

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR

JOÃO LUIZ DE SOUZA CARVALHO

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE INSUMOS, ISOLAMENTO DE
MARCADORES E VALIDAÇÃO ANALÍTICA DOS DERIVADOS DO *Nasturtium*
officinale R. Br., BRASSICACEAE.

CURITIBA

2008

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

JOÃO LUIZ DE SOUZA CARVALHO

**DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE INSUMOS, ISOLAMENTO DE
MARCADORES E VALIDAÇÃO ANALÍTICA DOS DERIVADOS DO *Nasturtium
officinale* R. BR., BRASSICACEAE.**

**Tese apresentada Programa de Pós-
Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde,
Universidade Federal do Paraná, como
parte dos requisitos para a obtenção
do grau de Doutor em Ciências
Farmacêuticas,**

**Orientador: Prof^o. Dr. Obdulio Gomes
Miguel**

**Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilis
Dallarmi Miguel**

CURITIBA


2008

TERMO DE APROVAÇÃO

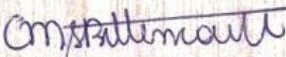
JOÃO LUIZ DE SOUZA CARVALHO

Título: "Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados do *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae"

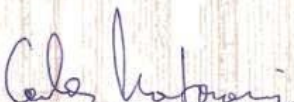
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Insumos, medicamentos e correlatos.



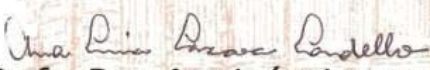
Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Orientador



Profa. Dra. Christiane Meyre da Silva Bittencourt
Universidade do Vale do Itajaí



Prof. Dr. Carlos Alberto Montanari
Universidade de São Paulo



Profa. Dra. Ana Luísa Lacava Lordello
Universidade Federal do Paraná



Prof. Ti. José Domingos Fontana
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 05 de dezembro de 2008.

NOTA BIOGRÁFICA

O autor é Mestre em insumos, medicamentos e correlatos pelo curso de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade do Paraná em 07 de dezembro de 2001.

Graduou-se em Licenciatura em Ciências, habilitação em Química, e Bacharelado em Química pela Faculdade Oswaldo Cruz de São Paulo em 1981.

No ensino superior, foi professor de Química Analítica Quantitativa no curso de Química Industrial (UNIVILLE – 2002 a 2006) e no curso de Engenharia de Fundição (SOCIESC – 2002 a 2004). Também lecionou as disciplinas de Química Geral e Química Orgânica no curso de Engenharia de Produção (UNIVILLE – 2002 a 2005).

Para o nível médio leciona como professor efetivo de Química no Colégio Estadual João Martins Veras em Joinville, Santa Catarina.

Desenvolve atividade empresarial, por intermédio da Fitoanalítica LTDA, prestando assessoria técnica industrial em pesquisa e desenvolvimento (analítica e processos) de produtos fitoterápicos, desde o ano de 2002 até o presente.

Experiência profissional adquirida na área industrial como Químico: Laboratório Catarinense S.A. de 01/1987 a 04/2002 em Fitoterápicos; Rhodia Química S.A. de 07/1976 a 09/1986 em matérias primas para indústria Química e Farmacêutica; Celanese de 04/1976 a 06/1976 em fibras têxteis; Firestone de 09/1973 a 03/1976 produtos derivados de borracha; Toro de 09/1972 a 09/1973 em antirruídos automotivos.

Em 2002 foi aprovado no Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná (doutorado), onde desenvolveu um estudo intitulado: “Desenvolvimento tecnológico de insumos, isolamento de marcadores e validação analítica dos derivados do *Nasturtium officinale* R. Br. Brassicaceae” (Agrião).

DEDICATÓRIA

A Deus, por me guiar nos caminhos da sabedoria e respeito a todos.

A minha esposa Nena e filhas Patrícia, Fernanda e Thais, genros Marco Leonardo e Favo pelo constante apoio, amor e paciência.

A minha família que sentiu minha falta, mas sempre apoiou e acreditou em mim.

Ao Obdulio e a Marilis, orientadores e amigos, minha segunda família, a qual mudou e lapidou este pesquisador.

Aos meus verdadeiros amigos que sempre acreditaram em mim, vocês.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Ao Aldo Candido Dadalt Diretor Presidente das Ervas Curam Indústria Farmacêutica Ltda, que acreditou no projeto e no registro da PI 060703-7A. Ao Robson e aos amigos desta que colaboraram para que este projeto fosse concluído.

A Dr^a. Marilis Dallarmi Miguel, Dr. Obdulio Gomes Miguel pelo apoio técnico na elaboração desta tese, pelos descontos e pela nossa grande amizade.

Ao Dr. Roberto Pontarolo e a Dra Francinete Ramos Campos do Centro de Bioequivalência do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná, pelas análises de LC/MS.

Ao Dr. Guilherme L. Sasaki e Dr. Lauro M. Souza do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, pelas análises de GC/MS.

Ao Botânico Dr. Gert Hatschbach, pela herborização da espécie vegetal no Herbário de Curitiba, Museu Botânico.

Aos amigos. Luiz e a Elizir, pela doação inicial do material vegetal.

Aos amigos da Quilab, principalmente ao apoio do Sr. Luiz Carlos Gonçalves na presteza das necessidades em modificações de equipamentos.

Ao químico César Weber da Natrium Química, pelas análises dos metais por espectrofotometria de absorção atômica, meu grande amigo e filho de Coração.

Aos Farmacêuticos Leonardo Davi Dominoni e a Fernanda S. F. Smolarek pela ajuda na elaboração desta tese e principalmente pela amizade e compreensão.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação e Graduação pela presteza continua, transferência de conhecimento nas disciplinas cursadas e amizade.

A Regina, Paulo e a todos os funcionários da Universidade Federal do Paraná que sempre estavam dispostos a ajudarem.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação. Miriam, Josiane e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização e divulgação deste trabalho.

RESUMO

O presente trabalho objetivou o estudo sobre *Nasturtium officinale* R. Br.; pertencente à família Brassicaceae, cujas partes aéreas do vegetal foram submetidas a preparo de alcoolatura e extrato padronizado com finalidade da produção de insumos derivados do mesmo. Aliado a isso se realizou o estudo fitoquímico utilizando como técnica analítica a cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna, cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência, espectrometria de ultravioleta, espectrometria de infravermelho e espectrometria de massa. Foram desenvolvidas tecnologias extrativas de particionamento pelo princípio do processo tradicional em Soxhlet e modificações, tanto para uso em processos analíticos quanto para o processo industrial, para produção de insumos (PI 0601703-7 A), nos quais se pôde verificar eficiência e reprodutibilidade para fins analíticos, farmacotécnicos e preparativos. De acordo com a literatura consultada, verificou-se a presença de compostos fenólicos simples e heterosídicos (fenilpropanóides e flavonóides), saponinas (esteróides e terpênicas policíclicas) e compostos contendo enxofre (glucosinolatos). De acordo com análise comparativa dos processos extrativos (tradicional e Soxhlet), pode-se referir que o processo Soxhlet apresentou melhor rendimento e rapidez, além de apresentar-se termoestável para a concentração e isolamento de grupos estruturais, para fins analíticos e farmacotécnicos.

Palavras-chave: glucosinolatos, *Nasturtium officinale* R. Br., termo-estável, Soxhlet, fenilpropanóides e flavonóides

ABSTRACT

The present work aimed at the study about *Nasturtium officinale* R. Br.; Brassicaceae family, which aerial parts of the vegetable were submitted to preparation of alcoholature and standardized extract with finality of inputs production derived from the same. It was also conducted the phytochemical study and using as analytical techniques in thin layer chromatography, column chromatography, gaseous chromatography, high performance liquid chromatography and ultraviolet spectrometry, infrared spectrometry and mass spectrometry. It was developed extractive technologies of partition by traditional process in Soxhlet and modifications, both for use in analytical processes and for industrial process, in inputs production (PI 0601703-7 A), through which it was possible to verify efficiency and reproducibility to analytical, pharmacothechnical and to preparative objectives too. According to the literature, it was verified the presence of simple and heterosidic phenolic compounds (phenylpropanoids and flavonoids), saponinas (steroidal and polycyclic terpenic) and compounds containing sulfur (glucosinolates). According to the comparative analysis of the extractive processes (traditional and Soxhlet), it was possible to say that the Soxhlet process presented a better performance and speed, besides being thermo-stable to the concentration and isolation of the structural groups , to pharcothechnical, pharmacological and analytical objectives.

Keywords: glucosinolates, *Nasturtium officinale* R. Br., thermo-stable, Soxhlet, phenylpropanoids and flavonoids.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
SUMÁRIO	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XVIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XXI
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Objetivos	3
1.1.1 Objetivo geral.....	3
1.1.2 Objetivos Específicos	3
1.2 Fluxograma do projeto	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Enquadramento Taxonômico	5
2.2 Sinônimos e nomes populares	5
2.3 Descrição Macroscópica	5
2.4 Descrição Microscópica	6
2.5 Uso Popular	6
2.6 Constituição Química	7
2.7 Aspectos Farmacológicos	10
2.7.1 Dosagem e Administração.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Coleta, Identificação e EXSICATA do agrião	12
3.2 ESTABILIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DA DROGA VEGETAL	13
3.2.1 Determinação gravimétrica de perda, em mufla, na droga vegetal estabilizada.	13
3.3 Métodos Gerais	14
3.3.1 Determinação gravimétrica de perda em balança de infravermelho.....	14
3.3.2 Determinação do teor de sólidos por perda em rota-vapor	14
3.3.3 Determinação gravimétrica de perda em mufla programável, com cinco patamares de temperatura.....	14
3.3.3.1 Preparo das amostras para determinação de metais.....	15
3.3.4 Determinação de teor de água pelo método de Karl Fisher.....	15
3.3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	16
3.3.6 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa.....	17
3.3.6.1 Preparo das amostras para análise por cromatografia gasosa.....	17
3.3.6.2 Preparo das amostras silanizadas para análise no cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massa - GC/MS	18
3.3.7 Cromatografia Líquida de alta eficiência (CLAE).....	18
3.3.7.1 Sistema cromatográfico analítico.....	18

3.3.7.2	Sistema cromatográfico preparativo.....	20
3.3.7.2.1	Análise preparativa em meio de ácido clorídrico.....	20
3.3.7.2.2	Análise preparativa em meio de ácido fórmico.....	20
3.3.7.3	Qualificação (<i>fingerprint</i>) e semi-quantificação (>95%) de compostos fenólicos, nitrogenados e esteróides por CLAE.....	21
3.3.7.3.1	Preparo de soluções padrão para construção das curvas de semi-quantificação (>95%) e <i>fingerprint</i> (qualificação).....	21
3.3.7.3.2	Preparo da amostra para análise por CLAE para determinação de compostos fenólicos, nitrogenados e esteróides.....	23
3.3.7.4	Validação analítica do doseamento do feniletil glucosinolato por CLAE.....	23
3.3.7.4.1	Linearidade.....	24
3.3.7.4.2	Exatidão.....	24
3.3.7.4.3	Especificidade.....	25
3.3.7.4.4	Precisão por repetibilidade.....	25
3.3.7.4.5	Precisão intermediária.....	26
3.3.7.4.6	Robustez.....	26
3.3.7.4.7	Intervalo.....	26
3.3.8	Qualificação por espectrofotometria UV/VIS.....	26
3.3.8.1	Preparo da amostra para análise UV.....	26
3.3.9	Qualificação por espectrofotometria de infravermelho - IR.....	27
3.3.9.1	Preparo da amostra para análise no IR.....	27
3.4	Obtenção dos extratos de <i>Nasturtium officinale</i>.....	27
3.4.1	Preparo da alcoolatura de agrião.....	27
3.4.2	Extrato por dupla maceração.....	27
3.4.3	Extração em Soxhlet analítico modificado.....	28
3.4.3.1	Extração em Soxhlet analítico modificado com etanol 81%.....	28
3.4.3.2	Extração em Soxhlet analítico modificado com gradiente de polaridade de solvente.....	29
3.4.4	Extratos padronizados para fins farmacotécnicos em Soxhlet modificado.....	30
3.4.4.1	Extrator com capacidade para 500g de droga vegetal.....	30
3.4.4.2	Extrator com capacidade para 2000g de droga vegetal.....	31
3.4.4.3	Extrator industrial com capacidade de 300 L de droga vegetal.....	32
3.4.5	Extração em Soxhlet modificado, por gradiente de polaridade, para fins fitoquímicos.....	33
3.5	Tratamento dos extratos de <i>Nasturtium officinale</i>.....	34
3.5.1	Alcoolatura de agrião.....	34
3.5.2	Extrato por dupla maceração.....	34
3.5.3	Extrato analítico em Soxhlet modificado.....	34
3.5.3.1	Extrato com etanol 81%.....	34
3.5.3.1.1	Reação de hidrólise ácida de glucosinolatos do extrato analítico talos e folhas (EATF).....	34
3.5.3.1.2	Reação de degradação enzimática de glucosinolatos do EATF.....	35
3.5.3.2	Frações extraídas por gradiente de polaridade.....	35
3.5.4	Extratos padronizados para fins farmacotécnicos.....	36
3.5.4.1	Análises preliminares dos extratos padronizados.....	36
3.5.4.2	Particionamento do extrato padronizado talos e folhas (EPTF) em sílica.....	36
3.5.4.2.1	Obtenção da pastilha de sílica.....	36
3.5.4.2.2	Preparação da coluna (cartucho) de sílica.....	37
3.5.4.2.3	Condicionamento inicial da coluna (cartucho) de sílica.....	37
3.5.4.2.4	Processo de partição em Soxhlet modificado, utilizando coluna (cartucho) de sílica.....	38
3.5.4.2.5	Análise das frações do extrato padronizado de talos e folhas (EPTF).....	39
3.5.4.3	Particionamento da fração etanólica 85% proveniente do EPTF, em sílica.....	39
3.5.4.3.1	Obtenção da pastilha de sílica.....	39
3.5.4.3.2	Preparação da coluna (cartucho) de sílica.....	40
3.5.4.3.3	Condicionamento inicial da coluna (cartucho) de sílica.....	40
3.5.4.3.4	Processo de partição da fração etanólica (85%) do EPTF.....	40
3.5.4.3.5	Análise das frações EtOH 96% e EtOH 96% com HCl 0,1 N (90:10), obtidas da fração etanólica (85%) do EPTF.....	41
3.5.4.4	Separação, em coluna de sílica, da fração EtOH 96%.....	41
3.5.4.4.1	Separação por Sephadex LH 20 da solução obtida com a associação da 8 ^a a 14 ^a fração do item 3.5.4.4.....	42

3.5.4.3.5.2	Análise das frações obtidas no particionamento em sílica e em Sephadex LH-20 da fração EtOH 96%	42
3.5.4.5	Particionamento do extrato padronizado talos e folhas (EPTF) em meio aquoso	42
3.5.4.5.1	Fracionamento com hexano	43
3.5.4.5.2	Fracionamento com acetato de etila.....	44
3.5.4.5.3	Fração aquosa do fracionamento residual do acetato de etila.....	45
3.5.4.6	Fracionamento do extrato etanólico padronizado em meio ácido e posteriormente em meio básico.....	45
3.5.4.6.1	Fracionamento em meio ácido para determinação de compostos fenólicos e esteróides	45
3.5.4.6.2	Fracionamento em meio básico para determinação de compostos nitrogenados e agliconas.....	46
3.5.4.6.3	Fração aquosa do fracionamento residual do clorofórmio	47
3.5.5	Extratos para fins fitoquímicos em Soxhlet modificado.....	47
3.5.5.1	Análises preliminares dos extratos para fins fitoquímicos.....	47
3.5.5.2	Separação, em coluna, da fração hexânica	48
3.5.5.3	Separação, em coluna, da fração diclorometano	48
3.5.5.4	Separação, em coluna, da fração acetato de etila	49
3.5.5.5	Separação, em Soxhlet fitoquímico modificado, da fração metanólica.....	49
3.5.5.5.1	Separação, por Sephadex LH 20, da 8ª fração metanólica	50
3.5.5.5.1.1	Separação, por Sephadex LH 20, da 3ª e 4ª frações do item 3.5.5.5.1.....	51
3.5.5.6	Separação, em Soxhlet fitoquímico modificado, da fração etanólica (81%)	51
3.5.5.6.1	Separação, por Sephadex LH 20, da 4ª fração etanólica.....	52
3.5.5.6.1.1	Separação, por Sephadex LH 20, da 8ª fração do item 3.5.5.6.1	53
3.5.5.6.2	Separação, por Sephadex LH 20, da 6ª fração do item 3.5.5.6.1.1	53
3.5.5.6.3	Separação, por Sephadex LH 20, da 3ª fração do item 3.5.5.6.2.....	53
3.5.5.6.3.1	Separação, por Sephadex LH 20, da 3ª fração do item 3.5.5.6.3.....	54
3.6	Tratamento do resíduo seco de <i>Nasturtium officinale</i>	54
3.6.1	Determinação gravimétrica de perda em mufla.....	54
3.7	Desenvolvimento tecnológico	55
3.7.1	Extrato fluido de agrião.....	55
3.7.2	Tintura de agrião.....	55
3.7.3	Suporte sólido matricial de agrião	55
3.7.4	Extrato seco de agrião.....	55
3.7.5	Cápsulas de extrato seco de agrião	56
3.7.6	Pastilhas com “blend” do extrato EPTF de agrião.....	56
3.7.7	Pastilhas com “blend” extrato ESPTF de agrião	56
3.7.8	Xarope de agrião	57
3.7.9	Solução oral de agrião.....	57
3.7.10	Solução para bochecho (colutório).....	57
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1	Coleta, Estabilização E Padronização Granulométrica Da Droga Vegetal	58
4.1.1	Determinação gravimétrica de perda em mufla, na droga vegetal estabilizada	61
4.1.2	Determinação gravimétrica de perda em mufla e em balança de perda por infravermelho (45°C) nos extratos padronizados.	62
4.1.3	Determinação De Teor De Água Por Karl Fisher	63
4.1.3	Análises para determinação de metais.	63
4.2	Alcoolatura e insumos derivados da droga vegetal.....	64
4.2.1	Alcoolatura obtida em liquidificador.....	64
4.2.1.2	Determinação a 45°C do teor de sólidos no resíduo da filtração da Alcoolatura obtida em liquidificador	65
4.2.3	Extrato obtido dupla maceração	66
4.2.4	Extrato obtido em Soxhlet Analítico Modificado	66
4.2.4.1	Reações de hidrólise ácida e degradação enzimática de glucosinolatos do EATF.....	67
4.2.5	Extratos para padronizados para fins farmacotécnicos e extratos para fins analíticos e fitoquímicos.	67

4.2.5.1	Extratos padronizados para fins farmacotécnicos, obtidos em aparelho de Soxhlet modificado.....	67
4.2.5.2	Extratos para fins analíticos e fitoquímicos obtidos por particionamento em Soxhlet modificado.....	69
4.2.5.2.1	Particionamentos em colunas de sílica e Sephadex LH-20.....	71
4.2.5.2.2	Particionamentos em meio aquoso em Soxhlet modificado.....	71
4.3	Análises dos extratos, insumos e produtos.....	71
4.3.1	Análises por CCD.....	71
4.3.1.1	Cálculo dos hRf e RR das amostras e referências.....	72
4.3.1.2	Análise de compostos fenólicos em flavonóides e fenilpropanóides por CCD.....	72
4.3.1.3	Análise de glucosinatos por CCD.....	75
4.3.1.4	Análise de saponinas na forma esteroidal e/ou triterpênica por CCD.....	77
4.3.2	Análises por Cromatografia Gasosa – CG.....	78
4.3.2.1	Extrato analítico talos e folhas (EATF).....	78
4.3.2.2	Fração do Extrato Analítico Talos e Folhas (EATF) e Sinigrin Silanizados.....	79
4.3.3	Análises por espectrometria de massa - MS.....	80
4.3.4	Análises por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE.....	85
4.3.4.1	Resultados da validação analítica do doseamento do feniletil glucosinolato por CLAE.....	85
4.3.4.1.1	Linearidade.....	85
4.3.4.1.2	Exatidão.....	87
4.3.4.1.3	Especificidade.....	92
4.3.4.1.4	Precisão por repetibilidade.....	103
4.3.4.1.5	Precisão intermediária.....	105
4.3.4.1.5	Robustez.....	108
4.3.4.1.5.1	Composição da Fase Móvel.....	108
4.3.4.1.5.2	Diferentes lotes de colunas.....	110
4.3.4.1.5.3	Estabilidade das soluções.....	112
4.3.4.2	Resultados das análises do feniletil glucosinolato por CLAE.....	114
4.3.4.3	Resultados das análises para qualificação (<i>fingerprint</i>) e semi-quantificação (>95%) de compostos fenólicos, nitrogenados e esteróides por CLAE.....	117
4.3.5	Análises por CLAE preparativa e avaliação por espectrometria de massa (LC-MS).....	129
4.3.6	Análises qualitativas por UV/VIS.....	131
4.3.7	Análises qualitativas por IR.....	133
4.4	Tratamento do resíduo seco.....	135
4.4.1	Determinação gravimétrica de perda em mufla, no resíduo da droga vegetal estabilizada.....	135
4.5	Desenvolvimento tecnológico.....	135
4.5.1	Extrato Fluído Padronizado de Agrião.....	135
4.5.2	Tintura de Agrião.....	136
4.5.3	Padronização do suporte sólido para uso farmacotécnico e alimentício.....	137
4.5.4	Extrato seco de agrião.....	138
4.5.5	Cápsulas com extrato seco padronizado de agrião.....	139
4.5.6	Xarope de Agrião.....	140
4.5.7	Solução oral de Agrião.....	140
4.5.8	Solução para bochecho (colutório) de Agrião.....	141
4.5.9	Pastilhas com extrato fluído e extrato seco de agrião.....	142
4.6	Processo Soxhlet com Extrator de plantas medicinais afins (PI 0601703-7 A).....	142
5	CONCLUSÕES.....	144
	REFERÊNCIAS.....	148
	BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA.....	153
	LISTA DE ANEXOS.....	155

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 –	FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO TECNOLÓGICA DE INSUMOS <i>Nasturtium officinale</i>	4
FIGURA 2 –	NÚCLEOS FUNDAMENTAIS DE REFERÊNCIA E ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS REFERIDAS	9
FIGURA 3 –	<i>Nasturtium officinale</i> R. BR.	12
FIGURA 4 –	PREPARO DA ALCOOLATURA, VISÃO APÓS MACERADO E SISTEMA DE FILTRAÇÃO A VÁCUO.	27
FIGURA 5 –	APARELHO SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO	29
FIGURA 6 –	APARELHO SOXHLET FARMACOTÉCNICO MODIFICADO PARA 500G DE DROGA VEGETAL	31
FIGURA 7 –	APARELHO SOXHLET FARMACOTÉCNICO MODIFICADO PARA 2000G DE DROGA VEGETAL	32
FIGURA 8 –	COLUNA DE SÍLICA COM PLACA POROSA	37
FIGURA 9 –	APARELHO SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO	39
FIGURA 10 –	ACESSÓRIOS PARA EXTRATOR SOXHLET MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO COM GRADIENTE DE POLARIDADE DE SOLVENTE	43
FIGURA 11 –	EXTRATOR SOXHLET MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO COM GRADIENTE DE POLARIDADE DE SOLVENTE COM AMOSTRA	44
FIGURA 12 –	EXTRATOR SOXHLET MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO EM MEIO ÁCIDO E MEIO BÁSICO.	46
FIGURA 13 –	COLETA DE AGRIÃO MONOCULTURA NO MUNICÍPIO FAZENDA DO RIO GRANDE-PR.	58
FIGURA 14 –	MATERIAL VEGETAL SECO (DROGA VEGETAL) NA ESTUFA DA UFPR A 45°C	59
FIGURA 15 –	MATERIAL VEGETAL <i>IN NATURA</i> NA ESTUFA DE SECAGEM INDUSTRIAL DE PLANTAS MEDICINAIS	59
FIGURA 16 –	MATERIAL VEGETAL SECO (DROGA VEGETAL) NA ESTUFA DE SECAGEM INDUSTRIAL DE PLANTAS MEDICINAIS	60
FIGURA 17 –	DROGA VEGETAL MOÍDA EM MOINHO DE FACAS INDUSTRIAL DE PLANTAS MEDICINAIS ..	60
FIGURA 18 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO ORIENTATIVO PARA FLAVONÓIDES E FENILPROPANÓIDES... ..	73
FIGURA 19 –	CCD PARA IDENTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS NO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS.	74
FIGURA 20 –	CCD PARA IDENTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS NO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS.	75
FIGURA 21 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO ORIENTATIVO PARA GLUCOSINOLATOS REFERENTES A SINIGRIN E SINALBIN, SEGUNDO WAGNER (1996) PG. 296-299.	76
FIGURA 22 –	CCD PARA IDENTIFICAÇÃO DE GLUCOSINOLATOS NO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS.	76
FIGURA 23 –	PERFIL CROMATOGRÁFICO ORIENTATIVO PARA SAPONINAS, REFERENTES A ESCINA, SEGUNDO WAGNER (1996)	77
FIGURA 24 –	CCD PARA IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS NO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS	78
FIGURA 25 –	PERFIL POR CG DO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS (EATF)	79
FIGURA 26 –	PERFIL POR CG DA SOLUÇÃO DE SINIGRIN SILANIZADO	80
FIGURA 27 –	PERFIL POR CG DA FRAÇÃO DO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS SILANIZADA ..	80
FIGURA 28 –	ESPECTRO DE MASSA DO PADRÃO DE SINIGRIN	81
FIGURA 29 –	ANÁLISE DIRETA NO PROBE DO DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSA NA UFSC, DO PADRÃO DE SINIGRIN UTILIZADO COMO COMPOSTO DE REFERÊNCIA	81

