



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA  
LABORATÓRIO DE FITOQUÍMICA

# Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais

(Edição Revisada)

Wagner Luiz Ramos Barbosa  
Colaboradores:  
Etienne Quignard  
Isabel Cecília de Castro Tavares  
Lucianna do Nascimento Pinto  
Franciella Queiroz de Oliveira  
Rodson Martins de Oliveira

**Belém - PA  
2001**

## **INTRODUÇÃO**

### **Brevíssimo histórico da Fitoterapia**

Desde épocas imemoriais os seres humanos utilizam-se dos recursos naturais para a sua sobrevivência. Os vegetais são, ainda nos dias atuais, usados na construção de casas, no fabrico de vestimentas e na saciedade da fome.

Na época pré-colombiana, antes da invasão e subjugo do continente americano pelas monarquias ibéricas, as sociedades que aqui viviam, construía suas casas, em harmonia com o clima da região que habitavam, usando folhas e troncos de árvores, as quais também lhes forneciam seu meio de transporte. Sobre alimentação não é necessário falar, a não ser para inferir que, pelo fato de terem uma “dieta” bastante rica e variada, já faziam uso medicinal dos vegetais. Os doentes eram tratados pelos chamans, pelos pajés, pelos curandeiros, estes sim, donos da arte e da ciência da cura, que associam o conhecimento da flora curativa com a capacidade de comunicarem-se diretamente com seus deuses e com os elementos da natureza, agindo assim em duas frentes contra a doença e a favor do paciente.

Com a sistematização da pilhagem dos recursos naturais, a chamada colonização, os europeus e quase extinguíram alguns produtos como o ouro e prata nos países andinos e o pau-brasil aqui, e quase aniquilaram esta fonte de conhecimento, que são os pajés, isso porque o invasor por pouco conseguiu transformar o indígena em mais uma espécie extinta. Nos séculos que se seguiram, no Brasil, a Medicina e a Farmácia acompanharam os moldes europeus utilizando o acervo curativo e as técnicas importadas. Entretanto, na cozinha, o processo era bem mais dinâmico e variado. Acrescida dos conhecimentos trazidos pelos negros, contrabandeados e vilipendiados numa situação degradante e “abençoada” de escravos, a farmacopéia nativa, que já misturava a flora indígena e européia, enriqueceu-se com as espécies trazidas da África. Com isso muitas formulações passaram a incluir espécies vegetais que cresciam originalmente em diferentes continentes.

Com o aparecimento das sulfas, dos antibióticos e com o incremento da síntese orgânica, começou a pressão dos produtos sintéticos sobre os de origem natural. Sem dúvida este avanço trouxe alguma melhoria na qualidade de vida das pessoas, mas o que as indústrias não contavam era que uma catástrofe estava em gestação nos seus laboratórios. Uma substância milagrosa que agia sem causar reações adversas, o ideal dos produtos sem efeitos colaterais graves: a talidomida.

E deu no que deu.

Utilizada por gestantes, a substância apresentou um efeito teratogênico que fez com que milhares de bebês nascessem sem braços ou com membros deformados. Isso custou, até hoje, muito caro para alguns países que tiveram que investir altas somas para integrar esses deficientes às suas sociedades. A isso some-se o movimento *hippie* que, na mesma época, contestava a ganância dos capitalistas, o materialismo da sociedade e o reacionarismo da igreja, propondo uma volta aos valores mais elevados da vida, com mais liberdade, mais amor e com alguns outros ingredientes que não devem ser mencionados aqui, mas que são também de origem vegetal!

Assim como o capitalismo e o socialismo, a industrialização também mostrou o seu lado mau. As soluções revolucionárias e definitivas como a energia nuclear, o neoliberalismo, a quimioterapia, entre outras, já criaram uma gama muito vasta de problemas, para serem hoje aceitas sem críticas; por isso essa tentativa de se sair em busca de novos caminhos para as várias crises que enfrentamos, ainda.

Com a realização da Conferência Mundial sobre Meio Ambiente em 1992 no Rio de Janeiro pôde-se trazer de volta ao debate a questão de preservação da biodiversidade. Novas estratégias foram lançadas para, a médio prazo, poder-se alcançar níveis de qualidade no

meio ambiente, que possam adiar o dia do “juízo final”, ou seja, postergar o caos ambiental. Paralelamente, pretendeu-se incentivar o desenvolvimento das nações mais pobres do planeta. Entretanto, nada disso terá uma mínima chance de ocorrer se as regras do jogo continuarem as mesmas. Nenhum país industrializado aceitará abrir mão de seu *status quo* em benefício de um mais pobre. Da mesma forma, nenhum governo neoliberal do chamado terceiro mundo terá força, ou mesmo interesse, para defender os legítimos direitos de sua população.

Mas há uma saída! A educação, quando dirigida aos menos favorecidos, quando alia formação e informação; a educação é uma arma mais forte do que a guerrilha ou uma nova constituição. Por isso é de capital importância sabermos trabalhar e explorar nossas potencialidades, defender nossa riqueza ambiental, cultural, e principalmente aquela que está dentro das pessoas. Por meio da educação devemos fazer florescer essa riqueza interior dos estudantes, pois eles é que vão definir o rumo que o futuro irá tomar.

E nesse futuro, no que diz respeito às mais diferentes terapias que andam *en vogue* neste final de século, está incluída a fitoterapia, não mais aquela empírica dos tempos da Pharmácia, ou aquela que proclama que “o que é natural não tem contra-indicação”.

Com a utilização consciente e crítica dos recursos naturais, escolhendo bem os parceiros e as formas de com eles interagir, pode-se contribuir para reduzir o sofrimento de um doente, o atraso de uma sociedade ou até mesmo a pobreza de um país.

O uso de plantas no tratamento de males do corpo e do espírito continua sendo objeto da curiosidade leiga e científica.

Wagner Luiz Ramos Barbosa  
Rio de Janeiro, dezembro de 1992.

## **ASPECTOS EXPERIMENTAIS DA FITOQUÍMICA**

### **Importância da identificação do material vegetal**

Escolher o material vegetal a ser estudado é, a princípio, uma tarefa ingrata, se considerarmos que, apesar da destruição sistemática e insensata das florestas tropicais, ainda existem milhares de diferentes espécies vegetais. Para orientação da escolha existem a literatura especializada e as farmacopéias humanas, ou seja, os muitos homens e mulheres que acumularam conhecimento empírico sobre medicina tradicional.

