

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA DETERMINAÇÃO DE RICININA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA COM DETECÇÃO POR UV- VISÍVEL

Daniely CARDOSO (1); Lucia GUEZO (2); Jéssica CASTRO(3); Mayara COELHO(4); Natilene M. BRITO(5)

(1) CEFET-MA, Av. Getúlio Vargas, Monte Castelo, 32189106, e-mail: veronik_tdb@yahoo.com.br

(2) CEFET-MA, e-mail: lguezo7@hotmail.com

(3) CEFET-MA, e-mail: dr_jessica10@yahoo.com.br

(4) CEFET-MA, e-mail: mayara_coelho@yahoo.com.br

(5) CEFET-MA, e-mail: natilene@cefet-ma.br

RESUMO

A torta da mamona é o mais tradicional e importante subproduto da cadeia produtivo da mamona, obtido a partir do óleo das sementes desta oleaginosa. Em todo o mundo, seu uso predominantemente tem sido como adubo orgânico de boa qualidade, pois é uma mistura ricamente nitrogenada, eficiente na recuperação de terras esgotas, embora possa obter valor significativamente maior se utilizada como alimento animal (após ser moído e obtido o farelo), aproveitando o alto teor de proteínas. Porém, este uso não tem sido possível devido à presença de uma das substâncias tóxicas, o alcalóide ricinina. Neste trabalho isolou-se o alcalóide ricinina das sementes da mamona e realizou análises utilizando diferentes técnicas com o intuito de caracterizar o composto como: Ultravioleta visível (UV-Vis); Infravermelho (IV); Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN- H^1); Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a detector de espectrofotometria de massa (CG-EM). Os resultados encontrados com as diferentes técnicas confirmaram a identidade do composto passando a ser utilizado como padrão para o desenvolvimento do método de análise para esta substância utilizando a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado a um detector de UV-VIS, tal método utiliza uma coluna C18 de 15 cm, fase móvel de ACN:H₂O (90:10, v:v), fluxo da fase móvel de 0,8 mL, tais parâmetros permitem que a análise do composto em questão seja realizada em cerca de 10 min, mostrando-se um método rápido e eficiente para a análise de ricinina.

Palavras-chave: Ricinina, Torta de mamona, Cromatografia.

1 INTRODUÇÃO

A mamona (*Ricinus communis*) é uma das 7.000 espécies da família das Euforbiáceas, originária da Etiópia, no Continente Africano. As bagas desta planta é produtora de um óleo especial, solúvel em álcool, o mais denso e viscoso de todos os óleos vegetais e animais que a natureza concebeu possuidor de propriedades singulares que o fazem o mais versátil de todos, com mais de 1000 aplicações industriais e um dos melhores para produção de biocombustíveis, é o caso do biodiesel. (<http://www.rbb.ba.gov.br/index.php?id=3&prefixo=det&menu=oleaginosa>).

O óleo desta oleaginosa tem sido usado como diversas finalidades na produção de sabões, manufatura de cosméticos, germicidas, lubrificantes de aeronaves militares, fabricação de corantes, desinfetantes aderentes, além de diversos polímeros. Assim, o cultivo da mamona tem sido destinado praticamente à industrialização do óleo, obtendo-se como subproduto a torta da mamona, a qual é utilizada como adubo orgânico que é um produto de baixo valor agregado se comparado com sua aplicação como alimento animal. Seu alto teor de nitrogênio (5%) e presença de outros macronutrientes como, por exemplo, a fibra (35%) torna-a um excelente adubo que contribui também para o fornecimento de matéria orgânica para o solo (Silva, 1971).

A torta é o sólido residual obtido do processo de extração do óleo a partir das bagas (sementes sem casca). A toxicidade da torta da mamona é bastante conhecida. Um dos principais componentes tóxicos é a ricinina (Figura 1), um alcalóide tóxico que possui fórmula molecular $C_8H_8 N_2O_2$, com nome químico 3-ciano-4-metoxi-N-metil-2-piridona (Leite e colaboradores, 2005).

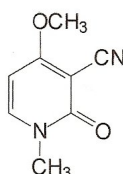


Figura 1: Fórmula estrutural da ricinina

Possui massa molecular de 164, 16, toxicidade (LD_{50}) 19-20 mg Kg^{-1} para ratos. Os sintomas de envenenamento por ricinina são semelhantes aos da ricina, que são: vômitos, dores abdominais fortes, sede extrema, diarreia com sangramento, aceleração do batimento cardíaco, convulsões e morte (Leite e colaboradores, 2005).

A ricinina é pouco afetada pelos tratamentos térmicos com vapor, passando assim para as tortas residuais. Encontra-se nas bagas em quantidades relativamente pequenas cerca de 0,3% (Leite e colaboradores, 2005).

