

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP
Faculdade de Ciências

VANESSA SVIZZERO FAKHOURY

**Desenvolvimento de metodologias verdes para análises do perfil
químico das folhas de espécies do gênero *Davilla* por cromatografia
líquida de alta eficiência**

Bauru
2017

VANESSA SVIZZERO FAKHOURY

Desenvolvimento de metodologias verdes para análises do perfil químico das folhas de espécies do gênero *Davilla* por cromatografia líquida de alta eficiência

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

VANESSA SVIZZERO FAKHOURY

Desenvolvimento de metodologias verdes para análises do perfil químico das folhas de espécies do gênero *Davilla* por cromatografia líquida de alta eficiência

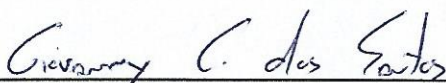
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química.

Aprovação: 14/02/2017

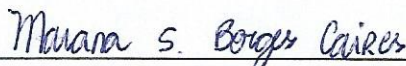
Banca Examinadora



Prof. Dr. Daniel Rinaldo
Faculdade de Ciências – Unesp, Bauru



Ms. Giovanny Carvalho dos Santos
Faculdade de Ciências – Unesp, Bauru



Ms. Maiara Stefanini Borges Caires
Faculdade de Ciências – Unesp, Bauru

Bauru, 14 de Fevereiro de 2017

“ Vá firme na direção da sua meta, porque o pensamento cria, o desejo atrai e a fé realiza. ”

(Lauro Trevisan)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por tudo!

Dedico este trabalho a minha família, pai, mãe e irmã, que sempre estiveram do meu lado, me apoiando e incentivando em todos os momentos de minha vida.

Agradeço imensamente aqueles que me fizeram estar aqui hoje e aos meus amigos de curso pela valiosa amizade, em especial, Amanda Cosmo, João Henrique Pelissari e Beatriz Germano.

Ao meu namorado, que tem estado sempre ao meu lado.

Agradeço ao meu orientador por todo o ensinamento, incentivo e confiança, ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes, Prof. Dr. Cristiano Soleo Funari, Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro e aos técnicos de laboratório da UNESP de Bauru, Ralph Moreira e David Souza por toda a ajuda para que esta pesquisa fosse realizada.

Ao CNPq/PIBIC pelo financiamento do projeto de pesquisa.

A todas as pessoas que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho, deixo os meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

A grande preocupação com a sustentabilidade vem fazendo pesquisadores estudarem práticas para diminuição da produção de resíduos tóxicos a fim de proteger desde o meio ambiente até a saúde humana. Bem como o avanço de técnicas para a preservação ambiental, a produção de fitoterápicos vem ganhando espaço e confiança da população no tratamento e cura de enfermidades. Em 2009, foi divulgada uma lista contendo 71 espécies medicinais com o intuito de nortear estudos no desenvolvimento de fitoterápicos, a chamada Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (Rennisus). Contudo, espécies nativas não relacionadas, porém com promissoras atividades farmacológicas, podem servir como opções para aumentar a lista Rennisus. Dentre essas espécies encontram-se a *Davilla elliptica* e *D. nitida*. Estudos dessas duas espécies do gênero *Davilla* relatam atividade antiulcerogênica. Contudo, esses trabalhos, da qual a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada por possuir a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma ampla quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em uma escala de tempo de poucos minutos, com alta eficiência, sensibilidade e resolução, faz uso de solventes tóxicos, como acetonitrila e metanol. Como são espécies com potencial para produção de fitoterápicos, o controle de qualidade rotineiro dos extratos das mesmas pode gerar grandes quantidades de resíduos tóxicos, podendo trazer sérios danos a saúde do analista e ao meio ambiente. Este trabalho descreve uma estratégia, racional e com números de experimentos reduzido de desenvolvimento de método cromatográfico para obtenção do perfil de *Davilla elliptica* e *D. nitida* por CLAE utilizando solventes e reagentes ambientalmente amigáveis. A metodologia de *clean-up* desenvolvida reduziu a quantidade de solventes em 40 vezes quando comparado com a literatura e o método de análise por CLAE-DAD foi capaz de separar os metabólitos majoritários dos infusos de *D. elliptica* e *D. nitida* utilizando etanol e água como fase móvel.

Palavras-chave: *Davilla elliptica*, *Davilla nitida*, química verde, CLAE-DAD, quimiometria

ABSTRACT

The great concern with sustainability has been causing researchers to study practices to reduce the production of toxic waste in order to protect from the environment to human health. As well as the advancement of techniques for environmental preservation, phytotherapeutic production has been gaining the public's trust in the treatment and cure of diseases. In 2009, a list containing 71 medicinal species was published in order to guide studies in the development of herbal medicines, the so-called National List of Medicinal Plants of Interest of SUS (Rennisus). However, unrelated native species with promising pharmacological activities can serve as options for increasing the Rennisus list. Among these species are *Davilla elliptica* and *D. nitida*. Studies of these two species of the genus *Davilla* report antiulcerogenic. However, such work, of which high performance liquid chromatography (HPLC) is the most used technique because it has the capacity to perform separations and quantitative analyzes of a large amount of compounds present in several types of samples, in a time scale of few minutes, with high efficiency, sensitivity and resolution, makes use of toxic solvents such as acetonitrile and methanol. As they are species with potential for phytotherapeutic production, the routine quality control of extracts from them can generate large amounts of toxic waste, which can cause serious damage to the health of the analyst and the environment. This work describes a rational strategy with reduced numbers of experiments, developing a chromatographic method to obtain the profile of *Davilla elliptica* and *D. nitida*, starting with the first species, using HPLC with solvents and environmentally friendly reagents. The developed clean-up methodology reduced the amount of solvents by 40 times when compared to the literature and the analysis method by HPLC-PAD was able to separate the major metabolites of the infusion of *D. elliptica* and *D. nitida* using ethanol and water as mobile phase.

Keywords: *Davilla elliptica*, *Davilla nitida*, green chemistry, HPLC, chemometrics

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

λ	Comprimento de onda
AcOEt	Acetato de etila
ACN	Acetonitrila
AcOH	Ácido acético
CCD	Planejamento de composto central
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos
EtOH	Etanol
GCFR	<i>Green Chromatographic Fingerprinting Response</i>
MeOH	Metanol
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
UV	Ultravioleta

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Davilla elliptica</i> (“lixieirinha”).....	14
Figura 2. <i>Davilla nitida</i> (“sambaibinha”).....	15
Figura 3. Cromatograma do perfil das folhas de <i>D. elliptica</i> do trabalho de referência.....	19
Figura 4. Preparação da amostra de <i>D. elliptica</i> e <i>D. nitida</i> para análise por CLAE-DAD..	20
Figura 5. Cromatograma do branco (MeOH 100%). Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.5, método de eluição descrito na seção 3.1; $\lambda = 254$ nm.....	22
Figura 6. Cromatograma da amostra preparada a partir do pó das folhas de <i>D. elliptica</i> de acordo com os procedimentos descritos no trabalho de referência. Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.5; método de eluição descrito na seção 3.1, $\lambda = 254$ nm.....	23
Figura 7. Comparação entre as quantidades dos solventes utilizados no <i>clean-up</i> do trabalho de referência e do nosso trabalho de pesquisa.....	24
Figura 8. Cromatogramas das análises da triagem de variáveis por CLAE (experimentos 1 ao 8).....	27
Figura 9. Cromatogramas das análises da triagem de variáveis por CLAE (experimentos 9 ao 16).....	28
Figura 10. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados para a resposta Número de picos.....	29
Figura 11. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados para a resposta GCFR.....	29
Figura 12. Cromatograma do perfil de <i>D. elliptica</i> aplicando as condições cromatográficas ótimas determinadas.; $\lambda = 254$ nm.....	32
Figura 13. Espectros UV dos picos 1 ao 8 do perfil cromatográfico das folhas de <i>D. elliptica</i>	33
Figura 14. Espectros UV dos picos 9 ao 16 do perfil cromatográfico das folhas de <i>D. elliptica</i>	34
Figura 15. Espectros UV dos picos 17 ao 19 do perfil cromatográfico das folhas de <i>D. elliptica</i>	35
Figura 16. Cromatograma do perfil de <i>D. nitida</i> aplicando as condições cromatográficas ótimas determinadas; $\lambda = 254$ nm.....	36
Figura 17. Espectros UV dos picos 1 ao 4 do perfil cromatográfico das folhas de <i>D. nitida</i>	36
Figura 18. Espectros UV dos picos 5 ao 12 do perfil cromatográfico das folhas de <i>D. nitida</i>	37

Figura 19. Espectros UV dos picos 13 ao 15 do perfil cromatográfico das folhas de <i>D. nitida</i>	38
--	----

ÍNDICE LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Fatores e níveis investigados na triagem de <i>D. elliptica</i> ($\frac{1}{2}$ fatorial com 2 níveis e 5 fatores: $2v^{5-1}$).....	24
Quadro 2. Resultados do planejamento fatorial fracionário $2v^{5-1}$ realizado para estudar influências de fatores cromatográficos de CLAE utilizando H ₂ O e EtOH como fase móvel na separação dos metabólitos secundários de <i>D. elliptica</i>	25
Quadro 3. Fatores e níveis incluídos no planejamento composto central para <i>D. elliptica</i>	30
Quadro 4. Quadro com as respostas obtidas pelas análises do CCD dos três fatores na separação dos metabólitos secundários de <i>D. elliptica</i>	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivos específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Pesquisa bibliográfica para seleção do trabalho de referência para análise do infuso das folhas de <i>D. elliptica</i>	18
3.2. Solventes utilizados.....	19
3.3. Coleta e identificação do material vegetal.....	19
3.4. Preparação das amostras (<i>Clean-up</i> das folhas de <i>D. elliptica</i> e <i>D. nitida</i>).....	19
3.5. Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	21
3.6. Programas utilizados.....	21
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	22
4.1. Reprodução do trabalho de referência.....	22
4.2. Caráter verde do preparo de amostras.....	23
4.3. Triagem de variáveis.....	24
4.4. Planejamento composto central (CCD) e ponto ótimo.....	30
4.5. Perfil cromatográfico de <i>D. elliptica</i>	32
4.6. Perfil cromatográfico de <i>D. nitida</i>	35
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
6. REFERÊNCIAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

Uma valiosa fonte de produtos para o cuidado da saúde humana são as plantas medicinais, que são usadas na busca do alívio de algum sintoma desagradável (SANTOS et al., 2007).

As plantas medicinais são utilizadas em comunidades tradicionais, como remédios caseiros, sendo consideradas a matéria-prima para fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos. Sem sombra de dúvidas, as plantas medicinais compõem parte da biodiversidade e são abundantemente utilizadas desde a existência da humanidade. Cerca de 80% da população mundial, principalmente dos países em desenvolvimento, confiam nos derivados de plantas medicinais para seus cuidados com a saúde, e, aproximadamente 25% de todas as prescrições médicas, são formulações baseadas em substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados destas (FIRMO et al., 2011).

“O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza, muitas vezes, o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais de todo mundo, mantém em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas as informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos.” (MACIEL et al., 2002, p. 429).

As populações nos países em desenvolvimento são destacadas por não terem acesso aos medicamentos industrializados, devido ao alto custo destes. Em consequência disto, as plantas medicinais e suas utilizações terapêuticas são cada vez mais utilizadas, em razão das suas capacidades curativas e por ser uma alternativa de baixo custo, tornando-as mais acessíveis (OLIVEIRA et al., 2010).

