

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**DISCIPLINA DE FARMACOGNOSIA**

**PRÁTICAS DE LABORATÓRIO**

**Elaboração: Prof. Dr. Fernando B. da Costa**

**Ribeirão Preto – 2012**

## SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
PRÁTICA 1. Extração de óleo essencial e separação e identificação de alguns constituintes químicos da camomila ( <i>Matricaria chamomilla</i> , Asteraceae) .....	2
PRÁTICA 2. Separação e identificação de substâncias através de cromatografia: fracionamento e identificação da carvona no óleo essencial de hortelã ( <i>Mentha sp</i> , Lamiaceae) e identificação do mentol em balas .....	7
PRÁTICA 3. Extração e caracterização de metabólitos de extratos de guaco ( <i>Mikania laevigata</i> , Asteraceae).....	10
PRÁTICA 4. Determinação de aflatoxinas em amendoins.....	12
PRÁTICA 5. Determinação de própolis em produtos comerciais utilizando marcadores químicos por CCD bidimensional .....	14
PRÁTICA 6. Heterosídeos cardiotônicos: extração e caracterização .....	16
PRÁTICA 7. Heterosídeos saponínicos: extração e caracterização .....	18
PRÁTICA 8. Heterosídeos flavonóides: extração, caracterização e quantificação.....	21
PRÁTICA 9. Rutina: hidrólise, partição e análise cromatográfica .....	25
PRÁTICA 10. Rutina: purificação da quercetina através de cromatografia em coluna.....	26
PRÁTICA 11. Heterosídeos antraquinônicos: detecção de antraquinonas livres, O- e C-heterosídeos .....	27
PRÁTICA 12. Taninos: extração, caracterização e quantificação.....	30
PRÁTICA 13. Alcalóides tropânicos: extração e caracterização.....	34
PRÁTICA 14. Processos extrativos: tintura de ipeca (parte I).....	36
PRÁTICA 15. Processos extrativos: tintura de ipeca (parte II).....	42
BIBLIOGRAFIA BÁSICA .....	44
APÊNDICE 1. Preparo de reagentes.....	46
APÊNDICE 2. Guia para confecção de relatórios.....	48



## APRESENTAÇÃO

Este material foi elaborado com o intuito de proporcionar ao usuário uma oportunidade para aprimorar seu conhecimento acerca de alguns tópicos da análise de fármacos e de matérias primas de origem vegetal, no âmbito da disciplina de *Farmacognosia*. A base destas práticas é o programa teórico da disciplina e a bibliografia que consta no final.

Os roteiros de práticas para laboratório aqui descritos foram elaborados de forma que pudessem englobar diferentes fármacos e matérias primas de origem vegetal, os quais possuem os principais grupos de metabólitos secundários apresentados no curso teórico: óleos essenciais, terpenóides, heterosídeos diversos (cardiotônicos, saponínicos, antraquinônicos, flavonóides e taninos) e alcalóides. Devido à importância do tema para a saúde pública, foi inserida também uma prática destinada à análise de metabólitos secundários de fungos (aflatoxinas) em alimentos. A seqüência das práticas de laboratório, de acordo com os principais grupos metabólicos, está de acordo com a classificação química dos fármacos de origem vegetal descrita nos livros mais recentes de farmacognosia.

As análises de laboratório são baseadas em técnicas e procedimentos experimentais simples, porém eficazes, tais como diferentes processos extrativos de princípios ativos, partições com solventes, reações cromogênicas e de precipitação, cromatografia, quantificação por titulação e espectrofotometria, dentre outras. Desta forma, estas análises visam caracterizar, de maneira genérica, qualitativa e quantitativa, os principais grupos de metabólitos secundários e classes de princípios ativos de plantas, bem como detectar adulterações e falsificações grosseiras no âmbito do controle de qualidade.

Acreditamos que devido à simplicidade das análises descritas e do relativo baixo custo para seu desenvolvimento, a maioria dos experimentos pode ser realizada em laboratórios apropriados que possuam a mínima infra-estrutura básica. Desta forma, esperamos contribuir com uma pequena parcela no que concerne o controle de qualidade de fármacos e de matérias primas de origem vegetal, tema de grande relevância na atualidade, porém ainda pouco explorado no Brasil.

Nos exemplos da vida real não devemos, entretanto, nos olvidar de alguns itens que não são abordados neste material, muitos deles presentes nas legislações específicas para fitoterápicos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Como exemplo, pode-se citar a caracterização macro e microscópica de fármacos, testes de pureza e as cromatografias líquida e gasosa, que cada vez mais estão acessíveis e cuja necessidade é imperiosa, pois estas proporcionam, no conjunto, o mínimo de qualidade a um dado produto de origem vegetal.

Fernando B. da Costa  
Ribeirão Preto, fevereiro de 2012

## PRÁTICA 1. Extração de óleo essencial e separação e identificação de alguns constituintes químicos da camomila (*Matricaria chamomilla*, Asteraceae)

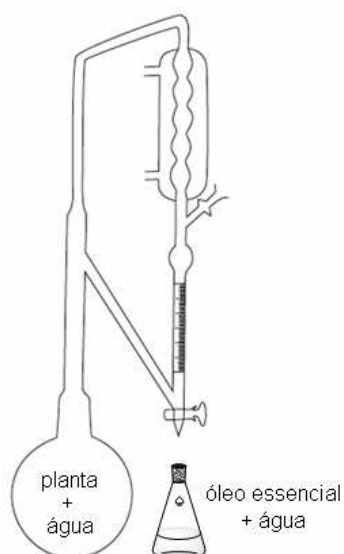
### 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, ou óleos voláteis, ocorrem em inúmeras espécies vegetais de várias famílias e estão localizados em glândulas ou estruturas especiais.

Diferem química e fisicamente dos óleos fixos, sendo constituídos por uma mistura complexa e variável de substâncias terpênicas ou aromáticas. Tal conjunto de substâncias confere aos óleos essenciais algumas propriedades características, tais como volatilidade, aspecto oleoso, aroma intenso, sabor, insolubilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos.

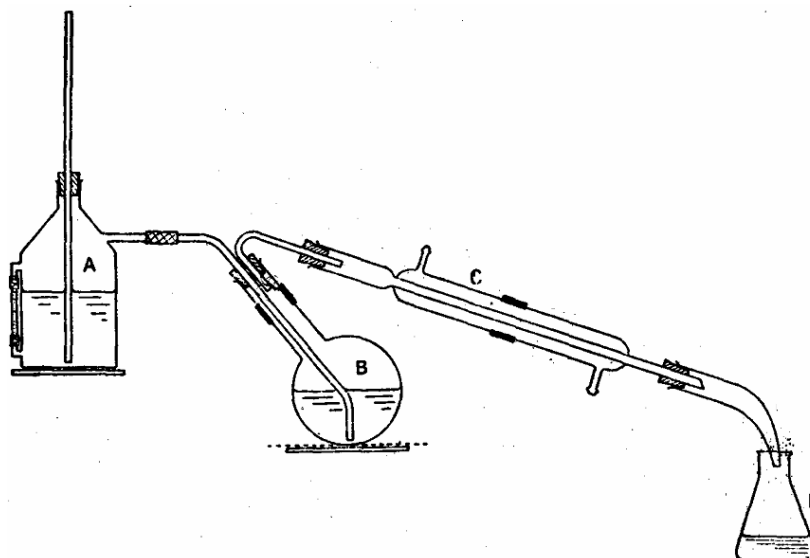
Os óleos essenciais, ou os fármacos que os contêm, possuem atividades terapêuticas variadas, atuando ao mesmo tempo em vários órgãos e sistemas do corpo humano. São bastante úteis nas indústrias de cosméticos e de alimentos. Na farmácia, estão presentes em medicamentos e preparações galênicas.

A extração de óleos essenciais de espécies vegetais pode ser realizada por diferentes métodos, seja com o uso de solventes orgânicos ou empregando destilação. Os métodos mais comuns são os que empregam destilação, como a hidrodestilação e a destilação por arraste a vapor, tanto em escala industrial como no laboratório. Na hidrodestilação o material vegetal fica em contato direto com a água que entrará em ebulição e então o óleo essencial é destilado juntamente com a água a 100 °C. Em seguida o óleo é condensado e posteriormente separado da água. Esta operação ocorre, por exemplo, na extração de óleos essenciais realizada em aparelho de Clevenger, como ilustrado na figura a seguir. Este equipamento é destinado a extrações em pequena escala realizadas em laboratório, geralmente para doseamento.



Já na destilação por arraste a vapor (ver figura a seguir) há um recipiente específico (A) para aquecer a água à ebulição, o qual está interligado, através de uma tubulação, a um outro recipiente (B) que contém o vegetal em contato com água. O vapor d'água sai do primeiro

recipiente com destino ao segundo contendo o vegetal na água e, neste caso, a temperatura da destilação do óleo essencial dependerá da soma das pressões de vapor do óleo e da água, sendo sempre realizada abaixo do ponto de ebulição da água. Em seguida, o vapor e o óleo são condensados (C) e posteriormente o óleo é separado da água (D). Na figura a seguir pode ser observada a aparelhagem para realização de destilação por arraste a vapor em um laboratório.

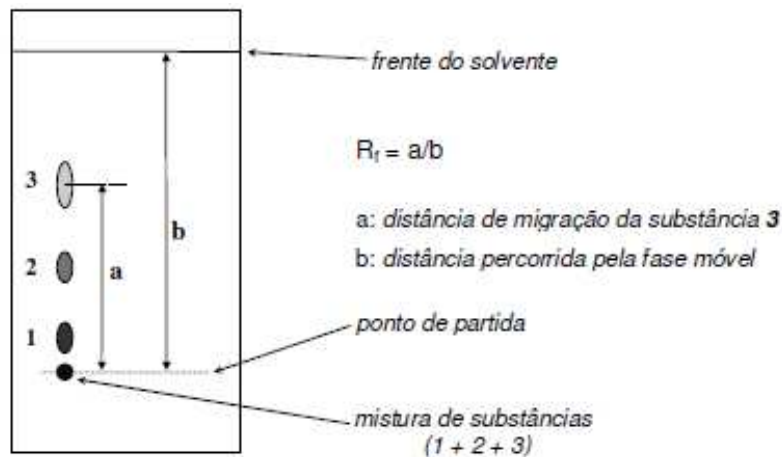


A cromatografia é um método de separação de misturas de substâncias, através de sua migração diferencial entre duas fases, uma fixa (fase estacionária) e outra móvel (fase móvel). Mostra-se extremamente útil para o isolamento, purificação e identificação de componentes de misturas. O tipo mais comum de cromatografia utilizada na separação de produtos naturais é a de adsorção, empregando-se sílica gel como fase estacionária. As modalidades mais difundidas são a cromatografia em camada delgada (CCD) e a cromatografia em coluna (CC).

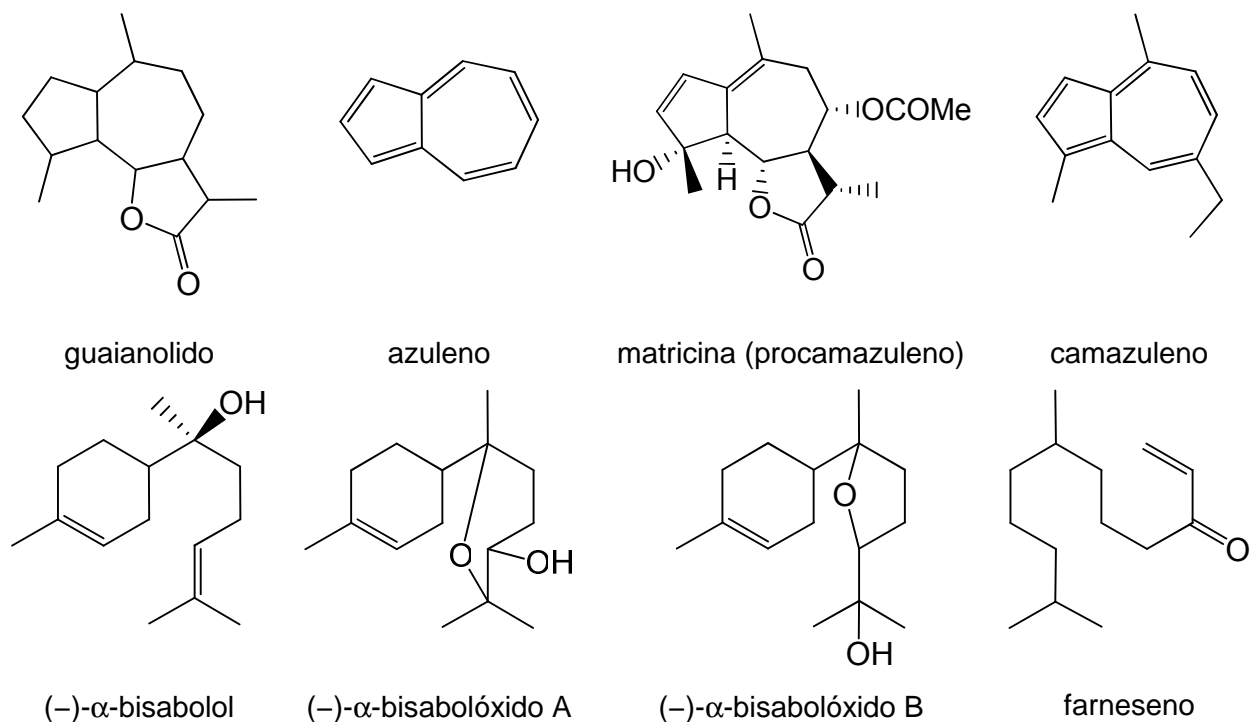
A CCD é a modalidade de escolha para a caracterização de substâncias pelo fato de ser uma técnica muito fácil de ser utilizada, além do baixo custo. Geralmente o parâmetro para a caracterização das substâncias é o valor do fator de retenção ( $R_f$ ), ou seja, a relação entre as distâncias percorridas pela substância e pela fase móvel, como indicado na figura a seguir.

A CC, por sua vez, é geralmente selecionada para o fracionamento de misturas e, conseqüentemente, para o isolamento das substâncias.

