



ESTUDO DA ADSORÇÃO DO ESPILANTOL EM SOLUÇÃO ALCÓOLICA EM RESINAS HIDROFÓBICA

Felipe Lopes da Mota (Bolsista/Apresentador)¹ – UNIFESSPA
felipemota@unifesspa.edu.br
Clóvis Sacardo da Silva (Coordenador(a) do Projeto)² - UNIFESSPA
clovis.silva@unifesspa.edu.br

Agência Financiadora: CNPq

Eixo Temático/Área de Conhecimento: Purificação de produtos biotecnológicos

1. INTRODUÇÃO

O espilantol é um composto bioativo encontrado em uma grande variedade de plantas. No Brasil é encontrada na planta do gênero *Acmella*, incluindo a variedade *Acmella oleracae*, conhecida popularmente como jambu. O composto pode exercer uma variedade de efeitos biológicos e farmacológicos, incluindo atividades analgésica, neuroprotetora, estimulante sexual, antioxidante, antimutagênica, anticâncer, anti-inflamatória, antifúngica e antimicrobiana, antilarvicida e inseticida. O composto espilantol é uma substância alcalóide anfifílica, ou seja, possui uma região hidrofílica e uma região hidrofóbica em sua estrutura. O grupo amida da molécula de espilantol é relativamente polar, enquanto a parte insaturada é menos polar. Este fato permite que o composto seja extraído das plantas através de solventes que variam da polaridade do hexano a metanol:H₂O (4:1 v/v)^[1].

Os produtos destinados a usos terapêuticos, entretanto, requerem maior pureza. Assim, o estudo e desenvolvimento de técnicas de biosseparação em grande escala é atualmente uma necessidade, visando maiores valores de eficiência, e por conseguinte economia e altos graus de recuperação e pureza, mantendo ainda, a atividade biológica da molécula^[2]. No referente a purificação e isolamento do espilantol, os trabalhos desenvolvidos até o presente momento, que para isolar e purificar o espilantol em solução alcoólica, o processo passa por uma etapa em coluna de adsorção^[3-5].

Sendo assim, os estudos de resinas comerciais devem fornecer subsídios, para que se proponha um processo onde sejam estabelecidas as condições operacionais adequadas de purificação do espilantol em solução alcóolica. O trabalho teve como objetivo o estudo de resinas poliaromáticas hidrofóbicas comerciais, para purificar o espilantol em solução etanólica proveniente da extração etanol/H₂O da planta jambu.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Preparo do material e extração

O material composto por caules, folhas e flores foi previamente lavado, para remover os resíduos do solo. As matérias-primas foram higienizadas através de imersão em solução contendo 200 mg L⁻¹ de cloro residual livre a partir de hipoclorito de sódio com 10 % de pureza, durante 10 minutos, com subsequente drenagem da água. O material lavado foi secado em estufa com circulação de ar a 45 °C por 12 horas. O material seco foi triturado usando um processador Robust 1000 W. Após seco, o material foi armazenado em frascos de vidros com tampa hermética. A extração foi feita utilizando uma solução de etanol 70% (wt) durante 3 horas, para produzir extrato etanólico. A relação volume de solvente (mL) por massa de material vegetal (g)

¹Graduando em Engenharia Química - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará

² Prof. Dr. em Engenharia Química – Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (FEMMA/IGE/UNIFESSPA).



foi de 10:1 e foi utilizado o extrator Soxhlet para a extração do espilantol. O extrato obtido foi filtrado em papel quantitativo de 45 μm e colocado em frasco âmbar para análise.

2.2. Teste de adsorção do espilantol na resina Amberlite XAD-4 e Carvão Ativado

Os testes de adsorção do espilantol contido no extrato alcoólico da planta jambu foram feitos em ensaios em batelada sob agitação. Para cada 20 mL de solução alcoólica contendo espilantol (preparada conforme descrito no item 2.1) foram adicionados diferentes massa de resina adsorvente (base úmida) e carvão ativado (ambos adquiridos com recurso próprio). Os frascos contendo resina e solução de espilantol foram agitados a 100 rpm e mantidos a temperatura de 30°C. Após atingir o equilíbrio (2 h), os valores das concentrações finais de espilantol no extrato foram analisados por cromatografia líquida.

