversos métodos, sendo os mais recomendáveis: busca na literatura por artigos que relatam o isolamento de substâncias similares por CCC fazendo otimização do sistema quando necessário; e busca sistemática utilizando tabelas de sistemas de solventes (FOCAULT & CHEVOLOT, 1998; COSTA, 2013).

Para o isolamento de substâncias derivadas de flavonoides, são frequentemente utilizadas diferentes proporções de solventes hexano-AcOEt-metanol-H<sub>2</sub>O (HEMWat), pois são capazes de abranger separação de substâncias em uma ampla faixa de polaridade, por combinações de solventes em proporções diferentes (COSTA *et al*, 2013; CARNEIRO, 2021).

O estudo fitoquímico e a purificação de flavonoides no extrato SGD levou a identificação de duas dihidrochalconas, uma delas isolada pela primeira vez no extrato em acetato de etila dessa planta (COSTA, 2013), e a segunda anotada por espectrometria de massas que identificou fragmentos característicos das duas dihidrochalconas 2',6'-dihidroxi-4'-O-metil-dihidrochalcona [M - H]<sup>-</sup> 271 *m/z* e da 2',6'-dihidroxi-4,4'-di-O-metil-dihidrochalcona [M - H]<sup>-</sup> 301 *m/z* (LEAL *et al*, 2010; LEAL, 2022).

O conhecimento prévio desses estudos é importante, porque ao conhecer a substância ou a classe das substâncias a serem trabalhadas, é possível buscar na

literatura artigos e estudos que relatem o isolamento de substâncias similares, facilitado o desenvolvimento do ensaio e, conseqüentemente a eficiência da técnica (FOCAULT & CHEVOLOT, 1998; ITO, 2005).

## 2.2 METODOLOGIA

A pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Fitoquímica e Cromatografia Contracorrente (LabFitoCCC) do Instituto de Pesquisa de Produtos Naturais (IPPN) e no Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia da Faculdade de Farmácia, ambos da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A pesquisa utilizou metodologia qualitativa como referencial teórico de pesquisas envolvendo estudos semelhantes realizadas no nosso grupo de pesquisa, permitindo assim avaliações de técnicas a serem realizadas e otimizando o campo de estudos.

Também foram utilizadas metodologias quantitativas de técnicas cromatográficas e espectroscópicas, possibilitando aprofundamento prático de análises das substâncias de interesse. Para essa pesquisa, as análises foram realizadas partindo-se do extrato em diclorometano de folhas de *S. glycyarpa* (SGD) pronto, obtido anteriormente pelo grupo de pesquisa do LabFitoCCC.

### 2.2.1 Coleta das espécies de *Siparuna sp.* e preparação dos extratos

As folhas das espécies de *Siparuna* foram coletadas na Reserva Adolpho Ducke, Manaus, Brasil, em 2015. Todas as espécies foram depositadas no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) com registro número 269732 para *S.glycyarpa*. Essa pesquisa teve autorização do Conselho Diretor do Patrimônio Genético (CGEN) com autorização número A3C04CB.

As folhas da espécie *Siparuna glycyarpa* secas e moídas separadamente foram extraídas por maceração com etanol 96°GL. Parte dos extratos brutos etanólicos, foi fracionado através de partição líquido-líquido entre metanol:água 7:3 (v/v) e solventes de polaridades crescentes, hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol (**Figura 6**) (LEAL, *et al.*, 2021). A coleta das folhas de *Siparuna* e preparação dos 25 extratos foram realizados pelo grupo de pesquisa do LabFitCCC da UFRJ. O extrato em diclorometano de *S. glycyarpa* foi empregado para dar prosseguimento ao estudo dessa pesquisa.



**Figura 6:** Fracionamento do extrato de folhas de *Siparuna glycyarpa*.

### 2.2.2 Teste de Sistema de Solventes para fracionamento por Cromatografia Contracorrente

O teste de sistema de solvente (TSS) para CCC foi realizado com alíquotas do extrato seco (sem necessidade prévia de quantificação) dissolvidas em diferentes proporções do sistema de solventes hexano-acetato de etila-metanol-água (HEMWat) em tubos de ensaios. O sistema de solvente HEMWat foi testado nas proporções 8:2:8:2 (v/v), 7:3:6:4 (v/v), 7:3:5:5 (v/v), 5:5:5:5 (v/v), 3:7:5:5 (v/v), 3:7:4:6 (v/v), 2:8:2:8 (v/v).

Uma espátula de metal é usada para inserir a pequena quantidade do extrato dentro do tubo de ensaio, homogeneizando a amostra até sua completa dissolução. Após agitação manual do tubo com a espátula de metal, e decantação das fases inferior e superior, iguais volumes de ambas as fases são aplicadas em placas de cromatografia em camada delgada (CCDA), onde a FE será a sílica gel 60 F<sub>254</sub> e a FM é clorofórmio (ou diclorometano) + 0,5% metanol.

As CCDA foram visualizadas sob luz ultravioleta em comprimento de onda de 254 e 365 nm. Na CCDA, deve-se fazer uma estimativa visual do coeficiente de partição (*K*) das substâncias de interesse.

### 2.2.3 Pré-purificação do extrato em diclorometano das folhas de *S.glycyarpa*

A primeira pré-purificação do extrato bruto de SGD foi fracionada por extração líquido-líquido com o sistema de solvente (SS) 1:1:1:1 (v/v) em funil de separação utilizando uma amostra de 1.0 g de extrato bruto de SGD. Após a decantação, a fase inferior (SGDI) e a fase superior (SGDS) foram recolhidas separadamente e levadas para a eliminação dos solventes sob pressão reduzida no rotavapor. As fases obtidas foram analisadas por CCDA, eluídas com clorofórmio (ou diclorometano) + 0,5% metanol e visualizadas sob luz UV em comprimento de onda de 254 e 356 nm.

Na presente pesquisa, foram realizados 3 pré-purificações do extrato bruto de SGD, sendo a segunda e terceira pré-purificações com 2,0 g do extrato bruto.

#### **2.2.4 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de fotodiodos (CLAE/DAD)**

Foram utilizados 3 equipamentos diferentes de CLAE para as análises com o extrato em diclorometano das folhas de *S. glycyarpa*.

A metodologia de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de fotodiodos (CLAE/DAD) foi empregada com o objetivo de identificar substâncias através de características químicas de cada classe de compostos com a absorção na região de UV em diferentes comprimentos de onda.

A análise de CLAE/DAD (280, 310, 330, 360 nm) na Central Analítica do IPPN foi realizada utilizando o equipamento Agilent 1260 Infinity Series. As condições de gradiente são: solvente A água com 0,01% de ácido fórmico, solvente B acetonitrila, com gradiente de B = 0% em 0 min, B = 60 % em 40 min, B = 100% em 45 min, B = 0 % em 53 min a 60 min, com temperatura a 25°C. Foi utilizada uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (2,1 × 100 mm d.i.; 2,7 µm de tamanho de partícula; Agilent).

Análises por CLAE/DAD foram ainda realizadas no Laboratório de Fitoquímica e Farmacognosia da Faculdade de Farmácia do UFRJ, no equipamento Merck Elite LaChrom, Hitachi com uma coluna Luna 5µ C18 (2) 100A (150 × 4.60 mm d.i.; 5 µm de tamanho de partícula; PEEK, Ea). Nessa análise foram testadas oito diferentes condições de gradientes de solventes, sendo estas:

1. **solvente A** = água – 0,01 % de ácido fórmico, **solvente B** = acetonitrila (ACN); B = 5 % em 0 min, B = 60 % em 40 min, B = 100 % em 45 min, B = 5 % em 53 min e B = 5 % em 60 min.
2. **solvente A** = água – 0,01 % de ácido fórmico, **solvente B** = acetonitrila (ACN); B= 20 % em 0 min, B = 60 % em 40 min, B = 100 % em 45 min, B = 20 % em 53 min e B = 20 % em 60 min.
3. Corrida interrompida.
4. **solvente A** = água – 0,01 % de ácido fórmico, **solvente B** = acetonitrila (ACN); B= 30 % em 0 min, B = 60 % em 40 min, B = 100 % em 45 min, B = 30 % em 53 min e B = 30 % em 60 min.

5. **solvente A** = água – 0,01 % de ácido fórmico, **solvente B** = metanol (MeOH); B= 5 % em 0 min, B = 60 % em 40 min, B = 100 % em 45 min, B = 5 % em 53 min e B = 5 % em 60 min.
6. **solvente A** = água – 0,01 % de ácido fórmico, **solvente B** = metanol (MeOH); B= 30 % em 0 min, B = 70 % em 20 min, B = 100 % em 25 min, B = 30 % em 30 min e B = 30 % em 45 min.
7. **solvente A** = água – 0,01 % de ácido fórmico, **solvente B** = metanol (MeOH); B= 50 % em 0 min, B = 70 % em 20 min, B = 100 % em 25,1 min, B = 50 % em 30,1 min e B = 50 % em 45 min.
8. **solvente A** = água – 0,01 % de ácido fórmico, **solvente B** = metanol (MeOH); B= 60 % em 0 min, B = 70 % em 15 min, B = 100 % em 20,1 min e B = 60 % em 35 min.