As inflorescências dessecadas de *Matricaria chamomilla* L. [sin. *Chamomilla recutita* (L.) Rausch., Asteraceae] constituem a droga vegetal conhecida como camomila-vulgar, camomila alemã, moçanilha ou matricária.



A droga contém entre de 0,3-1,5% de óleo essencial, constituído principalmente de sesquiterpenos como (-)- $\alpha$ -bisabolol, (-)- $\alpha$ -bisabolóxidos A e B, farneseno e camazuleno. O camazuleno em si não ocorre na planta *in natura*, mas é formado a partir de uma lactona sesquiterpênica, a matricina (procamazuleno), durante a destilação por arraste a vapor. Em geral, os constituintes denominados “azulênicos” aparecem em alguns vegetais (além da camomila, também ocorrem na losna, no eucalipto, etc.) sob a forma de pró-azulenos, de incolores a ligeiramente alaranjados. Através de desidrogenação catalítica dos anéis fundidos ciclo-pentênico/ciclo-heptânico, característicos desses terpenóides, resultam nos azulenos, com o surgimento de ligações duplas conjugadas e conseqüente aparecimento de cor intensa, processo que também ocorre espontaneamente durante a destilação por arraste a vapor.



As inflorescências da camomila são amplamente empregadas como medicamento fitoterápico no continente europeu (de onde é nativa e também largamente cultivada) e nos EUA devido às suas propriedades anti-inflamatória e antiespasmódica.

As propriedades anti-inflamatória e antiespasmódica da camomila são decorrentes, sobretudo, do seu óleo essencial, em especial os sesquiterpenóides (-)- $\alpha$ -bisabolol,  $\alpha$ -bisabolóxidos A e B e a lactona sesquiterpênica do tipo guaianolido matricina. Os flavonóides e os derivados cumarínicos aumentam os efeitos espasmolíticos, porém não são componentes do óleo essencial. Em doses altas produz paralisia nos músculos lisos.

Uma infusão contém apenas cerca de 10-15 % do óleo essencial presente na planta e, portanto, extratos brutos ou preparações que contenham grande quantidade do óleo com certeza são muito mais eficazes.

## 2. EXPERIMENTAL

Droga: capítulos florais de *Matricaria chamomilla* dessecados.

### 2.1. Identificação

#### 2.1.1. Preparo da amostra

Adicionar em um Erlenmeyer 100 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  a 5 g de inflorescências de camomila e agitar por 40 min. Filtrar para um béquer e levar o filtrado à secura em rotaevaporador. Dissolver o resíduo em quantidade de tolueno suficiente para obter 5 mL de solução.

Empregar a hidrodestilação para obter óleo essencial de camomila em aparelho de Clevenger.

#### 2.1.2. Cromatografia em camada delgada comparativa

Com auxílio de capilares de vidro, aplicar na cromatoplaça a solução e o óleo essencial obtidos na seção anterior, empregando o bisabolol como padrão. Material necessário:

- adsorvente: sílica gel GF<sub>254</sub>
- fase móvel: tolueno-AcOEt (93:7)
- reveladores:
  - luz UV 254 e 366 nm
  - vanilina sulfúrica

R <sub>f</sub> (aproximado)	Coloração	Componente
0,20-0,25	Marrom-clara	Óxidos de bisabolol
0,25	violeta	Espatulanol
0,35	Violeta	(-)- $\alpha$ -Bisabolol
0,50-0,60	Marrom	<i>cis/trans</i> -eno-Inodiccicloéter
0,85	Azul, tendendo ao violeta	Azuleno
0,99	azul-violeta	Farneseno, THC



## 2.2. Pesquisa de proazulenos

### 2.2.1. Reagentes

Empregar  $\text{CHCl}_2$  e éter de petróleo (ligroína).

Reagente: dissolver 0,25 g de *p*-dimetilaminobenzaldeído na mistura de 45 mL de AcOH glacial, 5 mL de ácido fosfórico concentrado (85%) e 45 mL de água.

### 2.2.2. Procedimento

Adicionar 0,5 g de inflorescências camomila pulverizada em um Erlenmeyer. Adicionar em seguida 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e agitar por cerca de 2 min. Remover o produto com pipeta comum e transferi-lo para um Erlenmeyer, repetindo o mesmo procedimento com 5 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Reunir e evaporar as soluções em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em banho-maria até reduzir o volume a aproximadamente 0,5 mL.

Adicionar 2,5 mL do reagente e transferir para um tubo de ensaio. Aquecer em banho-maria por 5 min e depois deixar esfriar. Adicionar 5 mL de éter de petróleo. Agitar bem e deixar separar as duas fases. Observar o desenvolvimento de cor na fase aquosa. O desenvolvimento de cor azul na camada aquosa ácida indica presença de proazulenos, mas se esses componentes estiverem em pouca quantidade, obtêm-se colorações castanho-esverdeadas.

## 2.3. Análise da qualidade de camomila

Comparar a intensidade de cor azul da solução aquosa ácida obtida no ensaio anterior a uma solução-padrão, constituído da mistura de:

- 83 mL de solução de  $\text{CuSO}_4$  a 12% (p/v);
- 0,25 mL de solução de  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  a 5% (p/v);
- 16,75 mL de água.

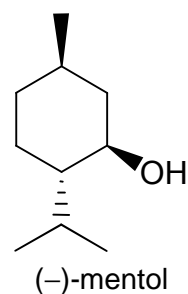
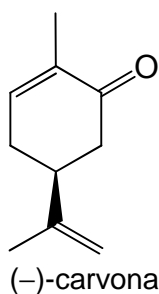
A intensidade de cor da solução aquosa ácida obtida do ensaio anterior não poderá ser inferior ao da solução-padrão.

## PRÁTICA 2. Separação e identificação de substâncias através de cromatografia: fracionamento e identificação da carvona no óleo essencial de hortelã (*Mentha sp*, Lamiaceae) e identificação do mentol em balas

### 1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais geralmente são extraídos através de destilação por arraste a vapor ou hidrodestilação. Porém, um caso especial de extração é o uso de solventes orgânicos voláteis, seja a frio ou a quente. Neste caso, o rendimento do produto a ser obtido é maior, entretanto não apenas as substâncias voláteis estarão presentes, mas também aquelas não voláteis. Como exemplo de extração com solvente orgânico a quente, pode-se empregar a extração contínua com Soxhlet.

O óleo essencial de hortelã a ser investigado neste experimento será extraído a partir das folhas de uma espécie de *Mentha* L. (Lamiaceae), a qual é muito utilizada como condimento e que apresenta também propriedades carminativas. O componente principal deste óleo é o monoterpene carvona, sendo que o mentol ocorre em quantidade muito pequena.



O (-)-mentol é um monoterpene isolado de espécies do gênero *Mentha*, como a *M. x piperita* L. ou a *M. arvensis* L., ou sintetizado em laboratório a partir de outros monoterpenos. Da planta, é obtido através de seus extratos ou do óleo essencial, podendo variar em concentração dependendo da espécie ou variedade, além de outros fatores. Possui odor característico e, no uso tópico, em baixas concentrações, apresenta propriedades anti-sépticas e vasodilatadoras, sendo que em altas concentrações age como anestésico local. Em uso interno, tem ação carminativa em baixas concentrações, sendo que em doses elevadas pode até provocar parada respiratória ou cardíaca. Na alimentação e na farmácia, tanto o mentol como o óleo de hortelã são empregado como aromatizantes.

### 2. EXPERIMENTAL

Droga: folhas frescas de *Mentha*. Utilizar também duas balas de menta.

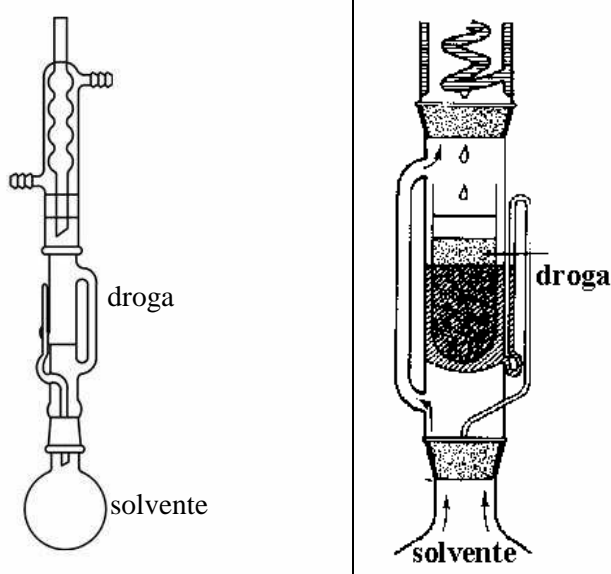
### 2.1. Preparo de material a ser identificado das balas

Triturar as balas de hortelã em gral. Adicionar 30 mL de água destilada, procurando solubilizar todo o pó e depois transferir para funil de separação. Lavar o gral por duas vezes com 10 mL de éter dietílico, juntando à mistura do funil de separação.

Separar a camada etérea e adicionar pequena quantidade de agente dessecante ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Filtrar em um funil comum com papel de filtro, transferir para um béquer e levar ao banho-maria. O resíduo seco deve ser recuperado com 1 mL de éter dietílico para ser analisado posteriormente através de CCD.

### 2.2. Obtenção do óleo essencial

Montar o sistema de extração de Soxhlet conforme indicado na figura a seguir, tendo como solvente extrator 200 mL de AcOEt. Pesar cerca de 20 g de folhas frescas de hortelã e acondicionar no local apropriado. Submeter o conjunto a aquecimento e, após ebulição do solvente, aguardar cerca de 40 min. Concentrar em rotaevaporador o material extraído da hortelã. Uma pequena alíquota deverá ser analisada através de CCD e o restante fracionado em CC.

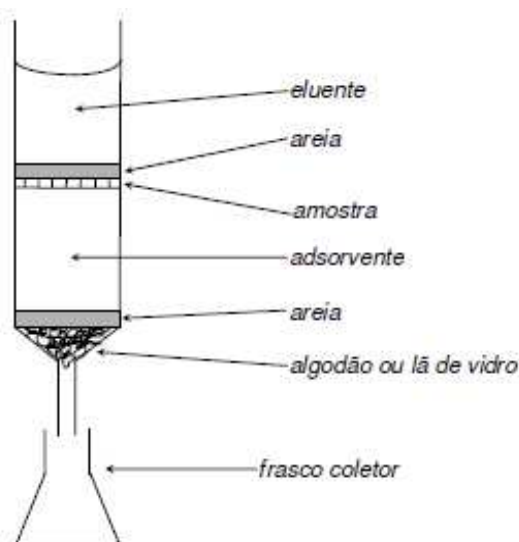


Extrair uma pequena quantidade de óleo essencial de folhas frescas de hortelã através de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger.

### 2.3. Empacotamento da coluna cromatográfica

Procede-se como indicado no esquema a seguir, sendo que se deve suspender a sílica em *n*-hexano antes dela ser colocada na coluna. O material necessário é descrito a seguir:

- coluna de vidro aberta, algodão (ou lã de vidro) e areia;
- amostra: material extraído da hortelã (0,5 mL);
- adsorvente (fase estacionária): sílica gel 60 (8 g);
- eluente: *n*-hexano e AcOEt em gradiente crescente de polaridade.



#### 2.4. Eluição dos componentes

Após o empacotamento da coluna, conforme a ilustração acima, faz-se a eluição da amostra, iniciando com *n*-hexano, seguido de misturas deste com AcOEt e, finalmente, apenas com AcOEt.

No total, serão coletadas cerca de 15 frações, com aproximadamente 10 mL cada, sendo o solvente evaporado em banho-maria.

#### 2.5. Análise cromatográfica

Procede-se a análise através de CCD empregando-se placas 20 x 20 cm cobertas com sílica, utilizando amostras autênticas de mentol (1) e de carvona (2), o material extraído das balas (3), material extraído da hortelã via Soxlet (4) e Clevenger (5) e as frações obtidas da coluna. Material necessário:

- adsorvente (fase estacionária): sílica gel GF<sub>254</sub>
- fase móvel: tolueno-AcOEt (93:7)
- reveladores:
  - luz UV (254 nm)
  - vanilina sulfúrica

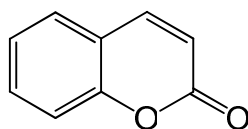
### PRÁTICA 3. Extração e caracterização de metabólitos de extratos de guaco (*Mikania laevigata*, Asteraceae)

#### 1. INTRODUÇÃO

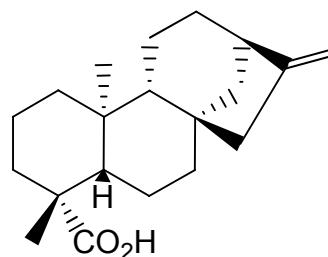
O gênero *Mikania* Willd. (Asteraceae) é constituído por um grupo de plantas herbáceas com cerca de 450 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais dos continentes americano e asiático. Algumas espécies trepadeiras são conhecidas como guaco.

A *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker, conhecida como guaco cheiroso, é largamente utilizada no Brasil pelas suas propriedades broncodilatadora, expectorante e antitussígena, principalmente na forma de xarope. Quimicamente a droga, constituída pelas folhas secas, é constituída por terpenos, flavonóides e derivados do ácido cinâmico.

A cumarina e o diterpeno ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico (ácido caurenóico), presentes em maior concentração nas folhas deste vegetal, conferem identidade aos seus preparados e são, em parte, responsáveis pelo seu efeito farmacológico. Deste modo, estas substâncias vêm sendo utilizadas como marcadores químicos no controle de qualidade da espécie. Além destas substâncias, também é comum a presença de derivados do ácido *ent*-caurenóico e do ácido cinâmico.



cumarina



ácido *ent*-kaur-16-en-19-óico

Neste experimento, a cumarina e o ácido caurenóico deverão ser identificados em amostras de guaco após sua extração, observando-se ainda sua presença em produtos contendo extratos e tinturas de guaco.

#### 2. EXPERIMENTAL

Droga: folhas secas pulverizadas de *Mikania laevigata* (guaco cheiroso).