Na tentativa de se adaptarem as agressões do meio ambiente, as plantas geram uma ampla quantidade de substâncias naturais com potencial antimicrobiano e imunomodulador, tais como flavonóides e polifenóis, detectados nas plantas e que são presentes em alta quantidade na dieta humana. Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, incluindo atividades antioxidantes e propriedades imunomodulatórias (CARLOS et al., 2005).

Entre as espécies medicinais de destaque no bioma Cerrado estão a do gênero *Davilla*, especificamente no estado de São Paulo, conhecidas como *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*, cujas folhas são utilizadas popularmente para aliviar dores de estômago.

Davilla elliptica St. Hill (Figura 1), conhecida popularmente como “lixieirinha”, “lixeira”, “sambaibinha”, “muricizinho” e “bugre”, pertence à família Dilleniaceae. É um arbusto que atinge 1,5m à 3m de altura, possui folhas de pelos ásperos, flores amarelas e frutos secos redondos com coloração marrom-amarelada, encontrada no Cerrado brasileiro. A espécie *D. elliptica* pode ser utilizada para o tratamento de enfermidades, tais como diarreias, hérnias, hemorróidas e, até como antisséptico para a limpeza de ferimentos (SOARES et al., 2005).

Extrato metanólico das folhas de *D. elliptica* apresentaram mutagenicidade quando avaliados em ensaios *in vitro*, porém, a mesma atividade não foi observada em ensaios *in vivo* (BISO et al, 2010).

Os extratos metanólico e etanólico de *D. elliptica* podem modular a ativação de macrófagos e o efeito imunoestimulatório observado pode ser benéfico no aumento da imunidade em doenças infecciosas (CARLOS et al., 2005). Esses mesmos extratos apresentaram atividade antimicrobiana quando avaliados contra diversos microrganismos (MICHELIN et al., 2005).

Ainda, KUSHIMA e col. (2009) relataram que os extratos metanólicos das folhas de *D. elliptica* apresentaram expressiva atividade gastroprotetiva.



Figura 1. *Davilla elliptica* (“lixieirinha”).
Fonte: (KORNDORFER, 2006)

Estudos químicos relatam a presença de flavonóides glicosilados derivados da quercetina e miricetina, e ácido gálico no extrato metanólico das folhas de *D. elliptica* (RINALDO et al., 2006; RODRIGUES et al., 2008).

Davilla nitida (Figura 2) conhecida popularmente como “sambaibinha” ou “lixieirinha de rama”, também é uma planta que pertence à família Dilleniaceae. Nos estudos realizados por KUSHIMA e col. (2009), sua composição química é equivalente a encontrada em *D. elliptica*, onde derivados de ácido fenólico, flavonóides e taninos condensados foram identificados. Estes metabólitos secundários são envolvidos em diferentes atividades biológicas, incluindo efeitos gastroprotetores, sendo assim, utilizada na medicina popular para o tratamento de vários sintomas gastrointestinais.



Figura 2. *Davilla nitida* (“sambaibinha”).
Fonte: (Tropicos®)

Nesses estudos químicos citados observa-se a utilização de substâncias tóxicas nas análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), como acetonitrila, metanol e ácido trifluoroacético. A utilização desses solventes é comum na maioria dos estudos.

Para inserir a química de produtos naturais na nova filosofia global, que busca a diminuição de geração de poluentes, é necessário buscar uma alternativa que evite ou minimize a produção de resíduos tóxicos. Uma alternativa é a aplicação da química verde na análise de extratos vegetais.

Denomina-se química verde, este novo caminho da química, que tem em vista o desenvolvimento, a criação, aplicação de produtos e métodos para a eliminação ou redução do uso e geração de substâncias tóxicas. Ademais, também visa o desenvolvimento sustentável, benefícios ambientais, aumento no rendimento e diminuição na formação de subprodutos. Consequentemente, apresentando um impacto econômico,

devido à diminuição de gastos com o armazenamento e tratamento de resíduos (PRADO, 2003).

Seis princípios são descritos por Chemat, Vian e Cravotto (2012) para a extração de produtos naturais na aplicação da química verde:

- **Princípio 1:** Inovação através da seleção de recursos vegetais renováveis.
- **Princípio 2:** Uso de solventes alternativos e, principalmente, de água ou agro-solventes.
- **Princípio 3:** Redução consumo de energia por meio da recuperação de energia e utilização de tecnologias inovadoras.
- **Princípio 4:** Produção de co-produtos, em vez de resíduos a incluir a bio-industria e agro-refino.
- **Princípio 5:** Redução de operações unitárias e processos robustos e controlados.
- **Princípio 6:** Obtenção de extratos vegetais não desnaturados, biodegradáveis e sem contaminantes.

A aplicação do princípio 2 citado por Chemat, Vian e Cravotto (2012) pode ser realizada, por exemplo, nas análises de extratos vegetais pela Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A quimiometria faz o uso de ferramentas estatísticas e matemáticas para o planejamento e otimização das condições experimentais e também, para a extração de informações químicas relevantes de dados químicos multivariados (RIBEIRO et al., 2007).

A estratégia de utilizar uma triagem de variáveis utilizando-se planejamento fatorial fracionário é útil pelo fato de discriminar entre variáveis significativas e não significativas no processo a ser estudado, em um número reduzido de experimentos em comparação com um planejamento fatorial completo. Assim, este planejamento pode ser considerado uma opção mais sustentável em comparação com um planejamento fatorial completo para a etapa de triagem de variáveis. Este tipo de planejamento demanda menos recursos, tais como solventes e energia. A otimização das condições cromatográficas - Planejamento composto central (CCD) requer um número menor de experimentos, proporcionando resultados comparáveis. Os resultados obtidos pela execução do planejamento CCD providenciam informações que contribuem para o desenvolvimento de um modelo matemático capaz de encontrar um ponto ótimo que mostrará quais os melhores valores para os fatores (parâmetros cromatográficos) avaliados (FUNARI et al., 2014).

2. OBJETIVOS

Desenvolver métodos de análise para obtenção do perfil cromatográfico de *D. elliptica* e *D. nitida* por CLAE-DAD que sejam menos impactantes ambientalmente.

2.1. Objetivos específicos

- 1) Escolher um trabalho de referência que possua o melhor perfil cromatográfico por CLAE das folhas de *D. elliptica* para comparação com o método verde a ser desenvolvido;
- 2) Reproduzir o trabalho de referência selecionado;
- 3) Desenvolver métodos de preparação de amostra (*clean-up*) utilizando conceitos de química verde;
- 4) Realizar uma triagem de variáveis, aplicando o planejamento fatorial, para determinar os parâmetros cromatográficos que possuem maior influência na separação dos metabólitos secundários polares das folhas de *D. elliptica*;
- 5) Desenvolver o planejamento do Composto Central para obter o modelo matemático capaz de determinar as condições ótimas de análise dos metabólitos secundários polares das folhas de *D. elliptica* por CLAE-DAD;
- 6) Comparar, com as condições ótimas calculadas para CLAE, os perfis cromatográficos de *Davilla elliptica* e *Davilla nitida*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pesquisa bibliográfica para seleção do trabalho de referência para análise do infuso das folhas de *D. elliptica*

Foram realizadas consultas minuciosas de artigos que envolviam métodos de análise de *D. elliptica* por CLAE nas bases de dados: Scielo, *Web of Science*, Google Scholar, SciFinder e Athena (base de dissertações e teses da UNESP).

Com base em critérios cromatográficos como método de análise, fase móvel, fase estacionária, vazão, temperatura, parte da planta utilizada para extração e número de picos obtidos no cromatograma, foi escolhido como referência o trabalho dos autores RODRIGUES e colaboradores (2008).

Nesse trabalho os autores estudaram as folhas de *D. elliptica* e a preparação das amostras foi por infusão: 100 g de pó das folhas foram embebidos em 1000 mL de água fervente por 10 min. Posteriormente foi realizada a filtração em papel de filtro.

A solução filtrada foi submetida a extração líquido-líquido com acetato de etila e H₂O na proporção 1:1 (v/v).

A porção orgânica foi separada, seca e ressuspensa em 50 mL da mistura metanol:água (7:3, v/v) e alíquotas de 10 mL foram aplicadas em cartucho sep-pack C₁₈, pré-condicionados com 200 mL de metanol e 100 mL de água. O cartucho foi eluído com 50 mL de metanol e a fração coletada foi seca e ressuspensa em 10 mL de metanol:água (7:3, v/v), filtrada em microfiltros de 0,45 µm e injetada no sistema CLAE.

Nas análises por CLAE foi utilizada uma coluna Varian C₁₈ (250 x 4,60 mm d.i., 4 µm), como fase estacionária, e a fase móvel foi composta por H₂O+0,05% de ácido trifluoroacético [(TFA), solvente A] e acetonitrila+0,05% de TFA (solvente B).

O método de análise do trabalho de referência possui tempo total de 55 minutos, com vazão de 1,0 mL.min⁻¹, cuja programação de eluição é 85:15 (A:B) em 0 min variando para 78:22 (A:B) até 25 min, posteriormente variando de 78:22 (A:B) a 60:40 (A:B) em 15 min, de 60:40 (A:B) a 22:78 (A:B) em 5 min, de 22:78 (A:B) a 0:100 (A:B) em 5 min e 100% de B por mais 5 min.

O cromatograma obtido pelos autores do artigo selecionado apresentou 15 picos (Figura 3).

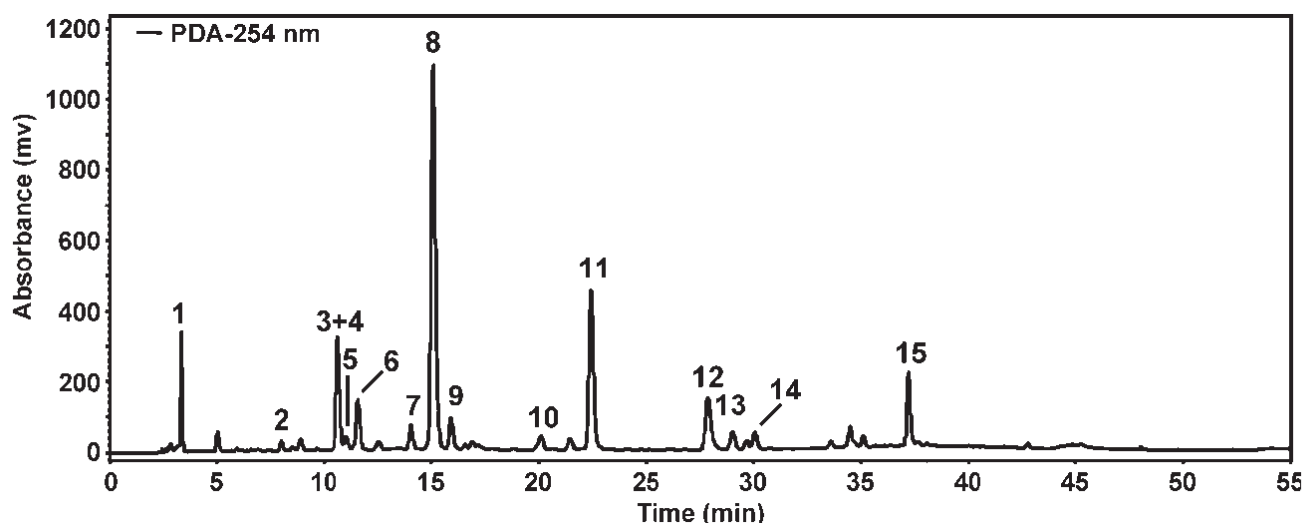


Figura 3. Cromatograma do perfil das folhas de *D. elliptica* do trabalho de referência.
 Fonte: Rodrigues et al., 2008

3.2. Solventes utilizados

Solventes grau HPLC: Acetonitrila (ACN), Ácido acético (AcOH), Ácido trifluoroacético (TFA), etanol (EtOH) e metanol (MeOH), todos da marca (TEDIA®) e água ultrapura.