Possui temperatura de fusão entre 200 e 201°C e uma temperatura de sublimação de 152°C. O tratamento da torta com calor a vapor não elimina a ricinina eficientemente, já o tratamento com a amônia elimina cerca de 25% da ricinina, mas possui como desvantagem a formação de produtos de degradação cuja toxidez não foi ainda avaliada (Leite e colaboradores, 2005).

Atualmente, há um grande potencial para o uso industrial do óleo de rícino na produção de biodiesel, portanto tornam-se imprescindíveis trabalhos que objetivem agregar valor ao resíduo gerado. Porém, estes procedimentos necessitam de análises periódicas de seus extratos para comprovar a retirada das toxinas da torta. (<http://www.biodieselbr.com/plantas/mamona/ricinina.htm>).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A literatura apresenta um gama de artigos com métodos desenvolvidos para análise do composto em estudo, contudo a maioria destes não apresenta dados suficientemente exatos e precisos quando se pretende garantir que não há risco de morte ao examinarmos águas ou alimentos, ou ainda, rações animais (Narang, *et al.*, 1997; Dill, *et al.*, 2004; Na, *et al.*, 2004; Wadkins, *et al.*, 1998; Woo, *et al.*, 1998; Xinglong, *et al.*, 2001).

Sendo assim, diversos outros métodos têm sido propostos, baseados nas mais diferentes técnicas analíticas. Destes, os métodos cromatográficos apresentam-se como de excelente resolução, separando de forma satisfatória os compostos de interesse daqueles co-extraídos, além de apresentarem excelente precisão e exatidão (Hines, *et al.*, 2004; Ishiguro, *et al.*, 1976; Despeyroux, *et al.*, 20

análise da ricinina, métodos por cromatografia gasosa (CG) são adequados por apresentar bons resultados. Na cromatografia líquida, o composto pode ser quantificado sem procedimentos muito laboriosos. Entretanto, a literatura, de modo geral, não apresenta informações com relação aos limites de detecção e quantificação, dificultando uma análise que deve considerar estes parâmetros (Brito, 2005).

A Tabela 1 apresenta o princípio ativo, o método utilizado, as condições de análise e referências de pesquisas sobre o composto em estudo, apresentando informações norteadoras para o desenvolvimento do presente trabalho.

TABELA 1: Relação de vários métodos para análise do composto em estudo.

REFERÊNCIAS	PRINCÍPIO ATIVO	MÉTODO UTILIZADO	CONDIÇÕES DE ANÁLISE
MELCHERT e PABEL, 2004	Ricinina	GC-EM	Fluxo: 30cm ³ /s ; Coluna: 30mx0,25mm; d.f:0,25µm
LEITE et. al., 2005	Ricinina	Cromatografia em Contracorrente	Fluxo: 1,5ml/min a 3ml/min ; Coluna: C18; Fase-móvel: CH ₂ Cl ₂ / MeOH/H ₂ O(93:35:72 v/v/v)
HINES, H. B. et.al. (2004)	Ricinina e Ricina	HPLC-MS	Coluna: C18; Fase-móvel:(70:30) ACN:H ₂ O; (10:90) MeOH: H ₂ O; Limite de detecção: 0,02 µM.

De acordo com a tabela 1, verificou-se que Melchert e Pabel (2004) utilizaram para a identificação e quantificação de tricotecnos e algumas micotoxinas a Cromatografia a Gás com detecção por espectrofotometria de massas (GC-EM) e interface de impactos elétricos (electrospray), como método para determinação da ricinina na torta de mamona sob as seguintes condições de análise: (Sílica fundida com uma coluna Restek 5 cm como coluna de guarda, 30mx0, 25 mm, d.f:0,25µm). Este método pode também ser usado para determinar independentemente a ricinina como marcador biológico e a ricina em ataques terroristas. Já, Leite et. al.(2005), utilizaram a cromatografia em contracorrente para o isolamento do alcalóide ricinina das folhas *Ricinus communis*. Esta técnica é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido sem utilização de adsorvente. Consiste na utilização de duas fases líquidas imiscíveis, onde uma é a fase móvel e a outra, a fase estacionária. O isolamento de ricinina a partir do extrato diclorometânico das folhas de *R. communis* foi realizado através de cromatografia contracorrente de gotas (DCCC), cromatografia contracorrente locular rotacional (RLCC) e cromatografia contracorrente de alta velocidade (HSCCC). Para cada análise foi utilizado 1,5g do extrato bruto. As mostras dissolvidas na fase móvel e injetadas de acordo com a capacidade do injetor de cada equipamento. O sistema de solvente utilizado nas três técnicas foi CH₂Cl₂: MeOH:H₂O (93:35:72; v:v:v), tendo-se a fase inferior como móvel e fase superior como estacionária e o fluxo variando de 1,5ml/min à 3ml/min.