**Essas pessoas sabem que planta cura que mal!**

Baseando-se na informação dessas pessoas ou dos botânicos, dos farmacólogos, e de um número crescente de farmacêuticos que fazem o trabalho de campo, pode-se determinar que planta será investigada, geralmente segundo seu nome popular. A classificação taxonômica, a qual ocorre, quase sempre, com o concurso de um especialista, é a determinação de um táxon como idêntico ou semelhante a uma descrição já existente, por comparação do material-problema com exsicatas dispostas em herbários ou com monografias especializadas, levando a obtenção da denominação científica do material.

A análise de um indivíduo com fins de sua identificação baseia-se na prospeção, no indivíduo em análise, de características comuns a uma família, ficando as diferenças restritas a certos limites. Observando-se a anatomia, macro e microscópica, e a constituição química deste indivíduo pode-se chegar a uma identificação positiva da espécie a que ele pertence.

A identificação segura do vegetal empregado no preparo de fitoterápicos garante o efeito terapêutico pretendido, pois este está relacionado com as propriedades farmacodinâmicas da droga indicada, característica de uma determinada espécie. No caso de uma identificação positiva, também o grau de pureza da droga deve ser controlado, avaliando-se não só os princípios ativos como também as possíveis adulterações, falsificações e impurezas. Tais anomalias, apesar de freqüentes, não devem ser encaradas como acontecimentos triviais, pois podem acarretar conseqüências altamente danosas, até fatais, para os usuários do produto.

No âmbito de pesquisa em fitoquímica, a identificação positiva e segura da planta medicinal sob investigação garante a padronização dos métodos e a reprodutibilidade dos resultados, os quais podem vir a ter aplicação prática.

Deve-se, ainda, atentar para o fato curioso de que uma mesma espécie botânica pode possuir diferentes nomes populares ou, ao contrário, diferentes espécies botânicas com um mesmo nome não - sistemático, segundo a região ou população que as usa. Este fato só faz aumentar a importância de uma identificação positiva e segura da droga a ser cientificamente investigada ou farmacêuticamente utilizada.

### **Procedimentos na coleta**

Muitas pessoas encarregadas da coleta de vegetais para uso farmacêutico possuem largo conhecimento empírico sobre plantas medicinais, entretanto cabe ao especialista acompanhar a coleta do material e proceder as análises necessárias para corroborar ou não com a identificação intuitiva do coletor.

Ao coletar-se uma planta para análise botânica imediata, ou seja, quando se pode contar com especialistas próximo ao local de coleta, pode-se dispensar cuidados especiais com o preparo do espécime a ser analisado. Entretanto, deve-se coletar o material o mais completo possível, com pelo menos um ramo florido com 20 a 30 cm de altura. Ao que deve-se anexar informações sobre o local e data de coleta, nome e uso popular, o porte do vegetal,

a coloração das flores e outras informações importantes como a frequência e o tipo de vegetação associada.



Fig. 1: Material coletado com etiqueta.

Na maioria dos casos o material vegetal precisa ser remetido para outro local a fim de ser identificado e se isso demandar mais de 24 horas, faz-se necessário tomar certos cuidados. Os ramos floridos coletados devem ser distendidos e colocados entre folhas de papel absorvente - papel jornal, por exemplo - o conjunto deve ser então acondicionado entre placas de papelão para ser em seguida prensado. Também aqui, como acima, deve-se anexar informações relativas à coleta dos espécimes.

O material coletado para estudos químicos deve ser etiquetado com os dados necessários à sua identificação no laboratório, como no início deste item. As partes suculentas devem ser conservadas abaixo de 10°C ou dessecadas, após fragmentação. Cascas e lenhos podem ser secos ao tempo, reduzidos a pedaços pequenos para serem triturados em moinho mecânico, após o que são submetidos a nova secagem. O material moído deve ser acondicionado de forma a evitar-se contaminação e infestação de quaisquer tipos.

Para a herborização do material vegetal deve-se utilizar duas tábuas de 45 x 30 cm, papelão canelado e papel absorvente nas mesmas medidas. Um espécime, o mais completo possível, deve ser acondicionado entre folhas de papel absorvente, o conjunto deve ser colocado entre as folhas de papelão e por fim entre as tábuas. A prensa deve ser firmemente amarrada com cordas (figuras 2 e 3). A secagem deve acontecer em estufa a 37°C por um ou dois dias ou à temperatura ambiente, por um tempo mais longo. Material suculento necessita de mais tempo para secagem.

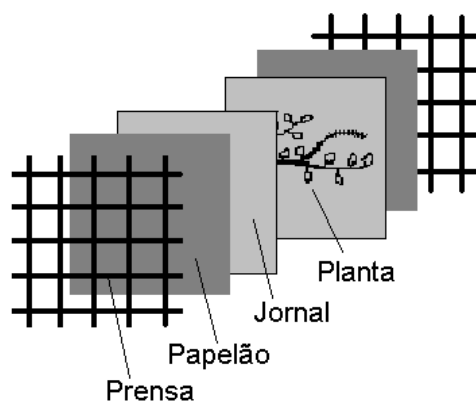


Fig. 2: Elementos necessários para a herborização de material vegetal.



Fig. 3: Conjunto amarrado.

As seguintes informações devem constar em uma etiqueta que acompanha a exsicata: Nome da Instituição, Número da Amostra e Data da Coleta; Classificação Botânica; Família, Nome Científico (espécie) e Nome Popular; Procedência, Observações, Nome do Coletor e Nome do Especialista que identificou.

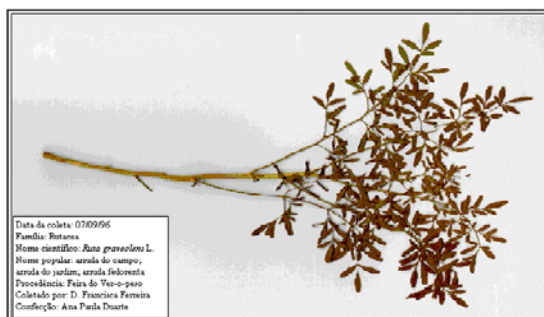


Fig. 4: Uma exsicata com etiqueta.

Parte integrante de uma identificação precisa e segura do material a ser utilizado na pesquisa fitoquímica, a determinação da época da coleta e da procedência do material pode evitar divergências na sua análise química, condicionada à sazonalidade e às condições do solo e do ar onde o vegetal cresce.

#### Preparação de extratos análise fitoquímica

Considerando-se que uma determinada espécie vegetal seja recomendada para tratar determinada sintomatologia e por esse motivo deseja-se investigá-la, o próximo passo a ser dado nessa investigação, após a caracterização botânica, é a abordagem farmacológica do material, o qual já deve ter sido botanicamente classificado. Através de dados etnofarmacológicos, que fornecem informações sobre a utilização da planta, pode-se, pois, processar a sua extração segundo a maneira tradicional e proceder-se, assim, a testes de atividade, com o concurso de um/a farmacólogo/a.