2.3. Determinação de espilantol por CLAE

A análise qualitativa das soluções de espilantol foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Modelo: Prominência Shimadzu LC-20AP) da faculdade de química- ICE-UNIFESSPA, usando detector de fotodiodo, e uma coluna C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 μm). A fase móvel composta foi composta por acetonitrila e água na proporção 40:60 (v/v) com vazão de 0,2 mL.min⁻¹. Uma alíquota de 0,5 mL da solução de extrato previamente preparada foi filtrada em filtros de 0,22 μm , e uma parte da solução filtrada (10 μL) foi injetada no cromatógrafo para quantificação da concentração de espilantol ($\mu\text{g mL}^{-1}$) na amostra. A quantificação foi feita através de uma curva analítica previamente construída com o padrão de espilantol preparado e leitura de absorbância em 229,8 nm.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Teste qualitativo de adsorção *clorofila a e b* pela resina Amberlite XAD-4 e Carvão Ativado em espectrofotometria

Segundo MALDANER & JARDIM (2009) os testes de adsorção da substância alvo em estudo é fundamental para otimizar os gastos de reagentes e matéria prima, bem como definir as melhores condições e o número de experimentos a ser realizado^[6]. A adsorção da *clorofila a e b* pela resina Amberlite XAD-4 utilizando o extrato bruto de jambu foi analisada por espectrometria no comprimento de onda 665 e 652 nm, respectivamente. Os valores obtidos das absorbâncias referente a *clorofila a e b* para as diferentes massas de resina |Amberlite XAD-4 podem ser observadas na Tabela 1. A Tabela 1 demonstra que o aumento da massa de resina no frasco proporciona uma diminuição de 15% nas absorbâncias das *clorofilas a e b* na solução. Estes valores indicam duas hipóteses: a) uma baixa adsorção das *clorofilas a e b* pela resina, e/ou; b) massa de resina insuficiente para a alta concentração de *clorofilas a e b* presente no extrato hidro alcoólico de jambu. No intuito de verificar as hipóteses estabelecidas anteriormente uma amostra do extrato bruto de jambu foi diluída dez vezes e as massas das resinas foram aumentadas variando na faixa de 0,25 a 1,5 g de resina por frasco com 20 mL. Na Tabela 2 pode se observar os resultados obtidos para absorbância da *clorofila a e b* em função do aumento da massa de resina. Os resultados qualitativos demonstram uma baixa adsorção da *clorofila a e b* pela resina Amberlite XAD-4, mantendo a variação entre 15 a 20% de absorção das *clorofilas*. Devido à alta concentração de *clorofila a e b* no extrato hidroalcoólico de jambu, optou-se por um teste qualitativo de adsorção utilizando o carvão ativado como alternativa de pré-tratamento, para o uso posterior da resina Amberlite XAD-4. Segundo RODRIGUEZ et al. (2016) o carvão ativado é capaz de reduzir a concentração da *clorofila a e b* em 40% no extrato bruto de jambu^[7].

Tabela 1. Valores das absorbâncias para as *clorofilas a e b* presentes nos extratos alcoólicos de jambu para a resina Amberlite XAD-4.

Amostras	Massa da resina (g)	Clorofila <i>a</i> (nm)	Clorofila <i>b</i> (nm)
A1	0,0250	0,454	0,286
A2	0,0320	0,438	0,269
A3	0,1000	0,417	0,256
A4	0,3000	0,409	0,251
A5	0,5000	0,385	0,244

Tabela 2. Valores das absorvâncias para as *clorofilas a* e *b* presentes nos extratos alcoólicos de jambu diluído 10 vezes, para a resina Amberlite XAD-4.

