



Curso de Farmácia-Bagé/RS

PROTOSCOLOS E TÉCNICAS LABORATORIAIS

Fitoterapia popular anti-infecciosa: análise fitoquímica, toxicológica e avaliação do potencial antibacteriano in vitro- Projeto de Pesquisa PQ969/16



Graciela Maldaner e Patrícia Mariño (org.)

Ana Paula Simões Menezes e Rafael Oliveira dos Reis (col.)



PROTOS E TÉCNICAS LABORATORIAIS

Fitoterapia popular anti-infecciosa: análise fitoquímica, toxicológica e avaliação do potencial antibacteriano in vitro- Projeto de Pesquisa PQ969/16



Editora do Centro Universitário da Região da Campanha

Av. Tupy Silveira, 2099
CEP 96400-110 - Bagé - RS - Brasil
Telefone: (53) 3242-8244 – Ramal 231
e-mail: ediurcamp@urcamp.edu.br
site: www.ediurcamp.urcamp.edu.br

FAT - Fundação Áttila Taborda

Presidente:

Lia Maria Herzer Quintana

URCAMP – Centro Universitário da Região da Campanha

Reitora:

Lia Maria Herzer Quintana

Pró-Reitora Acadêmica:

Virgínia Paiva Dreux

Gerente Financeiro:

Nélson Sonaglio

Editor(a) chefe

Ana Cláudia Kalil Huber

Editor(a) Auxiliar

Clarisse Ismério

Assessora Técnica

Bibl. Maria Bartira N. C. Taborda

Diagramação

Alessandra Almeida de Menezes

CONSELHO EDITORIAL

Ana Cláudia Kalil Huber	Dra. (Urcamp)
Clarisse Ismério	Dra. (Urcamp)
Elisabeth Cristina Drumm	Dra. (Urcamp)
Marilene Vaz Silveira	Me. (Urcamp)
Marília Pereira de A. Barbosa	Me. (Urcamp)
Sandro Moreira Tuerlinckx	Dr. (Urcamp)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

P967 Protocolos e técnicas laboratoriais: fitoterapia popular anti-infecciosa: análise fitoquímica, toxicológica e avaliação do potencial antibacteriano in vitro- Projeto de Pesquisa PQ969/16. / Graciela Maldaner e Patrícia Mariño, Ana Paula Simões Menezes, Rafael Oliveira dos Reis. - Bagé: Ediurcamp, 2021. 48p.

ISBN: 978-65-86471-12-0

1.Fitoterapia. 2.Plantas Medicinais. 3. Técnicas Laboratoriais.
I.Maldaner, Graciela. II.Mariño, Patrícia. III.Menezes, Ana Paula
Simões. IV.Reis, Rafael Oliveira dos. V.Título.

CDD: 615.321

Catalogação elaborada pelo Sistema de Bibliotecas FAT/URCAMP
Bibliotecária responsável: Maria Bartira N. C. Taborda CRB: 10/782

Os textos aqui reproduzidos são de exclusiva responsabilidade de seus autores.



CENTRO UNIVERSITÁRIO DA REGIÃO DA CAMPANHA

PROJETO DE PESQUISA DO CURSO DE FARMÁCIA

Organizadoras

Graciela Maldaner e Patrícia Mariño

Colaboradores

Ana Paula Simões Menezes e Rafael Oliveira dos Reis



EDIURCAMP

Bagé/RS
2021

OBJETIVO DO PROJETO DE PESQUISA

“Fitoterapia popular anti-infecciosa: análise fitoquímica, toxicológica e avaliação do potencial antibacteriano *in vitro*”

O uso de Plantas Medicinais é notório desde os primeiros registros de comunicação da civilização humana, e vem perpassando os séculos, sendo ainda atualmente objeto de amplo estudo, por representar ferramenta de tecnologia de inovação em saúde.

Nos últimos anos têm se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais visando a obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas.

O Brasil é considerado hoje uma das maiores biodiversidades do mundo, com enorme potencial como fonte de novos fármacos, despertando grande interesse dos laboratórios internacionais no planejamento e desenvolvimento de fármacos. Desde o ano de 2006, vem sendo reconhecida a Política de Plantas Medicinais e Fitoterápicos brasileira, articulada pelo Ministério da Saúde, no intuito de fortalecer a nossa medicina, despertando para maior amplitude de estudos científicos.

Atualmente, sabe-se que os metabólitos secundários presentes nas plantas medicinais representam uma interface química entre as mesmas e o ambiente circundante, sendo portanto, sua síntese afetada por condições ambientais, período de coleta e modo de preparo dos extratos a serem consumidos. Fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, radiação ultravioleta, volume hídrico e poluição atmosférica, podem modular a síntese de metabólitos relevantes para ação farmacológica esperada das plantas medicinais.

Igualmente, é notório que o uso excessivo e inadequado de antibióticos pela população mundial, associada à prescrições irracionais pelos profissionais têm contribuído para o aumento da resistência bacteriana. Segundo os dados da OMS (Organização Mundial da

Saúde) as infecções causam 25% das mortes em todo o mundo. Assim, o estudo e pesquisa de novos antibióticos derivados de plantas medicinais vêm aumentando, uma vez que as substâncias produzidas por elas representam moléculas complexas e inéditas.

Com base no contexto acima e em acordo com a responsabilidade social da Urcamp, este projeto foi pensado pelos professores do Curso de Farmácia Ana Paula, Graciela, Patrícia e Rafael no ano de 2016, em associar suas áreas de conhecimento a fim de estudar as plantas medicinais utilizadas pela comunidade onde a Urcamp está inserida, com foco no controle de qualidade dos produtos e plantas disponíveis na região, bem como na avaliação do potencial antimicrobiano dos mesmos.

Queremos agradecer aos alunos Chaiane Gonçalves, Bruna Freitas, Anna Paula Rezende, Alessandra Dall'Asta, João Olavo Severo, Viviane Hahn, Daniele Marques, Gleicimara Trindade, Thais Ribeiro, Daiane Tomazzeti, Raquel Rodrigues, Lucas Ollé, Fathieli Castro Jardim, Alice Costa Netto, Franciele Rosa, Rafael Gonçalves e Vinícius Oberto que embarcaram conosco nesta aventura do mundo das plantas medicinais desde 2016.

PROTÓCOLOS E TÉCNICAS LABORATORIAIS

Este material foi idealizado pelos professores para facilitar a execução das técnicas que são comumente utilizadas neste projeto para pesquisa com plantas medicinais nos laboratórios do Centro Universitário URCAMP.

As técnicas aqui citadas são desenvolvidas dentro do objetivo de pesquisar os metabólitos secundários de maneira qualitativa e quantitativamente, além de avaliar o potencial antibacteriano dos diferentes extratos das plantas estudadas.

Este instrumento mostra o passo-a-passo de cada técnica, para que o aluno consiga desenvolver sua pesquisa de maneira mais independente, porém com correto suporte. Além disso, aborda regras gerais para o trabalho dentro do laboratório evitando riscos de acidentes e mantendo a segurança no laboratório.

