

Avaliação de atividades biológicas de extratos não voláteis de *Baccharis uncinella* obtidos por maceração e por extração com CO₂ supercrítico

Maria Eduarda Sanvido

Aluna da Faculdade de Engenharia

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Av. Ipiranga, 6681. Partenon. Porto Alegre/RS. CEP 90619-900.

RESUMO

O gênero *Baccharis* compreende cerca de 500 espécies distribuídas pelo continente americano. Os principais compostos relatados em extratos não voláteis do gênero *Baccharis* são os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides e os compostos terpênicos. Suas principais propriedades biológicas são as atividades antioxidante, antibacteriana e anti-inflamatória. Neste estudo foram empregadas duas técnicas extrativas: a extração com CO₂ supercrítico e a maceração com metanol. O objetivo do trabalho foi avaliar qual método extrativo potencializa a obtenção de compostos biologicamente ativos. Foram utilizadas como matéria prima as partes aéreas de *Baccharis uncinella* para ambas as técnicas de extração. A extração supercrítica foi realizada em uma temperatura de 60°C e nas pressões de 150 e 200 bar. A maceração foi realizada com metanol e a planta foi macerada por 10 dias. Os extratos foram fracionados por cromatografia em coluna e suas frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada a fim de identificar a que classe os compostos pertencem. Análises de atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e flavonoides também foram realizadas. Os resultados indicam que a fração 4 do extrato macerado, obtida pelo fracionamento em coluna, foi a que apresentou o melhor resultado, onde sua atividade antioxidante foi de 89,04 % e seu percentual de flavonoides foi de 4,34 %.

PALAVRAS CHAVE: *Baccharis uncinella*; extração supercrítica; maceração; atividade antioxidante; flavonoides.

ABSTRACT

The *Baccharis* genus is composed by more than 500 species distributed throughout the American continent. The main compounds reported in non-volatile extracts of *Baccharis* genus are phenolic compounds, including flavonoids and terpene compounds. Its main biological properties are antioxidant activities, antibacterial and anti-inflammatory. This study employed two extraction techniques: extraction with supercritical CO₂ and maceration with methanol. The objective of this work is to evaluate which extractive method enhances obtaining biologically active compounds. Aerial parts of *Baccharis uncinella* were used for both extraction techniques. The supercritical extraction was performed at a temperature of 60 ° C and at pressures of 150 to 200 bar. Conventional extraction was performed with methanol and the plant is macerated for 10 days. The extracts were fractionated by chromatography column and its fractions were analyzed by thin layer chromatography to identify which classes of compounds were present. Analysis of antioxidant activity, content of phenolic compounds and flavonoids were also performed. The results obtained indicate that the

fraction 4 of the methanol extract showed the best results, where its antioxidant activity was 89.04% and its flavonoid percentage was 4.34%.

KEYWORDS: *Baccharis uncinella*; supercritical extraction; maceration; antioxidant activity; flavonoids.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil tem uma das maiores biodiversidades do mundo. Várias substâncias produzidas pelo metabolismo secundário das plantas são inseridas na indústria química, farmacêutica e de alimentos e estão cada vez mais sendo estudadas a fim de propor uma utilização benéfica aos seres humanos de uma forma sustentável. As espécies vegetais nativas desempenham um importante papel nas pesquisas brasileiras, pois se trata de um recurso disponível e renovável, assim como é uma forma de valorizar o que a flora regional tem para oferecer (LUCAS, 2015).

O gênero *Baccharis* tem ampla distribuição geográfica e uma grande variedade de espécies que têm grande destaque na medicina popular no Brasil e em outros países da América do Sul. O campo para pesquisas de novas moléculas bioativas deste gênero é promissor devido ao seu grande potencial em metabólitos secundários, como os compostos fenólicos (VERDI ET AL., 2005).

As plantas do gênero *Baccharis* pertencem à família Asteraceae, que compreende aproximadamente 500 espécies, todas americanas, onde aproximadamente 120 estão localizadas no Brasil (BUDEL ET AL., 2005). Entre os principais compostos encontrados em extratos de plantas deste gênero estão os compostos terpênicos e os compostos fenólicos. Destacam-se os flavonoides, que são amplamente empregados nas indústrias de alimentos, farmacêutica e cosmética por estarem relacionados às boas atividades antimicrobianas, antioxidantes e anti-inflamatórias (ASCARI ET AL., 2012; PIANTINO ET AL., 2008; VERDI ET AL., 2005).

Diferentes técnicas são utilizadas para a obtenção de extratos não voláteis de material vegetal, sendo que tradicionalmente o método empregado é a maceração da planta com solvente orgânico (BIESAGA ET AL., 2011). Quando o interesse é a obtenção de compostos polares, o metanol é o solvente mais utilizado, pois consegue extrair um maior número de compostos (CECHINEL ET AL., 1998). Como alternativa ao processo tradicional, a extração supercrítica é uma operação unitária que tem ganhado destaque como processo extrativo de compostos bioativos a partir de matrizes vegetais (HUANG ET AL., 2012). Entre as vantagens relacionadas ao seu uso, principalmente quando o solvente utilizado é o CO₂, é o fato de ser considerada uma tecnologia limpa (CASSEL ET AL., 2008). O CO₂ é o solvente mais utilizado

neste processo em função de ser não inflamável, não tóxico, não corrosivo e atingir facilmente as condições de temperatura e pressão supercríticas (CASSEL ET AL., 2008; HUANG ET AL., 2012).

Para a análise de extratos não voláteis oriundos destas plantas se destacam as técnicas cromatográficas, como a cromatografia em camada delgada e a cromatografia em coluna (LUCAS, 2015). Técnicas espectrofotométricas também podem caracterizar o extrato vegetal através de experimentos que determinem a concentração de compostos específicos, como a análise de flavonoides (FUNARI e FERRO, 2006). Análises de atividades biológicas também são muito utilizadas, dentre elas a análise de atividade antioxidante, que indica o potencial de proteção à oxidação encontrada em determinados compostos (OLIVEIRA ET AL., 2003).