Hines e colaboradores (2004), em seu experimento utilizou um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) ou HPLC com uma coluna C18 para a detecção seletiva através de testes com adenina. As amostras foram injetadas a cada 2 minutos e a coluna foi removida a cada 10 injeções para a remoção das substâncias retidas. Utilizou-se como fase móvel metanol : água (10:90,v :v) e acetonitrila :água (70 :30,v :v).

Como pôde observar esta toxina, ricinina, têm sido amplamente estudada por pesquisadores em todo o mundo. Várias técnicas analíticas são utilizadas para este fim, técnicas estas caras e de difícil acesso para alguns laboratórios de pesquisa. Deve-se então buscar a utilização de técnicas mais baratas que sejam acessíveis a empresas e laboratórios de pesquisa no Brasil. Assim como devem ser desenvolvidos métodos rápidos, eficientes e mais baratos para a identificação e quantificação destes compostos, pois o Brasil com o projeto de implantação do *Biodiesel* terá uma grande quantidade de torta de mamona gerada pelas indústrias de beneficiamento e os trabalhadores, ou mesmo a comunidade próxima destas áreas, podem ser contaminados por esta toxina.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Isolamento e Purificação da Ricinina

Frutos de *Ricinus communis* (mamona) foram coletados e posteriormente secos na estufa a 40°C por 24 horas. Removeu-se o pericarpo, triturou-se, pesou-se 15 gramas e dela extraiu-se o óleo com éter etílico a frio por 24 horas. Filtrou-se este extrato descartando-se o filtrado. Ao material sólido adicionou-se 30 mL de etanol à frio por 24 horas, após este tempo procedeu-se a evaporação do etanol em evaporador rotatório para a concentração do extrato. Deixou-se em repouso a 4 °C por 24 horas removeu-se os cristais obtidos por filtração e promoveu-se a recristalização

solvente, todo este experimento está ilustrado no fluxograma abaixo. Secaram-se os cristais e realizaram-se os testes para confirmação da identidade e pureza do composto, processo apresentado na figura 2 (Ferraz, et al., 1999). Estes testes utilizando diferentes técnicas analíticas como: Ultravioleta-Visível (UV-Vis); Infravermelho (IV); Ressonância Magnética Nuclear de próton (RMN- H^1); Cromatografia Gasosa (CG) acoplada a detector de espectrofotometria de massa (CG-EM) foram realizados na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), para onde foi enviado o composto obtido da extração das sementes de mamona para análise.

3.2 Solventes, Reagentes, Soluções e Equipamentos

Foram utilizados os seguintes solventes e reagentes para o isolamento da ricinina das sementes de mamona: Éter de petróleo P. A., Quimex; Álcool Etílico P. A., Proquímicos; solvente deuterado diclorometano ($CDCl_3$) da Acros; Hexano e Metanol da Mallinkrodt (grau cromatográfico, HPLC); Acetato de etila P. A., Proquímicos e Silica gel 60G. Os equipamentos foram: Cromatógrafo líquido, SHIMADZU, Modelo LC 20AT, injetor Rheodine de 20 mL, acoplado ao detector SPD 20, coluna C 18 de 15 cm x 4,6 mm ID x 5 μ m; Evaporador Rotatório Janke & Kunkel modelo IKA-WERK 7813 Staufen, cedido pelo Laboratório de Produtos Naturais da UFMA, que foi utilizado para fazer evaporação após a extração líquido-líquido; Agitador Magnético, Biomixer, utilizado para acelerar o processo de agitação; Balança Analítica Mettler, H20T com 4 dígitos após a vírgula.

4 METODOLOGIA

4.1 Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de infravermelho foram obtidos utilizando-se pastilhas de KBr, as quais foram obtidas após dispersão do composto sólido extraído das sementes de mamona (ricinina) em quantidades adequadas deste sal, seguida compressão em prensa hidráulica, submetendo-se à leitura em Espectrofotômetro FTIR BOMEM MB-102.

4.2 Ressonância Magnética Nuclear de Próton (RMN- H^1)

Os espectros obtidos na utilização desta técnica por meio da solubilização do composto extraído das sementes da mamona (ricinina) em solvente deuterado (diclorometano, $CDCl_3$), submetendo-se à leitura em Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear Brüker ARX 200MHz (4,7 Tesla) utilizando tetrametilsilano como referência.

4.3 Cromatografia Gasosa acoplada a detector por Espectrometria de Massas (CG-EM)

O sistema cromatográfica empregado para a análise e obtenção do fragmentograma do composto extraído das sementes de mamona (ricinina) foi um CG-MS 5970, com coluna HP-1 (50m x 0,22mm D.I x 0,33 μ m de filme) acoplado a um detector de massas de baixa resolução. Foi empregada programação de temperatura em que a análise iniciava-se com 80 °C mantidos por 2 min, com taxa de variação de 5 °C/min até 300 °C, mantidos nesta temperatura por 25 min. O detector e o injetor permaneceram durante toda a análise com temperatura de 300 °C. O composto extraído das sementes (ricinina) foi diluído em etanol para a obtenção de uma solução de concentração de cerca de 10 mg L^{-1} e foram injetados cerca de 5 μ L desta solução para a realização da análise.