Plantas que são usadas como chás, são extraídas com água a quente e o extrato aquoso deve ser, o mais rápido possível, remetido para os testes, a fim de evitar-se o desenvolvimento de fungos ou a degradação de substâncias pela ação da água. Pode-se evitar estes contratempos conservando-se o extrato sob refrigeração por um curto período em atmosfera estéril, evaporando-o sob pressão reduzida ou procedendo-se à liofilização após congelamento, sendo este o método de escolha, quando possível.

Para obter-se o extrato seco, no caso da planta ser extraída com água, deve-se secar o em um liofilizador. Este aparelho é composto, basicamente, de uma bomba de alto vácuo e de uma câmara fria. Ele retira a água do extrato, sem aquecimento. O extrato congelado é introduzido num reservatório que é evacuado até em torno de  $10^{-3}$  cm de mercúrio, nesta

condição a água sublima, isto é, passa do estado sólido - gelo - para a fase de vapor, para ser de novo convertida em gelo na câmara fria (figuras 5 e 6).

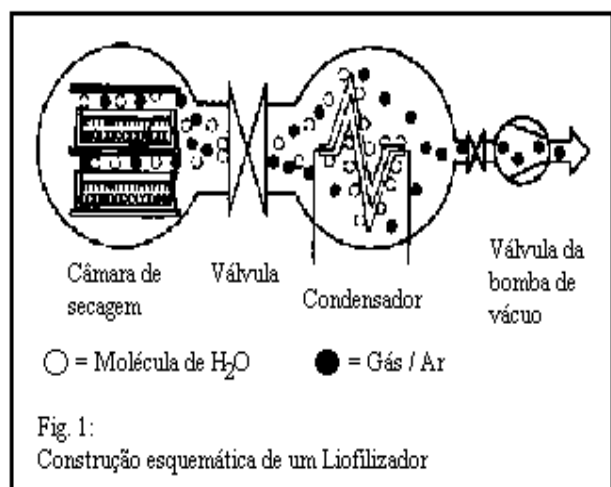


Fig. 5: Construção esquemática do equipamento.



Fig. 6: Liofilizador de bancada.

Fonte: Catálogo da Empresa AMSCO/FINN-AQUA Hürth, Alemanha

Os outros extratos, além do aquoso, devem também ser evaporados à baixa pressão até secura, evitando-se assim, a presença de resíduos de solventes orgânicos que podem mascarar a atividade intrínseca do extrato. Em geral, extratos tradicionais não aquosos desta natureza com fins terapêuticos são preparados com vinho ou aguardente, o que corresponde a um extrato hidroalcoólico entre 10% e 40%.

É também importante atentar para a preparação de extratos que apresentem uma razoável hidrossolubilidade, pois a maioria dos testes biológicos se faz com soluções aquosas de extratos ou frações secas. Caso a amostra não apresente esta propriedade será necessário o uso de agentes dispersantes ou emulgentes, o que pode dificultar a avaliação da atividade ou mesmo a execução dos testes.

Uma vez detectada ou confirmada a atividade farmacológica do material em estudo e, caso se objetive isolar o princípio ativo, procede-se a uma extração por solvente orgânico, no qual será pesquisada a bioatividade já detectada, levando-se em conta o que se afirmou antes para este tipo de extrato, quanto a presença de resíduos de solventes. O extrato orgânico deve ter seu perfil cromatográfico determinado por cromatografia em camada delgada ou cromatografia líquida de alta eficiência e deve ser analisado quanto à composição química.

A atividade deve ser pesquisada também nas frações brutas, que são preparadas a partir do extrato inicial. A fração ativa poderá ser tratada para fornecer a substância ativa.

Este é o caso ideal!

No transcorrer deste procedimento pode-se isolar outras substâncias que podem, da mesma forma, apresentar outro tipo de bioatividade, ou serem aproveitadas como marcadoras nos métodos usuais de controle qualidade.

A fim de se interromper os processos enzimáticos correntes no vegetal deve-se, após coleta, colocar o material vegetal em uma estufa, pré-aquecida à temperatura de 60°C a 80°C, durante quinze a trinta minutos ou proceder-se sua extração imediata com álcool etílico, caso se preconize a extração do material fresco. Caso a extração deva ser efetuada no material seco, é recomendável deixá-lo desidratar em ambiente ventilado e climatizado para que não ocorra infestações e degradações indesejadas ou que interfiram negativamente nos resultados esperados.



### Análise cromatográfica de um extrato e determinação das condições para o seu fracionamento e para o isolamento de substâncias

O extrato obtido a partir do vegetal seco ou fresco deve ser analisado cromatograficamente, tenha ele sido preparado para teste farmacológico ou para análise química propriamente dita. Após a evaporação do solvente tem-se um extrato seco que deve ser pesado para determinação do rendimento. Uma pequena porção deste material é redissolvida num mínimo de solvente orgânico; metanol, clorofórmio ou acetato de etila, por exemplo. A solução é aplicada na forma de barras sobre placas cromatográficas, sendo desenvolvidos cromatogramas com eluentes adequados de diferentes polaridades. Estes cromatogramas devem ser observados sob luz natural, luz ultravioleta e revelados com reativos específicos para determinadas classes de metabólitos secundários. As observações feitas são anotadas e os cromatogramas (figura 7) reproduzidos sobre papel para posterior comparação.

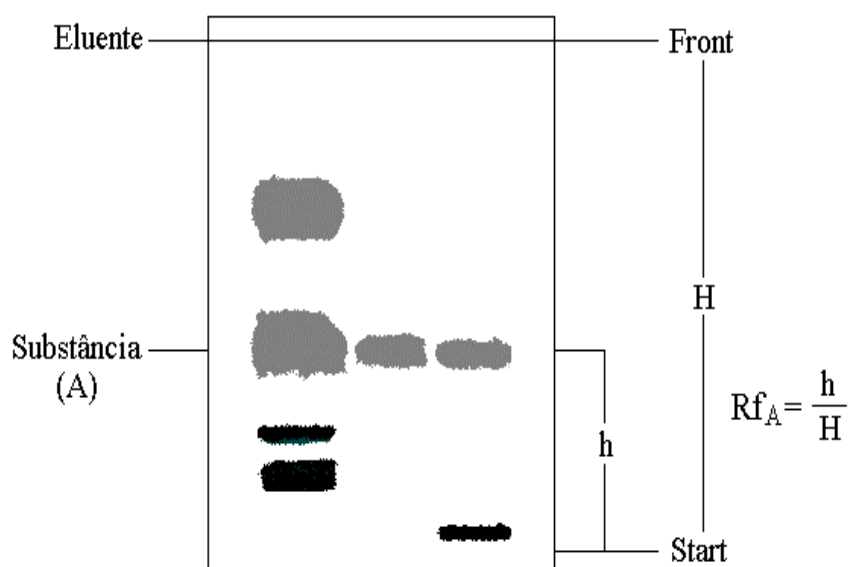


Fig. 7: Cromatograma e cálculo do Rf.  
Fonte: Deutsche Apotheker Zeitung, 49, 2705, 1992.