SUMÁRIO

OBJETIVO DO PROJETO DE PESQUISA	5
“Fitoterapia popular anti-infecciosa: análise fitoquímica, toxicológica e avaliação do potencial antibacteriano in vitro”	5
PROTOCOLOS E TÉCNICAS LABORATORIAIS	7
1.USO DE PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE TRATAMENTO	11
2. NORMAS DE SEGURANÇA NO LABORATÓRIO	14
2.1 Regras de Segurança No Laboratório	15
2.1.1 Regras Gerais e Uso de Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs) e Equipamentos de Proteção Individual (EPIs):	15
2.1.2 Principais Vidrarias que Compõe o Laboratório.....	18
3. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA QUALITATIVA EM PLANTAS MEDICINAIS.....	23
3.1 Identificação de alcalóides	24
3.1.1 Materiais utilizados.....	25
3.1.2 Reagentes.....	26
3.1.3 Técnica.....	27
3.1.3.1 Teste Direto I	27
3.1.3.2 Teste Direto II.....	28
3.1.4 Resultados esperados.....	28
3.2 Identificação de antraquinonas	29
3.2.1 Materiais utilizados.....	29
3.2.2 Reagentes.....	30
3.2.3 Técnica e resultados esperados.....	30
3.3 Identificação de flavonóides.....	31

3.3.1 Materiais utilizados.....	31
3.3.2 Reagentes.....	32
3.3.3 Técnica e resultados esperados.....	32
3.4 Identificação de saponinas	34
3.4.1 Materiais utilizados.....	34
3.4.2 Reagentes.....	35
3.4.3 Técnica e resultados esperados.....	35
3.5 Identificação de taninos.....	36
3.5.1 Materiais utilizados.....	36
3.5.2 Reagentes.....	37
3.5.3 Técnicas e resultados esperados	37
3.5.4 Técnicas para diferenciação de taninos.....	38
4. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA QUANTITATIVA EM PLANTAS MEDICINAIS ...	39
4.1 Procedimentos para utilização do Espectrofotômetro	40
4.2 Doseamento de polifenóis.....	41
4.2.1 Materiais utilizados.....	42
4.2.2 Reagentes.....	42
4.2.3 Procedimento experimental	42
4.3 Doseamento de Flavonóides Totais	43
4.3.1 Materiais utilizados.....	43
4.3.2 Reagentes.....	44
4.3.3 Procedimento experimental	44
REFERÊNCIAS.....	46

1. USO DE PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE TRATAMENTO

Desde os primórdios, os vegetais têm sido utilizados não só como fonte alimentícia, como também medicamentosa. As mais diversas enfermidades têm sido tratadas com chás (infuso, decocto, macerados), sucos, tinturas, banhos, cataplasmas e unguentos, preparados a partir das plantas.

Durante as chamadas civilizações clássicas, as drogas vegetais começam a ser registradas de forma sistemática. Na Grécia, PedaciusDioscórides escreveu a obra traduzida para o Latim por humanistas do século XV, chamada “Matéria Médica” que por mais de 1500 anos, durante o período Greco-romano e na idade média, foi considerada a bíblia de médicos e farmacêuticos. Dioscórides descreveu a origem e uso terapêutico de mais de 500 drogas vegetais, aproximadamente 100 drogas de origem animal e outras de origem mineral. Acredita-se que a matéria médica, transformada em disciplina didática, hoje é a conhecida como Farmacognosia, componente curricular obrigatório em todos os Cursos de Farmácia do Brasil.

Durante a idade média, entre os séculos V e XV, a Europa viveu em um período de estagnação. Nesta mesma época, surge no mundo árabe o médico Avicena que utilizava as flores como terapêutica para os males cardíacos. Através do povo árabe, foram introduzidas na terapêutica europeia a canela, o limão, a noz moscada, sene, tamarindo e cânfora.

Ao final do século XV, as novas rotas marítimas para as Índias e América trouxeram novos conhecimento de outros vegetais como o coco, o chá preto e o café, iniciando um novo tempo para o estudo de fitofármacos.

Pode-se perceber que diversas drogas vieram da antiguidade e através dos séculos perduram aos diferentes hábitos culturais. No decorrer da historia das civilizações ocorreram muitos fenômenos onde costumes foram perdidos, alterando a realidade destes povos. O povo

brasileiro sofreu influência da cultura dos povos indígena e africana, mas devido aos novos hábitos culturais importados de outros países, há um risco iminente de perder essas memórias culturais relativas aos produtos naturais.

Entretanto, as plantas medicinais ainda hoje são objetos de estudo pelas indústrias farmacêuticas para o planejamento e desenvolvimento de novos medicamentos, através do uso de tecnologias inovadoras. Apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, ainda tem-se 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados com origem de plantas e compostos de origem natural. Planta medicinal, de acordo com definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é qualquer espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. Em definição mais ampla, a Organização Mundial da Saúde (OMS, 1979) cita que é toda e qualquer planta contendo substâncias que possam ser usadas para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico e que possa servir como fonte de fitofármacos e de seus precursores para a síntese químico-farmacêutica.

O Brasil destaca-se por ser o maior país com diversidade genética do mundo, com aproximadamente 55 mil espécies registradas (de um total contabilizado entre 350 a 550 mil) e conta com extensa tradição do uso das plantas medicinais ligada ao conhecimento popular passado entre gerações. As plantas estão entre os grupos mais estudados no Brasil. Segundo Simões et al. (2017), entre 1990 a 2006 foram descritas 2.875 novas espécies e entre 2007 a 2015, 1.900 espécies, ou seja, a cada dois dias, uma nova espécie é descrita em nosso país.

O Brasil é composto por seis biomas (Figura 1): Floresta Amazônica, Mata Atlântica, Caatinga, Cerrado, Pampa e Pantanal. Estima-se que a biota presente entre 170 e 210 mil espécies, correspondendo à cerca de 13% dos recursos mundiais. Entre os grupos mais estudados estão as plantas, onde, de 34.916 espécies reconhecidas, 19.187 são nativas do Brasil (SIMÕES et al., 2017).

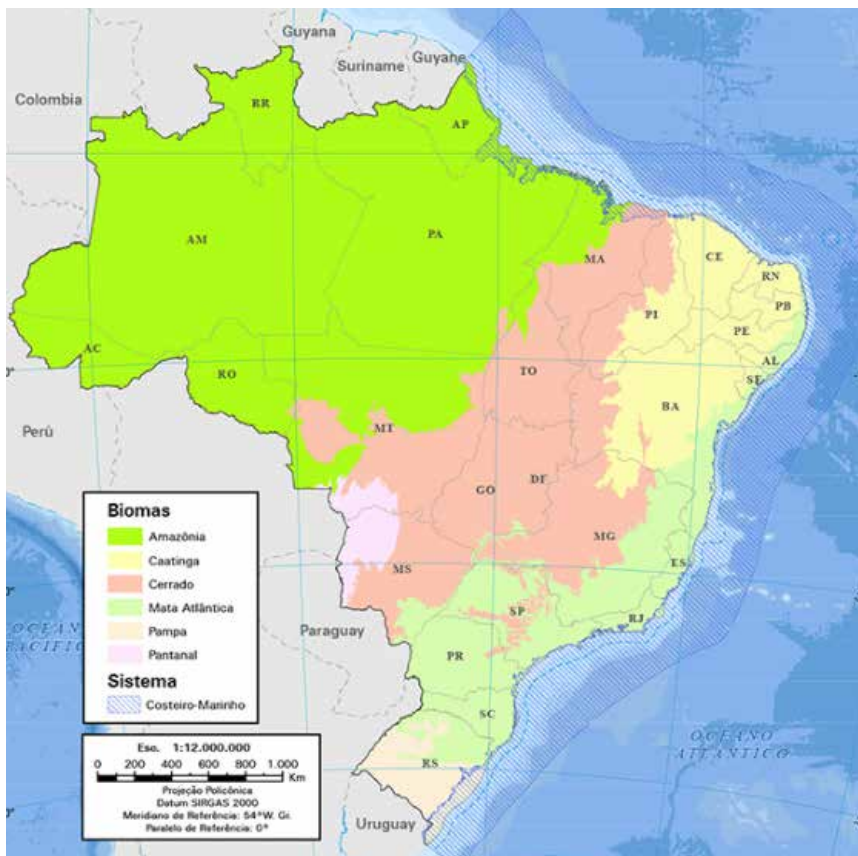


Figura 1 - Biomas brasileiros
 Fonte: IBGE, 2020

Apesar de sofrer com a degradação desde o século XVII, o Bioma Pampa é considerado uma das maiores riquezas do Sul do nosso país. A região da Campanha (Figura 2) é apontada como a parte mais característica do bioma Pampa e compreende a parte oeste do mesmo. As inúmeras coxilhas, pequenas elevações, de baixa altitude, cobertas por vegetação campestre caracterizam a paisagem (HECK; RIBEIRO; BARBIERI, 2017).