4.4 Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Para análise da ricinina em Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC), primeiramente utilizou-se o clorofórmio para dissolver os cristais e a ativação da estufa a uma temperatura de 100°C durante 1 hora, para retirada de umidade, uma vez que esta interfere nos resultados. Em seguida, aplicou-se a amostra na placa, preparou-se uma mistura de solventes Hexano/Acetato de etila na proporção 70: 30 (V: V) e colocou-se a placa em uma cuba (recipiente tampado) para que eluisse até a marca indicada, depois tirou-se e deixou secar por alguns minutos. Logo após, colocou-se a placa em outra cuba contendo iodo, a qual tem por objetivo queimar toda a sílica, cerca de um dia, para revelar as substâncias ali contidas. Por fim, para revelar se houve a presença de ricinina, utilizou-se a solução de Mayer (revelador), solução esta própria para a determinação de alcalóides, como o composto em estudo. Esta solução é composta por Iodeto de Potássio (50g) e Cloreto de Mercúrio (13,55g) em água.

4.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector por Espectrometria de Absorção Molecular (CLAE-EM)

O sistema cromatográfico empregado para a análise e obtenção do cromatograma do composto extraído das sementes de mamona (ricinina) foi um HPLC-UV, com coluna C18 de 15 cm x 4,6 mm ID x 5 μ m, fase móvel Água-Acetonitrila (H₂O:ACN) na proporção (90:10,v:v) por um tempo determinado de 15 min e fluxo de 0,8mL/min. Realizou-se a preparação da solução estoque feita a partir do padrão. A solução foi preparada da seguinte maneira: Pesou-se 0,0011g do composto (ricinina), diluiu-se em 10 mL de Metanol. Resultando em uma solução de concentração 0,11 g.L⁻¹. Em seguida, para a obtenção da curva analítica, foram preparadas a partir da solução estoque (ricinina) seis soluções de concentrações diferentes: 2,0 mg L⁻¹; 3,0 mg L⁻¹; 5,0 mg L⁻¹; 7,0 mg L⁻¹; 9,0 mg L⁻¹; 10,0 mg L⁻¹.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Infravermelho

O espectro do infravermelho, apresentado na Figura 2, apresenta uma banda intensa de deformação axial (C≡N) em 2220 cm⁻¹ atribuída ao grupamento nitrila, uma banda de deformação axial (C=O) em 1640 cm⁻¹ atribuída à carbonila e outra em 1600 cm⁻¹ atribuída a ligação (C = C) de aromáticos. As bandas entre 2800 e 3000 cm⁻¹ foram atribuídas aos constituintes do óleo de mamona que permanecem em pequenas concentrações na torta (FERRAZ,1999).

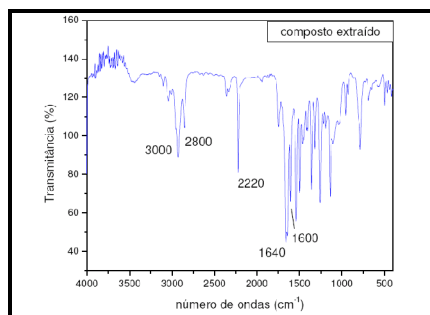


FIGURA 2: Espectro de Infravermelho resultados obtidos para o composto extraído da torta de mamona

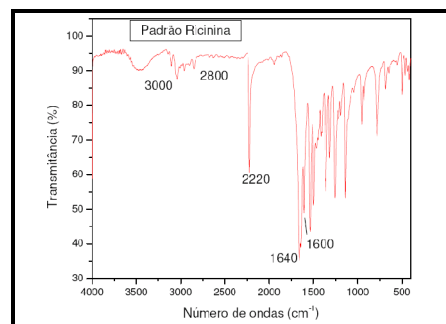


FIGURA 3: Espectro de Infravermelho, resultados obtidos para o padrão de ricinina.

Estes resultados foram semelhantes ao obtido quando analisado o padrão do composto apresentado na figura 3, confirmando assim sua identidade. A fim de caracterizar e confirmar a identidade do composto extraído realizou-se análise por RMN.

5.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para o espectro de RMN-H¹ (CDCl₃, 200 MHz) da ricinina, como apresentado na Figura 4, observaram-se sinais em 7,55 δ (d, H¹, J = 7,7 Hz) e 6,08 δ (d, H¹, J = 7,7 Hz) indicando a presença de dois hidrogênios aromáticos acoplados entre si em relação vicinal, ligados a carbonos sp² (prótons H-6 e H-5 respectivamente). Observaram-se também dois sinais de singletos nas regiões de 4,00 δ , três hidrogênios de metoxila ligada a anel aromático, e 3,55 δ , três hidrogênios referentes a uma metila ligada ao átomo de nitrogênio (DEGROOTE, 1994). Alguns picos (entre 0,8 e 2,5 δ) foram identificados como óleos que foram co-extraídos, uma vez que a torta possui ainda um percentual residual de óleo. Assim, procedeu-se uma purificação deste extrato por cromatografia de camada delgada (CCD) para remover este residual de óleo.