FIGURA 30 – ANÁLISE POR CG/MS NA UFPR DO PADRÃO DE SINIGRIN DERIVATIZADO COM TMS UTILIZADO COMO COMPOSTO DE REFERÊNCIA	82
FIGURA 31 – ANÁLISE DIRETA NO PROBE DO DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSA NA UFSC, DO PROVÁVEL GLUCONASTURTIUM ACIDO.....	82
FIGURA 32 – ANÁLISE POR CG/MS NA UFPR, DO PROVÁVEL GLUCONASTURTIUM ACIDO DERIVATIZADO COM TMS	82
FIGURA 33 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO ESPECTRO DE MASSA DO SINIGRIN	83
FIGURA 34 – ESTRUTURAS QUÍMICAS PARA ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DOS ESPECTROS DE MASSA	84
FIGURA 35 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO 0,10 MG/ML	85
FIGURA 36 – ESPECTRO E PUREZA DO PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO 0,10 MG/ML.....	86
FIGURA 37 – CURVA DE LINEARIDADE DE FENILETIL GLUCOSINOLATO	86
FIGURA 38 – CROMATOGRAMA DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 01.....	88
FIGURA 39 – ESPECTRO DO PICO DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 01	88
FIGURA 40 – MULTICROMATOGRAMA AGRIÃO TINTURA – EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 01	88
FIGURA 41 – CROMATOGRAMA DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 02.....	90
FIGURA 42 – ESPECTRO DO PICO DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 02	90
FIGURA 43 – MULTICROMATOGRAMA AGRIÃO TINTURA – EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 02	90
FIGURA 44 – CROMATOGRAMA DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 03.....	91
FIGURA 45 – ESPECTRO DO PICO DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 03	92
FIGURA 46 – MULTICROMATOGRAMAS AGRIÃO TINTURA – EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 03.....	92
FIGURA 47 – CROMATOGRAMA DO ETANOL 77%.....	93
FIGURA 48 – CROMATOGRAMA DO ETANOL 81%.....	93
FIGURA 49 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS PRESENTES NO CROMATOGRAMA DO ETANOL COM O PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO.	94
FIGURA 50 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE	94
FIGURA 51 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE	95
FIGURA 52 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE – ANÁLISE DO PICO DE BENZOATO DE SÓDIO	96
FIGURA 53 – ESPECTRO DO PICO SELECIONADO DO XAROPE	96
FIGURA 54 – ESPECTRO DO PICO SELECIONADO DO XAROPE E DO PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO	96
FIGURA 55 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS PRESENTES NO CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE COM O PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO.	97
FIGURA 56 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL	98
FIGURA 57 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL	98
FIGURA 58 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL – ANÁLISE DOS PICOS	99
FIGURA 59 – ESPECTROS DOS PICOS SELECIONADOS DA SOLUÇÃO ORAL.....	99
FIGURA 60 – ESPECTROS DOS PICOS SELECIONADOS DA SOLUÇÃO ORAL E DO PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO	100
FIGURA 61 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS PRESENTES NO CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL COM O PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO.	100
FIGURA 62 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15	101
FIGURA 63 – ESPECTRO DO PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO NA TINTURA DE AGRIÃO	102
FIGURA 64 – COMPARAÇÃO ESPECTRAL ENTRE FENILETIL GLUCOSINOLATO PADRÃO E O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO NA TINTURA DE AGRIÃO	102

FIGURA 65 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 01.....	103
FIGURA 66 – ESPECTRO DO PICO DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 01	103
FIGURA 67 – MULTICROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE PRECISÃO DA TINTURA DE AGRIÃO DO ANALISTA 01.....	104
FIGURA 68 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO RELATIVO (% STANDARD DEVIATION) DAS CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS PARA O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO	104
FIGURA 69 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO RELATIVO (% STANDARD DEVIATION) DOS TEMPOS DE RETENÇÃO ENCONTRADOS PARA O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO.....	105
FIGURA 70 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 02.....	105
FIGURA 71 – ESPECTRO DO PICO DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 02	106
FIGURA 72 – MULTICROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE PRECISÃO DA TINTURA DE AGRIÃO DO ANALISTA 02.....	106
FIGURA 73 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO RELATIVO (% STANDARD DEVIATION) DAS CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS PARA O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO	107
FIGURA 74 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO RELATIVO (% STANDARD DEVIATION) DOS TEMPOS DE RETENÇÃO ENCONTRADOS PARA O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO.....	107
FIGURA 75 – MULTICROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE PRECISÃO DA TINTURA DE AGRIÃO DOS ANALISTAS 01 E 02.....	107
FIGURA 76 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 – INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL	108
FIGURA 77 – ESPECTRO DO PICO DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 – INFLUÊNCIA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL	109
TABELA 52 – RESULTADO DA ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL	109
FIGURA 78 – MULTICROMATOGRAMAS DA TINTURA DE AGRIÃO – INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL	109
FIGURA 79 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 02.....	110
FIGURA 80 – ESPECTRO DO PICO DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 02	111
FIGURA 81 – MULTICROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE PRECISÃO DO AGRIÃO SOLUÇÃO ORAL DOS ANALISTAS 01 E 02 – INFLUÊNCIA DA TROCA DE COLUNA.....	111
FIGURA 82 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE EXATIDÃO II – ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO FINAL.....	112
FIGURA 83 – ESPECTRO DO PICO DA SOLUÇÃO DE XAROPE EXATIDÃO II – ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO FINAL	113
FIGURA 84 – MULTICROMATOGRAMA DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO.....	113
FIGURA 85 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DA ALCOOLATURA.....	114
FIGURA 86 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DA DROGA VEGETAL TALOS E FOLHAS	115
FIGURA 87 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO EXTRATO FLUIDO DE AGRIÃO	115
FIGURA 88 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO	115
FIGURA 89 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO EXTRATO SECO DE AGRIÃO	116
FIGURA 90 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO XAROPE	116
FIGURA 91 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL	116
FIGURA 92 – CROMATOGRAMA DA CURVA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO E <i>FINGERPRINT</i> DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES	118
FIGURA 93 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO GÁLICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES.....	118

FIGURA 94 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO PIROGALOL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES.....	118
FIGURA 95 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CLOROGÊNICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES... ..	119
FIGURA 96 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CAFEICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES.. ..	119
FIGURA 97 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO PARA CUMÁRICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES.... ..	119
FIGURA 98 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO FERÚLICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES... ..	119
FIGURA 99 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO SINÁPICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES... ..	120
FIGURA 100 – VALORES ESTATÍSTICO CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO HIDROCINÂMICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES... ..	120
FIGURA 101 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CINÂMICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES.. ..	120
FIGURA 102 – CROMATOGRAMA DA CURVA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO E <i>FINGERPRINT</i> DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES	121
FIGURA 103 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA CUMARINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES....	121
FIGURA 104 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA RUTINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES... ..	122
FIGURA 105 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CINÂMICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES	122
FIGURA 106 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO PSORALENO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES....	122
FIGURA 107 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA QUERCETINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES....	122
FIGURA 108 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA LUTEOLINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES... ..	123
FIGURA 109 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA ISORRAMETINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES....	123
FIGURA 110 – CROMATOGRAMA DA CURVA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO E <i>FINGERPRINT</i> DE NITROGENADOS.....	123
FIGURA 111 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA NICOTINAMIDA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS.....	124
FIGURA 112 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA TIROSINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS.....	124

FIGURA 113 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO HIDROCIÂNICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS	124
FIGURA 114 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA TIRAMINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS	124
FIGURA 115 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA FENILALANINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS	125
FIGURA 116 – CROMATOGRAMA DA CURVA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO E <i>FINGERPRINT</i> DE ESTERÓIDES.....	125
FIGURA 117 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO TOCOFEROL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES.....	126
FIGURA 118 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ACETATO DE TOCOFEROL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES	126
FIGURA 119 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA CURVA E ESPECTRO DO LUPEOL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES.....	126
FIGURA 120 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA CURVA E ESPECTRO DO ESTIGMASTEROL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES	127
FIGURA 121 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA CURVA E ESPECTRO DO BETA SITOSTEROL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES	127
FIGURA 122 – CROMATOGRAMA E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS DO EATF	127
FIGURA 123 – CROMATOGRAMA E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITROGENADOS	128
FIGURA 124 – CROMATOGRAMA E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ESTERÓIDES NO EATF.....	129
FIGURA 125 – ESPECTRO DE MASSAS DA FRAÇÃO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 17 MINUTOS	130
FIGURA 126 – ESPECTRO DE MASSAS DA FRAÇÃO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 22 MINUTOS	130
FIGURA 127 – ESPECTRO DE MASSA DA FRAÇÃO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 27 MINUTOS.....	131
FIGURA 128 – ANÁLISE, POR ESPECTROFOTOMETRIA UV, DAS REFERÊNCIAS RUTINA E QUERCETINA OBTIDAS NO PARTICIONAMENTO POR SEPHADEX LH 20	132
FIGURA 129 – ANÁLISE, POR ESPECTROFOTOMETRIA UV, DAS FRAÇÕES 1 A 7 OBTIDAS NO PARTICIONAMENTO POR SEPHADEX LH 20	132
FIGURA 130 – PERFIL POR UV DA FRAÇÃO 66 OBTIDA DA FRAÇÃO ETANÓLICA 85% DO EXTRATO OBTIDO POR PARTICIONAMENTO DIRETO EM APARELHO SOXHLET MODIFICADO NA COLUNA XTERRA TM	133
FIGURA 131 – PERFIL POR CLAE DA FRAÇÃO 66 OBTIDA DA FRAÇÃO ETANÓLICA 85% DO EXTRATO OBTIDO POR PARTICIONAMENTO DIRETO EM APARELHO SOXHLET MODIFICADO NA COLUNA XTERRA TM	133
FIGURA 132 – ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE IR DA SUSPENSÃO DO PRECIPITADO.....	134
FIGURA 133 – ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE IR DO SINIGRIN	134
FIGURA 134 – ESPECTRO DE IR DA NIST DO ETIL BENZENO	134
FIGURA 135 – ANALISE MICROSCÓPICA DO SUPORTE SÓLIDO.....	138
FIGURA 136 – PREPARO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE AGRIÃO.....	138
FIGURA 137 – MICROSCOPIA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE AGRIÃO.....	139
FIGURA 138 – CÁPSULAS DE EXTRATO SECO PADRONIZADO DE AGRIÃO.....	139
FIGURA 139 – PASTILHAS DE AGRIÃO	142
FIGURA 140 – FIGURAS PARA EXEMPLIFICAR O PROCESSO INDUSTRIAL DESENVOLVIDO.....	143
FIGURA 141 – EXTRATOR INDUSTRIAL (PI 0601703-7 A).....	143

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE NASTURTIIUM OFFICINALE R. BR.....	5
TABELA 2 – PROGRAMAÇÃO DA MUFLA	15
TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DE SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS UTILIZADAS NAS ANÁLISES POR CCD E RESPECTIVAS PROPORÇÕES.....	16
TABELA 4 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	19
TABELA 5 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE DE FENÓLICOS E FENILETIL GLUCOSINOLATO	19
TABELA 6 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS NITROGENADOS	19
TABELA 7 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE DE ESTERÓIDES	19
TABELA 8 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA ANÁLISE PREPARATIVA COM ÁCIDO CLORÍDRICO	20
TABELA 9 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA ANÁLISE PREPARATIVA COM ÁCIDO FÓRMICO.....	20
TABELA 10 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE PADRÕES A 0,2 MG/ML PARA FENILPROPANÓIDES.	21
TABELA 11 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE EM FENILPROPANÓIDES E <i>FINGERPRINT</i>	21
TABELA 12 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE PADRÕES A 0,2 MG/ML PARA CUMARINAS E FLAVONÓIDES.	22
TABELA 13 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES E <i>FINGERPRINT</i>	22
TABELA 14 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE PADRÕES A 0,2 MG/ML PARA COMPOSTOS NITROGENADOS.	22
TABELA 15 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE DE COMPOSTOS NITROGENADOS E <i>FINGERPRINT</i>	22
TABELA 16 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE PADRÕES A 0,2 MG/ML PARA ESTERÓIDES.....	22
TABELA 17 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE DE ESTERÓIDES E <i>FINGERPRINT</i>	22
TABELA 18 – PREPARO DAS SOLUÇÕES AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, NITROGENADOS E ESTERÓIDES; E <i>FINGERPRINT</i>	23
TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TEÓRICA PADRÃO ADICIONADO (MÍNIMA).....	25
TABELA 20 – CONCENTRAÇÃO TEÓRICA PADRÃO ADICIONADO (MÉDIA)	25
TABELA 21 – CONCENTRAÇÃO TEÓRICA PADRÃO ADICIONADO (MÁXIMA)	25
TABELA 22 – PARTICIONAMENTO DA FRAÇÃO METANÓLICA EM SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO	50
TABELA 23 – COLUNA DAS FRAÇÕES DO ITEM 3.5.3.2.4.1	51
TABELA 24 – COLUNA DAS FRAÇÕES	51
TABELA 25 – PARTICIONAMENTO DA FRAÇÃO ETANÓLICA (85%) EM SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO	52
TABELA 26 – COLUNA DA FRAÇÕES.....	53
TABELA 27 – COLUNA DA FRAÇÕES.....	53
TABELA 28 – COLUNA DA FRAÇÕES.....	54
TABELA 29 – COLUNA DA FRAÇÕES.....	54
TABELA 30 – RENDIMENTO DE DROGA VEGETAL ESTABILIZADA	61
TABELA 31 – RELAÇÃO DAS QUANTIDADES DE DROGA VEGETAL DESTINADA AOS ESTUDOS ANALÍTICOS E À PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PADRONIZADOS	61
TABELA 32 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA PERDA GRAVIMÉTRICA EM MUFLA PARA A DROGA VEGETAL ESTABILIZADA	62

TABELA 33 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA PERDA GRAVIMÉTRICA EM MUFLA PARA OS EXTRATOS PADRONIZADOS	62
TABELA 34 – TEOR DE SÓLIDOS E COMPOSTOS VOLÁTEIS POR PERDA A 45°C EM BALANÇA DE INFRAVERMELHO, DOS EXTRATOS PADRONIZADOS	62
TABELA 35 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DA DROGA VEGETAL POR KARL FISHER	63
TABELA 36 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE METAIS.....	64
TABELA 37 – RESULTADOS DA OBTENÇÃO DA ALCOOLATURA OBTIDA POR LIQUIDIFICADOR	65
TABELA 38 – RESULTADOS DO RESÍDUO DA ALCOOLATURA	66
TABELA 39 – PROCESSO DO EXTRATO POR DUPLA MACERAÇÃO.....	66
TABELA 40 – PREPARO DOS EXTRATOS PARA FINS FARMACOTÉCNICOS	68
TABELA 41 – PARTIÇÃO COM GRADIENTE DE POLARIDADE EM SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO.....	69
TABELA 42 – PARTIÇÃO DA DROGA VEGETAL COM GRADIENTE DE POLARIDADE EM SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO	70
TABELA 43 – PARTIÇÃO DA PASTILHA COM GRADIENTE DE POLARIDADE EM SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO	70
TABELA 44 – COMPARAÇÃO DAS PARTIÇÕES, ANALÍTICO, FITOQUÍMICO E DA PASTILHA COM GRADIENTE DE POLARIDADE EM SOXHLET MODIFICADO	70
TABELA 45 – RESULTADOS DO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS (EATF) ANALISADOS POR CG.	79
TABELA 46 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO E DESVIO PADRÃO RELATIVO.....	87
TABELA 46 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 01	89
TABELA 47 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 02	90
TABELA 48 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 03	92
TABELA 49 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ANALISTA 01	104
TABELA 50 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ANALISTA 02.....	106
TABELA 51 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	108
TABELA 53 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS MÉTODOS – INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL.....	110
TABELA 54 – RESULTADO DA ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA TROCA DE COLUNA	111
TABELA 55 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA	111
TABELA 56 – RESULTADO DA ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO.....	113
TABELA 57 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO FINAL DE AGRIÃO XAROPE E PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO EM FASE DILUENTE.....	113
TABELA 58 – TEOR DE FENILETIL GLUCOSINOLATO	117
TABELA 59 – TEOR DE FENÓLICOS NO EATF.....	128
TABELA 60 – TEOR DE NITROGENADOS NO EATF	128
TABELA 61 – TEOR DE ESTERÓIDES NO EATF	129
TABELA 62 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA PERDA GRAVIMÉTRICA EM MUFLA PARA OS RESÍDUOS DA DROGA VEGETAL ESTABILIZADA	135
TABELA 63 – ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS DO EPTF.....	136
TABELA 64 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO EPTF	136
TABELA 65 – DOSEAMENTO DO EPTF	136
TABELA 66 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO EPTF.....	136
TABELA 67 – ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS DA TINTURA DE AGRIÃO	136
TABELA 68 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA TINTURA DE AGRIÃO	136
TABELA 69 – DOSEAMENTO DA TINTURA DE AGRIÃO	137
TABELA 70 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA TINTURA DE AGRIÃO.....	137

TABELA 71 – RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DO SUPORTE SÓLIDO	137
TABELA 72 – ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS DO XAROPE DE AGRIÃO	140
TABELA 73 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO XAROPE DE AGRIÃO	140
TABELA 74 – DOSEAMENTO DO XAROPE DE AGRIÃO	140
TABELA 75 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO XAROPE DE AGRIÃO	140
TABELA 76 – ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS DA SOLUÇÃO ORAL DE AGRIÃO	141
TABELA 77 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS SOLUÇÃO ORAL DE AGRIÃO	141
TABELA 78 – DOSEAMENTO SOLUÇÃO ORAL DE AGRIÃO	141
TABELA 79 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA SOLUÇÃO ORAL DE AGRIÃO	141

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	- Microlitro
µmol	- Micro mol
AU	- Absorbance Unit
CCD	- Cromatografia em Camada Delgada
CG	- Cromatografia gasosa
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
cm	- Centímetro
cm ³	- Centímetro cúbico
CMC	- Carboxi metil celulose
d	- Densidade (g/cm ³)
d.i.	- Diâmetro interno
DAD	- Diode array detector
DVE	- Droga vegetal estabilizada
DVF	- Droga Vegetal das folhas
DVT	- Droga Vegetal dos talos
DVTF	- Droga Vegetal dos talos e folhas
E	- Elemento químico
EAESPTF	- extrato analítico do extrato seco padronizado talos e folhas
EAF	- Extrato analítico das folhas
EAT	- Extrato analítico dos talos
EATF	- Extrato analítico dos talos e folhas
EPF	- Extrato padronizado das folhas
EPT	- Extrato padronizado dos talos
EPTF	- Extrato padronizado dos talos e folhas
ESPTF	- extrato seco padronizado dos talos e folhas
g	- gramas
GC	- Gas chromatography
GC/MS	- Gas chromatography / mass spectrometry
h	- horas
HCl	- Ácido clorídrico
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography
hRf	- Mobilidade Relativa ao frente x 100
IR	- Infrared (infravermelho)
IV	- Infravermelho
kg	- Quilograma
LC-MS	- Liquid chromatography / mass spectrometry
m	- Massa
M	- Molar
mAU	- Mili absorbance unit
mg	- Miligrama
min	- minuto
mL	- mililitro
mm	- milímetro
MS	- espectrometria de massa - (mass spectrometry)
na	- não analisado
NADPH	- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato ácido
nd	- não detectado
NEU	- difenilboriloxietilamino a 1 % em metanol
NIST	- National Institute of Standards and Technology
nm	- Nanômetro
NNK	- 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil-1-butanona),
NOS	- <i>Nasturtium officinale</i> Seco
°C	- Grau Celsius
p.	- página

PA	- Para Análise
PEITC	- Feniletíl isotiocianato
pH	- Potencial de hidrogênio
pi	- Padronização interna
RDVF	- Resíduo da Droga Vegetal do Extrato padronizado das folhas
RDVT	- Resíduo da Droga Vegetal do Extrato padronizado dos talos
RDVTF	- Resíduo da Droga Vegetal do Extrato padronizado dos talos e folhas
Rf	- Mobilidade Relativa ao fronte
rpm	- Rotações por minuto
RR	- Retenção relativa
SOPTF	Solução Oral do Extrato padronizado talos e folhas
SR	- Solução Reagente
TMS	- Trimetil silano
tr	- Tempo de retenção
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
UFSC	- Universidade Federal de Santa Catarina
USP	- United States Pharmacopoeia
UV	- Ultravioleta
v.	- Volume
VIS	- Visível
vol.	- Volume
XPTF	Xarope do Extrato padronizado talos e folhas

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de grande biodiversidade vegetal e nesse contexto inúmeras plantas medicinais são utilizadas por grande parte de nossa população, na forma de fitoterápicos, nutracêuticos ou alimentos. Também podem ser usadas na extração de matérias-primas como extratos, óleos essenciais, substâncias químicas puras, que podem servir de modelos para obtenção de análogos sintéticos ou materiais de partida, no preparo de moléculas semi-sintéticas. A possibilidade de desenvolvimento de novas tecnologias na área de química fina pode atrair investidores ao mercado de insumos farmacêuticos.

Dentre tanta diversidade, o agrião, *Nasturtium officinale* R. Br. é uma planta medicinal com ampla utilização. BLUMENTHAL *et al.* (2000) referem ações farmacológicas como antibacteriana, antiescorbútica, colagoga e expectorante. Estas características demonstram a necessidade de credenciar os fornecedores, a fim de controlar os estrangulamentos da cadeia produtiva, vista desde a semente até a matéria prima final.

A Fitoanalítica, sediada em Joinville–SC, é uma microempresa especializada em produtos naturais, a qual preza pela ética e probidade no desenvolvimento de formas farmacêuticas. Desde 2002 estuda processos analíticos e industriais para aplicação na indústria farmacêutica de fitoterápicos, investindo maciços esforços na garantia da qualidade e na pesquisa química. Futuramente, também, na área farmacológica e clínica em prol da eficácia terapêutica dos produtos de seus projetos.

Sob esta perspectiva, objetiva produzir insumos a fim de possibilitar a incorporação destes nas diversas formas farmacêuticas de interesse comercial, considerando as inúmeras aplicações tradicionais, farmacológicas, farmacêuticas, cosméticas e nutracêuticas do *Nasturtium officinale* R. Br.

O interesse da pesquisa e validação do processo tecnológico, com o rigor científico, encontra apoio na necessidade de se obter insumos de qualidade, que possam viabilizar a produção de fitoterápicos de acordo com as exigências legais apresentada pela RDC 48/2004 (ANVISA). Desse modo, esses produtos desenvolvidos

podem servir como matéria-prima padrão com aplicabilidade direta na indústria, ou ainda servir de base para uma monografia farmacopéica.

No processo analítico semiquantitativo, identificam-se grupos químicos estruturais de interesse que estão relacionados com as atividades farmacológicas do fitoterápico. Estas substâncias ativas devem ser isoladas e tratadas como futuros marcadores, sendo assim, submetidas à validação do método analítico. Na área de fitoterápicos um dos ramos mais complexos é o da química analítica, necessitando de um trabalho interdisciplinar que requer a dedicação e parceria de todos os envolvidos, desde o produtor até a indústria farmacêutica, sem perder de vista a eficácia do produto final.

Portanto a proposta de trabalho encontra apoio na necessidade de validação da tecnologia de produção dos fitoterápicos derivados do *Nasturtium officinale* R. Br., considerando a importância que isso representa para a melhoria na qualidade do produto final e conseqüentemente na eficácia terapêutica do mesmo, e valorização da classe dos medicamentos fitoterápicos.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Realizar estudos fitoquímicos e analíticos, validar o método de extração e a tecnologia analítica e desenvolver insumos e produtos derivados das partes aéreas de *Nasturtium officinale* R. Br. Brassicaceae.

1.1.2 Objetivos Específicos

Obter os extratos da droga vegetal por meio de extrator Soxhlet modificado;

Preparar extratos particionados em ordem crescente de polaridade, utilizando tanto a droga vegetal quanto o extrato padronizado;

Isolar constituintes químicos (glucosinolatos) da espécie *Nasturtium officinale* R. Br. Brassicaceae por meio do desenvolvimento de novas técnicas cromatográficas e otimização de técnicas já existentes;

Confirmar a estrutura química de compostos isolados com objetivo de compor um elenco de possíveis marcadores;

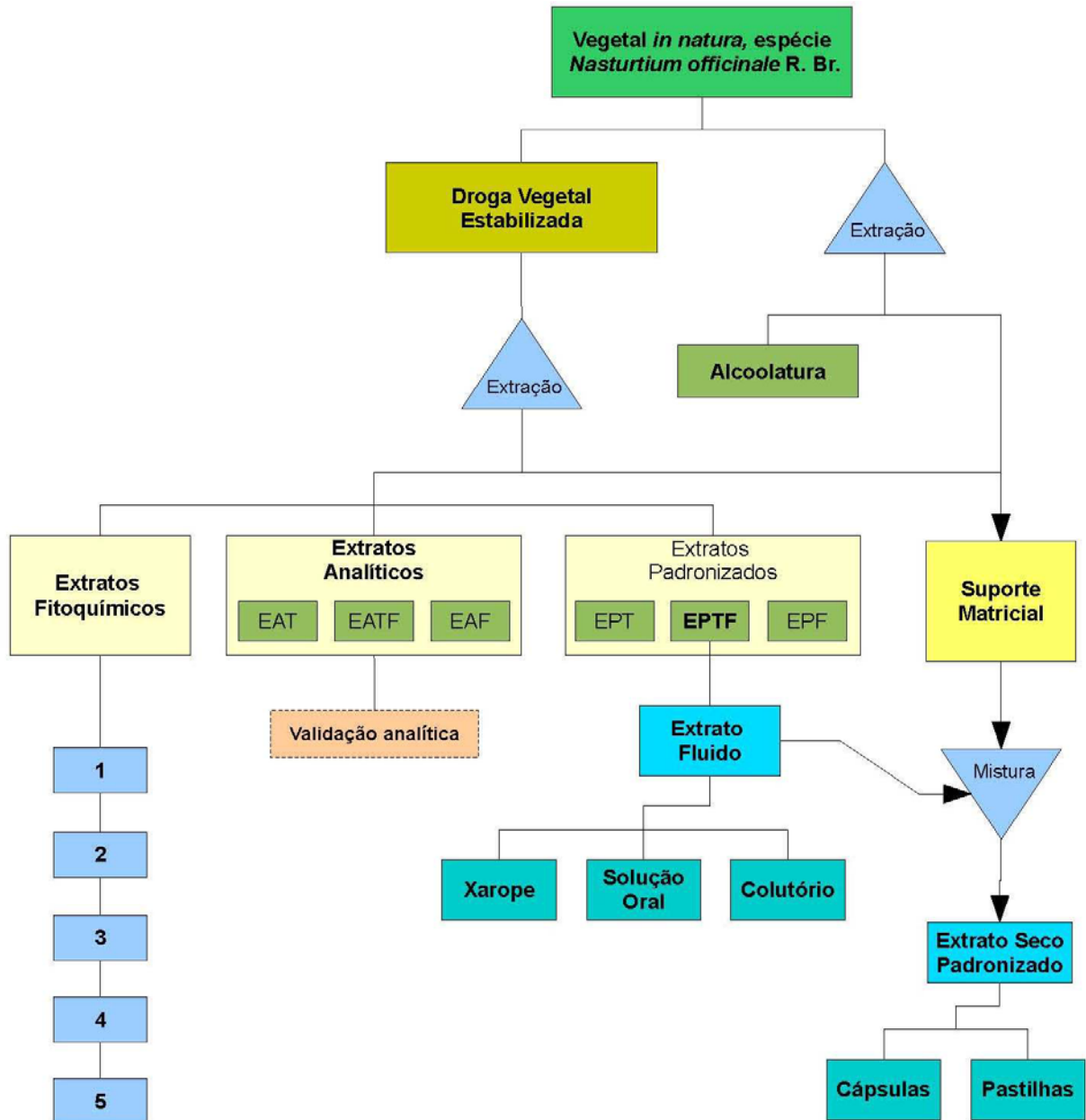
Desenvolver tecnologias extrativas e validá-las para obtenção do extrato padronizado (insumo primário);

Produzir insumos secundários em extrato seco, extrato fluido, tintura, xarope, solução oral e pastilhas com aplicabilidade industrial;

Validar os métodos de análise da droga vegetal;

1.2 FLUXOGRAMA DO PROJETO

FIGURA 1 – FLUXOGRAMA DE PRODUÇÃO TECNOLÓGICA DE INSUMOS *Nasturtium officinale*.