No Brasil, este bioma é restrito ao estado do Rio Grande do Sul, ocupando cerca de 63% da sua área e 2% do território nacional. A Campanha, composta pelos municípios de Aceguá, Bagé, Caçapava do Sul, Candiota, Dom Pedrito, Hulha Negra e Lavras do Sul, é considerada a parte mais

característica do Bioma Pampa, abrangendo a porção oeste do mesmo no Brasil. Diversos tipos de solo são encontrados encobertos pelas contínuas coxilhas revestidas por sua vegetação campestre, resultando em diferentes composições florísticas. Distintas plantas são nativas desta região e já estudadas por alunos componentes deste Projeto de Pesquisa como a marcela (*Achyrocline satureioides* (Lam.) DC.), a carqueja (*Baccharis crispa* Spreng.), a pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link), a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.) e o alecrim-do-campo (*Vernonanthur anudiflora* (Less.) H. Rob.).



Figura 2 - Região da Campanha
Fonte: Heck; Ribeiro; Barbieri (2017 p. 38)

2. NORMAS DE SEGURANÇA NO LABORATÓRIO

Todo laboratório que manipule substâncias químicas e biológicas está suscetível a acidentes, podendo gerar graves consequências.

Entretanto, na maioria das vezes, os acidentes estão relacionados à falta de atenção e conhecimento das técnicas, dos equipamentos e, até mesmo da falta de conhecimento do local e do experimento a ser realizado.

Portanto, para diminuir os riscos de acidentes e manter a segurança no laboratório precisamos seguir algumas regras e procedimentos de trabalho adequados, para assim evitarmos e prevenimos a exposição dos profissionais, dos estudantes, da comunidade e do meio ambiente a riscos e agentes potencialmente tóxicos, inflamáveis e patogênicos.

Lembre-se que o laboratório pode ser um local seguro e com menos riscos desde que tomemos consciência que a segurança não está somente em seguir protocolos e regras, mas também está na percepção de cada um de nós ao se conscientizar e eliminar condições impróprias que podem gerar algum risco de acidente.

O laboratório é um local sério, onde devemos ter maturidade, concentração e conhecimento ao utilizá-lo.

2.1 Regras de Segurança No Laboratório

2.1.1 Regras Gerais e Uso de Equipamentos de Proteção Coletiva (EPCs) e Equipamentos de Proteção Individual (EPIs):

1. Nunca trabalhe sozinho no laboratório, em caso de acidente um parceiro poderá ajudar.
2. Não deve ser permitida a entrada de pessoas estranhas no laboratório.
3. Trabalhar com seriedade, evitando brincadeiras.
4. Esteja sempre consciente do que está fazendo.
5. Não se deve manter, comer e beber qualquer tipo de alimento no laboratório.
6. Não é permitido fumar no laboratório.
7. Observe sempre o local de trabalho, a fim de verificar se o mesmo apresenta condições seguras para o desenvolvimento do experimento. Ao observar alguma irregularidade, comunique o responsável pelo laboratório.

8. Localize o disjuntor no quadro de distribuição e, aprenda desligá-lo para evitar graves consequências em caso de acidentes que envolva eletricidade. Certifique-se do estado da fiação, tomadas e plugues do laboratório.
9. Em caso de não saber usar algum aparelho, utensílio ou equipamento, pergunte para o instrutor.
10. Verificar a existência de Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC) no laboratório, como por exemplo, capela de exaustão, chuveiro de emergência, lavador de olhos, cobertor de segurança e extintor de incêndio no prazo de validade.
11. Conheça o seu laboratório e saiba usar os seus equipamentos de segurança.
12. O laboratório deve possuir sempre disponível kit de primeiros socorros.
13. Deixar sempre disponível (visualmente) telefones de médicos e hospitais que possam prestar atendimento em caso de acidentes.
14. Utilize os Equipamentos de proteção individual (EPIs) e EPCs adequados para cada procedimento no laboratório.
15. Usar avental/jaleco apropriado.
16. Use sempre calçados fechados de tecido não sintético.
17. Use calça que cubra toda a perna.
18. Os cabelos compridos devem ser mantidos sempre presos.
19. Evite o uso de adornos pessoais, como brincos, pulseiras, anéis e colares, entre outros.
20. Não usar lentes de contato.

Durante o experimento:

21. Manter a bancada do laboratório sempre organizada deixando somente o material que está sendo utilizado.
22. Verifique constantemente as vidrarias utilizadas no laboratório; em caso de trincas ou material excessivamente arranhado e defeituoso, não o utilize e descarte-o adequadamente.
23. Use apenas materiais limpos.

24. Todos os produtos químicos devem estar devidamente rotulados.
25. Deixar sempre os frascos de reagentes tampados.
26. Leia cuidadosamente o rotulo no frasco do reagente desejado.
27. Nunca abra um frasco antes de ler o rótulo.
28. Nunca trabalhe com inflamáveis próximos a chama ou expostos ao sol.
29. Adicione sempre ácidos à água e nunca o contrário.
30. Nunca retorne reagentes para os seus frascos de origem.
31. Nunca pipetar diretamente do frasco do reagente. Verter uma quantidade aproximada para um recipiente adequado, para posteriormente ser pipetado/ medido a quantidade necessária. A sobra não deverá ser retornada ao frasco.
32. Nunca retirar reagente diretamente do frasco para pesagem. Sempre colocar a quantidade aproximada em um recipiente para posterior pesagem.
33. Nunca pese material diretamente sobre o prato da balança; use béquer, vidro de relógio ou papel de pesagem.
34. Não leve as mãos na boca ou nos olhos quando estiver manuseando produtos químicos.
35. Se qualquer produto químico for derramado, lave o local com bastante água imediatamente.

Após o experimento:

36. Colocar os lixos em recipientes adequados de acordo com sua classificação.
37. Materiais perfurocortantes devem ser descartados em recipientes adequados.
38. Nunca despeje resíduos na pia, utilize sempre recipientes adequados e identificados com as substâncias presentes.
39. Após o encerramento do experimento, todos os materiais utilizados deverão ser limpos, secos e guardados em local apropriado.
40. Não deixe aparelhagem alguma em funcionamento sem a supervisão de alguém.

41. Lave bem as mãos ao deixar o laboratório.

42. Ao retirar-se do laboratório, verifique se todos os aparelhos estão desligados e se há torneiras de água ou gás abertas.

2.1.2 Principais Vidrarias que Compõe o Laboratório

O laboratório é um local que possui diversos tipos de vidrarias, materiais e equipamentos, que apresentam a finalidade de proporcionar uma maior precisão e exatidão em estudos e análises realizados neste ambiente.

Os laboratórios normalmente possuem uma grande quantidade de objetos elaborados em vidro e, desse modo, requerem um cuidado especial ao manuseá-los para que acidentes sejam evitados. Para isso, devemos nos familiarizar com estes objetos, conhecendo suas formas e modo de utilizá-los.

A seguir veremos as principais vidrarias que compõem um laboratório e suas principais funções. Estes itens básicos são indispensáveis na rotina de trabalho de um laboratório.

1. BALÃO VOLUMÉTRICO - utilizado para preparar e diluir soluções, utensílio já calibrado, utilizado para volumes exatos. Não pode ser aquecido.