Para evaporação de solventes orgânicos a baixa pressão, utiliza-se o evaporador rotativo sob vácuo mediano de 60 até 20 cm de mercúrio (pressão normal: 760mmHg); pode-se utilizar uma trompa de jato d'água ou bomba de membrana de Teflon ® (pressão em torno de 15 miliPascal), ideal para solventes orgânicos menos voláteis ou mesmo água.

De posse da análise cromatográfica do extrato, quanto a sua composição por classes de substâncias, seleciona-se qual substância deve ser isolada, de acordo com o plano de investigação a ser seguido. Devido a complexidade de um extrato bruto, muitas vezes essa tarefa não é tão fácil, ou seja, muitas vezes torna-se necessário dividir o extrato bruto em frações grosseiras, para, aí sim, poder-se visualizar a “mancha” que interessa.

A denominação mancha dá-se àquela zona do cromatograma ocupada pelas substâncias que são coradas, absorvem ou fluorescem no ultravioleta, ou ainda àquelas que mostram coloração típica (e às vezes não tão típicas também) de uma ou outra classe ao reagirem com um reativo “específico” (ver figura 7).

A obtenção das frações brutas, o fracionamento, é uma estratégia que visa “descomplicar” o extrato bruto, possibilitando a identificação de manchas que estavam



mascaradas por corantes naturais (clorofilas, carotenóides ou flavonóides e às vezes alcalóides) ou encobertas por substâncias majoritárias (ácidos graxos, esteróides ou flavonóides). Para o fracionamento pode-se utilizar diferentes técnicas:

- a partição líquido – líquido, que explora a imiscibilidade de alguns solventes orgânicos com água;
- a desadsorção seletiva, que está baseada na capacidade de um solvente em deslocar substâncias adsorvidas a um suporte inerte ou ainda;
- a cromatografia de coluna, às vezes sob pressão (frequentemente dispensável), que está fundamentada na capacidade de um eluente (uma mistura de solventes em proporções definidas) de deslocar, arrastando sucessivamente, substâncias, que se adsorvem ao suporte inerte segundo suas polaridades.



Fig. 8: Funil de decantação na separação líquido - líquido

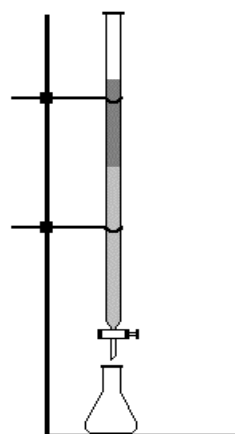


Fig. 9: Cromatografia em coluna.

Em alguns casos, durante o fracionamento pode ocorrer a precipitação ou mesmo a cristalização de uma substância, que na maioria dos casos, pode tratar-se de uma substância majoritária, geralmente ubiqüitária.

Para que determinada a mancha, leia-se a substância, possa ser isolada de um extrato bruto, ou de uma fração bruta, deve-se adequar as condições cromatográficas até poder-se visualizar a mancha escolhida numa altura superior a um quarto e inferior a um terço do caminho percorrido pelo eluente na placa. Isso é o que se chama “*R<sub>f</sub>* ótimo” (do inglês *Retention factor*) da substância, ou seja, a razão entre as distâncias percorridas pela mancha e pelo eluente na placa.

Uma vez conseguida a combinação de solventes (eluente) adequados, passa-se ao isolamento propriamente dito da substância que mostrar o *R<sub>f</sub>* entre 0,25 e 0,33 nas dadas condições (ver figura 7).

#### **Cromatografia em camada delgada, preparativa, de coluna, automatizada gasosa ou de alta performance**

A cromatografia é o método analítico básico da fitoquímica. Na Alemanha, os químicos sintéticos costumam dizer, como piada, que eles fazem química verdadeira e nós fitoquímicos, somente cromatografia. Eles se esquecem, porém, que todo o desenvolvimento da química orgânica está baseado nos estudos dos compostos naturais. Os métodos para

síntese e de análise estrutural são, em grande parte, desenvolvidos e aperfeiçoados, por exigência da Fitoquímica.

Para se proceder à análise de extratos vegetais, para o seu fracionamento e para o isolamento de seus constituintes químicos poder-se-ia utilizar somente a cromatografia. A análise cromatográfica de um extrato faz-se aplicando-se uma pequena quantidade deste sobre uma placa, geralmente de vidro, coberta com um material inerte. A cromatografia de adsorção é o tipo mais comum e útil, de uso geral, sendo outras variantes e desenvolvimentos aplicados a casos específicos. Deve-se registrar ainda a cromatografia de partição, a de troca iônica e a filtração em gel.

O desenvolvimento do cromatograma, diagrama que mostra os constituintes químicos do extrato distribuídos sobre a placa cromatográfica segundo suas polaridades, faz-se com o uso de um eluente, uma combinação de solventes. A posição dos compostos sobre a placa é dada pelo seu  $R_f$  (ver figura 7).

O termo ‘placa cromatográfica’ se aplica a qualquer material recoberto de suporte quimicamente inerte para fins cromatográficos, podendo ser de vidro, de alumínio ou de polímeros sintéticos. Cada tipo tem suas limitações e vantagens, mas as placas de vidro são as mais difundidas.

O suporte, material que cobre a placa cromatográfica, com uma espessura de 0,25 mm forma o que se chama de fase estacionária. Atualmente, três tipos de suportes para cromatografia em camada delgada (CCD) atendem às necessidades dos fitoquímicos:

- sílica gel, ou óxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ). Trata-se de um mineral, cujo grão apresenta a propriedade de adsorver substâncias à superfície, a qual, por apresentar muitos poros, possui uma superfície de contato extremamente grande para a dimensão do grão. Estas substâncias adsorvidas podem ser seletivamente deslocadas por um solvente orgânico ou por uma mistura deles, que flui pelo suporte; a presença de água no eluente pode desativar a sílica gel, o que às vezes é necessário;
- o óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), também conhecido como alumina, pode ser empregado na forma ácida ou neutra. O eluente pode conter água. A alumina básica e a neutra são usadas, geralmente, para a separação de alcalóides;
- sílica gel de fase reversa (*Reversed phase - RP*), neste caso tem-se um resíduo de cadeia longa (C8 ou C18) ligado ao oxigênio do óxido de silício. Adequado para separação de substâncias muito polares, como por exemplo de glicosídeos, este suporte requer como eluente álcoois hidratados. Neste tipo de cromatografia é contra-indicado o uso de qualquer outro solvente orgânico, mas existem exceções.

