ISSN 1679-6535

COMUNICADO TÉCNICO

251

Fortaleza, CE
Abril, 2019

Embrapa

Fracionamento de Extratos Vegetais em Escala Preparativa como Ferramenta para Formação de Biblioteca de Produtos Naturais

Guilherme Julião Zocolo
Maria Francilene Souza Silva
Francisca Aliny Nunes Silva
Kirley Marques Canuto
Edy Sousa de Brito
Claudia do Ó Pessoa

Fracionamento de Extratos Vegetais em Escala Preparativa como Ferramenta para Formação de Biblioteca de Produtos Naturais[1]

[1] Guilherme Julião Zocolo, bacharel em Química, doutor em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza,CE; Maria Francilene Souza Silva, graduação em Ciências Biológicas, doutoranda em Biotecnologia-RENORBIO, Fortaleza, CE; Francisca Aliny Nunes Silva, bacharela em Química com habilitação industrial, bolsista, Fortaleza, CE; Kirley Marques Canuto, farmacêutico, doutor em Química de Produtos Naturais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Edy Sousa de Brito, Químico Industrial, doutor em Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Claudia do Ó Pessoa, bacharela em Farmácia Bioquímica, doutora em Farmacologia, professora titular-UFC.

Introdução

Os produtos naturais vêm sendo uma fonte de inspiração para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que auxiliam no tratamento de doenças, sendo o modelo de partida para novos medicamentos (Harvey; Edrada-Ebel; Quinn, 2015). Derivados sintéticos baseados em produtos naturais têm se revelado particularmente úteis como anticancerígenos e antimicrobianos (Wagenaar, 2008). Para todos os agentes terapêuticos aprovados, mais de 50% são de origem natural. Para todas as drogas antitumorais aprovadas em todo o mundo na área do câncer, de 1940 até o final de 2014, das 175 pequenas moléculas aprovadas, 131 (ou 75%) são diferentes de moléculas sintéticas, com 85 (ou 49%) sendo na verdade produtos naturais ou diretamente derivados (Newman; Cragg, 2016). Os metabólitos secundários são o resultado de processos evolutivos resultantes das interações competitivas no meio ambiente entre espécies distintas, produzindo compostos capazes de interagir com uma variedade de alvos macromoleculares com elevada afinidade e seletividade (Wagenaar, 2008).

Informações sobre metabólitos de plantas presentes em extratos brutos de alta complexidade têm ganhado substancial incremento devido à aplicação de modernas técnicas analíticas, tais como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*), que é uma técnica bem estabelecida utilizada amplamente em várias áreas, sendo uma delas a prospecção de compostos de interesse químico/farmacológico (Lang et al., 2008). Os resultados obtidos por essa técnica podem ser analisados e empregados na tomada de decisões iniciais a respeito de processos de isolamento de compostos (Johansen; Glitsø; Bach Knudsen, 1996). Esses processos são atualmente baseados na técnica de desreplicação.

O fracionamento biomonitorado ou bioguiado é utilizado para identificar produtos naturais bioativos, sendo considerado um método de fluxo moderado e que depende de intensos recursos (Harvey, 2007). A desreplicação é caracterizada pelo reconhecimento de compostos já investigados em uma fase inicial, evitando assim o reisolamento de substâncias conhecidas e tendo, portanto, como papel fundamental a descoberta de novas moléculas, especialmente quando se busca uma atividade biológica específica, em sistemas de triagem, aplicados a extratos com origem em produtos naturais (Funari et al., 2013; Kingston, 2011).

Cerca de duas décadas atrás, quando o conceito de HTS (*high-throughput screening* – triagem biológica de alto rendimento) permitiu a implantação de ensaios biológicos aplicados a um grande número de extratos brutos, inicialmente houve um impacto na redução dos tempos de prospecção de compostos bioativos. Esperava-se que houvesse uma rápida produção de bibliotecas com grande diversidade química, "drug-like" (Wagenaar, 2008).