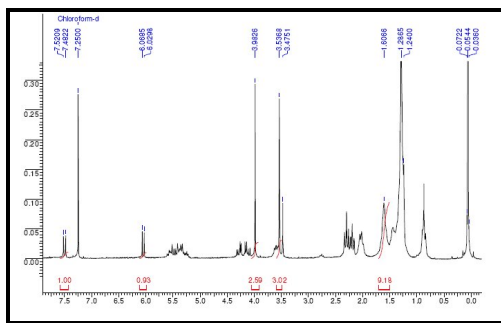


FIGURA 4: Espectro RMN¹ do composto extraído das sementes de mamona (ricinina) (CDCl₃, 200 MHz).

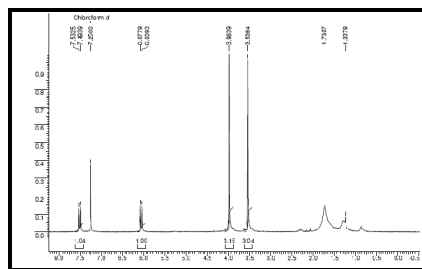


FIGURA 5: Espectro RMN¹ do composto extraído das sementes de mamona (ricinina) (CDCl₃, 200 MHz), obtido após purificação por Cromatografia de Camada Delgada (CCD).

O espectro resultante deste processo, apresentado na Figura 5, confirmou os resultados obtidos no espectro anterior e percebe-se que os picos atribuídos ao resíduo de óleo tiveram sua intensidade reduzida, entre 0,8 e 2,5 δ e outros desapareceram, entre 5,0 e 5,75 δ confirmando que se tratava de compostos co-eluídos provenientes da torta de mamona.

5.3 Cromatografia Gasosa (CG)

A análise do composto extraído das sementes de mamona também foi efetuada utilizando-se cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (Figura 6) e detector de espectrometria de massas (Figura 7). Na Figura 6, observa-se que foi possível obter um composto com pureza em torno de 96%, calculada pela área relativa do pico. Na Figura 7, observa-se o fragmentograma do pico de interesse característico composto isolado das sementes de mamona (ricinina).

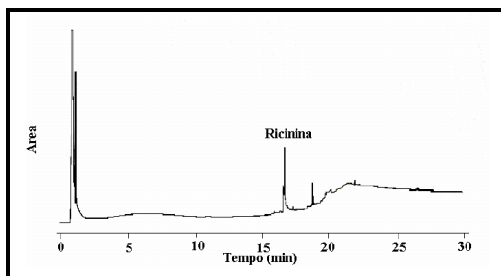


FIGURA 6: Cromatograma obtido por CG-DIC do alcalóide ricinina obtido no laboratório

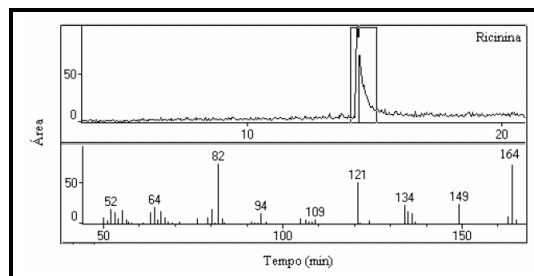


FIGURA 7: Cromatograma e fragmentograma do composto isolado das sementes de mamona (ricinina) obtido no laboratório.

Na análise do fragmentograma obtido pode-se perceber um pico de alta intensidade com massa igual a 164,0u coincidente com a massa molecular do alcalóide ricinina, além de outros picos provenientes da quebra da molécula em questão que são iguais ao fragmentograma da ricinina o que nos mostra que o composto isolado das sementes de mamona se refere a ricinina.

5.4 Cromatografia de Camada Delgada Comparativa (CCDC)

Obteve-se um Cromatograma em Camada Delgada Comparativa (CCDC) do extrato proveniente da extração líquido-líquido com sistema de solventes Hexano:Diclorometano (Hex:DCM) (1:1, v:v), utilizando o sistema de soventes Hexano:Acetato de Etila (70:30, v:v) como fase móvel e Sílica gel 60G como fase estacionária, obtendo-se o seguinte resultado de acordo com a placa abaixo, figuras 9 e 10.