2. BALÃO DE FUNDO REDONDO - utilizado para aquecimento de líquidos e reações com desprendimento gasoso.



3. BALÃO DE FUNDO CHATO – utilizado para armazenar e aquecer líquidos ou soluções.



4. BASTÃO DE VIDRO - É utilizado para auxiliar na agitação e transferência de líquidos de um recipiente para outro.



5. BEQUER OU BECKER - É utilizado para preparar soluções em geral, aquecimento de líquidos e entre outros.



6. BURETA – utilizada para análises volumétricas, permitindo o escoamento controlado de líquido através da torneira. Geralmente é utilizada em titulações. Não pode ser aquecida.



7. CONDENSADOR – É utilizado para condensar vapores gerados no processo de destilação ou aquecimento sob refluxo.



8. DESSECADOR – É utilizado para guardar substâncias em ambiente com baixo teor umidade.



9. ERLLENMEYER – É utilizado para titulações, aquecimento de líquidos e dissoluções de substâncias.



10. FUNIL SIMPLES – É utilizado na transferência de líquidos de um frasco para outro ou para efetuar filtrações simples.



11. FUNIL DE SEPARAÇÃO – É utilizado para separar líquidos imiscíveis, abrindo-se a torneira deixando escoar a fase mais densa.



12. KITASSATO – É utilizado para filtrações a vácuo, o frasco possui uma saída lateral.



13. PESA FILTRO – É utilizado para pesar substâncias que sofrem alteração em contato com o meio ambiente.



14. PICNÔMETRO – É utilizado para aferir a massa volumétrica de sólidos ou líquidos.



15. PIPETA VOLUMÉTRICA – É utilizada para medir com precisão e transferir volume de líquidos, equipamento calibrado.



16. PIPETA GRADUADA – utilizada para medir volume variável de líquidos, equipamento calibrado.



17. PLACA DE PETRI – É utilizada para o desenvolvimento de culturas de fungos e bactérias.



18. PROVETA – É utilizada para medir volumes de líquidos sem grande precisão.



19. TERMÔMETRO – É utilizado para medir a temperatura de substâncias ou do ambiente.



20. TUBO DE ENSAIO – É utilizado para realização de reações químicas em pequena escala e em reações em geral. Podem ser aquecidos em movimentos circulares diretamente sob a chama do Bico de Bunsen.



21. VIDRO DE RELÓGIO – É utilizado para analisar e evaporar pequenas substâncias e também para cobrir béqueres e outros recipientes.



3. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA QUALITATIVA EM PLANTAS MEDICINAIS

A fitoquímica é a área responsável pelo estudo dos princípios ativos de drogas vegetais, chamados de metabólitos secundários. Estas substâncias fazem parte do metabolismo das plantas, conferindo proteção para as mesmas, como por exemplo, proteção contra ataques de insetos e herbívoros, contra a radiação ultravioleta, entre outros.

Contudo, é conhecido que os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante, sendo, portanto, sua síntese afetada por condições ambientais. Fatores como sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, radiação ultravioleta, volume hídrico e poluição atmosférica, podem alterar a síntese de metabólitos relevantes para ação farmacológica esperada das plantas medicinais.

A avaliação fitoquímica qualitativa ou triagem fitoquímica preliminar é realizada com o objetivo de detectar de maneira rápida e simples a presença dos diferentes compostos de interesse para prática clínica. Para isso, utilizam-se reações químicas de coloração ou precipitação para a caracterização dos principais grupos de substâncias de interesse. Para cada grupo de metabólitos secundários, existem reações específicas de caracterização já conhecidas, denominadas “Marcha Analítica” (Tabela 1).

Tabela 1. Principais reações químicas para caracterização de metabólitos

GRUPOS DE METABÓLITOS	REAÇÕES QUÍMICAS DE CARACTERIZAÇÃO
Alcalóides	Dragendorff e Mayer
Antraquinonas	Bornträeger
Flavonóides	Shinoda
Heterosídeos Cardioativos	Açúcares: Keller-Kiliani Agliconas: Liebermann-Burchard Anel Lactônico: Kadde ou Balijet
Saponinas	Formação de Espuma e Ação Hemolítica
Taninos	Solução de Gelatina 1% Cloreto Férrico Reação de Stiasny

Fonte: Simões et al., 2017; p. 72

Entretanto, uma das limitações destes ensaios é a possibilidade da ocorrência de reações inespecíficas, podendo gerar resultados falso-negativos ou falso-positivos. Associado a isso, algumas interpretações são subjetivas, pois dependem da avaliação de cor julgada pelo analista. Para contornar esta limitação, sugere-se a realização dos mesmos testes em diferentes dias.

No laboratório de Farmacognosia do Curso de Farmácia do Centro Universitário Urcamp são realizados testes fitoquímicos preliminares para os metabólitos alcalóides, antraquinonas, flavonóides, saponinas e taninos e estarão descritos abaixo.

Além destes testes citados na Tabela 1 podem ainda ser utilizados para a identificação de metabólitos secundários em plantas medicinais as técnicas cromatográficas. Entretanto, as mesmas não serão abordadas neste material visto que não são utilizadas para esta finalidade neste Projeto de Pesquisa.

3.1 Identificação de alcalóides

Os alcalóides formam um grupo heterogêneo de compostos naturais que, normalmente, apresentam uma estrutura complexa. São compostos básicos de origem natural que apresentam nitrogênio na sua estrutura. Muitos autores só consideram como verdadeiros alcalóides os compostos

com nitrogênio em anéis heterocíclicos e como proto-alcalóides os que o possuem numa cadeia lateral acíclica. Sua origem biogenética é normalmente a partir de aminoácidos, mas há vários alcalóides que derivam de terpenos e esteróis, classificados como pseudoalcaloides.

São providos de uma grande atividade farmacológica e toxicológica. Diversos medicamentos utilizados na prática clínica são derivados de alcalóides, como a morfina e seus derivados, a cafeína, teofilina, emetina, atropina, pilocarpina, entre outros.

Os alcalóides dividem-se em várias classes, nomeadamente: alcalóides com grupo amina em cadeia lateral; alcalóides com núcleo pirrolidina, piridina e piperidina; alcaloides com núcleo tropano; alcaloides com núcleo pirrolizidina; alcaloides com núcleo quinolizidina; alcaloides com núcleo quinoleína; alcaloides com núcleo isoquinoleína; alcaloides com núcleo indólico; alcaloides com núcleo imidazol; alcaloides derivados do metabolismo terpênico; alcaloides das Amaryllidaceae; alcalóides betalaínicos e metilxantinas.

3.1.1 Materiais utilizados

- Algodão
- Balança
- Becker 100 mL
- Conta – gotas
- Estante
- Funil
- Placa aquecedora
- Proveta 25mL e 50mL
- Tubo ensaio
- Vidro de relógio (para tampar o bequer)

3.1.2 Reagentes

Ácido sulfúrico 1%.....200 ml*

2 ml de ácido sulfúrico

198 ml de água

*Utilizar capela para o preparo. Armazenar em vidro

Ácido clorídrico 2N.....250 ml*

42 ml de ácido clorídrico

208 ml de água

*Para o preparo (na capela), sempre colocamos a água primeiro que o ácido. Armazenar em vidro

Reagente de Dragendorf

Carbonato de bismuto.....5 g

Iodeto de potássio..... 25 g

Ácido clorídrico conc.....12 ml

Água destilada qsp.....100 ml

Modo de fazer: em banho de gelo, dissolver o carbonato de bismuto em 50 ml de água, adicionando cuidadosamente o ácido; posteriormente acrescentar gradativamente o iodeto de potássio; após completa dissolução, completar o volume para 100 ml com água.

Reagente de Mayer

Cloreto de mercúrio.....1,35g

Iodeto de potássio.....5 g

Água destilada qsp.....100 ml

Modo de fazer: Misturar o cloreto de mercúrio com 60 ml de água; dissolver o iodeto de potássio em 20 ml de água; misturar as soluções e completar o volume para 100 ml com água.