O presente estudo tem por objetivo extrair compostos não voláteis de *Baccharis uncinella* por meio de dois métodos diferentes: a extração supercrítica e a maceração com solvente orgânico. Os extratos obtidos serão fracionados por cromatografia em coluna e analisados por cromatografia em camada delgada a fim de comparar os compostos presentes nas frações de cada tipo de extração. Analisar-se-á o teor de compostos fenólicos e de flavonoides, assim como determinar-se-á a atividade antioxidante presente nas frações a fim de avaliar qual é o processo extrativo que potencializa a obtenção de compostos com atividade biológica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Gênero *Baccharis*

O gênero *Baccharis* apresenta elevado valor socioeconômico e é encontrado principalmente nos Estados do Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo. Muitas espécies do gênero *Baccharis* são utilizadas na medicina popular para controle ou tratamento de várias doenças, como anemias, inflamações e diabetes (VERDI ET AL., 2005).

A *Baccharis* mais conhecida é a *B. trimera*, também chamada de carqueja, e é muito utilizada para tratamento de problemas gastrointestinais (OLIVEIRA ET AL., 2012). Os compostos terpênicos, diterpênicos e as saponinas são relatados em extratos não voláteis deste gênero, bem como compostos fenólicos, como os flavonoides e ácidos fenólicos (VILA., 2006). Entre as principais propriedades biológicas dos extratos de plantas do gênero *Baccharis* estão a atividade antioxidante, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana (VERDI ET AL., 2005). Especificamente para os extratos de *B. uncinella*, estudos relatam a presença de compostos triterpenos e flavonóides (ZALEWSKI ET AL., 2010).

2.2. Compostos não Voláteis

Nas plantas, existem dois tipos de metabolismo: o primário e o secundário. O metabolismo primário é o responsável pelas funções vitais da planta, enquanto o metabolismo secundário produz substâncias que conferem características de proteção e adaptação ao ecossistema onde elas estão inseridas. Entre as características, podem-se citar a defesa contra herbívoros, a proteção contra raios UV e a atração de polinizadores. Os compostos não voláteis extraídos de material vegetal estão localizados no metabolismo secundário das plantas (SIMÕES ET AL., 2007; LUCAS, 2015).

Grande parte das moléculas presentes nos extratos não voláteis são os compostos fenólicos, que incluem uma grande diversidade de estruturas e possuem pelo menos um anel aromático e um hidrogênio substituído por um grupamento hidroxila. Dentre eles, citam-se os taninos, flavonoides, ligninas, cumarinas, entre outros (SIMÕES ET AL., 2007; LUCAS, 2015).

2.3. Obtenção de Extratos não Voláteis

Muitas técnicas de extração podem ser utilizadas para se obter extratos não voláteis de plantas, principalmente constituídos por compostos fenólicos como os flavonoides.

A maceração com solvente orgânico é bastante empregada, principalmente pela facilidade e ampla aplicabilidade (RIJKE ET AL., 2006). Solventes como o metanol, etanol, acetato de etila, bem como suas combinações com água podem ser utilizados nesse processo (BIESAGA ET AL., 2011). Extração com equipamento Soxhlet é menos empregada para obtenção de flavonoides a partir de plantas (RIJKE ET AL., 2006).

Outra maneira que vem sendo muito utilizada nos últimos anos para a obtenção de extratos não voláteis de material vegetal é através da extração com fluido supercrítico. A principal vantagem é a obtenção do extrato puro, sem a necessidade de remover o solvente para posterior utilização, sendo assim classificada como uma tecnologia limpa (CASSEL ET AL., 2008).

2.3.1. Maceração com Solvente Orgânico

A maceração com solvente orgânico é um método bastante utilizado para se obter extratos não voláteis de plantas. O solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos polares, como os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides (CECHINEL ET AL, 1998). Este método de extração consome uma quantidade grande de solvente e requer tempo, pois a planta é macerada por aproximadamente 10 dias (BIESAGA ET AL., 2011). Após a extração, o solvente residual deve ser evaporado antes de se realizar as análises posteriores.

2.3.2. Extração Supercrítica

A extração supercrítica pode ser definida como a solubilização de determinados compostos de uma matriz sólida ou líquida em um solvente nas condições supercríticas (REVERCHON ET AL., 2006). Um fluido supercrítico é aquele que se encontra acima da sua pressão e temperatura críticas e, nesta condição, adquire viscosidade análoga a de um gás e uma capacidade de dissolução elevada como a de um líquido. (CASSEL ET AL., 2008; LUCAS, 2015). Muitos solventes podem ser utilizados, porém o dióxido de carbono apresenta algumas vantagens, como ser não tóxico, não inflamável, ter baixo custo e atingir facilmente sua condição supercrítica (CASSEL ET AL., 2008).

O funcionamento básico do processo de extração por fluido supercrítico se inicia com o solvente no estado líquido sendo comprimido em uma bomba de alta pressão e em seguida aquecido em um pré-aquecedor até as condições supercríticas. O fluido nestas condições é introduzido no vaso de extração. Depois de efetuada as extrações, o solvente juntamente com o extrato obtido, passam por uma válvula de expansão onde o solvente retorna ao estado gasoso, resultando na sua total eliminação, obtendo-se assim o extrato puro (CASSEL ET AL., 2008; LUCAS, 2015).

2.4. Análises de Compostos não Voláteis

A análise e identificação dos extratos não voláteis são normalmente realizadas através de métodos cromatográficos e espectroscópicos (LUCAS, 2015).

Cromatografia é um método de separação de compostos em uma mistura, onde a amostra interage com a fase estacionária e a fase móvel (VILA, 2006). Técnicas cromatográficas como cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia em coluna (CC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são muito utilizadas como métodos analíticos qualitativos e quantitativos.

