

Método de extração e análise por CLAE para os metabólitos secundários majoritários de *Lychnophora ericoides* Mart.

Leonardo Gobbo-Neto¹(PG)*, Humberto Takeshi Sakamoto²(PG), Norberto Peporine Lopes¹ (PQ).

*gobbo@fcrp.usp.br

¹DFQ, FCFRP – USP, 14040-903, Ribeirão Preto, SP. ²DQ, FFCLRP – USP, 14040-901, Ribeirão Preto, SP.
Palavras Chave: *Lychnophora ericoides*, CLAE, variação metabólica.

Introdução

Variações temporais e espaciais no conteúdo total, bem como as proporções relativas, de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis. No entanto, estudos sobre estas variações e os fatores que as determinam têm sido realizados quase exclusivamente com espécies de clima temperado e que já foram submetidas a pressões seletivas antrópicas.

A carência de estudos nesta área com espécies endêmicas brasileiras nos levou a desenvolver uma metodologia de extração e análise por CLAE para o estudo de possíveis variações sazonal, circadiana e interpoblacional na produção dos metabólitos secundários majoritários das folhas de *L. ericoides*, uma espécie endêmica do cerrado de GO e MG e amplamente utilizada na medicina popular destas regiões como antiinflamatório e analgésico tópico¹.

Resultados e Discussão

As metodologias de extração e análise foram desenvolvidas e otimizadas utilizando-se 3 diferentes amostras de *L. ericoides*, provenientes de populações distintas.

Preparo e extração: o material a ser analisado é seco em estufa a 40°C por 48h e então as folhas são retiradas e processadas em moinho analítico. 20mg das folhas moídas são extraídos com 3mL de MeOH/H₂O 9:1 contendo o padrão interno cumarina (15µg/mL), em banho de ultra-som por 10 minutos. 500µL do extrato são então particionados com igual volume de Hex e então centrifugado a 1200g por 10 minutos, para uma rápida e eficiente separação das fases. Uma alíquota da fase hidro-alcoólica é então filtrada através de membrana de acetato de celulose (0,45µm) diretamente para um frasco do auto-injetor do sistema de CLAE. O método de extração é capaz de extrair todos os metabólitos majoritários aproximadamente na mesma proporção: 90%.

Análise por CLAE: 20µL do extrato são injetados em uma coluna Hypersil ODS, com pré-coluna equivalente. Utiliza-se fluxo de 1,6 mL/min e como fase-móvel ACN/MeOH/HAc 88:10:2 (bomba B) e H₂O/HAc 98:2 (bomba A), no seguinte gradiente de eluição: 0,01min – 8%B; 35min – 20%B; 65min – 28%B; 95min – 37%B; 135min – 55%B; 145min – 100%B. Utiliza-se um detector com arranjo de diodos

(DAD) e os cromatogramas são registrados a 270 e 325nm.

Até o momento, através de injeções, co-injeções e comparação de espectros UV de padrões autênticos, foram identificados 12 dos 29 picos ocorrentes nos perfis cromatográficos obtidos para as 3 diferentes amostras de *L. ericoides* utilizadas.

Foram construídas curvas de calibração para 7 das substâncias majoritárias, as quais representam todas as classes de metabólitos secundários ocorrentes na espécie. São elas: vicenina-2 (1), 6,8-di-C-β-glicopiranosil-crisina (2), ácido 4,5-di-O-E-cafeoilquinico (3), 4,5-diidro-15a-lychnopholideo (4), 4,5-diidro-15β-desoxigoyazensolideo (5), 16a-(1-metilprop-1Z-enil)-eremantolideo (6) e pinostrobin (7). A metodologia foi validada² e os resultados obtidos constam na Tabela 1.

Tabela 1. Resultados obtidos para os parâmetros avaliados na validação do método analítico.

substância	1	2	3	4	5	6	7
LDmin (µg/mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
LQmin (µg/mL)	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0	1,0	2,0
LQmax (mg/mL)	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
CV% intra-ensaio	2,8	2,5	2,3	1,8	2,0	2,2	2,7
CV% inter-ensaio	3,3	2,9	4,3	3,1	3,4	3,5	3,8
exatidão %	5,2	4,8	6,4	5,5	3,2	4,1	7,3

Conclusões

A metodologia de extração e análise desenvolvida apresentou, em todos os parâmetros analisados para a validação, resultados considerados satisfatórios para os propósitos deste estudo. Até o momento, 12 dos 29 picos cromatográficos ocorrentes nos indivíduos analisados foram identificados e curvas de calibração foram construídas para 7 deles.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP

¹ Gobbo-Neto, L.; Santos, M.D. *et al. Planta Med.* 2005, 71, 3.

Sociedade Brasileira de Química (SBQ)

² ANVISA. Res. Nº 899, 29 de maio de 2003.