

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

## **ANÁLISE PRELIMINAR POR CROMATOGRÁFIA EM CAMADA DELGADA DOS EXTRATOS DA FRAÇÃO HEXÂNICA DAS FOLHAS DE TRÊS ESPÉCIES DE ERIOCAULACEAE MART.<sup>1</sup>**

**Ana Laura Arnhold<sup>2</sup>, Mara Lisiane Tissot-Squalli<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup> Trabalho de Conclusão de Curso de Ciências Biológicas

<sup>2</sup> Bióloga e licencianda em Ciências Biológicas, bolsista PET Biologia

<sup>3</sup> Docente do Departamento de Ciências da Vida (DCVida) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Grupo de Pesquisa Biodiversidade e Ambiente (AMBIO), tutora do Programa de Educação Tutorial (PET Biologia/MEC/SESU)

### **INTRODUÇÃO**

A família Eriocaulaceae Mart. apresenta cerca de 1.200 espécies divididas em 10 gêneros (eMONOCOT, 2015). *Syngonanthus chrysanthus* (Bong.) Ruhl. é conhecida nos campos da restinga litorânea do sul e sudeste brasileiro (eMONOCOT, 2015), sendo considerada restrita à América do Sul (GIULIETTI e HENSOLD, 1990). No mesmo ambiente ocorrem *E. modestum* Kunth e *E. megapotamicum* Malme. Estas espécies constituem parte importante da flora nativa de restingas no estado do Rio Grande do Sul.

As eriocauláceas são muito estudadas em âmbito taxonômico a partir de dados morfológicos e anatômicos, porém poucos trabalhos abordam a complexidade das estratégias evolutivas, assim como as interações ecológicas desta família. A investigação de grupos de substâncias químicas que funcionam como marcadores taxonômicos pode trazer resultados interessantes sobre a evolução de determinados táxons e também auxiliar no processo de classificação, assim como a correlação entre evolução de estruturas químicas e a evolução morfológica e anatômica de plantas (GOTTLIEB, 1982). Dentre as substâncias comumente utilizadas como marcadores taxonômicos estão: alcaloides, terpenos e compostos fenólicos como as cumarinas e flavonoides.

Compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que possuem pelo menos um anel aromático no qual, pelo menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila (CARVALHO, 2004). São amplamente distribuídos em plantas, porém, costumam apresentar algumas especificidades que podem servir como marcadores taxonômicos para estudos de sistemática vegetal, como é o caso dos flavonoides (ZUANAZZI, 2004). Os compostos fenólicos mais estudados, tanto para fins taxonômicos quanto para fins farmacológicos, são os fenóis, xantonas, cumarinas, flavonoides, isoflavonoides e taninos (CARVALHO, 2004).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Os flavonoides podem ser encontrados como agliconas ou sob a forma de glicosídeos ou derivados metilados e acilados (LUENGO, 2005). As modificações no anel central dessas substâncias levam à diferenciação em subclasses distintas, tais como: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, isoflavonas e antocianidinas (VEITCH, 2008). As cumarinas são heterosídeos amplamente distribuídos nos vegetais, predominantemente nas angiospermas, mas também podem ser encontrados em fungos e bactérias. As cumarinas podem ser encontradas em todas as partes de uma planta, frequentemente em misturas. Possuem espectro

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

ultravioleta (UV) característico, o qual é fortemente influenciado pela natureza e posição dos grupos substituintes (KUSTER, 2004).

Os alcaloides são compostos nitrogenados encontrados predominantemente em angiospermas. Constituem-se um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural, comparável com a dos terpenóides, representando cerca de 20 % das substâncias naturais descritas (CARVALHO, 2004). Os terpenóides também constituem uma vasta variedade de substâncias vegetais. Constituem grande parte dos óleos essenciais, normalmente em forma de monoterpenos ou sesquiterpenos (SIMÕES, 2004). Dentre esta grande variedade de compostos, poucos são atribuídos às eriocauláceas, devido à quantidade insuficiente de estudos de caracterização química destas espécies. Portanto, se faz necessário maior estímulo aos estudos moleculares, principalmente de cunho fitoquímico (ARNHOLD, 2015).