Técnicas espectrofotométricas também são utilizadas para caracterizar extratos vegetais. Entre as técnicas está a que determina a concentração de flavonoides (FUNARI E FERRO,

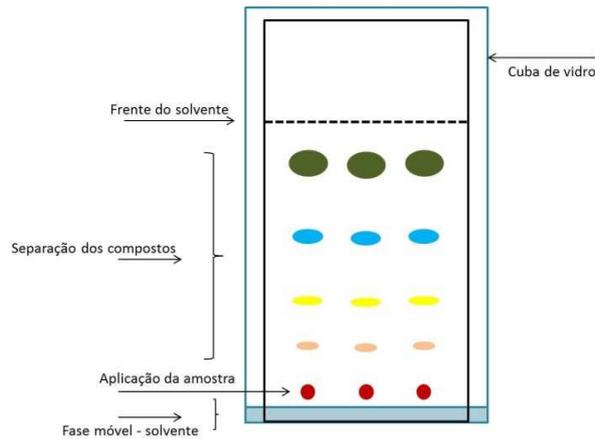
2006). Análises de atividades biológicas também são muito utilizadas, dentre elas a análise de atividade antioxidante, que indica o potencial de proteção à oxidação encontrada em determinados compostos (OLIVEIRA ET AL., 2003).

2.4.1. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A CCD consiste na separação de compostos de uma mistura multicomponente através da migração sobre uma camada de adsorvente, chamada de fase estacionária. As placas podem utilizar como adsorvente celulose e alumina, sendo a sílica gel a fase estacionária mais utilizada. Esta migração se dá por capilaridade com ajuda de um solvente, chamado de fase móvel (COLLINS ET AL., 2007; SKOOG ET AL., 2008; LUCAS, 2015). A fase móvel dependerá das características químicas do extrato. Como os extratos vegetais possuem moléculas polares e apolares, a fase móvel indicada deve possuir polaridade intermediária para conseguir separar os compostos de maneira mais eficiente (WAKSMUNDZKA-HAJNOS ET AL., 2008).

A CCD é a ferramenta básica para identificar quais tipos de compostos estão presentes nos extratos. Pode ser utilizada também para isolar um determinado composto de uma mistura e também para verificar a presença de compostos bioativos. A CCD também controla a eficiência de separação de outros métodos cromatográficos, como a cromatografia em coluna. Esta técnica tem muitas vantagens, como a otimização de outras análises cromatográficas, baixo custo e o fato de poder utilizar diferentes procedimentos na detecção de diferentes classes de compostos. A caracterização dos compostos é normalmente feita através da luz ultravioleta e também por meio de reveladores químicos (WAKSMUNDZKA-HAJNOS ET AL., 2008). A Figura 1 ilustra o procedimento de um experimento de CCD.

Figura 1 - Esquema de um experimento de CCD.



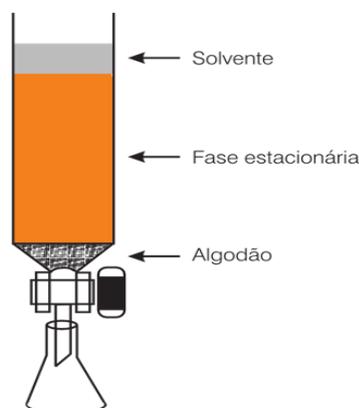
Fonte: LUCAS, 2015.

A amostra é aplicada na base inferior da placa cromatográfica e é inserida na cuba de vidro contendo a fase móvel. A cuba de vidro é mantida fechada e durante o desenvolvimento da análise e os compostos da amostra vão sendo separados em zonas distintas. Quando a frente do solvente atingir o topo da placa, retira-se a placa da cuba e deixa-se evaporar o solvente.

2.4.2. Cromatografia em Coluna (CC)

A cromatografia em coluna (CC) tem por objetivo fracionar extratos e isolar compostos (LUCAS, 2015). O princípio de separação da técnica é baseado no fenômeno da adsorção, onde uma substância (gás, líquido ou sólido) fica retida na superfície de um sólido (COLLINS ET AL., 2007; SKOOG ET AL., 2008). A Figura 2 ilustra o procedimento de um experimento de CC.

Figura 2 - Esquema de um experimento de CC.



Fonte: DEGANI ET AL., 1998.

O equipamento consiste em uma coluna de vidro aberta no topo e recheada com um material adsorvente (fase estacionária). O adsorvente mais utilizado é a sílica gel. Na

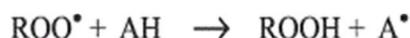
extremidade inferior se encontra uma torneira para o controle do volume das frações a serem recolhidas. A amostra a ser separada é adicionada no topo da coluna. A separação dos compostos se dá por gravidade ou por pressão com a ação dos solventes (fase móvel) que separam os compostos de acordo com a polaridade (LUCAS, 2015; SKOOG ET AL., 2008). A escolha da fase móvel deve ser feita de acordo com a série eluotrópica referente ao adsorvente que está sendo utilizado, seguindo a ordem crescente de polaridade. Quando um solvente puro não consegue separar determinados compostos de uma mistura, pode-se utilizar uma mistura dos solventes (COLLINS ET AL., 2007; LUCAS, 2015).

2.4.3. Atividade Antioxidante, Teor de Fenólicos Totais e Teor de Flavonoides

O interesse na utilização de plantas como fontes naturais de compostos antioxidantes em indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos vem crescendo (RICE-EVANS ET AL., 1996). Além disso, os consumidores estão cada vez mais atentos a produtos que contenham compostos antioxidantes, visto que eles são importantes para a manutenção da saúde e para a proteção contra doenças degenerativas, como o câncer (KÄHKÖNEN ET AL., 1999).

Compostos antioxidantes são aqueles que protegem sistemas biológicos contra efeitos potencialmente lesivos de reações que promovem a oxidação de macromoléculas ou de estruturas celulares (VILA., 2006). O mecanismo de ação antioxidante ocorre com a remoção dos radicais livres existentes através da doação de átomos de hidrogênio, conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Mecanismo de ação antioxidante.



Fonte: VILA, 2006.

Os compostos fenólicos são comumente encontrados em plantas e apresentam propriedades biológicas reconhecidas, como atividade antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória (KÄHKÖNEN ET AL., 1999). Os flavonoides são um grupo de compostos fenólicos, onde a atividade antioxidante ganha destaque e, juntamente com os diterpenos, são os compostos de maior ocorrência nos metabólitos secundários de plantas do gênero *Baccharis*.