Solventes grau PA: EtOH (Synth®) e Acetato de etila (AcOEt, Vetec Sigma-Aldrich®).

3.3. Coleta e identificação do material vegetal

A coleta de folhas de *D. elliptica* e *D. nitida* foi realizada em Agosto de 2002 em Palmas–TO na estrada de Monte do Carmo pela Profa. Dra. Clélia A. H. Lima do Instituto de Biociências da UNESP de Botucatu-SP. Para montagem da exsicata foi coletado o material fértil da espécie, identificado pela Profa. Dra. Solange Lolis e depositada no Herbário da Universidade Federal de Tocantins, com os seguintes números de voucher: *D. elliptica* St. Hill (Dilleniaceae) TO4593, *D. nitida* Vahl. (Dilleniaceae) TO3849.

O material coletado foi armazenado em freezer à -80°C sob proteção da luz.

3.4. Preparação das amostras (*Clean-up* das folhas de *D. elliptica* e *D. nitida*)

Pelo fato da composição química das folhas de *D. elliptica* ser qualitativamente semelhante à composição das folhas de *D. nitida*, optou-se por realizar o desenvolvimento do método verde utilizando apenas o infuso das folhas de *D. elliptica*.

As amostras foram preparadas simulando o preparo popular: em 2,5 g do pó da planta padronizado foi adicionado 25mL de água a 80°C (proporção 1:10), dando origem

ao infuso de cada planta estudada (*D. elliptica* e *D. nitida*). Em seguida, foi realizada a filtração e resultou em 20mL de cada infuso que foi submetido a extração líquido-líquido e assim, 20mL de Acetato de etila (AcOEt) foi adicionado em cada infuso, resultando em duas fases. A fração acetato de cada infuso foi retirada e seca a 40°C. As amostras foram solubilizadas em 1,25mL de EtOH/H₂O 7:3 (v/v).

Posteriormente foi realizada extração em fase sólida utilizando cartucho de C₁₈ (500 mg/3mL, Phenomenex® Strata C₁₈-E, 55um) ativado com 3 mL de EtOH e ambientado com 3 mL da mistura EtOH/H₂O (7:3, v/v). A amostra de cada planta foi adicionada em cartuchos diferentes e eluídas com 3 mL de EtOH/H₂O 7:3, conforme Figura 4, originando a fr. 7:3 de *D. elliptica* e fr.7:3 de *D. nitida*. A fração (fr.7:3) proveniente do *clean-up* foi filtrada em micro-filtro com poros de 0,45 µm (PTFE, Phenomenex®) e alíquotas de 12 µL foram injetadas no sistema CLAE.

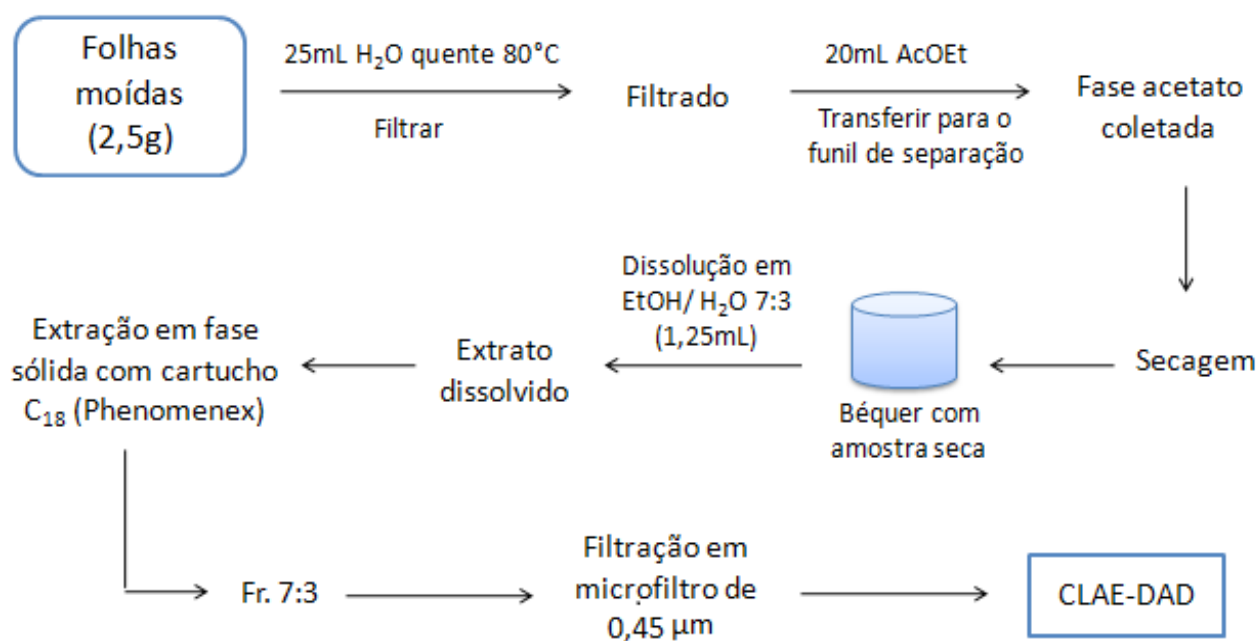


Figura 4. Preparação da amostra de *D. elliptica* e *D. nitida* para análise por CLAE-DAD.

3.5. Equipamento de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O equipamento utilizado para as análises por CLAE foi um Jasco® (bomba PU-2089S Plus, amostrador AS-2055 Plus, forno de coluna CO-2060 Plus), composto por um sistema de solvente binário, sendo solvente A ($H_2O + 0,25\%$ de AcOH) e solvente B (EtOH) e detector de arranjo de fotodiodos (DAD, Jasco MD-2015 Plus).

Para as análises de reprodução do trabalho de referência utilizou-se uma coluna Varian C_{18} (250 x 4,60 mm d.i., 4 μm).

Para as análises da triagem de variáveis (planejamento fatorial fracionário) utilizou-se uma coluna de fase reversa XBrigde (150 x 4,6 mm, 5 μm), pré-coluna (4 x 3 mm, 5 μm).

3.6. Programas utilizados

Para o controle do equipamento de CLAE foi utilizado o programa ChromPass® versão 1.8.

No processamento dos cromatogramas e contagem dos picos foi utilizado o programa livre OpenChrom® versão 1.1.

O tratamento estatístico realizado no planejamento fatorial fracionário foi realizado no programa livre de estatística GNU Octave® versão 4.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Reprodução do trabalho de referência

O trabalho de referência utilizado foi da espécie *D. elliptica* por possuir maior número de trabalhos publicados e por possuir composição química semelhante à da espécie *D. nitida* (RODRIGUES, 2007; KUSHIMA et al., 2009).

A reprodução do trabalho de referência foi realizada para observarmos se nossas condições climáticas, reagentes e marca de equipamentos não interferem nas análises e, portanto, seja possível realizar uma comparação com o novo método verde desenvolvido.

Antes de iniciar cada análise, foi realizada uma análise do branco para detectar possíveis contaminantes nos solventes utilizados no preparo das amostras.

A solução do branco utilizada foi metanol grau HPLC, eluído em cartucho de C₁₈. O branco foi analisado por CLAE-DAD com método de eluição descrito na seção 3.1. No cromatograma obtido (Figura 5) foram observado picos com áreas muito baixas, podendo ser classificados como ruídos em 254 nm, desconsiderando os sinais referentes ao volume morto (tempo morto = 2,6 min). Desse modo, evidenciou-se a ausência de contaminantes, tanto no metanol quanto nos solventes utilizados na fase móvel do sistema CLAE (ACN e TFA).

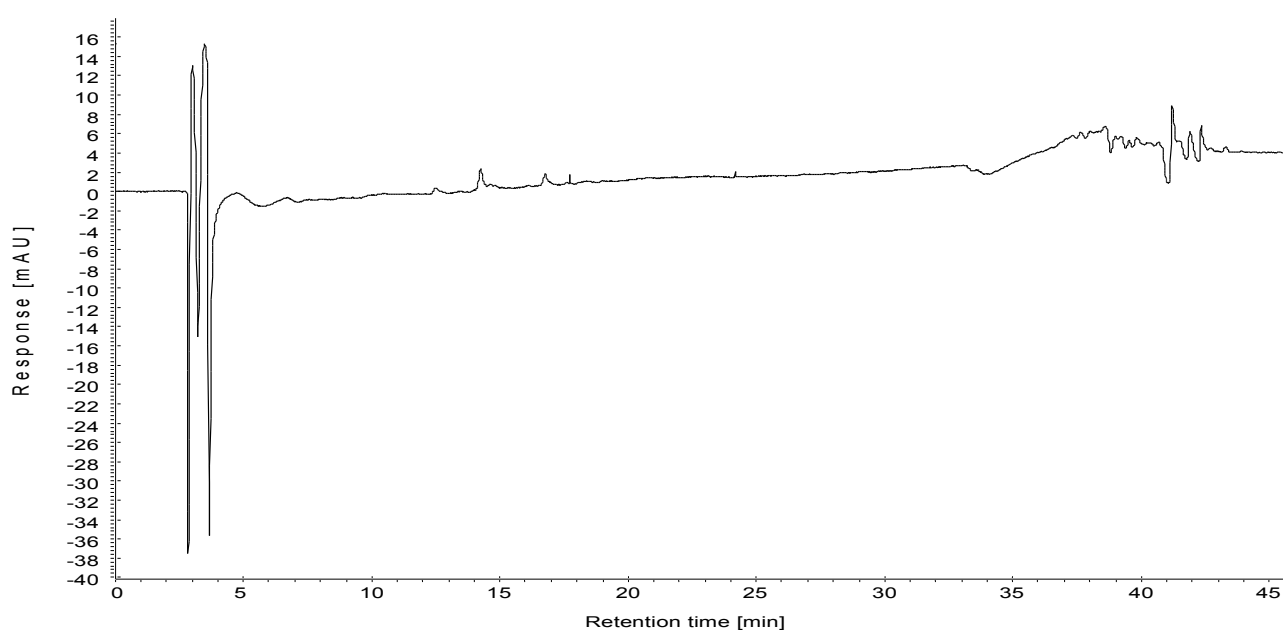


Figura 5. Cromatograma do branco (MeOH 100%). Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.5, método de eluição descrito na seção 3.1; $\lambda = 254$ nm.

Na análise da amostra, obtida pelos procedimentos descritos no trabalho de referência (RODRIGUES et al., 2008), foi possível observar diferenças mínimas no tempo de retenção e na área relativa dos picos (Figura 6) quando comparado com o cromatograma do trabalho de referência (Figura 3).

Pela análise dos espectros UV e tempo de retenção das substâncias da amostra preparada na reprodução foi possível identificar e relacionar, por comparação, com os dados cromatográficos e espectroscópicos do trabalho de referência. Os picos majoritários no cromatograma obtido foram numerados de acordo com o trabalho de referência (Figura 3). Não foi possível identificar a substância 15.