Bibliotecas de extratos brutos foram as primeiras a serem implantadas e possuem várias vantagens: o preparo tem baixo custo; envolvem pequenas quantidades de amostra; os tempos de preparação são reduzidos; dimensão global moderada; e têm elevado grau de diversidade. No entanto, depois de vários anos de rastreio destas bibliotecas, estas vantagens foram sobrepostas por limitações, que incluem: 1) a natureza física das amostras pode torná-las inadequadas para sistemas de manipulação automáticas de líquidos (problemas de solubilidade e viscosidade); 2) metabólitos minoritários podem passar despercebidos em extratos brutos ou ter sua atividade biológica mascarada por outros componentes da mistura complexa; 3) tempo e uso intensivo de recurso são necessários para isolar e identificar os componentes ativos; 4) estruturas conhecidas são frequentemente redescobertas; e 5) compostos quimicamente pouco atraentes são frequentemente isolados. Como resultado destas limitações, uma segunda geração de bibliotecas de produtos naturais baseada em extratos brutos submetidos à etapa de fracionamento foi proposta (Wagenaar, 2008).

A fim de se obter um grau moderado de diversidade química, para suplantar os problemas inerentes aos testes realizados com extratos brutos, o fracionamento foi adotado como estratégia para a implementação das bibliotecas de produtos naturais. Dependendo do método utilizado para o fracionamento, do número de compostos presentes no extrato bruto original e dos objetivos do fracionamento (especificidade do teste biológico de triagem), as frações resultantes podem variar amplamente, em termos de complexidade, de uma mistura de vários compostos para um único composto principal com pureza maior do que 90%.

Vários fatores devem ser considerados quando se planeja uma biblioteca fracionada, incluindo o custo, o tempo e os recursos necessários para a produção, o custo por amostra por bioensaio, o número desejado de compostos por fração

e o grau de diversidade desejado para as bibliotecas de um tamanho fixo.

Este comunicado técnico traz recomendações para a utilização de um método de fracionamento por HPLC em escala preparativa, aplicado à formação da biblioteca de produtos naturais da Embrapa Agroindústria Tropical. As recomendações metodológicas para o estabelecimento da biblioteca de extratos fracionados contribuirão para a descoberta de drogas com atividade biológica in vitro e in vivo. Espera-se, portanto, que o desenvolvimento de um método de fracionamento baseado em estratégias de desreplicação venha a tornar mais rápido o processo de descoberta de moléculas (Figura 1) com atividade biológica, otimizando a triagem de novos compostos biologicamente ativos nos próximos anos.