Os flavonoides são importantes para o crescimento e desenvolvimento da planta e também atuam no mecanismo de defesa contra infecções e lesões (KÄHKÖNEN ET AL.,

1999). No entanto, é importante salientar que nem toda a atividade antioxidante do gênero *Baccharis* está necessariamente relacionada a compostos fenólicos, onde terpenos e tricotecenos também podem possuir tais características (VERDI ET AL., 2005).

3. METODOLOGIA

3.1. Coleta do Material Vegetal

O material vegetal utilizado nos experimentos foi coletado no Centro de Pesquisa e Conservação da Natureza Pró-Mata (CPCN Pró-Mata) da PUCRS, localizado em São Francisco de Paula, RS. Para os experimentos de extração foram utilizadas as partes aéreas da *B. uncinella*.

3.2. Maceração com Metanol

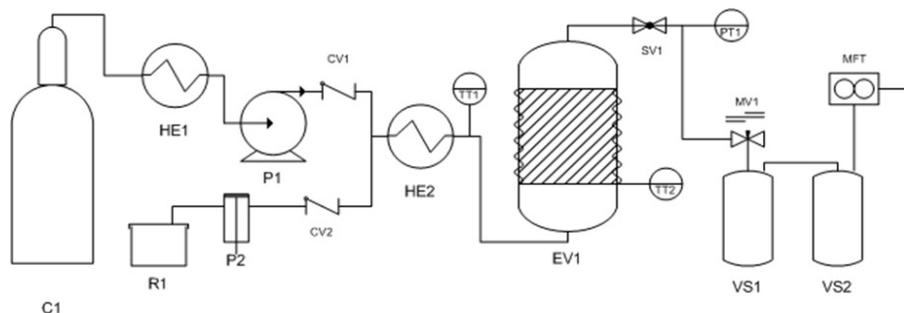
A maceração dos compostos não voláteis de *B. uncinella* foi realizada utilizando metanol (Merck) como solvente. A extração convencional foi realizada com 50 gramas de planta seca em estufa (Tecnal) e 500 mL de solvente por um período de 10 dias. Após esse período, o extrato obtido foi seco com auxílio de um rotavapor (Tecnal) para posteriores análises.

3.3. Extração Supercrítica

As extrações foram realizadas na unidade piloto de extração supercrítica do LOPE/FENG e o processo está esquematizado na Figura 4. O procedimento de extração dos compostos não voláteis por fluido supercrítico foi realizado utilizando CO₂ como solvente (99,9% de pureza – AirProducts) em duas diferentes condições de pressão, 150 e 200 bar, na temperatura de 333,15 K, pois em pressões mais elevadas se extrai mais compostos polares, como os fenólicos e flavonóides (LUCAS, 2015). Para cada experimento foram adicionados 50 gramas de *B. uncinella* previamente seca em estufa (Tecnal) e moída em moinho de facas (Skymesen). As definições sobre as condições de extração foram embasadas no estudo de Lucas (2015).

Figura 4 - Fluxograma do processo de extração com fluído supercrítico:

C – cilindro de CO₂, HE – Trocador de calor, CV – Válvula de retenção, P1 – Bomba de alta pressão de CO₂, P2 – Bomba de cossolvente, R – Reservatório de cossolvente, EV1 – Vaso de extração, TT – Controladores de temperatura, PT – Controladores de pressão, VS – Vaso de separação, MFT – Medidor de vazão, MV- Válvula micrométrica, SV – Válvula de bloqueio.



Fonte: LUCAS, 2015

3.4. Análises dos Compostos

3.4.1. Cromatografia em Camada Delgada

A análise por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) foi realizada em placas de sílica gel Alugram® Xtra SIL G/UV₂₅₄ (Macherey-Nagel) de 20cm x 20cm, utilizando como fase móvel diclorometano PA (Merck). As placas foram visualizadas em lanterna de luz UV (Boiton) com comprimento de onda de $\lambda = 365$ nm. Após a visualização na luz, as placas foram reveladas com DPPH para avaliar a atividade antioxidante e com vanilina sulfúrica para avaliar a presença de compostos fenólicos e flavonóides.

3.4.2. Cromatografia em Coluna

A cromatografia em coluna foi realizada em uma coluna de vidro de 30 cm de comprimento e 2,2 cm de diâmetro, utilizando como adsorvente sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) marca Merck. Os experimentos foram padronizados com uma altura de 15 cm de sílica no interior da coluna. A massa utilizada para o experimento foi de 0,6 gramas de extrato, tanto supercrítico como macerado. A coluna foi acoplada a um sistema a vácuo, garantindo assim o esgotamento do eluente utilizado nas frações recolhidas. Os solventes utilizados para a eluição dos compostos, em ordem crescente de polaridade, foram diclorometano e metanol, todos da marca Merck. Para que o aumento de polaridade do sistema fosse gradual, foram utilizadas misturas dos solventes em diferentes proporções, como é apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação dos solventes e suas respectivas proporções utilizadas no fracionamento por cromatografia em coluna.

Identificação das frações correspondentes	Solvente	Proporção de mistura (% em volume)
F1	Diclorometano	100
F2	Diclorometano : Metanol	99:1
F3	Diclorometano : Metanol	97:3
F4	Diclorometano : Metanol	95:5
F5	Diclorometano : Metanol	90:10
F6	Metanol	100

Como forma de padronizar os experimentos, foi estabelecido que a quantidade de cada eluente e/ou misturas de eluentes seria de 03 vezes o volume de adsorvente na coluna para garantir a máxima eluição dos compostos. Com uma altura de 15 cm de sílica e um diâmetro de 2,2 cm, o volume útil da coluna é, aproximadamente, 57,0 cm³. Então, o volume para cada eluente e/ou misturas foi de 170 ml. As frações foram recolhidas ao término da passagem dos 170 ml de fase móvel. Após a retirada de cada fração, o solvente foi eliminado com o auxílio de um rotavapor (Tecnal) e a amostra seca foi armazenada em frascos de vidro para posteriores análises.