##### 2.1. Extração do material vegetal

Transferir cerca de 5 g de guaco pulverizado para um Erlenmeyer de 125 mL de capacidade e adicionar 50 mL de AcOEt. Em seguida, vedar o frasco com auxílio de papel alumínio e deixar em agitação sobre chapa aquecedora magnética a 30 °C, por 30 min. Decorrido o tempo de extração, filtrar o extrato em AcOEt para funil de separação de 125 mL. Retirar cerca de 5 mL deste extrato para análise cromatográfica posterior.

Particionar o extrato AcOEt com solução hidroalcoólica (1:1) de KOH 1N (3 x 20 mL). Separar cerca de 5 mL do extrato AcOEt após a partição e concentrá-lo para a realização de

CCD. Reunir as frações aquosas alcalinas e adicionar  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado até pH ácido (aproximadamente pH 1). Transferir a solução ácida para funil de separação de 125 mL e, em seguida, particionar a solução ácida com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 20 mL). Reunir as frações  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e concentrar o solvente em rotaevaporador. Transferir o concentrado para um pequeno frasco para análise cromatográfica.

## 2.2. Extração do produto comercial (xarope) contendo guaco

Transferir 10 mL do xarope de guaco para funil de separação de 125 mL e adicionar 40 mL de água destilada. Homogeneizar e particionar com *n*-hexano (3 x 20 mL). Juntar as frações em *n*-hexano, concentrá-las e transferir para o pequeno frasco para análise cromatográfica posterior.

Em seguida, particionar a solução aquosa restante com AcOEt (3 x 20 mL). Reunir as frações AcOEt, concentrar e transferir o concentrado para o pequeno frasco.

## 2.3. Análise e identificação da cumarina e do ácido caurenóico através de CCD

Aplicar em uma placa cromatográfica os seguintes produtos: extrato em AcOEt do guaco (1), extrato vegetal em AcOEt após a partição com solução alcalina (2), fração em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  do vegetal (3), fração em *n*-hexano do xarope (4), fração em AcOEt do xarope (5), padrões de cumarina (6) e de ácido caurenóico (7). Material necessário:

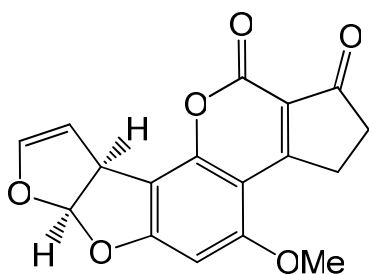
- adsorvente: sílica gel GF<sub>254</sub>
- fase móvel: *n*-hexano-AcOEt (3:2)
- reveladores:
  - luz UV 366 nm (cumarinas)
  - $\text{H}_2\text{SO}_4$ /aquecimento (ácido caurenóico)

## PRÁTICA 4. Determinação de aflatoxinas em amendoins

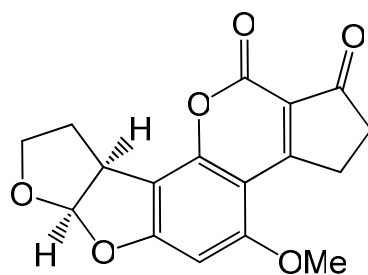
### 1. INTRODUÇÃO

As aflatoxinas são micotoxinas (metabólitos secundários) produzidas por fungos pertencentes ao gênero *Aspergillus*. Estes fungos desenvolvem-se em vários produtos alimentícios, principalmente no amendoim e seus derivados, mas ainda podem ser encontrados em nozes, milho, algodão e rações animais.

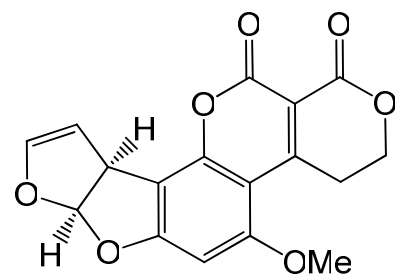
A contaminação dos alimentos e rações animais por aflatoxinas tornou-se um problema de saúde pública, pois causa a aflatoxicose. O quadro envolve problemas hepáticos, tais como necrose aguda, cirrose e carcinoma. São conhecidas cerca de 20 aflatoxinas, destacando-se a B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub>. A aflatoxina B<sub>1</sub> é a predominante e uma das mais tóxicas.



aflatoxina B<sub>1</sub>



aflatoxina B<sub>2</sub>



aflatoxina G<sub>1</sub>

### 2. EXPERIMENTAL

Material: amendoim em grão.

#### 2.1. Preparo da amostra

Amostras de amendoim em grão devem ser trituradas em gral de modo a passar em peneiras de, no mínimo, 20 Mesh. Todas as amostras devem ser perfeitamente homogêneas.

#### 2.2. Extração e limpeza

No copo de um homogeneizador, colocar 25 g de amostra, 135 mL de MeOH e 15 mL de KCl 4%. Em velocidade baixa, misturar por 5 min e a seguir filtrar em papel de filtro.

À uma alíquota de 75 mL, juntar 75 mL de clarificante (sulfato de amônio 30%) e 25 mL de celite, medido em béquer. Homogeneizar a mistura com bastão de vidro e filtrar em papel de filtro.

Transferir uma alíquota de 75 mL da segunda filtração para um funil de separação, no qual 75 mL de água foram previamente colocados. Fazer duas partições com 10 mL de CHCl<sub>3</sub> com um tempo de agitação de 3 min. Recolher 5 mL de cada partição, reunir em balão envolvido em papel alumínio.

### 2.3. Análise qualitativa e quantitativa de aflatoxinas por CCD

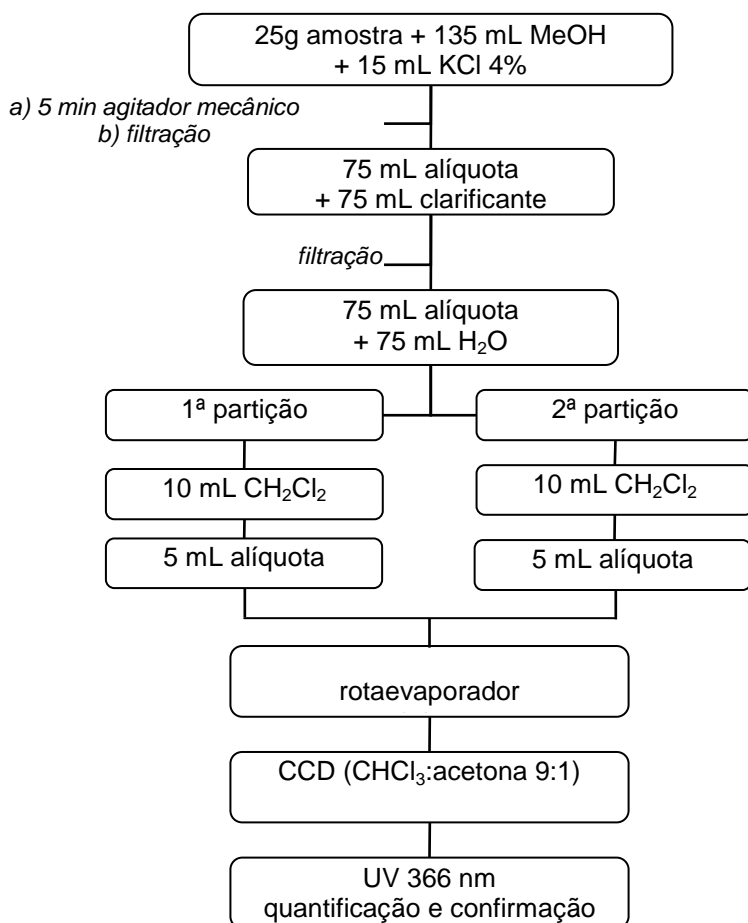
A quantificação é realizada por CCD através de comparação visual com padrões.

Evaporar até a secura, em rotaevaporador, o extrato em  $\text{CHCl}_3$  obtido anteriormente. Dissolver o resíduo em 400  $\mu\text{L}$  de benzeno. Colocar em sonicador por 30 segundos para garantir a solubilização.

Para verificar a presença de aflatoxinas, aplicar 10  $\mu\text{L}$  do extrato por três vezes na placa. Sobre a terceira mancha do extrato, aplicar 4  $\mu\text{L}$  do padrão de aflatoxinas. Na mesma placa aplicar 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{L}$  de padrão de aflatoxinas. Desenvolver a placa no sistema  $\text{CHCl}_3$ -acetona 9:1. Remover a placa após 10 cm de desenvolvimento. Sob luz UV (366 nm), localizar as manchas fluorescentes indicativas da presença de aflatoxinas. Manchas fluorescentes com o mesmo  $R_f$  e tonalidade do padrão indicam resultado positivo. Efetuar quantificação por comparação visual da intensidade de fluorescência da mancha suspeita com a dos padrões cromatográficos.

A confirmação do resultado pode ser feita através da eluição em éter etílico da mesma placa na qual foi realizada a quantificação. Este procedimento praticamente elimina a possibilidade de resultado falso-positivo.

### 2.4. Esquema geral





## PRÁTICA 5. Determinação de própolis em produtos comerciais utilizando marcadores químicos por CCD bidimensional

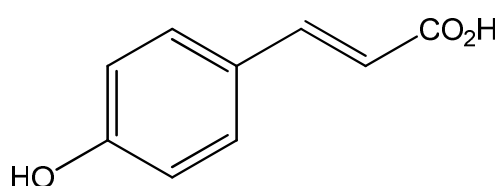
### 1. INTRODUÇÃO

Própolis é o nome genérico que designa uma série de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas de consistência viscosa, cuja cor varia de amarelo a castanho escuro ou até esverdeado. É coletada de determinadas partes das plantas (principalmente de brotos ou exsudatos de árvores) pelas abelhas europeias (*Apis mellifera* L.) que a transporta à colméia e a modifica, em parte, principalmente pela adição de ceras e de certas secreções, como enzimas salivares. No cerrado brasileiro produz-se a denominada própolis verde, a qual possui alto valor comercial e tem sua origem botânica em *Baccharis dracunculifolia* DC. (Asteraceae).

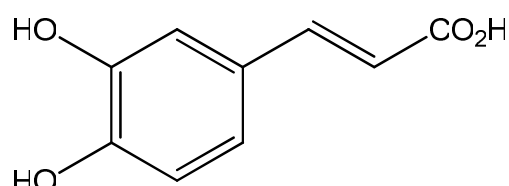
A própolis tem diversas aplicações terapêuticas, tais como anti-inflamatória, antimicrobiana, antiulcerogênica, antiparasitária, imunomodulatória, dentre outras. Nos últimos anos tem se observado o aumento na utilização de produtos contendo própolis, devido às suas aplicações terapêuticas. Sendo assim, tornou-se indispensável o desenvolvimento de metodologias que garantam a qualidade, tanto da matéria-prima, como do produto final a ser utilizado.

Os marcadores químicos são substâncias, ou grupo de substâncias que permitem apontar uma identidade do material a ser estudado, sendo esses selecionados conforme a sua abundância, facilidade de detecção e doseamento.

Neste experimento será efetuada a análise qualitativa de derivados de própolis (mel e própolis, própolis verde e tintura de própolis) por meio de CCD uni e bidimensional empregando-se padrões de referência (ácidos cumárico e cafeico) e extrato de *B. dracunculifolia*.



ácido cumárico



ácido cafeico

### 2. EXPERIMENTAL

Material: mel e própolis, própolis verde e tintura de própolis.

#### 2.1. Preparo da amostra

Diluir em 50 mL de água destilada 10 mL de um produto comercial (mel e própolis) e, em seguida, particionar com 20 mL de AcOEt, utilizando funil de separação de 125 mL. Repetir este procedimento mais duas vezes e, se necessário, centrifugar. Concentrar a fração orgânica em rotaevaporador usando balão de fundo redondo de 100 mL.

## 2.2. CCD unidimensional

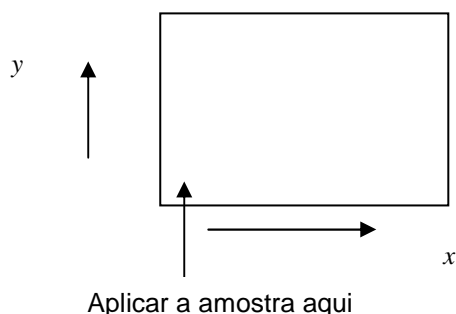
Em uma placa cromatográfica comparativa de sílica gel (5 cm de largura), aplicar a fração orgânica obtida anteriormente (1), o padrão de tintura de própolis (2), os padrões de ácido cumárico(3), ácido cafeico(4) e extrato de *B. dracunculifolia* (5), utilizando-se como fase móvel uma mistura de *n*-hexano:AcOEt (1:1) com algumas gotas de AcOH. Após a eluição, observar a placa sob luz UV (254 e 366 nm) e, em seguida, revelar com vanilina sulfúrica.

## 2.3. CCD bidimensional

Para se obter uma melhor resolução, aplicar as amostras em uma placa de sílica (20 x 20 cm). Sugestão: um grupo realiza a CCD bidimensional com a amostra de mel e própolis; dois grupos realizam a CCD com a tintura de própolis, um quarto grupo com extrato de *B. dracunculifolia* e os demais com os padrões.

Utilizar como fase móvel *n*-hexano:AcOEt (1:1) com algumas gotas de AcOH. Após a primeira eluição (eixo *y*, vide figura abaixo), observar a placa sob luz UV e, em seguida, eluir novamente a placa (de forma bidimensional), utilizando  $\text{CHCl}_3$ :MeOH (93:7) como segundo sistema de fase móvel (eixo *x*). Após a eluição, observar a placa sob luz UV e, em seguida, revelar com vanilina sulfúrica.

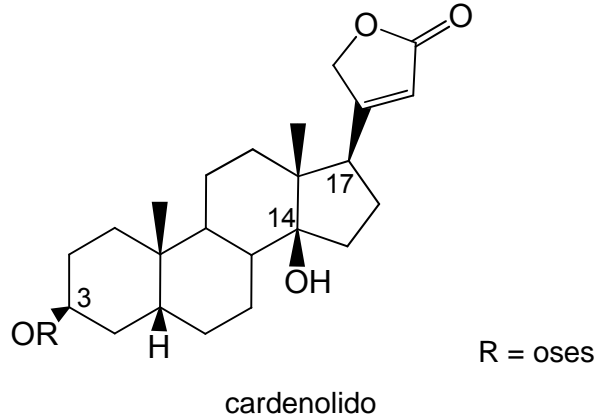
Calcular os  $R_f$  correspondentes às principais substâncias. Esquematizar as placas cromatográficas, destacando as “manchas” obtidas. Estimar o número mínimo de substâncias nas amostras estudadas.