A mistura de solventes utilizada para o desenvolvimento de um cromatograma tem sua composição definida na observação da distribuição das substâncias sobre a placa. Caso se esteja buscando o sistema (eluente + suporte, geralmente a sílica gel) ideal para o fracionamento de um extrato numa coluna cromatográfica, deve-se utilizar um eluente que “abra” o extrato, isto é, as manchas devem suceder-se sobre a placa de forma nítida, sem contornos difusos ou sobreposição, tal feito é extremamente difícil.

Um outro critério para definir uma substância a isolar é trabalhar o sistema em função dela desde a análise do extrato, buscando sistematicamente a melhor combinação de solventes.

Uma técnica bastante prática e rápida para o isolamento de pequenas quantidades de substâncias está embasada no uso da cromatografia de camada delgada (CCD) preparativa sobre placa de vidro. Aqui se aplica uma solução concentrada da amostra (não mais que 5 mg por placa de 20 cm de largura) e desenvolve-se o cromatograma com o eluente escolhido. Após evidenciar-se a posição da substância a ser isolada, com o uso de um reagente geral aspergido sobre uma faixa estreita da placa, ou por observação sob luz ultravioleta, raspa-se a sílica gel que contém a banda relativa à substância procurada. Esta sílica é então lavada com

um solvente orgânico apropriado, que dissolva a substância em questão; o metanol é contra-indicado, pois arrasta uma quantidade significativa de sílica gel. A solução obtida é concentrada até a secura e para garantir a ausência de sílica, deve-se, de novo, dissolver o resíduo da evaporação, filtrar e mais uma vez evaporar a secura.

Os solventes empregados no preparo de um eluente devem ser relativamente voláteis; não devem reagir entre si; quando a mistura desenvolver calor, deve-se esperar o arrefecimento da mesma antes de seu uso. O benzeno é contra-indicado pela sua carcinogenicidade, deve ser substituído por tolueno, apesar deste ferver a 110°C. O clorofórmio é hepatotóxico, assim como o diclorometano, mas ambos são insubstituíveis no isolamento de alcalóides. O metanol é também bastante tóxico, ele é absorvido pela pele e pode provocar cegueira e morte. Os solventes clorados e metanol devem ser manuseados sob aspiração (em capela), com uso de luvas e óculos de proteção. O éter etílico forma, com o tempo, peróxidos que podem, ao fim de uma destilação, explodir de forma bastante violenta, recomenda-se por isso destilá-lo na presença de hidróxido de potássio, antes de seu uso.

Todos os produtos químicos são nocivos à saúde, e alguns são muito perigosos, por isso, exigem do usuário muita atenção e cuidado no seu manuseio.

A automação dos sistemas cromatográficos levou ao desenvolvimento de aparelhos destinados a executar a separação de compostos de uma mistura de uma maneira rápida, eficiente e com alto poder de resolução. O método chama-se cromatografia líquida de alta performance. O aparelho compõe-se de uma bomba injetora de eluentes, uma coluna com adsorventes sólidos impregnados de fases líquidas diretas ou reversas, e um detetor baseado na diferença de índices de refração ou na absorção no ultravioleta, entre outros tipos. Outros acessórios são a impressora de dados e gráficos referentes às condições da coluna e das frações obtidas e o coletor automático de frações.

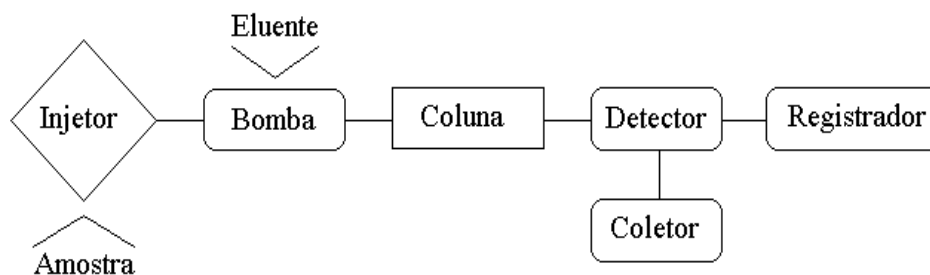


Fig. 10: Esquema de um cromatógrafo.

Este aparelho permite a padronização mais exata das condições de isolamento de uma substância. Tal fato levou ao desenvolvimento de métodos de análise (qualitativa) e controle (quantitativo) de composição de frações e de extratos vegetais, possibilitando a identificação de substâncias conhecidas e a descoberta de novas, assim como, e principalmente, o Controle de Qualidade de produtos farmacêuticos, à base de insumos vegetais.

## ABORDAGEM FITOQUÍMICA

### I. PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Triturar o material vegetal (50g) em triturador mecânico. Transferir para um recipiente apropriado onde se deve acrescentar álcool etílico até a completa submersão do material (anotar o volume usado). Fechar o recipiente vedando-o com folha de alumínio. Deixar em maceração por, no mínimo, 3 dias. Ao final do prazo, filtrar o material primeiramente sobre gaze e depois sobre papel filtro. Concentrar o filtrado em evaporador rotativo para depois, transferir para um frasco devidamente tarado, que deve ser levado à estufa para completa secagem do extrato. Depois de seco, o extrato deve ter sua massa medida para posterior cálculo do rendimento.

### II. REATIVOS E SUA PREPARAÇÃO

#### II.1. Reativo de KEEDE para Glicosídeos Cardíacos:

**Solução A:** dissolver 2g de Ácido 3,5-dinitrobenzóico em 50mL de Metanol.

**Solução B:** dissolver 5,7g de Hidróxido de Potássio em 100mL de Metanol.

Adicionar II gotas da sol. **A** e II gotas da sol. **B** no momento do teste.

**II.2. Reativo de BOUCHARDAT para Alcalóides:** dissolver 4g de Iodeto de Potássio 2g de Iodo ressublimado em 100mL de água destilada.

#### II.3. Reativo de DRAGENDORFF para Alcalóides:

**Solução A:** dissolver 8g de Subnitrato de Bismuto ( $\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) em 20mL de Ácido Acético.

**Solução B:** dissolver 27,2g de Iodeto de Potássio (KI) em 50mL de água destilada.

Adicionar aos poucos a solução A sobre a solução B.

