

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

**TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS PARA OBTENÇÃO DE SUBSTÂNCIAS  
BIOATIVAS DE PLANTAS<sup>1</sup>  
CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUES FOR OBTAINING BIOACTIVE PLANT  
SUBSTANCES**

**Bárbara Pezzini Moreira<sup>2</sup>, Gabriela Elisa Hirsch<sup>3</sup>, Ilaine Teresinha Seibel  
Gehrke<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Projeto de pesquisa realizado no Grupo de Pesquisa em Fisiologia da UNIJUI (GPeF)

<sup>2</sup> Aluna de Graduação em Engenharia Química da UNIJUI, bolsista PIBIC/UNIJUI Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF).

<sup>3</sup> Pós Doutoranda no Programa de Pós-Graduação em Atenção Integral a Saúde (PPGAIS) UNIJUI/UNICRUZ, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF).

<sup>4</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida da UNIJUI, Grupo de Pesquisa em Fisiologia (GPeF), Laboratório de Pesquisa em Química (LAPEQUI).

#### INTRODUÇÃO

Substâncias bioativas são encontradas em diversas matrizes vegetais, como raízes, sementes, folhas, caule, flores e frutos. A importância desses produtos está não somente no seu uso *in natura*, mas também na sua aplicação como base de novos produtos alimentícios, cosméticos ou medicinais. As atividades funcionais atribuídas nos produtos naturais advêm das diversas classes de substâncias presentes nelas, como flavonoides, carotenoides, alcaloides, entre outros (PEREIRA, 2012).

A avaliação dos constituintes encontrados nas plantas e do seu respectivo potencial terapêutico tem sido objeto de muitos estudos, onde já foram comprovadas as ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais (COSTA, 2000; SKOOG, 1992; EWING, 1972). A extração dessas substâncias pode ser realizada por diversos processos de separação, e a escolha do melhor método depende da substância ou classe de substâncias que se pretende identificar, da matéria-prima utilizada e aplicação final que se pretende dar às substâncias extraídas (PEREIRA, 2012).

Entre os métodos modernos de análise de extratos de produtos naturais, a cromatografia ocupa um lugar de destaque devido a sua versatilidade em efetuar a separação, identificação e quantificação de espécies químicas, isoladamente ou em conjunto com outras técnicas instrumentais de análise (COLLINS et al., 1990).

Assim, o objetivo deste estudo é realizar uma revisão teórica sobre as técnicas cromatográficas para a obtenção de substâncias bioativas de plantas.

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

## METODOLOGIA

Esse estudo trata-se de uma revisão teórica sobre obtenção de substâncias bioativas de plantas, e a pesquisa foi realizada utilizando como base periódicos científicos, livros, dissertações e teses.

## RESULTADOS

Os processos de fracionamento de extratos vegetais visando o isolamento de substâncias ativas podem ser monitorados por ensaios direcionados para a avaliação da atividade biológica (UGAZ, 1988). Os extratos vegetais a serem fracionados podem ser obtidos por diferentes métodos de extração. Dentre estes métodos, podemos destacar a percolação, a maceração, a decocção, extração em aparelho de Soxhlet e a destilação por arraste (UGAZ, 1988). Além desses, ainda existem a extração com fluidos supercríticos, por micro-ondas e por ultrassom. Além do tipo de método, a escolha do solvente também influencia no tipo de substância a ser extraída, por isso este deve ser o mais seletivo possível, pois é graças à seletividade e por consequência a polaridade do solvente que se pode extrair apenas as substâncias desejadas ou em maior quantidade (SIMÕES et al., 2000).

Após a extração, utilizando alguma das técnicas citadas anteriormente, o fracionamento e a identificação destes extratos se torna possível através de um conjunto de técnicas cromatográficas. Esse tipo de fracionamento é realizado através de uma coluna cromatográfica, que de maneira geral é constituída por um tubo de vidro, em posição vertical, com a extremidade inferior afilada terminando numa torneira, que permite o controle da vazão da fase móvel, e suas dimensões dependerão da quantidade de material a ser cromatografado. A fase que fica no interior da coluna (fase estacionária) é suportada, na parte inferior, por um pedaço de algodão. Dentre as fases estacionárias mais comuns destacam-se a sílica, alumina (podendo ser básica, ácida ou neutra), celulose, poliamida, entre outras (COLLINS et al., 1990).

A separação dos componentes da amostra depende da polaridade de cada componente e da fase estacionária. O processo de interação dos componentes da amostra com a fase estacionária está associado a interações intermoleculares (SKOOG, 1992). Os eluentes, como são tratadas as chamadas fases móveis da coluna, são selecionados de acordo com a sua força eluotrópica, isto é, com o aumento da habilidade de interagir com as substâncias retidas na fase estacionária (COSTA, 2000). Sendo assim, é conveniente desenvolver uma coluna cromatográfica na forma de um gradiente de polaridade crescente (SIMÕES et al., 2000). Além disso, é necessário que a eluição seja suficientemente lenta para que se possa manter os equilíbrios de transferência de massas, porém, deve ser suficientemente rápida para que se evite a difusão molecular (SKOOG, 1992).

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

O enchimento da coluna é uma etapa que também requer cuidado, pois quanto mais uniforme for, maior será a sua eficiência. Uma vez montada a coluna cromatográfica, a amostra deve ser aplicada ao topo da mesma. Após toda amostra ter sido colocada é adicionada a fase móvel, cuidadosamente, até que se forme uma coluna líquida incolor e límpida acima do nível superior da amostra (COLLINS et al., 1990). A fase móvel, por sua vez, quando está passando através do adsorvente na coluna, arrasta consigo os componentes da amostra que está sendo cromatografada. Portanto, quanto maior a diferença entre os coeficientes de adsorção, mais completa será a separação do composto. Esta separação dos componentes de uma mistura ocorre devido às diferenças nas forças de interação entre eles e o adsorvente (COLLINS et al., 1990). Por fim, após o desenvolvimento da coluna, é realizada uma análise cromatográfica, podendo ser via cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa (GC) ou cromatografia líquida (LC).