## PRÁTICA 6. Heterosídeos cardiotônicos: extração e caracterização

### 1. INTRODUÇÃO

Os heterosídeos cardiotônicos são substâncias cardioativas, ou seja, exercem ação sobre o músculo cardíaco. As agliconas contêm o núcleo esteroidal do tipo ciclopentano peridrofenantreno e, de acordo com o número de átomos de carbono do anel lactônico do C-17, são classificadas como *cardenolidos* ou *bufanolidos*. As oses ligadas ao grupamento –OH do C-3 são, na maioria das vezes, a glicose, ramnose ou digitoxose, dentre outras.



Alguns heterosídeos, como a digitoxina e a digoxina, são utilizados na terapêutica para tratamento da insuficiência cardíaca congestiva, sendo que sua extração é feita a partir de extratos das folhas de *Digitalis purpurea* L. (dedaleira ou digital) e *D. lanata* Ehrh. (Plantaginaceae).

A identificação dessas substâncias é baseada na caracterização das oses, do núcleo esteroidal e do anel lactônico dos cardenolidos, através de reações químicas que produzem complexos coloridos.

### 2. EXPERIMENTAL

Droga: frutos secos de *Thevetia neriifolia* Juss. ex Steud. (sin. *T. peruviana* (Pers.) K. Schum., chapéu-de-napoleão, Apocynaceae) e folhas secas e pulverizadas de *Nerium oleander* L. (espirradeira, louro-rosa, Apocynaceae).

#### 2.1. Extração dos heterosídeos

Pesar 5 g do material vegetal e colocar em um Erlenmeyer, adicionando em seguida 40 mL de EtOH 95%. Levar ao banho-maria a 60 °C por 15 min. Após o extrato ter sido resfriado, filtrá-lo em papel de filtro para uma proveta. Se necessário, completar o volume do filtrado com água destilada até 30 mL.

Adicionar 10 mL de solução saturada de acetato de chumbo. Agitar bem e deixar em repouso até haver precipitação de material e em seguida filtrar em papel de filtro.

Transferir o filtrado para um funil de separação, extrair com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (2 x 15 mL) e reunir o produto das extrações (fase orgânica). Filtrar em algodão, submeter à evaporação em banho-maria, até metade do volume, e agitar a fase orgânica com pequena porção de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anidro.

## 2.2. Reações gerais de caracterização

### 2.2.1. Reações com desóxi-oses

#### Reação de Keller-Killiani

Evaporar 2 mL do extrato em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em um tubo de ensaio. Dissolver o *resíduo* em 1 mL de AcOH glacial. Com auxílio de pipeta de Pasteur, adicionar duas gotas de  $\text{FeCl}_2$  a 2% e transferir *cuidadosamente* o conteúdo desse tubo para um outro contendo 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Não agitar.

Observar o aparecimento de coloração de castanho-avermelhada na *zona de contato* dos dois líquidos e azul-esverdeada (gradual) na camada contendo AcOH.

### 2.2.2. Reações com o núcleo esteroidal

#### Reação de Libermann-Burchard

Evaporar 2 mL do extrato em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em um tubo de ensaio. Adicionar *ao resíduo* 10 gotas de anidrido acético. Transferir, aos poucos, o conteúdo do tubo de ensaio para um segundo tubo contendo 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado.

Observar o aparecimento de coloração castanho-avermelhada na *zona de contato* entre as duas camadas.

### 2.2.3. Reações com o anel lactônico

#### a) Reação de Kedde

Evaporar 2 mL do extrato em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em um tubo de ensaio. Adicionar *ao resíduo* seis gotas de reagente de Kedde (solução alcoólica a 1% de ácido 3,5-dinitrobenzóico) e três gotas de KOH 1 N.

Observar o aparecimento de uma coloração vermelho-violácea.

#### b) Reação de Baljet

Evaporar 2 mL do extrato em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em um tubo de ensaio. Adicionar ao resíduo cinco gotas de solução aquosa a 0,5% de ácido pícrico (2,4,6-trinitrofenol) e duas gotas de KOH 1 N.

Observar o aparecimento de uma coloração alaranjada.

## **PRÁTICA 7. Heterosídeos saponínicos: extração e caracterização**

### **1. INTRODUÇÃO**

Os heterosídeos saponínicos, ou simplesmente saponinas, pertencem a uma classe de metabólitos secundários que possuem a propriedade de formar espuma abundante e persistente após agitação com água, causar hemólise em hemácias normais e possuir propriedade ictiotóxica. As agliconas (sapogeninas) podem conter núcleo esteroidal (ciclopentano peridrofenantreno) ou triterpênico, podendo ainda ser mono ou bidesmosídicas.

Alguns fármacos são utilizados na terapêutica, como o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L., Fabaceae), a salsaparrilha (espécies do gênero *Smilax* L., Smilacaceae) e o ginseng japonês (*Panax ginseng* C.A. Mey., Araliaceae). Algumas espécies são utilizadas para o preparo de detergentes ou como agentes espumantes de bebidas. Outras, como os timbós, são empregadas por caboclos e tribos indígenas para a captura de peixes. Os timbós são plantas de diferentes gêneros de diferentes famílias, como *Magonia* A. St.-Hil., *Paullinia* L. e *Sapindus* L. No Brasil, há alguns gêneros utilizados em produtos fitoterápicos e como complementos alimentares (*Pfaffia* Mart. e *Gomphrena* L., Amaranthaceae), sendo que ainda se conhece muito pouco sobre os detalhes de sua constituição química e ação farmacológica.

Algumas agliconas com núcleo esteroidal, como a diosgenina e a hecogenina, são utilizadas como materiais de partida para a síntese de hormônios esteroidais. Sua extração é feita a partir de espécies do gênero *Dioscorea* L. (inhame ou cará mexicano, Dioscoreaceae) e *Agave* L. (sisal africano, Asparagaceae), respectivamente.

A identificação dessas substâncias pode ser baseada na caracterização genérica das oses, dos núcleos esteroidal ou triterpênico e pela observação das propriedades afrogênicas (formação de espuma), hemolíticas e ictiotóxicas.

### **2. EXPERIMENTAL**

Droga: sementes secas e pulverizadas de *Aesculus hippocastanum* L. (castanheira da índia, Sapindaceae).

#### **2.1. Extração dos heterosídeos**

Pesar 5 g do pó das sementes da droga vegetal em um Erlenmeyer e ferver em chama de bico de Bunsen, por cerca de 5 min, com 100 mL de água destilada. Centrifugar o extrato e esperar esfriar. Se necessário, completar o volume inicial.

#### **2.2. Observação da propriedade afrogênica**

Adicionar 5 mL do extrato aquoso em um tubo de ensaio, tampar a boca do mesmo e agitar vigorosamente por 15 segundos. Deixar em repouso por 15 min e observar se houve a permanência de abundante anel de espuma.

### 2.3. Observação da propriedade hemolítica

Adicionar 4 mL do extrato aquoso em um tubo de ensaio (I) e isotonzá-lo com 36 mg de NaCl, a fim de se obter solução a 0,9%. Em seguida, adicionar 2 mL de uma suspensão a 2% de sangue de carneiro em solução fisiológica. Em outro tubo de ensaio (II), adicionar 4 mL de solução fisiológica e 2 mL da suspensão de sangue, que servirá como controle.

Deixar as duas soluções em repouso e após 1 h verificar se houve ou não ação hemolítica no tubo contendo o extrato da droga.

### 2.4. Caracterização genérica de oses

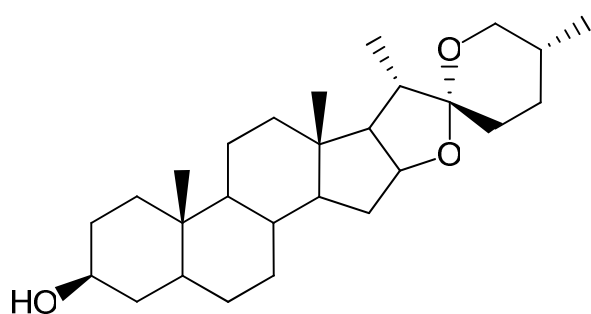
#### Reação de Molish

Em um tubo de ensaio, adicionar 1 mL do extrato aquoso e cinco gotas de uma solução recém-preparada de  $\alpha$ -naftol a 5% em EtOH. Em seguida, pelas paredes do tubo, adicionar *cuidadosamente e sem agitar*, 1 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> R. O aparecimento de anel de coloração violeta na *zona de contato* entre as duas camadas caracteriza resultado positivo para carboidratos.

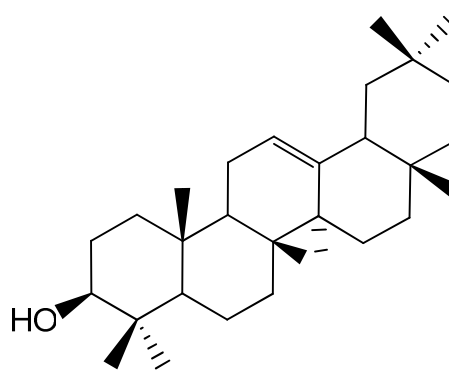
### 2.5. Hidrólise dos heterosídeos saponínicos

Colocar 90 mL do extrato aquoso em um balão de fundo redondo. Em seguida, adicionar *lentamente* 10 mL de HCl R. Montar aparelho para refluxo e proceder com a reação por cerca de 45 min. Esfriar e transferir o líquido para funil de separação, extraíndo as agliconas (sapogeninas) com CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 x 40 mL). Concentrar o extrato orgânico até um sexto do volume (cerca de 20 mL) e secar com um pouco de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, filtrando em seguida com papel de filtro.

### 2.6. Caracterização genérica dos núcleos esteroidal e triterpênico



núcleo esteroidal (espiroestano)



núcleo triterpênico (tipo  $\beta$ -amirina)

#### 2.6.1. Reação de Moller

Adicionar 2,5 mL do extrato em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> em um tubo de ensaio. Evaporar o solvente e adicionar duas gotas de cloreto estânico a 20% em cloreto de tionila. O aparecimento de coloração vermelha é resultado positivo para o núcleo triterpênico.

### 2.6.2. Reação de Libermann

Adicionar 2,5 mL do extrato em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em um tubo de ensaio. Evaporar o solvente e suspender o resíduo em 3 mL de AcOH glacial R, adicionando em seguida duas gotas de cloreto férrico SR. Pelas paredes do tubo e sem agitar, adicionar *cuidadosamente* 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  R. O aparecimento de anel de coloração azul ou violeta na *zona de contato entre as duas camadas* caracteriza resultado positivo para núcleo esteroidal, enquanto que anel de coloração pardo-avermelhada ou verde, indica presença de núcleo triterpênico.

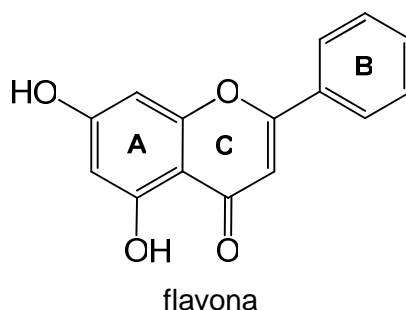
### 2.6.3. Reação de Salkowisk

Adicionar 2,5 mL do extrato em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  em um tubo de ensaio. Evaporar o solvente e adicionar *cuidadosamente* 2 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  R pelas paredes do tubo, *sem agitar*. O aparecimento de anel de coloração vermelha ou pardo-avermelhada caracteriza resultado positivo para núcleo triterpênico, enquanto que anel de coloração rósea a violeta, indica presença de núcleo esteroidal.

## PRÁTICA 8. Heterosídeos flavonóides: extração, caracterização e quantificação

### 1. INTRODUÇÃO

Heterosídeos flavonóides (do latim *flavus* = amarelo) são metabólitos secundários vegetais sólidos, coloridos, solúveis em água ou em soluções hidroalcoólicas e insolúveis em solventes orgânicos apolares, podendo apresentar-se na forma de O- ou C- heterosídeos. As agliconas, denominadas simplesmente de flavonóides, são substâncias sólidas, geralmente amarelas, com núcleo aromático e três anéis (A, B e C), apresentando-se sob a forma de polifenóis ou seus éteres ( $-OCH_3$ ) derivados. São também denominadas de benzopiranos ou  $\gamma$ -pironas. Dentre as substâncias responsáveis pela pigmentação de pétalas de flores, os heterosídeos flavonóides são os principais componentes, podendo ser encontrados também em outras partes dos vegetais, seja na forma livre ou heterosídica.



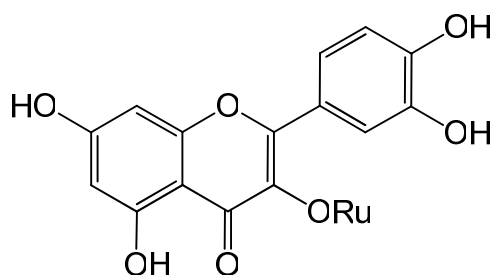
Dependendo da estrutura química, os flavonóides enquadram-se em diferentes classes: *flavonas*, *flavanonas*, *flavonóis*, *diidroflavonóis*, *isoflavonas* ou *chalconas*. Um grupo especial são as antocianidinas (do grego *antho* = flor e *kyanos* = azul), também responsáveis pela pigmentação de flores (rosa, papoula) e pericarpo de frutos (berinjela, uva, amora, cereja, groselha, morango), apresentando-se sob diferentes cores, dependendo do pH do meio e do número e da posição de grupamentos substituintes.

A principal atividade farmacológica dos flavonóides está relacionada com a permeabilidade capilar, além de serem importantes antioxidantes naturais.