Reagente de Wagner

Iodo.....1 g

Iodeto de potássio.....2 g

Água destilada.....100 ml

Modo de fazer: dissolver o iodeto de potássio em água e acrescentar o iodo.

Reagente de Bertrand

Ácido sílico-túngstico.....5 g

Água destiladaqsp.....100 ml

Modo de fazer: Dissolva 5 g de ácido sílico-túngstico em 100 ml de água.

3.1.3 Técnica

A análise de alcalóides em plantas medicinais está baseada nas propriedades destes compostos apresentarem padrões de solubilidade diferentes, de acordo com o pH ao qual são submetidos. As reações positivas empregando os reagentes abaixo citados só é possível quando tais compostos estão na forma de sal e, devido a isso, utiliza-se soluções ácidas para sua extração.

3.1.3.1 Teste Direto I

Extração:

- colocar 2 g da droga pulverizada em bequer
- adicionar 20 ml de H₂SO₄ a 1%
- ferver por 2 min
- filtrar por algodão
- resfriar o filtrado
- dividir o filtrado tubos de ensaio em número compatível aos reagentes utilizados

Pesquisa direta:

- gotear 1 a 2 gotas dos Reagentes (1 reagente para cada tubo de ensaio) e comparar com branco. O resultado positivo é observado através da formação de

precipitado e de coloração de acordo com a tabela 2.

3.1.3.2 Teste Direto II

Extração:

- pesar 5g da droga vegetal moída (ou 2,5g)
- adicionar 30 ml de ácido clorídrico diluído (2N) (ou 15mL)
- ferver por 2min
- filtre por algodão
- dividir o filtrado em tubos de ensaio em número compatível aos reagentes utilizados

Pesquisa direta:

- gotejar 3 gotas dos Reagentes (1 reagente para cada tubo de ensaio) e comparar com branco. O resultado positivo é observado através da formação de precipitado e de coloração de acordo com a tabela 2.

Tabela 2: Avaliação da presença de alcalóides: reagentes utilizados, composição química e coloração positiva para cada teste.

REAGENTES	COMPOSIÇÃO	COR DO PRECIPITADO
Dragendorff	Iodobismutato de potássio	Alaranjado
Mayer	Iodomercurato de potássio	Branco
Bertrand	Ácidosílico-túngstico	Branco
Bouchardat/Wagner	Iodo-iodeto de potássio	Marrom
Sonnenschein	Ácidofosfomolibdico	Branco
Hager	Ácidopícrico	Amarelo

Fonte: Simões et al., 2017; p. 73

3.1.4 Resultados esperados

Após a realização dos testes de acordo com as especificações no item 4.1.3, deve-se comparar a coloração formada de acordo com o reagente que foi utilizado e comparar com os dados da Tabela 2, para a verificação da indicação da presença de alcalóides na amostra testada.

3.2 Identificação de antraquinonas

As antraquinonas, também conhecidas por antranóides, derivados antracênicos ou derivados hidroxiantracênicos, são uma subclasse dos metabólitos secundários denominados quinonas.

Nas plantas, as antraquinonas são produzidas após a formação das antronas e antronóis, isto por que as antraquinonas são formadas por reações como auto-oxidação das antronas livres ou ainda pela ação de enzimas da própria planta. As antronas que dão origem as antraquinonas, também podem ser transformadas em diantronas e naftodiantronas, no entanto, apenas as antraquinonas é que possuem ação farmacológica (laxativa).

Quanto às propriedades físicos-químicas, de modo geral, as quinonas se apresentam na forma de substâncias cristalinas de coloração amarela até vermelha. As antraquinonas possuem coloração laranja ou vermelha e são as mais estáveis em soluções aquosas acidificadas em relação às diantronas e naftodiantronas.

As antraquinonas hidroxiladas assim como as demais quinonas hidroxiladas em meio alcalino irão produzir o ânion fenoxilato que irão se apresentar em uma coloração purpúrea.

As antraquinonas são empregadas terapeuticamente como laxativos e catárticos, por agirem irritando o intestino grosso, aumentando a motilidade intestinal. Seu uso prolongado não é aconselhável, devido ao aparecimento de reações adversas, como escurecimento da mucosa, atonia, perda de eletrólitos e até mesmo o desenvolvimento de câncer intestinal.

3.2.1 Materiais utilizados

- Balança
- Banho maria
- Becker 100mL
- Estante
- Funil
- Papel filtro

- Pipeta 5mL
- Pipetador
- Proveta 25mL
- Tubo de ensaio
- Vidro relógio (para tampar o bequer)

3.2.2 Reagentes

Etanol 75%.....175 mL

100 ml água + 75 ml etanol

Medir os volumes em proveta graduada. Armazenar em vidro.

Hidróxido de sódio 10%.....50mL

Pesar 5 g NaOH e completar o volume até 50 ml com água em balão volumétrico. Armazenar em recipiente plástico.

3.2.3 Técnica e resultados esperados

A reação de Bornträger é a mais utilizada para detectar a presença de antraquinonas livres em espécies vegetais; ela ocorre com base na alta solubilidade destes compostos em solventes orgânicos apolares que, após a alcalinização, tornam-se vermelhos. Essa cor é decorrente pela ionização das hidroxilas fenólicas.

A Reação de Bornträger direta é frequentemente usada para detecção de antraquinonas livres, onde coloração rósea, vermelha ou violeta é desenvolvida em meio básico.

- Pesar 1g da droga vegetal seca
- Adicionar 20 mL de etanol 75%
- Levar à BM por 2 minutos
- Transferir para 2 tubos de ensaio (branco e amostra) através de filtração em papel filtro.
- No tubo amostra adicionar 5mL da solução de NaOH a 10% e comparar a coloração formada com o tubo branco:

Resultado positivo – coloração rosa, vermelho ou violeta

3.3 Identificação de flavonóides

Os flavonóides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de compostos está amplamente distribuída por todo o reino vegetal e até o presente são conhecidas mais de 8000 variedades de flavonóides. Estão subdivididos em seis classes: flavonas, flavanonas, isoflavonas, flavonóis, flavanóis e antocianinas.

Na natureza podem-se encontrar flavonóides em diversas formas estruturais. Quimicamente, a maioria dos flavonóides baseia-se em uma estrutura fundamental que possui um esqueleto formado por de 15 átomos de carbono constituído por dois anéis de benzeno ligado por meio de uma cadeia três carbonos entre elas e um oxigênio como heteroátomo. Os flavonóides são responsáveis por inúmeras funções nas plantas. Dentre elas, podem-se mencionar a proteção contra raios ultravioleta, contra insetos, fungos, vírus e bactérias, e a capacidade de proporcionarem a atração de animais polinizadores. Além dessas características, muitos desses compostos possuem também importantes propriedades farmacológicas, sendo a mais conhecida, a ação antioxidante.

3.3.1 Materiais utilizados

- Ácido clorídrico pa
- Balança
- Becker 100mL
- Conta-gotas
- Estante
- Funil
- Magnésio metálico (cortado em pedacinhos)
- Papel filtro
- Pinça

- Pipeta 1mL, 2mL, 5mL
- Pipetador
- Placa aquecedora
- Proveta 25mL
- Tubo de ensaio
- Vidro relógio (para tampar o bequer)

3.3.2 Reagentes

Etanol 75%.....175 ml

100 ml água + 75 ml etanol

Medir os volumes em proveta graduada. Armazenar em vidro.

Solução de cloreto férrico 2%.....10 ml

Pesar 0,2 g cloreto férrico e completar o volume até 10 ml com água em balão volumétrico.

Hidróxido de Sódio 5%.....10ml

Pesar 0,5g de hidróxido de sódio e completar o volume com água para 10ml em balão volumétrico.

