

COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *PHYSALIS* (SOLANACEAE)

Lucas Souza da Silva¹; Alexandre Freitas Espeleta²; Angélica Maria Lucchese³

1. Bolsista FAPESB/CNPq, Graduando em Farmácia, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: lsuefs@gmail.com

2. Orientador, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: espeleta@uefs.br

3. Co-orientadora, Departamento de Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: angelica.lucchese@gmail.com

PALAVRAS-CHAVE: CLAE, fisalinas, *Physalis*

INTRODUÇÃO

As várias aplicações terapêuticas de espécies do gênero *Physalis* (Solanaceae) na medicina tradicional têm sido alvo de estudos para comprovação e identificação dos constituintes responsáveis pela ação farmacológica (Tomassini *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2005). Relatos de ação antimicrobiana, antiinflamatória, imunomoduladora, citotóxica, antitumoral, tripanossomicida e leishmanicida podem ser encontrados, sendo esta atividade atribuída principalmente a presença de fisalinas (Tomassini, 2000; Soares *et al.* 2002; Soares *et al.* 2003; Lopes *et al.*, 2006, Da Silva *et al.*, 2016). Estas substâncias são esteróides polioxigenados derivadas do ergostano, com estruturas complexas e a presença de duas funções lactônicas (Tomassini *et al.*, 2000). Neste sentido, estudos para o desenvolvimento de métodos de quantificação de fisalinas encontradas em fontes vegetais produtoras destes metabólitos tornam-se importantes, como através da cromatografia líquida de alta eficiência. Desta forma, considerando que as fisalinas não são produtos comercialmente disponíveis, este estudo teve como objetivo o isolamento e identificação destas substâncias para o estabelecimento de um método de análise.

METODOLOGIA

As espécies vegetais (*P. angulata*, *P. peruviana* e *P. ixocarpa*) foram coletadas e as partes aéreas da espécie foram secas à temperatura ambiente, ao abrigo da luz, até peso constante, para estabilização do material, sendo posteriormente pulverizadas em moinho de facas. O material pulverizado foi submetido à extração por maceração com metanol, em recipientes de vidro. Os extratos brutos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, e em seguida o resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão.

O extrato metanólico de *P. angulata* foi então redissolvido em metanol e tratado com solução de acetato de chumbo, para redução da quantidade de taninos, e posterior purificação. Em seguida o extrato foi filtrado e submetido à partição em clorofórmio, para obtenção de uma fração enriquecida em fisalinas. Feito isso a fração de fisalinas foi então submetida a análise cromatográfica por cromatografia em camada delgada (CCD) para escolha do sistema de solvente que propiciasse a melhor separação, visando sua purificação por cromatografia em coluna aberta e a mistura clorofórmio/metanol na proporção de 9:1, foi a que levou a melhor resolução.

As subfrações do fracionamento em coluna de *P. angulata* foram analisadas por CCD e cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de fotodiodos (CLAE-DAD), bem como amostras do extrato bruto da *P. peruviana* e *P. ixocarpa*. Para a análise por CLAE-DAD, os extratos foram dissolvidos em metanol, purificados por SPE, filtrados (0,45 µm, Millipore) e analisados em triplicata, conforme metodologia de análise em desenvolvimento no laboratório. Uma coluna Ascentis® C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm) foi utilizada com um fluxo de 1,0 mL/min, volume de injeção de 20 µL e temperatura do forno fixada em 30°C, fase móvel constituída de acetonitrila (B) e água (A), em corrida de 30 minutos com variação gradual de acetonitrila de 30% a 80%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *pool* de fisalinas, obtido a partir de um fracionamento por partição líquido-líquido, foi submetido a análise cromatográfica para escolha do sistema de solvente que propiciasse a melhor separação, visando sua purificação por cromatografia em coluna aberta. A mistura clorofórmio/metanol na proporção de 9:1, foi a que levou a melhor resolução. Na purificação por cromatografia em coluna aberta foram obtidas 30 frações da amostra durante a eluição, que foram reunidas em 8 grupos (Tabela 1), conforme perfil cromatográfico, com uma taxa de recuperação de 88,3% da massa aplicada.