3.4.3. Atividade Antioxidante

A análise da atividade antioxidante dos extratos foi realizada através do método de sequestro de radicais livres DPPH, proposto por Duarte-Almeida (2006). Foi preparada uma solução de amostra e etanol (99,5% - Merck) na concentração de 20 mg/mL. A solução de DPPH (Sigma®) tem uma concentração de 60 µM, também em etanol. As amostras reagem por 60 minutos em um local protegido da luz. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) no comprimento de onda de $\lambda = 515$ nm. A quantificação da atividade antioxidante foi calculada através da equação proposta por Duarte-Almeida:

$$\text{SRL (\%)} = \frac{\text{Absorbância Controle} - \text{Absorbância Amostra}}{\text{Absorbância Controle}} \times 100$$

O decaimento da absorbância das amostras correlacionado ao decaimento da absorbância controle resulta na porcentagem de sequestro de radicais livres (%SRL).

3.4.4. Compostos fenólicos totais

O método utilizado para a análise da concentração de compostos fenólicos totais foi o método Follin-Ciocalteau (FOLLIN E CIOCALTEAU, 1927), tendo como padrão o ácido gálico. Esse método leva em consideração qualquer composto fenólico presente na amostra. Para a preparação da amostra, uma massa de 20 mg de extrato é diluída em 1 ml de etanol (Merck). Uma alíquota de 100 μ L da amostra é colocada em um balão de 10 mL, juntamente com 900 μ L de etanol (Merck) e o volume é completado com água destilada. Para o experimento, 400 μ L da amostra contida no balão de 10 mL são transferidos para um tubo de ensaio, juntamente com 600 μ L da solução de etanol a 10%, 1 mL da solução de carbonato de sódio a 17%, 1 mL do reagente Folin-Ciocalteau 1N e 7 mL de água destilada. A solução reage por 90 minutos em um local protegido da luz. A leitura das absorvâncias foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) no comprimento de onda de $\lambda = 725$ nm. A quantificação é realizada com base na curva padrão de ácido gálico.

3.4.5. Flavonoides

O método utilizado foi o de reação com $AlCl_3$ (FUNARI E FERRO, 2006). O extrato de *B. uncinella* é diluído em etanol (Merck) até atingir uma concentração de 20 mg/ml. Para o experimento, 200 μ L desta solução foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL juntamente com 1 mL da solução de $AlCl_3$ a 2,5%, onde o volume do balão é completado com etanol (Merck). Após 30 minutos de reação, as amostras são lidas em espectrofotômetro (Biospectro SP-220) em um comprimento de onda de $\lambda = 425$ nm. O padrão de referência empregado foi a quercetina (Sigma®) e uma curva padrão foi construída. A quantificação é realizada comparando as leituras em comprimento de onda de $\lambda = 425$ nm das amostras com a curva padrão de quercetina.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Cromatografia em Coluna

Os extratos obtidos a partir da extração por maceração com metanol e por fluido supercrítico foram fracionados em coluna. Foram obtidas 6 frações para ambos os extratos. As

Figuras 5 e 6 mostram o fracionamento em coluna para os extratos macerado e supercrítico, respectivamente. As fotos foram tiradas após a passagem dos 170 mL do eluente.

Figura 5 - Fracionamento do extrato macerado.

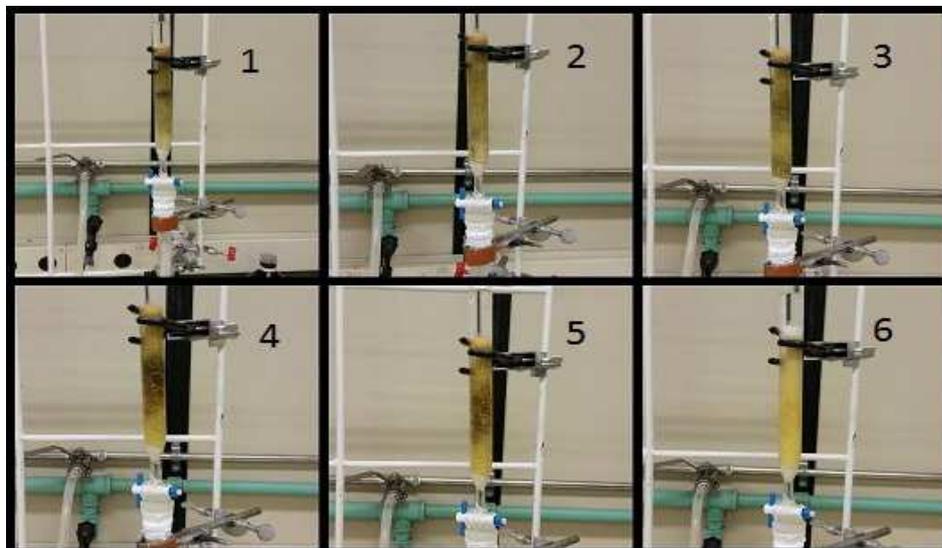
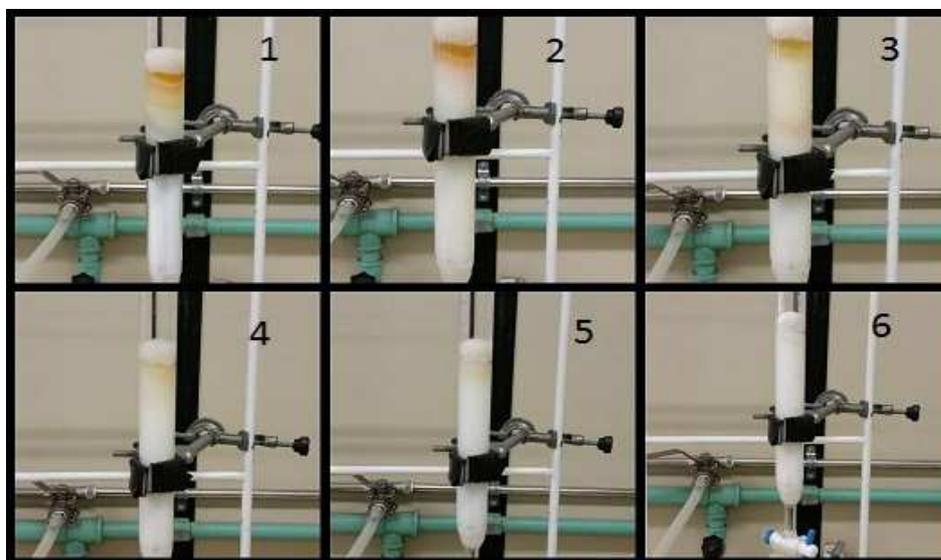


Figura 6 - Fracionamento do extrato supercrítico.



