

AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE COMPOSTOS DA CLASSE DOS FITOESTERÓIDES EM FORRAGEIRA DO GÊNERO BRACHIARIA

Aluna: Letícia Fontana Torraga¹; Nathasha Yuhi Catenaci²; Alexandre Correa de Lima³

Estudantes do curso de farmácia; e-mail: le.torragea@hotmail.com¹

Estudantes do curso de farmácia; e-mail: nathachacatenaci@ir.com.br²

Professor da Universidade de Mogi das Cruzes; e-mail: alexandrel@umc.br³

Área do conhecimento: Ciências Exatas e de Tecnologia

Palavras-chave: *Brachiaria*; fitoesteróides; *Sporophila caerulescens*; fitoquímica; forrageira

INTRODUÇÃO

Os esteróides são caracterizados por estruturas tetracíclicas com esqueletos que agrupam de 27 a 29 carbonos. Essa classe de compostos (também a de triterpenos) têm suas biossínteses iniciadas pela união, cauda-cauda, de duas moléculas de farnesildifosfato (FPP), para formarem o esqualeno. Uma epoxidação por catálise enzimática no esqualeno produz o esqualeno-2,3-óxido. A partir desse, e de novas adições das ligações duplas, ocorrem ciclizações que levam à formação do cátion terciário protosteril. Em plantas, o protosteril resulta no cicloartenol que pode ser considerada como a molécula base da biossíntese dos fitoesteróides (QUEIROZ, 2009). Os fitoesteróides são os esteróides encontrados em espécies vegetais como, por exemplo, o β -sitosterol, campesterol, estigmasterol e outros (BEZERRA, 2011). Plantas do gênero *Brachiaria* são forrageiras utilizadas na pecuária que possuem um alto valor nutricional para ruminantes e são de fácil adaptação ao clima tropical. Porém podem causar fotossensibilização hepatógena aos ruminantes devido ao acúmulo da protodioscina, uma saponina esteroidal presente nessas forrageiras que ao ser metabolizada gera metabólitos secundários responsáveis pela formação de sais biliares desencadeando essa fotossensibilização hepatógena (ARAUJO, 2010). Estudos fitoquímicos na *Brachiaria* foram direcionados para a identificação e quantificação da saponina protodioscina. Outros fitoesteróides não são mencionados nesses estudos fitoquímicos para *Brachiaria*. Em apenas um dos trabalhos pesquisados utilizou-se, além das folhas, as sementes geradas pela planta para investigação de fitoesteróides. Neste, não foi encontrado a protodioscina nas sementes e não investigaram outros fitoesteróides (BRUM et al, 2009). A importância de se avaliar outros compostos fitoquímicos está no fato dessas substâncias terem propriedades biológicas de amplo interesse farmacêutico, agropecuário, etc. Como exemplo tem-se os resultados apresentados em estudos fitoquímicos na planta *Tribullus terrestris* (TT) na qual se encontrou saponinas responsáveis pelo aumento do nível do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e do Hormônio Luteinizante (LH) em fêmeas de camundongos (ADAAY, 2012). Vale ressaltar que, para a *Brachiaria*, não consta na literatura investigações a respeito de moléculas associadas, de alguma forma, com o ciclo produtor/ regulador de hormônios. Ornitólogos e biólogos descrevem que as sementes de *Brachiaria* estimulam a ave *Sporophila caerulescens*, também conhecido como coleiro, à reprodução. Machos e fêmeas que têm essas sementes em suas dietas iniciam seus períodos reprodutivos já no início da primavera, enquanto que aqueles que dispõem de outras fontes alimentares, como alpiste, painço, iniciam suas posturas e chocas ao fim do período reprodutivo (SILVA, 1984). Esse estímulo à reprodução e a presença da protodioscina, desperta interesse investigativo de

classes de fitoesteróides nessa forrageira. Como descrito acima, na literatura não são descritas investigações para grupos de fitoesteróides nas sementes de *Brachiaria* (OLIVEIRA, 2011). Portanto sem esses não é possível relacionar o estímulo reprodutivo da ave *Sporophila caerulenscens* à ingestão de *Brachiaria*. Vale ressaltar também que os hormônios FSH e LH participam do ciclo reprodutivo do *Sporophila caerulenscens*, machos e fêmeas. Nesses animais o LH é responsável por estimular a produção de progesterona no folículo maduro, além de provocar o rompimento do folículo e a ovulação. No macho, o LH age nos testículos e induz a produção de androgênios (RUTZ, 2007). No presente trabalho propôs-se uma avaliação da classe de composto fitoesteróides, utilizando as **sementes** da *Brachiaria*. Esse estudo nas sementes de *Brachiaria* auxiliará, em estudos futuros, no desenvolvimento de uma ração específica para *Sporophila caerulenscens* com características idênticas ou similares à composição das sementes de modo a serem empregadas em criatórios comerciais dessa ave os quais têm grande colaboração na preservação e aperfeiçoamento genético dessa ave.