- Eluente: Hexano: Acetato de Etila (70:30, V:V);
- Revelador: Iodo

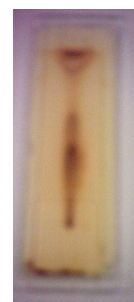


FIGURA 8: Placa Cromatográfica do extrato proveniente da extração líquido-líquido utilizando o sistema de solventes Hex/DCM (1:1, V:V)

FIGURA 9: Placa Cromatográfica do extrato proveniente da extração líquido-líquido utilizando o sistema de solventes Hex/DCM (1:1, V:V)

De acordo com a figura 8, a análise para amostra (Ricinina) por CCDC não obteve bons resultados, uma vez que, o revelador (Iodo) não reagiu com as substâncias na amostra, tal resultado pode ser devido a solução esta degradada ou o substrato não conter a substância de interesse. Entretanto, em decorrência desses fatores fez-se novamente todo o procedimento obtendo-se desta vez êxito no resultado (figura 9).

5.5 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência(CLAE) Acoplada a Detector de Espectrofotometria de Absorção Molecular na região do UV- Vis

Os resultados encontrados com as diferentes técnicas confirmaram a identidade do composto passando, então, a ser utilizado como padrão para o desenvolvimento do método de análise para ricinina utilizando o CLAE acoplado a um detector de UV-VIS. Para otimização da fase móvel testou-se diferentes composições e proporções para Água:Metanol, H₂O:MeOH, (60:40, 70:30, 80:20, 90:10) e Água-Acetonitrila, H₂O:ACN, (60:40, 70:30, 80:20, e 90:10). Destas fases a que apresentou melhor resolução e menor tempo de análise foi H₂O:ACN 90:10 apresentando tempo de retenção para o composto em estudo em torno de 7,5 min, o que garantiu a separação do composto de interesse presente na amostra, como mostrado nos cromatogramas apresentados nas figuras 10 e 11. Testou -se também o fluxo da fase móvel, utilizando 0,8 mL/min e 1,0 mL min⁻¹, nesse caso, obteve -se bons resultados para ambos os fluxos mostrando que de acordo com o interesse da análise pode-se usar qualquer um deles.

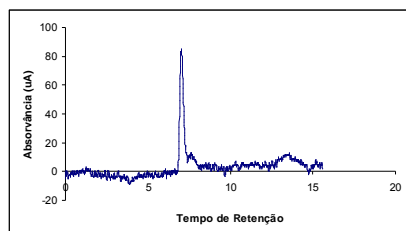


FIGURA 10: Cromatograma obtido com comprimento de onda 315nm. Volume de injeção de 20 µL, fluxo 0,8mL/min. Fase móvel 80:20 H₂O : MeOH (V:V).

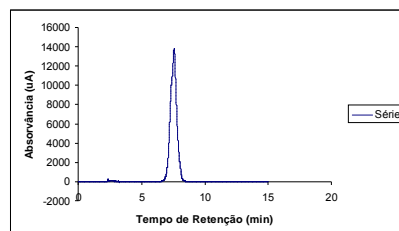


FIGURA 11: Cromatograma obtido com comprimento de onda 315nm. Volume de injeção de 20 µL, fluxo 0,8mL/min. Fase móvel 90:10 H₂O : ACN (V:V).

Após otimização dos parâmetros, construiu-se as curvas analíticas para tal princípio ativo, obtida pela diluição de 0,0011g de ricinina em 10mL de metanol, resultando em uma concentração de 0,11 g.L⁻¹ e a partir desta preparou-se e injetou-se soluções de diferentes concentrações: 2,0 mg L⁻¹; 3,0 mg L⁻¹; 5,0 mg L⁻¹; 7,0 mg L⁻¹; 9,0 mg L⁻¹; 10,0 mg L⁻¹.

Obteve-se um coeficiente de correlação de 0,9985 para o fluxo de 0,8 mL/min e de 0,9989 para o fluxo de 1,0 mL/min, mostrando a linearidade da resposta do composto em estudo (figuras 12 e 13). O limite de Detecção do método foi em torno de 0,1 mg L⁻¹ e o de quantificação em torno de 2,0 mg L⁻¹. Tais valores foram obtidos considerando para o limite de detecção três vezes o desvio padrão do branco (3 x s / S) onde “s” é o desvio padrão da resposta e “S” é o coeficiente angular do gráfico de calibração e o de quantificação dez vezes o desvio padrão do branco (10 x s / S). Provando-se que o método utilizado é eficiente e rápido para análise do alcalóide ricinina.

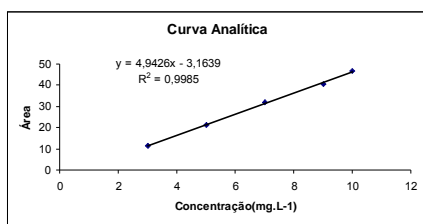


Figura 12: Curva de calibração para ricinina obtida a partir de soluções padrão em metanol; volume de injeção 20 µL; coluna C₁₈ (25 cm); eluição isocrática com água:acetonitrila (90:10) a 0,8 ml min⁻¹; detecção em 315 nm.