- 1- Extrato Fitoquímico seco em sílica;
- 2- Partição com gradiente de polaridade em Soxhlet;
- 3- Partição em coluna de sílica;
- 4- Partição em coluna de Sephadex;
- 5- Partição em coluna octadecil semi-preparativa (CLAE).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO

TABELA 1 – ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA ESPÉCIE NASTURTIIUM OFFICINALE R. BR.

	Cronquist	Engler
Divisão	Magnoliophyta	Angiospermae
Classe	Magnoliopsida	Dicotyledoneae
Subclasse	Dilleniidae	Archichamydeae
Ordem	Capparales	Papaverales
Família	Brassicaceae	Cruciferae
Gênero	Nasturtium	Nasturtium
Espécie	Nasturtium officinale	Nasturtium officinale

2.2 SINÔNIMOS E NOMES POPULARES

A sinonímia científica para a espécie é citada como: *Roripa nasturtium* (L.) Rusbi, *Sisymbrium nasturtium* Thumb., *Sisymbrium nasturtium-aquaticum* L., *Sisymbrium fluviatile* Vell, *Radicula nasturtium* (Thumb.) Ca, *Radicula nasturtium-aquaticum* Britt. e *Nasturtium nasturtium* Cockerell, segundo OLIVEIRA (1991). O mesmo autor cita ainda como sinônimos populares para o agrião, no Brasil: agrião das fontes, agrião da água, berro, berro d'água e agrião oficial.

2.3 DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA

O agrião é uma planta herbácea e vivaz, seu caule apresenta coloração verde, algumas vezes arroxeadado na base. É flexível, glabro, fistuloso, semi-cilíndrico e provido de sulcos longitudinais pouco profundos. Mede entre 15 cm e 30 cm de comprimento por até 1 cm de diâmetro na base e ao nível dos nós origina finas raízes adventícias de coloração esbranquiçada. Apresenta folhas alternas, compostas, pecioladas, imparipinadas providas de três a onze folíolos membranosos, glabros, de forma variando entre oval, elíptica até orbicular. O folíolo terminal geralmente possui tamanho e base subcordiforme e a margem dos folíolos é inteira ou levemente crenada. As flores são alvinitentes, pequenas, dispostas em espigas terminais ou opostas às folhas. A corola é actinomorfa, crucífera e o cálice é dialissépalo regular formado de quatro sépalas. O androceu é tetradínamo e o ovário apresenta-se súpero

bicarpelar. O fruto é uma siliqua curta, um pouco recurvada mais comprida que o pedúnculo. As valvas são munidas de nervura dorsal distinta. Floresce bianualmente de abril a maio e de novembro a fevereiro, segundo OLIVEIRA (1991).

2.4 DESCRIÇÃO MICROSCÓPICA

O caule apresenta eustélica sendo os feixes vasculares do tipo colateral aberto. A epiderme caulinar quando vista em secção transversal é formada por células de contorno retangular alongada no sentido angular e quando vista em secção paradérmica apresenta células alongadas no sentido longitudinal. Os estômatos localizam-se, com maior freqüência, ao longo dos sulcos longitudinais. A região colenquimática subepidérmica é pouco desenvolvida, tanto na região cortical como na região medular, onde aparece uma fístula, elas são providas de lacunas e câmaras constituindo aerênquima. A secção transversal da folha apresenta limbo com mesófilo heterogêneo e assimétrico. As epidermes são constituídas por células irregulares na forma e no tamanho, não apresentam pêlos e os estômatos ocorrem em ambas as faces. As células epidérmicas vistas de face, apresentam contorno levemente sinuoso e os estômatos do tipo anisocítico acham-se distribuídos irregularmente. O parênquima paliçádico é formado por uma única fileira de células, ao passo que o parênquima lacunoso é bem desenvolvido. Na região do mesófilo ocorrem feixes luminosos do tipo colateral. A planta não apresenta cristais de oxalato de cálcio, segundo OLIVEIRA (1991).

2.5 USO POPULAR

As partes aéreas de *Nasturtium officinale* R. Br. são consumidas em grande quantidade na alimentação humana, possuem odor característico, sabor levemente amargo e levemente picante que a torna agradável. É rica em substâncias ativas e vitaminas sendo utilizada no tratamento de infecções do trato urinário em crianças é também considerada expectorante para tratamento de bronquites, de acordo com BLUMENTHAL *et al.* (2000). Também há indicações de uso no tratamento de icterícia

e em doenças periodontais como as gengivites, segundo LOGGIA (1993). Misturado com água de colônia, pode ser utilizado no tratamento da queda de cabelo, segundo QUER (1962).

2.6 CONSTITUIÇÃO QUÍMICA

Segundo trabalho realizado por JOHNSTON (1968), o isolamento de flavonóides, glucosinolatos, saponinas e compostos fenólicos simples derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico (Figura 2, pág. 9), no agrião, pode ser realizado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20. O processo é realizado em colunas com dimensões de 25x450 mm com eluição de 3 a 5 mL por minuto. Deve-se usar de 1 % a 2 % da composição a ser separada em relação a quantidade de Sephadex LH-20.

A conversão de ácidos carboxílicos aromáticos foi investigada em *Nasturtium officinale* R. Br. por LOFFELHARDT (1975), por meio de experimentos que demonstraram a capacidade da membrana tilacóide de catalisar a L-fenilamina em ácido benzóico.

GIL *et al.* (1980) demonstraram que a espécie *Nasturtium officinale* R. Br. contém 4 glucosinolatos, sendo que o 2-feniletil glucosinolato foi considerado o principal representante. Isotiocianatos foram os maiores produtos de degradação dos glucosinolatos, entretanto os tiocianatos não foram detectados. A aplicação de calor durante a extração causou um aumento na formação de nitrilas sobre a formação de tiocianatos.

HART *et al.* (1995) desenvolveram um método em cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE - para determinação de carotenóides em vários vegetais incluindo o agrião, o qual demonstrou ser uma significativa fonte de luteína e beta-caroteno (>1000 mg/100 g). HORBOWICZ (1989) determinou o conteúdo de vitamina E (alfa-tocoferol) em várias plantas por CLAE e o agrião foi uma das que apresentou o maior conteúdo, cerca de 5 mg/100 g na planta fresca.

Um método de separação por CLAE de glucosinolatos intactos em vegetais da família Brassicaceae foi desenvolvido por LEWKE *et al.* (1996). O método é baseado em separação por coluna RP-18, utilizando como eluente metanol e tampão

acetato de amônio com detecção no ultravioleta (UV).

No agrião, a conversão, NADPH-dependente, de aminoácidos para suas aldoxinas representa o início da síntese de glucosinolatos, segundo BENNETT *et al.* (1996). Segundo SVANEM *et al.* (1997) sintetizaram o [alfa-14C]-desulfopenil glucosinolato em seis passos a partir do feniletilbromideo.

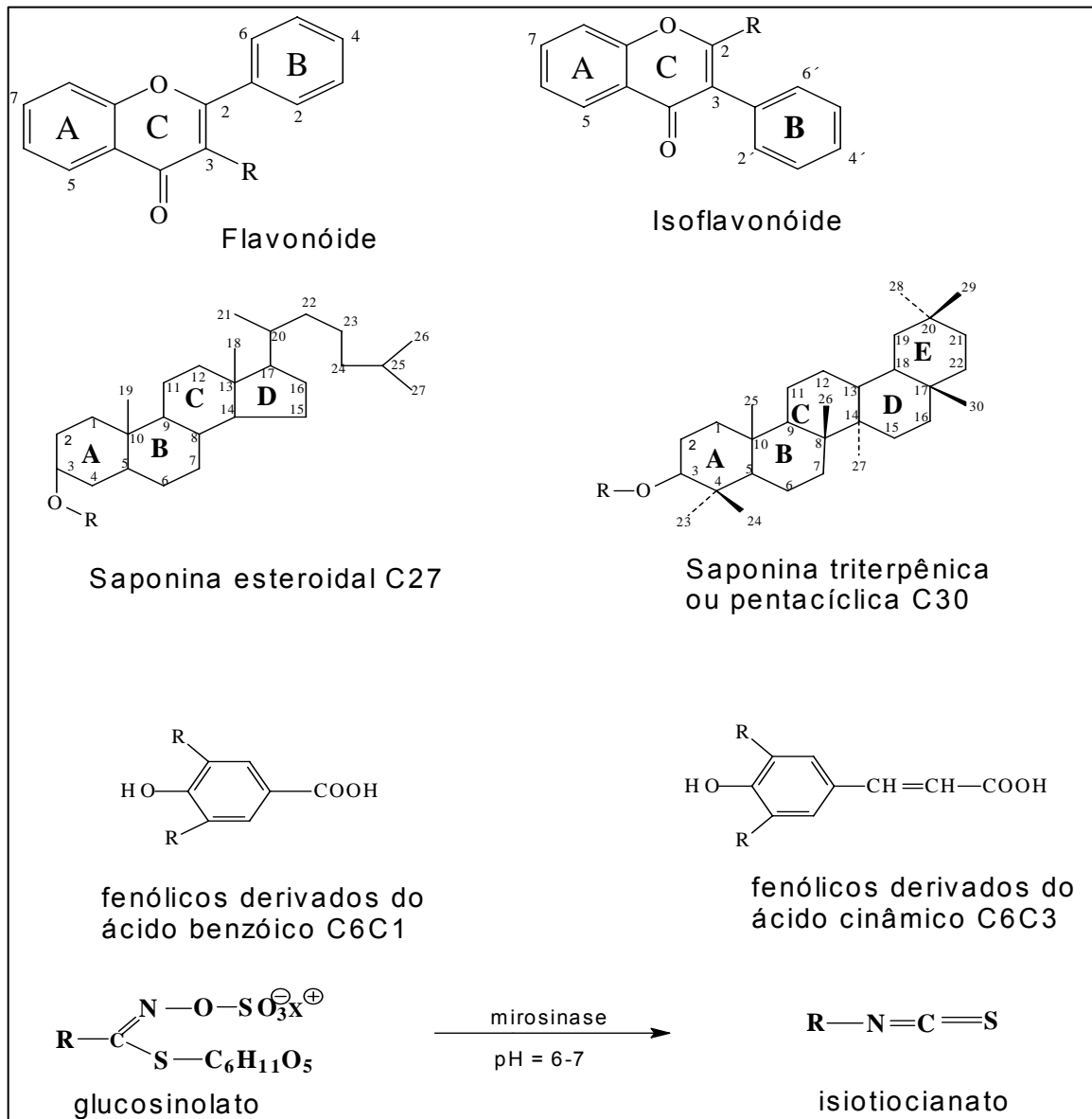
Utilizando um método de CLAE para o doseamento dos produtos cíclicos dos isotiocianatos e 1-2-benzenoditiol, após o tratamento do extrato com mirosinase, JIAO *et al.* (1998) determinaram que o agrião contém 81,3 µmol/100 g desses compostos na planta fresca.

O *Nasturtium officinale* R. Br. contém glucosinolatos, como a gluconasturtiina (precursor do feniletil isotiocianato - PEITC), o qual ocorre por hidrólise. Também possui nitrilas, como a 3-fenilpropionitrila e a 8-metiltiooctanona nitrila. Possui os minerais: manganês, ferro, fósforo, iodo, cobre e cálcio e as vitaminas A, C, E, e nicotinamida, segundo BLUMENTHAL *et al.* (2000) e LOGGIA (1993).

KIKUCHI *et al.* (1999) desenvolveram um método para separação e análise de isoflavonas beta-glicosídicas (daidzina e genistina) e agliconas (daidzeína e genisteína) do agrião utilizando CLAE em fase reversa com eluente gradiente de metanol e água.

GODA *et al.* (1999) isolaram do *Nasturtium officinale* R. Br. compostos inibidores da histamina em células antígeno estimuladas (RBL-2H3). Dos quinze compostos isolados, os flavonóides e megastigmanos inibiram significativamente a liberação de histamina e dois flavonóides em específico 3-O-soforosídeo da rametina (7-metilquercetina) e ramazina – eram compostos inéditos.

FIGURA 2 – NÚCLEOS FUNDAMENTAIS DE REFERÊNCIA E ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS REFERIDAS



FONTE: CARVALHO 2001

2.7 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

Inúmeras pesquisas farmacológicas demonstraram a utilização do agrião como fator protetor dos pulmões de fumantes contra agentes carcinógenos presentes no tabaco. Dietas que incluem o agrião podem ajudar a inibir a formação do 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil-1-butanona), ou NNK. O NNK é um carcinógeno presente no tabaco que contribui para etiologia do câncer do pulmão. O feniletil isotiocianato (PEITC), liberado na mastigação da folha do agrião pela hidrólise enzimática do feniletil glucosinolato, é um agente químico preventivo contra o câncer do pulmão. Estudos pré-clínicos demonstraram que o PEITC inibiu a carcinogênese, no pulmão, induzida pela nitrosamina, que é um potente carcinogênico específico do tabaco. Para determinar biodisponibilidade do PEITC a partir do seu precursor glucosinolato, análises em material biológico animal foram conduzidas, as quais têm demonstrado que o PEITC é liberado após ingestão da folha de agrião, segundo BLUMENTHAL *et al.* (2000).

GETAHUN *et al.* (1999) demonstraram que glucosinolatos são convertidos em isotiocianatos em humanos depois da ingestão de agrião cozido, onde as mirosinases foram completamente inativadas. A extensão da conversão, entretanto, é consideravelmente menor que a ocorrida com a ingestão de agrião cru. Além disso, foi sugerido que a microflora intestinal é uma boa fonte para a hidrólise de glucosinolatos a isotiocianatos em humanos.

Tem sido reportado que o agrião possui atividades antibacterianas, antiescorbútica, colagoga e propriedades expectorantes, segundo BLUMENTHAL *et al.* (2000).

Extrato de agrião administrado na dose de 4% do peso corporal em ratos mostrou significativo aumento na pressão arterial, segundo RIBEIRO (1998). Ainda neste contexto, não foi observada a interação do uso do agrião concomitantemente com outros fármacos, segundo BLUMENTHAL *et al.* (2000).

2.7.1 Dosagem e Administração

Segundo BLUMENTHAL *et al.* (2000) o uso interno do *Nasturtium officinale* R. Br. deve seguir a dosagem de acordo com a forma de uso. Para a droga vegetal, a dose adequada é de 4 a 6 g em ingestão diária; por conseguinte, quando utilizada a planta fresca esta tem como posologia diária cerca de 20 a 30 g. Esses autores se referem ao sumo da planta fresca, com indicação de consumo de 60 a 150 mL de vegetal fresco moído em água previamente fervida e fria. Ao tratarem o infuso como preparação aquosa extrativa, referem-se a uma quantidade de droga vegetal inferior àquelas indicadas, nas farmacopéias, para infusos. Recomendam o uso de 2 g em 150 mL de água fervente em infusão por 10 min, duas ou três vezes ao dia antes das refeições.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA, IDENTIFICAÇÃO E EXSICATA DO AGRIÃO

O material vegetal foi coletado junto ao produtor e fornecedor credenciado, no município Fazenda do Rio Grande, Estado do Paraná, Brasil. Este recebeu visitas para revisão das condições agrológicas, técnicas, sistemas de sementeiras, transplante e controle de umidificação (normal ou irrigação da nascente). Foi então elaborado um cronograma de coletas para estudo da composição, fórmula percentual durante o consumo anual e suas variações.

As coletas foram realizadas em abril de 2002 sendo adquiridos 2 kg de droga vegetal, estabilizada pelo produtor, em abril de 2003 e em outubro de 2004 foram coletados 85 kg e 20 kg, respectivamente, de material vegetal fresco do mesmo produtor, que foram estabilizados no laboratório de farmacotécnica do curso de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Em dezembro de 2005 e em setembro de 2007 foram coletados 200 kg e 850 kg, respectivamente, de material vegetal fresco, do mesmo produtor e foram estabilizados em secador industrial no município de Campo Largo, estado do Paraná.

Material proveniente do mesmo produtor já havia sido destinado à realização de exsicata (figura 3) em abril de 2000, sendo herborizado no Herbário de Curitiba, Museu Botânico, sob o número 248503, conferido pelo Dr. Gert Hatschbach.

FIGURA 3 – *Nasturtium officinale* R. BR.



FONTE: CARVALHO 2001

3.2 ESTABILIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DA DROGA VEGETAL

O material vegetal, obtido em Abril de 2003, foi pré-estabilizado à temperatura ambiente com ventilação forçada. Este foi separado em três partes: talos e folhas (39 kg de material fresco), só folhas (33 kg de material fresco) e somente talos (13 kg de material fresco). Em seguida foi realizada a estabilização em estufa ventilada a 45°C, por um período de 20 horas. A estabilização de todo o material vegetal se deu no período de abril de 2003 (o mesmo procedimento foi executado para a coleta de outubro de 2004). Obtendo-se, assim, três frações de material vegetal: droga vegetal talos e folhas (DVTF), droga vegetal folhas (DVF) e droga vegetal talos (DVT).

O material vegetal, tanto o obtido em dezembro de 2005 quanto em setembro de 2007, foram estabilizados em estufa industrial no patamar de temperatura de 45°C a 70°C com ventilação forçada por um período de 24 horas e após secagem foi moído em tela de 8 mm e embalado em sacos. A estabilização de todo o material vegetal, em cada coleta, se deu no período imediatamente subsequente tendo duração média de 20 horas de secagem. A partir das coletas de 2005 o material vegetal não foi separado como anteriormente citado, obtendo-se então, apenas uma fração de droga vegetal: droga vegetal talos e folhas (DVTF).

3.2.1 Determinação gravimétrica de perda, em mufla, na droga vegetal estabilizada.

As análises foram executadas, segundo descrito no item 3.3.3 de métodos gerais, para os três tipos de droga vegetal obtidos: talos e folhas (DVTF), folhas (DVF) e talos (DVT).

O mesmo procedimento foi aplicado às amostras das coletas de 2005 e 2007, na droga vegetal respectivamente obtida.

3.3 MÉTODOS GERAIS

3.3.1 Determinação gravimétrica de perda em balança de infravermelho

Para a determinação dos voláteis totais, que foi realizada segundo a Farmacopéia Brasileira 4 ed. 1988, p. V.2.9., utilizou-se balança de perda por infravermelho da marca Sartorius, modelo MA 30.

Pesou-se 2 g da droga vegetal estabilizada ou mediu-se 2 mL do extrato padronizado 1:1, em placa bacteriológica de acrílico, com 50 mm de diâmetro. A análise foi realizada a 45 °C, em um período de 90 min.

3.3.2 Determinação do teor de sólidos por perda em rota-vapor

Uma alíquota de 25 mL de extrato padronizado foi concentrada em um balão de 50 mL em evaporador rotatório, a 45 °C e 600 mmHg até a secura para determinação do teor de sólidos por gravimetria.

3.3.3 Determinação gravimétrica de perda em mufla programável, com cinco patamares de temperatura.

A determinação foi realizada de acordo com a metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira 4 ed. 1988, p.V.4.24, USP XXIV, 2000, p.1885 e VOGEL 2002. A metodologia otimizada utilizou-se para tanto uma mufla da marca EDG, MOD-1800 CON5P segundo CARVALHO 2001.

Os seis cadinhos de porcelana foram previamente tarados e calcinados com alíquota de 2 g de droga vegetal ou com volume de extrato equivalente a dois gramas para análise de macronutrientes (Ca; P; K; Na; Cl; Mg; S). Para análise de micronutrientes (Fe; Cu; Co; Mn; Cr; I; F; Mo; Se; Cr e Si) foram preparadas três alíquotas com 20 g de amostras. Estes foram levados à mufla programada em gradientes crescentes de temperatura. Ao final de cada patamar de temperatura, os cadinhos foram resfriados em dessecador e em seguida foram determinadas suas massas, em balança analítica, segundo a tabela 2.

TABELA 2 – PROGRAMAÇÃO DA MUFLA

Temperatura (°C)	Rampa de aquecimento (°C/min)	Tempo no patamar de estabilização (min)
45	5	90
105	5	90
250	10	60
450	25	150
675	25	150

3.3.3.1 Preparo das amostras para determinação de metais.

A determinação foi realizada a partir das amostras provenientes do item 3.3.3. As amostras foram dissolvidas em 20 mL de água e 20 mL de ácido nítrico, transferiu-se a solução para um béquer de 250 mL, aqueceu-se por 30 minutos em ebulição, diluiu-se para 80 mL com água, filtrou-se a solução para balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água. As análises para determinação de metais foram realizadas na empresa Natrium Química (Joinville-SC) por absorção atômica, segundo método constante de FRANSON (1998).

3.3.4 Determinação de teor de água pelo método de Karl Fisher

O teor de água foi determinado segundo a Farmacopéia Brasileira 4. ed. 1988, p. V.2.20.1.

Foram pesados 5 g da droga vegetal em um tubo de Falcon de 50 mL e a este foram adicionados 20 mL de metanol P.A. Merck. Procedeu-se a maceração por 15 minutos. A seguir iniciou-se o processo de extração por turbólise (Ultraturrax IKA, modelo T25 basic). Centrifugou-se o extrato e transferiu-se o sobrenadante, por filtração em papel, para balão volumétrico de 50 mL. Repetiu-se o processo extrativo por mais duas vezes. Completou-se o volume com metanol e determinou-se o teor de água no aparelho de Karl Fisher (Karl Fisher Metrohm, mod. 701KF, 703 Ti stand).

3.3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises de CCD foram realizadas pela otimização de metodologias descritas em STAHL (1969), MABRY (1970), LOGGIA (1993), WAGNER (1996) e CARVALHO (2001), para identificação de compostos fenólicos, glucosinolatos e saponinas na forma esteroideal e triterpênica. Foram utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 F₂₅₄, da marca Merck, de dimensões 10 cm por 10 cm.

Aplicou-se de 5 a 10 µL, de cada amostra, com microseringa, intercalando-as com os padrões de referência (1 mg/mL) solubilizados em metanol. As fases móveis utilizadas constam da tabela 3, juntamente com a composição de solventes e a respectivas proporções entre os mesmos.

TABELA 3 – COMPOSIÇÃO DE SOLVENTES DAS FASES MÓVEIS UTILIZADAS NAS ANÁLISES POR CCD E RESPECTIVAS PROPORÇÕES

Fase móvel	Composição	Proporção
1 ^(a)	tolueno:acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água	9:68:2:9:12
2 ^(b)	acetato de etila: tolueno	7:93
3 ^(c)	clorofórmio: ácido acético: metanol: água	53:29:11:7
4 ^(d)	n-butanol: n-propanol: ácido acético: água	49:17:17:17
5 ^(e)	acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água	100:11:11:26

(a) CARVALHO, 2001;

(b) MIGUEL saponinas;

(c) WAGNER (pág. 319 saponinas);

(d) WAGNER (pág. 298 glucosinolatos);

(e) WAGNER (pág. 210 a 215 fenólicos).

As placas foram realizadas em triplicatas para que pudessem ser reveladas por nebulização com os reativos: (1) – difenilboriloxietilamino a 1 % em metanol (reativo de NEU), (2) – mistura 1:1 com vanilina 2 % em etanol e 24 % de ácido fosfórico em etanol – preparado no momento da revelação, e (3) – mistura 1:1 com vanilina 2 % em etanol e 10 % de ácido sulfúrico em etanol – preparado no momento da revelação.

Antes e após as revelações com os reativos de NEU (para fenólicos) e vanilina (para saponinas, glucosinolatos, esteróides e terpenos policíclicos) as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta em 254 nm e 366 nm.