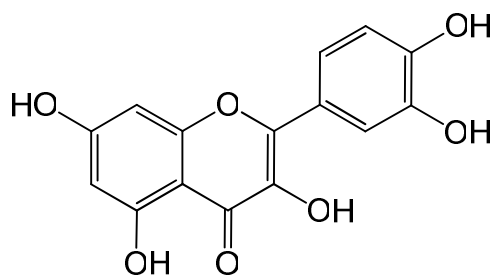
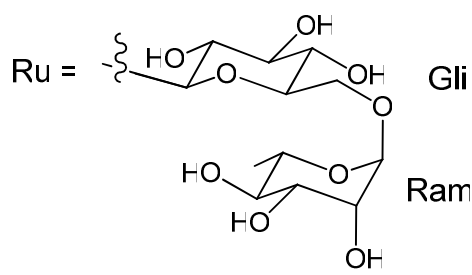
A identificação genérica das diferentes classes de flavonóides é baseada em reações com formação de produto colorido, em face do número e posição das hidroxilas fenólicas presentes nos anéis A e B. Um dos métodos de identificação dessas substâncias é baseado em análise cromatográfica. A quantificação pode ser feita através de métodos espectrofotométricos.

A rutina (quercetina-3-O-rutinosídeo) é um heterosídeo flavonóide amplamente distribuído na natureza, sendo encontrada espécies de várias famílias vegetais. A quercetina, sua aglicona, é um flavonol, e a rutinose (Ru) é um dissacarídeo contendo uma unidade de ramnose ligada a uma de glicose. Tanto a rutina como a quercetina possuem várias propriedades farmacológicas, além de serem excelentes antioxidantes naturais. A rutina é um pó amarelo cristalino, solúvel em MeOH, piridina e soluções alcalinas e pouco solúvel em água.





rutina



quercetina

## 2. EXPERIMENTAL

Droga: sementes secas de *Dimorphandra mollis* Benth. (fava-d'anta, faveiro, falso barmatimão, Fabaceae).

### 2.1. Extração dos heterosídeos

Pesar 5 g do material vegetal seco em Erlenmeyer de 125 mL, adicionar 50 mL de EtOH 70 % e deixar em banho-maria sobre placa aquecedora e sob agitação, por 30 min, a 40 °C. Em seguida, filtrar o extrato em papel de filtro e concentrar em rotaevaporador até 50% do volume inicial. Separar cerca de 8 mL do extrato hidroalcoólico concentrado para as reações e CCD.

Em um funil de separação de 125 mL, particionar o restante do extrato concentrado com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 10 mL). Em seguida, particionar a solução aquosa remanescente com *n*-BuOH (3 x 10 mL). Evaporar sob vácuo até a secura as frações orgânicas obtidas ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  e *n*-BuOH) e, em seguida, transferi-las para frascos previamente pesados para análise posterior. Separar pequena alíquota de cada extrato para CCD.

### 2.2. Análise cromatográfica

Com auxílio de capilar de vidro, aplicar o extrato, seus produtos de partição e os padrões de rutin e quercetina em placa cromatográfica (5 x 5 cm) contendo sílica gel GF<sub>254</sub> como adsorvente. Desenvolver o cromatograma no sistema AcOEt-MeOH (95:5) com algumas gotas de AcOH.

Ao final da eluição, observar a fluorescência das amostras sob luz UV, nos comprimentos de onda 254 e 366 nm. Fazer um círculo ao redor das manchas principais. Em seguida, em capela, expor a placa a vapores de  $\text{NH}_3$  e observar novamente a fluorescência sob

luz UV, comparando os resultados. Finalmente, revelar com vanilina sulfúrica e comparar os resultados novamente. Verificar as diferenças observadas após a revelação com os diferentes reveladores.

### **2.3. Reações de coloração (genéricas)**

#### **2.3.1. Reação com hidróxidos alcalinos**

Em um tubo de ensaio, colocar 0,5 mL do extrato e 9,5 mL de água destilada. Separar 5 mL da solução final e a ela adicionar 15 gotas de solução de NaOH 1 N. O aparecimento de coloração amarela na solução indica a presença de flavonóides com hidroxilas fenólicas livres. Comparar com o outro tubo.

#### **2.3.2. Reação com cloreto de alumínio**

Em um pedaço de papel de filtro, aplicar duas gotas do extrato. Adicionar uma gota de solução de cloreto de alumínio em EtOH a 5% sobre uma das gotas. Após a evaporação do solvente, observar as manchas no papel, sob luz UV. Flavonas e flavonóis tomam fluorescência amarelada e flavanonas, azul-esverdeada.

#### **2.3.3. Reação de Shinoda (cianidina)**

Adicionar em um tubo de ensaio 5 mL do extrato vegetal, 1 mL de HCl concentrado e de dois a três fragmentos de magnésio metálico.

Observar após alguns minutos o aparecimento de cor na solução, que pode ser rósea ou vermelha (flavonóis), violeta (flavanonas) ou alaranjado (flavonas). Isoflavonas e chalconas não produzem cor.

#### **2.3.4. Reação com cloreto férrico**

Em um tubo de ensaio, misturar 1 mL do extrato vegetal e 9 mL de água destilada, adicionando em seguida 5 mL da solução obtida para um outro tubo. Em um dos tubos, adicionar *lentamente*, pela parede, uma gota de cloreto férrico a 2%, deixando o segundo tubo ao lado, sem a adição de nenhum reagente. Soluções contendo flavonas coram-se de verde-claro, flavonóis e flavanonas de verde-escuro e chalconas de amarelo.

### **2.4. Quantificação: calcular o teor de flavonóides totais**

#### **2.4.1. Construção da curva analítica**

A curva padrão foi construída utilizando-se soluções metanólicas de quercetina. Para tanto, pesaram-se cerca de 10 mg de quercetina em balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com metanol PA. Transferiram-se alíquotas de 2, 3, 4, 5 e 6 mL da solução estoque e 1 mL da solução de  $\text{AlCl}_3^*$  para balões volumétricos de 50 mL contendo 40 mL de MeOH. Após acerto do volume final com metanol a 25°C, agitou-se por alguns segundos.

Decorridos 30 min, fez-se a leitura em espectrofotômetro a 425 nm. Elaborou-se a equação da curva padrão pelo método de regressão linear (Figura 1).

\*Solução de cloreto de alumínio a 5%

#### 2.4.2. Teor de flavonóides na amostra

Transferiu-se uma alíquota de 50 µL do extrato (amostra) e 1 mL da solução de  $\text{AlCl}_3^*$  para um balão volumétrico de 25 mL contendo 20 mL de MeOH. A seguir, executaram-se os mesmos procedimentos descritos no item 2.4.1.

Em um balão volumétrico de 250 mL, dissolveu-se 12,5 g de  $\text{AlCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  em 200 mL de MeOH. Após a dissolução, completou-se o volume com MeOH a 25°C.

#### Resultados

Tabela 1. Dados para elaboração da curva analítica.

Concentração µg/mL	Absorvância nm
8,16	0,475
12,24	0,7765
16,32	1,0525
20,40	1,367
24,48	1,685

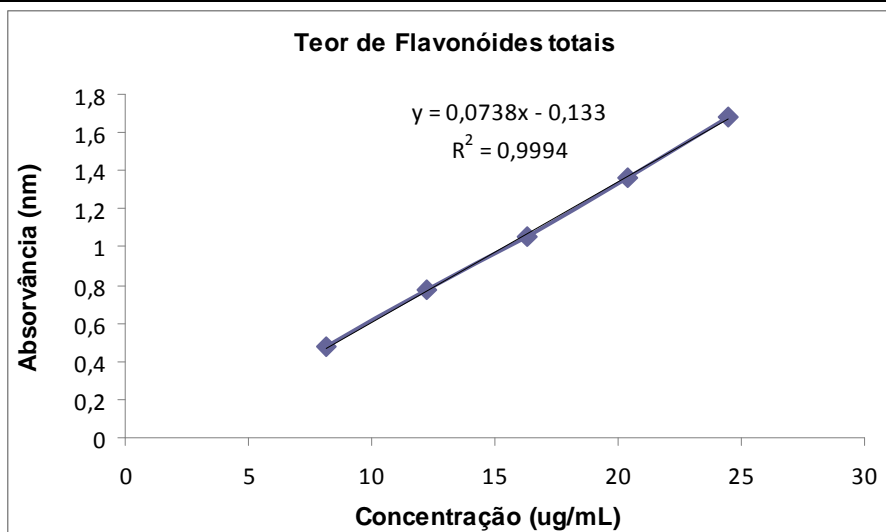


Figura 1: Curva analítica obtida a partir de diluição seriadas com o padrão de quercetina.

#### Executando a equação

Absorvância da amostra = 0,8355 nm, conforme metodologia descrita.

$$y = 0,0738x - 0,133$$

$$0,8355 = 0,0738x - 0,133$$

$$x = 13,12 \text{ µg/mL}$$

## **PRÁTICA 9. Rutina: hidrólise, partição e análise cromatográfica**

### **1. OBJETIVOS**

Efetuar as hidrólises da fração *n*-BuOH obtida no experimento anterior e do padrão de rutina. Analisar, qualitativamente, através de CCD, os extratos obtidos.

### **2. EXPERIMENTAL**

#### **2.1. Hidrólise da rutina obtida da fração butanólica**

Em um balão de 100 mL, colocar o resíduo da fração *n*-BuOH obtida na prática anterior. Guardar uma pequena alíquota do material para análise cromatográfica. Acrescentar 40 mL de solução MeOH-H<sub>2</sub>O 7:3, contendo 2,5 mol/L de HCl e deixar em ebulição por 30 min, utilizando sistema de refluxo. Em seguida, após esfriar o balão, transferir a solução ácida para funil de separação e particionar com AcOEt (3 x 10 mL). Reunir as frações orgânicas em AcOEt, adicionar uma pequena quantidade de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtrar. Concentrar em rotaevaporador e transferir para um frasco previamente pesado.

#### **2.2. Hidrólise do padrão de rutina**

Repetir o procedimento acima utilizando 50 mg do padrão de rutina.

#### **2.3. Cromatografia em camada delgada comparativa dos produtos de hidrólise**

Em uma placa cromatográfica (5 x 20 cm) com sílica gel GF<sub>254</sub>, aplicar a fração *n*-BuOH (1), os produtos de hidrólise (fração em AcOEt, 2), os padrões de rutina (3) e quercetina (4). Desenvolver a CCD no sistema de solvente AcOEt-MeOH (95:5) com traços de AcOH. Após a eluição, observar a placa sob luz UV e, em seguida, revelar em vapores de iodo. Verificar os produtos de hidrólise de rutina e da fração *n*-BuOH.

## PRÁTICA 10. Rutina: purificação da quercetina através de cromatografia em coluna

### 1. OBJETIVOS

Isolar e identificar a quercetina obtida no experimento anterior através de métodos cromatográficos.

### 2. EXPERIMENTAL

#### 2.1. Adsorção da amostra

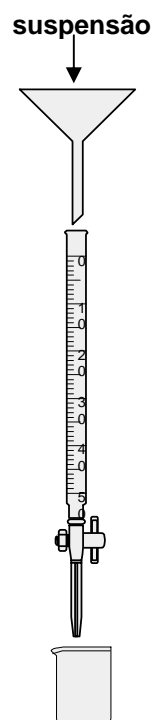
Pesar a fração em AcOEt (contendo os produtos de hidrólise) e, em seguida, adsorver em sílica gel com a ajuda de solvente orgânico. Após a adsorção, secar a amostra obtida e aplicá-la em CC.

#### 2.2. Preparação da coluna cromatográfica

Em uma coluna de vidro, empacotar cerca de 5 g de sílica gel 60 na mistura de *n*-hexano-AcOEt (4:1), preparando-se uma suspensão desta mistura de solventes com a sílica, adicionando-se esta progressivamente à coluna (ver Prática 2). Em seguida, coletar 15 frações de aproximadamente 10 mL cada, utilizando-se as misturas de solventes:

#### GRADIENTE

Eluente	Frações
1) <i>n</i> -Hexano:AcOEt (4:1)	1 - 5
2) <i>n</i> -Hexano:AcOEt (1:1)	6 - 9
3) AcOEt	10 - 12
4) AcOEt:MeOH (4:1)	13 - 14
5) MeOH	15



#### 2.3. Cromatografia em camada delgada comparativa

Em uma placa cromatográfica (20 x 20 cm) com sílica gel GF<sub>254</sub>, aplicar todas as frações coletadas e o padrão de quercetina. Desenvolver a cromatografia no sistema de solvente AcOEt-MeOH (95:5) com traços de AcOH. Após a eluição, observar a placa sob luz UV e, em seguida, revelar em vapores de iodo. Reunir as frações semelhantes e identificar a quercetina nestas frações.

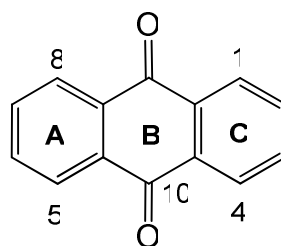
## PRÁTICA 11. Heterosídeos antraquinônicos: detecção de antraquinonas livres, O- e C-heterosídeos

### 1. INTRODUÇÃO

Fármacos de origem vegetal que contém heterosídeos antraquinônicos (antracênicos) são empregados desde a antiguidade como laxativos e purgativos.

Dentre as drogas mais importantes utilizadas na terapêutica, destacam-se o ruibarbo (*Rheum palmatum* L., Polygonaceae), a cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana* DC., Rhamnaceae), a sene (*Cassia angustifolia* Vahl, *C. senna* L., *Senna alexandrina* Mill., Fabaceae) e a babosa [*Aloe vera* (L.) Burm. f., *A. barbadensis* Mill. e outras espécies, Xanthorrhoeaceae]. Os princípios ativos dessas espécies com ação catártica agem no aparelho digestivo, mais precisamente na contração do músculo liso da parede do cólon e também no transporte de íons/absorção de água. Cuidado deve ser tomado devido à tolerância que aparece após uso prolongado.

O núcleo antraquinona (estrutura abaixo) pode estar ligado a oses através de ligações O- (geralmente nas posições 1 e 8) e C-heterosídicas (geralmente na posição 10), além de apresentar diferentes estados de oxidação, representados pelas antronas, antranóis, oxantronas e diantronas. Sabe-se que a ação farmacológica desejável é favorecida pelo núcleo antraquinona propriamente dito, sendo que os demais, exceto as diantronas, apesar de serem ativos, exercem efeitos indesejáveis nos usuários como, por exemplo, cólicas intestinais, espasmos e vômitos. Daí a necessidade de armazenar alguns desses vegetais coletados por um longo período de tempo, a fim de proporcionar a formação espontânea das formas mais oxidadas.



núcleo antraquinônico

### 2. EXPERIMENTAL

Drogas: cascas de *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada) e rizomas de *Rheum palmatum* (ruibarbo) pulverizados.