Observa-se que a metodologia de fracionamento utilizada se mostrou mais eficiente para o extrato supercrítico, visto que a última imagem na foto da Figura 6, que corresponde à última fração, ficou sem amostra retida na sílica. Isso significa que a polaridade dos solventes foi adequada para a separação dos compostos presentes no extrato. Já para o fracionamento com o extrato macerado, a última imagem vista na foto da Figura 5, que corresponde à última fração, ainda ficou retida na sílica. Solventes ou misturas de solventes mais polares podem ser

utilizados para limpar totalmente a coluna cromatográfica, garantindo a coleta de todos os compostos presentes no extrato.

4.2. Cromatografia em Camada Delgada

O extrato bruto e suas frações, de ambas as técnicas extrativas, foram analisados por CCD. As placas foram vistas na luz UV no comprimento de onda de $\lambda = 365$ nm e reveladas com DPPH e vanilina sulfúrica. Os compostos observados podem ser vistos nas Figuras 7, 8 e 9.

A placa analisada na luz UV (Figura 7) não apresentou uma grande variedade de compostos. Devido a este fato, tornou-se necessário a utilização de diferentes métodos de detecção, como os reveladores químicos, que tornam visíveis os compostos que não foram captados pela luz UV.

Figura 7 - Imagem da placa de CCD vista na luz UV no comprimento de onda de $\lambda = 365$ nm. Extrato bruto macerado e suas frações e extrato supercrítico e suas frações, respectivamente

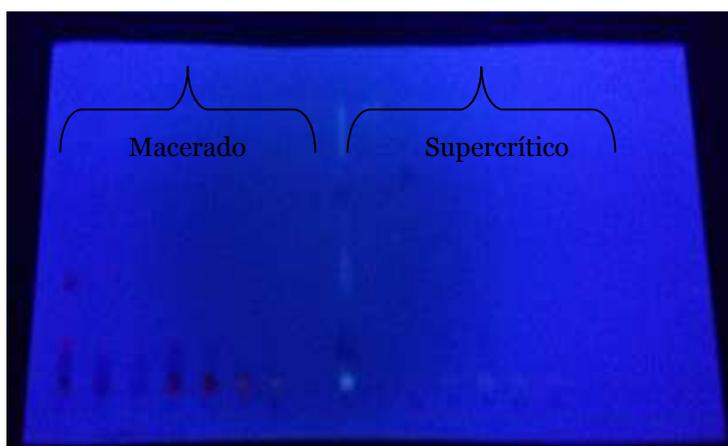


Figura 8 - Imagem da placa de CCD revelada com DPPH. Extrato bruto macerado e suas frações e extrato supercrítico e suas frações, respectivamente.

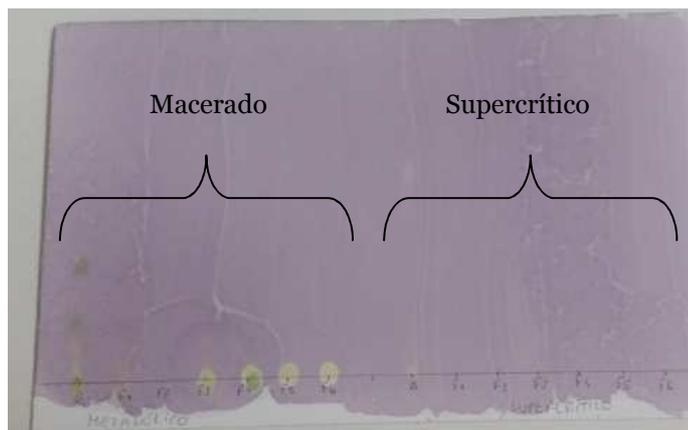
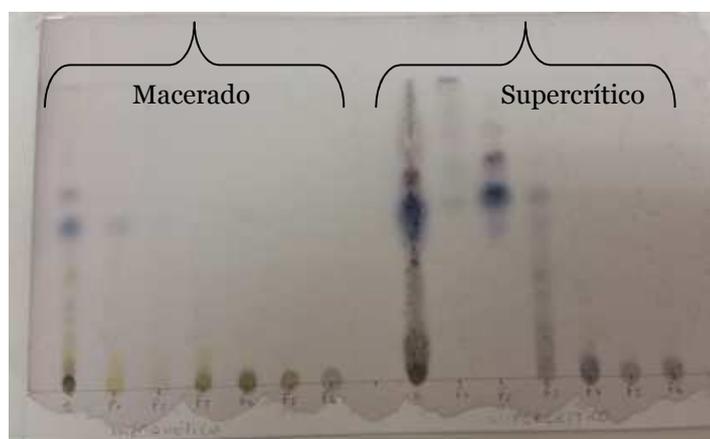


Figura 9 - Imagem da placa de CCD revelada com vanilina sulfúrica. Extrato bruto macerado e suas frações e extrato supercrítico e suas frações, respectivamente.



A placa revelada com DPPH (Figura 8) indica forte atividade antioxidante do extrato macerado com metanol bruto e das suas frações 3, 4, 5 e 6, devido às zonas de coloração amareladas, enquanto que o extrato supercrítico apresentou atividade antioxidante muito inferior ao do extrato macerado.

Analisando a placa revelada com vanilina sulfúrica (Figura 9), observam-se compostos amarelados/alaranjados no extrato bruto macerado e em todas as suas frações. Tal coloração pode ser um indicativo de flavonoides (LUCAS, 2015). A coloração amarelada é observada sem tanto destaque para os extratos obtidos com CO₂ e suas respectivas frações. A coloração azul/roxa (Figura 9) observada em grande quantidade no extrato supercrítico e suas frações é atribuída a compostos terpênicos (LUCAS, 2015).