3.3.6 Cromatografia Gasosa e Espectrometria de Massa

Foram realizadas análises por CG para verificação de compostos voláteis, glucosinolatos silanizados e esteróides. Para tanto se utilizou cromatógrafo gasoso da marca Shimadzu, modelo 14 B com detector de ionização de chama, equipado com colunas Megabore DB-1 (100% dimetilpolisiloxano, polaridade 5) e DB-17 (50% fenil e 50% dimetilpolisiloxano, polaridade 24) de 0,53 mm de diâmetro interno por 30 m de comprimento. Como gás de arraste, utilizou-se hidrogênio a uma vazão de 6 mL por minuto, split a 6 mL por minuto (razão 1:1), purga do septo 3 mL por minuto, "make up" nitrogênio 25 mL por minuto e oxigênio a 100 mL por minuto. O gradiente de temperatura utilizado foi: temperatura inicial 100°C com patamar de 1 minuto e rampa de aquecimento a 8°C por minuto até 260°C com patamar de 6 minutos. A temperatura do injetor foi de 260°C e do detector foi de 280°C. O volume de injeção foi de 2 µL, segundo CARVALHO (2001), CIOLA (1973), LANÇAS (1993), NOWAK (2000), OLIVER (1995) E SPENCE (1983). As amostras destinadas a espectrometria de massa foram silanizadas e injetadas no mesmo sistema cromatográfico.

As análises derivatizadas e analisadas no Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR) por CG/MS, utilizou um cromatógrafo gasoso Varian 3300 acoplado a um detector Finigan Íon Trap modelo 800R com as mesmas condições acima más utilizando uma coluna capilar DB-225 de 30m x 0,025mm (comprimento x diâmetro interno).

As análises não derivatizadas e analisadas na central de análises da UFSC por Probe/MS, utilizou um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG 17-A acoplado a um detector Finigan Íon Trap modelo 800R com injeção direta no *probe* do detector.

3.3.6.1 Preparo das amostras para análise por cromatografia gasosa

As soluções padrão ou amostra, cujas concentrações variaram de 1 a 10 mg por mL, foram preparadas com 100 a 500 µL de amostra ou padrão adicionados de 50µL de solução de padrão interno de acetato de tocoferol com concentração de 5 mg/mL em etanol 96%.

3.3.6.2 Preparo das amostras silanizadas para análise no cromatógrafo gasoso e espectrômetro de massa - GC/MS

As soluções padrão ou amostra, cujas concentrações variaram de 1 a 10 mg por mL, foram preparadas transferindo-se 500 µL de amostra ou solução padrão para um microtubo de 1,5 mL. Foram adicionados 250 µL de agente silanizante (trimetil silano) na amostra ou padrão e após foi adicionado 250µL de piridina destilada para análise em GC/MS. Nas amostras para análise em CG foi utilizada uma alíquota de 250 µL da amostra silanizada e adicionando 50 µL de solução de padrão interno de acetato de tocoferol com concentração de 5 mg/mL em etanol 96%.

3.3.7 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.3.7.1 Sistema cromatográfico analítico

As análises foram realizadas em 3 aparelhos Merck-Hitashi (1-Laboratório Catarinense S.A., 2- Indústria Farmacêutica As Ervas Curam Ltda, 3- Laboratório de Fitoquímica da UFPR) compostos de: bomba L7100 Lachrom (1 e 2) e bomba L2130 Elite LaChrom (3); degaseificador de solventes L7612 (1 e 2) e L7812 LaChrom (3); válvula de injeção Rheodyne 7725i (1, 2 e 3), sendo que a partir de fevereiro de 2008 foi substituída, no cromatógrafo 2, por injetor automático 7200 Merck ; Forno L7300 Lachrom (2); detectores DAD L7450 LaChrom (1), UV L7400 (2) (substituído em 16/08/2006 por DAD 7455), e DAD L2450 Elite LaChrom (3); interface L7000 LaChrom (1 e 2) e EZChrom Elite (3) conectada ao sistema operacional Windows NT.

Utilizaram-se as colunas Merck ODS 5 µm (250 mm X 4 mm d.i.), XTerra™ 5 µm (MS C18 250 mm x 4,6 mm d.i.) e Phenomenex Gemini C18 (250 mm X 4 mm d.i.), à temperatura de 35°C e sistema de separação conforme tabelas 4, 5, 6 e 7 e segundo as seguintes referências: OLSEN (1980 e 1981), BJÖRKQVIST (1988), TREVOR (1991), TREASE (1992), SILVERSTEIN (1994), MOFFAT (1986), BUDAVARI (1996), Mc MURRY (1997), SHIMAMURA (1999), SIMÕES *et al.* (2004), USP 24 (2000), BARRY (2001), HUCK (2001), MELLO (2001), JUMA (2001), KANG (2001), CARVALHO (2001), WATERS (2001), KIDDLE (2001), BURNS (2003).

TABELA 4 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS FENÓLICOS.

Tempo (min.)	Fase A (%) ⁽¹⁾	Fase B (%) ⁽²⁾	Fase C (%) ⁽³⁾	Fase D (%) ⁽⁴⁾	Fluxo mL/min
0 – 5	98	1	1	0	1
5 – 10	80	18	2	0	1
10 – 15	70	27	3	0	1
15 – 37	40	50	10	0	1,1
37 – 41	20	50	30	0	1,2
41 – 50	5	1	94	0	1,2
50 – 55	1	1	98	0	1,5
55 – 60	98	1	1	0	1

⁽¹⁾ Fase A = 0,1 M ácido fosfórico em ácido sulfúrico 0,01 M;

⁽²⁾ Fase B = metanol;

⁽³⁾ Fase C = acetonitrila:água (90:10)

⁽⁴⁾ Fase D = acetonitrila

TABELA 5 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE DE FENÓLICOS E FENILETIL GLUCOSINOLATO

Tempo (min)	Fase A (%) ⁽¹⁾	Fase B (%) ⁽²⁾	Fase C (%) ⁽³⁾	Fase D (%) ⁽⁴⁾	Fluxo mL/min
0 – 5	97	0	3	0	1
5 – 10	87	0	13	0	1
10 – 15	78	0	22	0	1
15 – 37	65	0	35	0	1,1
37 – 41	30	0	70	0	1,2
41 – 50	30	0	70	0	1,2
50 – 55	97	0	3	0	1,5
55 – 60	97	0	3	0	1

⁽¹⁾ Fase A = 0,1 M ácido fosfórico em ácido sulfúrico 0,01 M;

⁽²⁾ Fase B = metanol;

⁽³⁾ Fase C = acetonitrila:água (90:10)

⁽⁴⁾ Fase D = acetonitrila

TABELA 6 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE DE COMPOSTOS NITROGENADOS

Tempo (min)	Fase A (%) ⁽¹⁾	Fase B (%) ⁽²⁾	Fase C (%) ⁽³⁾	Fase D (%) ⁽⁴⁾	Fluxo mL/min
0 – 40	60	16	24	0	1,2

⁽¹⁾ Fase A = 1 mg/mL de lauril sulfato de sódio em solução 0,1 M ácido fosfórico em ácido sulfúrico 0,01 M;

⁽²⁾ Fase B = metanol;

⁽³⁾ Fase C = acetonitrila:água (90:10)

⁽⁴⁾ Fase D = acetonitrila

TABELA 7 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO PARA ANÁLISE DE ESTERÓIDES

Tempo (min)	Fase A (%) ⁽¹⁾	Fase B (%) ⁽²⁾	Fase C (%) ⁽³⁾	Fase D (%) ⁽⁴⁾	Fluxo mL/min
0 – 5	5	10	0	85	1,5

⁽¹⁾ Fase A = 0,1 M ácido fosfórico em ácido sulfúrico 0,01 M;

⁽²⁾ Fase B = metanol;

⁽³⁾ Fase C = acetonitrila:água (90:10)

⁽⁴⁾ Fase D = acetonitrila

3.3.7.2 Sistema cromatográfico preparativo

3.3.7.2.1 Análise preparativa em meio de ácido clorídrico

Utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico que o analítico, substituindo a coluna analítica por uma coluna Merck ODS 10 μm (250 mm X 10 mm d.i.) com fluxo de 2 mL/min e gradiente conforme tabela 8.

As análises das frações foram analisadas por Probe/MS na UFPR, utilizou um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG 17-A acoplado a um detector Finigan Íon Trap modelo 800R com injeção direta no *probe* do detector.

TABELA 8 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA ANÁLISE PREPARATIVA COM ÁCIDO CLORÍDRICO

Tempo (min)	Fase A (%) ⁽¹⁾	Fase B (%) ⁽²⁾	Fase C (%) ⁽³⁾
0-1	10	89	1
1-2	50	49	1
2-5	50	49	1
5-7	10	1	89
7-12	10	1	89
12-14	10	89	1
14-20	10	89	1

⁽¹⁾ Fase A = Água:acetonitrila:ácido clorídrico 0,1 M (946:50:4);

⁽²⁾ Fase B = água:ácido clorídrico 0,1 M (996:4);

⁽³⁾ Fase C = acetonitrila:fase B (90:10).

3.3.7.2.2 Análise preparativa em meio de ácido fórmico

Utilizou-se o mesmo sistema cromatográfico que o analítico, substituindo a coluna analítica por uma coluna X-Terra 10 μm (250 mm X 10 mm d.i.) com fluxo de 2 mL/min e gradiente conforme tabela 9, para obtenção de frações purificadas. As frações obtidas foram analisadas por espectrometria de massa com detector triplo quadripólo (Applied Biosystems API 3200) e utilizando-se um *probe* por ionização de eletrospray em modo positivo e modo negativo, de acordo com a necessidade.

TABELA 9 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DA ANÁLISE PREPARATIVA COM ÁCIDO FÓRMICO

Tempo (min)	Fase A (%) ⁽¹⁾	Fase B (%) ⁽²⁾
0-4	97	89
4-15	70	30
15-20	70	30
20-25	30	70
25-53	30	70
53-54	97	3
54-59	97	3

⁽¹⁾ Fase A = Água:acetonitrila:ácido fórmico (985:10:5);

⁽²⁾ Fase B = acetonitrila:água:ácido fórmico (900:95:5);

3.3.7.3 Qualificação (*fingerprint*) e semi-quantificação (>95%) de compostos fenólicos, nitrogenados e esteróides por CLAE.

3.3.7.3.1 Preparo de soluções padrão para construção das curvas de semi-quantificação (> 95%) e *fingerprint* (qualificação).

Para a determinação de fenólicos foram realizadas duas curvas, uma para quantificação em fenilpropanóides e outra quantificação em cumarinas e flavonóides. Foram também construídas curvas para compostos nitrogenados e esteróides. Todas as soluções foram preparadas segundo CARVALHO (2001), HARBONE (1998), SIMÕES *et al.* (2004), ANVISA (2003) e LYON *et al.* (2006).

Inicialmente preparou-se todas as soluções padrão com concentração de 2 mg/mL, em metanol. A seguir foi preparada uma solução de padrões com concentração final 0,2 mg/mL de cada padrão necessário, conforme demonstrado nas tabelas 10, 12, 14 e 16. Então foram preparadas as soluções padrão para construção da curva de linearidade, com concentrações entre 0,08 e 0,12 mg/mL conforme demonstrado nas tabelas 11, 13, 15 e 17.

As soluções foram diluídas para se obter um sinal de 100 a 1000 mAU de absorvância pelo detector.

TABELA 10 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE PADRÕES A 0,2 mg/mL PARA FENILPROPANÓIDES.

Padrão [2 mg/mL]	Volume de solução µL	Padrão [2 mg/mL]	Volume de solução µL
Ácido gálico	500	Ácido ferúlico	500
Pirogalol	500	Ácido sinápico	500
Ácido clorogênico	500	Ácido cinâmico	500
Ácido cafeico	500	Ácido hidrocinâmico	500
Ácido p-cumárico	500	Metanol PA	500

TABELA 11 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE EM FENILPROPANÓIDES E *FINGERPRINT*.

	Solução 0,08 mg/mL 80%	Solução 0,09 mg/mL 90%	Solução 0,1 mg/mL 100%	Solução 0,11 mg/mL 110%	Solução 0,12 mg/mL 120%
Solução 0,1M H ₃ PO ₄	600 µL	550 µL	500 µL	450 µL	400 µL
Solução de padrões 0,2 mg/mL ⁽¹⁾	400 µL	450 µL	500 µL	550 µL	600 µL

⁽¹⁾ Solução de padrões 0,2 mg/mL demonstrada na tabela 6

TABELA 12 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE PADRÕES A 0,2 mg/mL PARA CUMARINAS E FLAVONÓIDES.

Padrão [2mg/mL]	Volume de solução μL	Padrão [2mg/mL]	Volume de solução μL
Psoraleno	500	Luteolina	500
Cumarina	500	Quercetina	500
Rutina	500	Isorametina	500
Ácido cinâmico	500	Metanol PA	1500

TABELA 13 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES E *FINGERPRINT*

	Solução 0,08 mg/mL 80%	Solução 0,09 mg/mL 90%	Solução 0,1 mg/mL 100%	Solução 0,11 mg/mL 110%	Solução 0,12 mg/mL 120%
Solução 0,1M H ₃ PO ₄	600 μL	550 μL	500 μL	450 μL	400 μL
Solução de padrões 0,2 mg/mL ⁽¹⁾	400 μL	450 μL	500 μL	550 μL	600 μL

⁽¹⁾ Solução de padrões 0,2 mg/mL demonstrada na tabela 8

TABELA 14 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE PADRÕES A 0,2 mg/mL PARA COMPOSTOS NITROGENADOS.

Padrão [2mg/mL]	Volume de solução μL	Padrão [2mg/mL]	Volume de solução μL
Nicotinamida	500	Ácido hidrocínâmico	500
Tirosina	500	Fenilalanina	500
Tiramina	500	Metanol PA	2500

TABELA 15 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE DE COMPOSTOS NITROGENADOS E *FINGERPRINT*

	Solução 0,08 mg/mL 80%	Solução 0,09 mg/mL 90%	Solução 0,1 mg/mL 100%	Solução 0,11 mg/mL 110%	Solução 0,12 mg/mL 120%
Solução 0,1M H ₃ PO ₄ - com 1 mg/mL de lauril sulfato de sódio	600 μL	550 μL	500 μL	450 μL	400 μL
Solução de padrões 0,2 mg/mL ⁽¹⁾	400 μL	450 μL	500 μL	550 μL	600 μL

⁽¹⁾ Solução de padrões 0,2 mg/mL demonstrada na tabela 10

TABELA 16 – PREPARO DA SOLUÇÃO DE PADRÕES A 0,2 mg/mL PARA ESTERÓIDES.

Padrão [2mg/mL]	Volume de solução μL	Padrão [2mg/mL]	Volume de solução μL
Beta sitosterol	500	Tocoferol	500
Estigmasterol	500	Acetato de tocoferol	500
lupeol	500	Metanol PA	2500

TABELA 17 – PREPARO DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DA CURVA DE LINEARIDADE DE ESTERÓIDES E *FINGERPRINT*

	Solução 0,08 mg/mL 80%	Solução 0,09 mg/mL 90%	Solução 0,1 mg/mL 100%	Solução 0,11 mg/mL 110%	Solução 0,12 mg/mL 120%
Metanol	600 μL	550 μL	500 μL	450 μL	400 μL
Solução de padrões 0,2 mg/mL ⁽¹⁾	400 μL	450 μL	500 μL	550 μL	600 μL

⁽¹⁾ Solução de padrões 0,2 mg/mL demonstrada na tabela 12

3.3.7.3.2 Preparo da amostra para análise por CLAE para determinação de compostos fenólicos, nitrogenados e esteróides

Adicionou-se de 1 a 1,5 mL de cada amostra em um microtubo de 2 mL. As amostras foram preparadas conforme tabela 18. Foram diluídas para concentrações que se obtenha um sinal de 100 a 1000 mAU de absorvância pelo detector.

TABELA 18 – PREPARO DAS SOLUÇÕES AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, NITROGENADOS E ESTERÓIDES; E *FINGERPRINT*

Compostos	Amostra Extraída	Solução I ⁽¹⁾	Solução II ⁽²⁾	Solução III ⁽³⁾
Fenólicos	500-800 µL	200-500 µL	-	-
Nitrogenados	500-800 µL	-	-	200-500 µL
Esteróides	500-800 µL	-	200-500 µL	-

⁽¹⁾ Solução I = 0,1M:0,01M (H₃PO₄:H₂SO₄)

⁽²⁾ Solução II = 95% metanol e 5% de solução 0,1M:0,01M (H₃PO₄:H₂SO₄)

⁽³⁾ Solução III = 0,1M:0,01M (H₃PO₄:H₂SO₄) com 1 mg/mL de lauril sulfato de sódio

3.3.7.4 Validação analítica do doseamento do feniletil glucosinolato por CLAE

As análises cromatográficas quantitativas por CLAE foram validadas segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (RE-899 de 29 de maio de 2003) da ANVISA.

De acordo com esta resolução, as metodologias se classificam segundo sua finalidade e na categoria I teremos: testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Esta categoria exige a realização dos seguintes ensaios: especificidade, linearidade, intervalo, precisão por repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez.

A descrição detalhada da execução do ensaio analítico para fins de validação do método de doseamento de feniletil glucosinolato (ENGELLEN-EIGLES, 2006) no extrato padronizado de talos e folhas do Agrião apresenta-se a seguir.

As análises foram realizadas utilizando o extrato padronizado de talos e folhas (EPTF), somente a análise de especificidade utilizará a amostra do placebo das folhas no intuito de demonstrar a aplicabilidade do método aos extratos. As condições da análise cromatográfica bem como o modo de preparo da amostra conforme descritas neste capítulo. Os resultados são demonstrados em miligrama de analíto por grama de droga vegetal ou mL do extrato padronizado (mg/g ou mg/mL).

3.3.7.4.1 Linearidade

Inicialmente preparou-se a solução padrão com concentração de 1 mg/mL, em metanol. A seguir foi preparada uma diluição da solução padrão com concentração final 0,4 mg/mL. Para a realização da curva de calibração foram preparadas sete concentrações diferentes (0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14; 0,16 mg/mL) a partir da solução padrão de referência de feniletil glucosinolato com concentração de 0,4 mg/mL, em balões volumétricos, calibrados, de 5 mL. Para cada concentração foram realizadas 3 corridas (3 pontos por concentração). Conforme RE 899 da ANVISA (2003) preconizou-se um intervalo entre 40 a 160 % para análises de determinação quantitativa dos analitos dos itens 3.4 e 3.7, visando à obtenção mais precisa dos resultados de eficiência extrativa, os quais podem demonstrar variações maiores que 60 %. A condição de análise é que o coeficiente de correlação (r^2) deve resultar no mínimo 0,98. As soluções foram diluídas para se obter um sinal de 50 a 1000 mAU de absorvância pelo detector.

3.3.7.4.2 Exatidão

O placebo do extrato padronizado de talos e folhas do Agrião foi considerado o resíduo da droga vegetal que já passou pelo processo de extração por Soxhlet. Amostras dos placebos dos itens 3.4 e 3.7 fortalecidas com o padrão de referência foram analisadas em triplicata em três níveis de concentrações determinando a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do padrão adicionada na amostra. Para os cálculos foram utilizadas no mínimo três leituras.

Foi utilizado o padrão de referência de feniletil glucosinolato para preparo da amostra placebo fortalecido nas concentrações de 100 %. As extrações foram realizadas com o mesmo processo do preparo dos itens 3.4 e 3.7, substituindo a droga vegetal pelo resíduo de extração adicionado os padrões de referências.

As amostras de placebo fortalecido foram preparadas em três replicatas conforme tabela 19, 20 e 21. A exatidão é expressa em porcentagem de recuperação (Recuperação = concentração prática do padrão adicionado x 100) através do ensaio do ativo adicionado em quantidade conhecida. Esta porcentagem é calculada determinando-se a razão da quantidade encontrada dividida pela quantidade adicionada e multiplicando-se por 100. O valor de recuperação deve ficar entre 95 a 105 %.

TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO TEÓRICA PADRÃO ADICIONADO (MÍNIMA)

Preparo da solução	EPTF 1/100	EPSTF 1/200	XPTF 1/10	SOPTF 1/10
Volume de amostra (µL)	125	125	125	125
Solução de feniletil glucosinolato 0,4mg/mL (µL)	250	250	250	250
Metanol:Fase A qsp (mL)	5	5	5	5

TABELA 20 – CONCENTRAÇÃO TEÓRICA PADRÃO ADICIONADO (MÉDIA)

Preparo da solução	EPTF 1/100	EPSTF 1/200	XPTF 1/10	SOPTF 1/10
Volume de amostra (µL)	125	125	125	125
Solução de feniletil glucosinolato 0,4mg/mL (µL)	750	750	750	750
Metanol:Fase A qsp (mL)	5	5	5	5

TABELA 21 – CONCENTRAÇÃO TEÓRICA PADRÃO ADICIONADO (MÁXIMA)

Preparo da solução	EPTF 1/100	EPSTF 1/200	XPTF 1/10	SOPTF 1/10
Volume de amostra (µL)	125	125	125	125
Solução de feniletil glucosinolato 0,4mg/mL (µL)	1500	1500	1500	1500
Metanol:Fase A qsp (mL)	5	5	5	5

3.3.7.4.3 Especificidade

Foram analisadas as soluções do padrão de referência e as soluções placebo dos itens 3.4 e 3.7, para a determinação da interferência de cada amostra nas análises. A solução placebo foi preparada da mesma forma que a amostra, substituindo a droga vegetal pelo resíduo da extração.

Os cromatogramas resultantes foram analisados por sobreposição, não podendo haver resposta maior que 2 % nas soluções placebo, no mesmo tempo de retenção do feniletil glucosinolato obtido nas soluções padrão e placebos fortalecidos.

3.3.7.4.4 Precisão por repetibilidade

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão por repetibilidade (intra-corrída) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Foram realizadas três análises da amostra com seis repetições no mesmo dia, com o mesmo analista e mesmo equipamento.

3.3.7.4.5 Precisão intermediária

A precisão por intermediária (inter-corridas) é a concordância entre os resultados dentro de um mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Foram realizadas com seis repetições em dias diferentes e com analistas diferentes.

3.3.7.4.6 Robustez

É a medida da capacidade de um método analítico resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Para a CLAE serão considerados como fatores de variação do método:

Uso de outra coluna cromatográfica com lote diferente da utilizada para as análises anteriores;

Variação do pH da fase móvel ácida em menos 0,2 pontos (de 1,6 para 1,8) adicionando ácido fosfórico concentrado à fase móvel;

Aumento da temperatura do forno de colunas em 3 °C, ou seja, de 35 °C para 38 °C.

3.3.7.4.7 Intervalo

O intervalo de utilização do método foi considerado aquele compreendido entre os valores utilizados no teste da linearidade. Todas as amostras testadas foram diluídas de modo que sua concentração de feniletil glucosinolato ficasse dentro destes parâmetros.

3.3.8 Qualificação por espectrofotometria UV/VIS

3.3.8.1 Preparo da amostra para análise UV

As soluções padrão e/ou amostras, cujas concentrações variaram de 0,1 a 1 mg/mL, foram diluídas em solução 20% de acetonitrila em água e analisadas em microcubetas de quartzo, cuja absorção teve finalidade qualitativa e a leitura variava de 0,5 a 2 AU e scan de 200 a 600 nm.

3.3.9 Qualificação por espectrofotometria de infravermelho - IR

3.3.9.1 Preparo da amostra para análise no IR

As soluções padrão de sinigrin (propenil glucosinolato) e a amostra cuja concentração variou de 2 a 10 mg/mL, foram adsorvidas em brometo de potássio e a seguir evaporado o solvente. Preparou-se as pastilhas e fez-se análise espectral.

3.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *Nasturtium officinale*

3.4.1 Preparo da alcoolatura de agrião

Adicionou-se 530mL ou 1000mL de etanol 96% no copo de liquidificador doméstico e adicionou-se aos poucos 500g ou 950g de agrião in natura. Triturou-se nos intervalos de adição, mantendo-se por 1 min a trituração após adição total do vegetal e após a trituração transferiu-se para um béquer e macerou-se por três horas. Montou-se um sistema de filtração a vácuo (figura 4) e filtrou-se o macerado obtendo-se a alcoolatura.

FIGURA 4 – PREPARO DA ALCOOLATURA, VISÃO APÓS MACERADO E SISTEMA DE FILTRAÇÃO A VÁCUO.



3.4.2 Extrato por dupla maceração

Para extração por dupla maceração foram utilizados 500 g do droga vegetal que foi macerado em 1000 mL de etanol 81 % (850 mL de etanol 96 % e 150 mL de água) em um percolador de Robiquit com capacidade de três litros. Após 72 horas,

procedeu-se a eluição que resultou na obtenção da primeira fração de 500 mL do extrato. O resíduo foi novamente extraído por maceração, durante 72 horas, após adição de 500 mL de etanol 81%, produzindo a segunda fração de 500 mL do extrato. Pela reunião destas duas frações foram obtidos 1000 mL de extrato bruto etanólico.

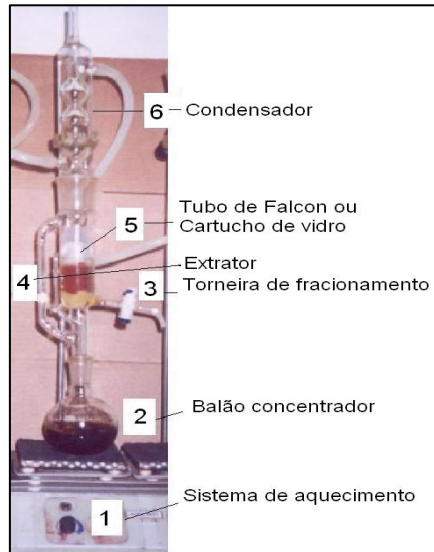
3.4.3 Extração em Soxhlet analítico modificado

3.4.3.1 Extração em Soxhlet analítico modificado com etanol 81%

Os extratos analíticos foram preparados a partir das drogas vegetais: talos, talos mais folhas e folhas; e também a partir do extrato seco talos e folhas (ESPTF). Os extratos obtidos foram então denominados: extrato analítico talos (EAT), extrato analítico talos e folhas (EATF), extrato analítico folhas (EAF) e extrato analítico do extrato seco padronizado talos e folhas (EAESPTF).