A CCD consiste na separação dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana. O processo de separação está fundamentado, principalmente, no fenômeno da adsorção (EWING, 1972). É utilizada com maior frequência na análise vegetal, em virtude da simplicidade, rapidez e sensibilidade oferecidas pela técnica (COSTA, 2000). O solvente ou mistura de solventes a ser utilizado como fase móvel deve ser escolhido cuidadosamente, considerando a natureza química das substâncias a serem separadas e a polaridade da fase móvel (SKOOG, 1992). Na revelação das placas cromatográficas se tornam visíveis as substâncias que eram incolores e estavam presentes na amostra (COLLINS et al., 1990). Vários reveladores podem ser utilizados na análise cromatográfica (UGAZ, 1988), sendo os mais importantes listados abaixo na Tabela 1.

Tabela 1 - Reativos para CCD

Reativos	Deteção
Anilsadeído sulfúrico	Esteróides, terpenóides, etc.
Vanilina sulfúrica	Esteróides, terpenóides, flavonoides
Sulfato de cério (IV)	Triterpenos, diterpenos, sesquiterpenos
Cloreto fêrrico	Fenóis, flavonoides
Cloreto de alumínio	Flavonóides
Ácido p-toluenosulfônico	Catequinas, esteróides, etc.
Tiocianato de cobalto (II)	Alcalóides, aminas
Reagente de Dragendorf	Alcalóides
Hidróxido de potássio em 10% etanol	Cumarinas, antranas, antraquinona
Ácido sulfúrico	Reativo universal
Permanganato de potássio + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Reativo universal
Cuba de iodo	Sistema pi

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijui

Com relação à Cromatografia Líquida, esta é muito utilizada para o isolamento de produtos naturais e purificação de produtos de reações químicas, no controle de qualidade de plantas medicinais, busca de metabólitos ativos, em estudos de ecologia química e até estudos quimiossistemáticos (PINTO et al, 2002). As amostras a serem estudadas devem ser líquidas, enquanto as fases estacionárias podem ser sólidas, levando à separação por adsorção, ou líquidas, sendo a separação por partição.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é uma extensão da cromatografia líquida clássica e caracteriza-se pelo uso de colunas em aço inox muito mais estreitas, com empacotamento de partículas de tamanhos muito reduzidos, que constituem a fase estacionária. A fase móvel circula sob alta pressão, ao longo da coluna, com um fluxo controlado. A alta pressão permite análises mais rápidas e o uso de uma fase estacionária constituída por micro partículas permite uma elevada eficiência na separação (NETO; NUNES, 2003; GOMES, 2010).

Já a Cromatografia Gasosa (GC) é uma técnica para separação e análise de misturas de substâncias voláteis, sendo bastante utilizada na área de produtos naturais. A amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás adequado (fase móvel ou gás de arraste). As substâncias que são carregadas pelo gás de arraste interagem de forma distinta com a fase estacionária. Isto acarreta tempos de residência na coluna para diferentes compostos, chegando ao detector em tempos diferentes sendo, portanto, separadas. O registro do sinal elétrico gerado pelo detector, em função do tempo, é o cromatograma, sendo que as substâncias aparecem nele como picos com área proporcional à sua massa, o que possibilita a análise quantitativa. Portanto, a GC permite identificar e quantificar compostos (EWING, 1972).

## CONCLUSÃO

As técnicas cromatográficas para isolamento e identificação de compostos bioativos vem se modernizando, pela introdução de novas tecnologias, porém, técnicas clássicas ainda são utilizadas. A escolha da técnica mais adequada a ser utilizada depende de vários fatores, como tipo de amostra, eficiência esperada, custo, disponibilidade do equipamento, entre outros.

Palavras-chave: extratos, compostos, flavonoides.

Keywords: extracts, compounds, flavonoids.

01 a 04 de outubro de 2018

**Evento:** Bolsistas de Iniciação Científica e Iniciação Tecnológica da Unijuí

## REFERÊNCIAS

CHOZE, R., **Técnicas de Separação e Identificação Empregadas na Análise de Produtos Naturais de Plantas**, Trabalho de Conclusão de Curso do Centro de Ciências Física e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2004.-Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/105274>. Acesso em 12 junho de 2018.

COLLINS, C.H., Braga, G.L., Bonato, P.S., **Introdução a Métodos Cromatográficos**, 4<sup>a</sup> ed. revisada e ampl., Ed. da Unicamp, Campinas, 1990.

COSTA, A.F., **Farmacognosia**, 3a ed., Ed. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2000.

EWING, G.W., **Métodos Instrumentais de Análise Química**, Volume II, Ed. Edgard Blücher LTDA, Ed. da Universidade de São Paulo, 1972.

SIMÕES, C.M.O., Schekel, E.P., Gosman, G., Mello, J.C.P., Mentz, L.A., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 2a edição, Porto Alegre/ Florianópolis, Ed. da UFRGS/ Ed. da UFSC, 2000.

SKOOG, D.A., **Principles of Instrumental Analysis**, 4th ed., 1992.

UGAZ, O. L., **Investigación Fitoquímica - Métodos en el Estudio de Productos Naturales**, 1a ed., Ed. Fondo editorial, Peru, 1988.