O resultado da comparação entre das placas de CCD reveladas com DPPH (Figura 8) e vanilina sulfúrica (Figura 9) gera um forte indicativo que a atividade antioxidante dos extratos obtidos por maceração e suas respectivas frações esteja relacionada à presença de flavonoides.

4.3. Análise de Atividade Antioxidante

As frações dos extratos resultantes da maceração e da extração supercrítica e obtidas por fracionamento em coluna com solventes de diferentes polaridades (Tabela 1) foram analisadas quanto ao poder antioxidante. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultado da atividade antioxidante das frações obtidas da maceração e extração supercrítica, respectivamente.

Fração	Maceração (% SRL)	E. Supercrítica (% SRL)
F1	29,6	8,08
F2	7,76	10,24
F3	82,47	9,86
F4	89,04	9,64
F5	79,48	5,82
F6	90,93	3,41

Observa-se que os resultados variaram muito de acordo com o método extrativo. Para a maceração com metanol, a fração 6 (F6) apresentou um maior percentual de sequestro do radical livre (% SRL), caracterizando-a assim como a fração com a melhor atividade antioxidante, seguida das frações 4, 3 e 5 que também apresentaram uma ótima ação antioxidante. Já para o extrato supercrítico, os resultados foram muito inferiores quando comparado com a maceração e a fração 2 (F2) foi a que apresentou a melhor atividade antioxidante, seguidas das frações 3, 4 e 1.

A presença da clorofila no extrato bruto obtido por maceração e suas frações 3, 4 e 5 se mostra acentuada, podendo ser vista na Figura 7, onde as zonas de fluorescência avermelhadas/alaranjadas indicam sua presença (WAGNER, 2001). Esse fato também pode estar relacionado à excelente atividade antioxidante que o extrato macerado com metanol e suas frações apresentaram, visto que a clorofila tem comprovada atividade antioxidante (VOLP ET AL., 2009).

4.4. Teor de Compostos Fenólicos e Flavonoides

Os resultados das análises do teor de compostos fenólicos, em equivalente de ácido gálico, e do teor de flavonoides, em equivalente de quercitina, das frações dos extratos

resultantes da maceração e da extração supercrítica e obtidas por fracionamento em coluna com solventes de diferentes polaridades (Tabela 1) são apresentados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Resultado do teor de compostos fenólicos em equivalente de ácido gálico das frações dos extratos resultantes da maceração e da extração supercrítica.

Fração	Maceração (% em massa)	E. Supercrítica (% em massa)
F1	4,97	4,22
F2	8,15	3,47
F3	5,73	5,73
F4	4,97	4,24
F5	2,33	5,56
F6	1,96	4,35

Tabela 4 - Resultado do teor de flavonoides em equivalentes de quercitina das frações dos extratos resultantes da maceração e da extração supercrítica.

Fração	Maceração (% em massa)	E. Supercrítica (% em massa)
F1	1,61	0
F2	0,62	0
F3	3,44	0,109
F4	4,34	0,091
F5	2,27	0,045
F6	0,47	0

Os resultados do teor de compostos fenólicos e flavonoides também variaram bastante de acordo com o método extrativo. Analisando a Tabela 3, podemos observar que para a maceração a fração 2 (F2) apresentou maior percentual em massa de compostos fenólicos, enquanto para a extração supercrítica a que apresentou o maior percentual foi a fração 3 (F3). Os resultados obtidos para o teor de flavonoides apontam maiores concentrações para as frações do extrato macerado. A fração 4 (F4) apresentou maior teor de flavonoides para a maceração, enquanto que na extração supercrítica a fração 3 (F3) apresentou o melhor resultado.

Analisando os resultados obtidos, conclui-se que os compostos fenólicos presentes nas frações 1, 2 e 6 da extração supercrítica não são flavonoides e a atividade antioxidante dessas

frações está relacionada a outras classes de compostos. Para as frações obtidas por maceração, conclui-se que praticamente todos os compostos fenólicos presentes nas frações 4 e 5 são flavonoides e, conforme observado na análise por CCD, é provável que a atividade antioxidante dessas frações esteja relacionada à presença de flavonoides, juntamente com a clorofila.

Avaliando todas as etapas deste trabalho, bem como os resultados obtidos, nota-se que é um caminho indicado e viável para a investigação de compostos bioativos de extratos de organismos vegetais, visando aplicações em indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos.

5. CONCLUSÃO

A metodologia utilizada para a análise cromatográfica em coluna se mostrou eficiente na separação dos compostos presentes nos extratos, como pode ser observado nas Figuras 7, 8, e 9. Entre estes fatos foi possível identificar a presença de clorofila (Figura 7).

Analisando os perfis cromatográficos dos extratos de *B. uncinella* foi possível concluir que os métodos de extração influenciam fortemente na composição dos compostos obtidos, onde se observou maior concentração de flavonoides nos extratos obtidos por maceração com metanol e maior concentração de compostos terpênicos nos extratos obtidos com CO₂ supercrítico, nas condições de operação testadas.

Em relação à atividade antioxidante, concluiu-se que a polaridade do solvente utilizado foi o responsável pela diferença entre os resultados para as frações oriundas do extrato supercrítico e do extrato macerado com metanol. Quanto maior a polaridade do solvente utilizado na extração, maior a atividade antioxidante.