Adicionou-se 10 g de droga vegetal em um tubo de Falcon, de polipropileno, perfurado no fundo cônico e vedado com algodão nas extremidades. Foi utilizado o extrator Soxhlet modificado (figura 5), segundo o procedimento a seguir: adicionou-se 150 mL de etanol 81% no balão de fundo chato com pérolas de vidro e conectou-se o extrator, previamente adicionado do tubo de Falcon com amostra. Em seguida adicionou-se 50 mL de etanol 81% ao tubo de Falcon e deixou-se o sistema em repouso por 30 min para umectação da droga vegetal. Conectou-se este conjunto ao condensador de bolas. Iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua onde o solvente condensado percolou pelo tubo de Falcon e eluiu para o extrator até refluxação. Esse procedimento ficou ativo por três horas. Depois de transcorrido este tempo, o extrato obtido foi filtrado e transferido para um balão volumétrico de 200 mL, que teve seu volume exatamente completado com etanol 81%.

FIGURA 5 – APARELHO SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO



3.4.3.2 Extração em Soxhlet analítico modificado com gradiente de polaridade de solvente

Os extratos analíticos foram preparados a partir da droga vegetal de talos e folhas (DVTF). Adicionou-se 10 g de DVTF em um tubo de Falcon, de polipropileno, perfurado no fundo cônico e vedado com algodão nas extremidades. O procedimento foi idêntico ao item 3.4.3.1, mas substituindo o etanol 81% pelos solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol 85%.

Após a conclusão da extração, no primeiro gradiente para preparo do extrato hexânico, o extrato hexânico do balão foi evaporado em banho Maria e solubilizado em etanol 96% e transferido para um balão volumétrico de 50 mL. Após a extração com hexano, montou-se novamente o sistema Soxhlet e iniciou-se a extração com 200 mL de clorofórmio. Introduziu-se novamente o cartucho no extrator, substituiu-se o hexano por clorofórmio e repetiu-se o procedimento, obtendo-se a fração clorofórmica pelo mesmo método e ressolubilizado em 50 mL de etanol 96%. A fração acetato de etila foi submetida ao mesmo processo de fracionamento e ressolubilização da fração clorofórmica. Finalmente a quarta fração foi extraída com 200 mL etanol 81% obtendo-se a 4ª fração etanólica 81%, na qual foi concentrada no equipamento, desprezando 120 mL de destilado pelo extrator. A solução extratora do balão foi filtrada para um balão de 100 mL e seu volume completado para 100 mL de etanol 81%.

3.4.4 Extratos padronizados para fins farmacotécnicos em Soxhlet modificado.

3.4.4.1 Extrator com capacidade para 500g de droga vegetal

Adaptou-se uma manta de algodão de 3 cm de espessura, sobre a placa porosa de teflon, no fundo do extrator, e adicionou-se em torno de 500 g da droga vegetal de acordo com a sua densidade aparente, perfazendo o volume de 1,6 L (25 cm de droga vegetal em um aparelho com ϕ de 9 cm x 40 cm de altura útil). O aparelho extrator Soxhlet (figura 6) foi utilizado com o seguinte procedimento: adicionou-se 1000mL de etanol 81% no balão de fundo chato de 3000 mL, contendo algumas pérolas de vidro; conectou-se o extrator ao balão e adicionou-se sobre 1500 mL de etanol 81% para umectação da droga vegetal por 30 min e conectou-se este conjunto ao condensador de bolas. Iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua, onde o solvente condensado percolou pela droga vegetal e eluiu no extrator até refluxação. Este procedimento foi mantido por cinco horas em média. Depois de transcorrido este tempo, concentrou-se o extrato do balão para aproximadamente 1000 mL. O procedimento foi realizado com as três partes de droga vegetal, que foram separados no processo de estabilização. Assim utilizou-se a droga vegetal obtida dos talos mais folhas, a somente dos talos e a obtida somente das folhas. Os extratos da droga vegetal dos talos e folhas foram reunidos, obtendo-se assim o extrato padronizado dos talos mais folhas (EPTF). O mesmo foi feito com os extratos das folhas, obtendo-se assim o extrato padronizado das folhas (EPF). Não foi necessário a realização desse procedimento com o extrato obtido dos talos porque deste material foi realizado apenas uma extração, sendo denominado de extrato padronizado dos talos (EPT). Os respectivos volumes finais, dos extratos padronizados, foram medidos com uma proveta e transferidos para frascos de vidro âmbar. Foi feito um “blend” de EPTF e EPF com uma mistura de 80% do volume final dos extratos referidos.

O marco residual foi submetido à determinação da massa final pela eliminação do etanol residual por filtração a vácuo e secagem em estufa a 45 °C. Após a estabilização do marco residual, este foi embalado em sacos de papel Kraft e acondicionado em caixas de papelão.

FIGURA 6 – APARELHO SOXHLET FARMACOTÉCNICO MODIFICADO PARA 500g DE DROGA VEGETAL



3.4.4.2 Extrator com capacidade para 2000g de droga vegetal

Adaptou-se uma manta de algodão de 3 cm de espessura, sobre a placa porosa de teflon, no fundo do extrator, e adicionou-se em torno de 2000 g da droga vegetal de acordo com a sua densidade aparente, perfazendo o volume de 6,4L (25 cm de droga vegetal em um aparelho com ϕ de 16 cm x 80 cm de altura útil). O aparelho extrator Soxhlet (figura 7) foi utilizado com o seguinte procedimento: adicionou-se 3000 mL de etanol 81% no balão de fundo chato de 6000 mL, contendo algumas pérolas de vidro; conectou-se o extrator ao balão e adicionou-se sobre 5000 mL de etanol 81% para umectação da droga vegetal por 30 min e conectou-se este conjunto ao condensador de bolas. Iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua, onde o solvente condensado percolou pela droga vegetal e eluiu no extrator até refluxação. Este procedimento foi mantido por cinco horas em média. Depois de transcorrido este tempo, concentrou-se o extrato do balão para aproximadamente 3000 mL. Os respectivos volumes finais, dos extratos padronizados, foram medidos com uma proveta e transferidos para frascos de vidro âmbar. Foi feito um “blend” de EPTF com uma mistura de 80% do volume final dos extratos referidos.

O marco residual foi submetido à determinação da massa final pela eliminação do etanol residual por filtração a vácuo e secagem em estufa a 45 °C. Após a estabilização do marco residual, este foi embalado em sacos de papel e acondicionado em caixas de papelão.

FIGURA 7 – APARELHO SOXHLET FARMACOTÉCNICO MODIFICADO PARA 2000g DE DROGA VEGETAL



3.4.4.3 Extrator industrial com capacidade de 300 L de droga vegetal

Adicionou-se 52 kg de droga vegetal com a sua densidade aparente de 0,3 kg/L perfazendo o volume de 150 L no extrator, sobre um disco de inox perfurado no fundo do extrator vedado com uma manta filtrante de algodão. Foi utilizado o extrator industrial a vácuo, pelo princípio de Soxhlet (auto-renovação do solvente), segundo patente INPI (PI 0601703-7), segundo o procedimento a seguir: adicionou-se 200 L de etanol 81% no concentrador com sistema de agitação. Em seguida adicionou-se 250 L de etanol 81% ao extrator e deixou-se o sistema em repouso por 30 min para umectação da droga vegetal. Iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua onde o solvente do concentrador é destilado e condensado sobre a droga vegetal e percolando pelo sistema extrator até cobrir totalmente a droga vegetal, o percolado macerado é refluxado para o concentrador. Esse procedimento manteve-se ativo por 8 refluxos de aproximadamente uma hora (cada refluxo). Depois de transcorrido este tempo, o extrato obtido foi concentrado para 100 L e filtrado para um reservatório de 200 L.

3.4.5 Extração em Soxhlet modificado, por gradiente de polaridade, para fins fitoquímicos

Realizou-se este processo utilizando a seguinte seqüência de solventes, em gradiente de polaridade: n-hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol 81%. O processo geral está descrito abaixo.

Adaptou-se uma manta de algodão, de 3 cm de espessura, no fundo do extrator soxhlet (ϕ 9cm x h 20 cm) e adicionou-se a quantidade de droga vegetal, 400 g da droga vegetal para a primeira determinação e 500 g na segunda determinação. Cobriu-se a droga vegetal com outra manta de algodão de 3 cm de espessura. O aparelho extrator Soxhlet (figura 6) foi utilizado com o seguinte procedimento: adicionou-se 500 mL do solvente no balão de fundo chato, de 1000 mL, com pérolas de vidro e conectou-se ao extrator. Em seguida adicionou-se ao extrator, sobre a manta de algodão superior, um volume de 1350 mL do mesmo solvente contido no balão com a finalidade de umectar a droga vegetal, para tanto se deixou o sistema em repouso por 30 min. Por fim conectou-se este conjunto ao condensador de bolas e iniciou-se o processo de aquecimento para a extração contínua, em que o solvente condensado percolava a droga vegetal e eluía pelo extrator até refluxação. Este procedimento foi mantido por um período de cinco horas. Depois de transcorrido este tempo, concentrou-se o extrato do balão para o volume adequado, de acordo com o solvente utilizado. Em seguida foi realizada a determinação da massa de sólidos, transferindo-se o extrato para um balão de evaporador rotatório previamente tarado e concentrando-o a 45 °C e 600 mmHg até a secura. O marco residual foi utilizado para a partição com o solvente subsequente no gradiente crescente de polaridade. Ou seja, foram realizados ao todo cinco processos extrativos em ordem crescente de polaridade, n-hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e etanol 81%. Os sólidos residuais da fração hexânica e diclorometano foram solubilizados em diclorometano, da fração acetato de etila em metanol, da fração metanol em metanol 95 % e os sólidos residuais da fração etanol 81% foram solubilizados em metanol 80%.

O marco residual foi estabilizado, eliminando-se o etanol residual por filtração a vácuo e secagem em estufa a 45°C, e sua massa final foi determinada.

3.5 TRATAMENTO DOS EXTRATOS DE *Nasturtium officinale*

3.5.1 Alcoolatura de agrião

Na alcoolatura foram submetidos, de acordo com o interesse, à determinação de peso seco por gravimetria em estufa e à avaliação dos perfis cromatográficos por CCD, e CLAE. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.2 Extrato por dupla maceração

No extrato por dupla maceração foram submetidos, de acordo com o interesse, à determinação de peso seco por gravimetria em estufa e mufla, avaliação dos perfis cromatográficos por CCD, CLAE. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.3 Extrato analítico em Soxhlet modificado

3.5.3.1 Extrato com etanol 81%

Os extratos analíticos EAT, EATF e EAF foram submetidos, de acordo com o interesse, à determinação de peso seco por gravimetria em evaporador rotatório e à avaliação dos perfis cromatográficos por CCD, CLAE e CG. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.3.1.1 Reação de hidrólise ácida de glucosinolatos do extrato analítico talos e folhas (EATF)

Adicionaram-se 50 mL do EATF no balão de 250 mL de fundo chato do sistema Soxhlet, 10 mL de ácido clorídrico puro e refluxou-se por 1h segundo DORMEMANN *et al.* (1974). Após hidrólise foi arrastado o excesso de ácido clorídrico pela modificação da pesquisa utilizando o extrator Soxhlet modificado (figura 5),

segundo o procedimento a seguir: adicionou-se 100 mL de etanol 96 % no balão de fundo chato com pérolas de vidro e conectou-se o extrator. Conectou-se este conjunto ao condensador de bolas. Iniciou-se o processo de aquecimento para o arraste do ácido clorídrico e água da solução de hidrólise, recolheu-se 80 mL de solução destilada pela torneira (item 3 da figura 5) do extrator. Interrompeu-se a concentração, transferiu-se a solução concentrada do balão do extrator para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com etanol 81%.

3.5.3.1.2 Reação de degradação enzimática de glucosinolatos do EATF

Foi realizada reação de degradação enzimática de glucosinolatos do EATF com objetivo de obter os glucosinolatos em forma de isotiocinato ou nitrila, segundo OLSEN e SORENSEN (1981)

Adicionaram-se 50 mL do EATF no balão de 250 mL de fundo chato do sistema Soxhlet, 10 mL de solução de nitrato de prata 0,03 M e refluxou-se por 1h segundo DORMEMANN *et al.* (1974). Após reação enzimática adicionou-se 3 mL de solução iodeto de potássio 0,15 M para precipitar os íons prata, filtrou-se a solução para um balão de fundo chato de 250 mL, lavou-se os precipitados com 125mL de etanol 96%. Conectou-se o balão ao sistema Soxhlet e este conjunto ao condensador de bolas. Iniciou-se o processo de aquecimento para o arraste de água da solução, recolheu-se 145 mL de solução destilada pela torneira (item 3 da figura 5) do extrator. Interrompeu-se a concentração, transferiu-se a solução concentrada do balão do extrator para um balão volumétrico de 50 mL, que teve seu volume exatamente completado com etanol 81%.

3.5.3.2 Frações extraídas por gradiente de polaridade

As frações obtidas foram submetidos, de acordo com o interesse, à determinação de peso seco por gravimetria, em estufa e evaporador rotatório, e à avaliação dos perfis cromatográficos por CCD, CLAE e CG. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.4 Extratos padronizados para fins farmacotécnicos

3.5.4.1 Análises preliminares dos extratos padronizados

Os extratos padronizados EPTF, EPF e EPT foram submetidos, de acordo com o interesse, a determinação de peso seco por gravimetria em balança de perda por infra-vermelho, determinação gravimétrica de perda em mufla e a avaliação do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia gasosa (CG). As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.4.2 Particionamento do extrato padronizado talos e folhas (EPTF) em sílica.

O EPTF foi particionado em soxhlet modificado utilizando-se para tanto a sua incorporação em sílica gel, conforme itens abaixo.

3.5.4.2.1 Obtenção da pastilha de sílica

Pesaram-se 250 g de sílica gel 60, marca Merck (0,063 – 0,200 mm), em duas cápsulas de porcelana (2x 125g) e adicionou-se, sobre a sílica em cada cápsula, um volume de 275 mL do extrato padronizado talos e folhas, perfazendo um volume total de 550 mL, que é equivalente a 300 g de droga vegetal estabilizada. Esse volume de 275 mL de extrato padronizado foi adicionado em porções pequenas de acordo com a saturação da sílica. Entende-se por saturação a capacidade de adsorção da sílica, assim, colocou-se sempre um volume suficiente para que a sílica ficasse solvatada, e não encharcada.

Foi realizada a evaporação do solvente em banho-maria a 60°C, concomitantemente à adição das porções do extrato padronizado, até a secura completa da sílica. Fez-se então a desagregação dos grumos formados, e a conseqüente homogeneização do pó, utilizando um gral de porcelana.

Esse pó obtido ficou denominado de pastilha de sílica incorporada pelo extrato padronizado, e foi usado no preparo posterior da coluna de sílica no item 3.5.4.2.2.

3.5.4.2.2 Preparação da coluna (cartucho) de sílica

A coluna de sílica foi preparada em um tubo de vidro adaptado a uma placa porosa nº 0 de 5 mm de espessura conforme demonstrado na Figura 8 (ϕ de 50 mm x 260 mm de altura). O procedimento seguido foi o seguinte: colocou-se um círculo de papel filtro, perfeitamente ajustado ao diâmetro interno do cartucho, sobre a placa porosa. Em seguida adicionou-se uma camada de sílica gel de aproximadamente 20 mm de altura (30g), acomodou-se outro círculo de papel filtro e sobre este foi colocada a pastilha de sílica obtida no item 3.5.2.2.1. Após plena acomodação da pastilha de sílica, esta foi protegida com um círculo de papel filtro e uma manta de algodão de aproximadamente 10 mm de espessura.

FIGURA 8 – COLUNA DE SÍLICA COM PLACA POROSA



3.5.4.2.3 Condicionamento inicial da coluna (cartucho) de sílica

Adaptou-se a coluna (cartucho) de sílica, obtida no item 3.5.2.2.2, ao extrator Soxhlet modificado (figura 9) e este a um balão de fundo chato de 1000 mL. Ao conjunto adicionou-se, lentamente, um volume de 300 mL de n-hexano para condicionar a coluna ao processo extrativo.

3.5.4.2.4 Processo de partição em Soxhlet modificado, utilizando coluna (cartucho) de sílica

Realizou-se este processo utilizando-se uma seqüência de solventes, em gradiente de polaridade: n-hexano, clorofórmio, acetato de etila, etanol 81 %. O processo geral apresenta-se descrito abaixo.

O aparelho extrator Soxhlet modificado (figura 8) foi utilizado com o seguinte procedimento: adicionou-se de 500 mL a do solvente no balão de fundo chato, de 1000 mL, com pérolas de vidro e conectou-se ao extrator. O conjunto foi acoplado ao condensador de bolas e iniciou-se o processo de aquecimento para a partição contínua, em que o solvente condensado eluía pelo cartucho de sílica, e passava diretamente para o balão de 1000mL devido à abertura do sistema de torneira do aparelho Soxhlet modificado. Este procedimento foi mantido pelo tempo necessário para a retirada da fração mais solúvel no respectivo solvente utilizado. Depois de transcorrido este tempo, concentrou-se o extrato contido no balão para o volume adequado, de acordo com o respectivo solvente utilizado. Em seguida foi realizada a determinação da massa de sólidos, transferindo-se uma alíquota do extrato (15-20 mL) para um balão de evaporador rotatório tarado e concentrando-o (45 °C e 600 mmHg) até a secura.

A coluna de sílica foi então condicionada ao solvente subsequente no gradiente de polaridade, e realizado o processo geral de partição. Ou seja, foram realizados ao todo quatro processos extrativos em ordem crescente de polaridade, n-hexano, clorofórmio, acetato de etila e etanol 81%. Os sólidos residuais da fração hexânica e clorofórmica foram solubilizados em etanol 96%, da fração acetato de etila em etanol 81%, e os sólidos residuais da fração etanol 81% foram solubilizados no próprio concentrado.

A coluna de sílica foi estabilizada, mantendo-se a mesma umectada em etanol 96%.

FIGURA 9 – APARELHO SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO



3.5.4.2.5 Análise das frações do extrato padronizado de talos e folhas (EPTF)

As frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e etanólica (85%) do extrato padronizado de talos e folhas (EPTF) foram submetidas, de acordo com o interesse, à avaliação dos perfis cromatográficos por CCD, CLAE e GC. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.4.3 Particionamento da fração etanólica 85% proveniente do EPTF, em sílica.

A fração etanólica (4^a fração no gradiente de polaridade) do EPTF foi particionada em soxhlet modificado utilizando-se para tanto a sua incorporação em sílica gel, conforme itens abaixo.

3.5.4.3.1 Obtenção da pastilha de sílica

Pesaram-se 85 g de sílica gel 60, marca Merck (0,063 – 0,200 mm), em uma cápsula de porcelana e adicionou-se, sobre a cápsula, um volume de 250 mL da fração etanólica (81%), proveniente de extrato padronizado talos e folhas. Esse volume é equivalente a 107,15 g de droga vegetal estabilizada. A fração etanólica (85%) foi adicionada em porções menores de acordo com a saturação da sílica. Procedeu-se a

evaporação do solvente em banho-maria a 60°C, concomitantemente à adição das porções da fração hidroalcoólica, até a secura completa da sílica. Fez-se então a desagregação dos grumos formados, e conseqüente homogeneização do 3.5.4.2.2. Particionamento da fração etanólica (85%) do extrato padronizado talos e folhas, em aparelho soxhlet modificado do item 3.5.4.2.3

3.5.4.3.2 Preparação da coluna (cartucho) de sílica

A coluna de sílica foi preparada em um cartucho de vidro(ϕ de 50 mm x 260 mm de altura) adaptado de uma placa porosa nº 0 de 5mm de espessura. Foi utilizada a coluna estabilizada após o processo de partição do extrato padronizado (Item 3.5.4.2.2.1). Adaptou-se então um círculo de papel filtro, perfeitamente ajustado ao diâmetro interno do cartucho, sobre coluna de sílica e em seguida foi colocada a pastilha de sílica obtida no item 3.5.4.2.3. Após plena acomodação da pastilha de sílica, esta foi protegida com um círculo de papel filtro e uma manta de algodão de aproximadamente 1 cm de espessura.

3.5.4.3.3 Condicionamento inicial da coluna (cartucho) de sílica

Adaptou-se a coluna (cartucho) de sílica, obtida no item 3.5.4.2.3, ao extrator Soxhlet modificado e este a um balão de fundo chato de 500 mL. Ao conjunto adicionou-se, lentamente, um volume de 150 mL de etanol 96% para acondicionar a coluna ao processo de partição.

3.5.4.3.4 Processo de partição da fração etanólica (85%) do EPTF

O processo foi realizado utilizando-se primeiramente etanol 96% e em seguida utilizou-se etanol 96% e ácido clorídrico 0,1 M em uma proporção de 90:10. O processo geral apresenta-se descrito abaixo.

Adicionou-se 300 mL de solvente no balão de fundo chato, de 500 mL, com pérolas de vidro e conectou-se ao extrator contendo a coluna/cartucho de sílica. O conjunto foi acoplado ao condensador de bolas e iniciou-se o processo de aquecimento

para a partição contínua, em que o solvente condensado eluía pelo cartucho de sílica, e passava diretamente para o balão de 500mL devido à abertura do sistema de torneira do aparelho Soxhlet modificado. Este procedimento foi mantido pelo tempo necessário para a retirada da fração mais solúvel no solvente em questão. Depois de transcorrido este tempo, concentrou-se o extrato do balão para o volume adequado. Em seguida foi realizada determinação da massa de sólidos, transferindo-se uma alíquota de 20 mL da fração obtida para um balão de evaporador rotatório tarado e concentrando-o (45 °C e 600 mm Hg) até a secura.

A coluna de sílica foi então condicionada ao eluente subsequente e foi repetido o processo geral de partição. Portanto, foram realizadas ao todo duas partições.

Os sólidos residuais da fração etanólica 96% foram solubilizados em etanol 70% e da fração etanólica 96% com ácido clorídrico 0,1 M (90:10) foram solubilizados em etanol 60%.

A coluna de sílica foi estabilizada, eliminando-se o etanol residual por secagem em estufa a 45°C.

3.5.4.3.5 Análise das frações EtOH 96% e EtOH 96% com HCl 0,1 N (90:10), obtidas da fração etanólica (85%) do EPTF

As frações etanólica (96%) e etanólica 96% com ácido clorídrico 0,1N (90:10), obtidas da fração etanólica (81%) do EPTF foram submetidas, de acordo com o interesse, à avaliação do perfil cromatográfico por CLAE, CCD, cromatografia gasosa, UV e espectro de massa. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.4.4 Separação, em coluna de sílica, da fração EtOH 96%

Pesaram-se 23 g de sílica gel 60, marca Merck (0,063 – 0,200 mm), em uma cápsula de porcelana e adicionou-se, sobre a cápsula, um volume de 50 mL da fração etanólica 96%, proveniente do item 3.5.3.2.4. Procedeu-se a evaporação do solvente em banho Maria a 60°C, concomitantemente à adição das porções da fração hidroalcoólica, até a secura completa da sílica. Fez-se então a desagregação dos

grumos formados, e conseqüente homogeneização do pó, utilizando-se de um gral de porcelana. Montou-se uma coluna de sílica com acetato de etila, adicionou-se sílica incorporada de extrato. Iniciou-se o processo de particionamento com, acetato de etila, acetato de etila:etanol 96% (95:5 a 0:100), etanol 96%:água (90:10 a 70:30) e etanol:ácido clorídrico 0,01N (70:30). Foram recolhidas 21 frações em frascos de 50mL, evaporadas a 45°C e diluídas em etanol (96% a 66%).

3.5.4.4.1 Separação por Sephadex LH 20 da solução obtida com a associação da 8ª a 14ª fração do item 3.5.4.4

Acondicionou-se a coluna com 50 mL de solução etanol 96%:água (7:3). Iniciou-se o processo de exclusão dimensional com soluções padrão de quercetina e rutina, para verificação da resolução da coluna.

Em seguida iniciou-se o processo de eluição com 2 mL da amostra. Lavou-se a coluna com 2 porções de 2 mL de etanol 96%:água (7:3) para garantir o arraste de toda a amostra para a coluna, manteve-se um volume de 5 a 15 mL de etanol 96%:água (7:3) no topo da coluna. Os primeiros 15 mL de eluente foram desprezados e a seguir foram coletadas as frações de 1 a 14, perfazendo um volume de 2 mL cada.

3.5.4.3.5.2 Análise das frações obtidas no particionamento em sílica e em Sephadex LH-20 da fração EtOH 96%

As frações obtidas nesses particionamentos foram analisadas por espectrofotometria UV, cromatografia líquida (CLAE) e espectrometria de massa. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.4.5 Particionamento do extrato padronizado talos e folhas (EPTF) em meio aquoso

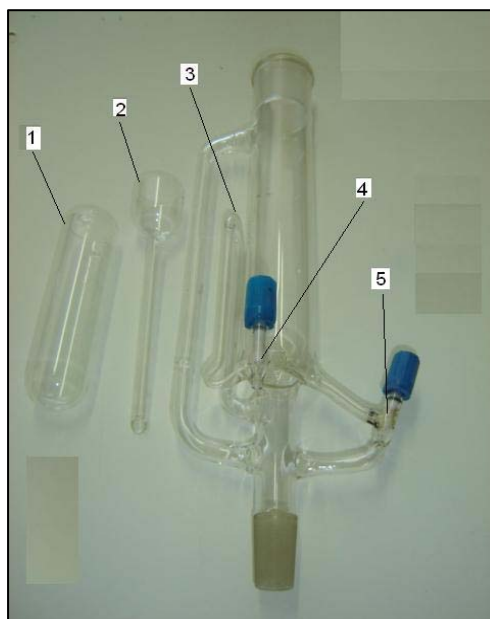
O extrato padronizado talos e folhas (EPTF) etanólico foi diluído em água e concentrado em banho Maria para meio aquoso. Adicionou-se 50 mL extrato e 100 mL de água em um erlenmeyer de 250 mL, homogeneizou-se e deixou-se a solução em banho Maria até a redução volume para 120 mL.