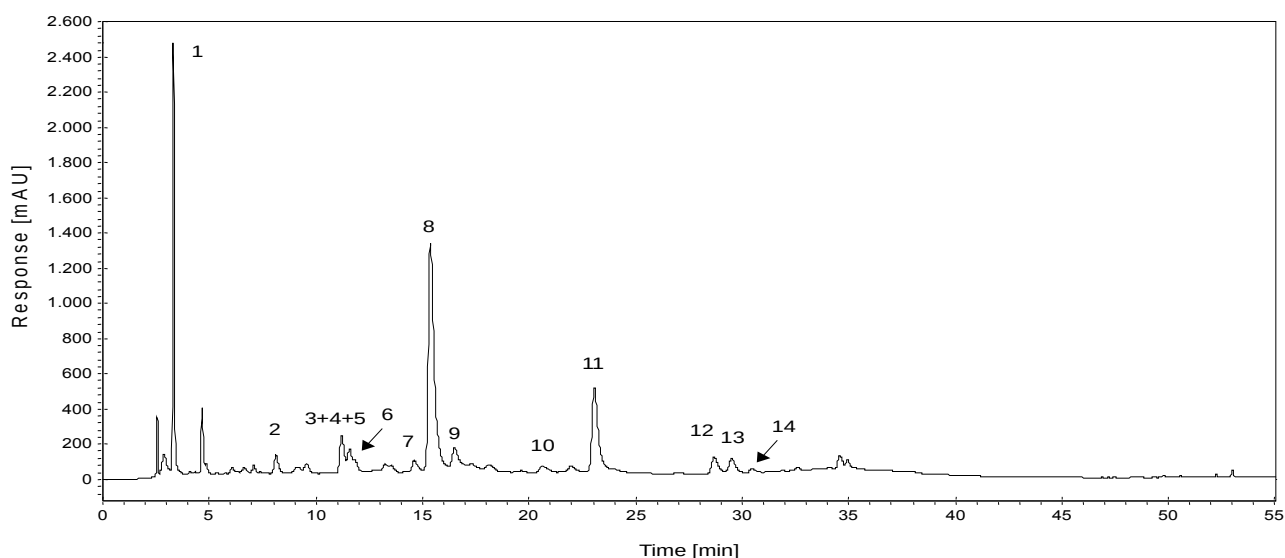


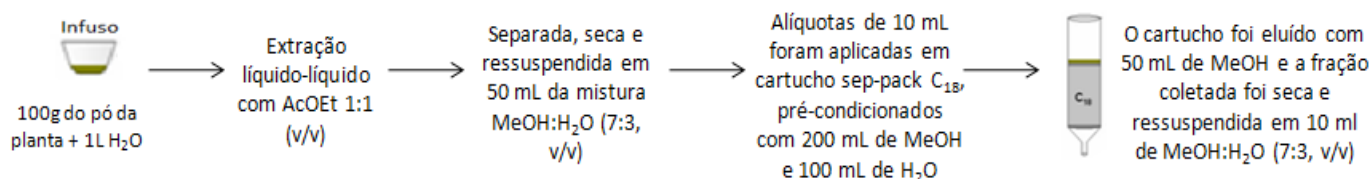
Figura 6. Cromatograma da amostra preparada a partir do pó das folhas de *D. elliptica* de acordo com os procedimentos descritos no trabalho de referência. Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.5; método de eluição descrito na seção 3.1, $\lambda = 254$ nm.

4.2. Caráter verde do preparo de amostras

O *clean-up* dos infusos foi uma miniaturização do trabalho de referência (seção 3.1) com diminuição de 40 vezes no consumo dos solventes utilizados (Figura 7), porém com a substituição do metanol pelo etanol (seção 3.4).

O solvente AcOEt já possui caráter verde de acordo com a *American Chemical Society* (ACS) (HENDERSON et al., 2011) e por essa razão manteve-se o AcOEt.

Trabalho de referência



Trabalho de pesquisa

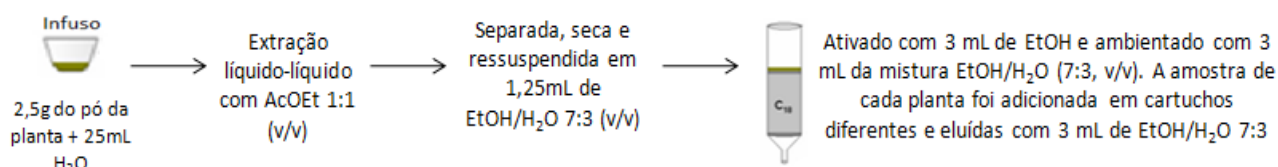


Figura 7. Comparação entre as quantidades dos solventes utilizados no *clean-up* do trabalho de referência e do nosso trabalho de pesquisa.

4.3. Triagem de variáveis

A triagem de variáveis foi realizada pelo planejamento fatorial fracionário com dois níveis (-1 e +1) e cinco fatores (X1, X2, X3, X4 e X5, Quadro 1). Os valores dos níveis das variáveis foram estipulados baseado nos tempos de retenção da primeira e última substância eluída no cromatograma da análise por CLAE da reprodução do trabalho de referência (Figura 6).

Quadro 1. Fatores e níveis investigados na triagem de *D. elliptica* (2^{5-1} fatorial com 2 níveis e 5 fatores: $2v^{5-1}$).

Fatores	Níveis	
	-1	+1
X1. % Inicial de EtOH	5	20
X2. Tempo de análise (min)	25	50
X3. Temperatura de análise (°C)	35	80
X4. % de AcOH no solvente A	0	0.5
X5. Vazão (mL min ⁻¹)	0.6	1.0

Visando eluir todas as substâncias da fr.7:3 de *D. elliptica* foi estipulado a porcentagem final de etanol como sendo 100% para todos os experimentos.

Para calcular os efeitos de cada fator estudado e suas combinações, foram analisadas duas respostas: número de picos total no cromatograma e a distribuição dos mesmos ao longo do cromatograma (*Green Chromatographic Fingerprinting Response*),

GCFR, desenvolvido pelo nosso grupo de pesquisa (FUNARI et al., 2014), cujos resultados estão apresentados no Quadro 2 e os cromatogramas nas Figuras 8 e 9. Quanto maior o número de picos presentes no cromatograma e estes estiverem bem distribuídos ao longo deste, melhor é o cromatograma.

Quadro 2. Resultados do planejamento fatorial fracionário $2_{v^{5-1}}$ realizado para estudar influências de fatores cromatográficos de CLAE utilizando H₂O e EtOH como fase móvel na separação dos metabólitos secundários de *D. elliptica*.

Experimentos	X1	X2	X3	X4	X5	Nº picos	GCFR (x=2)
1	-1	-1	-1	-1	+1	18	8,6
2	+1	-1	-1	-1	-1	16	13,7
3	-1	+1	-1	-1	-1	23	0
4	+1	+1	-1	-1	+1	13	4,6
5	-1	-1	+1	-1	-1	14	0
6	+1	-1	+1	-1	+1	05	0
7	-1	+1	+1	-1	+1	15	6
8	+1	+1	+1	-1	-1	06	2,2
9	-1	-1	-1	+1	-1	16	13,7
10	+1	-1	-1	+1	+1	16	6,8
11	-1	+1	-1	+1	+1	26	17,6
12	+1	+1	-1	+1	-1	15	0
13	-1	-1	+1	+1	+1	11	0
14	+1	-1	+1	+1	-1	07	0
15	-1	+1	+1	+1	-1	13	20
16	+1	+1	+1	+1	+1	07	1,4

Pela comparação dos experimentos obtidos, a melhor combinação de variáveis apresentada foi o Experimento 11, com 26 picos e um valor GCFR de 17,6.

Como é possível observar no gráfico normal da resposta número de picos (Figura 10), os contrastes que apresentaram efeitos significativos foram os dos fatores X1 (% inicial de EtOH) e X3 (Temperatura de análise). No gráfico normal da resposta GCFR (Figura 11) os contrastes que apresentaram efeitos significativos foram os dos fatores X13 (interação entre % inicial EtOH e Temperatura) e X35 (interação entre temperatura e vazão).

Em ambas respostas, os fatores X1 e X3 foram significativos na separação dos metabólitos. A % inicial de EtOH (X1) interferiu diretamente na força de eluição da fase móvel e o fator temperatura (X3), em teoria, era esperado que os maiores níveis de X3 seriam melhores, pois afinariam os picos e aumentariam a eficiência (difusão mais rápida dos analitos, com estabelecimento de um prato teórico mais rapidamente). Porém, a alta temperatura forçou a eluição prematura de alguns compostos, deslocando a maior parte

para a primeira metade do cromatograma, prejudicando assim a distribuição no cromatograma. Porém, a combinação entre esses fatores (X13) interfere significativamente na distribuição dos picos no cromatograma.

Por fim, o fator X35, referente a interação entre os fatores X3 e X5 (Temperatura de análise e vazão), apresentou efeito significativo apenas na distribuição dos picos (a resposta GCFR, Figura 11). Possivelmente uma maior temperatura e uma maior vazão diminui significativamente o tempo de retenção dos metabólitos das folhas de *D. elliptica*, assim como o inverso aumenta significativamente o tempo de retenção desses metabólitos. O parâmetro X5 pode ser considerado estatisticamente de pouca interferência, porém sua presença na fase móvel é importante na distribuição dos picos.

Outro fator que pode ter contribuído para a eluição dos metabólitos das folhas de *D. elliptica* na primeira metade do cromatograma é a % final de EtOH que foi estabelecida com valor de 100% e pode ter provocado um grande aumento na força de eluição da fase móvel, ocasionando assim valores baixos para a resposta GCFR.

Essa distinção não significa que os demais fatores cromatográficos (X2, X4 e X5) sejam descartáveis, mas sim que a variação dos mesmos interferem com menor magnitude na separação dos constituintes químicos da decocção das partes aéreas de *D. elliptica*, quando utiliza-se misturas de EtOH e H₂O como fase móvel.

Com isso, um valor para cada um desses três fatores pode ser fixado de maneira que as análises sejam realizadas em um menor tempo e com menor consumo de solventes, convergindo assim com os princípios da química verde. Portanto, os valores dessas variáveis foram fixados dentro da faixa investigada: Tempo de análise (X2) em 20 min, porcentagem de AcOH (X4) em 0,25% e vazão da fase móvel (X5) em 0,85 mL/min.