#### II.4. Reativo de MAYER para Alcalóides:

**Solução A:** dissolver 1,36g de Cloreto Mercúrico ( $\text{HgCl}_2$ ) em 60mL de água destilada.

**Solução B:** dissolver 5g de Iodeto de Potássio (KI) em 20mL de água destilada.

As soluções A e B devem ser misturadas e diluídas para 100mL de solução.

#### II.5. Reativo de PASCOVÁ para Ácidos Orgânicos:

**Solução A:** dissolver em 100mL de Etanol 0,075g de Verde de Bromocresol e 0,25g de Azul de Bromofenol.

**Solução B:** dissolver em 100mL de água destilada, 0,25g Permanganato de Potássio ( $\text{KMnO}_4$ ) e 0,25g de Carbonato de Sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ). Misturar 9 partes de **A** para 1 parte de **B**, somente no momento de usar. A mistura só é estável durante 5 a 10 min.

#### II.7. Reativo de FEHLING para Açúcares Redutores:

**Solução A:** dissolver 34,65g de Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ ) em água destilada e completar o volume para 500mL.

**Solução B:** dissolver 173g de Tartarato de Sódio e Potássio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) e 125g de Permanganato de Potássio (KOH) em água destilada e diluir para 500mL. Utilizar na proporção de 2mL de **A**, para 2mL de **B**.

**II.8. LUGOL:** dissolver 10g de Iodeto de Potássio (KI) e 5g de Iodo em 50mL de água destilada e completar o volume para 100mL.

**II.9. PAPEL REATIVO DE PICRATO DE SÓDIO para heterosídeo cianogenético:**  
dissolver 1g de Ácido Pícrico ( $C_6H_3N_3O_3$ ) em 100mL de água destilada; junte depois 10g de Carbonato de Sódio. Seque em temperatura ambiente. Válido por até 4 meses se o frasco estiver bem fechado.

**II.10. SOLUÇÕES PULVERIZADORAS I E II para sesquiterpenolactonas:**

⇒ **Solução pulverizadora I:**

**Solução A:** dissolver 20g de Cloridrato de Hidroxilamina ( $NH_2OH.HCl$ ) em 50mL de água destilada, completar o volume para 200mL com Álcool Etilico. Esta solução deve ser conservada em lugar fresco.

**Solução B:** dissolver 50g de Hidróxido de Potássio ( $KOH$ ) em água destilada (pequeno volume) e completar com Etanol até 500mL. Misturar 1 volume da solução A com 2 volumes de solução B. Filtrar o precipitado formado de Cloreto de Potássio ( $KCl$ ) (aguardar a formação do sal). Esta solução deve ser guardada em refrigerador, nestas condições se mantém estável por duas semanas.

⇒ **Solução pulverizadora II:**

Dissolver 10g de Cloreto Férrico  $FeCl_3$  em 20mL de solução de Ácido Clorídrico ( $HCl$ ) a 36% (concentrado), adicionar em seguida 200mL de Éter Etilico (agitar no momento da pulverização). Esta solução é bastante estável, desde que o frasco esteja bem vedado.

**II.11. Anisaldeído – Ácido Acético Reagente Geral**

Misturar 0,5mL de Anisaldeído a 10ml de Ác. Acético Glacial. Em outro recipiente, adicionar a 85mL de Metanol, 5mL de  $H_2SO_4$  concentrado. As duas soluções devem ser misturadas.

**II.12. Vanilina - Ácido Sulfúrico Reagente Geral**

**Solução. A :** Dissolver 1g de Vanilina em Etanol e completar o volume para 100mL.

**Solução. B :** Diluir 10mL de  $H_2SO_4$  em Etanol e elevar o volume até 100mL

**Obs.:** No momento da aplicação sobre a placa cromatográfica, retirar uma alíquota de cada solução obedecendo a proporção de 1:1.

**III. TESTES**

☛ **SAPONINAS**

a) **Saponina espumídica:** dissolver alguns miligramas do extrato alcoólico seco em 5mL de água destilada. Em seguida, diluir para 15mL e agitar vigorosamente durante 2min em tubo fechado.

**Resultado:** se a camada de espuma permanecer estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo para saponina espumídica.

**Obs.:** Existem outros compostos que ativam e desativam a espuma formada.

b) **Saponina hemolítica:** dissolver alguns miligramas do extrato seco, em 2mL de solução de Etanol a 80% (filtrar se necessário). Preparar 20mL de suspensão de hemácias a 5%, em solução de  $NaCl$  a 0,85%. Juntar 10mL da suspensão, a 1mL do extrato em sol.

etanólica, homogeneizar cuidadosamente e deixar em repouso durante 5min. Repetir o mesmo procedimento para os 10mL de suspensão restante, porém, substituindo o extrato em solução por sol. de NaCl a 0,85%.Centrifugar as duas preparações durante 5min a 3500rpm.

**Preparação da suspensão de hemácias a 5%:** retirar 5mL de sangue humano ou de outro animal, transferir para um tubo de ensaio, adotar um volume padrão de solução salina (sugestão: 5mL), e proceder a lavagem das hemácias, centrifugando durante 1min a 3000rpm e desprezando o líquido sobrenadante. Repetir o procedimento de lavagem por pelo menos 3 vezes. Em seguida, retirar 1mL do concentrado de hemácias e adicionar 19mL de solução de NaCl a 0,85% e homogeneizar.

**Resultado:** uma coloração vermelha ou rósea no líquido sobrenadante, é considerada evidência de hemólise, quando comparada ao teste em branco.

#### ☛ ÁCIDOS ORGÂNICOS

Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 5mL de água destilada. Filtrar se necessário. Transferir 2mL para um tubo de ensaio, ou 1mL para uma placa escavada, e adicionar gotas do **REATIVO DE PASCOVÁ**.

**Resultado:** se houver descoloração do reativo, a reação é positiva.

#### ☛ AÇÚCARES REDUTORES

**Técnica 1:** dissolver alguns miligramas do extrato seco em 5mL de água destilada. Filtrar se necessário. Adicionar 2mL do reativo de FEHLING A e 2mL do reativo de FEHLING B. Aquecer em BM em ebulição durante 5min.

**Resultado:** o aparecimento de um precipitado vermelho tijolo, indica presença de açúcares redutores.

**Obs.:** caso não haja formação do precipitado, executar a técnica 2.

**Técnica 2:** dissolver alguns miligramas do resíduo em 5mL de água destilada. Adicionar 1mL de HCl concentrado e ferver em BM durante 10min. Esfriar e neutralizar com solução de NaOH a 20%. Filtrar se necessário. Adicionar 2mL do reativo de FEHLING A e 2mL de FEHLING B. Aquecer em BM por 5min.

**Resultado:** o aparecimento de precipitado vermelho, indica reação **positiva** para **açúcares não redutores ou heterosídios**.