A partir da escolha do método extrativo que potencializa a obtenção de compostos biologicamente ativos, parte-se para a escolha da fração que apresentou o melhor resultado para as atividades propostas. A fração 4 (F4) do extrato macerado com metanol foi a que apresentou os melhores resultados, onde sua atividade antioxidante foi de 89,04 %, seu percentual de compostos fenólicos foi de 4,97 % e seu percentual de flavonóides de 4,34 %, onde praticamente todos os compostos fenólicos são flavonoides. Desse modo, sugere-se que a fração escolhida seja refractionada a fim de tentar isolar e identificar por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (CLAE/EM) algum flavonoide presente no extrato macerado de *B. uncinella* que seja responsável pela boa atividade antioxidante da fração.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Eduardo Cassel pela orientação e disponibilidade durante o desenvolvimento deste estudo. Agradeço também à professora Dra. Aline Lucas por

compartilhar seus conhecimentos, pelo apoio, atenção, conselhos e auxílios prestados no decorrer do trabalho. Agradeço a Deus por me abençoar e me acompanhar durante a minha trajetória. Agradeço aos meus pais, Rejane Brustolin Sanvido e Sérgio Luiz Sanvido, por não medirem esforços para me proporcionar a oportunidade de ter uma formação acadêmica, pelo incentivo, amor e dedicação durante toda a minha vida. Agradeço à minha tia Leiza Maria Brustolin por ser minha segunda mãe durante esses anos morando em Porto Alegre e à Aline Brustolin por ser a irmã que não tive. Agradeço ao Juliano Boese pelo companheirismo e pelas muitas ajudas ao longo do curso. Agradeço aos meus amigos e colegas Adriana Pires Kern, Fábio Dalla Valle e Luciana Machado pelas tardes de estudos ao longo desses anos e por fazerem os dias na PUCRS serem mais divertidos. Agradeço à minha amiga do coração, Thaise Santin Sirena, que mesmo longe se fez presente em muitos momentos da minha vida. Agradeço também a toda equipe do LOPE. Mais uma etapa está se encerrando e agradeço imensamente a todos que fizeram parte dessa conquista, que não será a última, pois, como diria Fernando Pessoa: ‘Tenho em mim todos os sonhos do mundo’.

6. REFERÊNCIAS

ASCARI, J.; SENS S.L.; NUNES, D.S. et al., Sedative effects of essential oils obtained from *Baccharis uncinella*. **Pharmaceutical Biology**, v.50(1), p.113-119, 2012.

BIESAGA, M. Influence of extraction methods on stability of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v.1218(18), p.2505-2512, 2011.

BUDEL, J.M.; DUARTE, M.R.; SANTOS, C.A.M. Progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, Asteraceae: I – Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.15(3), p. 268-271, 2005.

CASSEL, E.; VARGAS, R.M.F.; BRUN, G.W. Processos de Extração Supercrítica Aplicados a Produtos Naturais In: **Fundamentos de Tecnologia de Productos Fitoterapêuticos**(2Edn). Porto Alegre: EDIPUCRS, 2008, p. 213-228.

CECHINEL, V., YUNES, R.A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceito sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, 1998.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. 1º edição. São Paulo: editora da UNICAMP, 2007. 456p.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um Breve Ensaio. **Química Nova**, n.7, maio de 1998.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26(2), p. 446-52, 2006.

FOLLIN, O., CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. **Journal of Biology and Chemistry**, v. 73, p.424-427, 1927.

FUNARI, C.S., FERRO, V.O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26(01), p.171-178, 2006.

HUANG, Z.; SHI, X-h.;JIANG, W-j. Theoretical models for supercritical fluid extraction.**Journal of Chromatography A**,v.1250, p.2-26, 2012.

KÄHKÖNEN, M.P.; HOPIA, A.I.; VUORELA, H.J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T.S.; HEINONEN, M. Antioxidant Activity of Plant Extracts containing Phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.47, 3954-3962, 1999.

LUCAS, A.M. Estudosistemático de obtenção e impregnação supercrítica de extratos de *Baccharis*. Porto Alegre. 2015. Dissertação (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Faculdade de Engenharia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Brasil.

OLIVEIRA, C.B.; COMUNELLO, L.N.; LUNARDELI, A.; AMARAL, R.H.; PIRES, M.G.S.; SILVA, G.L.; MANFREDININI, V.; GNOATTO, S.C.B.; C.R.; OLIVEIRA, J.R.; GOSMANN, G. Phenolic Enriched Extract of *Baccharis trimera* Presents Anti-inflammatory and Antioxidant Activities. **Molecules** 17(1), 1113-1123, 2012.

OLIVEIRA, S.Q., DAL-PIZZOL, F., GOSMANN, G. Antioxidant activity of *Baccharis articulata* extracts: isolation of a new compound with antioxidant activity. **Free Radical Research**, v. 37, p. 555-559, 2003

PIANTINO, C.R.; AQUINO, F.W.B.; FOLLEGATI-ROMERO, L.A.; CABRAL, F.A. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 209-214, 2008.

REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 146-166, 2006.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids- antioxidant. **Free Radical Biology & Medicine**, Vol. 20, No. 7, pp. 933-956, 1996.

RIJKE, E.; OUT, P.; NIESSEN, W.M.A.; ARIESE, F.; GOOIJER, C.; BRINKMAN, U.A.T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**. v.1112, pg.31 -63. 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleosvoláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. p. 467-485.

SKOOG, D.A., WEST, D.A., HOLLER, F.J., CROUCH, R.S. **Fundamentos de química analítica**. 8ª edição. São Paulo: Thomson, 2008. 999 p.

VERDI, L.G., BRIGHENTE, I.M.C., PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28, n° 1, p. 85-94, 2005.

VILA, F.C. Identificação dos flavonoides com atividade antioxidante de cana-de-açúcar. São Paulo. 2006. 68p. Dissertação (Mestrado em Química Analítica). Instituto de Química, Universidade de São Paulo, Brasil.

VOLP, A. C. P., RENHE, I.R.T., STRINGUETA, P.C. Pigmentos naturais bioativos. **Alimentos e Nutrição Araraquara** – UNESP, v.20, n 1, p. 157-166, 2009.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant Drug Analysis - A thin layer chromatography atlas**. Segunda edição, Alemanha 2001.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M.; SHERMA, J.; KOWALSKA, T. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. **Chromatographic science series**, volume 99, 2008.

ZALEWSKI, C.A.; TOMAZELLA, G.T.; SARTORELLI, P.; ROMOFF, P.; FERREIRA, M.P.; FÁVERO, O.; LAGO, J.H.G. Variação Sazonal dos metabólitos secundários em espécies dióicas de *Baccharisuncinella* DC. (Asteraceae). **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, 2010.