3.3.3 Técnica e resultados esperados

A reação de Shinoda ou da cianidina é a mais utilizada para analisar este grupo de compostos, visto que as classes de flavonóides de maior ocorrência são sensíveis à técnica. Essa reação tem por base a redução dos derivados flavonoídicos, de cor amarela, em antocianos, com coloração avermelhada.

O processo de redução em geral ocorre no anel C da estrutura dos flavonóis e flavonas, gerando um núcleo antocianico. Além da reação da cianidina, outros ensaios são utilizados para detecção de flavonóides em drogas vegetais, como o reativo de Wilson (reação citro-bórica) ou a reação de Marini Betolo.

Extração:

- Realizar uma decocção com 2g da droga vegetal em 15mL de solução de etanol 75% por 2 minutos;

- Filtrar em papel filtro e reservar o filtrado.

Reação de Shinoda ou de cianidina:

- Em tubo de ensaio colocar 2 ml do extrato e adicionar mais ou menos seis fragmentos pequenos de Mg metálico (na cabine e longe dos olhos);
- Adicionar 1 ml de HCl conc., observando se desenvolve coloração.
- Comparar o resultado de acordo com a Tabela 3

Tabela 3: Reações cromáticas esperadas para a Reação de Shinoda

FLAVONÓIDES	COLORAÇÃO
Flavonas	Laranja
Flavonóis	Vermelho
Flavanonas	Violeta
Chalconas	-
Isoflavonas	-

Fonte: Simões et al., 2017; p. 74

Reação de Cloreto Férrico:

- Diluir o filtrado em água na proporção 1:5 (1 de extrato e 5 de água);
- Deste diluído, retirar 5mL e colocar em outro tubo de ensaio;
- Adicionar pelas paredes 1 gota de solução de Cloreto Férrico 2%, observando a coloração desenvolvida.
- Comparar o resultado de acordo com a Tabela 4.

Tabela 4: Reações cromáticas esperadas para a Reação com Cloreto Férrico

FLAVONÓIDES	COLORAÇÃO
Flavonas	Verde claro
Flavonóis	Verde acastanhado (escuro)
Flavanonas	Verde acastanhado (escuro)
Chalconas	Amarelo
Isoflavonas	Verde

Fonte: Simões et al., 2017; p. 74

Reação de Hidróxido de sódio:

- Diluir o filtrado em água na proporção 1:5;
- Deste diluído, retirar 5mL e colocar em tubo de ensaio;
- Adicionar 1 a 2 gotas de solução de NaOH 5%., observando se desenvolve coloração:

Pesquisa positiva – coloração amarela (flavonas, flavanonas, chalconas e isoflavonas); amarelo escuro para flavonóis

3.4 Identificação de saponinas

As saponinas são glicosídeos de esteróides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura, que possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteróide) e outra parte hidrofílica (açúcares), determina a propriedade de redução da tensão superficial da água e sua ação detergente e emulsificante.

As saponinas em solução aquosa formam espuma persistente e abundante. Essa atividade é igual aos outros detergentes, do fato de apresentarem na sua estrutura, uma parte lipofílica, denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares. A espuma formada é estável à ação de ácidos minerais diluídos, diferenciando-a daquela dos sabões comuns. Essa propriedade é a mais característica desse grupo de compostos, da qual deriva o seu nome (do latim sapone = sabão).

3.4.1 Materiais utilizados

- Balança
- Becker 250mL
- Caneta para vidro
- Conta-gotas
- Estante
- Funil
- Papel filtro

- Placa aquecedora
- Proveta 25mL
- Tubo de ensaio
- Vidro relógio (para tampar o bequer)

3.4.2 Reagentes

Ácido clorídrico 2N.....250 ml*

42 ml de ácido clorídrico

208 ml de água

*Para o preparo (na capela), sempre colocamos a água primeiro que o ácido. Armazenar em vidro

3.4.3 Técnica e resultados esperados

Teste qualitativo de espuma:

O teste de espuma é realizado com o extrato aquoso obtido a partir do decocto do vegetal. Após agitação enérgica do extrato filtrado, em tubo de ensaio, a formação de espuma persistente, que não desaparece com a adição de um ácido mineral diluído, indica a presença de saponinas.

- Realizar uma decocção com 2g da droga em pó com 20mL de água destilada por três minutos
- Filtrar em tubos de ensaio e tampar com papel alumínio
- Agitar energicamente, no sentido vertical por 15 segundos
- Marcar com caneta a altura da espuma
- Deixar a solução em repouso por 15 minutos
- Observar a presença de espuma persistente: Reação positiva (permanência de espuma) ou reação negativa (desaparecimento de espuma)
- Pode-se ainda ser adicionado 2 gotas de Solução de HCl 2N para verificação da espuma estável à ação de ácidos minerais diluídos.

3.5 Identificação de taninos

Os taninos podem ser encontrados abundantemente em várias partes das árvores como: raízes, galhos, folhas, flores, frutos e sementes. Os taninos são classificados em hidrolisáveis e condensados. Os primeiros são constituídos por diversas moléculas de ácidos fenólicos, como o gálico e o elágico, que estão unidos a um resíduo de glucose central. São chamados de hidrolisáveis, uma vez que suas ligações ésteres são passíveis de sofrerem hidrólise por ácidos ou enzimas.

Já os taninos condensados incluem todos os outros taninos verdadeiros. Suas moléculas são mais resistentes à fragmentação e estão relacionadas com os pigmentos flavonoides, tendo uma estrutura “polimérica” do flavan-3-ol, como a catequina, ou do flavan-3,4-diol, da leucocianidina. Em solução, desenvolvem coloração verde com cloreto férrico, assim como o catecol.

Os taninos são adstringentes e hemostáticos e, portanto, suas aplicações terapêuticas estão relacionadas com essas propriedades. São empregados principalmente na indústria de curtume e têm também aplicação na indústria de tintas, uma vez que as substâncias tanantes encontradas nos vegetais apresentam dentre várias propriedades, a de combinarem-se com as proteínas da pele dos animais, tornando-as imputrescíveis.

3.5.1 Materiais utilizados

- Bastão de vidro
- Becker 250mL
- Conta gotas
- Espátula
- Estantes
- Funil
- Papel filtro
- Pipeta 1mL, 2mL, 5mL

- Pipetador
- Placa aquecedora
- Proveta 50mL, 100mL
- Tubos ensaio
- Vidro de relógio (para tampar o bequer)

3.5.2 Reagentes

Acetato de Chumbo 10%.....100 mL

Pesar 10g acetato de chumbo e completar qsp para 100ml com água

Solução de Gelatina 2,5% em cloreto de sódio 5%....10mL

Pesar 0,25g de gelatina e dissolver em solução de cloreto de sódio 0,5% em balão volumétrico de 10mL.

Para preparar a solução de Cloreto de sódio 0,5%: pesar 0,5 g cloreto de sódio e completar até 10 ml de água quente em balão volumétrico.

Cloreto Férrico 2%....10mL

Pesar 0,2 g cloreto férrico e completar o volume até 10 ml com água em balão volumétrico

Ácido acético 10%.....100 mL

Medir 10mL de ácido acético e completar qsp com água para 100mL. Armazenar em líquido.

3.5.3 Técnicas e resultados esperados

Os taninos são substâncias fenólicas complexas, que reagem com aminas, amidos e substâncias protéicas. Os taninos reagem com os aminoácidos da gelatina (prolina por exemplo), pelo grupamento amina, formando precipitado. Também reagem com os alcalóides, pelo fato destes conterem o grupamento amina na molécula (mais especificamente o N); reagem e precipitam com sais metálicos, como chumbo, cobre, zinco, cromo e ferro.