Tabela 1: Tabela com frações reunidas após cromatografia do *pool* de fisalinas

Frações	Massa (g)
F.1	0,02
F.2	0,02
F.3	0,01
F.4	0,01
F. 5-13	0,08
F.14	0,03
F. 15-17	1,60
F. 18-30	0,35

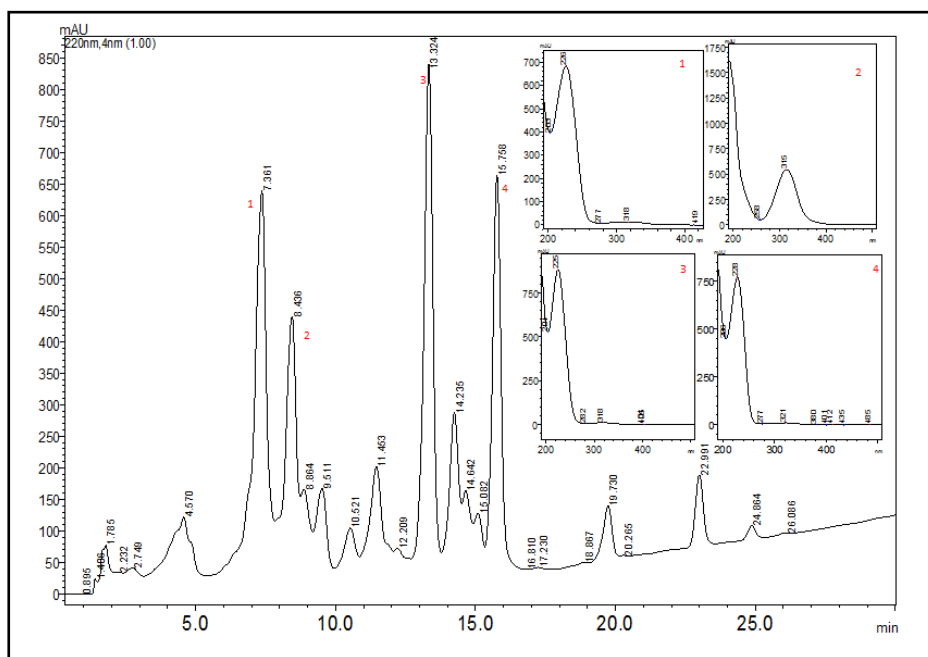
A fração 15 a 17 foi selecionada para uma segunda purificação pelo seu perfil cromatográfico e massa apresentada, agora utilizando como eluentes hexano, acetona e metanol, em gradiente de polaridade, empregando-se coluna aberta. Foram obtidas 48 subfrações, que por análise em CCD, foram reunidas em 9 grupos, com recuperação de 88,12% do material aplicado, conforme apresentado na tabela 2.

Tabela 2: Tabela com dados das frações reunidas após cromatografia de F15-17

Frações	Massa (g)
SFC.1-12	0,03
SFC.13	0,02
SFC 14-15	0,02
SFC 16-17	-
SFC 18-23	0,05
SFC 24-25	0,03
SFC 26-31	0,38
SFC 32-33	0,74
SFC 34-48	0,14

As subfrações 24-25 (SFC1), 26-31(SFC2), 32-33 (SFC3), 34-48 (SFC4), através do seu perfil cromatográfico e massa foram selecionadas para análise por CLAE-DAD, para se localizar a possível presença de fisalinas, conforme exemplificado na Figura 1 para a subfração SFC3. A presença de fisalinas D e G foi detectada em todas as frações, pela comparação dos espectros no UV e pelos tempos de retenção com padrões autênticos, mas em misturas com outras possíveis fisalinas.

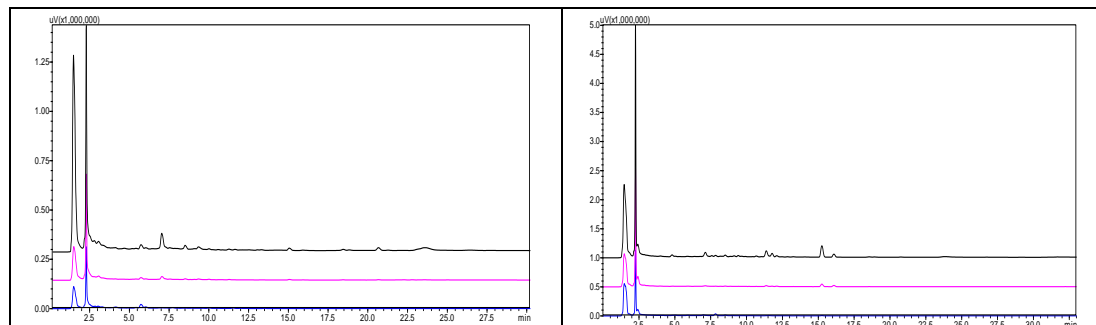
Figura 3: Perfil cromatográfico de SCF 3 no comprimento de onda de 220 nm e espectros no ultravioleta dos picos 1 a 4



