UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICA

FARMACOGNOSIA

Extração, Isolamento e Caracterização dos Constituintes Químicos das Drogas de Origem Vegetal

Profª Drª MARIA DE FÁTIMA VANDERLEI DE SOUZA



- **Núcleo de Estudos e Pesquisa em**
  Homeopatia e Fitoterapia;
- **PET-Farmácia (Programa de Educação Tutorial); e**
- **Laboratório de Tecnologia Farmacêutica**

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

Prof. Delby Fernandes de Medeiros



- Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos

INTRODUÇÃO

Conceitos importantes:

- Droga: qualquer substância, de origem animal, vegetal ou mineral, utilizada para determinado fim;
- Constituintes químicos: são os metabólitos que compõem as drogas (plantas), tendo ou não atividade farmacológica;
- Princípio ativo: é o constituinte químico responsável pela atividade farmacológica.

Produtos do Metabolismo Vegetal

Metabolismo primário	Metabolismo secundário
1. **Produto do metabolismo geral de todos os vegetais, com função de crescimento, respiração e fotossíntese.** 2. **Amplamente distribuídos nas plantas** 3. **Exemplos: Aminoacidos, proteínas, hormônios**	1. **Produto do metabolismo especial. relacionado com o processo de defesa das espécies** 2. **Com distribuição restrita nas plantas** 3. **Exemplos: flavonóides, alcalóides....**

Metodologia Direcionada ao Estudo Químico dos Produtos Naturais

Estudo Fitoquímico: Escolha da planta_

- Informações obtidas a partir da medicina popular;
- Dados quimiotaxonômicos;
- Aleatoriamente.

Coleta da amostra

- Conhecer botanicamente a droga (Vegetal) a ser estudada;
- Coletar a planta completa ou parte desta;
- Quantidade mínima para estudo.

Classificação Botânica

- Nome científico;
- Sinonímia científica e nome vulgar;
- Preparar e depositar exsicata no herbário.

Revisão bibliográfica_

- Chemical Abstracts;
- Biological Abstracts;
- NAPRALERT; INTERNET

Preparação para análise_

- Secagem do material vegetal;
- Trituração, e
- Preparação dos Extratos e Fases

Métodos de Extração_

1. Extrações caseiras;
2. Extrações em laboratórios de pesquisa.

- Diversos fatores influenciam a extração dos princípios ativos:

a) Estado de divisão da droga;

b) Agitação;

c) Temperatura;

d. Tipo de substância que se deseja extrair;
e. Natureza do solvente;
f. Influência do pH;
g. Tempo de extração.

Extrações Caseiras

- São aquelas que se podem fazer em casa devido à simplicidade do método (formas mais simples de fitoterápicos);

a) **Infusão**: método que consiste em lançar sobre a droga água fervente e deixá-la em recipiente fechado por um certo tempo. O produto final é conhecido como infuso.



b) **Decocção:** consiste em por o líquido em contato com a droga e levá-los à ebulição por um período aproximado de 15 minutos. O produto final é conhecido como cozimento ou decocto.

c) **Garrafada ou vinho medicinal:** consiste em deixar em contato a droga com uma mistura de água e álcool, à temperatura ambiente, por um período mínimo de 24 horas. O produto final chama-se alcoolatura.

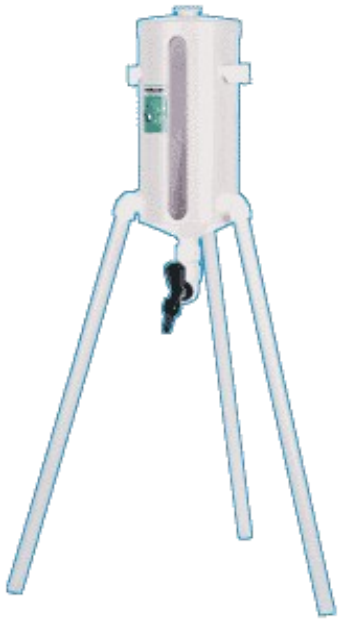
Extrações em Laboratório

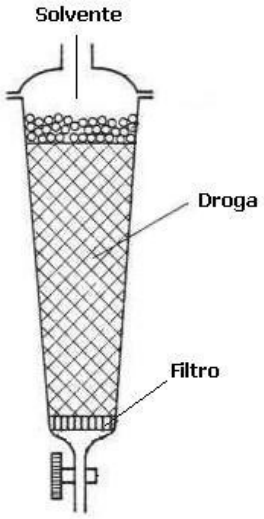
a) **<u>Maceração</u>**: consiste em deixar a droga (seca e pulvarizada) em contato com o solvente, em frasco bem fechado, ao abrigo da luz, à temperatura ambiente, por um período de tempo relativamente longo (48-72 h).



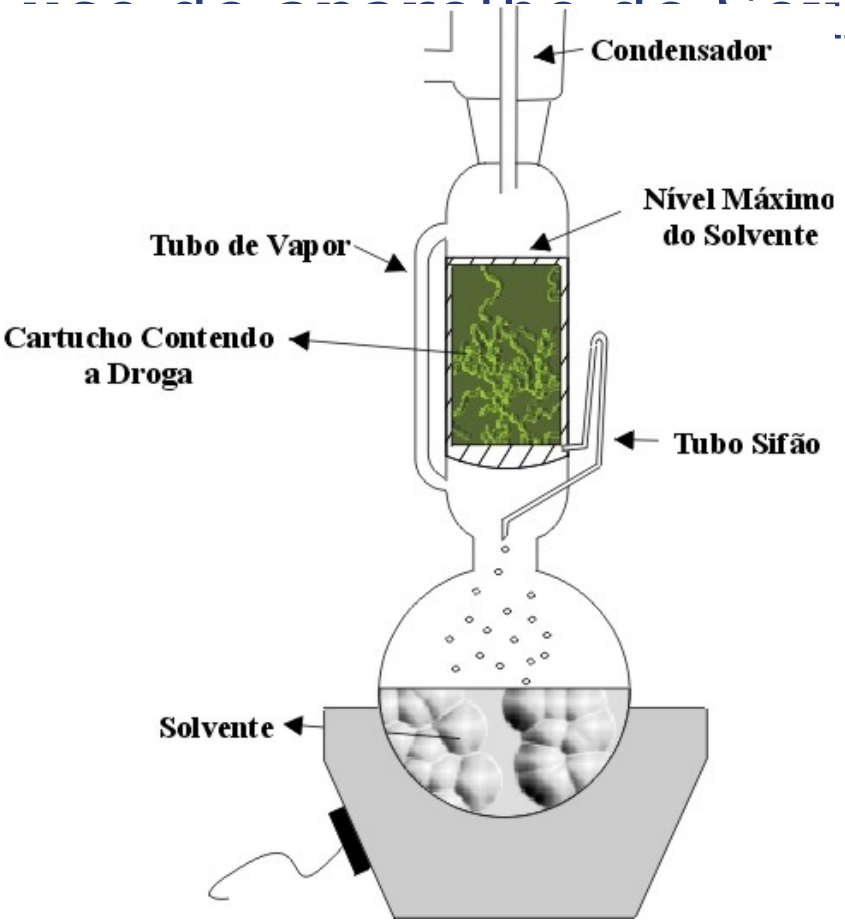
b) **<u>Percolação</u>:** consiste em fazer atravessar o líquido extrator, de maneira sucessiva (continuamente) através da droga pulverizada, à temperatura ambiente, e assim esgotar seus princípios ativos.