As injeções foram realizadas de forma manual com válvula injetora equipada com uma alça de injeção de 20 µl, com fluxo de 1 ml/min, com temperatura 25°C. Foi realizado uma corrida com o branco nas condições: **solvente A** = água – 0,1 % de ácido fórmico, **solvente B** = acetonitrila (ACN); B = 5 % em 0 min, B = 60 % em 40 min, B = 100 % em 45 min, B = 95 % em 53 min e B = 5 % em 60 min. Esse equipamento foi utilizado com o objetivo de otimizar a metodologia utilizada em outros extratos de *Siparuna*.

### **2.2.5 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a detector de fotodiodos e massas (CLAE/DAD/EM)**

A utilização da Cromatografia Líquida acoplado a Espectrofotometria de Massas (CLAE-EM/EM) foi realizada para substâncias visualizadas no CLAE/DAD.

Na análise de CLAE-EM/EM foi utilizado o equipamento UHPLC Dionex TM UltiMate™ 3000, fonte APCI-EM (254, 270, 330, 360 nm), na Central Analítica do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia - CA-DPNA da UFRJ. As condições de gradiente são: solvente A água – 0,1% de ácido fórmico, solvente B = acetonitrila, sendo B = 95 % em 5 min e 100 % em 30 min a 40°C. Foi utilizada uma coluna Poroshell 120 EC-C18 (2,1 × 100 mm d.i.; 2,7 µm de tamanho de partícula; Agilent).

Os espectros de massas foram processados utilizando o *software* Xcalibur™ e o *software* MZmine 2.53.

### 2.2.6 Fracionamento de SGD por Cromatografia Contracorrente

Os fracionamentos de SGD por CCC foram realizados no Laboratório de Cromatografia Contracorrente (LabCCC) do Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais (IPPN) da UFRJ. Dois tipos de equipamentos e colunas de CCC foram utilizados: P.C. Inc. High Speed Countercurrent Chromatograph, (modelo MKII CCC, Maryland, USA), e AECS Quattro HTPrep, (modelo AECS Quik Prep, Bridgend, UK). Ambos operam em velocidade entre 0-865 rpm.

De modo geral, os sistemas de solventes HEMWat de todos os fracionamentos foram preparados individualmente em funil de separação, respeitando as proporções de cada solventes. Após agitação vigorosa e separação das fases FS e FI por diferença de densidade (sendo a fase inferior com maior densidade que a fase superior), ambas as fases foram recolhidas em recipientes adequados e levadas para o aparelho de ultrassom UltraCleoner 700 para desgaseificação.

No primeiro fracionamento por CCC, 164 mg da SGDI foram injetadas no aparelho P.C. Inc, coluna de 80ml (diâmetro interno 1.6mm), com eluição isocrática do SS HEMWat 7:3:6:4 (v/v) no modo reverso (fase aquosa como fase móvel), sentido cabeça-cauda. Foram coletadas 80 frações (45 na eluição clássica e 35 na extrusão) de 2.0 ml, com fluxo de 2.0ml/mim.

Cerca de 500mg da SGDS foram injetadas nos fracionamentos 2, 3, 6 e 7 utilizando o aparelho HTPrep, coluna de 112ml (diâmetro 2,0 mm), com eluição isocrática do SS HEMWat 7:3:6:4 (v/v) no modo reverso, sentido cabeça-cauda. Foram colheradas 140 frações em cada fracionamento (80 na eluição clássica e 60 na extrusão) de 2.0 ml por tubo, com fluxo de 2.5ml/mim.

O sistema de solvente HEMWat modificado 7:3:5,5:4,5 (v/v) foi testado em dois momentos: no fracionamento 4 utilizando o P.C.Inc com 600mg SGDI (foram coletadas 120 frações de 2.0 ml; 80 na eluição clássica e 40 na extrusão) e no fracionamento 5 utilizando o equipamento HTPrep com 76,3mg das frações 23-40 recolhidas do CCC 2 (foram coletadas 230 frações de 1.0 ml; 160 na eluição clássica e 70 na extrusão). Ambos os fracionamentos foram realizados no aparelho P.C. Inc, coluna de 80ml (diâmetro interno 1.6mm), com eluição isocrática no modo reverso, sentido cabeça-cauda.

Todos os fracionamentos (1-7) por cromatografia contracorrente estão descritos na tabela 1.

Tabela 1: Condições cromatográficas dos fracionamentos isocráticos do extrato em diclorometano de folhas de *S. glycyarpa* (SGD) por cromatografia contracorrente (CCC1-CCC7).

Experimento	Amostra	Dissolução da amostra injetada (HEMWat)	Quantidade de amostra injetada (mg)	Retenção de FE (%)	Extrusão/ Total de frações	Proporção de SS (HEMWat) (v/v)	Equipamento /Coluna	Fluxo da Fase Móvel
CCC 1	SGDI*	FE:MeOH:H2O 2:2:1	164	82,85	45/80	7:3:6:4	PC. Inc /70ml	2ml/min
CCC 2	SGDS**	FE:MeOH:H2O 2:2:1	510	79,47	80/140	7:3:6:4	HTPrep /112ml	2,5ml/min
CCC 3	SGDS**	FE:MeOH:H2O 2:2:1	512	79,47	80/140	7:3:6:4	HTPrep /112ml	2,5ml/min
CCC 4	SGDI*	FE:MeOH:H2O 2:2:1	578	82,85	80/120	7:3:5,5:4,5	PC. Inc /70ml	2ml/min
CCC 5	frações 23-40 do fracionamento 2	FE:MeOH:H2O 2:2:1	76,3	82,85	160/230	7:3:5,5:4,5	PC. Inc /70ml	2ml/min
CCC 6	SGDS**	FE:FM 1:1	519,1	83,92	80/140	7:3:6:4	HTPrep /112ml	2,5ml/min
CCC 7	SGDS**	FE:FM 1:1	503,9	80,35	80/140	7:3:6:4	HTPrep /112ml	2,5ml/min
*SGDI -- Fase inferior da pré-purificação do extrato bruto em diclorometano das folhas de <i>Siparuna glycyarpa</i>								
**SGDS -- Fase superior da pré-purificação do extrato bruto em diclorometano das folhas de <i>Siparuna glycyarpa</i>								

### **2.2.7 Cromatografia em Camada Delgada e visualização por revelador NP-PEG**

Todos os fracionamentos de CCC e de TSS são aplicadas em placas cromatográfica de camada delgada (CCDA) utilizando a sílica gel 60 F<sub>254</sub> como FE e eluidas com clorofórmio (ou diclorometano) + 0,5% metanol (aumentando a polaridade quando necessário e chegando até 2,0% de metanol) como FM. Após a eluição as placas foram visualizadas sob radiação ultravioleta a 254 e 356 nm.

Algumas placas de CCDA foram selecionadas para serem reveladas com revelador químico NP-PEG (difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol) e expostas à luz ultravioleta em 365nm. Finalmente, as frações de CCC foram reunidas por semelhança cromatográfica.

### **2.2.8 Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C**

As amostras foram preparadas com solvente deuterado (MeOD) e colocadas em tubos próprios para RMN de 3 e 5 mm e, para a análise, sendo empregado um espectrômetro Varian VNMR-500 (Califórnia, EUA). As análises foram solicitadas conforme demanda em <sup>1</sup>H em 400 ou 500 MHz e <sup>13</sup>C em 125 MHz. Os espectros foram processados utilizando-se o *software* MestReNova.

### **2.2.9 Purificação das frações 33-40 e 57-69 do fracionamento 6 por filtração em gel de Sephadex LH-20**

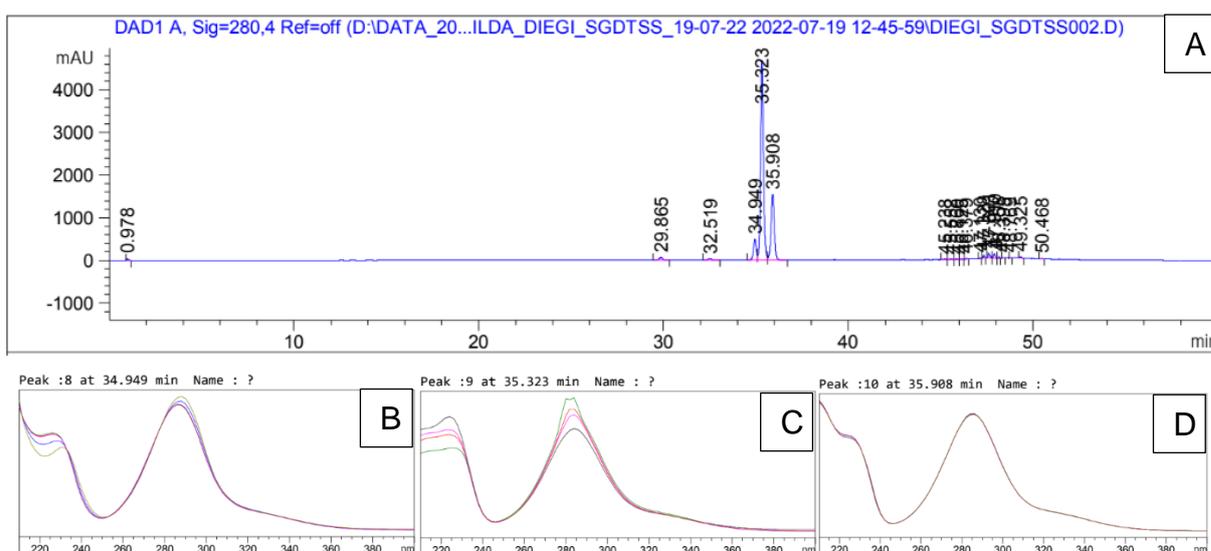
Após as frações reunidas de fracionamentos oriundos de CCC por semelhança cromatográficas, as frações 33-40 e 57-69 do fracionamento 6 foram escolhidas para separação das substâncias através de coluna de permeação em gel.