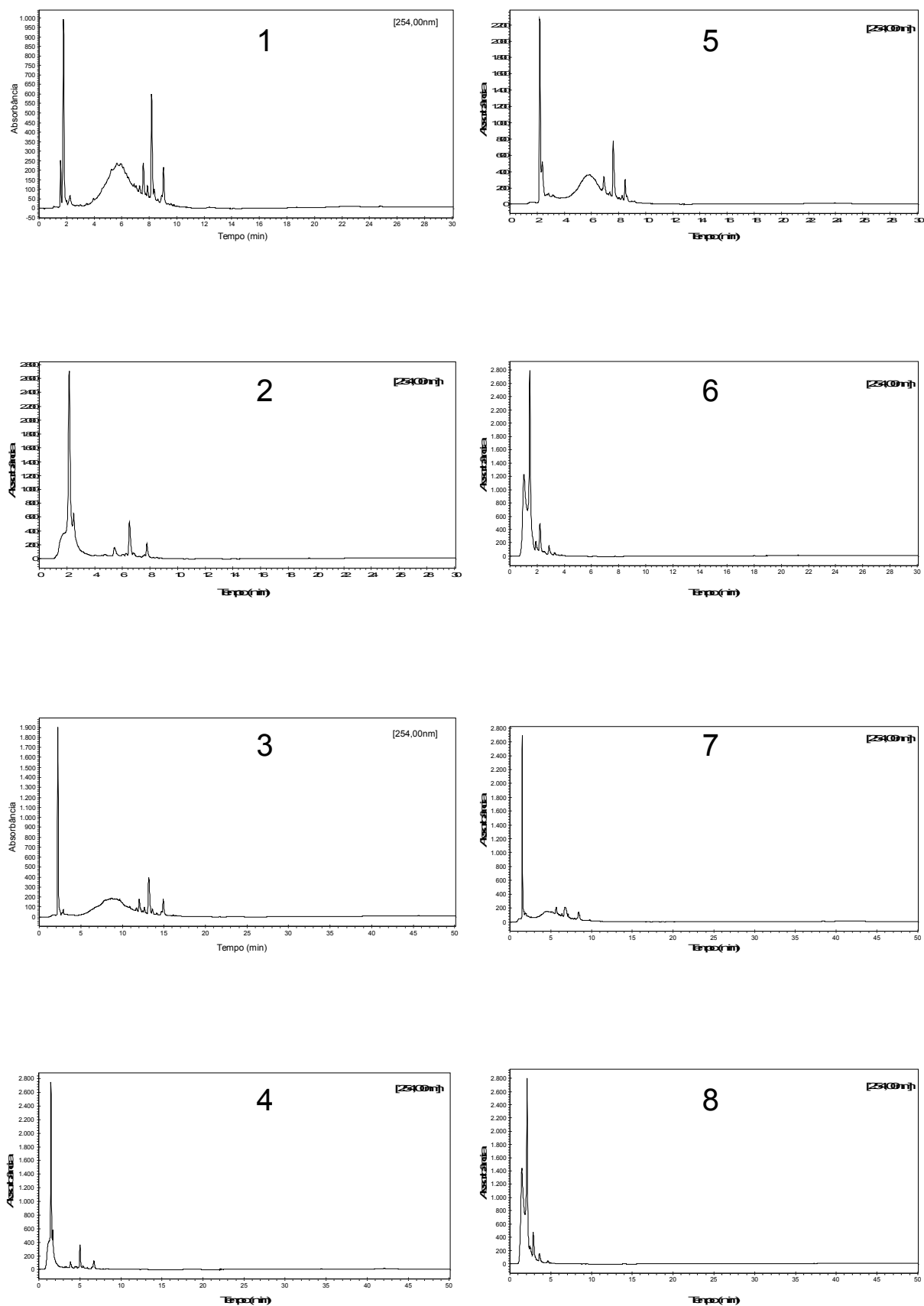


Figura 8. Cromatogramas das análises da triagem de variáveis por CLAE (experimentos 1 ao 8).

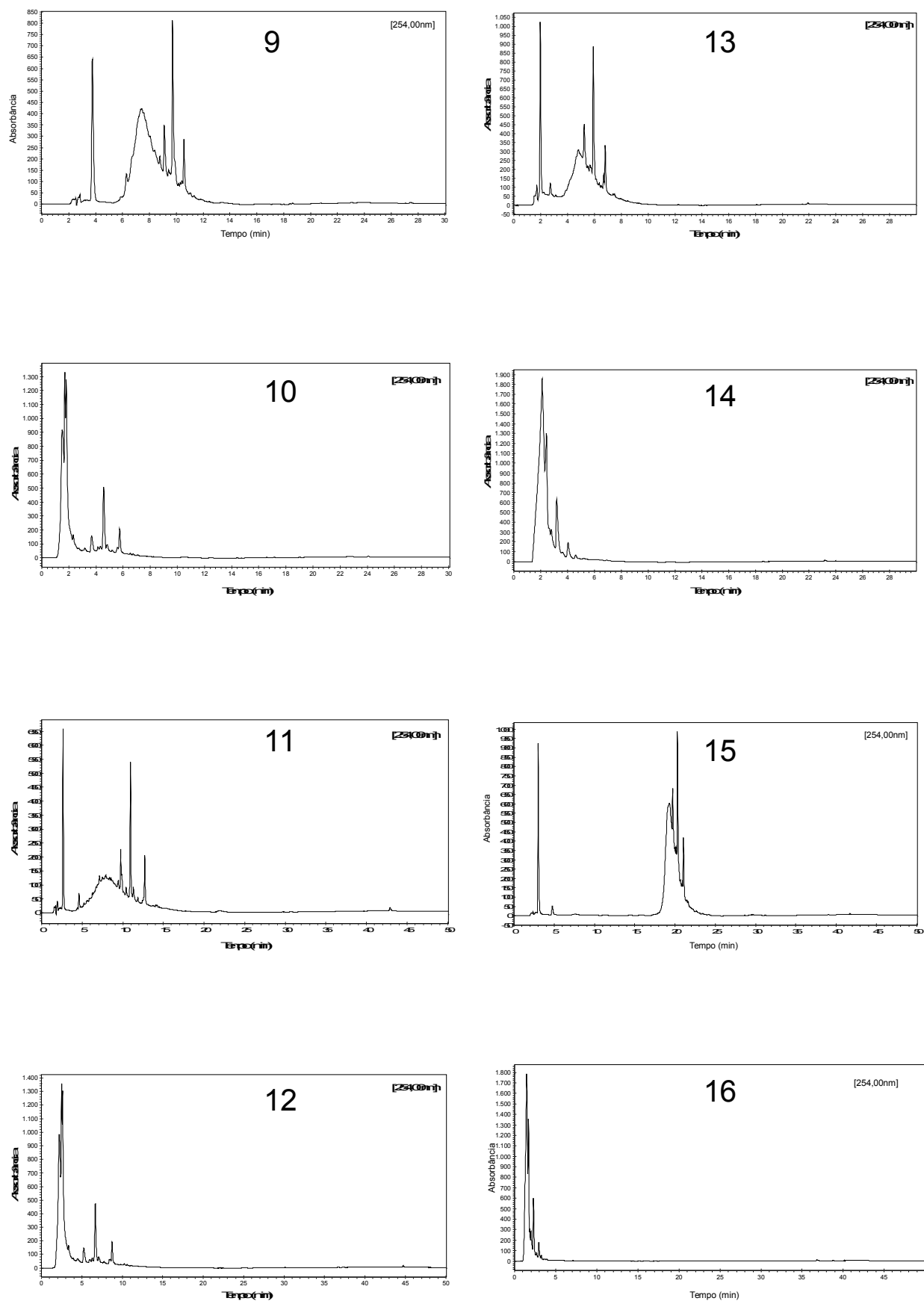


Figura 9. Cromatogramas das análises da triagem de variáveis por CLAE (experimentos 9 ao 16).

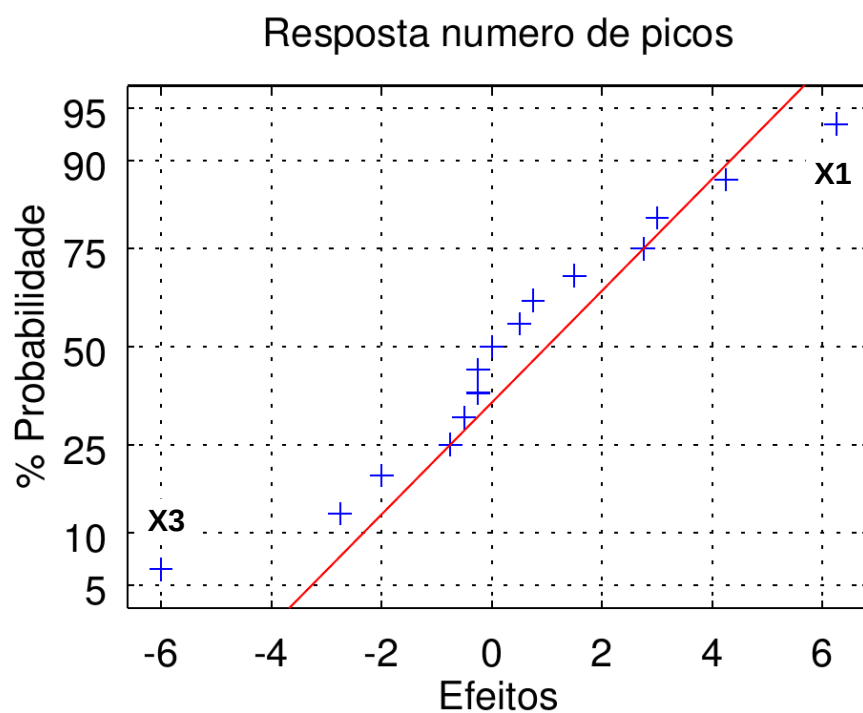


Figura 10. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados para a resposta Número de picos.

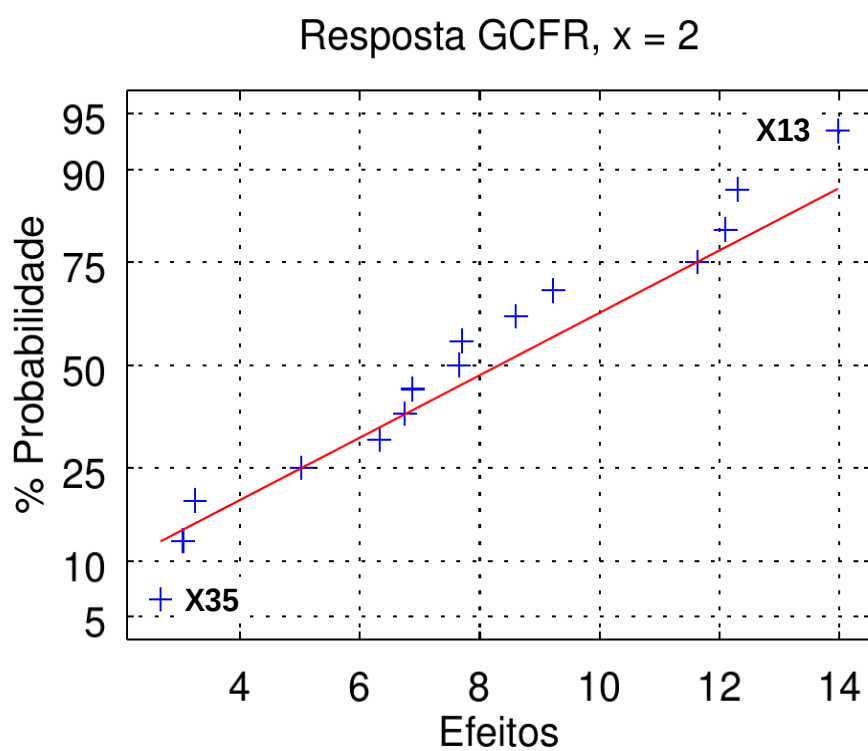


Figura 11. Gráfico normal dos valores dos efeitos calculados para a resposta GCFR.

4.4. Planejamento composto central (CCD) e ponto ótimo

Nesse novo planejamento foi inserida uma nova variável, a % Final de EtOH (X6) pelos motivos discutidos na seção 4.3.

Uma vez que as variáveis de maior relevância (X1, X3 e X6, agora sendo como % Final de EtOH) foram determinadas, um CCD foi aplicado para obtenção de um modelo matemático capaz de calcular as condições ótimas de análise dessas variáveis por CLAE.

O Quadro 3 mostra as variáveis envolvidas neste novo conjunto experimental, bem como os seus níveis. CCD é uma alternativa melhor ao fatorial completo de três níveis, que requer um número menor de experimentos do que este, proporcionando resultados comparáveis. Assim, requer menos recursos, tais como solvente e gasto de energia.

Quadro 3. Fatores e níveis incluídos no planejamento composto central para *D. elliptica*.