METODOLOGIA

As sementes utilizadas foram coletadas na cidade de Biritiba Mirim, São Paulo, numa área de 1000 m² coberta com *Brachiaria*. O material foi acondicionado em caixas plásticas abertas e assim foram levadas e mantidas até a chegada ao laboratório do curso de Química, na Universidade de Mogi das Cruzes. Após o processo de seleção e limpeza do material triturou-se 50g de sementes em 200 mL de etanol absoluto (Nuclear) utilizando um liquidificador (Arno WWB3) e na função pulsar com acionamento e interrupção dessa função em intervalos de, aproximadamente, um segundo. Essa mistura ficou em repouso por 15 dias para esgotamento do material. Após esse tempo a amostra foi então filtrada e transferida para um balão volumétrico de 250 mL o qual foi avolumado com etanol absoluto (Nuclear). Esse extrato foi levado ao rotoevaporador rotativo (Fisatom 801) a 40°C até obtenção de um resíduo pastoso que foi então resuspendido em 25 mL de etanol absoluto (Nuclear). O extrato foi transferido para um frasco âmbar identificado e armazenado sob refrigeração. Após sete dias de armazenamento se deu a avaliação para grupos fitoesteróides com reagente de Lieberman- Burchard. Vale ressaltar que outras formas de contato/ extração foram tentadas, descritas a seguir:

- 10g de sementes ficaram submersas em 100 mL de etanol absoluto (Nuclear) por uma semana. Após foi concentrada via rotoevaporador (Fisatom, 801), resuspendida em 25 mL do mesmo etanol usado na extração e testada com reagente de Lieberman. Com essa técnica de preparo do extrato, Brum e colaboradores não encontraram compostos esteroidais e a aluna participante nesse projeto também não.

- O método descrito acima foi então modificado visando aumentar a área de contato. A modificação se deu na utilização de um triturado *Mixer* (Walita), mas devido a baixíssima massa das sementes houve o efeito da força centrífuga, ou seja, foram lançadas para fora do alcance das facas do Mixer.

Ao substituir o Mixer pelo liquidificador (Arno WWB3) e utilizar a função pulsar foi possível triturar as sementes o que melhorou a área de contato levando a um extrato com coloração mais intensa em relação à dos extratos preparados sem trituração.

Avaliação qualitativa para Esteróides /triterpenóides: a avaliação da presença da classe de Esteróides/ triterpenóides se deu pela reação de Lieberman- Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado, (Nuclear P.A): sobre 2 mL do extrato adicionou-se 1 mL de

anidrido acético, 1 mL de ácido acético glacial e agitou-se suavemente, em seguida adicionou-se lentamente três gotas de H₂SO₄ concentrado, agitou-se suavemente e observou-se desenvolvimento de cores (SILVA et al, 2010).

Uma segunda metodologia foi utilizada, como contraprova. Cerca de 40 mL do extrato foi transferido para um béquer de 250 mL e levado à chapa aquecedora para evaporação do solvente. Ao resíduo adicionou-se 50 mL de acetonitrila e voltou-se o béquer sobre a chapa aquecedora. O sistema foi mantido em ebulição por 15 minutos e em seguida foi rapidamente resfriado em banho de gelo visando à formação de cristais de compostos esteróides, estes foram tratados com reagente de Lieberman e a coloração foi observada.

Cromatografia em Camada Delgada (CCD): empregou-se a CCD como uma técnica de confirmação das observações do método de Lieberman e ainda como uma oportunidade de aprendizado e contato com a técnica pelas alunas envolvidas neste trabalho. **Fase Estacionária (FE):** A FE utilizada foi sílica gel GF 250 sobre suporte plástico. Esta foi utilizada sem ativação e com ativação em estufa a 100°C durante 30 minutos, estando em seguida pronta para uso. **Fase Móvel (FM):** A fase móvel adequada para o desenvolvimento cromatográfico em camada delgada foi avaliada utilizando solventes com diferentes polaridades: Hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol e mistura entre os miscíveis, ambos da marca Nuclear. A revelação das manchas se deu com lâmpada UV (254 nm), com reagente de Lieberman e ainda permanganato de potássio 0,01 mol/L.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A principal avaliação qualitativa de compostos pertencentes à classe dos esteróides é a que utiliza do reagente de Lieberman-Burchard. Neste, trata-se a amostra com anidrido acético, ácido acético e algumas gotas de ácido sulfúrico. Esses reagentes desidratam e oxidam os anéis do ciclopentanoperidrofenantreno e como produto tem-se um esteróide aromático com estrutura química que absorve radiação UV-vis, que no teste é evidenciada pelo aparecimento de uma coloração azul-esverdeada.