Amostras	Massa da resina (g)	Clorofila <i>a</i> (nm)	Clorofila <i>b</i> (nm)
B1	0,2526	0,136	0,248
B2	0,5059	0,152	0,245
B3	0,7506	0,130	0,190
B4	1,0079	0,141	0,215
B5	1,5010	0,120	0,198

Nesta etapa optou-se por trabalhar com extrato de jambu diluído 10 vezes com a solução alcoólica de extração, para analisar qualitativamente a adsorção da *clorofila a* e *b* pelo carvão ativado. Na Tabela 3 pode se observar que o aumento da massa de carvão ativado influenciou na diminuição significativa da absorvância das *clorofilas a* e *b* indicando adsorção das clorofilas no carvão ativado.

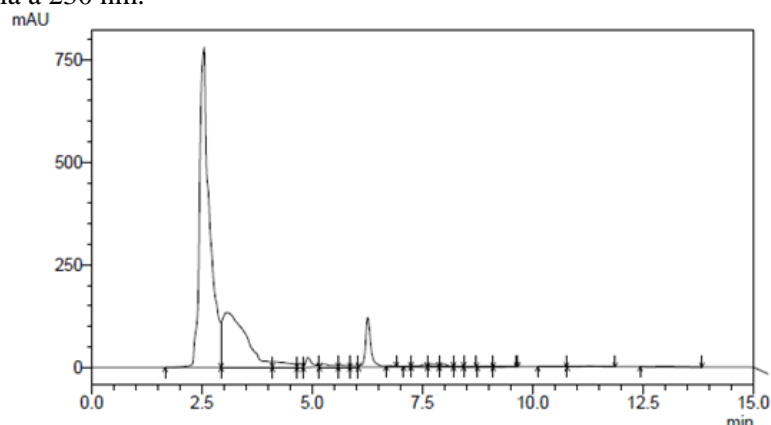
Tabela 3. Valores das absorvâncias para as *clorofilas a* e *b* presentes nos extratos alcoólicos de jambu diluído 10 vezes para o carvão ativado.

Amostras	Massa da resina (g)	Clorofila <i>a</i> (nm)	Clorofila <i>b</i> (nm)
D1	0,0032	0,157	0,326
D2	0,0063	0,137	0,280
D3	0,0125	0,093	0,184
D4	0,0250	0,052	0,097

4.2. Análises qualitativas do espilantol em CLAE

A amostra bruta do extrato foi preparada e analisada qualitativamente em um cromatógrafo Shimadzu LC-20AP para verificar a presença do espilantol no extrato extraído da planta jambu, uma vez que se conhece o tempo de retenção do espilantol pela coluna cromatografica. O tempo de retenção para o espilantol no cromatógrafo Shimadzu LC-20AP esta estabelecido entre 6,0 a 6,5 min. A Figura 1 apresenta o cromatograma da amostra bruta de extrato de jambu analisada no cromatógrafo Shimadzu LC-20AP, leitura da absorvância a 230 nm, pode-se observar que o pico do espilantol foi detectado pelo cromatógrafo em 6,3 min indicando a presença do espilantol na amostra de extrato bruto de jambu.

Figura 1. Cromatograma do extrato bruto alcóolico analisada no cromatógrafo Shimadzu LC-20AP, leitura da absorvância a 230 nm.

