

Otimização da extração de metabólitos primários de folhas de cana de açúcar (*Saccharum officinarum*) através de planejamento multifatorial

Paulo Roberto Ussoni Tomaz^{1*} (PG), Ana Paula Dias da Silva¹ (IC), Gabriel Mazzi Leme¹ (PG), Ossamu Hojo¹ (PQ), Vanderlan da Silva Bolzani¹ (PQ), Alberto José Cavalheiro¹ (PQ)
*paulo_araraquara@yahoo.com.br

NuBBE Núcleo de Bioensaio, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais – Departamento de Química Orgânica – Instituto de Química – UNESP - Araraquara.

Palavras Chave: metabólitos primários, GC, planejamento fatorial

Introdução

Metabolômica é uma abordagem promissora para o estudo global dos processos ecofisiológicos, monitorando através de técnicas analíticas de alto desempenho o maior número possível de metabólitos de um organismo¹. A escolha da CG é baseada na maior capacidade de picos por cromatograma e maior robustez principalmente no quesito reprodutibilidade quando comparado com HPLC². Dessa forma, o presente trabalho apresenta um planejamento fatorial para otimização das condições de extração de metabólitos primários das folhas de cana de açúcar.

Resultados e Discussão

Inicialmente as folhas da cana de açúcar adultas (*Saccharum officinarum* RB 3280) foram coletadas, secas em estufa (40° C) e trituradas em moinho de facas. Após essa preparação, pesou-se 200 mg de folha e um planejamento de misturas do tipo simplex-centróide foi utilizado para estudar o efeito dos solventes etanol, isopropanol e água na eficiência da extração (figura 1)

As extrações foram conduzidas com um volume final de solventes de 4 mL, adicionados de 100 µL de solução de ribitol (padrão interno) 2 mg mL⁻¹ em água. As extrações foram realizadas por maceração e aquecimento (70 °C por 15 min.).

Em seguida, alíquotas de 1 mL foram secas em Speed Vac, ressolubilizadas e metoximadas por 90 minutos a 30 °C com 80 µL de solução de cloridrato de metoxiamina 20 mg mL⁻¹ em piridina. A seguir as amostras foram siliadas [30 min. a 37 °C com 80 µL de MSTFA (N-metil-N-[trimetilsilil]-trifluoroacetamida)] e 1 µL foi injetado no GC-FID (Varian CP3800) na razão split 1:25. Foi utilizada uma coluna DB-5 (30m com 0,25mm diam, 0,25µm de filme). O injetor foi aquecido até 230 °C. N₂ foi usado com vazão de 1 mL s⁻¹. O forno foi aquecido a 70 °C por 5min, e aumento de 5 °C min⁻¹ até 290 °C e mantido por 6 min. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Análise da superfície de resposta utilizando número de picos como variável dependente definiu que a melhor condição de extração dos metabólitos

das folhas foi a condição 2, que corresponde a 100% de água como solvente extrator.(Figura 1)

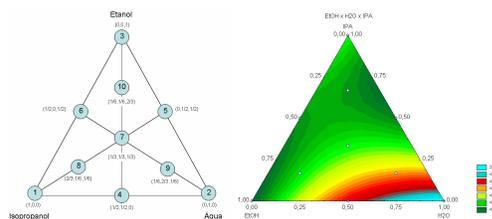


Figura 1. Planejamento simplex-centróide para análise da influência da proporção dos solventes na extração e superfície de resposta

A seguir, para otimização do volume de solvente, tempo, temperatura e número de extrações efetuou-se um planejamento fatorial 2⁴ (Tabela 1)

Tabela 1. Níveis alto e baixo para planejamento fatorial 2⁴

Variável	Nível alto	Nível baixo
Volume (mL)	2,0	4,0
Nº de extrações	3	1
Tempo (min)	45	15
Temperatura (°C)	70	30

Conclusões

Os experimentos quimiométricos realizados indicaram as seguintes condições ótimas de extração para os metabólitos primários de folhas de cana de açúcar: massa de amostra de 200 mg, solvente extrator água (2 mL) com 2 mgmL⁻¹ de ribitol, extrair 3 vezes por 15 min. A 30° C. Utilizando estas condições de extração foi possível observar 84 picos nas condições cromatográficas utilizadas.

Agradecimentos

CNPq, FAPESP, Biota-FAPESP, Banco Real

¹ Raamsdonk, L.M. B. Teusink, D. Broadhurst, N.S. Zhang, A. Hayes, M.C. Walsh, J.A. Berden, K.M. Brindle, D.B. Kell, J.J. Rowland, H.V. Westerhoff, K. van Dam, S.G. Oliver, *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*:45-50.

² Dunn WB, Ellis DI C. *Trends Anal. Chem.* **2005**, *24*:285–294.