Fatores	Unidade	-1.68	-1	0	+1	+1.68
X1.% Inicial % of EtOH	% (v/v)	5	7	10	13	15
X3. Temperatura de análise (°C)	°C	30	40	55	70	80
X6. % Final de EtOH	% (v/v)	30	36	45	54	60

Após as respostas obtidas pelas análises do CCD, (Quadro 4) permitiu-se obter o seguinte modelo matemático:

$$y = 21,7 - 23,7 \cdot X_1 - 27,1 \cdot X_3 - 17,5 \cdot X_6 + 31,8 \cdot X_1 X_3 + 21,7 \cdot X_1 X_6 + 26,1 \cdot X_3 X_6 - 21,7 \cdot X_1 X_3 X_6$$

com $R^2 = 0,84$.

Com o modelo matemático foi possível encontrar um ponto ótimo, os melhores valores para os fatores (parâmetros cromatográficos) avaliados. Assim, o melhor método de eluição por CLAE obtido foi um gradiente com H₂O+0,25% AcOH (A) etanol (B), variando 95:5 (A:B) a 55:45 (A:B) em 20 min, a 30°C, com vazão de 0,85 mL min⁻¹.

Quadro 4. Quadro com as respostas obtidas pelas análises do CCD dos três fatores na separação dos metabólitos secundários de *D. elliptica*.

Experimentos	X1	X3	X6	Nº picos	GCFR (x=2)
1	-1	-1	-1	21	231,5
2	+1	-1	-1	13	20,0
3	-1	+1	-1	15	0
4	+1	+1	-1	09	0
5	-1	-1	+1	19	40,3
6	+1	-1	+1	14	0
7	-1	+1	+1	14	0
8	+1	+1	+1	08	0

9	-1,68	0	0	20	70,6
10	1,68	0	0	12	0
11	0	-1,68	0	17	52,6
12	0	1,68	0	10	0
13	0	0	-1,68	13	20,0
14	0	0	1,68	13	0
CP1	0	0	0	13	9.2
CP2	0	0	0	13	0
CP3	0	0	0	15	12.1
CP4	0	0	0	13	0
CP5	0	0	0	12	0

4.5. Perfil cromatográfico de *D. elliptica*

Como é possível observar no cromatograma (Figura 12) e nos espectros UV dos metabólitos majoritários (Figura 13-15) o método desenvolvido apresentou seletividade que permite a identificação inequívoca das substâncias eluídas, com resolução próxima a do cromatograma apresentado no trabalho de referência (RODRIGUES et al., 2008).

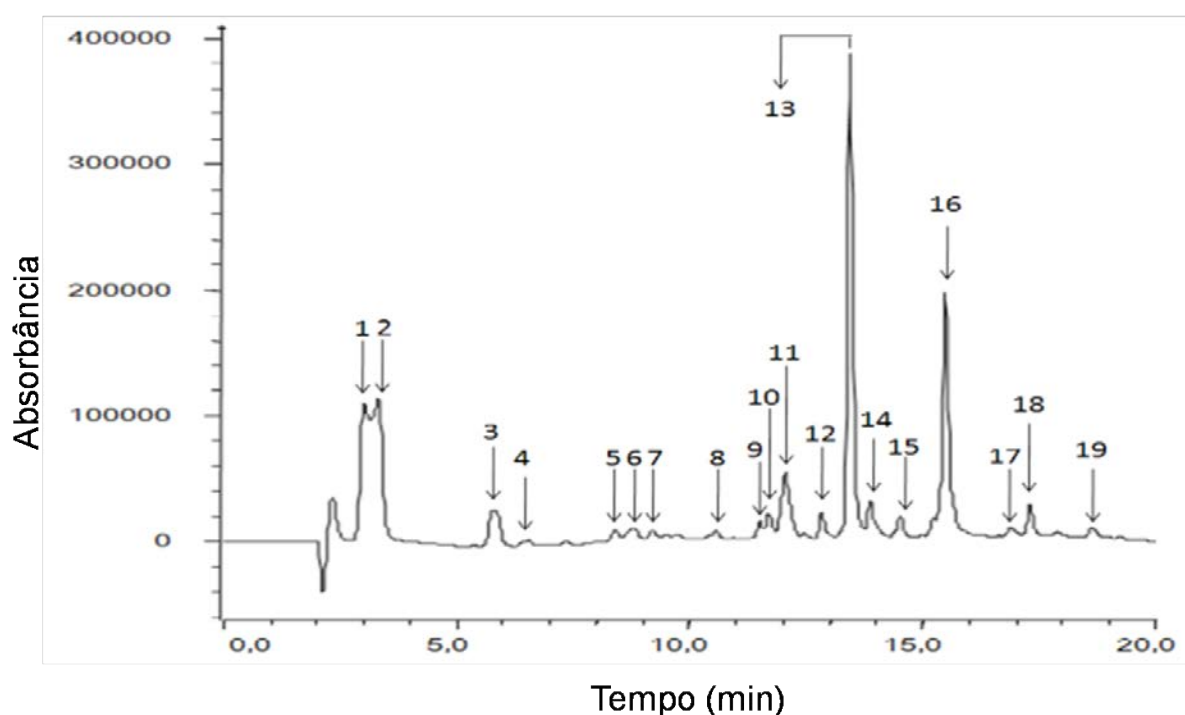


Figura 12. Cromatograma do perfil de *D. elliptica* aplicando as condições cromatográficas ótimas determinadas.; $\lambda = 254 \text{ nm}$.

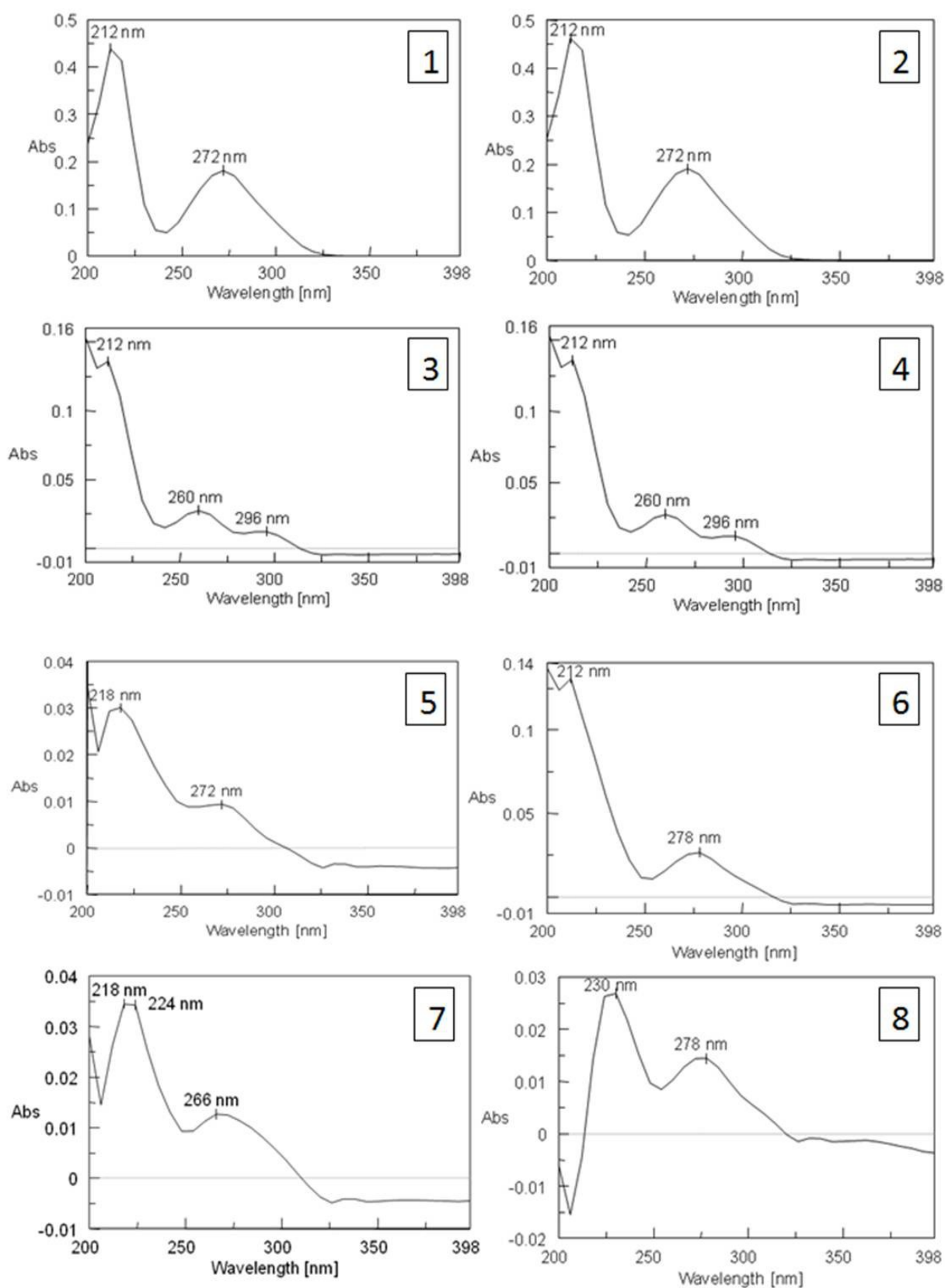


Figura 13. Espectros UV dos picos 1 ao 8 do perfil cromatográfico das folhas de *D. elliptica*.

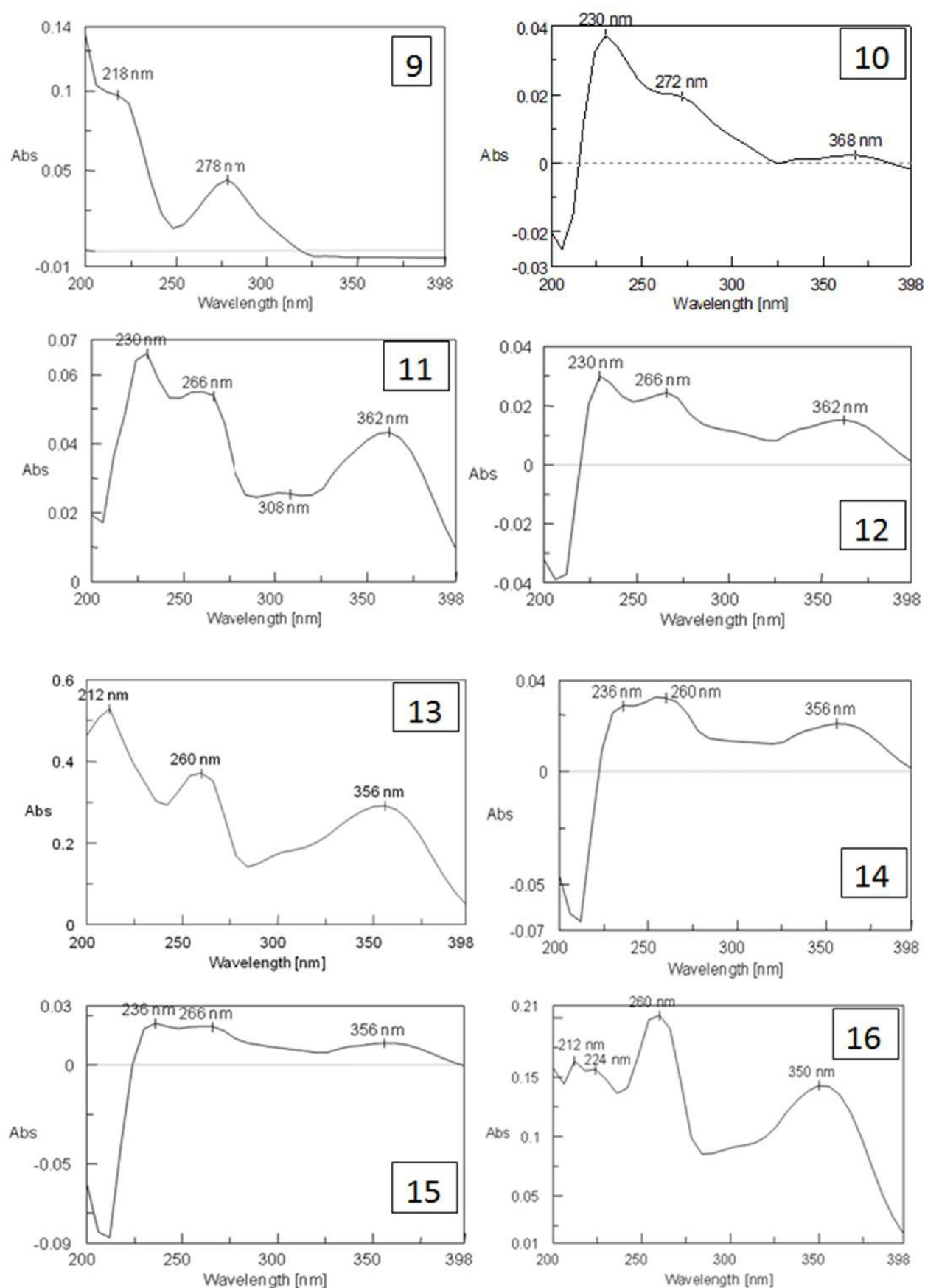


Figura 14. Espectros UV dos picos 9 ao 16 do perfil cromatográfico das folhas de *D. elliptica*.