#### 2.1. Reação geral para identificação dos glicosídeos antraquinônicos (reação de Bornträger)

Ferver 300 mg da droga durante 5 min com 10 mL de KOH 0,5 N e 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 6%. Esperar esfriar e filtrar em funil com papel de filtro. Em seguida, acidificar o filtrado com AcOH

glacial (aproximadamente 10 gotas) e fazer partição com 10 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . A fase orgânica deve apresentar uma coloração amarelada. A seguir, separar 5 mL da fase orgânica e agitar com 2,5 mL de NaOH 2 N. As antraquinonas livres conferem cor vermelha à parte alcalina e a fase orgânica torna-se incolor. Os 5 mL restantes devem ser separados para a análise cromatográfica, levados à secura e depois ressuspensos em solvente apropriado.

## 2.2. Análise cromatográfica em camada delgada

Efetuar análise cromatográfica da parte orgânica em duas placas de vidro 5 x 20 cm (concentrar bastante a amostra no momento da aplicação). Material necessário:

- fase móvel: *n*-hexano-AcOEt (97:3) com gotas de AcOH;
- fase estacionária: sílica gel GF<sub>254</sub>;
- reveladores: placa 1 em cuba saturada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  R e luz UV (366 nm);
- placa 2 em cuba saturada com iodo.

## 2.3. Pesquisa de heterosídeos antraquinônicos livres e combinados

### 2.3.1. Antraquinonas livres

Extrair 500 mg da droga pulverizada com 5 mL de éter dietílico. Deixar decantar e transferir o sobrenadante para um tubo de ensaio. Repetir o procedimento novamente e reunir os extratos etéreos. Não desprezar a droga.

Adicionar à solução etérea cerca de 1 mL de solução aquosa de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10% agitar. Uma coloração rósea ou vermelha na camada aquosa indica a presença de antraquinonas livres.

### 2.3.2. O-heterosídeos

Adicionar 40 mL de água destilada ao resíduo da droga obtido no item anterior e aquecer até a fervura, mantendo em aquecimento brando por 10 min. Se necessário, completar o volume com água destilada.

Esfriar e filtrar em algodão em funil para um Erlenmeyer. Adicionar 5 mL de HCl concentrado e levar a ebulição, mantendo por 10 min. Esfriar e filtrar em papel de filtro para funil de separação.

Extrair a solução aquosa ácida éter dietílico (3 x 10 mL) e não desprezar a camada aquosa ácida.

Agitar 5 mL da solução etérea com 2 mL de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10%. Uma coloração avermelhada na fase alcalina aquosa indica a presença de O-heterosídeos.

### 2.3.3. C-heterosídeos

Adicionar 5 mL de solução de  $\text{FeCl}_3$  a 25% à solução aquosa ácida obtida no item anterior. Levar à ebulição branda por 15 min. Se necessário, adicionar mais água para

completar o volume. Esperar esfriar e transferir a solução para funil de separação. Efetuar partição com 20 mL de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Separar a fase orgânica e lavá-la com água destilada (2 x 10 mL).

Adicionar 2 mL de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10% à 5 mL da fração em  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Uma coloração avermelhada da fase aquosa indica a presença de C-heterosídeos.

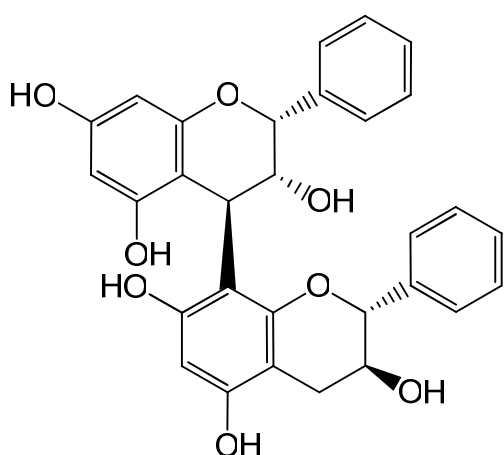


## PRÁTICA 12. Taninos: extração, caracterização e quantificação

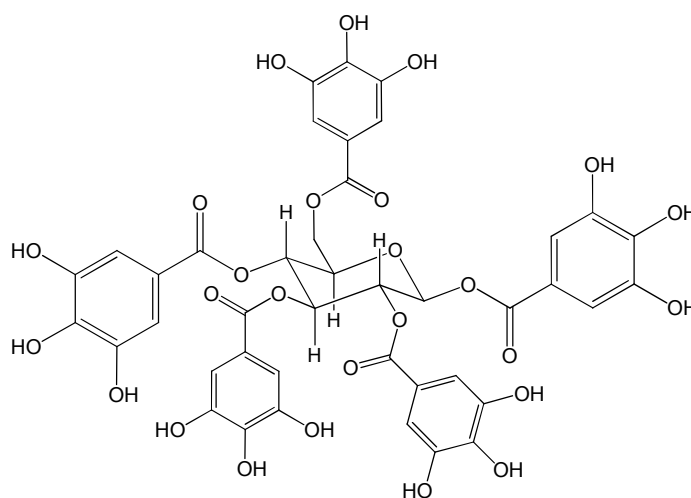
### 1. INTRODUÇÃO

Os taninos são metabólitos secundários vegetais com propriedade adstringente. Também possuem a capacidade de combinar com proteínas da pele de animais, impedindo sua hidrólise enzimática e preservando-as da putrefação, além de precipitar alcalóides e alguns metais pesados em solução aquosa. Na indústria, são empregadas no fabrico de couro.

Com relação à estrutura química, essas substâncias são polifenóis de alto peso molecular, na forma de polímeros ou heterosídeos, classificados respectivamente como taninos condensados (proantocianidinas) ou taninos hidrolizáveis (galitaninos ou elagitaninos).



tanino condensado (proantocianidina)



tanino hidrolisável (galitanino)

Os taninos são amplamente distribuídos nas diferentes famílias vegetais, sendo comuns em carvalhos (*Quercus* L. spp, Fagaceae), hamamelis (*Hamamelis virginiana* L., Hamamelidaceae) e barbatimão (*Stryphnodendron barbatimam* Mart., Fabaceae), além das galhas (produções patológicas em diferentes vegetais), dentre várias outras espécies.

A identificação dos taninos pode ser através de reações genéricas ou específicas, químicas ou biológicas. A análise quantitativa geralmente é realizada por espectrofotometria.

### 2. EXPERIMENTAL

Drogas: hamamelis (*Hamamelis virginiana*) e barbatimão (*Stryphnodendron barbatimam*) pulverizados.

#### 2.1. Extração dos taninos

Adicionar 1 g da droga pulverizada e 30 mL de água destilada em um Erlenmeyer, fervendo por cerca de 5 min. Após o resfriamento, filtrar em algodão e lavar o resíduo com pequena quantidade de água destilada. Se necessário, completar o volume inicial com água destilada.

## **2.2. Identificação genérica**

### **2.2.1. Hemoaglutinação**

Adicionar 5 mL do extrato aquoso em um tubo de ensaio (tubo **I**) e isotonzá-lo com 45 mg de NaCl, a fim de se obter solução a 0,9%. Em seguida, adicionar 2 mL de uma suspensão a 2% de hemácias em solução fisiológica. Em outro tubo de ensaio (tubo **II**), adicionar 5 mL de solução fisiológica e 2 mL da suspensão de sangue, que servirá como controle.

Deixar as soluções dos dois tubos em repouso por cerca de 20 a 30 min. Verificar se houve hemoaglutinação no tubo **I**, onde a solução fisiológica deve ficar límpida e as hemácias aglutinadas, ao contrário do tubo **II**, onde a solução fisiológica deve ficar rósea e opaca.

### **2.2.2. Reação com a gelatina**

Colocar 2 mL do extrato em um tubo de ensaio, juntamente com uma gota de HCl 10%. Em seguida adicionar, gota a gota e sem agitação, solução de gelatina a 2,5%.

Proceder com a técnica até haver aparecimento de turvação da solução ou precipitado da gelatina com os taninos.

### **2.2.3. Reação com alcalóides**

Em um tubo de ensaio, adicionar 2 mL do extrato, uma gota de HCl 10% e 15 gotas de uma solução de sal de alcalóide (sulfato de quinina a 0,1% em ácido sulfúrico 0,1 M).

Observar a formação de precipitado branco.

### **2.2.4. Reação com acetato neutro de chumbo**

Adicionar 2 mL do extrato em um tubo de ensaio e 10 gotas de solução aquosa de acetato neutro de chumbo a 10%.

Observar a formação de turvação ou precipitado.

### **2.2.5. Reação com acetato de cobre**

Adicionar 2 mL do extrato em um tubo de ensaio e 10 gotas de solução aquosa de acetato cobre a 4%.

Observar a formação de turvação ou precipitado.

## **2.3. Reações específicas**

### **2.3.1. Reação com acetato ácido de chumbo**

Adicionar em um tubo de ensaio 3 mL do extrato, 5 mL de AcOH glacial a 10% e 3 mL de solução de acetato de chumbo a 10%.

Os taninos condensados permanecem dissolvidos e os hidrolizáveis formam precipitado.

### 2.3.2. Reação com água de bromo

Em um tubo de ensaio adicionar 2 mL do extrato e algumas gotas de água de bromo.

Os taninos condensados formam imediatamente um precipitado amarelado ou avermelhado.

### 2.3.3. Reação com cloreto férrico

Adicionar em um tubo de ensaio 2 mL do extrato, 5 mL de água destilada e três gotas de solução aquosa  $\text{FeCl}_3$  2%.

Observar a formação de coloração azul para taninos hidrolizáveis e verde para os condensados.

## 2.4. Quantificação

### 2.4.1. Reagentes

Carbonato de sódio saturado 35%: para um béquer de 250 mL, pesar 35 g de carbonato de sódio anidro. Adicionar 100 mL de água destilada. Aquecer em 70-80 °C até dissolver. Deixar em repouso por 24 h (a solução deverá tornar-se transparente com depósito de sal no fundo). A seguir, filtrar em papel de filtro.

Reagente de Folin Denis: em um béquer de 250 mL transferir 25 mL de água destilada. Adicionar 5 mL de ácido fosfórico concentrado. Acrescentar mais 25 mL da água. Homogeneizar. Acrescentar 10 g de tungstato de sódio e 2 g de ácido fosfomolibdênico ao béquer. Dissolver os sólidos. Transferir para um balão de fundo redondo de 250 mL lavando as paredes do béquer com 25 mL de água. Adaptar o balão a um sistema de refluxo com manta de aquecimento e deixar em refluxo durante 2 h. A seguir, desligar o sistema e esperar esfriar. Transferir para um balão volumétrico de 100 mL, filtrando se necessário. Completar o volume do balão com água destilada. Nota: armazenar ao abrigo da luz e calor em frasco âmbar.

Ácido gálico 12,5 mg/mL: para um balão volumétrico de 50 mL, transferir exatamente 625 mg de ácido gálico. Completar o volume com metanol e homogeneizar.

### 2.4.2. Procedimento

- a) Preparo inicial da planta (extração): para um Erlenmeyer de 250 mL, transferir cerca de 3500 mg do pó de hamamelis – ou barbatimão – (=M) e adicionar 80 mL de água destilada. Em seguida, aquecer à fervura e manter em banho-maria (80-90 °C) por 30 min. Resfriar e em seguida transferir quantitativamente a solução para um balão volumétrico de 100 mL(=Vi), lavando as paredes do Erlenmeyer, esperar atingir a temperatura ambiente e completar o volume com água destilada. Finalmente filtrar em papel de filtro e utilizar o filtrado como amostra.

- b) Preparo da amostra – solução S1: transferir, para balão volumétrico de 50 mL, uma alíquota de 5 mL da amostra (=A1) e completar o volume com água destilada (=V1).
- c) Preparo do padrão – solução P1: transferir, para balão volumétrico de 50 mL, 1 mL do padrão de ácido gálico a 12,5 mg/mL e completar o volume com água destilada.
- d) Tanto para a amostra e para o padrão, transferir 1 mL da solução S1 (= A2) ou P1 para outro balão volumétrico de 50 mL (= V2) e adicionar 20 mL de água destilada. Homogeneizar.
- e) Acrescentar 2,5 mL de reagente de Folin-Denis.
- f) Adicionar 5 mL de carbonato de sódio saturado 35% p/v.
- g) Completar rapidamente o volume com água destilada, homogeneizar e deixar em repouso por 30 min ao abrigo da luz.
- h) Proceder a leitura da amostra e do padrão em espectrofotômetro a 760 nm, utilizando água destilada como branco.
- i) Calcular os teores de taninos de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Teor de taninos \% m/m} = \frac{AA \times CP \times V1 \times V2 \times Vi \times 100}{AP \times A1 \times A2 \times M}$$

AA = absorbância da amostra

AP = absorbância do padrão

CP = concentração reacional do padrão de ácido gálico (= 0,005 mg/mL)

A1 = alíquota da amostra (= 5 mL)

V1 = volume da primeira diluição (= 50 mL)

A2 = alíquota da reação (= 1 mL)

V2 = volume da reação (= 50 mL)

Vi = volume da amostra (= 100 mL)

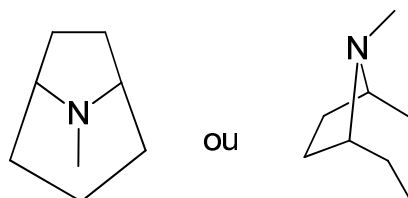
M = massa da amostra em mg

Obs: as leituras de absorbância devem se situar entre 0,200 e 0,800. Caso isto não aconteça, rever o volume da alíquota inicial da amostra (=A1).