#### ☛ HETEROSÍDIO CIANOGENÉTICO

Colocar num erlenmeyer 10g da planta fresca bem triturada, 10mL de água destilada e 1mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, vedar o erlenmeyer com uma rolha de cortiça onde deve estar preso o **papel reativo de Picrato de Sódio** de modo que não entre em contato com as paredes do erlenmeyer, nem com a mistura. Aquecer a 50°C durante 30'.

**Resultado:** se o papel corar de marrom – avermelhado, indica reação positiva para **Ácido Cianídrico**.

#### ☛ POLISSACARÍDIOS

Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 5mL de água destilada. Filtrar se necessário. Adicionar duas gotas de **lugol**.



**Resultado:** o aparecimento de coloração azul, indica resultado positivo.

#### ☛ **PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS**

1. **Reação de nihidrina:** dissolver alguns miligramas do extrato alcoólico em 3mL de água destilada e filtrar se necessário. Adicionar 0,5mL de solução aquosa de Nihidrina a 1%, aquecer até a ebulição.

**Resultado:** o aparecimento de coloração violeta persistente indica reação positiva.

#### ☛ **FENÓIS E TANINOS**

Dissolver alguns miligramas de extrato seco em 5mL de água destilada, filtrar se necessário e adicionar I a II gotas de solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  a 1%.

**Resultado:** qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é indicativo de reação positiva, quando comparado com o teste em branco (água + Sol. de  $\text{FeCl}_3$ ).

► Coloração inicial entre o azul e o vermelho, é indicativo da presença de fenóis, quando o teste em branco for negativo.

► Precipitado escuro de tonalidade azul, indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e verde, presença de taninos catéquicos.

#### ☛ **FLAVONÓIDES**

☞ **GERAL:** dissolver alguns miligramas do extrato seco, em 10mL de Metanol, filtrar se necessário. Adicionar V gotas de HCl concentrado e raspas de Magnésio.

**Resultado:** o surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

#### ☞ **POR CLASSES:**

❶ dissolver alguns miligramas do extrato seco em 20mL de água destilada e filtrar se necessário. Transferir para três tubos de ensaio, 3mL da solução (para cada tubo). Acidular um a pH 3, alcalinizar os dois restantes a pH 8.5 e 11.

**Resultado:**

CONSTITUINTES	COLORAÇÃO EM MEIO		
	ÁCIDO pH 3	ALCALINO pH 8.5	ALCALINO pH 11
ANTOCIANINAS E ANTOCIANIDINAS	VERMELHA	LILÁS	AZUL PÚRPURA
FLAVONAS, FLAVONÓIS E XANTONAS	-----	-----	AMARELA
CHALCONAS E AURONAS	VERMELHA	-----	VERMELHO – PÚRPURA
FLAVANONÓIS	-----	-----	VERMELHO – LARANJA

**Obs:** a presença de um constituinte pode mascarar a cor indicativa da presença de outro.

❷ **LEUCOANTOCIANIDINAS, CATEQUINAS E FLAVANONAS:** em dois tubos adicione 3mL da solução preparada anteriormente, acidule o primeiro com solução de HCl a pH 1 - 3 e alcalinize o outro a pH 11 com solução de NaOH. Aqueça-os com auxílio de uma



lâmpada de álcool durante 2 – 3min, cuidadosamente. Observe modificações na coloração, comparando com os tubos utilizados no teste anterior.

**Resultados:**

CONSTITUINTES	COLORAÇÃO EM MEIO	
	ÁCIDO	ALCALINO
LEUCOANTOCIANIDINAS	VERMELHA	-----
CATEQUINAS (TANINOS CATÉQUICOS)	PARDO – AMARELA	-----
FLAVANONAS	-----	VERMELHO-ALARANJADO

❶ **FLAVONÓIS, FLAVANONAS, FLAVANONÓIS E XANTONAS:** transferir para um tubo de ensaio, 3mL da mesma solução extrativa usada no teste anterior e acrescentar alguns miligramas de Magnésio em raspas, e 0,5mL de HCl concentrado. Aguarde o termino da efervescência, e observe por comparação a mudança na coloração em relação aos tubos acidificados dos testes anteriores.

**Resultado:** o aparecimento ou intensificação da cor vermelha, é indicativo da presença dos metabólitos a cima citados.

#### ☛ ALCALÓIDES

Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 5mL de solução de HCl a 5%, filtrar se necessário. Separar quatro porções de 1mL em tubos de ensaio, e adicionar gotas dos reativos abaixo:

- Reativo de Bouchardat, RESULTADO:** precipitado laranja avermelhado
- Reativo de Dragendorff, RESULTADO:** precipitado vermelho tijolo
- Reativo de Mayer, RESULTADO:** precipitado branco
- Reativo de Bertrand, RESULTADO:** precipitado branco

#### ☛ PURINAS

Numa cápsula de porcelana, juntar alguns miligramas do extrato seco, III gotas de solução de HCl 6N e duas gotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentrado (30%). Evaporar em BM. Deve haver formação de um resíduo corado de vermelho. Juntar III gotas de solução de NH<sub>4</sub>OH 6N.

**Resultado:** o surgimento de coloração violeta, indica reação positiva.

#### ☛ GLICOSÍDIOS CARDÍACOS

- Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 5mL de Metanol. Filtrar se necessário. Separar em duas porções de 2mL cada e adicionar gotas do reativo de **KEEDE**.

**Resultados:** Coloração azul ou violeta indica reação positiva.

- Solução de nitroprussiato de sódio a 5% :** adicionar III gotas de solução recente Nitroprussiato de Sódio e III gotas de solução de hidróxido de sódio 2N.

**Resultado:** coloração roxa intensa, indica reação positiva.

## ☛ CATEQUINAS

**Técnica 1:** Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 3mL de Metanol. Filtrar se necessário. Juntar 1mL de solução aquosa de Vanilina a 1% e 1mL de HCl concentrado.

**Resultado:** o surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

**Técnica 2:** Embeber um palito de fósforo na solução (extrato seco + Metanol), evapore até secar, e umedeça em HCl concentrado. Seque ao calor de uma chama forte, evitando sua carbonização.

**Resultado:** o aparecimento de cor vermelha, indica presença de catequinas.

## ☛ DERIVADOS BENZAQUINONAS; NAFTOQUINONAS E FENANTRAQUINONAS:

Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 3mL de Metanol. Filtrar se necessário. Adicionar II gotas de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 25%, II gotas de Formaldeído a 4% e II gotas de o-dinitrobenzeno a 5%. Aquecer a mistura em BM.