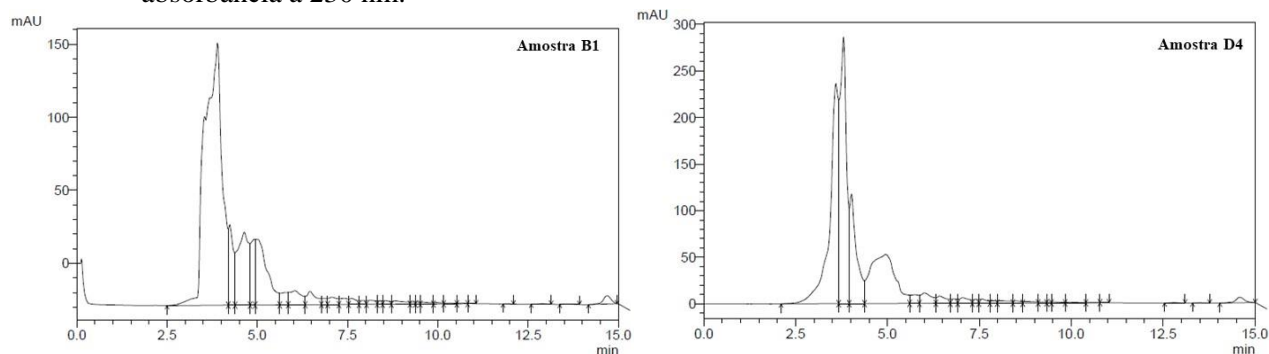


Fonte: autoria própria

As amostras B1 e D4 (Tabela 2 e Tabela 3, respectivamente) foram utilizadas para o teste de adsorção de clorofilas e analisadas no cromatógrafo Shimadzu LC-20AP, leitura da absorvância a 230 nm, no intuito de observar a adsorção do espilantol pela resina Amberlite XAD-4 e o carvão ativado. As Figuras 2 apresenta os cromatogramas das amostras B1 e D4, ambas as amostras apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção do cromatógrafo, uma vez que não se observa o pico do espilantol no tempo de retenção de 6,3 min. Este fato indica que tanto a resina ambertite XAD-4 e o carvão ativado apresentaram a adsorção do espilantol

em seus sítios ativos. Portanto, estes resultados dos testes qualitativos de adsorção demonstraram a viabilidade da resina amberlite XAD-4 como etapa de purificação do espilantol do extrato alcóolico.

Figura 2. Cromatograma das amostras B1 e D4 injetadas no cromatógrafo Shimadzu LC-20AP, leitura da absorbância a 230 nm.



Fonte: autoria própria

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os testes iniciais de adsorção do espilantol pela resina Amberlite XAD-4 demonstraram a viabilidade do uso da resina Amberlite XAD-4, como uma etapa de purificação do espilantol presente no extrato alcóolico de jambu. Outro resultado relevante é a baixa adsorção das *clorofilas a e b* pela resina Amberlite XAD-4 observado nos testes de adsorção das clorofilas pela resina. Nos testes de adsorção do espilantol e da clorofila pelo carvão ativado, observou-se que ambos apresentaram interação com o carvão ativado, logo este pode ser utilizado como uma etapa de pré-tratamento do extrato bruto de jambu, diminuindo a carga de contaminante para uma próxima etapa do processo de purificação do espilantol. Os resultados obtidos até o presente momento, servem de base para o direcionamento das próximas etapas que devem ser realizadas do projeto de pesquisa.

REFERÊNCIAS

- [1] BARBOSA, A. F.; CARVALHOSA, M. G.; SMITHB, R. E.; SABAA-SRUR, A. U.O. Spilanthol: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 128–133, 2016.
- [2] KILIKIAN, B. V.; PESSOA JR, A. **Purificação de produtos biotecnológicos**. In: Schmidell, W.; Lima, U. A.; Aquarone, E.; Borzani, W. *Biotechnology Industrial. Engenharia Bioquímica*, 1ª ed. São Paulo, Edgard Blücher Ltda, v.2, p.493-514, 200.
- [3] NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 5, p. 759–762, 1992.
- [4] SIMAS, N. K.; DELLAMORA, E. C. L.; SCHRIPISEMA, J.; LAGE, C. L. S.; OLIVEIRA FILHO, A. M. L. W.; PORZEL, A.; KUSTER, R. M. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 1, p. 67–72, 2013.
- [5] FREITAS BLANCO, V. S.; MICHALAK, B.; ZELIOLI, Í. A. M.; OLIVEIRA, A. S. S.; RODRIGUES, M. V. N.; FERREIRA, A. G.; GARCIA, V. L.; CABRAL, F. A.; KISS, A. K., RODRIGUES, R. A. F. Isolation of spilanthol from *Acmella oleracea* based on Green Chemistry and evaluation of its in vitro anti-inflammatory activity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, n.6, p. 372–379, 2018.
- [6] MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. **Química Nova**, v. 32, p. 214-222, 2009.
- [7] RODRIGUES, R. A. F.; DE FREITAS, V. S.; DE CARVALHO, J. E.; GROPPPO, F. C. Processo de purificação de extrato de jambu, extrato purificado assim obtido, composição anestésica e bioadesivo contendo extrato purificado de jambu. **Patente WO 2016/037250 AI**. 2016.