## PRÁTICA 13. Alcalóides tropânicos: extração e caracterização

### 1. INTRODUÇÃO

Os alcalóides tropânicos possuem o núcleo básico do tropano, uma estrutura bicíclica constituída pelos anéis pirrolidina e piperidina. Os do tipo atropina são encontrados em espécies da família Solanaceae, como a beladona (*Atropa belladonna* L.), mandrágora (*Mandragora officinalis* L.), meimendro (*Hyoscyamus niger* L.), trombetaira [*Datura suaveolens* Humb. & Bonpl. ex Willd., sin. *Brugmansia suaveolens* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Bercht. & C. Presl.] e estramônio (*Datura stramonium* L.). Os alcalóides tropânicos do tipo cocaína são encontrados apenas nas espécies *Erythroxylum coca* Lam. e *E. novogranatense* Hieron var. *truxillense* (Rusby) Plowman (Erythroxylaceae). Os principais representantes dessa classe são a hioscina (escopolamina), hiosciamina e atropina. A principal atividade farmacológica dos alcalóides de Solanaceae é a parassimpaticolítica (antagonista da acetilcolina).



representações do núcleo tropânico

### 2. EXPERIMENTAL

Droga: *Datura suaveolens* (trombetaira, saia-branca; Solanaceae).

#### 2.1. Análise direta do extrato em meio ácido com reagentes de precipitação

Pesar cerca de 500 mg do pó da droga em um tubo de ensaio. Adicionar 15 mL de solução de HCl 2% e aquecer em banho-maria por cerca de 3 min. Filtrar o extrato em algodão, distribuindo o filtrado em outros seis tubos de ensaio, adicionando em seguida os reagentes gerais de precipitação.

#### 2.2. Extração (método A)

Colocar 6 g da droga pulverizada em um Erlenmeyer. Adicionar 30 mL de HCl 2% e levar ao banho-maria por 10 min. Esperar a solução esfriar por 5 min e filtrar o sobrenadante em funil com algodão.

Extrair novamente o resíduo com duas porções adicionais de 15 mL de HCl 2%. Filtrar novamente e reunir os extratos filtrados.

Adicionar  $\text{NH}_4\text{OH}$  ao extrato até pH 9-10 (papel de tornassol).

Efetuar extrações com  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (3 x 25 mL), reunindo as fases orgânicas ao final. Secar com  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e filtrar em funil de vidro.

Separar a fase orgânica para as reações específicas (duas porções de 10 mL) e análise cromatográfica por CCD (pequena alíquota) e o restante para as reações de precipitação (evaporar em balão).

### 2.3. Identificação genérica - reações de precipitação

Evaporar totalmente o extrato da fase orgânica separado para as reações de precipitação. Adicionar pequena porção de HCl 2% (aproximadamente 6 mL) e misturar com auxílio de bastão de vidro, aquecendo levemente se necessário. Distribuir uniformemente o material em seis tubos de ensaio e, em cada tubo, adicionar cada um dos diferentes reagentes gerais de precipitação, gota a gota. Turvação ou precipitação são indicativos de reação positiva.

Utilizar os seguintes reagentes gerais de precipitação: reativos de Mayer (cloro iodomercurato de potássio), de Dragendorff (iodobismutato de potássio), de Bouchardat (triiodeto de potássio), de Bertrand (ácido silicotúngstico), ácidos tânico e fosfomolibdico.

### 2.4. Reações específicas para o núcleo tropânico

#### 2.4.1. Reação de Vitali

Submeter à evaporação total em banho-maria 10 mL do extrato orgânico contido em cápsula de porcelana, adicionando em seguida 6-8 gotas de HNO<sub>3</sub> concentrado. Com auxílio de bastão de vidro, misturar o ácido ao resíduo orgânico da cápsula e em seguida evaporar o produto até a secura em banho-maria (em capela). Ao esfriar a cápsula, adicionar 2 mL de acetona e 6-8 gotas de KOH a 10% em álcool. O resultado positivo é indicado pelo aparecimento de coloração violeta.

#### 2.4.2. Reação de Wasicky

Submeter à evaporação em banho-maria 10 mL do extrato orgânico contido na outra cápsula de porcelana. Ao resíduo, adicionar duas gotas de reativo de Wasicky (*p*-dimetilaminobenzaldeído e H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) e aquecer em chama, sobre tela de amianto. O resultado positivo é indicado pelo aparecimento de coloração vermelha, inicialmente nas bordas e depois em toda a região das gotas.

### 2.5. Análise cromatográfica

Efetuar análise cromatográfica através de CCD (placa 5 x 20 cm), utilizando a alíquota do extrato da fase orgânica. Material necessário:

- fase móvel: CHCl<sub>3</sub>-MeOH-NH<sub>4</sub>OH (50:9:1);
- fase estacionária: sílica gel GF<sub>254</sub>;
- padrões: atropina e hioscina (escopolamina);
- reveladores: luz UV, vapores de iodo e nebulização com reagente de Dragendorff.

## PRÁTICA 14. Processos extrativos: tintura de ipeca (parte I)

### 1. EXTRATOS

Os extratos são preparações concentradas, obtidas de drogas vegetais ou animais, frescas ou secas, por meio de um dissolvente apropriado, seguido de sua evaporação total ou parcial e ajustagem do concentrado a padrões previamente estabelecidos.

As drogas destinadas à sua preparação devem ser reduzidas ao grau de finura prescrito na respectiva monografia.

A extração pode ser feita por decocção, infusão, maceração, percolação, ou ainda pela expressão de partes de plantas frescas, de acordo com a técnica indicada para cada caso.

A percolação é o processo indicado na extração da maioria das drogas. O tempo de maceração e a velocidade de gotejamento do mênstruo variam com a droga, de modo a compensar as peculiaridades da extração.

A concentração das frações obtidas durante a extração deve ser feita imediatamente e, na maioria dos casos, pela evaporação sob pressão reduzida, em banho-maria e temperatura inferior a 60 °C para evitar que os princípios ativos da droga se alterem pela temperatura elevada.

Em certos casos, devidamente indicados nas respectivas monografias, a extração deve ser precedida de um tratamento prévio por bases ou ácidos, pela destruição das enzimas existentes, pelo desengorduramento ou outros tratamentos adequados a determinadas drogas.

Relativamente à sua consistência, os extratos dividem-se em quatro categorias:

- *extratos fluidos*: os que se apresentam sob a forma líquida;
- *extratos moles*: os que possuem consistência do mel espesso e, dessecados a 105 °C, perdem de 15 a 20% de seu peso;
- *extratos firmes ou pilulares*: os que possuem consistência de massa pilular e, quando dessecados a 105 °C, perdem de 10 a 15% de água;
- *extratos secos ou pulverulentos*: os que se apresentam sob a forma de pó e não perdem, a 105 °C, mais de 5% de seu peso, sendo em geral muito higroscópicos.

Certos extratos devem ser ajustados a padrões prescritos de seus princípios ativos. São toleradas as adições de açúcar, amido, glicerina líquida, carbonato de magnésio, óxido de magnésio, fosfato tricálcico, alcaçuz em pó, extrato de malte, extrato de sapé, glicerina e do resíduo da extração, reduzido a pó, para levá-los aos limites tolerados. O diluente para um extrato pode ainda ter a adição de clorofila ou de caramelo para levá-lo à sua cor normal.

### 2. EXTRATOS FLUIDOS

Os extratos fluidos são preparações oficiais, líquidas, obtidas de drogas vegetais e manipuladas de maneira que cada mililitro contém os princípios ativos solúveis, de 1 g da droga respectiva, devidamente dessecada ao ar livre.

Em sua maioria são preparados por um dos quatro processos gerais, abaixo descritos e designados pelas letras A, B, C e D.

O tempo de maceração e a velocidade de fluxo durante a percolação variam, segundo as diferentes drogas, com o objetivo de extrair completamente os constituintes importantes ou terapeuticamente ativos das quantidades especificadas da droga; podem, entretanto, afastar-se dos números indicados nas respectivas monografias, quando as quantidades empregadas da droga forem maiores ou menores.

A velocidade de saída do percolato é determinada pelas expressões *percole lentamente*, *percole rapidamente* e *percole à velocidade moderada*, que, referidas à extração de 1.000 g de drogas, significam, respectivamente, uma saída que não exceda de 1 mL de percolato por min, uma saída de 3 a 5 mL por min e uma saída de 1 a 3 mL por min.

Um extrato, que, com o tempo, deposite algum sedimento, pode ser filtrado ou decantado, desde que o líquido transparente resultante obedeça às especificações oficiais.

São os seguintes os processos gerais de fabricação.

### **2.1. Processo A**

Este processo é empregado na preparação dos extratos fluidos pela percolação, no qual o líquido extrator é o álcool ou uma mistura de álcool e água.

Operar do modo seguinte. Umedecer bem e uniformemente 1.000 g da droga, pulverizada previamente, com quantidade suficiente do líquido extrator indicado, e deixar em maceração, em vaso tampado, durante 15 min; comprimir a droga então, fortemente, no percolador, e verter sobre ela a quantidade suficiente de líquido extrator para umedecê-la e ainda restar um excesso de líquido sobrenadante; quando o líquido começar a gotejar, fechar a saída do percolato, cobrir e deixar macerar pelo tempo prescrito na monografia. Proceder a percolação na velocidade especificada, adicionando mais líquido extrator até esgotar a droga. Separar os primeiros 850 mL do percolato (se não houver determinação especial na monografia), destilar o restante para recuperar o álcool e concentrar o resíduo até consistência xaroposa, em temperatura que não exceda 60 °C. Dissolver esse extrato no percolato previamente separado e, se não houver doseamento, juntar quantidade suficiente do mênstruo empregado, para obter 1.000 mL do extrato fluido.

Este processo pode ser sempre substituído pelo **Processo C**.

### **2.2. Processo B**

Emprega-se este processo na preparação dos extratos fluidos em cuja extração são usados, além do álcool ou da mistura de álcool e água, quantidades determinadas de outros componentes, tais como um ácido ou glicerina, utilizados, sucessivamente, em dois líquidos extratores. O líquido extrator I contém glicerina ou ácido na proporção exigida para a



quantidade de droga empregada e o líquido extrator II, uma mistura de álcool e água, na proporção indicada, para completar o esgotamento da droga. Proceda do seguinte modo.

Umedecer bem e uniformemente 1.000 g da droga, pulverizada, com quantidade suficiente do líquido extrator I (esta operação requer de 600 a 800 mL de líquido extrator). Deixar a droga, assim umedecida, em repouso por uns 15 min; comprimi-la fortemente no percolador e adicionar o resto do líquido extrator I. Quando o líquido começar a gotejar, fechar a saída do percolador, cobrir e deixar a droga em maceração durante o tempo prescrito na monografia; proceder a percolação na velocidade indicada e, quando o líquido extrator I desaparecer da superfície, continuar a percolação com o líquido extrator II até terminar o esgotamento da droga. Separar os primeiros 850 mL de percolato, destilar o restante para recuperar o álcool e concentrar o resíduo até consistência xaroposa, em temperatura que não exceda 60 °C. Dissolver este resíduo na porção sepa rada e, se não houver doseamento, juntar quantidade suficiente do líquido extrator II para obter 1.000 mL ou o volume determinado por cálculo pelo doseamento.

O processo pode ser substituído pelo **Processo C**, atendendo à modificação de mênstruo neste indicada.

### 2.3. Processo C

Este processo é o da percolação fracionada, especialmente indicado para as drogas que contêm princípios voláteis ou constituintes facilmente alteráveis pelo calor ou na substituição dos **Processos A** ou **B**, quando não houver equipamento adequado para concentração e destilação. Ao se empregar o **Processo C** para a obtenção de um extrato fluido, que normalmente se prepara pelo **Processo B**, empregar o líquido extrator I em todo o transcurso de percolação.

Proceder ao seguinte modo. Dividir 1.000 g da droga pulverizada em três porções de 500 g, 300 g e 200 g, respectivamente. Umedecer uniformemente a primeira porção (500 g), com quantidade suficiente do líquido extrator; transferir o pó umedecido a um percolador adequado, cuja capacidade não deve exceder, de muito, o volume da droga no percolador. Saturar com o líquido extrator até ficar uma camada que a cubra completamente e deixar macerar pelo tempo prescrito na monografia; proceder a percolação, separando os primeiros 200 mL que percolarem e recolhendo depois, separadamente, cinco frações sucessivas de 300 mL de percolato cada uma, numerando-as na ordem em que forem obtidas.

Umedecer a segunda porção da droga (300 g) com quantidade suficiente do percolato obtido imediatamente depois da fração separada; percolar, procedendo como com a primeira porção da droga, usando como líquido extrator as porções restantes do percolato, obtidas na primeira operação, e usando-as na ordem em que foram recolhidas; separar os primeiros 300 mL do novo percolato e recolher mais cinco frações, de 200 mL cada uma, numerando-as na ordem em que forem obtidas.

Umedecer a terceira porção da droga (200 g) com quantidade suficiente da primeira fração numerada do percolato da segunda porção e proceder a percolação como na operação precedente, empregando como líquido extrator as frações de 200 mL de percolato da segunda porção, na ordem em que foram recolhidas. Se não houver doseamento, recolher e separar 500 mL de percolatos. Misturar os três percolatos separados das três porções da droga, para obter 1.000 mL de extrato fluido.

Se for necessário dosar o extrato fluido preparado pelo **Processo C**, recolher e separar somente 420 mL de percolato da terceira porção em vez dos 500 mL determinados anteriormente. Misturar os três percolatos separados das três porções da droga e dosar uma fração da mistura.

Se o teor obtido for excessivo, ajustar o título diluindo-o com quantidade suficiente do mênstruo empregado e, se insuficiente, retirar e separar todo o líquido restante nos percoladores. Repetir a extração utilizando como mênstruo o percolato de teor insuficiente e, depois, o líquido por último retirado, e proceder a novo doseamento.

#### **2.4. Processo D**

Este processo é empregado para preparar extratos fluidos nos quais o líquido extrator é a água fervente, adicionando-se álcool ao percolato concentrado, como conservador.

Eis seu modo operatório. A 1.000 g da droga grosseiramente pulverizada, juntar cerca de 3.000 mL de água fervente, misturar bem e deixar em maceração, em um percolador adequado, fechado, durante 2 h. Prosseguir a percolação na velocidade especificada, juntando, pouco a pouco, água fervente até completo esgotamento da droga. Evaporar os percolatos, em banho-maria ou destilador a vácuo, até o volume determinado; deixar esfriar, juntar o álcool e deixar a mistura em repouso, em recipiente fechado, durante 24 h. Decantar o líquido transparente, filtrar o restante, misturando-os e lavando o resíduo do filtro com quantidade suficiente do mênstruo de modo a obter 1.000 mL.