Uso do Reagente Lieberman-Burchard no extrato com resíduo de clorofila: uma alíquota de 2 mL do extrato preparado com uso do liquidificador no modo pulsar foi submetido ao teste de Lieberman portanto foi adicionado a este volume de extrato 1mL de anidrido acético e três gotas de ácido sulfúrico concentrado. A solução da amostra, sem os reagentes, exibiu coloração amarela esverdeada e passou, após a adição dos reagentes e agitação por alguns segundos, para o tom azul esverdeado intenso indicando a presença do grupo esteróide nas sementes.

Método do Cianeto de Metila: para eliminar dúvidas em relação à presença de clorofila residual (amarelo esverdeado) utilizou-se ainda, para o mesmo extrato preparado com uso do liquidificador em modo pulsar, o método do cianeto de metila que resulta na formação de cristais de fitoesteróides que são separados do extrato por filtração, ou seja, o teste é livre da interferência da clorofila residual. Este teste também exibiu coloração azul esverdeada indicando presença de grupos esteróides nas sementes.

Extratos - esgotamento por contato e sem trituração das sementes: o extrato preparado por esgotamento do material e sem a trituração não mostrou alteração de cor após adição do reagente de Lieberman-Burchard. No extrato no qual se utilizou do triturador *Mixer* houve dúvidas quanto à mudança de coloração. A forma de preparo da amostra é então fundamental uma vez que com o uso do liquidificador no modo pulsar verificou-se teste positivo. **Cromatografia em Camada Delgada:** a Cromatografia em Camada Delgada

(CCD) não exibiu resultados positivos para fitoesteróides mesmo com estudos de otimização da fase móvel.

CONCLUSÃO

A análise qualitativa com reagente de Lieberman-Burchard indica a possível presença de composto(s) do grupo fitoesteróide nas sementes de *Brachiaria*. O preparo do extrato interfere no resultado final. O método que proporcionou a trituração das sementes resultou em positivo para o fitoesteróide. Para uma conclusão mais incisiva necessita-se do uso de técnicas analíticas mais avançadas como a cromatografia líquida de alta eficiência com espectro de massa acoplado (HPLC-MS) para quantificação e caracterização do(s) composto(s) pertencente à classe dos fitoesteróides. Para tal estamos em contato com laboratórios para formalizar uma parceria e realização da análise.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAAAY, M. H; MOSA, A.A.R; **Evaluation of the effect of aqueous extract of *Tribulus terrestris* on some reproductive parameters in female mice.** J. Mater. Environ. Sci. 3 (6) (2012).

ARAUJO, A.L.L; FREITAS, L.G.L; WYSOCKI JUNIOR, H.L; GONTIJO, F; RIBEIRO, C.S; CARDOSO, D; ANDRADE, D.D.F; GUIMARÃES, V.Y; **Análise da concentração de protodioscina por HPLC/ELSD em *Brachiaria brizantha* e *B. decumbens* em relação ao tempo decorrido do plantio.** Biológico, São Paulo, v.72, n.2, p.53-80, jul./dez., 2010.

BEZERRA, K.S.; FILHO, N.R. A. **Análise e identificação de esteróides em óleo e biodiesel de soja.** Dissertação. Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química, 2011.

BRUM, K.B.; HARAGUCHI, M; LEMOS, R.A.A; CORREA, F.R.; FIORAVANTI, M.C.S; **Crystal-associated cholangiopathy in sheep grazing *Brachiaria decumbens* containing the saponin protodioscin.** Pesq. Vet. Bras. 27(1):39-42, janeiro 2009.

OLIVEIRA, C.H.S; **Fotossensibilização hepátogena em búfalos (*Bubalus bubalis*) em pastagens de *Brachiaria decumbens* no Estado de Minas Gerais.** Tese. Universidade Federal de Minas, Escola Veterinária, 2011.

QUEIROZ, G.S. **Análise de esteróides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *Brunfelsia uniflora*.** Tese. Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Química, 2009.

REICH, E.B. A; **HPTLC for the Analysis of Herbal drugs, Herbal Drug Preparations and Herbal Medicinal Products.** Handbook of Thin-Layer Chromatography 3rd ed, Chapter 18. New York: Dekker; 2003.

RUTZ , F.M. A.A; Xavier, E.G.; ROLL, V.F.B; ROSSI, P. **Avanços na fisiologia e desempenho reprodutivo de aves domésticas.** Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.307-317, jul./set. 2007.