A purificação das frações 33-40 e 57-69 reunidas do fracionamento 6 foram efetuadas em coluna de 90 cm de comprimento e 2 cm de diâmetro interno utilizando gel de Sephadex LH-20 como FE e MeOH como FM.

## 2.3 RESULTADOS E DISCURSÃO

### 2.3.1 Perfil de SGD por CLAE

O perfil cromatográfico por CLAE do extrato bruto em diclorometano das folhas de *Siparuna glycyarpa* (SGD) mostrou 3 picos majoritários com tempos de retenção ( $T_r$ ) = 34.949, 35.323, 35.908 min (**Figura 7**). Os picos visualizados em U.V no comprimento de onda de 280nm, apresentaram curvas de absorção cujos sinais estão de acordo com os cromóforos descritos para dihidrochalconas, sendo notável a perda de densidade eletrônica na ausência da ligação dupla entre os dois anéis aromáticos e da carbonila. Com a perda do sistema conjugado, as transições eletrônicas  $\pi-\pi^*$  não ocorrem da mesma forma, assim, as curvas de absorção por U.V são conseqüentemente menos intensas e desprovidas de picos bem definidos.



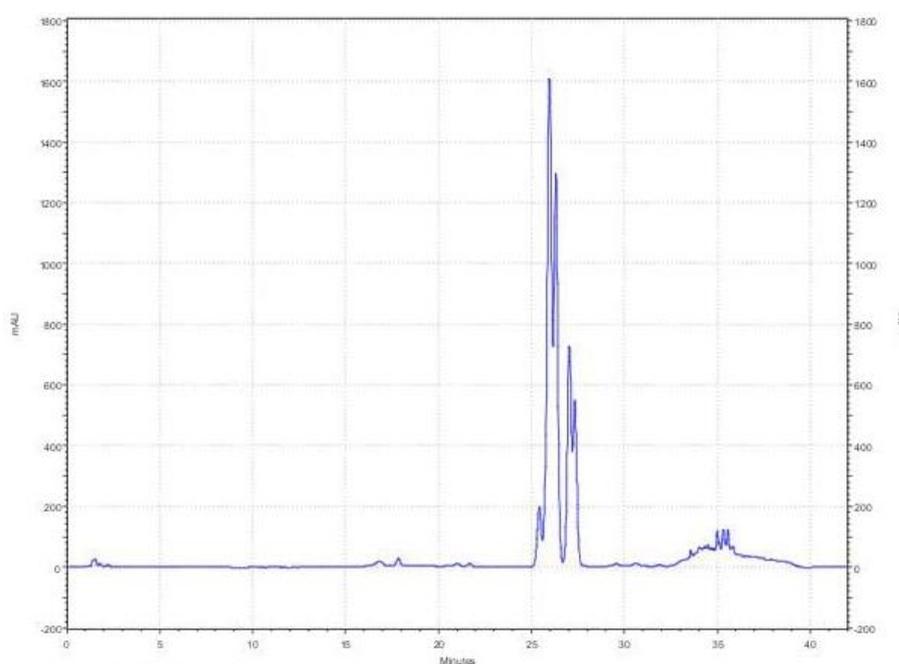
**Figura 7:** Perfil cromatográfico do extrato bruto em diclorometano das folhas de *Siparuna glycyarpa* (SGD) por CLAE em comprimento de onda de 280nm (A) e curvas de absorção no U.V dos sinais em  $T_r$  = 34.949 (B), 35.323 (C), 35.908 min (D). Utilizando a coluna Poroshell 120 EC-C18, solvente A água com 0,01% de ácido fórmico, solvente B acetonitrila com gradiente de B = 0% em 0 min, B = 60 % em 40 min, B = 100% em 45 min, B = 0 % em 53 min a 60 min, com temperatura a 25°C.

A análise preliminar do extrato SGD, por CLAE/DAD não foi considerada eficiente para a separação das substâncias no extrato, tendo em vista que as substâncias de interesse tiveram  $T_r$  longo e baixa resolução. Logo, foi necessário realizar novos testes para otimização da metodologia analítica para o extrato SGD.

A otimização da metodologia do extrato SGD foi realizada através de CLAE/DAD com diversas proporções de solvente A e B no Laboratório de Fitoquímica

e Farmacognosia da Faculdade de Farmácia do UFRJ. Uma corrida em branco, sem amostra injetada no sistema cromatográfico, foi iniciada a fim de analisar a composição dos solventes.

Dentre as proporções de solventes testadas a proporção com A = água - 0,01 % de ácido fórmico e solvente B = ACN, com A = 70 % e B = 30 % em 0 min e B = 70 % em 53 min foi a metodologia mais eficiente, assim reduzindo o Tr das substâncias (aparecendo em torno de 20 min), e possibilitou a visualização de 5 picos cromatográficos (**FIGURA 8**) ao invés de apenas 3 picos visualizados anteriormente com a metodologia anterior.



**Figura 8:** Perfil cromatográfico do extrato em diclorometano de folhas de *S. glycyarpa* (SGD) por U.V em comprimento de onda de 280nm.

### 2.3.2 Escolha de sistema de solvente para o fracionamento de SGD através de testes de partição em tubos de ensaio

O teste para a seleção de sistema (TSS) foi realizado pensando em abranger as substâncias-alvo determinadas através da faixa de Tr no cromatograma obtido por CLAE, por isso foram testados vários Sistemas de Solventes (SS) com proporções diferentes com base em tabelas de SS encontrados na literatura (ITO *et al.*, 1991. FOUCAULT, 1998; GARRARD, 2007). É importante frisar que no fracionamento em cromatografia contracorrente, os SS são escolhidos de modo a formarem duas fases imiscíveis.

Os SS testados foram: AcOEt-BuOH-H<sub>2</sub>O; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH-H<sub>2</sub>O AcOEt-Acetona-H<sub>2</sub>O; hex-AcOEt-MeOH-H<sub>2</sub>O. A maioria dos SS testados se mostraram muito polares para o extrato SGD, com exceção do SS HEMWat que proporcionou melhor distribuição das substâncias de interesse nas fases superior (FS) e inferior (FI).

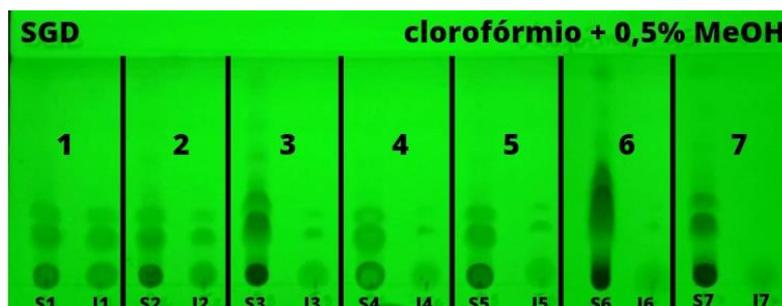
Com base nesses resultados foram propostas as proporções de SS HEMWat da tabela 2.

Tabela 2: Adaptação da tabela de proporções de sistemas de solventes HEMWat.

Experimento nº	nº do SS	Hexano	AcOEt	MeOH	H <sub>2</sub> O
1	-6	8	2	8	2
2	-4	7	3	6	4
3	-2	7	3	5	5
4	0	5	5	5	5
5	+2	3	7	5	5
6	+4	3	7	4	6
7	+6	2	8	2	8

FONTE: Adaptado de Friesen & Pauli, 2007.

A análise da distribuição de substâncias entre as duas fases do sistema bifásico líquido, após aplicação de iguais volumes da FS e FI em CCDA (**FIGURA 9**), mostraram que os testes de nº3 ao nº7 (proporções mais polares de TSS) retiveram na FS maior parte das substâncias. Em contrapartida, o teste nº1 (com proporção mais apolar) reteve na FI a maior parte das substâncias. Isso mostra a passagem gradual das substâncias da fase inferior (-6) para a fase superior (+6) conforme a redução da quantidade do modificador de fase aquosa (MeOH) e aumento da quantidade de água, assim como o aumento da quantidade do modificador da fase orgânica (AcOEt) e redução na quantidade de hexano. Ao analisar visualmente o coeficiente de partição ( $K$ ), esses sistemas de solventes foram descartados para o fracionamento por CCC por não proporcionar distribuição das substâncias do extrato SGD entre as duas fases do sistema bifásico. O sistema de solventes nº2 foi o melhor sistema de solvente dentre os testados.