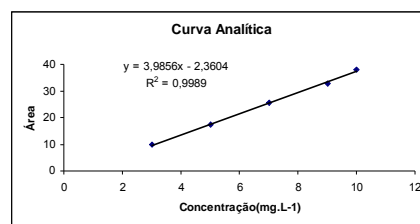


Figura 13: Curva de calibração para ricinina obtida a partir de soluções padrão em metanol; volume de injeção 20 µL; coluna C₁₈ (25 cm); eluição isocrática com água:acetonitrila (90:10, v:v) a 1,0 ml min⁻¹; detecção em 315 nm.

Conforme as figuras 12 e 13, os intervalos de concentração para as soluções de trabalho foram suficientemente lineares ($R^2 = 0,9985$ para o fluxo de 0,8 mL/min e $R^2 = 0,9989$ para o fluxo de 1,0 mL/min) indicando correlação fortíssima na reta obtida. Pois, sabe-se que os métodos desenvolvidos na química analítica buscam obter uma relação linear entre um sinal analítico y e uma quantidade ou concentração x, isto é, buscam a linearidade que se trata da capacidade que um método possui em obter sinais analíticos que sejam diretamente proporcionais à concentração ou quantidade do analito na amostra. Após a otimização do método de análise, o qual estabeleceu-se as melhores condições para determinação de ricinina, realizou-se experimentos para determinação da extração do princípio ativo oriundas da torta e do farelo de mamona decorrentes do processo de desintoxicação das mesmas. A figura 14 mostra as soluções obtidas a partir dessas extrações.

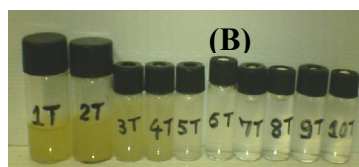
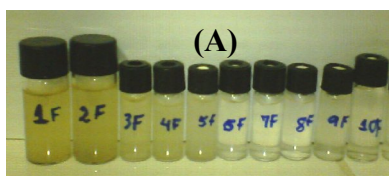
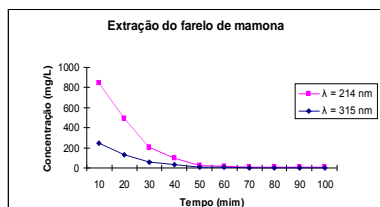


Figura 14: Amostras da filtração do farelo de mamona (A) e da torta de mamona (B).

De acordo com a figura 14, foram coletadas alíquotas cerca de 10 mL a cada 10 min de extração observando-se o decaimento da concentração de ricinina das amostras, sendo também visualizados nos gráficos (figura 15C e 15D).

(C)



(D)

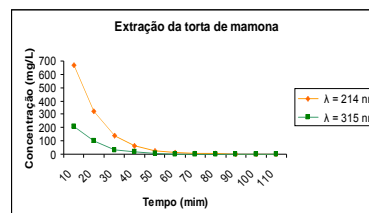


Figura 15: Extração de ricinina do farelo de mamona (C) e da torta de mamona (D), utilizando o método CLAE, 20 µL de injeção em dois comprimentos de onda ($\lambda=214$ nm e $\lambda=315$ nm).

Comparando-se o método aplicado para análise do alcalóide estudados com os descritos na literatura, verifica-se que os cromatogramas da primeira e última extração das amostras provenientes da torta da mamona, confirmam que o presente método foi satisfatório para análise, uma vez que, foi detectado a presença do composto em estudo nos mesmos parâmetros de trabalho utilizados para o padrão, ricinina, conforme as figuras 16 e 17.

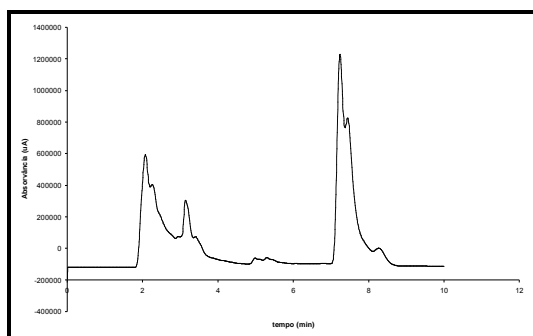


Figura 16: Cromatograma obtido a partir da primeira extração da torta de mamona com injeção de 20 μ L; coluna C_{18} (25 cm); eluição isocrática; fase móvel água:acetonitrila (90:10) a 0,8 ml min^{-1} e comprimento de onda 315 nm,

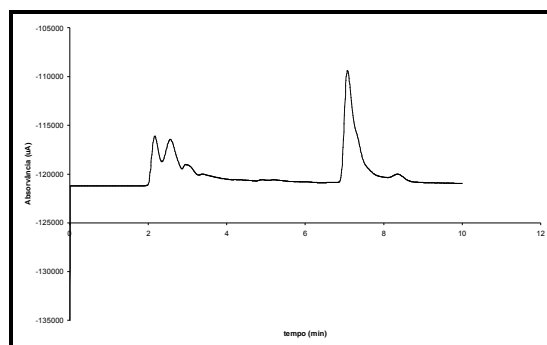


Figura 17: Cromatograma obtido a partir da última extração da torta de mamona com injeção de 20 μ L; coluna C_{18} (25 cm); eluição isocrática; fase móvel água:acetonitrila (90:10) a 0,8 ml min^{-1} e comprimento de onda 315 nm.