Ilustração: Guilherme Zocolo

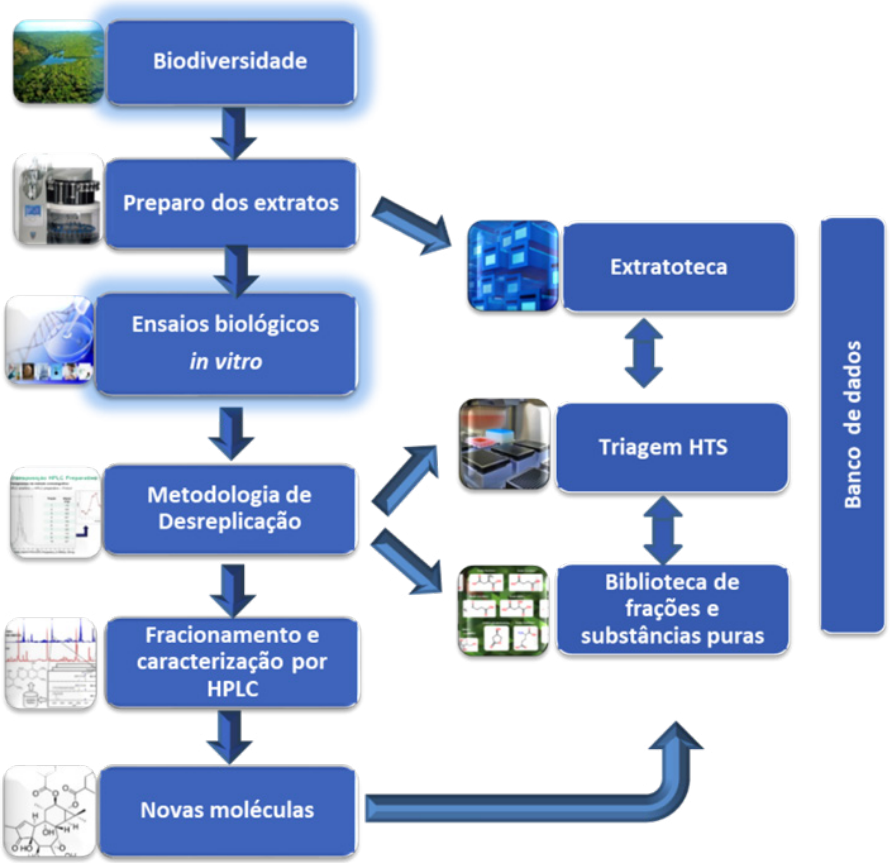

Figura 1. Fluxo de trabalho empregado na prospecção de moléculas.

Procedimento para obtenção das frações

Preparo das amostras

Antes da injeção das amostras para obtenção das frações no sistema CLAE preparativo, recomenda-se realizar um *clean-up* do extrato através de uma extração em fase sólida (EFS). A extração em fase sólida é realizada utilizando-se adsorventes com diferentes superfícies químicas para eliminação de componentes com log P > 5 (Camp et al., 2012). Compostos com log P < 5 são mais susceptíveis de serem permeáveis em membranas e mais facilmente absorvíveis pelo corpo, sendo, portanto, substâncias com maior probabilidade de se tornarem candidatos a potenciais fármacos (Lipinski et al., 2012).

Para isso, utilizam-se cartuchos de fase reversa (C_{18}), solubilizam-se 250 mg do extrato bruto em 20 mL de água ultrapura (Milli-Q) e homogeneiza-se em banho ultrassom por até 10 min. As massas usadas são baseadas na relação geral 20:1 massa absorvente do cartucho:massa da amostra. Utiliza-se o manifold com um fluxo de aproximadamente 1 mL/min.

O adsorvente deve ser acondicionado com 20 mL de MeOH grau HPLC; equilibrado com 20 mL de H_2O Milli-Q e aplica-se a amostra do extrato, que deve ser transferida aos poucos para o adsorvente; faz-se a limpeza da amostra com 20 mL de H_2O Milli-Q; elui-se com 40 mL do solvente (eluente: MeOH/H_2O 70:30 v/v); o eluato deve ser coletado e realizada a rotaevaporação para a remoção total do MeOH; em seguida, a amostra deve ser liofilizada.

Após a liofilização das amostras, deve-se dissolver 60 mg do material em 6 mL de H_2O Milli-Q (10 mg/mL), durante 2 a 4 min em banho-maria. Em seguida, filtrar a amostra em membrana PTFE 0,45 µm/25 mm, acondicionada previamente com MeOH grau HPLC.

Condições Cromatográficas

Para a padronização do fracionamento, utilizou-se o sistema de preparativo, composto de um sistema de bombas quaternárias *Waters* 2555, detector UV-vis./ Visível *Waters* 2489 e dispositivo de coleta de frações + *Waters Preparative Chromatography Rack* + *Waters Fraction Collector* III (Figura 2). A separação foi realizada por meio de coluna preparativa *SunFire*™ Prep C_8 OBD (100 mm x 19 mm x 5 µm – *WATERS*) com fluxo de 17 mL/min e tempo de injeção de 5 min, respeitando-se o limite de pressão do sistema de 2.500 psi (Figura 2 e 3).