O presente trabalho objetivou analisar a fração hexânica das folhas das espécies *E. megapotamicum*, *E. modestum* e *S. chrysanthus* através do método de cromatografia em camada delgada (CCD), a fim de comparar os principais grupos de metabólitos secundários nelas presentes.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal utilizado foi coletado em novembro de 2014, nas praias de Atlântida Sul (Xangri-lá, RS) e do Barco (Capão da Canoa, RS), nos municípios de Curumim (RS), e Torres (RS), nas coordenadas S 29° 52' 49.5" W 050° 04' 34.7", S 29° 42' 57.6" W 049° 59' 41.0", S 29° 37' 04.40" W 049° 56' 05.05" e S 29° 24' 35.8" W 049° 47' 56.2" respectivamente. Materiais testemunhos das espécies de *S. chrysanthus*, *E. modestum* e *E. megapotamicum* encontram-se depositados no Herbário Rogério Bueno (HUI) da Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, em Ijuí, RS.

A quantidade de folhas coletadas de *E. megapotamicum* totalizou 232,35 g de folhas frescas, de *E. modestum*, 132,89 g e de *S. chrysanthus*, 66,94 g. Após a coleta, as folhas foram limpas e maceradas em solventes em ordem crescente de polaridade (MATOS, 1997). Os solventes utilizados foram: Hexano (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), Acetato de etila (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) e Metanol (CH<sub>4</sub>O). Depois da máxima extração realizada por cada solvente, foi utilizado o evaporador rotativo Marconi 120 para tornar o extrato mais concentrado e livre de solvente para posterior análise.

Para a análise preliminar utilizou-se o método de cromatografia em camada delgada (CCD) descrito por Wagner e Bladt (2001). Foram utilizadas cromatoplasmas pré-fabricadas em sílica gel e alumínio F254 Merck em dimensões de 5x3,5cm. Apenas a fração hexânica foi analisada. Para a realização da CCD da fração hexânica, foi utilizada a fase móvel (Fm) de hexano e acetato de etila em proporção de 30:70, respectivamente. Para a diluição do extrato e posterior aplicação na placa, foi utilizada acetona (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) como solvente. Após a realização da CCD dos extratos da fração hexânica de *E. modestum*, *S. chrysanthus* e *E. megapotamicum*, foram utilizados reagentes para a verificação de compostos fenólicos, alcaloides, terpenos, cumarinas e flavonoides.

Para as revelações das placas foram utilizados Cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) a 2% para a revelação de compostos fenólicos, reagente de Dragendorff para alcaloides, anisaldeído sulfúrico para terpenos, NP-PEG (difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol) para flavonoides e solução hidróxido de potássio (KOH) a 10% para cumarinas, como sugerem Matos (1997) e Wagner e Bladt (2001). Utilizou-se uma lâmpada de emissão de radiação 365 UV-A e 254 nm UV-C da marca Boitton para a observação das placas antes de serem reveladas com anisaldeído sulfúrico, cloreto férrico e Dragendorff, assim como para observação das placas após a revelação com NP-PEG e KOH.

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na cromatoplaca 1, houve leve escurecimento em tom marrom na banda 2, indicando a presença de alcaloide em baixa quantidade, enquanto as bandas 1 e 3 apresentaram um leve tom amarelado, possivelmente flavonoides (Fig. 1). A solução de cloreto férrico foi utilizada para detectar possíveis fenóis, alcaloides, enóis e compostos fenólicos (WAGNER e BLADT, 2001; WALL, 2005).

Na cromatoplaca 2 houve escurecimento leve de tom amarronzado na banda 2, confirmando presença de alcaloide em baixa quantidade (WAGNER e BLADT, 2001), enquanto que nas bandas 1 e 3 não houve coloração perceptível (Fig. 2). É possível que *S. chrysanthus* tenha algum alcaloide que o distinga de *E. modestum* e *E. megapotamicum*. Ferrazoli (2008) também relata a ausência de alcaloides em *E. ligulatum* Vell. O Reagente de Dragendorff pode ser utilizado para visualizar a maioria dos compostos orgânicos nitrogenados, em geral, alcaloides (WALL, 2005).

Na cromatoplaca 3 não houve escurecimento das bandas nos tons de marrom escuro ou preto, o que indica a ausência de terpenos na fração hexânica (Fig. 2) (JORK, et al., 1990). Embora grande parte da classe dos terpenos seja apolar e seja fundamental na constituição dos óleos essenciais, é possível que haja alguns tipos de terpenos com porções polares em sua estrutura molecular nas frações que não foram analisadas neste estudo (SIMÕES, 2004), assim como em outras estruturas da planta, como capítulos, escapos e raízes.

Na cromatoplaca 4 ocorreu coloração amarelada e alaranjada na banda 1, enquanto na banda 2 e 3, a coloração variou de esverdeada a levemente amarelada, respectivamente (Fig. 2). Na cromatoplaca 4.1 (fotografia da cromatoplaca em luz UV a 365 nm) a banda 2 apresentou fluorescência de tom ligeiramente azulado, sugerindo presença modesta de cumarina (AMARAL, 2007), enquanto as bandas 1 e 3 não apresentaram alteração na fluorescência (Fig. 2).