Como visto nos cromatogramas obtidos, ambos mostram o pico de interesse em estudo referente ao intervalo 6 a 8, satisfazendo o método aplicado. Além disso o cromatograma mostra também a presença de outros compostos detectados pelo CLAE, já que a amostra não passou por um processo de caracterização.

6 CONCLUSÃO

Por meio da análise de todos os resultados das técnicas utilizadas, determinou-se a identidade do composto extraído, tratando-se do alcalóide ricinina, o qual foi utilizado como padrão no desenvolvimento do método analítico utilizando a técnica cromatográfica para a identificação e quantificação deste composto em diversos tipos de amostras, mostrando-se um método rápido e eficiente para análises de ricinina.

Enfim, com esta técnica foi possível obter a curva analítica do composto analisado, visto que não foi observado a presença de outros compostos, mas somente o de estudo, já que em relação aos resultados anteriores do relatório parcial houve variações no valor das áreas, ou seja, dos picos referentes ao da ricinina. Portanto, observou-se que o melhor comprimento de onda para o composto em análise é o de 315 nm e a melhor fase móvel em estudo é a 90:10 $\text{H}_2\text{O} : \text{ACN}$ (V:V) como mostrado nos cromatogramas apresentados no presente relatório. Este método mostrou-se eficiente para análise de ricinina em amostras contaminadas com o princípio ativo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BRITO, N. M. **Desintoxicação da torta de mamona para produção de ração animal**. [tese de doutorado em Química Analítica]. São Carlos: IQSC, USP, 2005.

HINES, H. B.; BRUEGGEMANN, E. E.; HALE, M. L. High-performance liquid chromatography-mass selective detection assay for adenine released from a synthetic RNA substrate by ricin A chain. **Anal. Biochemistry**, v.330, p.119-122,2004.

SILVA, N. M. **Estudo preliminar do emprego de torta de mamona associada à adubação mineral do algodoeiro**. Campinas:Instituto Agronômico de Campinas, 1971. 8p.

LEITE, A. C.; FERNANDES, J. B.; CABRA, E. C.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M F. das G. F. Isolamento do alcalóide ricinina das folhas de *ricinus communis* através de cromatografias em contracorrente. **Química Nova**, Brasil, v. 00, p. prelo-prelo, 2005.

DESPEYROUX, D.; WALKER, N.; PEARCE, M.; FISHER, M. ; McDONNELL, M.; BAILEY, S. C.; GRIFFITHS, G. D.; WATTS,P. Characterization of ricin heterogeneity by electrospray mass spectrometry, capillary electrophoresis, and resonant mirror. **Analytical Biochemistry**, v. 279, p. 23-36. 2000.

DARBY, S.M.; MILLER, M. L.; ALLEN, R.O. Forensic determination of ricin and the alkaloid marked ricinine from castor bean extracts. **Journal of Forensic Sciences**. P. 1033-1042. 2001.

DILL, K.; MONTGOMERY, D.D.; GHINDILIS, A. L.; SCHWARZKOPF, K.R.; RAGSDALE, S.R.; OLEINIKOV, A. V. Immunoassays based on electrochemical detection using microelectrode arrays, **Biosensors and bioelectronics**, article in press, 2004.

ISHIGURO, M.; TOMI, M.; FUNATSU, G.; FUNATSU, M. Isolation and chemical properties of a ricin variant from castor bean. **Toxicon**, v. 14, p. 157-165, 1976.

NARANG, U.; ANDERSON, G. P.; LIGLER, F.S.; BURANS, J. Fiber optic-based biosensor for ricin. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 12, n. 9-10, p. 937-945. 1997.

NA, D. H.; CHO, C. K.; YOUN, S. Y.; CHOI, Y.; LEE, K. R.; YOO, S. D.; LEE K.C. (2004). Capillary electrophoresis to characterize ricin and its subunits with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **Toxicon**, v. 43, p. 329-335.

XINGLONG, Y.; LEQUIN, Z.; HONG, J.; HAOJUAN, W.; CHUNYONG, Y.; SHENGGENG, Z. Immunosensor based on optical heterodyne phase detection. **Sensor and Actuators B**, v. 76, p. 199-202, 2000.

WOO, B. H.; LEE, J.T.; LEE, K.C. Purification of Sepharose-Unbinding Ricin from Castor Beans (*Ricinus Communis*) by Hydroxyapatite Chromatography. **Protein Expression and Purification**, v. 13, p. 150-154, 1998.