Foto: Francilene Silva

Figura 2. Sistema de cromatografia líquida de alta eficiência preparativa. (A) Sistema de bombas quaternárias *Waters* 2555; (B) detector UVvisível -vis.*Waters* 2489; e (C) coletor de frações + *Waters Preparative Chromatography Rack*+ *Waters Fraction Collector* III.

Fotos: Francilene Silva

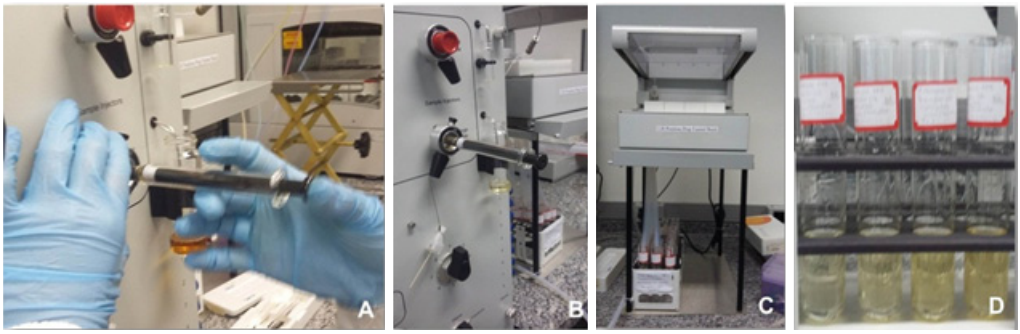

Figura 3. Ilustração do procedimento de injeção no sistema de cromatografia preparativa. A: injeção da amostra; B: seringa no injetor por 5 min.; C: coleta das frações; D: frações coletadas.

Os solventes utilizados devem ser filtrados em membrana de PTFE de 0,45 µm. A fase móvel (A) deve ser composta de água ultrapura acidificada com 0,05% de TFA (ácido trifluoroacético), e (B) composta de metanol grau HPLC acidificado com 0,05% de TFA. A separação segue gradiente de eluição de 5 a 95% de B por 20 minutos, seguindo por um isocrático de 100% de B por 10 minutos. O monitoramento do detector é de 254 nm a 274 nm (Tabela 1).

A acidificação da fase móvel é realizada para melhorar a resolução cromatográfica por meio da supressão iônica de silanois residuais da coluna cromatográfica, o que melhora, na prática, a separação de fenólicos, ácidos carboxílicos, álcoois, etc.

As amostras fracionadas devem ser liofilizadas para posteriores análises biológicas e químicas e armazenadas em frascos adequados para estocagem

Tabela 1. Gradiente de eluição da fase móvel utilizado na separação cromatográfica em escala preparativa.

Tempo (min)	Fluxo (mL/min)	% A	% B
Inicial	17,00	95,0	5,0
20,00	17,00	5,0	95,0
20,10	17,00	0,0	100,0
26,10	17,00	0,0	100,0
26,20	17,00	95,0	5,0
33,00	17,00	95,0	5,0

na biblioteca de compostos químicos (QUIMIOTECA).

Cada extrato irá gerar um total de 10 frações com tempos de retenção de 4 a 13 minutos. Cada fração terá descrição de massa, data de obtenção e rastreabilidade relativa à fonte de origem, que ficam salvos nos arquivos do programa (Figura 4).