- O produto final da percolação é o percolato.

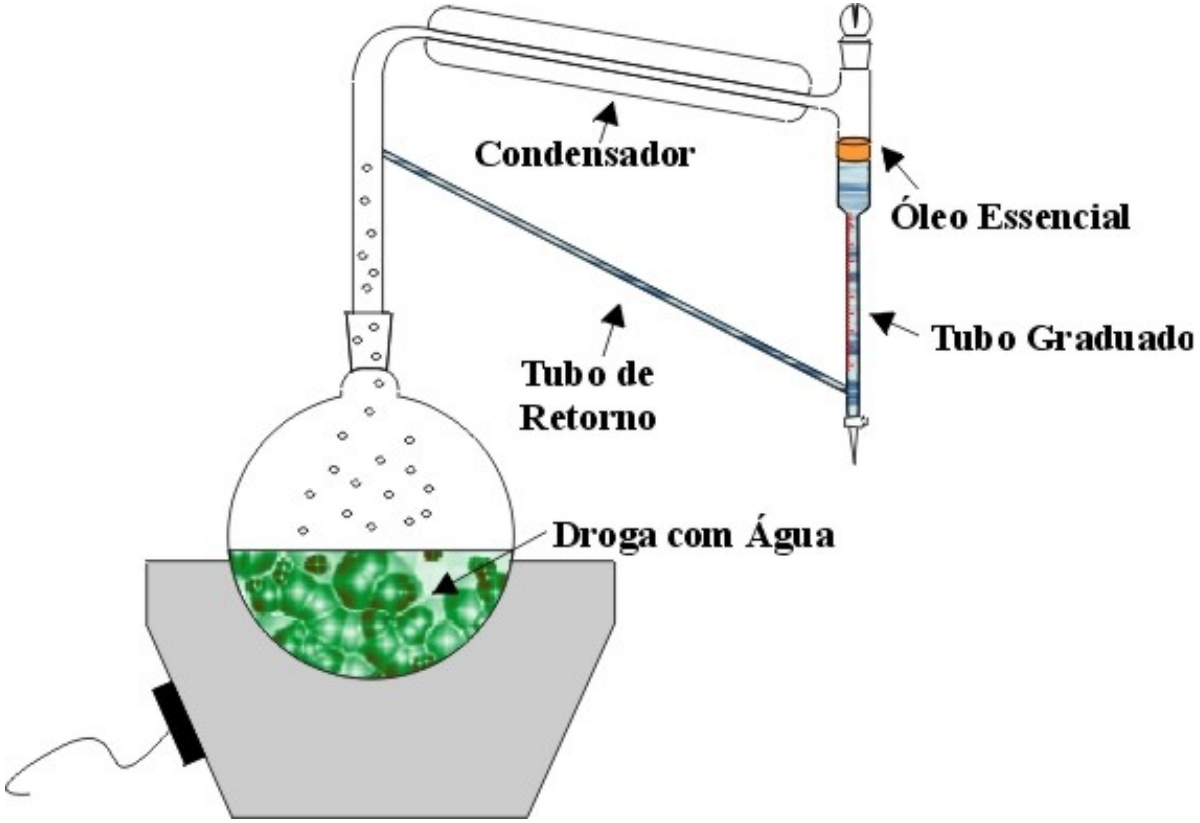




c) **Extração em Soxhlet**: método utilizado para extração dos constituintes químicos de drogas sólidas em solventes voláteis, fazendo uso do aparelho de Soxhlet.



d. **Extração em aparelho de Clevenger (**arraste de vapor d'agua): método específico para substâncias voláteis (óleos essenciais), imiscíveis com a água.



Evaporação do solvente a pressão reduzida

- O produto final do processo de extração deve ser concentrado;

- Aparelho utilizado: rotavapor



- **Vantagens:**

- ✓ Trabalha sob pressão reduzida;
- ✓ Destilação a baixa temperatura;
- ✓ Aumento considerável da superfície de evaporação;
- ✓ Transmissão maior de calor, permitindo destilações à vácuo rápidas, em temperaturas relativamente baixas.

Triagem Fitoquímica_

- Consiste em submeter o Extrato da planta a uma bateria de reações de caracterização de metabólitos secundários, com a finalidade de detectar qual a classe de produto natural presente.

  Vantagens:

- A abordagem fitoquímica, facilita a escolha do material a ser estudado;

- Permite ao pesquisador adaptar as técnicas de fracionamento e isolamento, de acordo com a natureza dos constituintes previamente detectados.

Principais testes de caracterização dos metabólitos secundários:

Constituintes analisados	Testes característicos
Alcalóides	Reagente de Dragendorff Reagente de Bouchardat Reagente de Mayer Reagente de Bertrand
Heterosídeos cardiotônicos	Reação de Kedde e Baljet (cardenolídeos) Reação de Keller-Kiliani (açucares) Reação de Liebermann-Bourchard (núcleo esteroidal)
Flavonóides	Reação de Shinoda ou Cianidina Reação de Wilson
Antraquinonas	Reação de Bomträger
Taninos	Reação com $FeCl_3$ Teste de gelatina (inespecífico) Teste de alcalóide (específico)
Esteróides	Reação de Liebermann-Bouchard
Saponinas	Teste de espuma Teste de hemólise

Pó da Planta

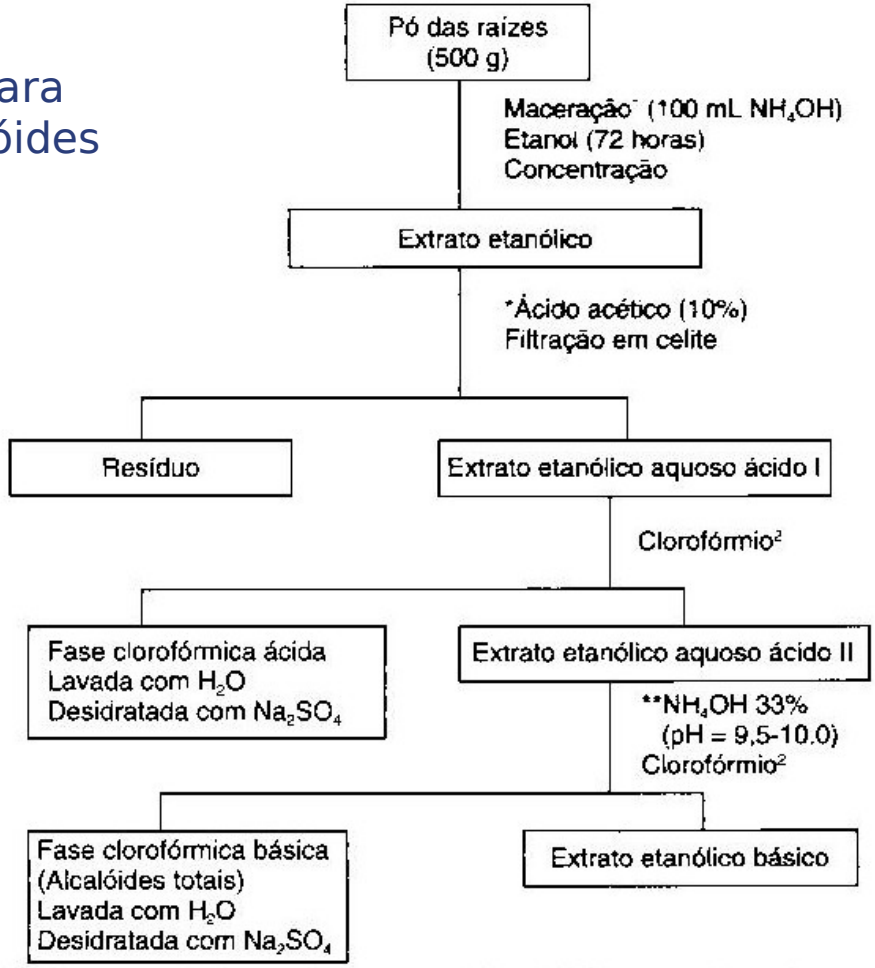
Etanol
Maceração
Concentração

Extrato Etanólico

Partição EtOH : H_2O (7:3)

Solução Hidroalcoólica (Sol HA)

Rota laboratorial para extração dos alcalóides



*Utiliza-se um ácido para formar os sais de alcalóides que não serão extraídos por clorofórmio.
**NH_4OH é utilizado para quebrar o sal de alcalóides, possibilitando assim a extração dos alcalóides livres por clorofórmio.
1 – Extração sólido-líquido.
2 – Extração líquido-líquido.