**Figura 9:** Placa de cromatografia em camada delgada (CCDA) visualizadas em luz U.V de 254nm referente ao teste de sistema de solventes HEMWat da Tabela 2. **S**= fase superior, **I**=fase inferior

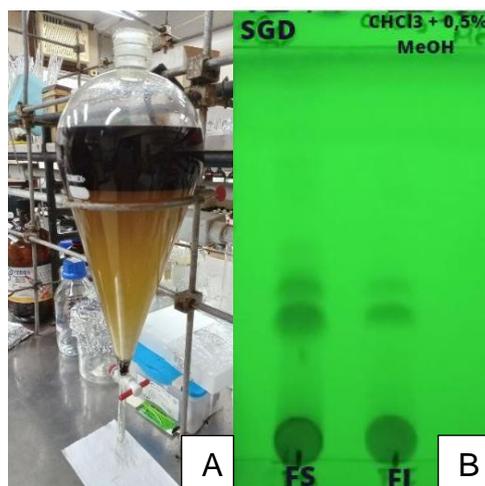
Todas as 14 amostras do TSS foram levadas para análise por CLAE/DAD e calculados os respectivos  $K$  utilizando as áreas das FI e FS.

Observa-se também no TSS que à medida que a polaridade dos sistemas aumenta, a concentração das substâncias na fase aquosa diminui enquanto a fase orgânica possui uma maior concentração de substâncias. Por isso, foi escolhido o sistema em modo reverso para que durante o processo de fracionamento por CCC a FM possa extrair substâncias da FE.

### 2.3.3 Pré-purificação do extrato em diclorometano das folhas de *Siparuna glycyarpa*

A pré-purificação do SGD foi realizada por partição líquido-líquido utilizando um funil de separação com SS HEMWat em proporção 1:1:1:1 (v/v) (**FIGURA 10**). A necessidade desse processo veio por conta das características fitoquímicas do extrato SGD, que apresentou substâncias polares e de média polaridade. Fazendo uma partição líquido-líquido do extrato SGD com o SS nº4, foi possível diminuir a complexidade do extrato, aonde a fase inferior (SGDI) se apresentou mais limpa para ser levada para o fracionamento em CCC.

Observou-se que a FS (orgânica) apresentou maior concentração de substâncias do extrato SGD, sendo essa a fase menos densa e correspondente a porção com coloração mais escura no funil de separação (**FIGURA 10.A**). A aplicação em CCDA (**FIGURA 10.B**) possibilitou a visualização da maior concentração das substâncias em SGDS, contudo a análise por CLAE/DAD de ambas as fases da pré-purificação mostram que as substâncias de interesse estão presentes na SGDS e na SGDI da pré-purificação do extrato SGD. Por esse motivo, as duas fases (superior e inferior) foram fracionadas por CCC.



**Figura 10:** A. Funil de separação com a pré-purificação do extrato bruto de SGD. B. CCDA com aplicação das SGDS e SGDI.

Nos fracionamentos por cromatografia contracorrente a SGDI e a SGDS foram injetadas separadamente nos equipamentos.

#### 2.3.4 Fracionamento por Cromatografia Contracorrente

Os resultados discutidos a seguir contemplaram sete fracionamentos por CCC para nível de comparação de resultados, solubilidades de amostra, proporções de SS, equipamentos e/ou metodologias dos fracionamentos realizados do extrato em diclorometano das folhas de *Siparuna glycyarpa*.

Os métodos por cromatografia contracorrente desenvolvidos utilizaram modo de eluição isocrática (com a força de solvente se mantendo constante durante toda a corrida), no modo reverso (fase apolar como fase estacionária e fase polar como fase móvel) e no sentido cabeça-cauda.

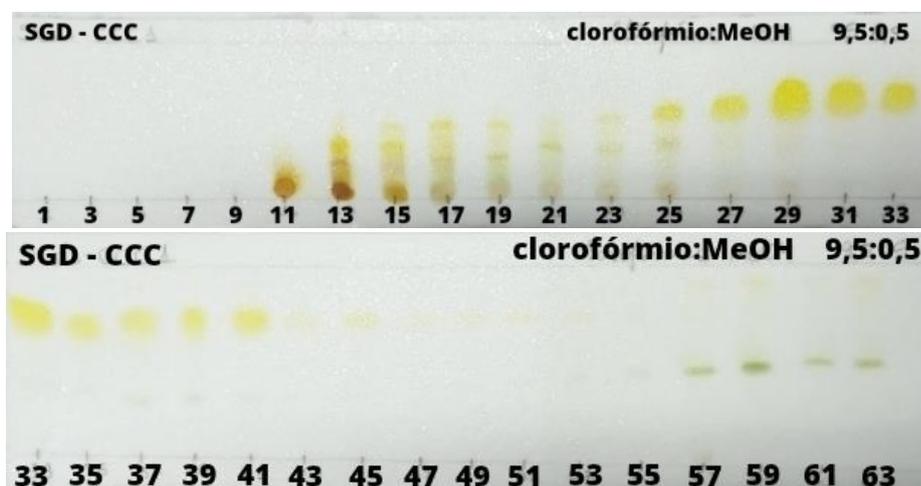
Após todos os fracionamentos, foram calculadas as retenções de fase estacionária dentro da coluna,  $S_f$ , através dos volumes  $V_m$  e  $V_s$ .  $V_m$  foi calculado através do excesso de fase estacionária eluído da coluna durante o processo de equilíbrio das duas fases.

$$\text{Retenção da fase estacionária} = \frac{\text{volume da coluna} - \text{volume médio}}{\text{volume da coluna}} \times 100$$

- **Primeiro fracionamento por Cromatografia Contracorrente**

No fracionamento 1, a retenção na fase estacionária dentro da coluna foi 82,85%. Nesse fracionamento, foi utilizada a FI da pré-purificação do extrato de SGD, pois a

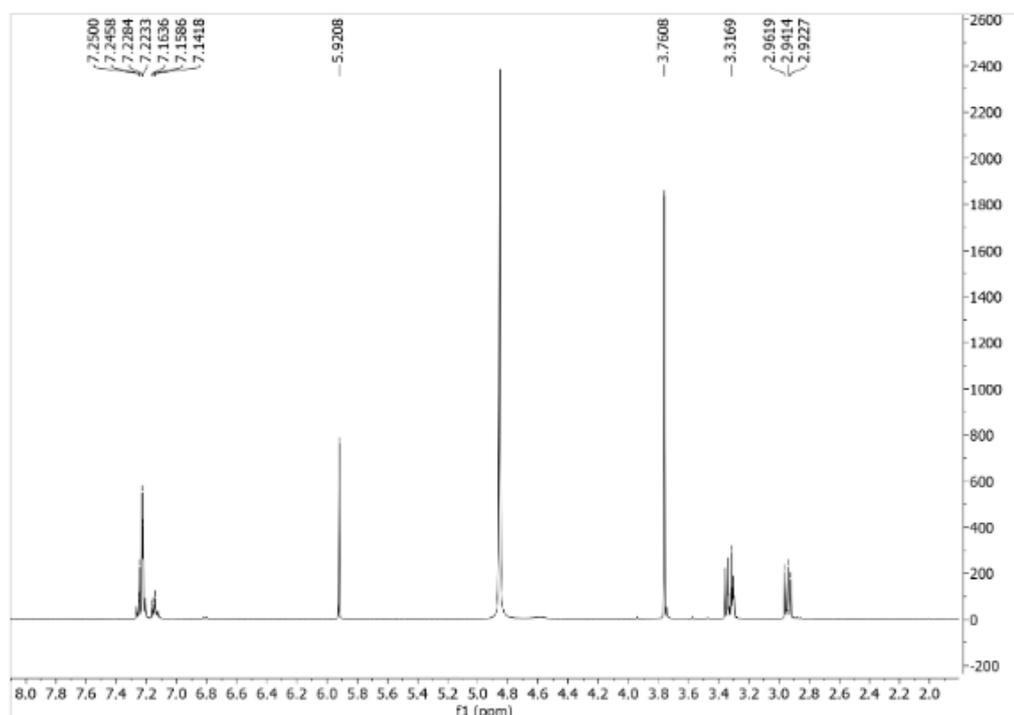
amostra estava mais limpa visualmente em CCDA. Com aplicação das frações obtidas no fracionamento por CCC em CCDA e revelado em NP-NEG (**FIGURA 11**) foi possível a visualização de manchas correspondentes a substâncias com características polares.



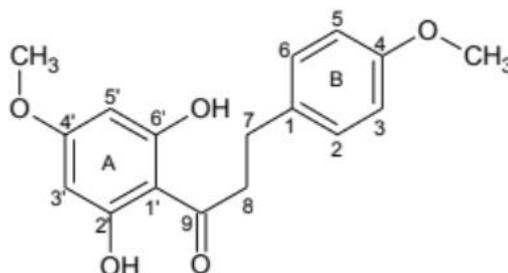
**Figura 11:** Frações do fracionamento 1 em cromatografia contracorrente do extrato SGD aplicas em CCDA e reveladas com NP-PEG.