### **3. TINTURAS**

As tinturas são medicamentos líquidos resultantes da extração de drogas vegetais ou animais. São preparadas na temperatura comum por percolação ou por maceração. Os líquidos extratores são o álcool, a água e o álcool, éter alcoolizado e a acetona.

#### **3.1. Preparação**

As tinturas podem ser preparadas por percolação ou maceração, operando-se de acordo com os dois processos gerais seguintes.

##### **3.1.1. Processo Geral P – Percolação**

Umedecer a droga ou drogas pulverizadas, indicadas na fórmula, com q.s. do líquido extrator prescrito e deixar em maceração durante 6 h em vaso tampado; passar então o pó umedecido pelo tamis nº 2, introduzir num percolado r, comprimindo-o suficientemente; juntar-lhe mais do líquido extrator e, de acordo com as regras de percolação (veja parte geral), proceder ao esgotamento da droga, até obter 1.000 mL de tintura.

Quando a tintura tiver de ser dosada, percolar até obter somente 950 mL de percolato, seguindo exatamente o processo indicado na fórmula e, determinada a quantidade de alcalóides nela existente, calcular a totalidade de alcalóides do resto do percolato e juntar a este q.s. do líquido extrator para que a tintura finalizada contenha exatamente a percentagem de alcalóides exigida.

### **3.1.2. Processo Geral M – Maceração**

Macerar a droga ou drogas pulverizadas, indicadas na fórmula, em vaso bem fechado, em lugar pouco iluminado, na temperatura ambiente, em 850 mL do dissolvente prescrito (salvo se for indicada outra quantidade na fórmula), agitando freqüentemente; após oito dias, filtrar e lavar aos poucos o resíduo restante no filtro com q.s. do dissolvente para obter 1.000 mL de tintura e misturar bem.

As tinturas são chamadas simples ou compostas, conforme são preparadas com uma ou várias substâncias. As tinturas simples recebem o nome das drogas que encerram; as compostas recebem algumas denominações especiais, como “Tintura de ópio canforada” (Elixir paregórico), “Tintura de Jalapa composta” (Aguardente alemã), etc.

As drogas vegetais ou animais empregados devem ser convenientemente pulverizados e secos, obedecendo ao grau de pulverização indicado em cada tintura.

O teor alcoólico, variável para cada tintura, é obtido por diluição de álcool com água destilada nas proporções especificadas em cada tintura e que devem ser rigorosamente obedecidas.

O álcool empregado nessas preparações deve satisfazer às exigências para o álcool.

As tinturas simples, de drogas muito ativas, chamadas heróicas, devem ser sempre preparadas por percolação e na proporção de uma parte da droga para 10 partes de álcool (100 para 1.000). Neste caso, o álcool a empregar é o de 70 % (v/v), salvo casos especiais indicados nas monografias respectivas.

As tinturas de drogas comuns (não heróicas) são preparadas com álcool de teor variável e na proporção de uma parte da droga para cinco partes de álcool, ou seja, 200 partes para 1.000 de álcool.

## **4. CONSERVAÇÃO**

As tinturas devem ser conservadas em recipientes bem fechados, de preferência de cor âmbar, ao abrigo da luz e do calor.

## 5. EXPERIMENTAL

### 5.1. Verificação do extrato seco

Havendo necessidade de conhecer o extrato seco de uma tintura, proceder do modo seguinte. Pipetar 10 mL da tintura, evaporar em banho-maria em cápsula de porcelana de 30 mL de capacidade previamente tarada.

Terminar a dessecação numa estufa a 105-110° durante 3 h, deixar resfriar em dessecador de ácido sulfúrico e pesar. Calcular a quantidade em 100 mL da tintura.

### 5.2. Tintura de ipecacuanha

<i>Tintura de ipeca</i>	Ipecacuanha em pó (60) .....100 g
	Álcool ..... q.s.
	Água ..... q.s.
	Para obter .....1.000 mL

Preparar esta tintura pelo **Processo Geral P** (item 3.1.1.), empregando, como líquido extrator, a mistura de três volumes de álcool e um volume de água e ajustando o volume da tintura finalizada, de maneira que cada porção de 100 mL contenha 0,2 g de alcalóides da ipecacuanha solúveis no éter. Exatamente 100 mL da tintura devem conter, no mínimo, 0,18 g e, no máximo, 0,22 g de alcalóides da ipecacuanha solúveis no éter.

### 5.3. Caracterização

Líquido límpido de cor castanho-avermelhada, de sabor ardente, nauseoso e cheiro fraco, porém característico. Uma mistura de 1 mL de tintura de ipecacuanha com 9 mL de água é opalescente; sendo adicionada de duas gotas de HCl diluído SR e de 1 mL de iodomercurato de potássio R, esta mistura deve turvar-se fortemente e dar precipitado flocoso. Aquecer com precaução a 60-70 °C uma mistura de 10 gotas (≈0,5 mL) da tintura com 10 gotas (≈0,5 mL) de HCl diluído SR e uma gota de solução de peróxido de hidrogênio SR: formar-se-á coloração amarelo-alaranjada (reação da emetina).

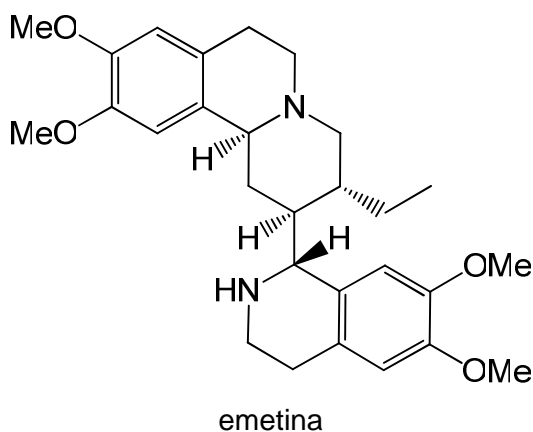
## PRÁTICA 15. Processos extrativos: tintura de ipeca (parte II)

### 1. EXTRAÇÃO DE ALCALÓIDES

Pesar 0,5 g da droga pulverizada em Erlenmeyer de 125 mL de capacidade. Adicionar 15 mL de solução de HCl 0,2 N. Deixar em maceração em banho-maria durante uma hora, agitando o frasco a cada 5 min. Em seguida, filtrar o extrato aquoso e transferir o filtrado para funil de separação de 125 mL de capacidade. Particionar a solução aquosa ácida duas vezes, com 20 mL de AcOEt. Em seguida, adicionar solução de NaOH 2,0 N à solução aquosa remanescente, em quantidade suficiente para atingir pH 10-11. Extrair a solução alcalina duas vezes, com 20 mL de AcOEt. Reunir as duas frações orgânicas obtidas da fase alcalina e concentrar em rotaevaporador.

### 2. DOSEAMENTO DOS ALCALÓIDES

Evaporar, em cápsula, 25 mL da tintura em temperatura inferior a 80 °C, até reduzi-los a cerca de 5 mL; juntar a este líquido 5 g de sílica gel 60, misturar bem e continuar a evaporação até secura. Introduzir a sílica impregnada num frasco de 100 mL de capacidade, com rolha esmerilhada, e juntar 25 mL de éter R; lavar a cápsula que serviu para a evaporação com 2 mL de NH<sub>3</sub> diluída SR, previamente adicionada de igual volume de água destilada e juntar as águas de lavagem ao frasco. Arrolhar bem este último e agitar vigorosamente, de vez em quando, durante 1 h; adicionar então 0,5 g de pó de goma adraganta e agitar novamente, e quando a sílica estiver depositada, decantar o líquido etéreo e separar. Lavar o resíduo do frasco duas vezes com 15 mL de éter R de cada vez; reunir os solutos etéreos, filtrar através de um pouco de algodão hidrófilo, lavar o filtro com éter R e evaporar cautelosamente o líquido etéreo total em banho-maria, até eliminar completamente o éter; dissolver o resíduo em alguns mL de álcool neutro R, juntar 20 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N, 5 mL de água destilada e duas gotas de vermelho de metila SI e dosar o excesso de ácido por meio de NaOH 0,02 N. Cada mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,02 N consumido corresponde a 0,004913 g de alcalóides de ipecacuanha [*Cephaelis ipecacuanha* (Brot.) A. Rich., Rubiaceae] solúveis no éter, avaliados em emetina. Multiplicar o resultado por quatro para se ter os alcalóides em 100 mL de tintura.



### **3. ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DOS ALCALÓIDES DE IPECA**

#### **3.1. Cromatografia em camada delgada comparativa**

Analisar em CCD a tintura obtida. Material necessário:

- adsorvente: sílica gel GF<sub>254</sub>
- fase móvel CHCl<sub>3</sub>-MeOH (2:3) e gotas de NH<sub>4</sub>OH
- reveladores:
  - luz UV 254 e 366 nm
  - reagente de Dragendorff

**BIBLIOGRAFIA BÁSICA**

A.O.A.C. **Official Methods of Analysis**. Association of Official Analytical Chemists. 16<sup>th</sup> Ed., 1995, method 952.03. A.O.A.C., Washington, D.C., p. 26.

Alvarenga, F.C.R.; Garcia, E.F.; Bastos, E.M.A.F.; Grandi, T.S.M.; Duarte, M.G.R. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia** **19**: 442-448, 2009.

Bertolucci, S.K.V.; Pereira, A.B.D.; Pinto, J.E.B.P.; Ribeiro, J.A.A.; Oliveira, A.B.; Braga, F.C. Development and validation of an RP-HPLC method for quantification of cinnamic acid derivatives and kaurane-type diterpenes in *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*. **Planta Medica** **75**: 280-285, 2009.

Brasil. **Farmacopéia Brasileira**. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 5<sup>a</sup> ed., vol. 1 e 2, 2010.

Brasil. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1<sup>a</sup> ed., 2011.

Collins, C.H.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. (coordenadores). **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas, Ed. UNICAMP, 6<sup>a</sup> ed., 1995.

Costa, A.F. **Farmacognosia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 5<sup>a</sup> ed., 1994, vol. I, II e III.

Evans, W.C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. London, WB Saunders, 14<sup>th</sup> ed., 1996.

Hänsel, R.; Sticher, O.; Steinegger, E. **Pharmakognosie – Phytopharmazie**. Berlin, Heidelberg, New York, Springer, 6. Aufl., 1999.

Matos, F.A.J. **Introdução à fitoquímica experimental**. Fortaleza, Ed. UFC, 1988.

Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E. **Farmacognosia e farmacobiotechnologia**. São Paulo, Editorial Premier, 1997.

Rocha, M.D.; Maia, P.P.; Rodrigues, M.A.C.; Martins, I. Incidência de aflatoxinas em amostras de amendoim e paçoca comercializadas na cidade de Alfenas-MG, Brasil. **Revista Brasileira de Toxicologia** 21: 15-19, 2008.

Simões, C.M.O; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz., L.A.; Petrovick, P.R. (organizadores). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 6ª ed., 2001.

Wagner, H.; Bladt, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin/Heidelberg, Springer Verlag, 1995.

Waterhouse, A.L. Determination of total phenolics. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**: I1.1.1-I1.1.8, supplement 6, 2002.



**APÊNDICE 1. Preparo de reagentes****Ácido Fosfomolibdico a 5% em EtOH**

Dissolver 5 mL de ácido fosfomolibdico em EtOH, completando o volume para 100 mL e filtrando em papel de filtro.

**Ácido Clorídrico R**

Ácido clorídrico concentrado (mínimo 35 e máximo 38%).

**Ácido Clorídrico 3,0 N SR**

Dilua 33,3 g de ácido clorídrico R com quantidade suficiente de água para 100 mL. Essa solução é correspondente a 10% (p/v) de HCl.

**Ácido Sulfúrico R**

Ácido sulfúrico concentrado 98,08% (mínimo 95 e máximo 98,08%).

**Cloreto Férrico SR**

Dissolver 9 g de cloreto férrico R em 50 mL de água e 2 mL de ácido clorídrico 3,0 N SR e dilua com quantidade suficiente de água para 100 mL.

**Reagente de Baljet**

Dissolver, em um balão de 100 mL, 1,8 g de ácido pícrico em 50 mL de álcool 90° e 30 mL de H<sub>2</sub>O, completando o volume do balão com solução de NaOH 1,0 N.

**Reagente de Bertrand**

Dissolver 5 g de ácido sílicotúngstico em 100 mL de água.

**Reagente de Bouchardat**

Solução decinormal de iodo.

**Reagente de Dragendorff**

Dissolver 8 g de subnitrito de bismuto em 20 mL de ácido nítrico diluído a 30%. Dissolver, em separado, 22,8 g de iodeto de potássio num volume mínimo de água. Lançar a primeira solução, pouco a pouco, sobre a segunda. Deixar em repouso durante algumas horas e filtrar. Completar com água o volume de 100 mL (guardar ao abrigo da luz).

**Reagente de Kedde**

Solução alcoólica a 1% de ácido 3,5-dinitrobenzóico.

**Reagente de Mayer**

Dissolver, em água, 2,71 g de cloreto de mercúrio e 10 g de iodeto de potássio. Completar o volume de 200 mL com mais água. Agitar e filtrar.

**Vanilina Sulfúrica**

Dissolver 1 g de vanilina em MeOH, completando o volume para 100 mL. Adicionar em seguida 1 mL (aproximadamente).

**APÊNDICE 2. Guia para confecção de relatórios**

Identificação *(nomes dos participantes da aula e número do grupo)*

Nº da aula prática/título da aula

**1. INTRODUÇÃO**

*Situar sucintamente o problema (a planta, a droga, a classe de substância, a metodologia, etc.)*

**2. OBJETIVOS****3. MATERIAIS E MÉTODOS**

*Listar etapas e equipamentos principais (Se preferir, utilizar um fluxograma)*

**4. RESULTADOS**

*(descrever os resultados alcançados – esquemas, tabelas, etc.)*

**5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO****6. BIBLIOGRAFIA**

*(caso tenha sido consultada alguma em aula)*