Extração:

- Preparar um decocto (15 minutos) com 5 g da droga vegetal pulverizada com 100 ml de água destilada
- Filtrar em papel filtro e deixar esfriar (solução extrativa A)
- Distribuir o filtrado em tubos de ensaio identificados para cada reação abaixo especificadas, sendo que um tubo será o branco

Reação de Gelatina 2,5%

- Colocar 2 ml da extração A + 2 a 3 gotas de solução de gelatina a 2,5% em solução de cloreto de sódio:

Pesquisa positiva – Formação de precipitado

Reação de Acetato de Chumbo

- Diluir a extração A em água (1:5)
- Adicionar 1 a 2 gotas de solução aquosa de acetato neutro 10%:

*Pesquisa positiva – Formação de precipitado
castanho avermelhado volumoso denso*

3.5.4 Técnicas para diferenciação de taninos

Reação com Cloreto Férrico 2%

- Diluir a extração A em água destilada (1:5)
- Adicionar 1 a 2 gotas da solução de FeCl_3 a 2% e observar a coloração formada:

*Cor Azul: taninos hidrolisáveis ou gálico
Cor Verde: taninos condensados ou catéquico*

Reação de Acetato de chumbo e acetato de etila

- Pipetar em tubo de ensaio 5ml da extração A
- Adicionar 10 ml da solução de ácido acético a 10 % e 5 ml da solução de acetato de chumbo a 10%:

Formação de um precipitado esbranquiçado: presença de taninos hidrolisáveis.

4. AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA QUANTITATIVA EM PLANTAS MEDICINAIS

Conforme já citado anteriormente, a produção de metabólitos secundários pelas plantas está condicionada à fatores extrínsecos (por exemplo, sazonalidade, radiação ultravioleta, qualidade do solo, índice pluviométrico, etc) e intrínsecos (idade da planta, órgão da planta pesquisado, entre outros). Além disso, os métodos de secagem e extração aplicados pelo homem após a retirada da planta da natureza podem afetar a extração e, conseqüentemente, a quantidade dos metabólitos de interesse farmacológico. Assim, a avaliação quantitativa dos metabólitos secundários são de extrema valia, uma vez que podem colaborar para o uso racional de plantas medicinais, a partir da melhor indicação acerca de um preparo mais eficaz para extração a partir do doseamento de substâncias necessárias para a ação farmacológica

A população faz uso de plantas medicinais in natura e também adquiridas em diferentes comércios locais, como em erveiros, farmácias e mercados. Portanto, avaliar a quantificação de metabólitos secundários é uma forma de avaliar a qualidade do material que está sendo adquirido. Várias são as metodologias que podem ser empregadas para a quantificação/doseamento de metabólitos secundários em plantas medicinais. Dentre elas, podemos citar os métodos cromatográficos através de suas diferentes fases móveis e estacionárias e também os métodos espectrométricos, os quais serão abordados neste material.

Dentre as cromatografias, a Cromatografia Líquida que Alta Eficiência (CLAE ou em inglês, HPLC, High Performance Liquid Chromatography) e a Cromatografia gasosa (CG) são as técnicas analíticas mais descritas na literatura para análise de produtos naturais. Isso é decorrente à alta especificidade de ambas técnicas, pela amplitude de amostras passíveis de análise, pela grande possibilidade de doseamento de diferentes compostos de interesse e também por serem as mais utilizadas pelos códigos farmacêuticos oficiais mundiais, incluindo a Farmacopéia Brasileira (SIMÕES et al., 2017).

Outro métodos muito utilizados na quantificação de metabólitos

e na controle de qualidade de plantas medicinais são os métodos espectroscópicos. A sensibilidade e a seletividade destes métodos são dependentes tanto da concentração da amostra como da estrutura química da mesma.

Na avaliação de amostras de extratos com plantas naturais, que podem ser obtidos por diferentes métodos e veículos, um dos métodos muito utilizados é a Espectrometria de absorção no UV-visível, que é também conhecida como fotometria clássica, e mesmo sendo uma técnica antiga, a mesma vem sendo aperfeiçoada e continua sendo uma ferramenta muito útil, tanto na quantificação como no controle de qualidade.

O método espectrofotométrico emprega basicamente as propriedades dos átomos e moléculas em absorver e emitir energia eletromagnética. Portanto, essa técnica quantifica as classes ou princípios ativos, por meio de luz de soluções coloridas.

Cada amostra absorve uma quantidade de luz em um determinado comprimento de onda. Portanto, é necessário encontrar o melhor comprimento de onda para se fazer a análise. Este comprimento de onda, pode ser obtido com uma solução da amostra em análise, realizando uma varredura nos comprimentos de onda da região do visível (380 – 700 nm), sendo que o comprimento de onda escolhido, será aquele que se obtiver o máximo de absorbância.

4.1 Procedimentos para utilização do Espectrofotômetro

O aparelho de UV-Visível que temos em nosso laboratório é manual. Já existem vários aparelhos mais modernos, porém este que temos é eficaz para as nossas análises. O funcionamento dele é bem simples, porém devemos seguir algumas regras para o melhor funcionamento do mesmo, que estão descritas abaixo:

- Ligar o aparelho uma hora antes da realização das análises para que o mesmo estabilize;
- Após esperar o tempo acima mencionado, selecionar o comprimento de onda a ser utilizado na análise. A seleção será feita pelas teclas

frontais do aparelho (▲▼);

- Selecionar o modo de análise: devemos apertar na tecla “MOD” até aparecer “ABS”, sendo que a resposta da análise será obtida em absorbância;
- Zerar o aparelho. Este procedimento será realizado com água: devemos colocar água destilada na cubeta, e a mesma introduzida no compartimento para cubeta, dentro do aparelho. Sempre devemos ter o cuidado de limpar as paredes da cubeta e a posição que a mesma deve ser colocada (parte não fosca deve ficar na direção da passagem da luz que será emitida pelo aparelho).
- Fechar a tampa do compartimento onde fica a cubeta, e apertar no botão “100% T”. Isso quer dizer que na água, estaremos transmitindo 100% da luz e nada está sendo absorvido.

Realizados esses passos, o aparelho está zerado e pronto para ser utilizado nas análises. Cabe ressaltar que estes passos devem ser realizados sempre que fizermos qualquer análise.

4.2 Doseamento de polifenóis

Um dos grupos de metabólitos secundários de grande importância, encontrados em plantas, são os compostos fenólicos. Esses compostos podem ser divididos em diversas categorias. Dentre elas, podemos citar os fenóis simples, ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas. Esses compostos podem atuar na defesa da planta frente as diversas formas de agressão ambiental. Na prática clínica, diversos benefícios podem ser relatados, sendo o de maior expressão, a ação antioxidante.

O teor de polifenóis totais é determinado pelo método de Folin-Ciocalteu adaptado de Singleton e Rossi (1965). Devemos preparar um extrato, que deve seguir uma metodologia descrita para a planta em análise e determinada em conjunto com os professores que atuam no projeto.

As análises devem ser realizadas em triplicata. Para cada amostra

deverá ser preparada uma solução de branco, onde o mesmo contém todos os reagentes com exceção da amostra.

4.2.1 Materiais utilizados

- 4 frascos de 10 mL âmbar (3 para amostra, 1 para o branco) com tampa lacre. Já devem ser codificados;
- Pipeta volumétrica de 5 mL (para medir a água destilada);
- Micropipeta de 1000 uL (para pipetar a amostra);
- Micropipeta de 500 uL (para pipetar o reagente Folin-Ciocalteu);
- Micropipeta de 1000 uL (para pipetar a solução de carbonato de sódio);
- Balão Volumétrico de 50 mL (para preparar a solução de carbonato de sódio);
- Água destilada;
- Reagente Folin-Ciocalteu P.A.;
- Solução de carbonato de sódio 5% preparado no dia.