Separações Cromatográficas

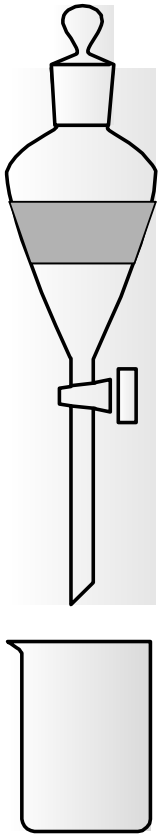
- **Cromatografia** – é um método de análise que separa misturas em seus componentes individuais, baseando-se no "princípio da diferença de velocidade de migração das moléculas através de um caminho com obstáculos".
- **Princípio:** em qualquer sistema cromatográfico existem dois elementos:

  1. Um <u>fixo</u> (fase estacionária), que pode ser constituído de uma substância sólida ou líquida (adsorvente)

  2. Um <u>móvel</u> (eluente). Este eluente pode ser líquido ou gasoso, dependendo do tipo

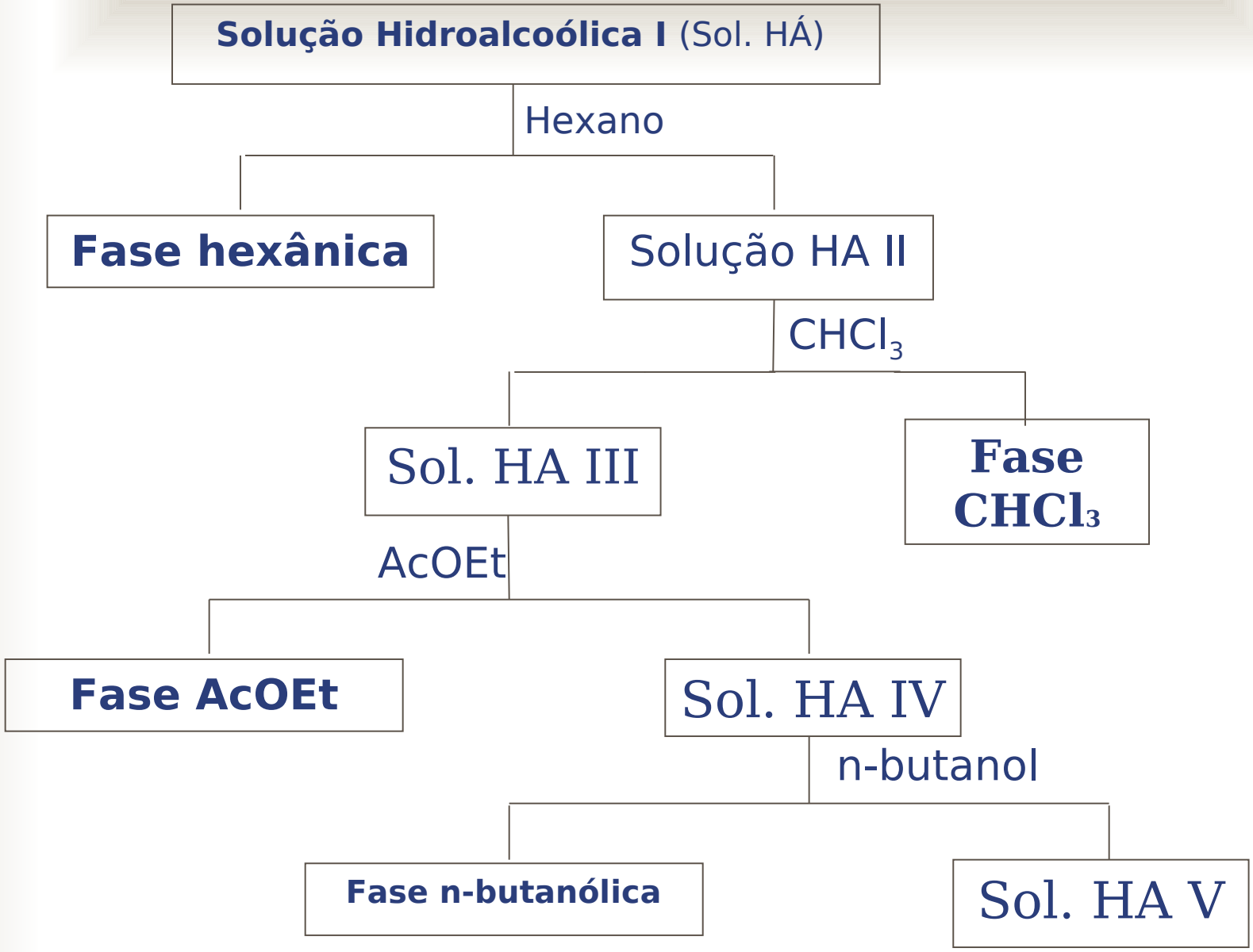
Principais tipos de cromatografia

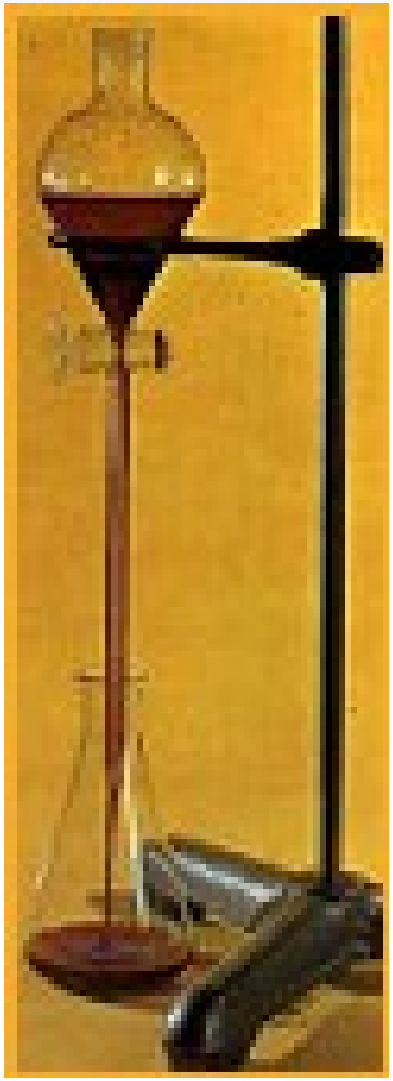
a) **Cromatografia de partição** (líquido-líquido):



- Separação dos componentes de uma mistura com base nos seus coeficientes de partição entre 2 solventes imiscíveis que constituem a fase móvel e estacionária;

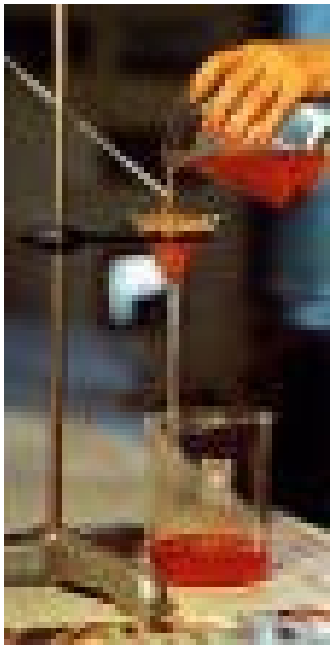
- Para se conseguir uma boa extração, aumenta-se a superfície de contato, agitando a mistura com firmeza.