As fluorescências de cor amareladas após borrifar com o revelador químico NP PEG são indícios de que as substâncias presentes no extrato SGD são flavonoides identificados anteriormente por nosso grupo de pesquisa. De acordo com semelhança cromatográfica por CCDA, as frações 37-40 foram reunidas e analisadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ ) (**FIGURA 12**), evidenciando sinais característicos de uma dihidrochalcona. Entretanto, nota-se que a metodologia empregada não foi eficiente para a separação e/ou isolamento de todas as substâncias no extrato.

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (**FIGURA 12**) mostrou sinais compatíveis com a dihidrochalcona 2',6'-dihidroxi-4,4'-di-O-metil-dihidrochalcona [ $\text{M-H}^-$  301  $m/z$ ] identificada anteriormente por estudos do nosso grupo de pesquisa (**TABELA 3**).



**Figura 12:** Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400MHz) em MeOD das frações 37-40 do fracionamento 1.



**Fonte:** Costa, 2013.

**Tabela 3:** Comparação dos sinais dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  em MeOD da fração 33-40 do fracionamento 1 de SGD com a chalcona 2',6'-dihidroxi-4,4'-di-O-metil-dihidrochalcona.

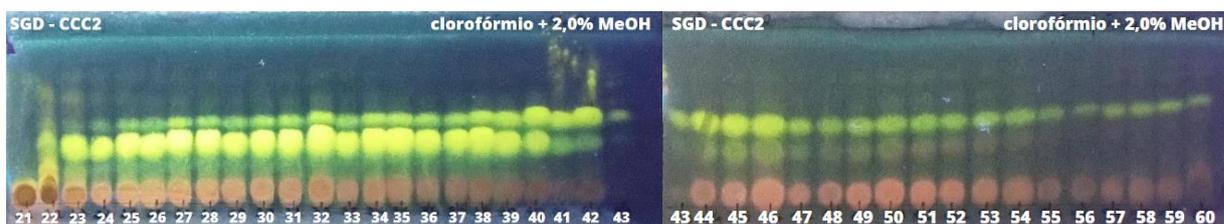
Carbono	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1'	2'	3'	4'	5'	6'	-OMe	-OMe
$\delta$ H (m)*	-	6,31 (d)	6,00 (d)	-	6,00 (d)	6,31 (d)	2,05 (t)	2,49 (m)	-	-	-	5,10 (s)	-	5,10 (s)	-	2,92 (s)	2,94 (s)
$\delta$ H (m)	-	7,25 (m)	7,15 (d)	-	7,15 (d)	7,25 (m)	2,9 (t)	3,3 (m)	-	-	-	5,9 (s)	-	5,9 (s)	-	3,8 (s)	-

\*Costa et al, 2013.

Os possíveis motivos para que a metodologia não tenha sido a correta, pode ter sido o preparo errado da amostra, que foi realizada desrespeitando as proporções de sistema de solvente empregados na coluna de CCC (foi utilizada um quantitativo de MeOH maior do que a da proporção do SS) ocasionando o desequilíbrio no sistema. Outro motivo pode ter sido a má preparação do sistema de solventes e na agitação do funil de separação.

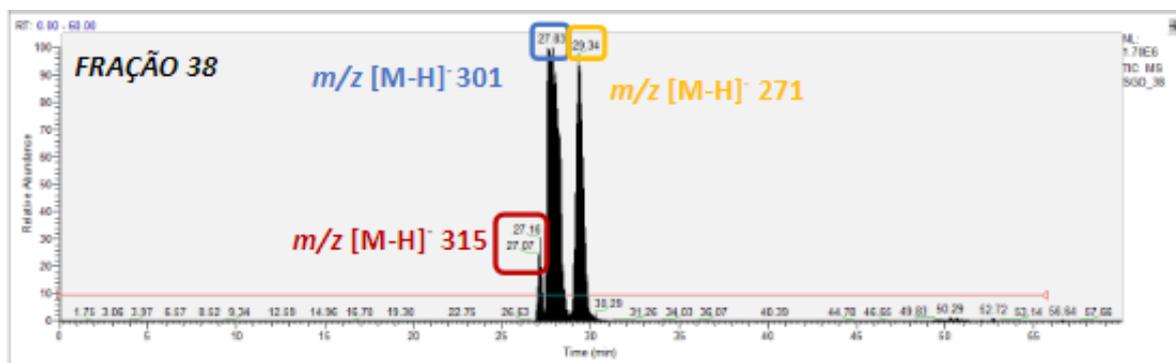
- **Segundo fracionamento por Cromatografia Contracorrente**

No segundo fracionamento, a retenção na fase estacionária dentro da coluna foi de 79,47%. Foi utilizado a FS da pré-purificação do extrato de SGD. A análise em CCDA possibilitou a visualização das duas substâncias majoritárias no extrato SGD (**FIGURA 13**), identificadas como as substâncias majoritárias no extrato por CLAE-EM/EM. Contudo, a metodologia empregada no fracionamento não foi eficiente para separar as substâncias por conta dos mesmos motivos do fracionamento 1.



**Figura 13:** Frações selecionadas do fracionamento 2 do extrato SGD aplicadas em CCDA e reveladas com NP-PEG e visualizadas através de U.V em 365nm.

Apesar de não ter ocorrido o isolamento das substâncias, o fracionamento 2 foi importante para prever como as substâncias predominantes no extrato estavam sendo eluídas. Com as frações de 21 a 60 sendo injetadas em CLAE-EM/EM e através das fragmentações em  $ms^2$  em cada substância nos Tr, foi possível supor que a mancha com cor amarelada mais polar corresponde a chalcona 2',6'- dihidroxi-4,4'-O-metil-dihidrochalcona [ $M-H^-$  301  $m/z$ ] no Tr de 28 min relatada nos estudos do extrato de SGD (**FIGURA 14**). Assim, como a banda menos polar corresponde a chalcona 2',6'-dihidroxi-4'-O-metil-dihidrochalcona [ $M-H^-$  271  $m/z$ ] no Tr de 29 min (**FIGURA 14**).



**Figura 14:** Espectro de CLAE-EM/EM da fração 38 do fracionamento 2 com a presença das duas substâncias majoritárias presentes no extrato SGD.

- **Terceiro fracionamento por Cromatografia Contracorrente**

No terceiro fracionamento foi repetida a mesma metodologia do fracionamento 2 com o objetivo de reunir mais frações das duas chalconas e repetir o fracionamento das duas substâncias identificadas para o isolamento em CCC. Nesse fracionamento, foi utilizada a FS da pré-purificação do extrato de SGD. Entretanto, a metodologia empregada não repetiu os mesmos resultados, apesar de repetir a retenção da FE = 79,47%.

Um fator que pode ter contribuído para a ineficiência da metodologia na técnica foi o sangramento da coluna. Nesse fracionamento o sangramento foi até o tubo 37, com cerca de 2,0mL por tubo. O sangramento prolongado na corrida mostra que não houve competição entre as FE e FM, sendo necessário reiniciar o fracionamento antes da injeção da amostra. Por falta de experiência na técnica, isso não ocorreu. Dentre as 120 frações coletadas, as substâncias foram reunidas em 3 frações.

- **Quarto fracionamento por Cromatografia Contracorrente**

No quarto fracionamento, o sistema HEMWat na proporção 7:3:5,5:4,5 (v/v) foi proposto tentando redistribuir as substâncias entre as fases aquosa e orgânica ao aumentar a quantidade de MeOH, o qual é um solvente prótico modificador da fase aquosa. Nesse fracionamento por CCC, foi utilizada a FI da pré-purificação do extrato de SGD.

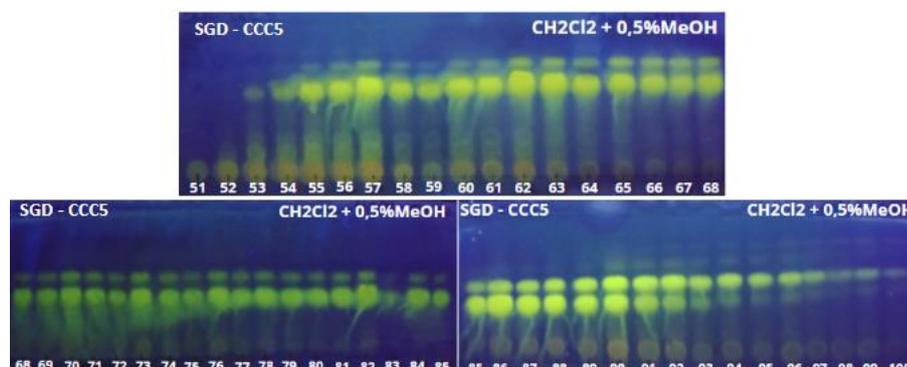
O AcOEt e o MeOH são considerados solventes modificadores no sistema de solvente bifásico em SS quaternários. Aumentando a quantidade de MeOH, conseqüentemente as proporções do SS são modificadas, assim muda a saturação dos líquidos Hex-AcOEt e MeOH-H<sub>2</sub>O e favorece a distribuição de substâncias para da fase orgânica para a fase aquosa.