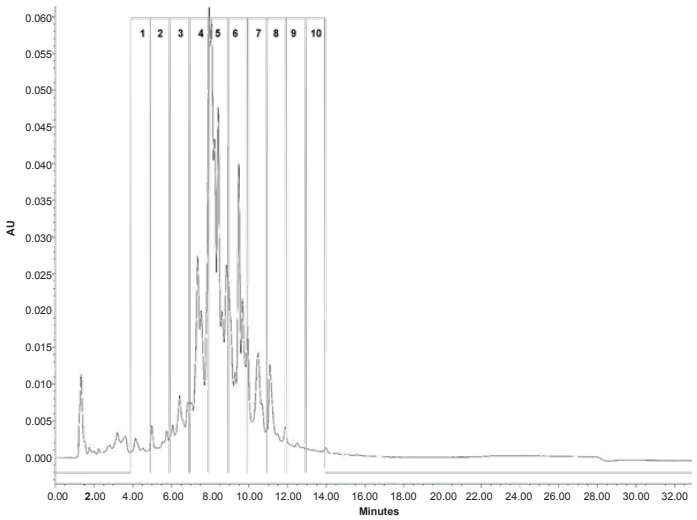

Figura 4. Cromatograma com corte de frações geradas a partir do método de desreplicação.

Considerações Finais

O método tem potencial de realizar o fracionamento de até 8 extratos por dia, o que dá margem para a obtenção de 1.600 frações por mês. Sugere-se que seja realizado em paralelo o estudo da atividade biológica dos extratos brutos e frações geradas, de forma a demonstrar que os compostos biologicamente ativos não foram perdidos ao longo do fracionamento.

O estudo químico biomonitorado de extratos e frações visa ao isolamento de substâncias biologicamente ativas, com o intuito de encontrar substâncias promissoras a novos candidatos a agroquímicos, além de potenciais modelos de fármacos com aplicação humana ou veterinária.

Referências

CAMP. D.; DAVIS, R. A.; CAMPITELLI, M.; EBDON, J. QUINN, R. J. Drug-like properties: Guiding principles for the design of natural product libraries. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 1, p. 72-81, 2012.

FUNARI, C. S.; CASTRO-GAMBOA, I.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. da S. Metabolômica, uma abordagem otimizada para exploração da biodiversidade brasileira: Estado da arte, perspectivas e desafios. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013.

HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 11, n. 5, p. 480-484, 2007

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**. v. 74, n. 3, p. 496-511, 2015.

JOHANSEN, H. N.; GLITSØ, V.; BACH KNUDSEN, K. E. Influence of extraction solvent and temperature on the quantitative determination of oligosaccharides from plant materials by high-performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 6, p. 1470-1474, 1996.

KINGSTON, D. G. I. Modern Natural Products Drug Discovery and Its Relevance to Biodiversity Conservation. **Journal of Natural Products**, v. 74, n. 3, p. 496-511, 2011.

LANG, G.; MAYHUDIN, N. A.; MITOVA, M. I.; SUN, L.; VAN DER SAR, S.; BLUNT, J. W.; MUNRO, M. H. G. Evolving Trends in the Dereplication of Natural Product Extracts : New Methodology for Rapid, Small-Scale Investigation of Natural Product Extracts. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 9, p. 1595-1599, 2008.

LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.46, n. 3, p. 3-26, 2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 29-61, 2016.

WAGENAAR, M. M. Pre-fractionated microbial samples - The second generation natural products library at Wyeth. **Molecules**, v. 13, n. 6, p. 1406-1426, 2008.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici
60511-110, Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109 / 3391-7195
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
(2019): on-line

MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO

PÁTRIA AMADA
BRASIL
GOVERNO FEDERAL

Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente
Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Secretária-executiva
Celli Rodrigues Muniz

Secretária-administrativa
Eveline de Castro Menezes

Membros
Marlos Alves Bezerra, Ana Cristina Portugal Pinto de Carvalho, Deborah dos Santos Garruti, Dheyne Silva Melo, Ana Iraidy Santa Brígida, Eliana Sousa Ximendes

Supervisão editorial
Ana Elisa Galvão Sidrim

Revisão de texto
José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica
Rita de Cassia Costa Cid

Projeto gráfico da coleção
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica
Arilo Nobre de Oliveira

Ilustração da capa
Guilherme Julião Zocolo