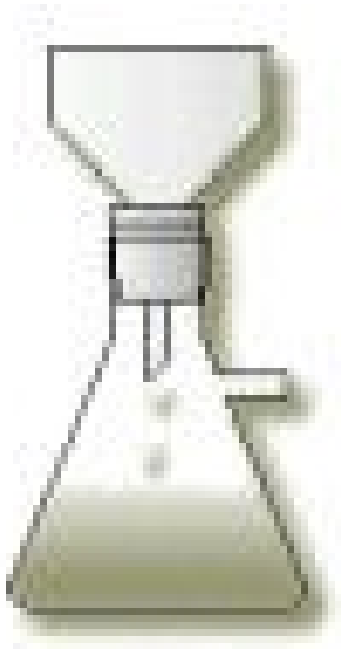

Solução Hidroalcoólica I (Sol. HÁ)
Hexano
Fase hexânica
Solução HA II
CHCl3
Sol. HA III
Fase CHCl3
AcOEt
Fase AcOEt
Sol. HA IV
n-butanol
Fase n-butanólica
Sol. HA V



Métodos de Separação

- Precipitação/ filtração: para sólidos insolúveis;
- A filtração pode ser a frio ou à quente, simples ou por sucção (vácuo).





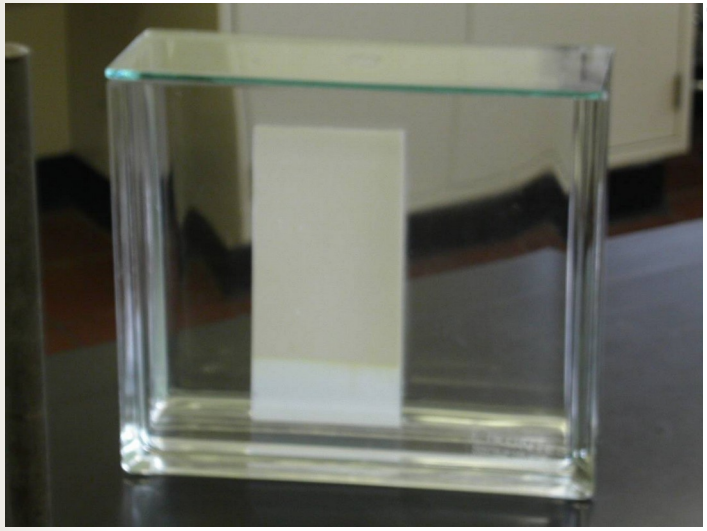
b) **Cromatografia de adsorção**:

- Também conhecida como cromatografia líquido-sólido, é o processo de separação dos componentes de uma mistura, por migração diferencial, no qual a propriedade do soluto responsável pela competição é a ***polaridade***;
- A fase estacionária pode constituir uma superfície plana (CCD ou CP) ou empacotada em coluna (CC, CG, CLAE).

- Adsorventes utililizados: sílica-gel, alumina, terra diatomácea, celulose, etc

b.1) **Cromatografia em camada delgada (CCD):**

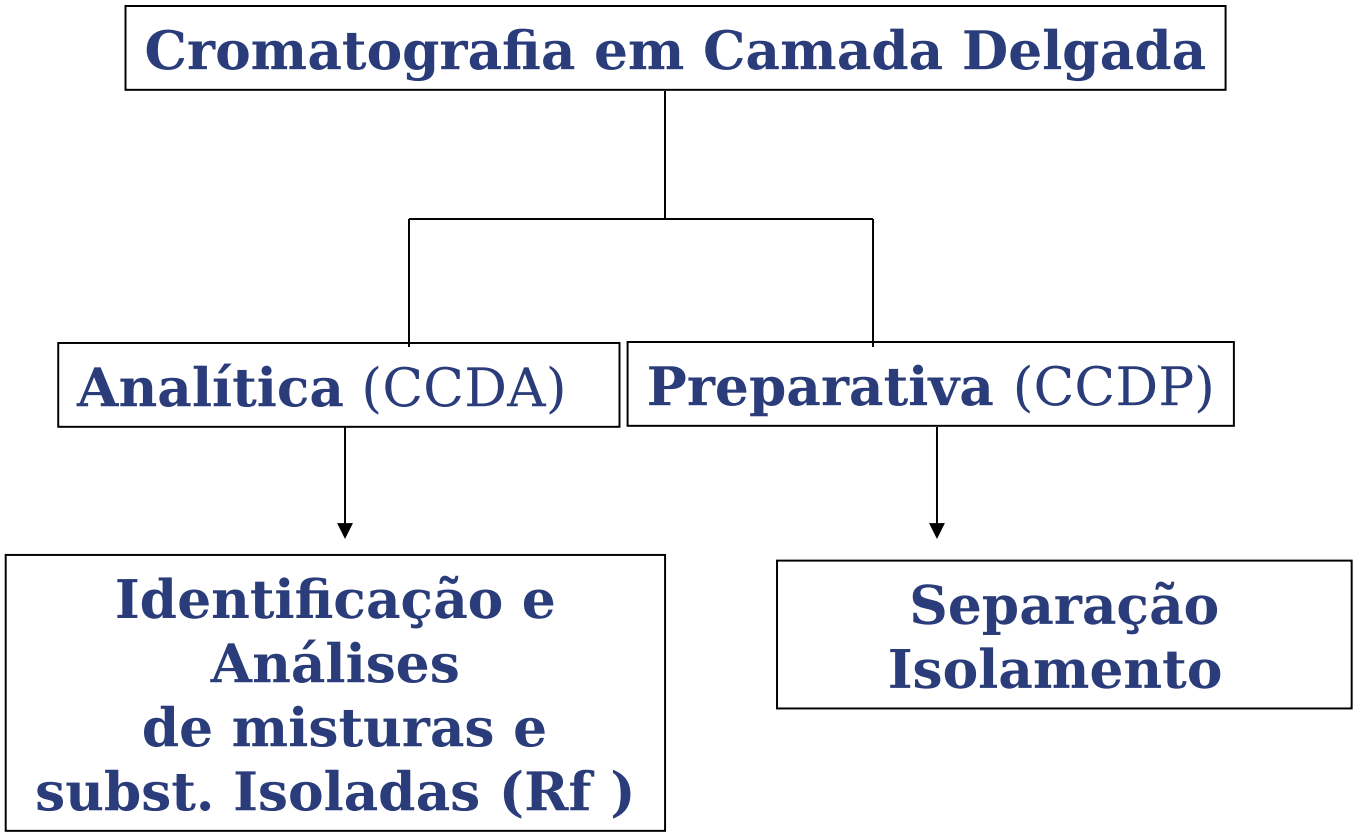
- Consiste na análise dos componentes de uma mistura através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana.