Na cromatoplaca 5 ocorreram tons alaranjados na banda 1, tons esverdeados da banda 2, e amarelo claro na banda 3 (Fig. 2). Na cromatoplaca 5.1 (fotografia da cromatoplaca 5 em luz UV a 365 nm) ocorreu forte fluorescência amarela e laranja na banda 2, enquanto na banda 1 a fluorescência se mostrou mais fraca e alaranjada e na banda 3 avermelhada. Tons de laranja sugerem flavonas ou flavonóis, enquanto amarelo sugere glicosídeos de flavonóis ou quercetina, e vermelho sugere flavonoides em geral (WAGNER, 2001). *S. chrysanthus* apresenta claramente duas substâncias que se distinguem por cor, enquanto que *E. megapotamicum* apresenta duas pequenas bandas as quais foram separadas no processo, porém, não apresentam distinção pela cor da fluorescência. Em *E. modestum* a separação também não foi satisfatória.

Os resultados desta análise coincidem com trabalhos como o de Salatino et al. (2000) e Dokkedal et al. (2004), que citam a predominância de compostos fenólicos e flavonóis em *Eriocaulon*, enquanto que em *Syngonanthus* há presença de flavonoides e flavonas, principalmente glicosiladas. Ricci et al. (1996) também descrevem presença de flavonas C- glicosiladas e O- glicosiladas em espécies do gênero *Syngonanthus*, evidenciando também que as eriocauláceas apresentam grande diversidade de flavonoides, os quais variam qualitativa e quantitativamente de um gênero para outro. Em contrapartida, Arnhold (2015) sugere que flavonoides estão ausentes ou se encontram em baixíssima quantidade nas raízes de *S. chrysanthus*, muito provavelmente por não haver nas raízes função biológica direta destas substâncias.

Diferentes fases móveis, como propõe Wagner e Bladt (2001), não foram testadas ainda. Deste modo, o resultado final na separação dos compostos não foi satisfatório, e, portanto, o fator de retenção é inconclusivo. Apesar disso, este cálculo é importante para avaliar o grau de polaridade

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

das substâncias a partir do comportamento expresso por elas na interação com a fase móvel e a fase estacionária.

Observando as cromatoplasmas e os resultados dos cálculos de Rf (Tabela em Anexo e figura em anexo), é possível perceber que as bandas do extrato de *S. chrysanthus* mostram-se mais próximas do ponto de aplicação, ou seja, apresentam comportamento mais polar que as bandas do extrato de *E. modestum* e *E. megapotamicum*, por ficarem retidas mais facilmente na sílica-gel da cromatoplasma, que é polar.

Sabe-se que a CCD é um método de difícil reprodutibilidade por diversos fatores, como o tamanho da mancha da amostra vegetal, nível do solvente usado para a fase móvel (CORSINO, 2003), assim como problemas de dimensão e recorte das cromatoplasmas. No entanto, apesar da discrepância das medidas de dispersão do Rf de cada extrato, é possível observar claramente um padrão cromatográfico de retenção.

#### CONCLUSÃO

Avaliações preliminares contribuíram para caracterizar, mesmo que de forma superficial, a composição química de espécies de eriocauláceas cujas constituições químicas não foram ainda totalmente descritas. Através de estudos como este, é possível utilizar determinados grupos de metabólitos como marcadores taxonômicos a nível de gênero ou espécie.

Este estudo, embora preliminar, demonstrou que existem aspectos importantes a serem pesquisados na fitoquímica de Eriocaulaceae, com especial atenção às aplicações taxonômicas, ecológicas e evolutivas. Mesmo assim, o histórico bibliográfico da família e também nossos resultados indicam que possivelmente moléculas interessantes do ponto de vista farmacológico também poderão ser encontradas em pesquisas futuras.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMARAL, Maria da Penha H.; VIEIRA, Fabiana Pires; LEITE, Magda Narciso; AMARAL, Lilian H.; PINHEIRO, Lucas César; FONSECA, Bruno Guedes; PEREIRA, Mônica Cecília Santana; VAREJÃO, Eduardo Vinícius. Determinação do teor de cumarina no xarope de guaco armazenado em diferentes temperaturas. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19(2B): 607-611, Abr./Jun. 2009.
- ARNHOLD, Ana Laura, MELLITZ, Gabriela Martins; HOUSSAINI, Mara Lisiane Tissot-Squalli; GEHRKE, Ilaine T. Seibel. Triagem fitoquímica da raiz de *Syngonanthus chrysanthus* (Bong.) Ruhlant a partir de ensaios cromáticos como análise preliminar e perspectivas de interesse farmacológico e biotecnológico. 3º Congresso Internacional em saúde: atenção integral a saúde. DCVida – Departamento de Ciências da Vida. Universidade Regional do noroeste do estado do Rio Grande do Sul. Ijuí (RS), 2015.
- CARVALHO, José Carlos Tavares; GOSMANN, Grace; SCHENKEL, Eloir Paulo. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira Simões; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo de; MENTZ Lilian Auler, PETROVICK, Pedro Ros. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª Edição. [S.L]. Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2004. p.519-556.
- CORSINO, Joaquim; SILVA, Dulce Helena S.; ZANONI, Maria Valnice B.; BOLZANI, Vanderlan S.; FRANÇA, Suzelei Castro; PEREIRA, Ana Maria S.; FURLAN, Maysa; Antioxidant flavan-3-ols and flavonol glycosides from *Maytenus aquifolium*. *Phytotherapy Research*. [S.L.] v. 17, 2003,