**Resultado:** coloração violeta, indica reação positiva.

## ☛ SESQUITERPENOLACTONAS E OUTRAS LACTONAS

Dissolver alguns miligramas do extrato em 3mL de Metanol e filtrar se necessário. Adicionar XII gotas de solução alcoólica de Cloridrato de Hidroxilamina a 10% e duas gotas de solução metanólica de KOH a 10%. Aquecer suavemente em BM durante 2min. Em seguida esfriar e acidificar com solução de HCl a 1N. Adicionar I gota de  $\text{FeCl}_3$  1%.

**Resultado:** o aparecimento de coloração violeta, indica reação positiva.

### \* Outra técnica (solução pulverizadora)

Dissolver alguns miligramas do extrato em Álcool Metílico. Aplicar através de um capilar, sobre uma folha de papel filtro, de modo a formar uma pequena mancha. Utilizar a técnica a seguir para revelação.

**PULVERIZAÇÃO:** pulverizar com a solução I, secar brevemente em temperatura ambiente, e em seguida, pulverizar com a II.

**Resultado:** o aparecimento de coloração violeta, indica reação positiva.

## ☛ ESTERÓIDES E TRITERPENÓIDES

Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 10mL de Clorofórmio. Filtrar sobre carvão ativado. Transferir o filtrado para um tubo de ensaio completamente seco. Adicionar 1mL de Anidrido Acético e agitar suavemente, em seguida, adicionar cuidadosamente, III gotas de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado. Torne a agitar suavemente.

**Resultado:** observe se há rápido desenvolvimento de cores, que vão do azul evanescente, ao verde persistente que indicam resultado positivo.

**Obs.:** cuidado, pode haver projeção durante a agitação.

## ☛ AZULENOS

Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 2mL de Clorofórmio. Filtrar se necessário. Concentrar até 0,5mL em BM e adicionar 2,5mL da sol. de p-dimetilaminobenzaldeído. Aquecer em BM durante 5min. Após esfriar, em um funil de

decantação, agitar com 10mL de Éter de Petróleo. Quando as duas fases estiverem distintas, observe a fase aquosa.

**Resultado:** Quando há presença de proazulenos, a fase aquosa adquire coloração azul, porém, quando estes estão em pequena quantidade, a coloração observada é esverdeada.

**Outra técnica:** Durante o desenvolvimento do perfil cromatográfico, borrifar a amostra eluída com a solução de p-dimetilaminobenzaldeído, abandonar sob a luz durante 5 min, em seguida, observe.

**Resultado:** O surgimento de uma mancha azul-claro, indica reação positiva.

#### ☛ CAROTENÓIDES

**Técnica 1:** dissolva alguns miligramas do extrato seco em 3mL de clorofórmio. Filtrar se necessário. Juntar 2mL de Clorofórmio saturado com Tricloreto de Antimônio.

**Resultado:** o aparecimento de coloração azul, indica reação positiva.

**Técnica 2:** substitua o clorofórmio saturado, por gotas de Ácido Trifluoracético.

**Resultado:** a observação de coloração azul, indica reação positiva.

**Obs.:** este tratamento serve para dissolver os pigmentos amarelos que mascaram a cor azul.

#### ☛ DEPSÍDIOS E DEPSIDONAS

Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 5mL de Éter Etílico. Filtrar se necessário. Evaporar todo o Éter em BM, juntar ao resíduo 3mL de Metanol. Agitar e adicionar III gotas de solução de  $\text{FeCl}_3$  a 1%.

**Resultado:** o aparecimento de coloração verde, azul ou cinza, indica reação positiva.

#### ☛ DERIVADOS DA CUMARINA

Dissolver alguns miligramas do extrato seco em 5mL de éter etílico, concentrar em BM até 0,5mL. Em papel filtro, aplique gotas da solução etérea, de modo a formar duas manchas de aproximadamente 1cm de diâmetro cada. A uma destas, juntar 1 gota de solução de NaOH a 1N. Cubra a metade da mancha com papel escuro, e exponha a outra metade a luz ultravioleta. Descubra e compare.

**Resultado:** fluorescência azul na parte exposta da mancha, indica reação positiva.

#### ☛ ANTRAQUINONAS

a) **Técnica 1:** dissolver alguns miligramas do extrato seco em 5mL de Tolueno. Filtrar se necessário. Adicionar 2mL de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10%, agitar suavemente.

**Resultado:** o aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

b) **Técnica 2:** ferver durante 15min alguns miligramas do resíduo, em 10mL de solução aquosa de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a 10%. Filtrar o líquido ainda quente. Transferir o filtrado para um funil de decantação, adicionar mais 10mL de água destilada, e extrair duas vezes com 10mL de Tolueno. Reunir os extratos toluênicos, e concentrar até 3mL, adicionar a este 3mL de solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$  a 10%.

**Resultado:** o aparecimento de coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa, indica reação positiva.

### 4. PERFIL CROMATOGRÁFICO

Dissolver uma pequena quantidade do extrato seco, em solvente apropriado (metanol p. ex.). Aplicar a amostra dissolvida com o auxílio de um tubo capilar, na base da placa cromatográfica e em dois locais como mostra a **figura 1**.

**Figura 1**

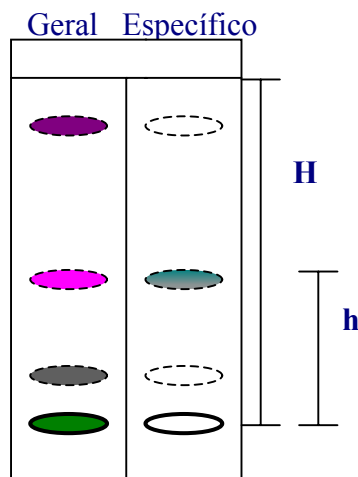


**Amostra**

Eluir a amostra com eluentes de polaridades crescente (p/ ex.: Hexano/Acetona (80:20), Clorofórmio/Metanol (90:10) ou Clorofórmio/Metanol/Água (75:20:05). Desenhar a placa em seu tamanho natural e com todos os detalhes perceptíveis em luz visível. Desenhar novamente a placa desta vez anotando as observações feita em câmara de luz ultravioleta, e finalmente, revelar as substâncias da placa com um reativo geral (Anisaldeído ou sol. de Vanilina) e um específico. A placa deve ser novamente desenhada com detalhes.

A revelação com os reativos deve ser feita da seguinte forma: cobrir a placa cromatográfica, deixando apenas metade dela exposta, borrifar primeiramente um reativo observar e desenhar, para depois borrifar o outro. Calcular os  $R_f$  quando possível, como mostra a **figura 2**.

**Figura 2**



### **Cálculo do fator de Retenção ( $R_f$ )**

$$R_f = \frac{h}{H}$$

**$R_f$**  = fator de Retenção

**h** = distância percorrida pela substância

**H** = distância percorrida pelo eluente