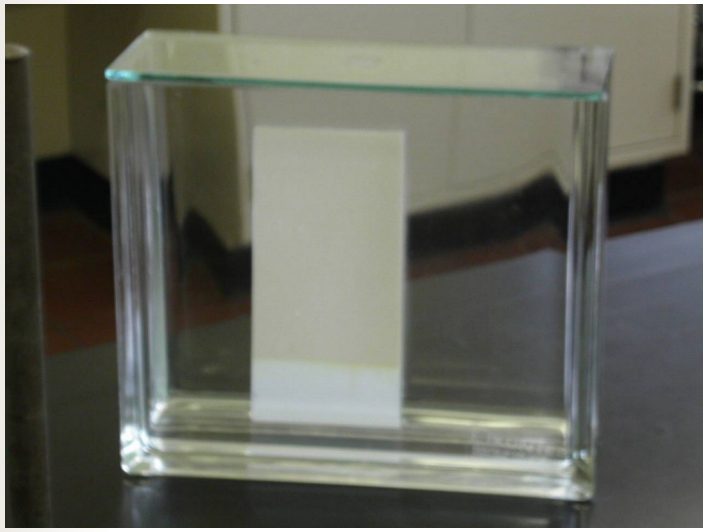
Vantagens (CCD):

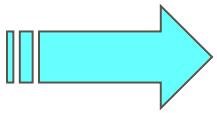
- Fácil compreensão e execução;
- Separações em breve espaço de tempo;
- Versatilidade;
- Grande reprodutibilidade, e
- Baixo custo.


Cromatografia em Camada Delgada
Analítica (CCDA)
Preparativa (CCDP)
Identificação e Análises de misturas e subst. Isoladas (Rf)
Separação Isolamento

Cromatografia em Camada Delgada Analítica

Conceito: método que permite fazer análise ou comparação entre duas ou mais substâncias.

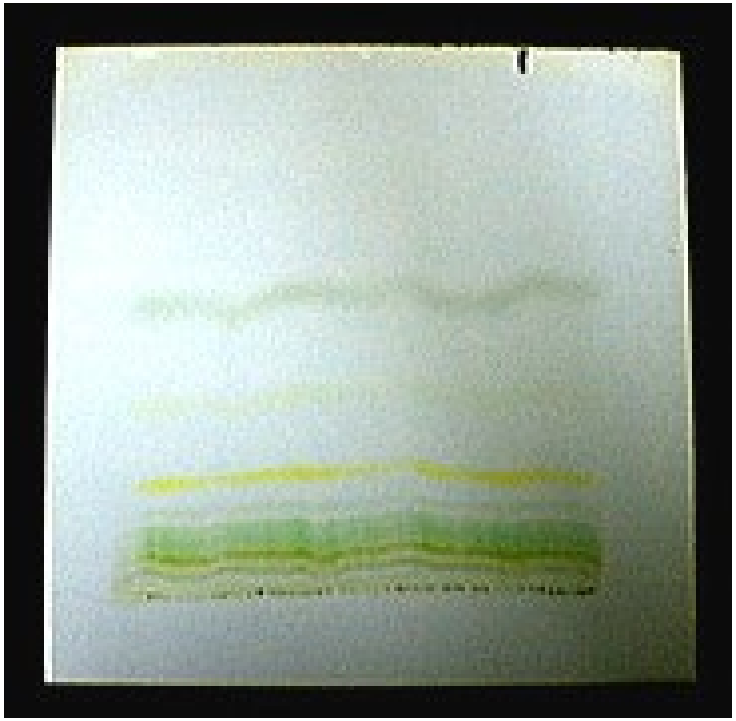




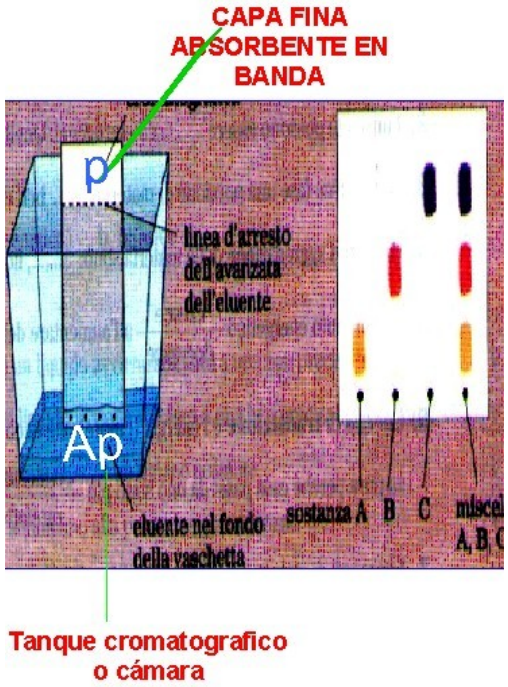


Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

Conceito: método que permite o isolamento e purificação de duas ou mais substâncias presentes em uma pequena quantidade de amostra.



- A análise qualitativa de uma substância realiza-se através de seu fator de retenção (Rf);

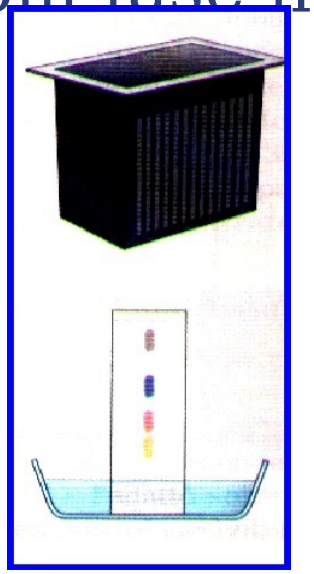


Usos da CCD:

- Reações orgânicas: pureza e acompanhamento da reação;
- Fitoquímica: pureza dos composto, natureza química dos compostos, identificação;
- Fitoterapia: controle de qualidade.

b.2) **Cromatografia em papel (CP):**

- Separação dos componentes de uma mistura, em função do deslocamento diferencial de solutos, arrastados por uma fase móvel, sendo retidos seletivamente por uma fase estacionária líquida (água), na cromatografia com fase normal.



b.2) **Cromatografia em papel (CP):**

- É uma técnica simples;
- Utiliza-se para separação de aminoácidos, pigmentos, misturas de substâncias, etc;
- Utiliza pequena quantidade de amostra (μg ou mg);
- Tem boa capacidade de resolução;
- Pode-se também realizar a análise quantitativa por métodos analíticos: espectrofotometria, microtitulação, microgravimetria, etc;

b.3) **Cromatografia em coluna (CC):**



- Processo de separação dos componentes de uma mistura, por migração diferencial, no qual a propriedade do soluto responsável pela competição é a ***polaridade***;

Escolha de eluentes

- ✓ Deve ser capaz de solubilizar os componentes da mistura a ser cromatografada;
- ✓ Devem ter baixo ponto de ebulição (35-85°C) para que sejam evaporados facilmente;
- ✓ A vazão do eluente pode ser aproximadamente de uma gota por segundo. Não se deve aumentar muito rapidamente a polaridade do eluente para evitar a sobreposição de bandas.