O resultado obtido com a modificação da proporção de SS não foi eficiente, mesmo com a retenção da FE = 82,85%. As duas substâncias majoritárias no extrato SGD eram eluidas juntas durante o fracionamento por CCC.

- **Quinto fracionamento por Cromatografia Contracorrente**

As frações 23-40 reunidas por semelhança cromatográfica do fracionamento 2, foram reunidas para o fracionamento em CCC com o SS HEMWat modificado (7:3:5,5:4,5 (v/v)). Entretanto no fracionamento 5 por CCC a análise por CCDA

(**FIGURA 15**), mostrou que esse sistema também não foi eficiente para a separação dos metabólitos desejados, com as duas substâncias sendo eluídas em conjunto.



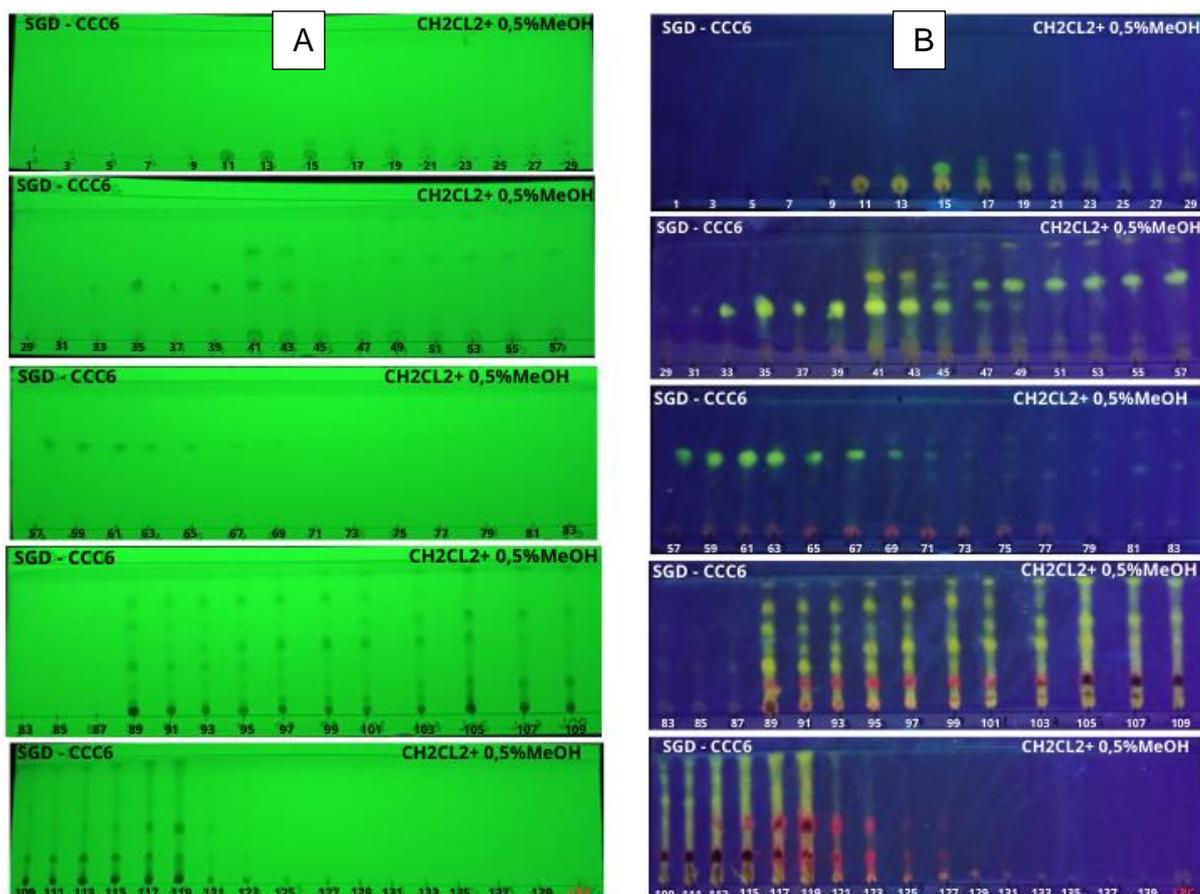
**Figura 15:** Frações selecionadas do fracionamento 5 do extrato SGD aplicadas em CCDA e reveladas com NP-PEG e visualizadas através de U.V em 365nm.

Nos fracionamentos 1-5 não obtivemos eficiência para o isolamento das substâncias de interesse. Por conta disso, foi realizada uma análise criteriosa de como estava sendo feita a realização dos procedimentos para a ~~análise~~ e operação dos equipamentos de cromatografia contracorrente. Recomeçamos todos os estudos e vimos que os fracionamentos de 1-5 não foram eficientes principalmente por conta do preparo errôneo da amostra que estava sendo injetada.

- **Sexto fracionamento por Cromatografia Contracorrente**

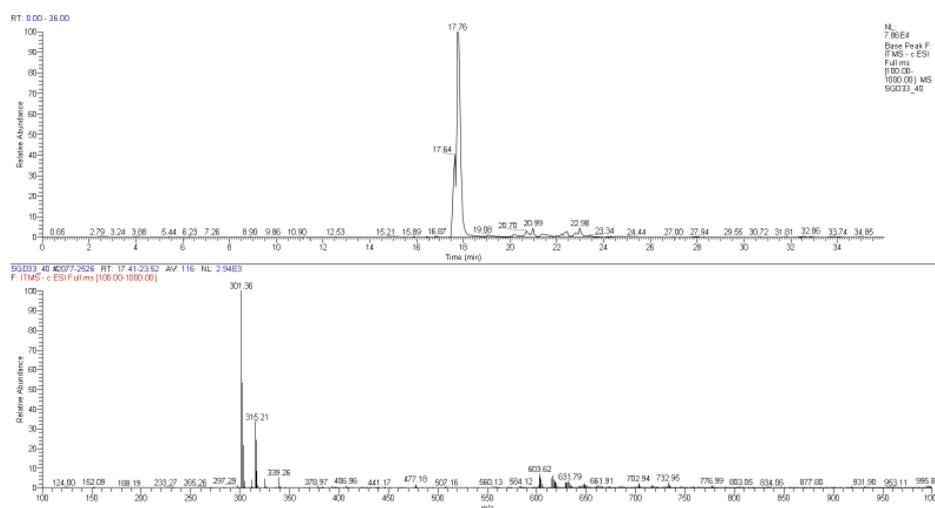
O fracionamento 6 teve retenção da FE = 83,92%. Nesse CCC, foi escolhida a FS da pré-purificação do extrato de SGD para ser injetada no HTPrep no SS 7:3:6:4 (v/v), com fluxo de 2,5 ml/min, com coluna de 112ml. A amostra foi preparada com proporção 1:1 (v/v) de FE:FM, assim respeitando as proporções de SS estabelecido para a análise.

Em comparação com os fracionamentos anteriores, nessa análise das frações de CCC em CCDA foi possível visualizar resolução de manchas cromatográficas bem definidas. O perfil de eluição em CCDA (**FIGURA 16**) mostra que até o tubo 8 houve eluição apenas de  $V_m$ . A partir do tubo 9 até o tubo 13, substâncias mais polares foram eluídas e com a força de solvente utilizada para eluir a placa de CCDA não foi suficiente para eluir as substâncias, sendo necessário aumentar a polaridade do sistema de eluição.



**Figura 16:** A. Fracionamento 6 do extrato SGD aplicas em CCDA e visualizadas através de U.V em 254nm. B. CCDA revelada com NP-PEG e visualizadas através de U.V em comprimento de onda de 365nm.

Depois do tubo 14 até o tubo 32, ocorreu eluição de substância com menos polaridade do que as primeiras frações, até o tubo 33 ao tubo 40 que apareceu a primeira dihidrochalcona majoritária no extrato SGD com peso molecular de  $[M-H^- 301 m/z]$  (FIGURA 17).



**Figura 17:** Espectro de CLAE-EM/EM da fração 33-40 do fracionamento 6 em modo negativo.

Entre os tubos 41 e tubo 43 as duas substâncias majoritárias presentes no extrato aparecem juntas, sendo possível visualizar também uma terceira substância. Entre os tubos 44 a 56 foram eluídas substâncias mais apolares até o aparecimento da segunda dihidrochalcona anotada entre os tubos 57-69 com peso molecular de  $[M-H^- 271 m/z]$  (FIGURA 18).