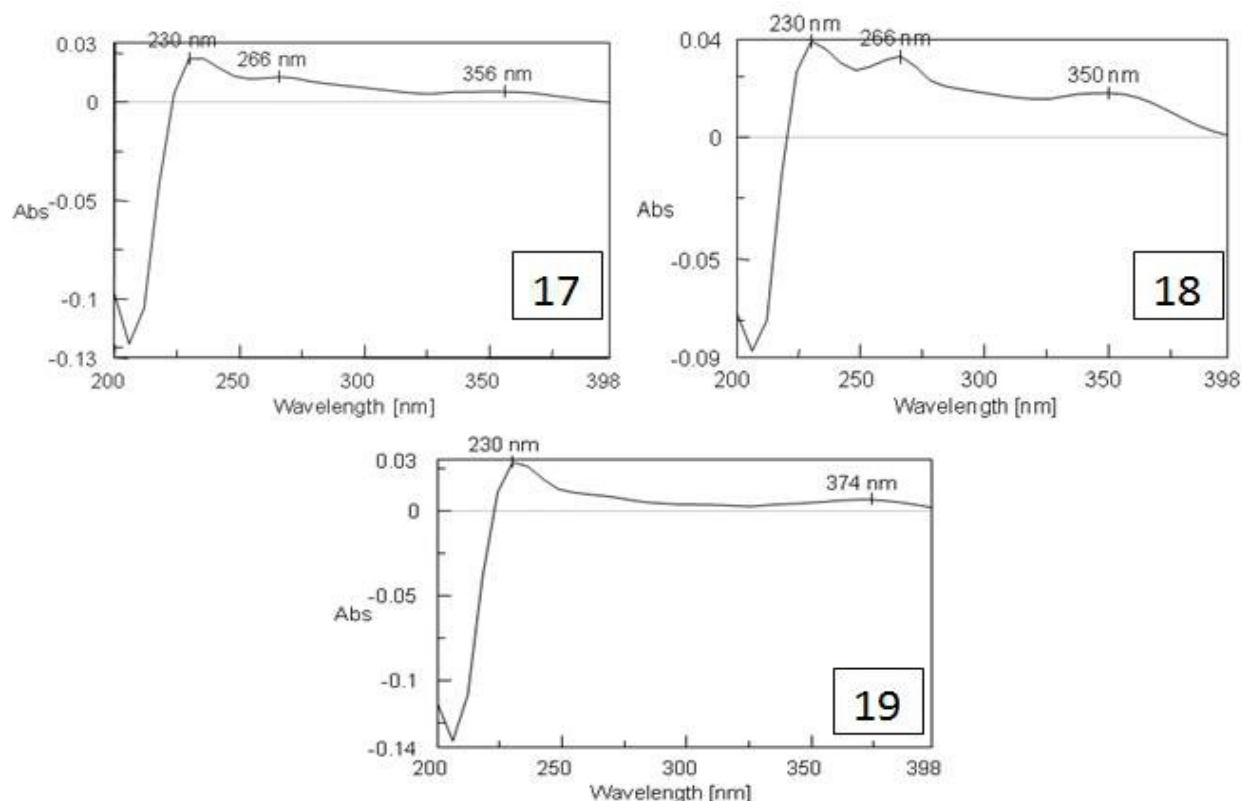


Figura 15. Espectros UV dos picos 17 ao 19 do perfil cromatográfico das folhas de *D. elliptica*.

4.6. Perfil cromatográfico de *D. nitida*

O método desenvolvido foi aplicado para o infuso das folhas de *D. nitida* e, também, foi eficiente para a separação dos metabólitos, como é possível observar no perfil cromatográfico (Figura 16) e nos espectros UV dos metabólitos majoritários (Figura 17-19). Assim como relatado por KUSHIMA e col. (2009) e RODRIGUES (2008), o perfil cromatográfico de *D. elliptica* é qualitativamente semelhante ao perfil de *D. nitida*.

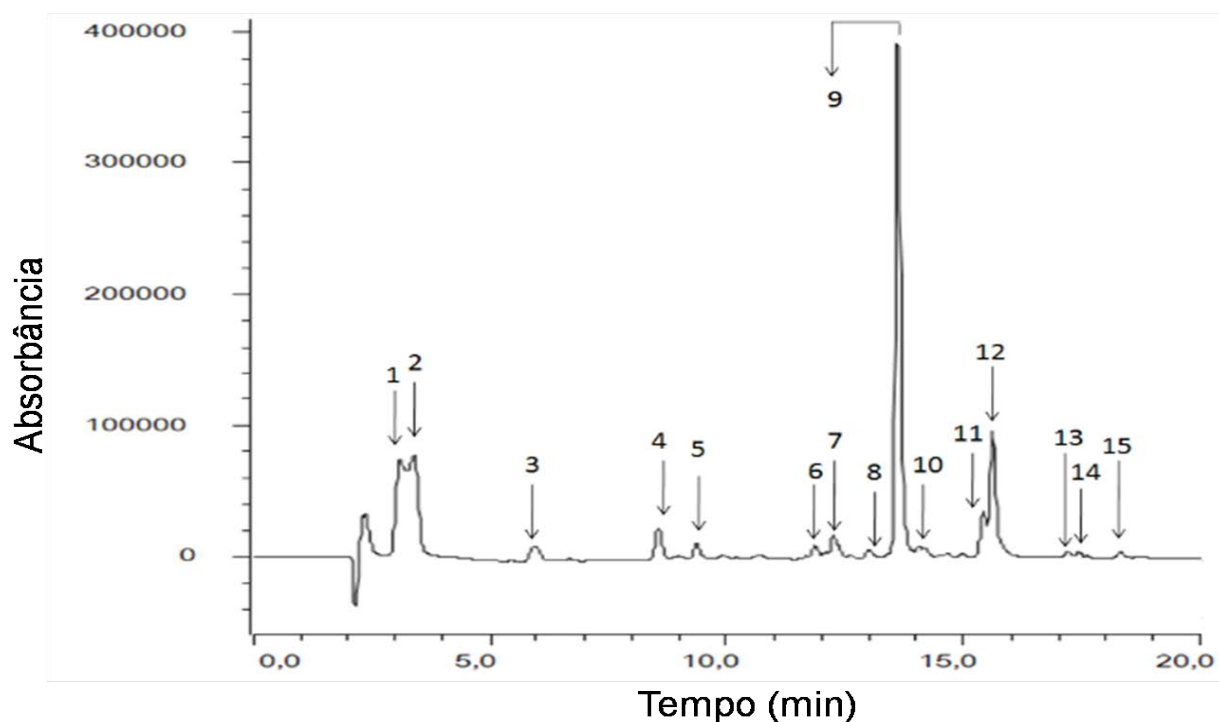


Figura 16. Cromatograma do perfil de *D. nitida* aplicando as condições cromatográficas ótimas determinadas; $\lambda = 254$ nm.

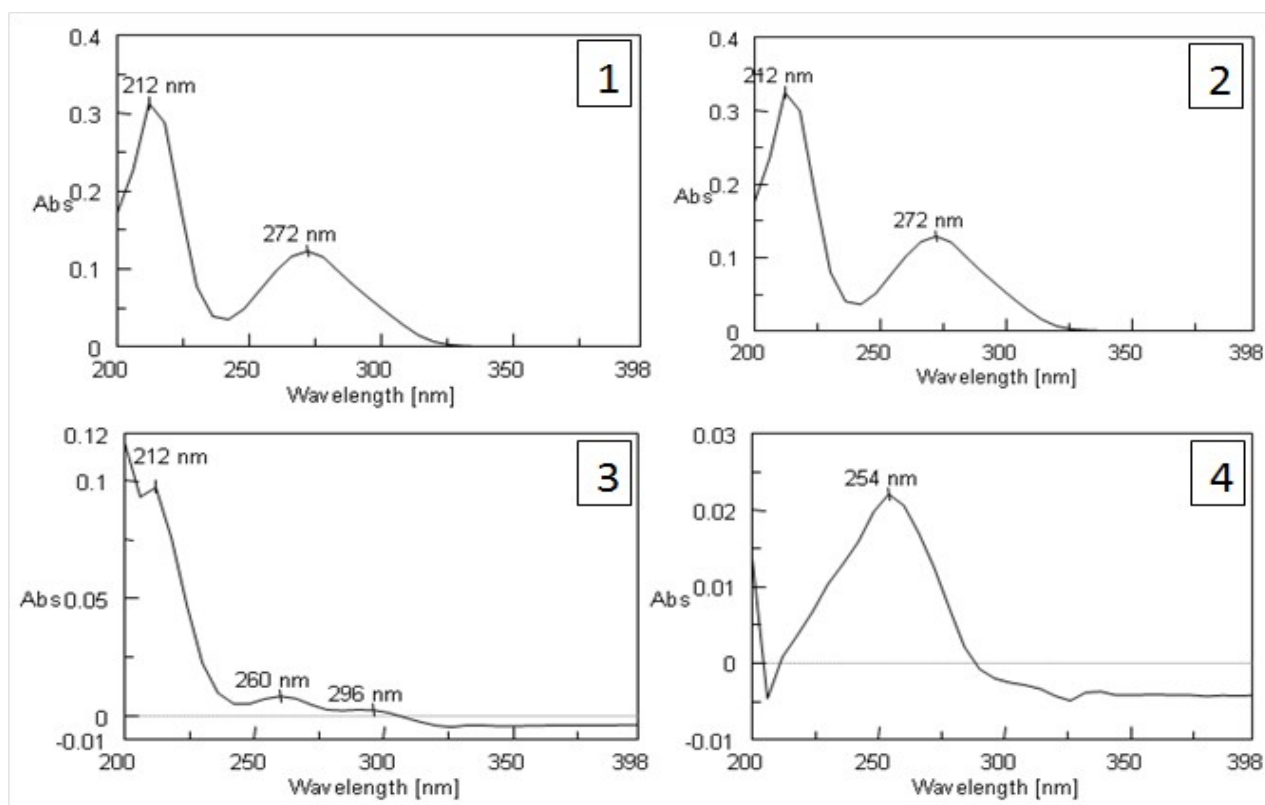


Figura 17. Espectros UV dos picos 1 ao 4 do perfil cromatográfico das folhas de *D. nitida*.