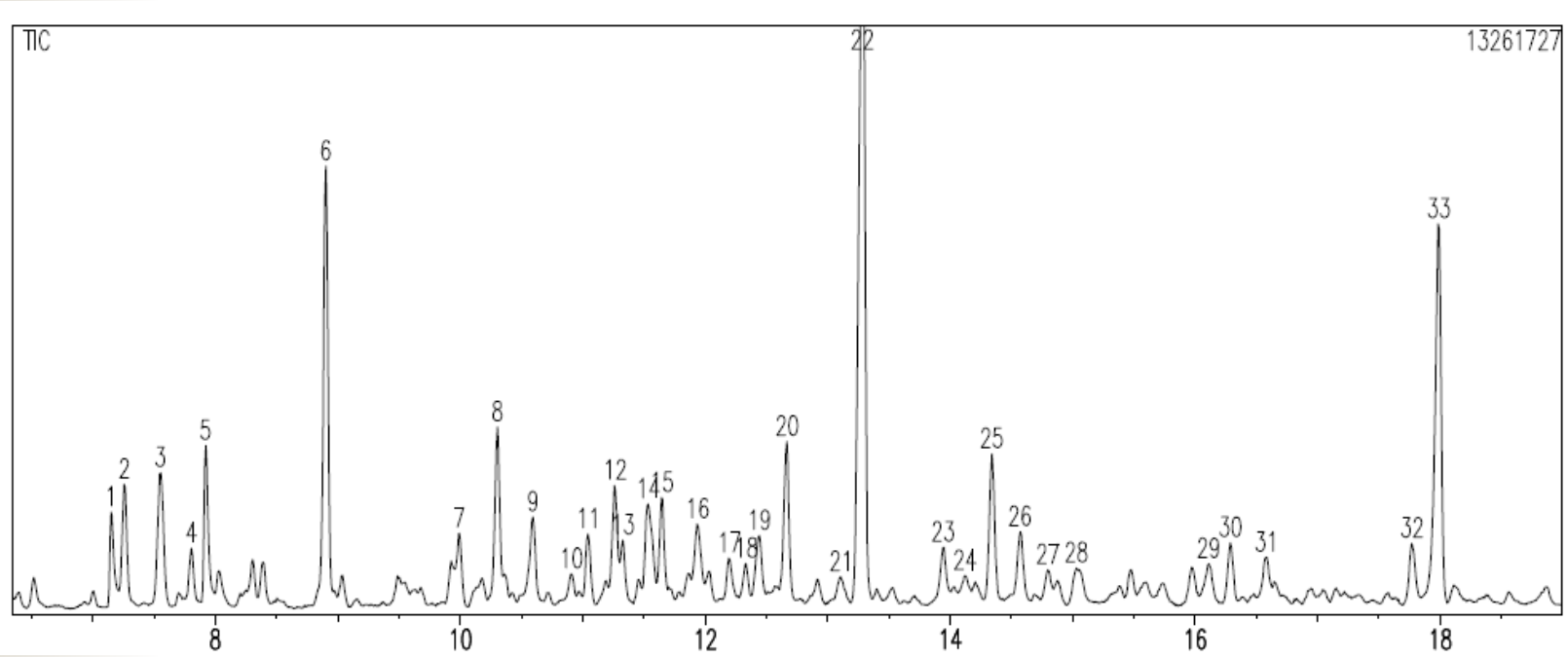
b.4) Cromatografia Gasosa (CG):

- Método de separação dos componentes de uma mistura através de uma fase gasosa móvel sobre um adsorvente estacionário.

- É utilizada para separação de compostos volatilizáveis;

- Nas aplicações analíticas, é possível o acoplamento CG/EM, útil na separação e identificação de estruturas, como por exemplo, de componentes de óleos voláteis.





Cromatograma do óleo essencial das partes aéreas de *Turnera subulata* extraídos por arraste de vapor de água.

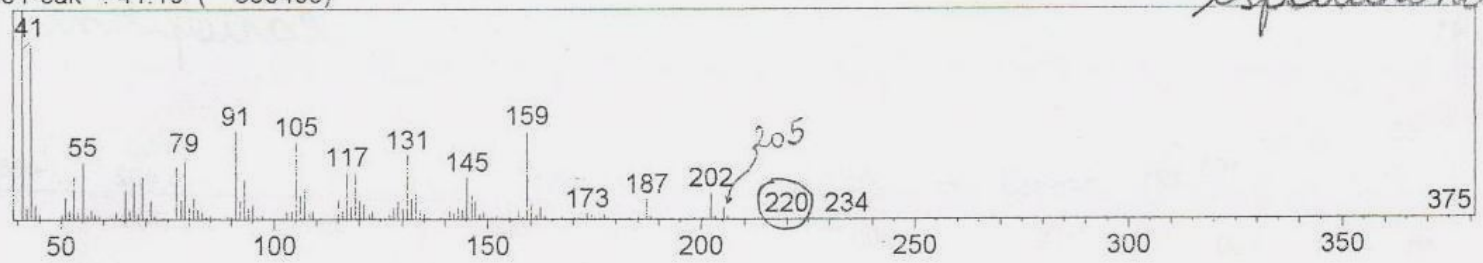
Pico - 25

IKc = 1014

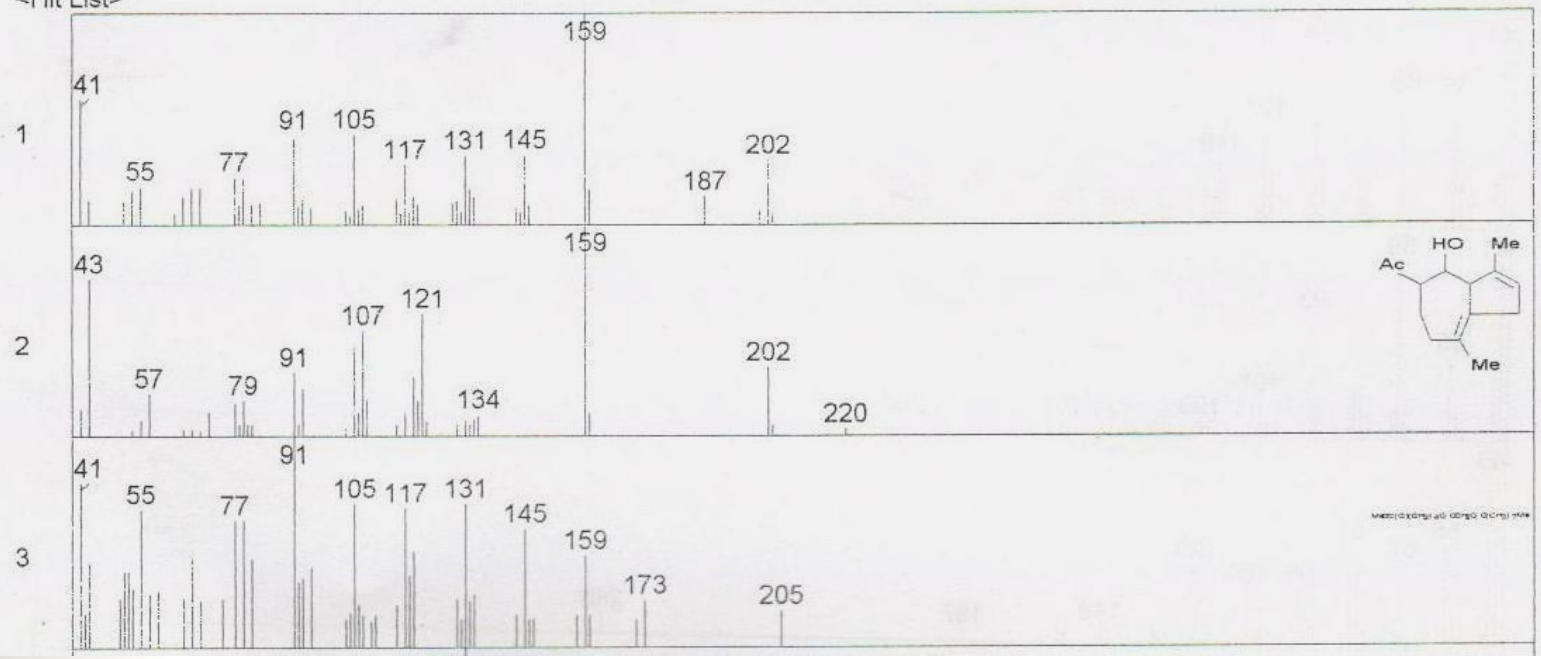
IKL = 1576

espatulenol

<Unknown Spectrum>
Data : MFAT38.D01
Mass Peak # : 142 Ret. Time : 31.625
Scan # : 3172 B.G. Scan # : (2954 - 2985)
Base Peak : 41.10 (390409)