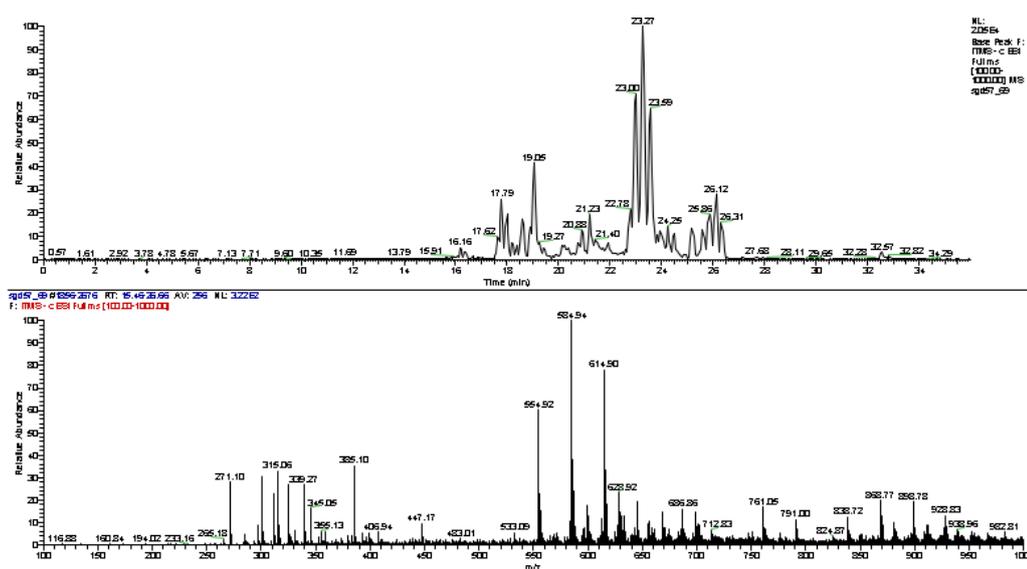


Figura 18: Espectro de CLAE-EM/EM da fração 57-69 do fracionamento 6 em modo negativo.

As frações de 70 até 140 foram analisadas, tendo como base a extrusão da corrida no tubo 80. É possível visualizar que essas frações são as substâncias mais apolares tendo mais afinidade com a FE do que com a FM. Essas últimas frações foram reunidas por semelhança cromatográfica em CCC, assim como as primeiras frações do CCC, e serão levadas para análises futuras de cromatográficas preparativas visando seus fracionamentos. As frações de 33-40 e 57-69 foram escolhidas para serem levadas a filtração em gel de Sephadex LH-20.

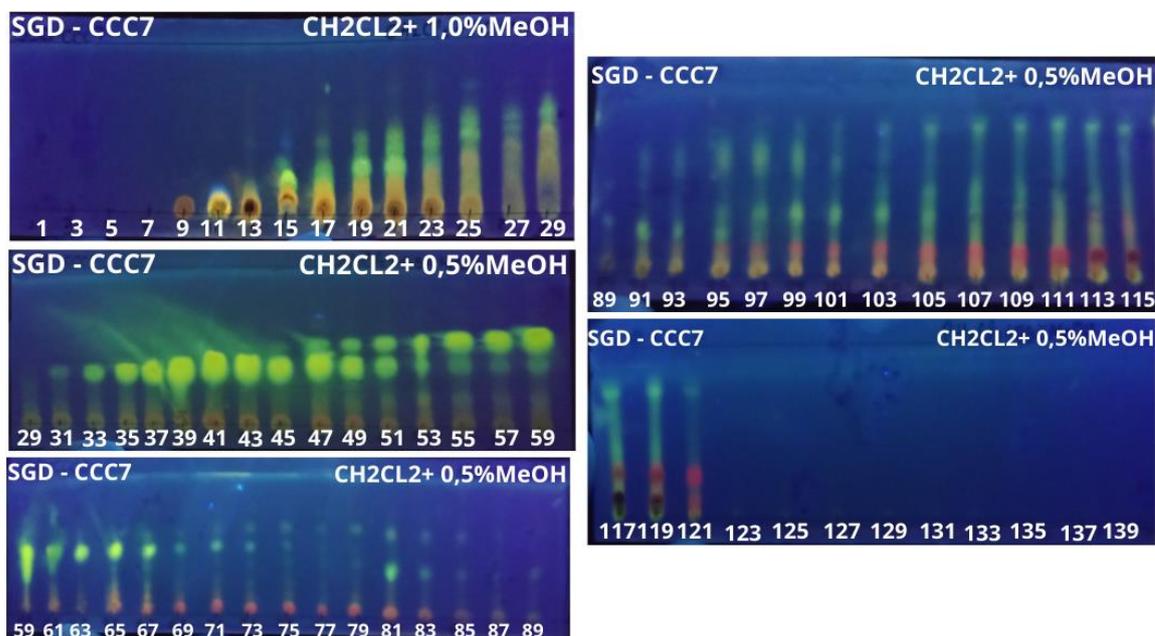
Esse fracionamento por CCC mostra a importância de solubilizar a amostra de forma correta e respeitando as proporções de sistema de solventes do sistema.

- **Sétimo fracionamento por Cromatografia Contracorrente**

O fracionamento 7 teve retenção da FE = 80,35%. Nesse CCC, foi escolhida a FS da pré-purificação do extrato de SGD para ser injetada no HTPrep no SS 7:3:6:4 (v/v), com a mesma metodologia do fracionamento 6.

Após a aplicação das frações em CCDA (FIGURA 19) e análise por CLAE-EM/EM, podemos ver que o fracionamento CCC7 reproduziu os resultados obtidos no

fracionamento 6. Isso mostra que a metodologia desenvolvida durante essa pesquisa é replicável. A análise por CLAE-EM/EM das frações desse fracionamento ainda está em processo de elucidação.



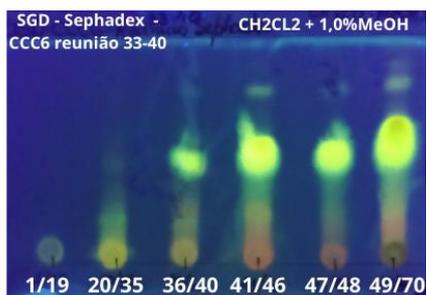
**Figura 19:** Fracionamento do extrato SGD aplicas em CCDA e reveladas com NP-PEG e visualizadas através de U.V em comprimento de onda 365nm.

Os resultados dos fracionamentos do extrato em diclorometano das folhas de *Siparuna glycyarpa* de 1-7, mostram que apesar da retenção das fases estacionárias em todos os fracionamentos por cromatografia contracorrente serem satisfatórios, a dissolução da amostra foi um fator determinante para o isolamento de substâncias majoritárias presente no extrato SGD e foi essencial para a eficiência da técnica.

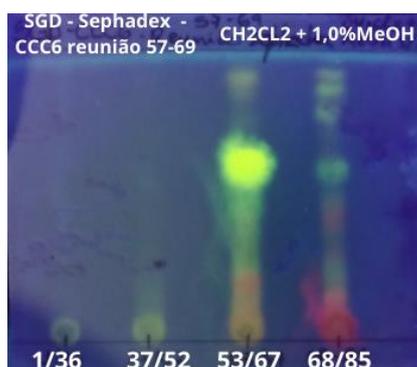
### 2.3.5 Filtração em gel Sephadex LH-20

As frações 33-44 e 57-69 do fracionamento 6 por CCC do extrato em diclorometano das folhas de *Siparuna glycyarpa* foram filtradas em gel Sephadex LH-20 com o objetivo de separar substâncias com diferentes pesos moleculares e tornar amostras mais limpas para os testes biológicos que estão em andamento.

As frações obtidas no fracionamento em Sephadex LH-20 foram reunidas por semelhanças cromatográficas (**FIGURA 20 e FIGURA 21**), para posteriormente serem levadas elucidação estrutural por RMN.



**Figura 20:** CCDA com frações reunidas da filtração em gel por Sephadex LH-20 da fração 33-40 do CCC6.



**Figura 21:** CCDA com frações reunidas da filtração em gel por Sephadex LH-20 da fração 57-69 do CCC6.

### 2.3.6 Determinação estrutural das substâncias isoladas por RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$

Após o fracionamento da fração 33-40 do CCC6, a fração 49-70 recolhida da coluna de Sephadex foi escolhida para ser elucidada por RMN. Assim a fração 53-67 foi escolhida após o fracionamento da fração 57-69 do CCC6.

As substâncias fracionadas por Sephadex LH-20 tiveram suas estruturas elucidadas por análises em espectros de RMN uni e bidimensionais de hidrogênio (RMN  $^1\text{H}$ , COSY  $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) e de carbono (RMN  $^{13}\text{C}$ , HSQC e HMBC) com posterior confirmação dos resultados obtidos com os resultados já obtidos na literatura.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A pré-purificação do extrato SGD em funil de separação com o sistema HEMWat nas proporções 1:1:1:1 (v/v) proporcionou amostras mais limpa para fracionamento por CCC. No teste de sistema de solvente foi possível definir que a proporção do SS HEMWat 7:3:6:4: (v/v) foi a que proporcionou coeficiente de partição próximo a 1 para as substâncias de interesse.

O fracionamento por cromatografia contracorrente é uma técnica que tem como principal vantagem a não utilização de suportes sólidos, mas para sua eficiente utilização é necessário que alguns critérios de escolha de sistema de solventes, dissolução de amostra e manuseio do equipamento sejam respeitados.

Nos fracionamentos 2-5 realizados com o extrato SGD não foi possível o isolamento de substâncias por conta de dissolução e preparo errôneos das amostras injetadas, que foram realizadas desrespeitando as proporções do sistema de solvente. Solubilizando a amostra com proporção 1:1 (v/v) da fase estacionária e fase móvel, foi realizado o fracionamento do extrato SGD com a técnica em modo reverso, possibilitando o isolamento de substâncias cujas estruturas foram elucidadas por RMN.