3.5.4.5.1 Fracionamento com hexano

Montou-se o sistema Soxhlet modificado, conforme figuras 10 e 11 transferiu-se a solução para o cartucho de fundo fechado (tipo tubo de centrifuga) do sistema Soxhlet, adicionou-se 150 mL de hexano pela solução. Acoplou-se o sistema ao condensador e iniciou-se o processo de particionamento. Manteve-se o processo de percolação continua por 3 h em particionamento e a cada 30 min eluía-se todo o particionamento hexânico para o balão abrindo-se o sistema de transferência direta, para potencializar a diluição de particionamento, promovendo a renovação do particionamento. Após as 3h, concentrou-se o fracionamento contido no balão de 250 mL do sistema para aproximadamente 40 mL no próprio extrator, abrindo-se o registro de coletor de frações e recolhendo-se em uma proveta de 100 mL. Transferiu-se o fracionamento do balão para um béquer de 100 mL evaporou-se para um volume de 6 a 7 mL, transferiu-se quantitativamente para um balão de 10 mL e completou-se o volume com etanol 96% e a seguir transferiu-se a solução para um vidro âmbar.

A fração obtida foi submetida, de acordo com o interesse, à avaliação do perfil cromatográfico por CLAE. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

FIGURA 10 – ACESSÓRIOS PARA EXTRATOR SOXHLET MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO COM GRADIENTE DE POLARIDADE DE SOLVENTE



1 – Cartucho de fundo fechado para uso de solvente de menor densidade que a amostra; 2- funil para percolação do solvente; 3-extrator de refluxo contínuo; 4- coletor de frações; 5- sistema de transferência direta.

FIGURA 11 – EXTRATOR SOXHLET MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO COM GRADIENTE DE POLARIDADE DE SOLVENTE COM AMOSTRA



3.5.4.5.2 Fracionamento com acetato de etila

Retirou-se com uma pipeta o resíduo de hexano da fase superior da solução contida no cartucho de fundo fechado (tipo tubo de centrifuga) do sistema Soxhlet do item 3.5.4.1(figura 11), adicionou-se 150 mL de acetato de etila e 30 mL de água pela solução. Acoplou-se o sistema ao condensador e iniciou-se o processo de particionamento. Manteve-se o processo de percolação contínua por 3 h em particionamento e a cada 30 min eluíu-se todo o particionamento hexânico para o balão abrindo-se o registro de eluição direta, para potencializar a diluição de particionamento, promovendo a renovação do particionamento. Após as 3h, concentrou-se o fracionamento contido no balão de 250 mL do sistema para aproximadamente 40 mL no próprio extrator, abrindo-se o registro de coleta direta em uma proveta de 100 mL. Transferiu-se o fracionamento do balão para um béquer de 100 mL, adicionou-se 30 mL de etanol 96% e evaporou-se para um volume de 20 mL, transferiu-se quantitativamente para um balão de 25 mL e completou-se o volume com etanol 96% e a seguir transferiu-se a solução para um vidro âmbar.

A fração obtida foi submetida, de acordo com o interesse, à avaliação do perfil cromatográfico por CLAE. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.4.5.3 Fração aquosa do fracionamento residual do acetato de etila

Transferiu-se solução residual contida no cartucho de fundo fechado (tipo tubo de centrifuga) do sistema Soxhlet do item 3.5.4.5.2 para um funil de separação de 250 mL. Transferiu-se quantitativamente a fase inferior para um balão de 200 mL e completou-se o volume com etanol 96% e a seguir transferiu-se a solução para um vidro âmbar. A fração obtida foi armazenada para possível avaliação do perfil cromatográfico por CLAE.

3.5.4.6 Fracionamento do extrato etanólico padronizado em meio ácido e posteriormente em meio básico

3.5.4.6.1 Fracionamento em meio ácido para determinação de compostos fenólicos e esteróides

Montou-se um sistema Soxhlet modificado para particionamento em solvente de maior densidade que amostra conforme figura 12. Adicionou-se 100mL de extrato hidroalcoólico obtido de droga com concentração de 8g /38 mL ou 250 mL de alcoolatura de agrião *in natura* com concentração de 950 g/1900 mL concentrados em banho Maria para aproximadamente 100 mL em um béquer de 250mL. Adicionou-se 50 mL de fase ácida concentrada para CLAE com concentração de 1% de ácido fosfórico, 0,05 M de ácido sulfúrico e 1% acetonitrila. Aqueceu-se a solução do béquer a 70°C por 15 min em agitação constante. Resfriou-se a solução, transferiu-se para o extrator contínuo do sistema Soxhlet modificado da figura 12. Iniciou-se o processo de particionamento, adicionou-se 250 mL de clorofórmio a solução aquosa do extrator com o auxílio de um funil (conforme representado na figura 11). Montou-se o sistema Soxhlet modificado para extração em meio ácido (figura 12), acoplado-se o sistema ao condensador e iniciou-se o processo de particionamento. Manteve-se o processo de percolação contínua por período de 3 h em particionamento e a cada 30 min eluíu-se todo o particionamento clorofórmico para o balão abrindo-se o registro de eluição direta, para potencializar a diluição de particionamento, promovendo a renovação do

particionamento. Após o período de 3h, concentrou-se o fracionamento contido no balão de 250 mL do sistema para aproximadamente 40 mL no próprio extrator, abrindo-se o registro de coleta direta em uma proveta de 100 mL. Transferiu-se o fracionamento do balão para um béquer de 100 mL, adicionou-se 30 mL de etanol 96% e evaporou-se para um volume de 20 mL, transferiu-se quantitativamente para um balão de 25 mL e completou-se o volume com etanol 96% e a seguir transferiu-se a solução para um vidro âmbar.

A fração obtida foi submetida, de acordo com o interesse, à avaliação do perfil cromatográfico por CLAE. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

FIGURA 12 – EXTRATOR SOXHLET MODIFICADO PARA EXTRAÇÃO EM MEIO ÁCIDO E MEIO BÁSICO



3.5.4.6.2 Fracionamento em meio básico para determinação de compostos nitrogenados e agliconas

Adicionou-se 50 mL de solução de hidróxido de amônia 1M a solução aquosa residual do particionamento do item 3.5.4.6.1 para elevar o pH para 10, agitou-se e verificou-se o pH em fita de pH. Iniciou-se o processo de particionamento, adicionando-se 250 mL de clorofórmio a solução aquosa do extrator com o auxílio de um funil (conforme representado na figura 11). Montou-se o sistema Soxhlet modificado para extração em meio básico (figura 12), acoplado ao condensador e iniciou-

se o processo de particionamento. Manteve-se o processo de percolação contínua por período de 3 h em particionamento e a cada 30 min eluía-se todo o particionamento clorofórmico para o balão abrindo-se o registro de eluição direta, para potencializar a diluição de particionamento, para renovação do particionamento. Após as 3h, concentrou-se o fracionamento contido no balão de 250 mL do sistema para aproximadamente 40 mL no próprio extrator, abrindo-se o registro de coleta direta em uma proveta de 100 mL. Transferiu-se o fracionamento do balão para um béquer de 100 mL, adicionou-se 30 mL de etanol 96% e evaporou-se para um volume de 20 mL, transferiu-se quantitativamente para um balão de 25mL e completou-se o volume com etanol 96% e a seguir transferiu-se a solução para um vidro âmbar.

A fração obtida foi submetida, de acordo com o interesse, à avaliação do perfil cromatográfico por CLAE. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.4.6.3 Fração aquosa do fracionamento residual do clorofórmio

Transferiu-se solução residual contida no extrator contínuo Soxhlet do item 3.5.4.6.2 para um funil de separação de 250 mL. Transferiu-se quantitativamente a fase superior do extrator contínuo da figura 12 para um balão volumétrico de 200 mL e completou-se o volume com etanol 96% e a seguir transferiu-se a solução para um vidro âmbar. A fração obtida foi armazenada para possível avaliação do perfil cromatográfico por CLAE.

3.5.5 Extratos para fins fitoquímicos em Soxhlet modificado

3.5.5.1 Análises preliminares dos extratos para fins fitoquímicos

Os extratos ou frações obtidas foram submetidos, de acordo com o interesse, à determinação de peso seco por gravimetria em balança de perda por infravermelho, e a avaliação do perfil cromatográfico por CLAE e por cromatografia gasosa. As análises foram realizadas conforme as metodologias descritas nos métodos gerais.

3.5.5.2 Separação, em coluna, da fração hexânica

A referida fração é resultante da mistura das duas frações hexânicas obtidas nas etapas de extração por gradiente de polaridade (item 3.5.4.5.1) foram unidas resultando em uma massa de 19,26 g.

A esta foram acrescentadas aproximadamente 10g de sílica gel 60 (70-230 mesh) e procedendo-se a evaporação até a secura, resultando em uma pastilha da fração hexânica adsorvida em sílica.

A pastilha foi cromatografada com 30 g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh) em uma coluna de 3 cm de diâmetro e 40 cm de altura, usando como eluente: n-hexano e acetato de etila na concentração crescente de 5% de acetato de etila a cada 100 mL, com vazão de 1 mL por minuto. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL e reunidas segundo monitoramento por cromatografia (CCD). Após a coleta do eluato do último frasco foram eluídos 200mL de metanol e o eluato foi recolhido em um frasco único. Dos 163 frascos obtidos por separação, em coluna, da fração hexânica, foram selecionados os de nº 3, 4, 5 e 6, que apresentaram uma coloração avermelhada e fez-se uma nova coluna utilizando-se acetona e éter de petróleo em concentração crescente de 2% de éter de petróleo. As frações foram recolhidas em frascos de 20 mL e após a coleta do último frasco foram eluídos 100 mL de metanol e o volume final foi recolhido em frasco único. Os frascos do número 7 ao numero 27 foram selecionados.

3.5.5.3 Separação, em coluna, da fração diclorometano

Para esta separação foram utilizadas as frações, obtidas nas duas etapas de extração (item 3.5.4.5), as quais foram reunidas resultando em um volume total de 58 mL.

A esta foram acrescentadas aproximadamente 10g de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) e procedeu-se a evaporação à secura, resultando em uma pastilha da fração diclorometano adsorvida em sílica.

A pastilha foi cromatografada por meio de uma coluna de 3 cm de diâmetro pôr 40 cm de altura contendo 30g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh), usando como

eluente: éter de petróleo e acetato de etila na concentração crescente de 5% de acetato de etila a cada 100 mL, com vazão de 1 mL por minuto. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, que foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia. Após a coleta do eluato do último frasco foram eluídos 150 mL de metanol e o eluato foi recolhido em frasco único.

3.5.5.4 Separação, em coluna, da fração acetato de etila

Para esta separação foram utilizadas as frações, obtidas nas duas etapas de extração (item 3.5.4.5), as quais foram reunidas resultando em um volume total de 50 mL.

À fração acetato de etila foram acrescidas aproximadamente 10g de sílica gel 60 (70 - 230 mesh) e procedeu-se a evaporação à secura, resultando em uma pastilha da fração acetato de etila adsorvida em sílica.

A pastilha da fração acetato de etila foi cromatografada por meio de uma coluna de 3 cm de diâmetro por 40 cm de altura contendo 30g de sílica-gel 60 (70 - 230 mesh), usando como eluente: éter de petróleo e acetato de etila na concentração crescente de 5% de acetato de etila a cada 100 mL, com vazão de 1mL por minuto. As frações foram coletadas em frascos de 20 mL, que foram reunidos segundo monitoramento por cromatografia. Após a coleta do eluato do último frasco foram eluídos 150 mL de metanol e o eluato foi recolhido em frasco único.

3.5.5.5 Separação, em Soxhlet fitoquímico modificado, da fração metanólica

A fração metanólica foi concentrada, de 200 mL para 50 mL, em banho-maria e adicionada sobre uma cápsula de porcelana com 27g de sílica-gel Merck (70-230). Procedeu-se a evaporação do metanol residual, obtendo-se uma massa total da pastilha de 47 g. Preparou-se o cartucho com 150 g de sílica (entre a placa porosa e o final da sílica foi intercalado dois discos de papel de filtro). Colocou-se o cartucho em um béquer de 500 mL, adicionou-se acetato de etila sobre a sílica, homogeneizou-se com um bastão e a seguir introduziu-se o sistema em um banho de ultra-som, sonicou-

se por dois minutos. A seguir adicionou-se a pastilha de agrião no cartucho e cobriu-se com um disco de papel de filtro, acoplou-se o cartucho no extrator Soxhlet fitoquímico modificado, adicionou-se 200 mL de acetato de etila no balão de fundo chato de 250 mL, acoplou-se o extrator preparativo com o cartucho no balão, adicionou-se 50 mL de acetato de etila sobre o cartucho preparativo, acoplou-se o sistema no condensador de bolas. Iniciou-se o processo de separação por 1 h, o concentrado de 40 mL do balão foi denominado fração acetato de etila da partição em metanol. Iniciou-se o processo de fracionamento com metanol, após a eliminação dos solúveis em acetato de etila, adicionou-se 200 mL de metanol no balão de fundo chato de 250 mL, acoplou-se o extrator Soxhlet fitoquímico modificado, com o cartucho, no balão, adicionou-se 100 mL de metanol sobre o cartucho preparativo para arrastar o acetato de etila e desprezou-se. Montou-se o processo de particionamento, conforme tabela 22.

TABELA 22 – PARTICIONAMENTO DA FRAÇÃO METANÓLICA EM SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO

Fração	Volume (mL)	Massa do frasco (g/ V EtOH 50%)
1	150	
2	50	/ 9mL
3	50	/6,5
4	100	/10
5	50	/10
6	60	78,5/10
7	100	/10
8	100	/10
9	400-70 (4 refluxo)	/10
10	300-50 mL	

3.5.5.5.1 Separação, por Sephadex LH 20, da 8ª fração metanólica

Acondicionou-se a coluna com 50 mL de metanol, adicionou-se a 8ª fração da partição em Soxhlet da fração metanol no topo da coluna, adicionou-se 5 porções de 2 mL de metanol para arrastar a fração acima para a coluna, adicionou-se 15 mL de metanol no topo da coluna para continuar a exclusão dimensional, manteve-se um volume de 5-15 mL de metanol no topo da coluna. Iniciou-se a coleta das frações, conforme tabela 23.

TABELA 23 – COLUNA DAS FRAÇÕES DO ITEM 3.5.3.2.4.1

Fração	Volume (mL)	Fração	Volume (mL)
1 MeOH	20	8	10
2	10	9 MeOH 90%	10
3	10	10	20
4	10	11 1,5mL HCl 1N	20
5	10	12	20
6	10	13 2 mL HCl 1N	20
7	10	14	25

3.5.5.5.1.1 Separação, por Sephadex LH 20, da 3ª e 4ª frações do item 3.5.5.5.1

Acondicionou-se a coluna com 50 mL de etanol 96%:água 8:2, adicionou-se a fração acima no topo da coluna, adicionou-se 5 porções de 2 mL de etanol 96%:água 8:2 para arrastar a fração acima para a coluna, adicionou-se 15 mL de etanol 96%:água 8:2 no topo da coluna para continuar a exclusão dimensional, manter um volume de 5 a 15 mL de solução no topo da coluna e Iniciou-se a coleta das frações, conforme tabela 24:

TABELA 24 – COLUNA DAS FRAÇÕES

Fração	Volume (mL)	Fração	Volume (mL)
1	10	5	10
2	10	6	10
3	10	7	10
4	10	8	10

3.5.5.6 Separação, em Soxhlet fitoquímico modificado, da fração etanólica (81%)

Foi adicionado em uma cápsula de porcelana 43g de sílica (70-230, 0.063-0.200, art. 7734), 100 mL da fração etanol 81% (400 g/360 mL e concentrado para 100 mL), evaporado em banho-maria e obtendo-se uma massa total de 81 g (pastilha de agrião etanólico 81%). Acondicionou-se o cartucho da partição com a fração metanólica por 3 h de refluxo com acetato de etila contendo 150 g de sílica (entre a placa porosa e o final da sílica foram intercalados dois discos de papel de filtro). A seguir concentrou-se o acetato de etila do balão, recolhendo-se o destilado e

desprezando o concentrado do balão. Adicionou-se a pastilha de agrião no cartucho e cobriu-se com um disco de papel de filtro, acoplou-se o cartucho no extrator preparativo, adicionou-se 200 mL de acetato de etila no balão de fundo chato de 250 mL, acoplou-se o extrator preparativo com o cartucho no balão, adicionou-se 50 mL de acetato de etila sobre o cartucho preparativo, acoplou-se o sistema no condensador. Iniciou-se o processo de separação, refluxou-se por 2 h (4 refluxo de 150 mL) e o extrato concentrado de 100 mL do balão foi denominado fração acetato de etila da partição em etanol 85%. Iniciou-se o processo de fracionamento com etanol 96 %, adicionou-se 200 mL de etanol 96 % no balão de fundo chato de 250 mL, acoplou-se o extrator preparativo com o cartucho no balão, adicionou-se 100 mL de etanol 96 % sobre o cartucho preparativo para arrastar os solúveis em acetato de etila:etanol 96 % 1ª fração. Montou-se o processo de particionamento, conforme tabela 25.

TABELA 25 – PARTICIONAMENTO DA FRAÇÃO ETANÓLICA (85%) EM SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO

Fração	Volume mL	Massa do frasco (mg)
Fr AcOEt	200	88566
1	100	85447
2	100	85326
3	100	84990
4	100	84056
5 ^(a)	100	84659
6 ^(b)	100	83919
7 ^(c)	100	85491
8 ^(d)	100	87502
9 (4 refluxos)	200 p/ 90	85818
10/10mL	200 p/ 90	83205
HCl 1N(4 refluxos)		
^(a) - 10 mL água;		
^(b) - 20 mL água;		
^(c) - 10 mL HCl 1N;		
^(d) - 20 mL HCl 1N		

3.5.5.6.1 Separação, por Sephadex LH 20, da 4ª fração etanólica

Acondicionou-se a coluna com 50 mL de etanol 96%:água 8:2, adicionou-se a fração acima (1668mg) no topo da coluna, adicionou-se 5 porções de 2 mL de etanol 96% para arrastar a fração acima para a coluna, manter um volume de 5-15 mL de etanol no topo da coluna e Iniciou-se a coleta das frações, conforme tabela 26.

TABELA 26 - COLUNA DA FRAÇÕES

Fração	Volume mL	fração	Volume mL
1	10Et96	6	10
2	10	7	10
3	10	8	10
4	10Et80	9	10
5	10	10	10

3.5.5.6.1.1 Separação, por Sephadex LH 20, da 8ª fração do item 3.5.5.6.1

Acondicionou-se a coluna com 50 mL de etanol 96%:água 8:2, adicionou-se a fração acima (2157mg) no topo da coluna, adicionou-se 5 porções de 2 mL de etanol 96% para arrastar a fração acima para a coluna, manteve-se o volume de 5-15 mL de etanol no topo da coluna e iniciou-se a coleta das frações, conforme tabela 27.

TABELA 27 - COLUNA DA FRAÇÕES

Fração	Volume mL	Fração	Volume mL
1	10Et80	6	10
2	10	7	10
3	10	8	10
4	10Et96	9	10
5	10	10	10

3.5.3.6.2 Separação, por Sephadex LH 20, da 6ª fração do item 3.5.5.6.1.1

Acondicionou-se a coluna com 50 mL de etanol 96%:água 8:2, adicionou-se a fração acima (1668mg ;3mL+0.5mL HCl 1N) no topo da coluna, adicionou-se 5 porções de 2 mL de etanol 96% para arrastar a fração acima para a coluna, manteve-se um volume de 5 a 15 mL de etanol no topo da coluna e iniciou-se a coleta das frações, houve contaminação das frações e foi desprezada a coleta.

3.5.5.6.3 Separação, por Sephadex LH 20, da 3ª fração do item 3.5.5.6.2

Acondicionou-se a coluna com 50 mL de etanol 96%:água (8:2), adicionou-se a fração acima (3mL+0.5mL HCl 1N) no topo da coluna, adicionou-se 5 porções de 2 mL de etanol 96% para arrastar a fração acima para a coluna, manteve-se um volume de 5 a 15 mL de etanol no topo da coluna e iniciou-se a coleta das frações, conforme tabela 28.

TABELA 28 – COLUNA DA FRAÇÕES

Fração	Volume mL	Fração	Volume mL
1	20d5mLEt96	6	6
2	4	7	6
3	6	8	10
4	5Et96	9	102HCl1N
5	5	10	102HCl1N

3.5.5.6.3.1 Separação, por Sephadex LH 20, da 3ª fração do item 3.5.5.6.3

Acondicionou-se a coluna com 50 mL de etanol 96%:água 8:2, adicionou-se a fração acima (3mL+0.5mL HCl 1N) no topo da coluna, adicionou-se 5 porções de 2 mL de etanol 96% para arrastar a fração acima para a coluna, manteve-se o volume de 5 a 15 mL de etanol no topo da coluna e iniciou-se a coleta das frações, conforme tabela 29:

TABELA 29 – COLUNA DA FRAÇÕES

Fração	Volume mL	Fração	Volume mL
5.6.1	20d 5mL EtOH 96	5.6.6	6
5.6.2	4	5.6.7	6
5.6.3	6	5.6.8	10
5.6.4	5 Et 96	5.6.9	
5.6.5	5	5.6.10	

3.6 TRATAMENTO DO RESÍDUO SECO DE *Nasturtium officinale*

O resíduo da droga vegetal foi estabilizado até peso constante em estufa a 45°C e monitorado por determinação gravimétrica de perda em balança de infravermelho ou em estufa.

3.6.1 Determinação gravimétrica de perda em mufla

As análises foram executadas, segundo descrito no capítulo material e método para os três tipos de resíduo de droga vegetal obtidos: resíduo de talos e folhas (RDVTF), resíduo de folhas (RDVF) e resíduos de talos (RDVT).

3.7 DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

3.7.1 Extrato fluído de agrião

O Extrato fluído de agrião constitui-se do extrato industrial obtido no item 3.4.4.3, no qual ajusta-se o seu teor ajustado para 7,2 mg/mL de feniletíl glucosinato. O ajuste quando necessário foi realizado pela diluição com etanol 77% ou pelo processo concentração. Este foi submetido às análises, organoléptica, físico-química, doseamento do teor de feniletíl glucosinato e análise microbiológica.

3.7.2 Tintura de agrião

Utilizou-se para o preparo da tintura o extrato fluído obtido no item 3.7.1, o qual foi diluído com etanol 77% para obter-se uma tintura com o teor de 1,44 mg/mL de feniletíl glucosinato. Este foi submetido às análises, organoléptica, físico-química, doseamento do teor de feniletíl glucosinato e análise microbiológica.

3.7.3 Suporte sólido matricial de agrião

O resíduo seco obtido após a estabilização do marco residual da extração da droga vegetal talos e folhas (DVTF) foi submetido a um processo de moagem, em moinho de facas, com tamis de malha nº 4. Foi efetuada a determinação do perfil granulométrico do pó segundo a Farmacopéia Brasileira IV, em seu método geral V.2.11, obtendo-se assim o denominado suporte sólido de agrião.

3.7.4 Extrato seco de agrião

O extrato seco de agrião gerou o produto obtido da incorporação do extrato fluído de agrião ao suporte sólido de agrião.

A incorporação se processou pela adição de 2,5 L de extrato fluído de agrião, em um recipiente adequado, ao suporte sólido matricial de agrião suficiente para obter-se 1 kg de extrato seco após a secagem a 45°C com homogeneização e com um teor de 18 mg/g de feniletíl glucosinato. Este foi submetido às análises, organoléptica, físico-química, doseamento do teor de feniletíl glucosinato e análise microbiológica.

3.7.5 Cápsulas de extrato seco de agrião

Utilizou-se para o preparo das cápsulas de extrato seco de agrião o próprio extrato seco de agrião (item 3.7.4) e cápsulas gelatinosas duras nº 0. O encapsulamento inicial se deu com auxílio de um encapsulador manual, em câmara de fluxo laminar. Além da encapsulação manual também procedeu-se o processo industrial de encapsulação, utilizando encapsuladora semi-automática com conteúdo de 400 mg a fim de obter-se uma cápsula com o teor de 7,2 mg/mL de feniletíl glucosinolato. Este foi submetido às análises, organoléptica, físico-química, doseamento do teor de feniletíl glucosinolato e análise microbiológica.

3.7.6 Pastilhas com “blend” do extrato EPTF de agrião

Utilizou-se, para o preparo das pastilhas: sacarose, mel e extrato seco de agrião, foram realizados 30 experimentos. Preparou-se a pastilha da seguinte maneira: em uma cápsula de porcelana foi adicionado 90g de açúcar e 10 g de mel. Procedeu-se a homogeneização e colocou-se a cápsula em banho maria a 110 °C até formar uma solução viscosa, a seguir adicionou-se 10 mL de extrato e manteve-se a solução em banho Maria a 110 °C até evaporação do etanol. Verteu-se a solução nas formas desmoldadas com óleo de soja. Obtendo-se pastilhas contendo de 5 g a 5,5 g de produto.

3.7.7 Pastilhas com “blend” extrato ESPTF de agrião

Utilizou-se, para o preparo das pastilhas: sacarose, mel e extrato seco de agrião, foram realizados 10 experimentos. Preparou-se a pastilha da seguinte maneira: em uma cápsula de porcelana foi colocada 90g de açúcar e 10g de mel. Procedeu-se a homogeneização e colocou-se a cápsula em banho maria a 110 °C até formar uma solução viscosa, a seguir adicionou-se 10 g de ESPTF, manteve-se a solução em banho Maria a 110 °C até incorporação do ESPTF e atingir a consistência adequada. Verteu-se a solução nas formas desmoldadas com óleo soja. Obtendo-se pastilhas contendo de 5 g a 5,5 g de produto.

3.7.8 Xarope de agrião

Utilizou-se xarope de açúcar invertido, extrato fluído de agrião, benzoato de sódio, ácido cítrico e água. Preparou-se o xarope da seguinte maneira: em um recipiente de inox de 50L foram adicionados 3L de extrato fluido de agrião, 750 g de benzoato de sódio, 300g de ácido cítrico, 3L de água e xarope de açúcar invertido na quantidade suficiente para completar 30 litros de solução. Manteve-se a homogeneização até formação de uma solução viscosa e obter-se um xarope com o teor de 0,72 mg/mL de feniletíl glucosinolato. Foram produzidos três lotes do produto. Este foi submetido às análises, organoléptica, físico-química, doseamento do teor de feniletíl glucosinolato e análise microbiológica.