<Hit List>



b.5) Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE ou HPLC):

- Técnica cromatográfica que apresenta um excelente desempenho cromatográfico.

- Utiliza colunas contendo fase estacionária formada por partículas extremamente finas (3 a 10 μm), esféricas ou irregulares, homogêneas e densamente compactadas;

- Requer uma pressão alta, para que a fase móvel flua a uma velocidade razoável através da coluna;


SCL-10A VP
DOVEBID
LOT #
186
LC-10AD VP
A
LC-10AD VP
B
SPD-10A VP
DOVEBID
LOT #
WITH
SIL-10AD VP
HPLC - TEAL
Rubbermaid

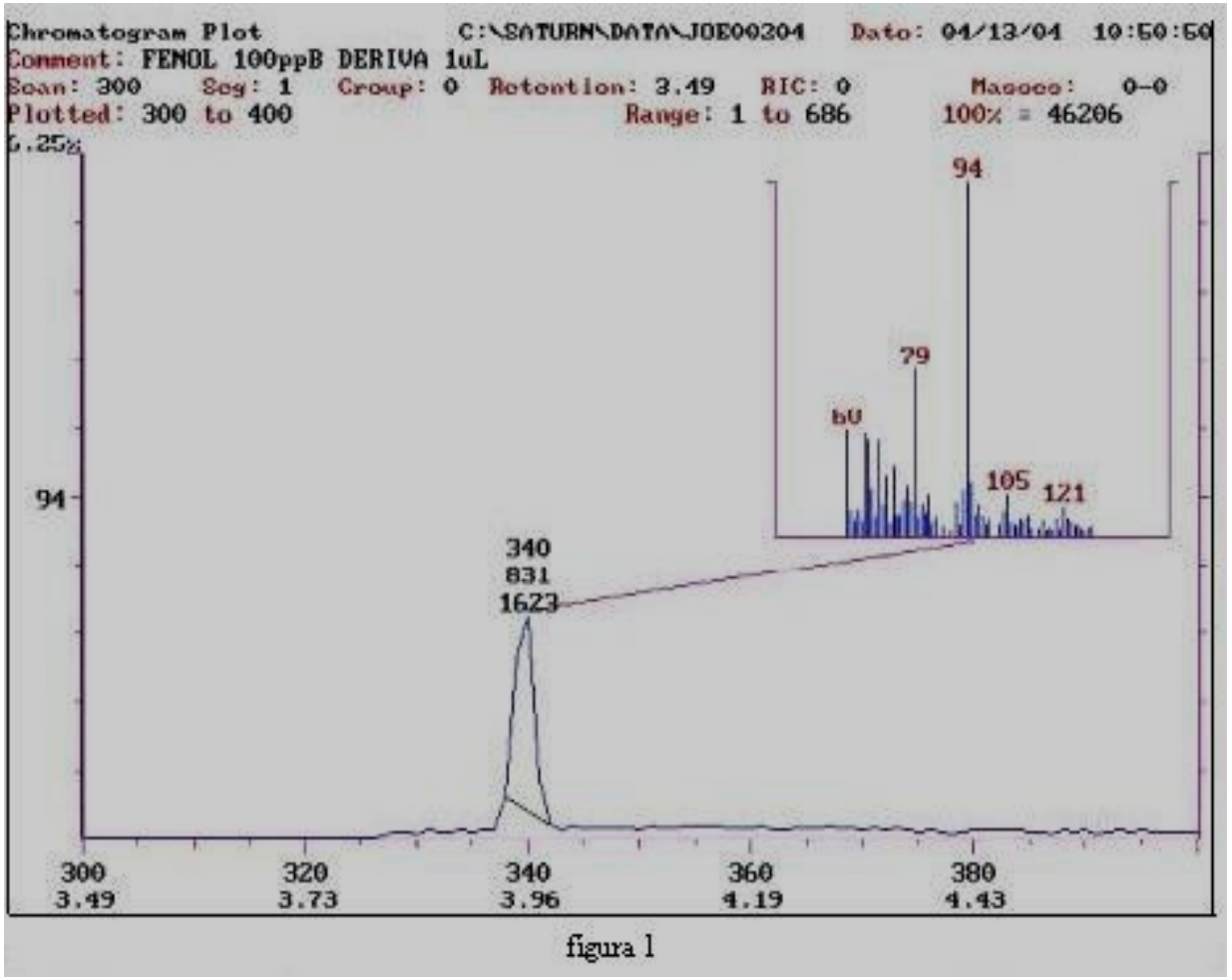
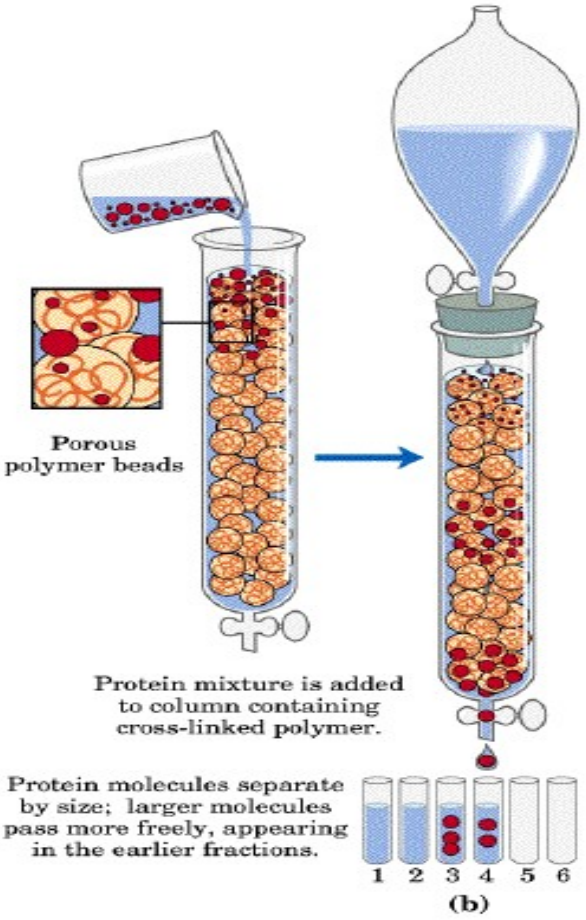