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

p 913-916. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ptr.1249/abstract> >. Acesso em: 12/11/15

EMONOCOT. An online resource for monocot plants. Disponível em: < <http://e-monocot.org/> > Acesso em 27/11/2015.

FANG, Jing-Jing; YE, Guan; CHEN, Wen-Liang; ZHAO, Wei-Min. Antibacterial phenolic components from *Eriocaulon buergerianum*. *Phytochemistry*. [S.L.] V. 69, 2008, p. 1279–1286.

GIULIETTI, Ana Maria; HELSOLD, Nancy. Padrões de distribuição geográfica dos gêneros de Eriocaulaceae. *Acta Botanica Brasilica*. 4:133-159. 1990. Disponível em: < <http://www.scielo.br/pdf/abb/v4n1/v4n1a10> >. Acesso em: 14/11/15

JORK, Hellmut FUNK, Werner, FISCHER, Walter, WIMMER, Hans. *Thin-Layer Chromatography: Reagents and Detection Methods*. Weinheira, Federal Republic of Germany, 1990 v. 1a, 1990. 496 p.

KUSTER, Ricardo M.; ROCHA, Leandro M. Cumarinas. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo de; MENTZ Lilian Auler, PETROVICK, Pedro Ros. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª Edição. [S.L]. Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2004. p.538-552.

LUENGO, López. Flavonoides. *Offfarm: Farmacia y Sociedad*, [S.L.]. 2002; 21 (4). p. 122.

MATOS, Francisco José de Abreu. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2ª edição. Editora UFC, Fortaleza. 1997, 141 p.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SPITZER, Volker. Óleos voláteis. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo de; MENTZ Lilian Auler, PETROVICK, Pedro Ros. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª Edição. [S.L]. Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2004. p.467-495.

VEITCH, N. C.; GRAYER, R. E. J. Flavonoids and their glycosides, including anthocyanins. *Nat. Prod. Rep.* [S.L] 2008, 25(3): p 555-611. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18497898> >. Acesso em: 04/10/15

WAGNER, Hildebert; BLADT, Sabine. *Plant Drugs Analysis: A thin layer chromatography atlas*. Editora Springer, 2ª edição. Berlim, 2001, 368 p.

WALL, Peter E. *Thin-layer Chromatography: a modern practical approach*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005. 184 p.

ZUANAZZI, José Angelo S.; MONTANHA, Jarbas Alves. Flavonoides. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo de; MENTZ Lilian Auler, PETROVICK, Pedro Ros. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5ª Edição. [S.L]. Editora da UFSC e UFRGS Editora, 2004. p.577-614.