3.7.9 Solução oral de agrião

Utilizou-se para o preparo solução oral: carboxi metil celulose (CMC), sorbitol 70%, sacarina sódica, extrato fluído de agrião, benzoato de sódio, ácido cítrico e água. Preparou-se a solução oral da seguinte maneira: em uma recipiente de inox de 50L foram adicionados 3L de extrato fluido de agrião, 750g de benzoato de sódio, 300g de ácido cítrico, 5,4kg de sorbitol 70%, 20L de água, 300g de CMC e completado o volume com água na quantidade suficiente para 30 litros de solução. Procedeu-se sob homogeneização até formação de uma solução viscosa e obter-se uma solução com o teor de 0,72 mg/mL de feniletíl glucosinolato. Foram produzidos três lotes do produto. Este foi submetido às análises, organoléptica, físico-química, doseamento do teor de feniletíl glucosinolato e análise microbiológica.

3.7.10 Solução para bochecho (colutório)

Utilizaram-se 500 mL do extrato fluido de agrião, 500 mL de etanol 96% e diluiu-se para 10L com água deionizada, obtendo-se assim a solução para bochecho e controle de placa dentária.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 COLETA, ESTABILIZAÇÃO E PADRONIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DA DROGA VEGETAL

Os 2 kg de droga vegetal adquirida em abril de 2002, objetivou a avaliação analítica e estudo da tecnologia a ser desenvolvida para obtenção da droga vegetal. As coletas em abril de 2003 de 85 kg e em outubro de 2004 de 20 kg do vegetal *in natura*. Estes foram coletados e armazenados em sacos de ráfia para transporte do município de Fazenda Rio Grande, estado do Paraná conforme figura 13. O material vegetal oriundo de monocultura deu origem à droga vegetal estabilizada em escala laboratorial conforme figura 14. Na seqüência foi realizado um estudo em separado para cada parte respectiva selecionada. O material vegetal *in natura* de talos e folhas coletado em dez/2005 (200 kg) e em set/2007 (850 kg), estabilizado em estufa industrial no município de Campo Largo, estado PR, estes foram realizados para avaliação da escala piloto industrial conforme figuras 15 e 16. A droga vegetal após secagem foi triturada em moinho de facas com tela de 8 mm conforme figura 17 e armazenada em sacos de ráfia. Os resultados da tabela 30 referenciam a quantidade de droga vegetal submetida à obtenção dos extratos padronizados destinados a estudos analíticos, farmacotécnicos e/ou fitoquímicos do lote piloto de insumos por via Soxhlet modificado analítico, farmacotécnico (2/12/2005) e industrial (22/09/2007) este processo patenteado com a PI 0601703-7.

FIGURA 13 – COLETA DE AGRIÃO MONOCULTURA NO MUNICÍPIO FAZENDA DO RIO GRANDE-PR



Verificou-se na figura 14 o aspecto macroscópico da droga vegetal seca e estabilizada em estufa a 45°C por período de 20h em escala laboratorial, apresentando cor verde brilhante e odor característico e mantendo as características da planta *in natura*.

FIGURA 14 – MATERIAL VEGETAL SECO (DROGA VEGETAL) NA ESTUFA DA UFPR A 45°C



Constatou-se nas figuras 15 e 16 a reprodução da secagem e estabilização da planta para obtenção da droga vegetal. Os resultados da escala industrial apresentaram-se muito semelhantes ao se comparar com a escala laboratorial, mantendo a mesma característica da planta *in natura*.

Nesse processo observou-se que após secagem e estabilização, houve uma redução de volume do vegetal, para cada 15 kg de planta obteve-se 1 kg de droga vegetal. Observado nas figuras 14, 15 e 16.

FIGURA 15 – MATERIAL VEGETAL *IN NATURA* NA ESTUFA DE SECAGEM INDUSTRIAL DE PLANTAS MEDICINAIS



FIGURA 16 – MATERIAL VEGETAL SECO (DROGA VEGETAL) NA ESTUFA DE SECAGEM INDUSTRIAL DE PLANTAS MEDICINAIS



Após moagem em tela de 8 mm (figura 17) obteve-se uma droga vegetal com características adequadas ao processo extrativo, uma vez que os fragmentos obtidos não ocasionaram obstrução ao refluxo do solvente extrator.

FIGURA 17 – DROGA VEGETAL MOÍDA EM MOINHO DE FACAS INDUSTRIAL DE PLANTAS MEDICINAIS



O trabalho deu início em escala laboratorial no sentido de buscar parâmetros físico-químico, que depois de dimensionados foram submetidos à escala industrial no sentido de preservar a integridade e qualidade fitoquímica da droga vegetal.

Em uma visão do sistema de obtenção da droga vegetal enquanto insumo para aplicação industrial, relativo ao método de secagem e estabilização, pode-se observar que o material vegetal nas diferentes datas de coleta foi fracionado em três partes DVTF, DVF E DVT. Essa separação inicial foi necessária para verificar se haveria composição química diferenciada de acordo com as partes do vegetal em estudo, conforme relatado na tabela 30. Na tabela 31 apresentam-se as quantidades destinadas para estudos fitoquímicos e preparação dos extratos padronizados.

TABELA 30 – RENDIMENTO DE DROGA VEGETAL ESTABILIZADA

Partes	Material "in natura" (g)	Droga Vegetal Estabilizada (g)	Rendimento%
Talos e folhas	39.000 ^(a)	2.330	6,0
	200.000 ^(b)	11.000	5,5
	850.000 ^(c)	53.000	6,2
Folhas	33 ^(a)	2.400	7,3
Talos	13 ^(a)	410	3,2

^(a) coleta abr/2003, secagem laboratorial ^(b) coleta dez/2005, secagem industrial ^(c) coleta set/2007, secagem industrial.

TABELA 31 – RELAÇÃO DAS QUANTIDADES DE DROGA VEGETAL DESTINADA AOS ESTUDOS ANALÍTICOS E À PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS PADRONIZADOS

Partes	Droga vegetal para Estudos Analíticos (g)	%	Droga vegetal para Extrato Padronizado (g)	%
Talos e folhas	730 ^(a)	31,3	1.600 ^(a)	68,7
	1.300 ^(b)	11,8	9.700 ^(b)	88,2
	1.000 ^(c)	1,9	52.000 ^(c)	98,1
Folhas	300 ^(a)	12,5	2.100 ^(a)	87,5
Talos	60 ^(a)	14,6	350 ^(a)	85,4

^(a) coleta abr/2003, secagem laboratorial ^(b) coleta dez/2005, secagem industrial ^(c) coleta set/2007, secagem industrial.

Verificou-se um comportamento semelhante entre a secagem em escala laboratorial e indústria, isto é, aproximadamente 6% de rendimento de droga vegetal ou 94% de perda do vegetal *in natura*. O propósito deste processo de secagem e obtenção da droga vegetal indica uma melhor produtividade quando a planta é adquirida na forma de droga vegetal, conforme tabela 30, pois neste contexto eliminam-se as possíveis variações de umidade oriundas do transporte.

4.1.1 Determinação gravimétrica de perda em mufla, na droga vegetal estabilizada

Os resultados realizados a temperatura de 45°C e 105°C correspondem ao teor de perda de umidade e substâncias voláteis. O aquecimento de 105°C para 250°C objetivou a carbonização do vegetal na própria mufla e eliminando o processo tradicional de carbonização lenta em chama. Os resultados das análises obtidas a 450°C correspondem aos sais minerais e a 675°C correspondem aos sais com variação no ânion (carbonatos, hidróxidos decompondo em óxidos e...). Os resultados das análises, nos três tipos de droga vegetal obtidos, talos e folhas (DVTF), folhas (DVF) e talos (DVT), apresentam-se expressos, em percentual, na tabela 32, para cada patamar de temperatura. No processo de insumos do agrião foi utilizado apenas a droga vegetal talos e folhas (DVTF).

TABELA 32 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA PERDA GRAVIMÉTRICA EM MUFLA PARA A DROGA VEGETAL ESTABILIZADA

Droga vegetal	45°C (%)	105°C (%)	250°C (%)	450°C (%)	675°C (%)
DVF	9,48	12,39	49,94	83,80	87,03
DVTF	7,01	13,40	59,44	84,97	86,09
DVT	95,00	85,38	42,11	16,95	15,70

4.1.2 Determinação gravimétrica de perda em mufla e em balança de perda por infravermelho (45°C) nos extratos padronizados.

Os resultados das análises dos extratos padronizados em mufla, tabela 33, apresentam semelhança em comparação com os resultados da droga vegetal (tabela 32). Nos três tipos de extratos padronizados obtidos, extrato de talos e folhas (EPTF), extrato de folhas (EPF) e extrato de talos (EPT), os resultados estão expressos em percentual para cada patamar de temperatura.

TABELA 33 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA PERDA GRAVIMÉTRICA EM MUFLA PARA OS EXTRATOS PADRONIZADOS

Extrato	45°C (%)	105°C (%)	250°C (%)	450°C (%)	675°C (%)
EPF	74,14	77,61	86,24	95,52	97,65
EPTF	71,44	76,34	85,73	94,78	96,66
EPT	72,96	78,27	86,38	94,82	95,50
EPSTF	7,15	15,41	40,4	83,2	84,5

Os resultados obtidos nas análises dos extratos padronizados em balança de perda por infravermelho, tabela 34, obtidos a partir dos três tipos de extrato padronizados obtidos, extrato de talos e folhas (EPTF), extrato de folhas (EPF) e extrato de talos (EPT), com a finalidade de avaliar o teor de sólidos e a perda em umidade e compostos voláteis, evidenciam um teor maior de sólidos para o EPF, devido este apresentar um maior teor de orgânico e menor teor de minerais.

TABELA 34 – TEOR DE SÓLIDOS E COMPOSTOS VOLÁTEIS POR PERDA A 45°C EM BALANÇA DE INFRAVERMELHO, DOS EXTRATOS PADRONIZADOS

Extrato	Sólidos (%)	Perda (%)
EPF	35,0 ^(a)	65,0
EPTF	32,0 ^(a) 31,5 ^(b)	68,0 68,5
EPT	26,4 ^(a)	73,6

^(a) item 3.4.4.1 ^(b) item 3.4.4.2

4.1.3 Determinação De Teor De Água Por Karl Fisher

Os valores das análises do teor de água estão apresentados na tabela 35.

TABELA 35 – DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÁGUA DA DROGA VEGETAL POR KARL FISHER.

Determinação	% De Água (P/P) Da Droga vegetal Tal Qual	% De Água (P/P) após Perda A 45°C
1	15,92	9,13
2	15,73	9,45
3	15,72	9,36
Média	15,79	9,31

Verificou-se no processo analítico que houve, por turbólise com metanol, a extração de toda a água da droga vegetal (DVTF) e de toda a água residual da droga vegetal (DVTF) após o ensaio de perda a 45 °C e a 105°C.

Então se quantificou o teor de água da droga vegetal pelo método de Karl Fisher. Demonstrou-se que o teor de água na droga vegetal (DVTF) correspondeu a 15,79% de água, sendo encontrado também o teor de 7,01% de perda a 45 °C e o teor de 13,4% em perda a 105°C, sendo que neste último caso a droga vegetal apresentou decomposição parcial (tabela 32).

Verificou-se que este método promove a extração da água total da droga vegetal em relação ao teor de água, devido à reação estequiométrica do método de Karl Fisher, quando comparado com o método de determinação por perda gravimétrica a 105°C, considerado umidade farmacopeica. Pode-se concluir que o processo de perda a 105°C não liberou totalmente a água de cristalização, segundo VOGEL (2002).

4.1.3 Análises para determinação de metais.

Os resultados do teor de metais foram obtidos por espectrofotometria de absorção atômica, a partir das amostras obtidas no item 3.3.3.1 e foram relatados na tabela 36, e expressos em mg/100g ou mg/100mL (1g de droga vegetal/1mL de extrato). Os mesmos foram comparados e avaliados com as especificações da tabela da composição de alimentos da ANVISA. Os resultados da tabela 36 evidenciam que a DVF apresenta o zinco e os outros minerais em maior concentração e o potássio está presente em maior concentração na DVT.

Verificou-se no RDVTF um teor maior de minerais quando comparado com os

extratos e com a droga vegetal separadamente. Ressalta-se que o resíduo da droga vegetal corresponde de 50 a 60% da massa da droga vegetal, ou seja, antes da obtenção dos extratos e geração do resíduo da droga vegetal.

Os resultados obtidos permitem avaliar a reutilização do resíduo seco como suporte para preparo do extrato seco, qualificando este como insumo no desenvolvimento de produtos fitoterápicos.

Dentro deste contexto, considerando a droga vegetal como insumo para o tratamento de deficiências de mineral, a utilização do RDVTF como suporte matricial, de acordo com a respectiva granulometria a sua aplicabilidade, no desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos e nutracêuticos.

TABELA 36 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DE METAIS

E	mg/100g ^(a)	DVT	DVF	DVTF	EATF	EPT	EPF	EPTF	RDVT	RDVF	RDVTF	EPSTF ^(b)
Zn	0,7	11,5	17,55	15,64	0,75	4,32	3,8	2,99	11,5	17,85	17,25	13,6
Fe	3,1	32,45	36,75	35,3	2,45	11,45	8	8,45	25,95	36,8	35,4	49,2
Cr	?	nd	nd	0,28	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,218	nd
Ca	133	2770	4026	3555	205	572	356	929	3309	4202	2140	3538
Mg	18	304	449	365	25	78	49	126	451	573	296	523
K	218	7110	6390	7010	316	3820	1890	1810	4925	3580	4450	5798
Ni	?	nd	nd	0,076	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,066	0,187
Co	?	nd	nd	0,36	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0,230	nD
PB	?	nd	nd	<0,0001	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<0,0001	nd
P	51	na	na	40	na	na	na	na	na	na	40	616
Na	<4	na	na	372	na	na	na	na	na	na	146	84
Mn	0,3	na	na	6,5	na	na	na	na	na	na	5,2	0,615
Cu	0,1	na	na	1,76	na	na	na	na	na	na	1,36	3,6
Al	na	na	na	93	na	na	na	na	na	na	75	na
Cd	na	na	na	0,1250	na	na	na	na	na	na	0,1130	na
Hg	na	na	na	<0,0001	na	na	na	na	na	na	<0,0001	na
Se	na	na	na	<0,0001	na	na	na	na	na	na	<0,0001	na

nd – não detectado; na – não analisado; (a) valor tabelado no produto “*in natura*”, segundo ANVISA; (b) utilizados 2g para os macronutrientes e 20g para os micronutrientes

4.2 ALCOOLATURA E INSUMOS DERIVADOS DA DROGA VEGETAL

4.2.1 Alcoolatura obtida em liquidificador

A finalidade da realização deste processo extrativo foi verificar comparativamente a composição, fórmula percentual e o teor total dos analitos em estudo no vegetal antes da estabilização na forma de droga vegetal. Na tabela 37 verificou-se um rendimento em alcoolatura de 70,0% e 73,0%, quanto ao teor de

sólidos extraíveis a variação foi de 35,33% e 36,0% em base seca, devido à variação da umidade do vegetal na coleta. Considerando-se o vegetal em base seca de agrião *in natura* obteve-se um rendimento médio de 35,7% de extraíveis.

A desvantagem deste processo é a variação de umidade durante o processo de coleta até o início de processamento, devido o vegetal conter em valor aproximado de 94 % de umidade e alto volume ou baixa densidade para ser processado, obtendo-se um alto volume de alcoolatura, baixo teor de sólidos e perda de aproximadamente 20% no processo industrial de centrifugação ou 30% por filtração a vácuo em escala laboratorial. A massa total de sólidos estimada no vegetal *in natura* corresponde a 30 gramas, sendo 7,42 g de extraíveis, contidos nos 700 mL de alcoolatura (tabela 37), e 22 g obtidas na determinação de sólidos a 45°C do resíduo de filtração da alcoolatura (tabela 39). Obtendo-se um total de 29,42 g, que corresponde a 97% das 30g estimadas. A variação se deve a fatores tais como a umidade em processos e nos insumos.

TABELA 37 – RESULTADOS DA OBTENÇÃO DA ALCOOLATURA OBTIDA POR LIQUIDIFICADOR

Alcoolatura	Coleta 04/2003	Coleta 12/2005
Volume de etanol adicionado 96% (mL)	530	1000
massa de vegetal (g)	500	950
Massa estimada de água no vegetal (g)	470	893
Massa estimada de droga vegetal no vegetal (g)	30	57
Volume total da solução (mL)	1000	1800
Volume total de alcoolatura filtrada (mL)	700	1320
Massa estimada de sólidos nos 700 mL de alcoolatura (g)	7,42	15,84
Rendimento do processo extrativo % P/V	70%	73
Volume estimado de alcoolatura no resíduo (g)	300	480
Teor de sólidos na alcoolatura % P/V	1,06	1,20
Teor de sólidos na vegetal % P/P	2,12	2,16
Perda de sólidos no resíduo da alcoolatura (g)	3,18 (300x0,0106)	5,76 (480x0,012)
Extraíveis em base seca	35,33	36

4.2.1.2 Determinação a 45°C do teor de sólidos no resíduo da filtração da Alcoolatura obtida em liquidificador

A finalidade da realização desta determinação foi verificar comparativamente o teor de sólidos no resíduo da alcoolatura e, por diferença de massa, determinar a perda total de alcoolatura no processo. As massas obtidas dos resíduos de filtração da

alcooolatura foram de 300g (4/2003) e 480 g (12/2005), respectivamente. Obteve-se 22 g e 33g de sólidos a 45° referente às 300g e 480g, respectivamente. A massa residual da filtração da alcooolatura representa 30% de perda no processo. Os resultados encontram-se demonstrados na tabela 38.

TABELA 38 – RESULTADOS DO RESÍDUO DA ALCOOLATURA

Resíduo	Coleta 04/2003	Coleta 12/2005
Massa do resíduo vegetal (g)	300	480
Massa do resíduo após perda a 45°C (g)	22	33
Teor de sólidos no resíduo de filtração da alcooolatura % P/P	7,3	6,9
Massa de solvente evaporado (g)	278	447
Perda de solvente no resíduo da alcooolatura % P/P	92,7	93,1

4.2.3 Extrato obtido dupla maceração

Na extração por dupla maceração, o extrato bruto de *Nasturtium officinale* representou 67% da solução extratora e os 33% restantes permaneceram no resíduo. A massa de sólidos extraída nas 500 g da droga vegetal foi de 110 g, ou seja, 22 % da composição da DVTF, conforme resultados demonstrado na tabela 39.

TABELA 39 – PROCESSO DO EXTRATO POR DUPLA MACERAÇÃO

Extrato	Extrato
Massa de planta (g)	500
Volume etanol adicionado (mL)	1500
Volume final do extrato (mL)	1000
Massa de sólidos (g)	110
% sólidos no extrato	11
% sólidos na planta	22
Rendimento total(35,33=100%)	62,3

4.2.4 Extrato obtido em Soxhlet Analítico Modificado

A finalidade da realização deste processo extrativo foi verificar comparativamente a composição, fórmula percentual e o teor total dos analitos em estudo na droga vegetal. Verificou-se um teor de sólidos na faixa de 35% a 36%.

4.2.4.1 Reações de hidrólise ácida e degradação enzimática de glucosinolatos do EATF

Os dois processos analíticos apresentaram como produtos a fenilpropanonitrila e o ácido hidrocínâmico com baixa reprodutibilidade qualitativa e quantitativa. Após a aquisição do padrão de feniletil glucosinolato esses métodos se tornaram desinteressantes para este estudo, uma vez que a finalidade era quantificar estequiometricamente o feniletil glucosinolato em fenilpropanonitrila ou em ácido hidrocínâmico.

4.2.5 Extratos para padronizados para fins farmacotécnicos e extratos para fins analíticos e fitoquímicos.

4.2.5.1 Extratos padronizados para fins farmacotécnicos, obtidos em aparelho de Soxhlet modificado

A tabela 40 demonstra a quantidade de droga vegetal a partir da qual foram obtidos os extratos padronizados, ou “blend” (mistura dos extratos padronizados), e os respectivos volumes finais a que foram concentrados, assim como a quantidade de resíduo seco estabilizado pela eliminação do solvente e a porcentagem equivalente de sólidos extraídos.

Este processo mostrou-se limpo, rápido, com alto rendimento e reprodutibilidade. No decorrer do processo de extração do extrato etanólico ocorre o aumento em teor de sólidos a cada refluxo, provocando um aumento na tensão superficial do extrato por saturação do efeito de solvatação do etanol, observando-se o aumento da temperatura de destilação do extrato.

Para não ocorrer a expansão do etanol de forma explosiva no sistema de extração, devido ao aumento da temperatura de destilação, utilizou-se então o álcool 85%, visto que a água permanece no balão na medida em que o azeótropo álcool-água é destilado. Com isso a temperatura do processo é diminuída e o risco de expansão do etanol de forma explosiva é reduzido, isso porque o efeito de solvatação do etanol é compartilhado com a água.

O rendimento deste processo extrativo foi inferior ao processo de extração em Soxhlet analítico modificado devido à proporção massa de droga vegetal e solvente extrator.

O processo analítico utilizou 10 g de droga vegetal para 200 mL de solvente (1 parte de droga vegetal para 20 partes de solvente), o processo farmacotécnico, no extrator com capacidade para 3000 mL (figura 6), utilizou 500 g de droga vegetal e 1500 mL de solvente extrator (1 parte de droga vegetal para 3 partes de solvente) e o processo farmacotécnico, no extrator com capacidade para 8000 mL (figura 7), utilizou 2000g de droga vegetal e 6000 mL de solvente extrator (1 parte de droga vegetal para 3 partes de solvente). Desse modo observa-se que o processo farmacotécnico necessita de, pelo menos, o dobro de tempo em cada sistema de extração para equiparar-se ao processo analítico, devido a proporção do solvente em relação à droga vegetal.

O “blend” resultante dos extratos EPF e EPTF teve a finalidade de simular o processo industrial, onde utiliza-se a droga vegetal inteira. O processo industrial onde se utiliza a droga vegetal rasurada (talos e folhas) apresentou 33,2% de sólidos, sendo este um ótimo rendimento quando comparado com o Soxhlet analítico modificado em escala laboratorial. Tal rendimento deve-se ao sistema a vácuo e a agitação no concentrador que contempla concentração e dispersão dos sólidos simultaneamente, conforme PI 0601703-7 A.

TABELA 40 – PREPARO DOS EXTRATOS PARA FINS FARMACOTÉCNICOS

Extrator	Droga vegetal	Amostra (g)	Volume de extrato (mL)	Resíduo seco da droga vegetal (g)	Sólidos nos extratos (%)
3000mL	Talos e folhas (a)	1600	2900	997	35,5
	Talos e folhas (b)	800	3800	513	25,6
	Folhas (a)	2100	4000	1190	43,3
	Talos (a)	410	850	228	29,2
8000 mL	Talos e folhas (b)	8900	13800	6755	24,1
Industrial	Talos e folhas (c)	52000	104000	33800	33,2

(a) coleta 04/2003 (b)coleta 12/2005 (c) coleta 09/2007

4.2.5.2 Extratos para fins analíticos e fitoquímicos obtidos por particionamento em Soxhlet modificado

A partição em Soxhlet analítico apresentou os resultados representados na tabela 41 com a finalidade de avaliar a composição entre os processos. No sistema de gradiente, evidenciou-se que a fração etanol 81% apresentou menor teor de sólidos totais (29,3%), devido à evaporação total da água. O mesmo não ocorre no extrato analítico (EATF), este com teor de sólidos superior a 35%, porque o mesmo apresenta a composição lipofílica e hidrofílica simultaneamente, desse modo dificultando a liberação da água no extrato em suas várias formas, no extrato. No particionamento da fração etanol 81% o fenômeno da azeotropia arrasta praticamente toda água e parcialmente a fração volátil.

O extrator Soxhlet modificado foi utilizado com a finalidade de obter partições seletivas como alternativas ao processo de partição por solventes em funil de separação. Este processo mostrou-se limpo, rápido, com alto rendimento e reprodutibilidade.

TABELA 41 – PARTIÇÃO COM GRADIENTE DE POLARIDADE EM SOXHLET ANALÍTICO MODIFICADO

solvente	Vol. de extrato(mL)	10 g de amostra	
		Sólidos (mg)	Sólidos (%)
N-hexano	50 (etanol 96%)	170	1,7
Clorofórmio	64 (etanol 96%)	150	1,5
Acetato de etila	50 (etanol 96%)	200	2
Etanol 85%	100 (etanol 77%)	2410	24,1
Total		2930	29,3

O processo de extração para fins fitoquímicos foi realizado em duas etapas (400g e 500g) e os respectivos extratos constam na tabela 42.

Os sólidos residuais da fração hexânica e diclorometano foram solubilizados em diclorometano, da fração acetato de etila em metanol, da fração metanol em metanol 95 % e os sólidos residuais da fração etanol 81% foram solubilizados em metanol 80%.

O marco residual do processo fitoquímico foi estabilizado e obteve-se uma massa final de 321 g na primeira etapa e de 406 g na segunda, demonstrando uma partição eficiente.

TABELA 42 – PARTIÇÃO DA DROGA VEGETAL COM GRADIENTE DE POLARIDADE EM SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO

Solvente	Primeira etapa (400 g)			Segunda etapa (500 g)		
	Vol. de extrato (mL)	Sólidos (g)	Sólidos (%)	Vol. de extrato (mL)	Sólidos (g)*	Sólidos (%)
N-hexano	325	7,250	1,8	325	12,016	2,4
Diclorometano	200	5,172	1,3	200	6,622	1,3
Acetato de etila	260	3,097	0,8	260	2,390	0,5
Metanol	360	38,256	9,6	360	52,948	10,6
Etanol 85%	360	38,260	9,6	360	40,988	8,2
Total	1505	92,035	23,1	1505	114,974	23,0

*determinação por perda em rota-vapor

O processo por partição em pastilha foi o que melhor representou a composição do particionamento devido ao processo de incorporação utilizado, realiza o microencapsulamento do extrato na sílica e apresentar menor teor de água no extrato seco (em sílica) em comparação com a droga vegetal, que este apresenta na composição intracelular. Os resultados estão demonstrados na tabela 43.