Chromatogram Plot
C:\SATURN\DATA\JOE00204
Date: 04/13/04 10:50:50
Comment: FENOL 100ppB DERIVA 1uL
Scan: 300 Seg: 1 Group: 0 Retention: 3.49 RIC: 0 Masses: 0-0
Plotted: 300 to 400
Range: 1 to 686
100% = 46206
6.25%
94
94
79
60
105
121
340
831
1623
300
3.49
320
3.73
340
3.96
360
4.19
380
4.43

figura 1

Vantagens da CLAE:

- O procedimento é simples e razoavelmente rápido;
- A análise instrumental permite maior resolução, automação de operações, registro e processamento da informação obtida;
- São requeridas apenas pequenas quantidades do material, mas pode-se fazer uso de quantidades maiores;
- O método tem sido utilizado com êxito na

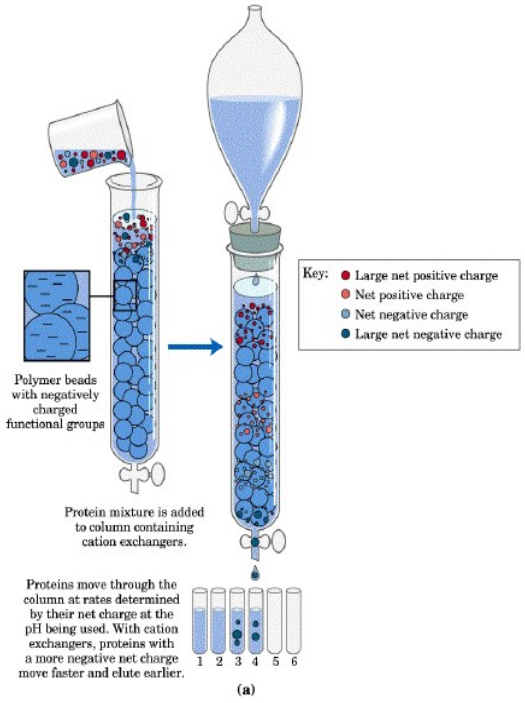
c) **Cromatografia de exclusão ou de filtração molecular**: baseia-se no tamanho das moléculas do soluto que passam através do suporte constituída por um gel poroso.

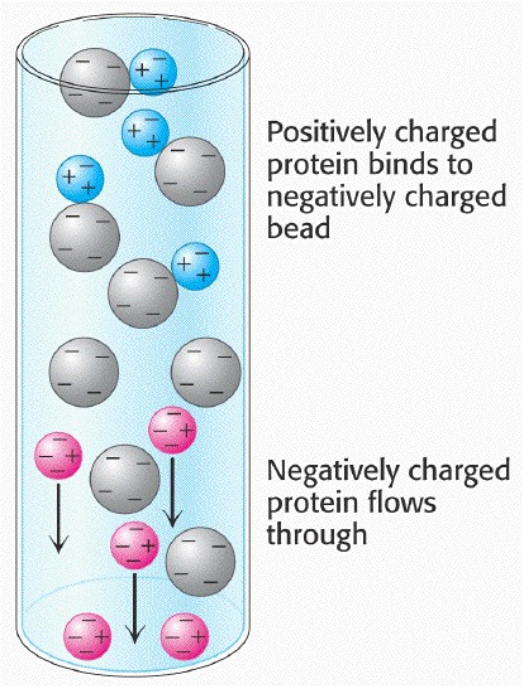


Tem propriedades desejáveis, como:

- ✓ Simplicidade técnica e versatilidade;
- ✓ É possível separar substâncias com massas moleculares abaixo de 1000 ou de vários milhões, variando a matriz do gel;
- ✓ Para este tipo de cromatografia utilizam-se géis derivados do dextrano, como o sephadex.

d) Cromatografia de troca-iônica: baseia-se no intercâmbio de íons entre a fase móvel e a fase estacionária.





Identificação ou Elucidação Estrutural das Substâncias

- Ultravioleta (UV)
- Infravermelho (IV)
- Espectrometria de massas (EM)
- RMN ^{1}H e RMN ^{13}C

Referências:

1. Collins, H.C.; Braga, G.L.; Bonato, P.S. **Introdução a Métodos cromatográficos.** Unicamp, 1997.

2- Matos, F. J. Abreu. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. Ed. Da UFC, 1997.

3- Miriam, de B.F.; Rosana, I. dos S., Claúdia, M.O. **Farmagnosia da planta ao Madicamento**. Ed.da UFSC, 1999.

4- Remolo C.; **Fundamentos da cromatografia**. Ed.Edgard Blucher, 1998.

Trabalhos desenvolvidos pela equipe com espécies da família Malvaceae:

Dissertações defendidas e aprovadas:

- Isolamento e Identificação de Compostos de *Herrisantia tiubae* (K.Schum) Brizicky (Malvaceae) (GOMES, 1998).
- Substâncias Aromáticas de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky, Uma Contribuição para a Fitoquímica (SILVA, 2000).
- Flavonas Isoladas e Identificadas das Partes Aéreas de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (COSTA, 2002).
- Substâncias Esteroidais e Fenólicas de *Sidastrum Paniculatum* (L) Fryxell (Malvaceae) (CAVALCANTE, 2006).

Trabalhos desenvolvidos pela equipe com espécies da família Malvaceae:

Teses defendidas e aprovadas:

- Estudo Fitoquímico de Duas Espécies da família Malvaceae: *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky e *Sida galheirenses* Ulbr (SILVA, 2004).

- Constituintes Químicos de Duas Espécies de Malvaceae: *Herissantia crispa* e *Backeridesia pickelli* (COSTA, 2006).

Teses em desenvolvimento:

- Estudo fitoquímico da espécie *Sidastrum paniculatum* (Malvaceae) (José Marcílio Sobral Cavalcante).

- Estudo fitoquímico de duas espécies de Malvaceae: *Wissadula periplocifolia* (L.) C. Presl e *Sidastrum paniculatum* (Malvaceae) (Roosevelt Albuquerque

Trabalhos desenvolvidos pela equipe com espécies da família Malvaceae:

Trabalhos publicados:

- Flavonóides Glicosilados de *Herissantia tiubae* (K. Schum) Brizicky (Malvaceae) e teste farmacológicos preliminares do canferol 3,7-di-*O*-α-L-ramnopiranosídeo (SILVA et al., 2005).

- Flavonoids from *Herissantia tiubae* (SILVA et al., 2005).

- Mechanism Involved in the Spasmolytic Effects of a mixture of Two Triterpenes, cycloartenol and cycloeucalenol, Isolated from *Herissantia tiubae* in the Guinea-Pig Ileum (GOMES et al., 2005).

- Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Sida galheirenses* (SILVA et al., 2006).

- Chemical constituents from *Bakeridesia pickelli* (H. Monteiro) (Malvaceae) and the relaxant activity of kaempferol-3-O-β-D-(6´´-E-p-coumaroyl)

Trabalhos desenvolvidos pela equipe com espécies da família Malvaceae:

Trabalho aceito e no prelo:

- Triterpenes and Phenolic Compounds Isolated from the Aerial Parts of *Herissantia tiubae* and Evaluation of 5,4′,-Dihydroxy-3,6,7,8,3′-Pentamethoxyflavone as Modulator of Bacterial Drug Resistance (SILVA et al, Pharmaceutical Biology, 2007).

Trabalhos a serem publicados:

- Avaliação do tilirosídeo como agente modulador de resistência a drogas em *Staphylococcus aureus* (FALCÃO-SILVA et al., 2007).
- Constituintes químicos e atividade anti-ulcerogênica de *Herissantia crispa* (COSTA et al., 2007).
- Constituintes químicos e avaliação da atividade tóxica


OBRIGADA!