4.2.2 Reagentes

Solução de carbonato de sódio 5% (Na_2CO_3) 5%50 mL

Pesar em balança semi-analítica 2,5 g do reagente P.A. carbonato de sódio e colocar o mesmo em um balão volumétrico de 50 mL e completar o volume com água destilada. Agitar até completa dissolução do reagente.

4.2.3 Procedimento experimental

Preparo das soluções para análise no UV-Visível

- Em cada frasco âmbar (3 frascos, com exceção do branco) adicionar 5mL de água destilada, 1000 μL de amostra e 500 μL do reativo de Folin-Ciocalteu.
- Deixar em repouso por três minutos.
- Adicionar 1,0 mL de carbonato de sódio 5% em cada frasco âmbar;
- Agitar e deixar de repouso por trinta minutos para que ocorra a reação;

Para o preparo do “Branco”, utilizaremos a mesma sequência

descrita acima, porém o volume do extrato será substituído pelo mesmo volume em água destilada (1000 µL).

Leitura no espectrofotômetro:

- Realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 725 nm, das amostras e do branco;
- Após cada leitura, lavar a cubeta com água destilada e depois ambientar com a solução que será analisada. E sempre tomar o cuidado de que a cubeta está limpa nas laterais não foscas, pois até as digitais da mão influenciam na leitura.
- Anotar os resultados achados (absorbâncias) para cada amostra e depois descontar o valor do Branco.

Os resultados anotados serão expressos em µg de ácido gálico por mL de amostra. Para isso, há uma curva padrão com concentrações conhecidas de ácido gálico, pré-estipulada pelas professoras.

4.3 Doseamento de Flavonóides Totais

O doseamento de flavonóides totais é realizado de acordo com a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira IV (2002) para calêndula, com modificações. De acordo com Woisky e Salantino (1998), o emprego do cloreto de alumínio em solução metanólica para fins quantitativos resulta em uma técnica muito precisa, evitando-se a interferência de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais.

As análises serão realizadas em triplicata e também será necessário o preparo de um branco, que possui todos reagentes, menos a presença da amostra.

4.3.1 Materiais utilizados

- 4 balões volumétricos de 10 mL;
- Micropipeta de 500 uL (para a solução de cloreto de alumínio);
- Micropipeta de 1000 uL e 500 uL (para solução de ácido acético);

- Balão volumétrico de 25 mL;
- Pipeta graduada de 5 mL;
- Proveta de 100 mL.

4.3.2 Reagentes

Solução de Cloreto de alumínio 2% (m.v-1).....25 mL

Obs: Deve ser preparado no dia do experimento

- Secar o cloreto de alumínio em estufa à 100 graus por 2 horas (cloreto de alumínio é muito higroscópico);
- Pesar em balança semi analítica 0,5 g de cloreto de alumínio seco; passar para um balão volumétrico de 25 mL e completar o volume com metanol (álcool metílico). Cobrir o balão volumétrico com papel alumínio, para evitar que o mesmo reaja com a luz;

Solução metanólica de ácido acético 5% (v.v-1).....100 mL

- O preparo deve ser realizado na capela de exaustão;
- Medir com uma pipeta graduada 5 mL de ácido acético e vertes sobre 95 mL de metanol (álcool metílico) dentro de uma proveta de 100 mL, sob agitação constante;
- Passar a solução para um frasco de vidro, rotular e reservar;

4.3.3 Procedimento experimental

Preparo das amostras para a análise de Flavonóides por UV-Viasível

- Colocar papel alumínio nos balões volumétricos que serão utilizados para a análise, inclusive o balão onde será preparado o branco;
- Rotular os balões;
- Pipetar em cada um dos três balões 5 mL de amostra.
- Pipetar 500 uL de solução metanólica de cloreto de alumínio 2% (m.v-1) e adicionar aos balões volumétricos com a amostra;
- Completar o volume dos balões com solução metanólica de ácido acético 5% (v.v-1);

- Tampar os balões, agitar os mesmos e deixar em repouso por 30 minutos;

Para o preparo do Branco: para cada amostra preparar um branco, transportando-se uma fração de 5 mL da amostra e ajustando-se o volume para 10 mL com solução metanólica de ácido acético a 5% (v.v⁻¹).

Leitura no espectrofotômetro:

- Realizar a leitura da absorbância em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 425 nm, das amostras e do branco;
- Após cada leitura, lavar a cubeta com água destilada e depois ambientar com a solução que será analisada. E sempre tomar o cuidado de que a cubeta está limpa nas laterais não foscas, pois até as digitais da mão influenciam na leitura.
- Anotar os resultados achados (absorbâncias) para cada amostra e depois descontar o valor do Branco.

Os valores achados serão colocados em uma curva de calibração com quercetina submetida à regressão linear. O teor de flavonóides será expresso em µg de quercitina por mL de amostra.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. Z. **Plantas Medicinais**. 2. ed. Salvador : EDUFBA, 2003, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, 2009. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2014/maio/07/renisus.pdf>. Acesso em 16 set 2020.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 96 p. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_praticas_integrativas_complementares_2ed.pdf>. Acesso em 20 jun 2020.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CONSTANTINO, M.G.; SILVA, J. V. G.; DONATE, M, P. **Fundamentos de Química Experimental**. São Paulo: EdUSP, 2. ed. 2004.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4.ed. v. 2, São Paulo: Atheneu, 2002.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Ribeirão Preto – SP, Brasil. **Quim. Nova**, V. 30, N. 2, p374-381, 2007.

LORENZI, H., MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP : Instituto Plantarum, 2ed., 2008.

HECK, R. M.; RIBEIRO, M. V.; BABIERI, R. L. **Plantas Medicinais no Bioma Pampa no cuidado em saúde**. Brasília: EMBRAPA, 2017, 155p.

IBGE. **Biomass brasileiros**. Disponível em: <<https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18307-biomass-brasileiros.html>> Acesso em jun 2020.

MOUCO, G.; BERNARDINO, M. J; CORNÉLIO, M. Controle de qualidade de ervas medicinais. **Revista Biotecnologia Ciência e**

Desenvolvimento. p. 68-73, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE/UNICEF. **Cuidados Primários de Saúde.** Relatório da Conferência Internacional sobre Cuidados Primários da Saúde, Alma-Ata, URSS, 6 a 12 de setembro de 1978. Brasília: Ministério da Saúde, 1979. 64p.

SIMÕES, C. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** 1ª ed. Porto Alegre: Editora UFRGS 2017, 502p.

SINGLETON, V.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Society for Enology and Viticulture.** V. 16, N. 3, p:144-58. 1965.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. **Normas de segurança no laboratório.** 2009. Disponível em: http://www.sbfagnosia.org.br/Ensino/Normas_de_seguranca.html Acesso em ago 2020

SOUZA. **Equipamentos e vidrarias de laboratório.** Disponível em: http://alfaumuarama.com.br/prevestibular/download.php?nome=EQUIPAMENTOS%20E%20VIDRARIAS%20DE%20LABORATORIO%20-27-03-2012.pdf&arquivo=aluno_online/arquivos/EQUIPAMENTOS%20E%20VIDRARIAS%20DE%20LABORATORIO%20-27-03-2012.pdf. Acesso em Ago/20.

TRINDADE et al. Triagem fitoquímica e avaliação do potencial antibacteriano de extratos das folhas de *Plantago major* L. **Revista de Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde.** v. 9, n. 1, 2019, p. 41-48.

WOISKY, R.G.; SALANTINO, A. Analysis of propolis: parameters and procedures for chemical quality control. **J. Apic. Res.,** v.37, n.2, p.99-105, 1998.



M
I
S
S
Ã
O

Produzir e socializar o conhecimento para a formação de sujeitos socialmente responsáveis que contribuam para o desenvolvimento global.