## REFERÊNCIAS

AGATI, G. *et al.* *Flavonoids as Antioxidants in Plants: Location and Functional Significance*. *Plant Sci.* v. 196, p. 67–76. 2012.

ARGENTA, S. C. *et al.* Plantas medicinais: cultura popular versus ciência. Vivências. **Revista Eletrônica de Extensão da URI**. v. 7, n.12, p. 51-60, mai. 2011. ISSN 1809-1636.

BERTHOD, A. *et al.* *Countercurrent chromatography in analytical chemistry (IUPAC Technical Report)*. **Pure and Applied Chemistry**. v. 81, n. 2, p. 355-387. fev. 2009. DOI:10.1351/PAC-REP-08-06-05. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/244742299\\_Countercurrent\\_chromatography\\_in\\_analytical\\_chemistry\\_IUPAC\\_Technical\\_Report](https://www.researchgate.net/publication/244742299_Countercurrent_chromatography_in_analytical_chemistry_IUPAC_Technical_Report). Acesso em: 1 jun 2023.

BORDES, L. P.; AMORIM, V. A. Metabólitos secundários de plantas. **Revista Agrotecnologia**, Ipameri, v.11, n.1, p.54-67, 2020.

BRONW, L. S. *et al.* Química A Ciência Central, 9 ed. **Pearson Education do Brasil**. São Paulo, 2007.

BÜTTENBENDER, S. L.; SIMON, E. de S.; VOLPATO, N. M. Cromatografia Contracorrente: Princípios e Aplicações. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 15, n. e, 2018. DOI: 10.5216/ref.v15ie.47586. Disponível em: <https://revistas.ufg.br/REF/article/view/47586>. Acesso em: 19 abr 2023.

CARNEIRO, M.J. **Composição química e atividades biológicas de extratos etanólicos e óleos essenciais de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Campinas, SP, 2021. Disponível em: [https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP30\\_19a435e9b03c875a5da92d81c46582b8](https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UNICAMP30_19a435e9b03c875a5da92d81c46582b8).

COSTA, F. das N. **Cromatografia Contracorrente no Isolamento de Produtos Naturais**. 2013. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: [https://minerva.ufrj.br/F/?func=direct&doc\\_number=000824600&local\\_base=UFR01#.ZECf1nbMLrc](https://minerva.ufrj.br/F/?func=direct&doc_number=000824600&local_base=UFR01#.ZECf1nbMLrc).

COSTA, F. das N. *et al.* *Changes in the mobile phase composition on a stepwise counter-current chromatography elution for the isolation of flavonoids from *Siparuna glycyarpa**. **Journal of Separation Science**. v. 36, p. 2253-2259, jun. 2013. DOI: doi.org/10.1002/jssc.201201054. Disponível em:

<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201201054>. Acesso em: 19 abr 2023.

COSTA, F. das N. *et al.* Purification of a synthetic pterocarpanquinone by countercurrent chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 23, n. 6, p. 1114-1118, jun. 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000600016>. Acesso em: 1 jun 2023.

DITTMER, C. *et al.* Asymmetric Cyclization of 2'-Hydroxychalcones to Flavanones: Catalysis by Chiral Bronsted Acids and Bases. **European Journal of Organic Chemistry**, v. 35, p. 5886-5898. 2007.

DÖMLING, A.; GAO, L. Chemistry and Biology of SARS-CoV-2. **Chem**. v. 6, p. 1283-1295, jun. 2020. DOI: 10.1016/j.chempr.2020.04.023. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7243793/>. Acesso em: 19 abr 2023.

FOUCAULT, A.P.; Chevolot, L. **Journal of Chromatography A**. n.3, v.808. 1998.

FERREIRA, M. K. A; *et al.* Potencial Farmacológico de Chalconas: Uma Breve Revisão. **Revista Virtual Química**. v. 10, n.5, p. 1455-1473. nov, 2018. ISSN. 1984-6835. Acesso em: 5 jun 2023.

FOUCAULT, A. P.; CHEVOLOT, L. Counter-current chromatography: instrumentation, solvent selection and some recent applications to natural product purification. **Journal of Chromatography A**. v. 808, p. 3-22. 1998.

HOSTETTMANN, K.; HOSTETTMANN, M.; MARSTON, A. *Preparative Chromatographic Techniques – Applications in Natural Product Isolation*. Springer. Berlim, 1986.

ITO, Y. Golden rules and pitfalls in selecting optimum conditions for high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**. v. 1065, Issue 2, p. 145-168, fev. 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.044>. Acesso em: 1 jun 2023.

LEAL, C. M. **Desreplicação dos extratos de espécies de Siparuna da Amazônia e investigação do potencial antiviral**. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

LEAL, C. M. *et al.* Amazonian Siparuna extracts as potential anti-influenza agents: Metabolic fingerprinting. **Journal of ethnopharmacology**. v. 270, n. 113788, p. 1-7, jan. 2021. DOI: 10.1016/j.jep.2021.113788. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/49640>. Acesso em: 21 abr 2023.

LEAL, C. M. *et al.* *Bioassay-Guided Fractionation of Siparuna glycyarpa n-Butanol Extract with Inhibitory Activity against Influenza A(H1N1)pdm09 Virus by Centrifugal Partition Chromatography (CPC)*. **Molecules**. v. 27, p. 399, jan. 2022. DOI: 10.3390/molecules27020399. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8781433/>. Acesso em: 19 abr 2023.

LEAL, C. M. *et al.* *Flavonoids from Siparuna cristata as Potential Inhibitors of SARS-CoV-2 Replication*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 5, p. 1-9, jul. 2021. DOI: 10.1007/s43450-021-00162-5. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8294293/>. Acesso em: 19 abr 2023.

LEITÃO, G. G; COSTA, F. das N. *Gradient Elution in Countercurrent Chromatography*. **Planta Med.** v. 81, n.17. DOI: 10.1055/s-0035-1546267. nov. 2015.

LEITÃO, G. G. *Uso da Cromatografia Contracorrente na obtenção de padrões de origem Vegetal*. **Revista Fitos**, v. 1, n. 2, p. 48-50, nov. 2005. DOI: 10.32712/2446-4775.2005.23. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19136>. Acesso em: 09 jun 2023.

LEITÃO, G. G. *et al.* *Kaempferol glycosides from Siparuna apiosyce*. **Phytochemistry**. v. 55, n. 6, p. 679-682, nov. 2000. DOI: 10.1016/s0031-9422(00)00222-3. PMID: 11130680.

LIU, Y. *et al.* *An overview of recent progress in solvent systems, additives and modifiers of counter current chromatography*. **New Journal of Chemistry**. v. 42, n. 9, abr. 2018. DOI:10.1039/C7NJ04747A.

MARSTON, A. & HOSTETTMANN, K. *Developments in the application of countercurrent chromatography to plant analysis*. **Journal of Chromatography A**. v. 1112, p. 181-194. 2006.

MARTIAS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J, B de. *Solubilidade das substâncias orgânicas*. **Química Nova**. v. 36, n. 8, p. 1248-1255. 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013000800026. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/9q5g6jWWTM987mDqVFjnSDp/?lang=pt#>. Acesso em: 19 abr 2023.

PARK, J. -Y. *et al.* *Chalcones isolated from Angelica keiskei inhibit cysteine proteases of SARS-CoV*. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**. v. 3, n. 1, p. 23-30, fev. 2015. DOI: 10.3109/14756366.2014.1003215. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25683083/>. Acesso em: 19 abr 2023.

PEIXOTO, A.L. *et al.* Siparunaceae in **Flora e Funga do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB14547>. Acesso em: 10 jun 2023.

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

RENNER, S.S; HAUSNER, G. Siparunaceae. *Flora Neotropica, Monograph*. **The New York Botanical Garden**. Bronx, Nova York. v. 95, p. 247, mar. 2005. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/4393941>. Acesso em: 10 jun 2023.

SHEHZAD, O. *et al.* *Application of stepwise gradients in counter-current chromatography: a rapid and economical strategy for the one-step separation of eight coumarins from Seseli resinosum*. **Journal of Chromatography A**. v. 1310, p.66-73, ago. 2013. DOI: 10.1016/j.chroma.2013.08.033.

SHIBUSAWA, Y. *et al.* *Three-phase solvent systems for comprehensive separation of a wide variety of compounds by high-speed counter-current chromatography*. **Journal of Chromatography A**. v. 1133, Issues 1–2, p. 119-125, nov. 2006.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0021967306015093>. Acesso em: 1 jun 2023.

VOGEL, A. I. *et al.* Química Orgânica: análise orgânica qualitativa. **LTC**. 6 ed., Ao Livro Técnico. Rio de Janeiro. mai, 2022.

YING, H. *et al.* *Ethyl acetate–n-butanol gradient solvent system for high-speed countercurrent chromatography to screen bioactive substances in okra*. **Journal of Chromatography A**. v. 1359, p. 117-123. 2004.