UV – pico 1 (220 nm, tempo de retenção aprox 7,3 min) com 226 nm de absorção uv; UV – pico 2 (220 nm, tempo de retenção aprox 8,4 min) com 315 nm de absorção uv; UV – pico 3 (220 nm, tempo de retenção aprox 13,3 min) com 225 nm de absorção uv; UV – pico 4 (220 nm, tempo de retenção aprox 15,7 min) com 228 nm de absorção uv.

Uma análise do extrato bruto das outras duas espécies, *P. peruviana* e *P. ixocarpa*, também foi realizada, conforme apresentado na figura 2, indicando que a leitura em 220 nm é a mais adequada, pelo número e área dos picos. Mas a quantidade de taninos presentes (tempo de retenção entre 2 a 2,5 min) dificulta a comparação das amostras, confirmando a necessidade de sua remoção para clarificação do extrato. A validação deste processo inicial de purificação com acetato de chumbo também será futuramente executada.

Figura 2: Perfis cromatográficos do extrato bruto de *P. peruviana* (a) e *P. ixocarpa* (b) em três comprimentos de onda sobrepostos



Linhas em preto a 220 nm; em rosa a 254 nm, em azul a 315 nm

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do perfil cromatográfico por CCD e CLAE-DAD indicam a presença de fisalinas em mistura nas subfrações. O processo de separação e isolamento destes metabólitos está em andamento, visando à obtenção de padrões para a construção e validação de um método cromatográfico de análise de fisalinas.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, E. R. de. **Plantas Medicinais Brasileiras**: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus Editora. 1993.
- DA SILVA, B. J. M. et al. *Physalis angulata* induces death of promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* via the generation of reactive oxygen species. **Micron**, v. 82, p. 25-32, 2016.
- DASZYKOWSKI, M. et al. Automated alignment of one-dimensional chromatographic fingerprints. **Journal of Chromatography** v. 1217, n. 40, p. 6127-6133, out. 2010.
- HUNZIKER, A. T. 1969. Estudios sobre Solanaceae VI. Contribucion al conocimiento de Capsicum y gêneros afines (*Witheringia*, *Acnistus*, *Athenaea*, etc) Segunda parte. *Kurtziana*, v.5, p.393-399.
- LOPES, D.C.D.X.P.; FREITAS, Z.M.F.; SANTOS, E.P.; TOMASSINI, T.C.B. Atividades antimicrobiana e fototóxica de extratos de frutos e raízes de *Physalis angulata* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 16, n. 2, p. 206-210, 2006.
- MAGALHÃES, H. I. F. **Atividade antitumoral (in vitro e in vivo) das fisalinas isoladas de *Physalis angulata* Lin.** Fortaleza: UFC. 2005. (Dissertação de mestrado) Disponível em: http://www.teses.ufc.br/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=246. Acesso em: 12 de Nov de 2009.
- NETO, F. R. A; NUNES, D S. S. **Cromatografia: Princípios básicos e Técnicas afins**. Interciência: Rio de Janeiro. 2003.
- SILVA, M.T.G. *et al.* Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 100, n. 7, p. 779-778, 2005.
- SOARES, M. B. P.; BELLINTANI. M. C.; RIBEIRO. I. M.; TOMASSINI. T. C. B. SANTOS. R. R. **Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L.** *European Journal of Pharmacology* 459 (2003) 107–112. Elsevier Science B.V. 2002.
- SOARES, M. B. P.; BELLINTANI, M. C.; RIBEIRO, I. M.; TOMASSINI, T. C. B.; SANTOS; R. R. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**. v. 459, p. 107, 2003.
- TOMASSINI, T. C. B. et al. **Gênero *Physalis* uma revisão sobre vitaesteróides**. *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 47-57, 2000.
- VASCONCELLOS, A. G. **Potencial biotecnológico de *Physalis angulata* L.:** uma planta medicinal. 122f. Dissertação de mestrado em ciências biológicas. UFRJ. Rio de Janeiro. 1998.