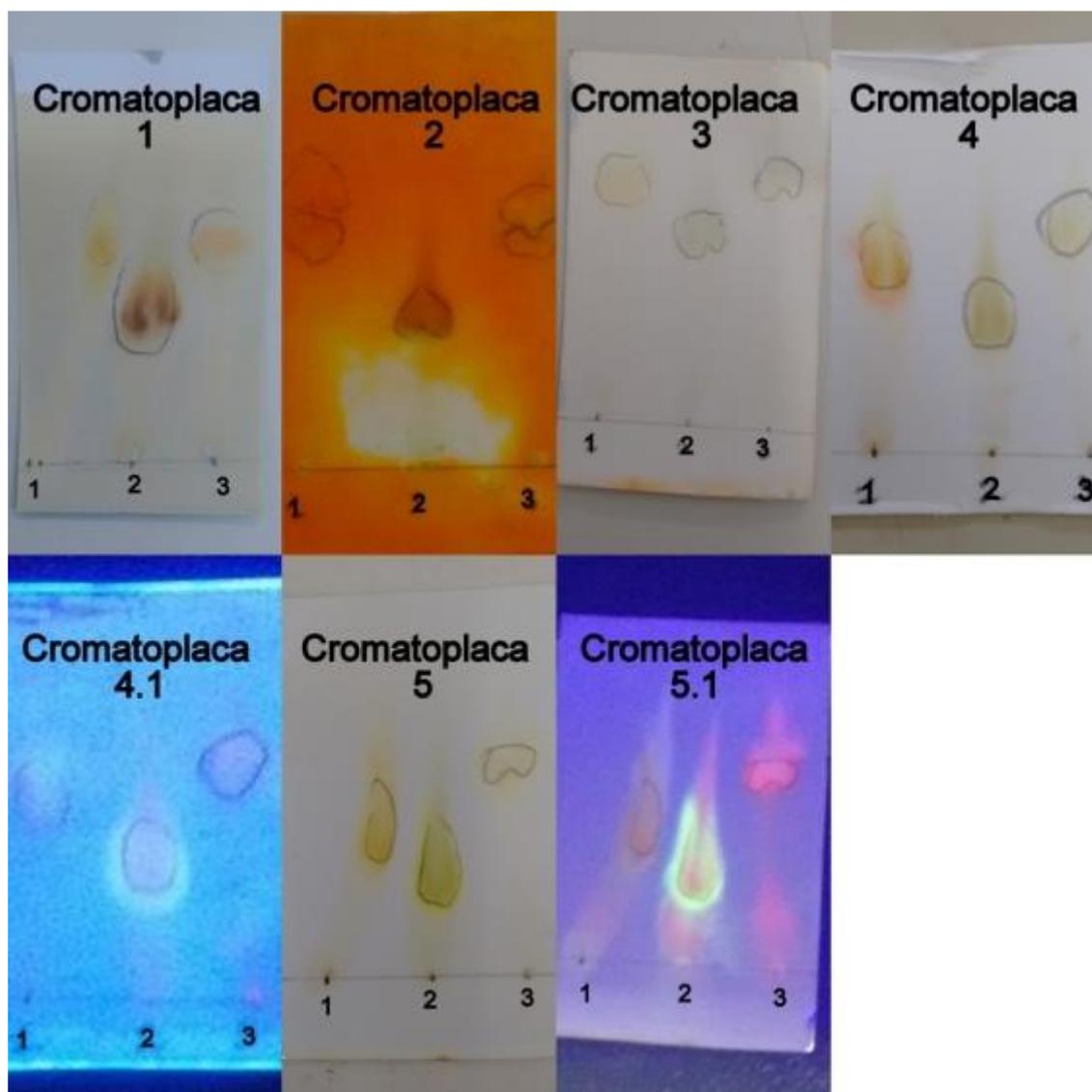
ANEXOS

**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico  
**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

Cromatoplasmas		Rf1	Rf2	Rf3
1-	Cloreto férrico	0,61 cm	0,50 cm	0,60 cm
2-	Dragendorff	0,57 cm	0,36 cm	0,53 cm
3-	Anisaldeído sulfúrico	0,71 cm	0,59 cm	0,76 cm
4-	Solução KOH	0,56 cm	0,40 cm	0,67 cm
5-	NP-PEG	0,52 cm	0,37 cm	0,65 cm

Fonte: O próprio autor.

Tabela 1 - Fator de retenção das cromatoplasmas analisadas com diferentes reveladores e com fase móvel de 30:70 (hexano e acetato de etila). Rf1 é o fator de retenção de *E.modestum*, Rf2 de *S.chrysanthus* e Rf3 de *E.megapotamicum*.



**Modalidade do trabalho:** Relatório técnico-científico

**Evento:** XXIV Seminário de Iniciação Científica

Figura 1 - Cromatoplasmas reveladas com diferentes reagentes; Cromatoplasma 1: Solução de  $\text{FeCl}_3$  a 2%. Cromatoplasma 2: Dragendorff. Cromatoplasma 3: Anisaldeído sulfúrico. Cromatoplasma 4: Solução de  $\text{KOH}$  a 10%. Cromatoplasma 4.1 Solução de  $\text{KOH}$  + UV 365 nm. Cromatoplasma 5: NP-PEG. Cromatoplasma 5.1: NP-PEG + UV-A de 365 nm. A mancha 1 de cada cromatoplasma corresponde ao extrato hexânico de *E. modestum*, a mancha 2 corresponde ao de *S. chrysanthus* e a 3 corresponde ao de *E. megapotamicum*. Fonte: o próprio autor.