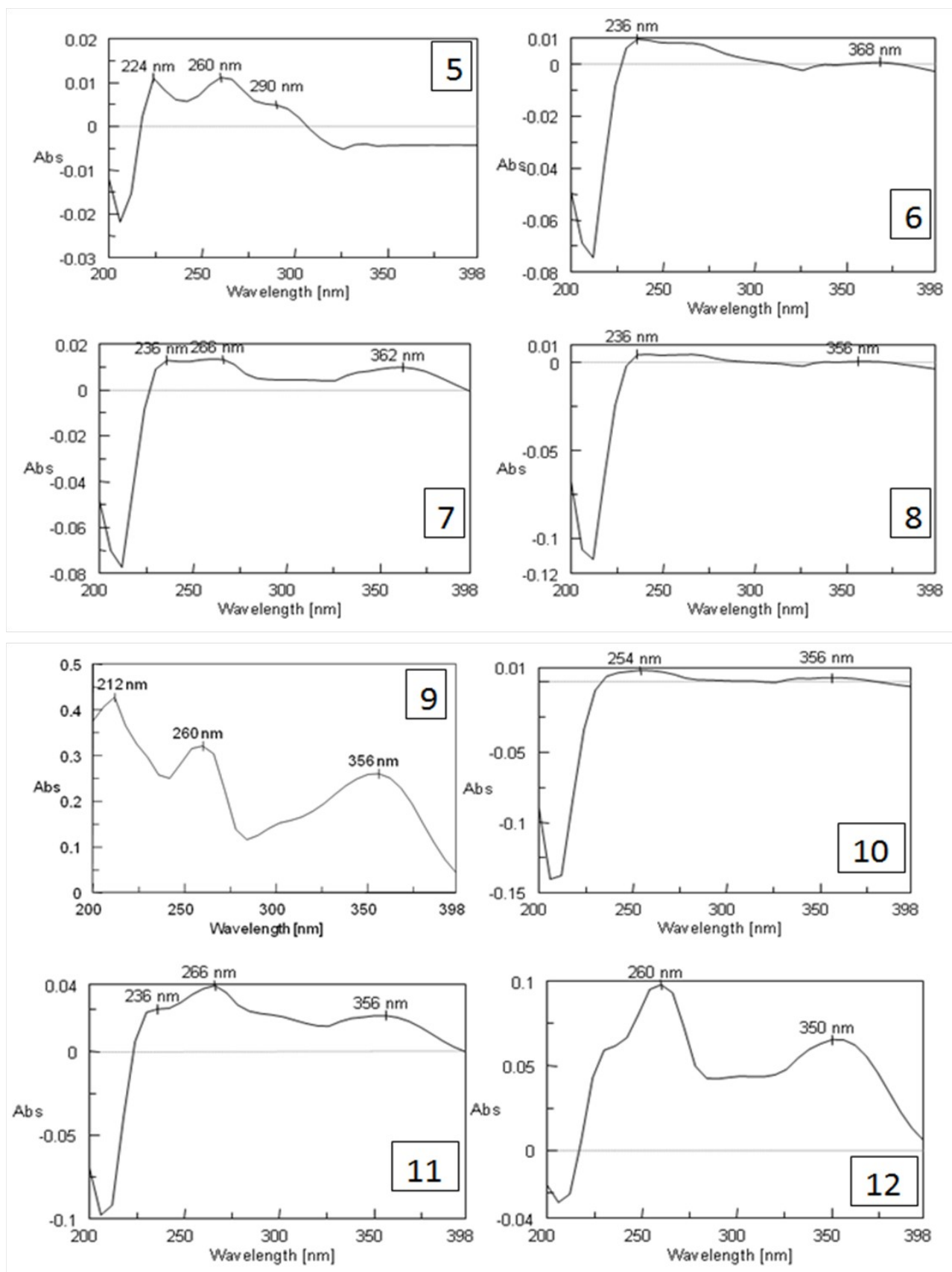


Figura 18. Espectros UV dos picos 5 ao 12 do perfil cromatográfico das folhas de *D. nitida*.

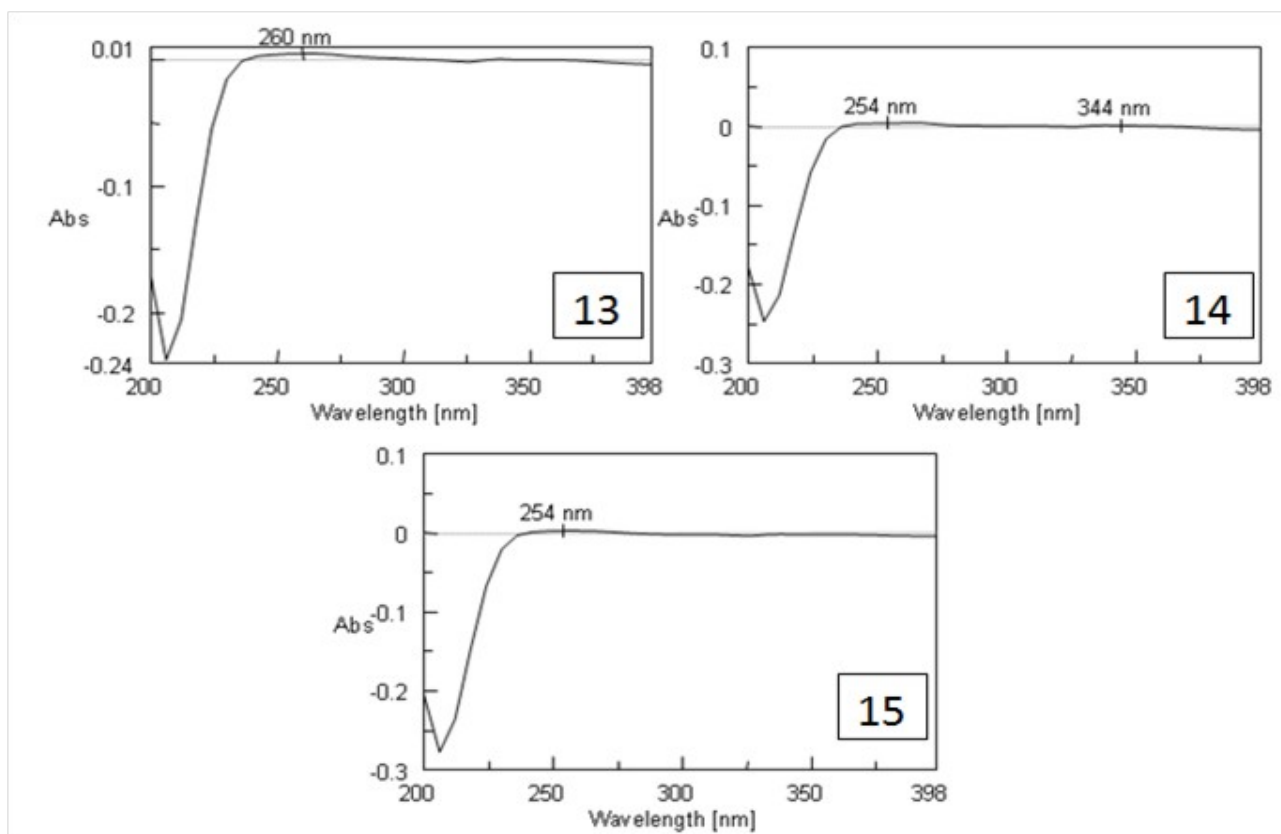


Figura 19. Espectros UV dos picos 13 ao 15 do perfil cromatográfico das folhas de *D. nitida*.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho contribuiu na análise de estudos fitoquímicos utilizando a química verde, diminuindo a utilização de solventes tóxicos e de solventes orgânicos empregados nas etapas de preparo da amostra. A utilização do infuso é a forma que mais se assemelha com as fitopreparações empregadas pela população e gerou significativa redução no tempo de preparo da amostra, proporcionando atividades sustentáveis, com uma abordagem verde e de economia de tempo, desde o início até o fim do desenvolvimento do método.

O método cromatográfico verde desenvolvido para a análise do infuso das folhas do gênero *Davilla*, apresentou seletividade satisfatória para os picos majoritários, o que permite a identificação inequívoca dessas substâncias por análise dos espectros UV e co-injeção com padrões autênticos, possuindo resolução semelhante aos já publicados e citados para essas espécies.

6. REFERÊNCIAS

- BISO, F. I. et al. Assessment of DNA damage induced by extracts, fractions and isolated compounds of *Davilla nitida* and *Davilla elliptica* (Dilleniaceae). **Mutation Research. Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 702, p.92 - 99, 2010.
- CARLOS, I. Z. et al. Ação do extrato metanólico de *Davilla elliptica* St. Hill. (Dilleniaceae) na resposta imune. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.44 - 50, 2005.
- CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of Natural Products: Concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8615-8627, 2012.
- FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, 2011.
- FUNARI, C. S. et al. Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 37-44, 2014.
- HENDERSON, R. K. et al. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. **Green Chemistry**, v. 14, p. 854-862, 2011.
- KORNDORFER, A. P. **A importância do silício nas relações entre herbívoros e Davilla elliptica (Dilleniaceae) St. Hil no cerrado**. 2006. 31 f. Monografia (Especialização) - Curso de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2006.
- KUSHIMA, H. et al. *Davilla elliptica* and *Davilla nitida*: Gastroprotective, anti-inflammatory immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* action. **Journal of Ethnopharmacology**, v.123, p.430 - 438, 2009.
- MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, 429-438, 2002.
- MICHELIN, D. C. et al. Antimicrobial activity of *Davilla elliptica* St. Hill (Dilleniaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p.209 - 211, 2005.
- OLIVEIRA, G. et al. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Sociedade Botânica do Brasil**, v. 24, p.571-577, 2010.
- PRADO, A. G. S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, p.738-744, 2003.
- RIBEIRO, Fabiana A. L. et al. **Quimiometria: inovação no desenvolvimento e validação de métodos analíticos para controle de qualidade na indústria química**. 2007. Conselho Regional de Química. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/informativomat_235>. Acesso em: 21 fev. 2017.

RINALDO, D. et al. Preparative separation of flavonoids from the medicinal plant *Davilla elliptica* St. Hill. by High-Speed Counter-Current chromatography. **Química Nova**, v. 29, p.947 - 949, 2006.

RODRIGUES, C. M. **Caracterização quali e quantitativa de metabólitos secundários em extratos vegetais**. 2007. 199 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, " Instituto de Química - Campus Araraquara, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" - Araraquara, 2007.

RODRIGUES, C. M. et al. High-performance liquid chromatographic separation and identification of polyphenolic compounds from the infusion of *Davilla elliptica* St. Hill. **Phytochemical Analysis**. v.19, p.17 - 24, 2008.

SANTOS, S. C. et al. In vitro antimicrobial activity of the extract of *Abarema cochliocarpos* (Gomes) Barneby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, p. 215-219, 2007.

SOARES, M. L. et al. Análise da atividade antimicrobiana das folhas de *Davilla elliptica* St.-Hil. (Dilleniaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, p.183-186, 2009.

TROPICOS®. **Missouri Botanical Garden**. Disponível em:
<<http://www.tropicos.org/Image/34616>>. Acesso em: 03 mar. 2017.