TABELA 43 – PARTIÇÃO DA PASTILHA COM GRADIENTE DE POLARIDADE EM SOXHLET FITOQUÍMICO MODIFICADO

Solvente	300 g de amostra		
	Vol. final de extrato(mL)	Sólidos (g)	Sólidos (%)
N-hexano	200	10,9	3,6
Clorofórmio	430	13,4	4,5
Acetato de etila	275	6,7	2,2
Etanol 85%	700	55,2	18,4
Total	1605	86,2	28,7

A tabela 44 apresenta a comparação entre os processos de partição, demonstrando semelhanças, sendo que o mais eficiente foi o processo analítico, pela proporção do solvente em relação à droga vegetal. Também se observou praticidade na obtenção das frações para qualificação e quantificação analítica.

TABELA 44 – COMPARAÇÃO DAS PARTIÇÕES, ANALÍTICO, FITOQUÍMICO E DA PASTILHA COM GRADIENTE DE POLARIDADE EM SOXHLET MODIFICADO

Solvente	Sólidos (%) (analítico)	Sólidos (%) (fitoquímico)	Sólidos (%) (pastilha fitoquímico)
N-hexano	1,7	2,1	3,6
Clorofórmio	1,5	1,3	4,5
Acetato de etila	2,0	0,65	2,2
Metanol	-	10,1	-
Etanol 85%	24,1	8,9	18,4
Total	29,3	23,05	28,7

4.2.5.2.1 Particionamentos em colunas de sílica e Sephadex LH-20.

A finalidade do particionamento foi separar as frações lipofílicas em colunas de sílica e as hidrofílicas (glicosiladas) em colunas de sephadex LH-20 e isolar a fração de glucosinolatos. O provável feniletil glucosinolato foi separado em uma fração e após isso foi analisado por CLAE, CG/MS, CG/MS derivatizado e por LC/MS. A pureza e estabilidade da fração não atenderam aos parâmetros para validação e registro. Após pesquisas em publicações científicas, que indicavam a utilização do padrão de feniletil glucosinolato, fez-se uma busca na *internet* e assim foi encontrado o laboratório LKT que comercializa a referida substância padrão.

4.2.5.2.2 Particionamentos em meio aquoso em Soxhlet modificado.

O particionamento em meio aquoso foi executado com três tipos de solvente: hexano, acetato de etila e clorofórmio. Tendo hexano e acetato de etila menor densidade que a água, o processo de partição procedeu-se no equipamento Soxhlet modificado, representado na figura 11, no qual os solventes percolaram pelo sistema para extrair as frações solúveis nesses para fins analíticos. O processo de partição com clorofórmio, tendo este densidade maior do que a água foi substituído pelo sistema representado na figura 12. O particionamento foi executado em duas etapas, sendo a primeira etapa em meio ácido, em que extraiu-se os esteróides e os fenólicos e após o esgotamento total desse processo. A seguir o meio aquoso teve seu pH alcalinizado (pH=10) para extração dos compostos nitrogenados. A finalidade desses processos foi purificar as amostras e eliminar as interferências no processo analítico e concentrar os analitos de acordo com a faixa de linearidade da metodologia empregada.

4.3 ANÁLISES DOS EXTRATOS, INSUMOS E PRODUTOS.

4.3.1 Análises por CCD

Foram realizadas análises por CCD (item 3.3.5) para verificação a presença de compostos fenólicos, glucosinolatos e saponinas na forma esteroidal e/ou triterpênica, com 5 sistemas de fases móveis. Esta técnica demonstrou-se eficiente para qualificação dos núcleos fundamentais citados.

As placas de CCD percorreram uma distância de 10 cm. Em seguida eliminou-se a fase móvel em estufa a 45 °C. Antes e após a revelação inicial com o reativo de NEU as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta em 254 e 366 nm, porém obtiveram-se resultado satisfatório apenas quando observadas em 366 nm. Depois de fotografadas, as placas foram nebulizadas com vanilina fosfórica ou sulfúrica, dependendo do analíto glicosilados em questão.

Calculou-se os hRf ($R_f \times 100$) e as retenções relativas (RR) das referências e da amostra co-injetada com as referências.

4.3.1.1 Cálculo dos hRf e RR das amostras e referências.

Os cálculos dos hRf ($R_f \times 100$) e das retenções relativas (RR) das referências e da amostra co-injetada com as referências foram realizados de acordo com as fórmulas abaixo:

$$\text{hRf} = \frac{d_a \times 100}{d_M} \qquad \text{RR} = \frac{d_a}{d_P}$$

Onde:

d_a = distância de retenção do analíto

d_M = distância de retenção da fase móvel

d_P = distância de retenção do padrão ou referência

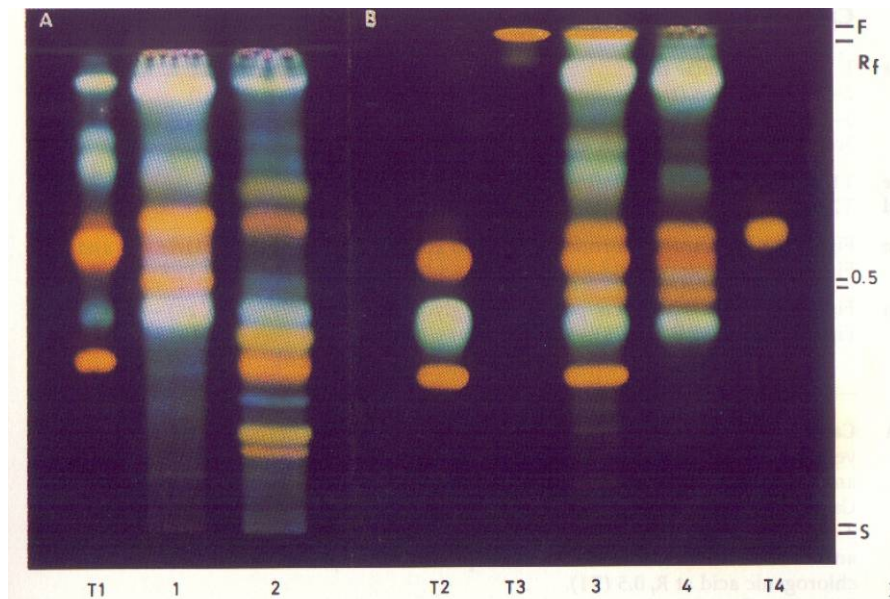
4.3.1.2 Análise de compostos fenólicos em flavonóides e fenilpropanóides por CCD

Verificou-se a presença de flavonóides e fenilpropanóides por CCD utilizando a fase móvel 5, avaliando-se por hRf e RR conforme WAGNER (1996) e CARVALHO (2001). No perfil cromatográfico orientativo segundo WAGNER (1996), demonstrado na figura 18, a rutina apresentou mancha laranja amarelada na região de hRf 35, sendo que esta foi considerada como RR 1, o ácido clorogênico apresentou mancha azul na região de hRf 45 e RR 1,29 e o hiperosídeo apresentou mancha laranja-amarelada na

região de hRf 60 e RR 1,71. Foram utilizados como substâncias de referência neste estudo comparativo a rutina (flavonóide) e o ácido clorogênico (fenil propanóide).

A figura 19B demonstra que o método, com revelador NEU, foi eficiente na qualificação de flavonóides e fenilpropanóides presentes no extrato analítico, pois verificou-se a presença de flavonóides (mancha laranja-amarelada) nos hRf/RR 23/0,49, 30/0,64, 34/0,72, 47/1(rutina), 53/1,13 e 75/1,60 e a presença de fenilpropanóides (mancha azul) nos hRf/RR <10/<0,1 e 91/1,94. Nas figuras 19A e 19C reveladas com vanilina sulfúrica apresentaram-se manchas enegrecidas nos hRf/RR <10/<0,1, 47/1(rutina), 53/1,13 e 75/1,60 provavelmente moléculas glicosiladas ou derivadas do ácido quínico. Este sistema demonstrou-se ótimo como *fingerprint* para qualificação de fenólicos para o extrato, devido a reprodutibilidade da RR em comparação com os dados publicados por WAGNER (1996).

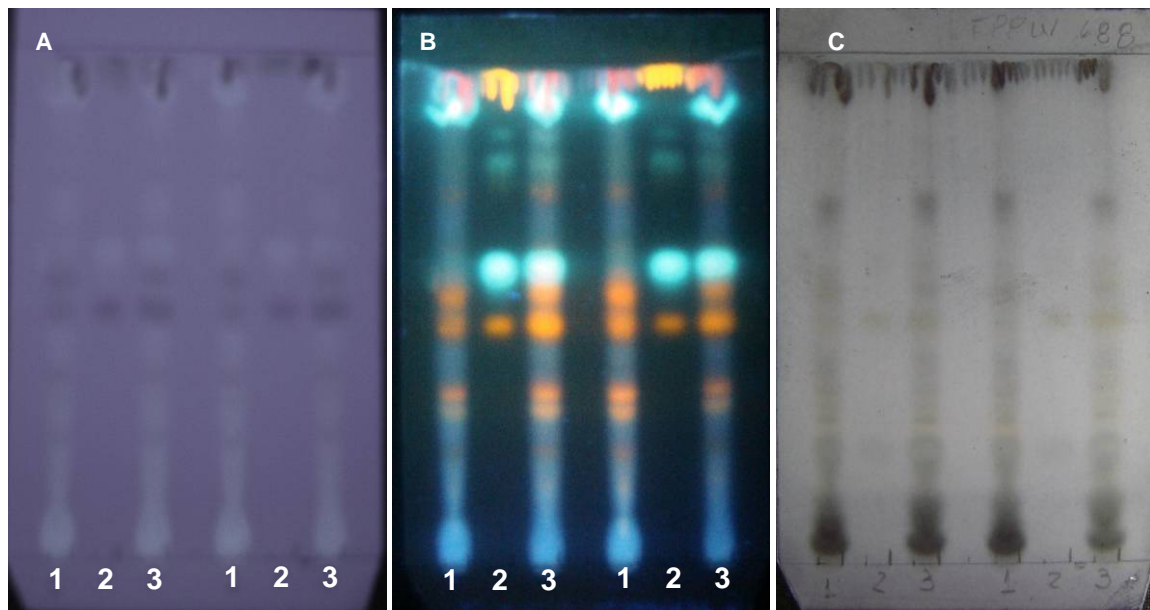
FIGURA 18 – PERFIL CROMATOGRÁFICO ORIENTATIVO PARA FLAVONÓIDES E FENILPROPANÓIDES.



FONTE: WAGNER (1996), p.215

T1-Rutina - ácido clorogênico – hiperosídeo – ácido isoclorogênico; 1 – arnica flos; 2 – calêndula flos; T2 – rutina – ácido clorogênico – hiperosídeo; T3 – quercetina; 3 – Heterothecae flos; 4 – Arnica flos (pobre em astragalina); T4 – luteolina-7-O-glicosídica

FIGURA 19 – CCD PARA IDENTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS NO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS.



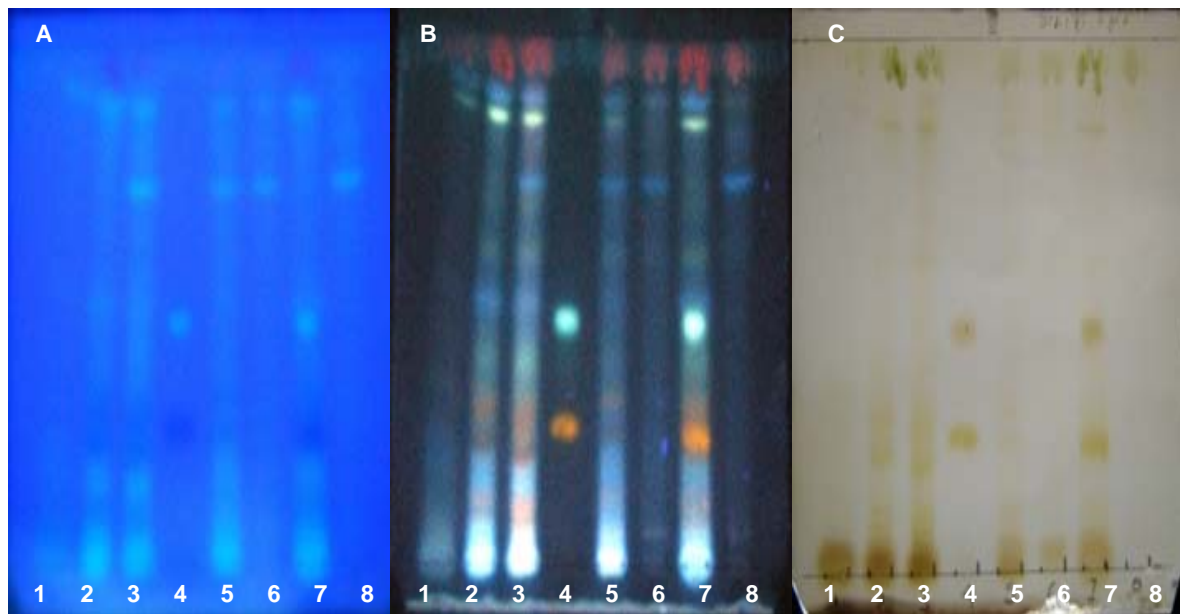
1 – EATF; 2 – rutina / ácido clorogênico / quercetina; 3 – EATF / rutina / ácido clorogênico / quercetina

Para o estudo da composição do agrião na metodologia de WAGNER (1996) otimizada por CARVALHO (2001) verifica-se na figura 20 uma melhor separação de fenólicos, em relação a WAGNER (1996). Nesse processo utilizou-se a fase móvel 1, que demonstrou eficiência na qualificação de flavonóides.

A revelação com NEU, figura 20B, evidenciou a presença de flavonóides (mancha laranja-amarelada) nos hRf/RR 9/0,37, 10/0,41, 25/1(rutina), 25/1,13 e fenilpropanóides (mancha azul) nos hRf/RR <10/<0,1, 48/1,92, 86/3,44 e 88/3,52.

Nas figura 20A visualizada sem NEU e em 366 nm visualizou-se manchas azul escura para flavonóides e azul claro par fenilpropanóides. Na figura 20C, reveladas com vanilina fosfórica, observou-se manchas enegrecidas nos hRf/RR <10/<0,1, 25/1(rutina), 28/1,13 e 86/3,44 provavelmente moléculas glicosiladas ou derivadas do ácido quínico. Este sistema demonstrou-se eficiente como *fingerprint* para qualificação de fenólicos em fenilpropanóides para o extrato analítico, devido à reprodutibilidade da RR de acordo com a literatura CARVALHO (2001,p.43).

FIGURA 20 – CCD PARA IDENTIFICAÇÃO DE FENÓLICOS NO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS.



1 – ATF; 2 – EATF; 3 – EPTF; 4 – Rutina/Ácido clorogênico; 5 – EPSTF; 6 – Xarope EPTF;
7 – EATF/Rutina/Ácido clorogênico; 8 – Solução Oral EPT

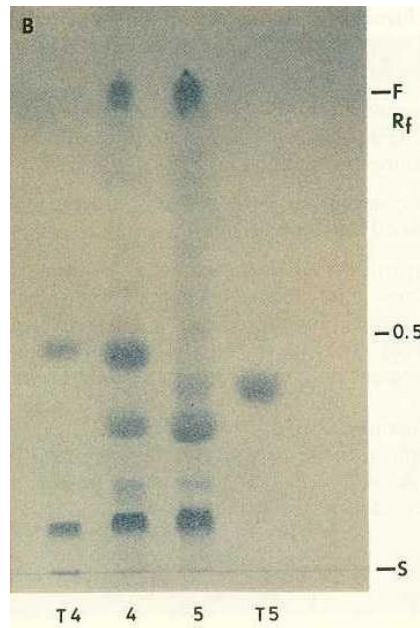
4.3.1.3 Análise de glucosinolatos por CCD

Verificou-se a presença de glucosinolatos por CCD utilizando a fase móvel 4, avaliando-se por hR_f e RR conforme WAGNER (1996). No perfil cromatográfico orientativo segundo WAGNER (1996), demonstrado na figura 21, a melhor detecção foi quando revelado com vanilina sulfúrica. O sinigrin apresentou mancha cinza na região de hR_f 40, sendo que esta foi considerada como RR 1, o sinalbin apresentou duas manchas cinza na região de hR_f 11 e RR 0,28 e hR_f 48 e RR 1,2, os quais foram utilizadas como substâncias de referências neste estudo comparativo o sinigrin e o sinalbin.

A qualificação de glucosinolatos no extrato analítico visualizados sem NEU e com NEU, figura 22A e 22B, demonstrou-se um método eficiente para a verificação de flavonóides (mancha laranja-amarelada) e nos fenilpropanóides (mancha azul), porém essa revelação utilizando NEU não demonstrou-se eficiente para a qualificação de glucosinolatos quando comparado a revelação utilizando vanilina fosfórica (figura 22C1) e vanilina sulfúrica (figura 22C2). Observou-se manchas enegrecidas com maior intensidade na revelação com vanilina sulfúrica, apresentando manchas enegrecidas

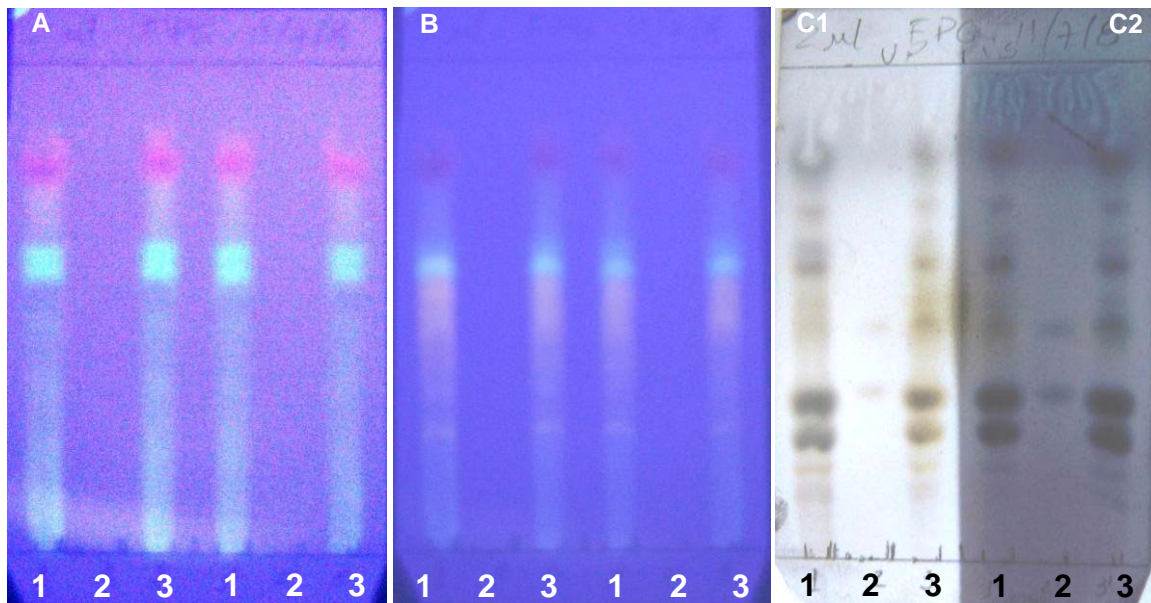
nos hRf/RR 24/0,73, 33/1(sinigrin) e 46/1,39 (feniletil glucosinolato). Este sistema demonstrou-se eficiente como *fingerprint* para qualificação de glucosinolatos para o extrato, devido a reprodutibilidade da RR em comparação com os dados publicados por Wagner.

FIGURA 21 – PERFIL CROMATOGRÁFICO ORIENTATIVO PARA GLUCOSINOLATOS REFERENTES A SINIGRIN E SINALBIN, SEGUNDO WAGNER (1996) PG. 296-299



T4 – Capsaicin; 4 – Sinapis albae sementes; 5 – Sinapis nigri sementes; T5 – sinigrin

FIGURA 22 – CCD PARA IDENTIFICAÇÃO DE GLUCOSINOLATOS NO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS.

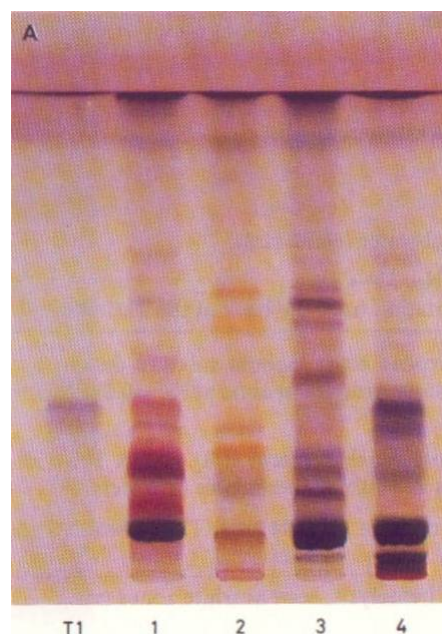


1 – EATF; 2 – Sinigrin / fenil etil glucosinolato; 3 – EATF / sinigrin / fenil etil glucosinolato

4.3.1.4 Análise de saponinas na forma esteroidal e/ou triterpênica por CCD

Verificou-se a presença de saponinas por CCD, utilizando a fase móvel 3, avaliando-se por hRf e RR conforme WAGNER (1996). No perfil cromatográfico orientativo segundo WAGNER (1996), demonstrado na figura 23. A melhor detecção foi com vanilina sulfúrica, a escina apresentou mancha cinza na região de hRf 45, sendo que esta foi considerada como RR 1. Foi utilizada como substância de referência neste estudo comparativo a escina, por ser comum ao metabolismo vegetal.

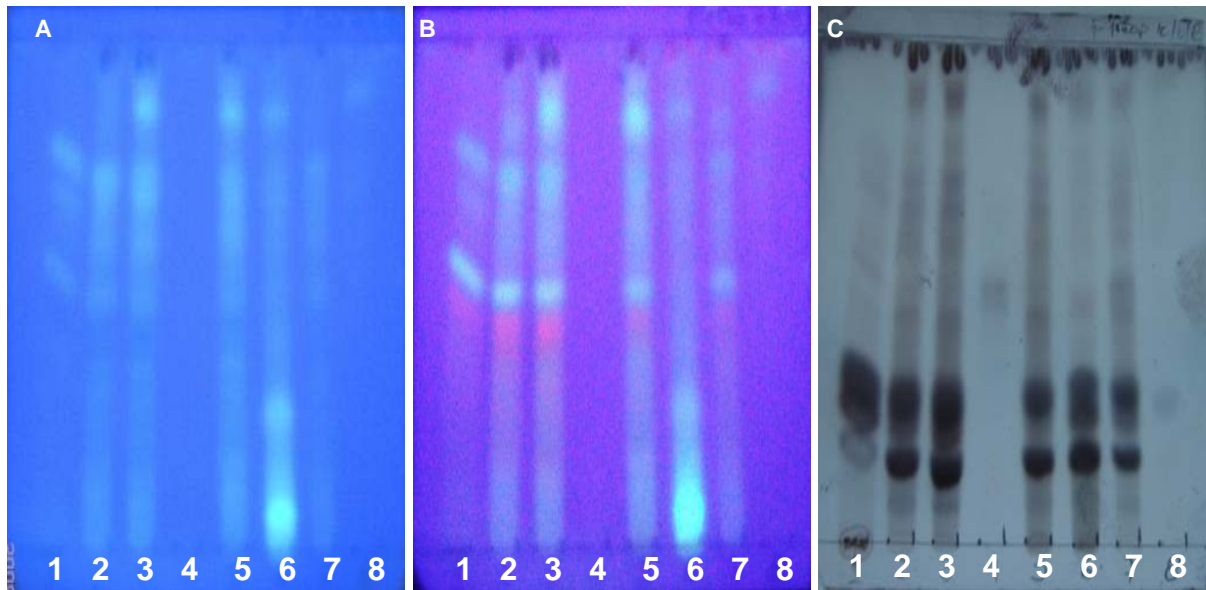
FIGURA 23 – PERFIL CROMATOGRÁFICO ORIENTATIVO PARA SAPONINAS, REFERENTES A ESCINA, SEGUNDO WAGNER (1996)



T1 – Escina; 1- *Senegae radix*,
2- *Sarsaparilla radix*; 3- *Ginseng radix*,
4- *Hippocastani sementes*.

A metodologia utilizando a fase móvel 3 para qualificação de saponinas no extrato analítico demonstrou eficiência tanto na visualização sem NEU quanto com NEU, figura 24A e 24B respectivamente, para evidenciar flavonóide (mancha laranja-avermelhada) e para fenilpropanóides (mancha azul), porém não foi efetiva para saponinas. Estas, quando reveladas com vanilina sulfúrica, apresentaram manchas enegrecidas (figura 25C) nos hRf/RR 54/1 (escina) e hRf/RR 96/1,92 (beta sitosterol). Este sistema demonstrou-se relevante como *fingerprint* para qualificação de saponinas, devido a reprodutibilidade da RR em comparação com os dados publicados por WAGNER (1996) e CARVALHO (2001).

FIGURA 24 – CCD PARA IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS NO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS



1 – ATF; 2 – EATF; 3 – EPTF; 4 – Escina/Beta sitosterol; 5 – EPSTF; 6 – Xarope EPTF; 7 – EATF/ Escina/Beta sitosterol; 8 – Solução Oral EPTF

4.3.2 Análises por Cromatografia Gasosa – CG

Foram realizadas análises por CG para verificação de compostos voláteis, glucosinolatos silanizados e esteróides.

Primeiramente foi realizada análise do extrato analítico talos e folhas (EATF), após foi realizado um particionamento e análise de uma fração considerada relevante e, em paralelo, análise de amostra silanizada do glucosinolato sinigrin.

Esta técnica demonstrou-se eficiente para qualificação e quantificação dos núcleos fundamentais do metabolismo do agrião. A qualificação foi realizada por tempo de retenção (t_r) e por retenção relativa (RR) e a quantificação foi realizada por padronização interna (acetato de tocoferol).

4.3.2.1 Extrato analítico talos e folhas (EATF)

Verificou-se a presença de quatro compostos em maior concentração, dos quais dois não foram identificados, e os outros dois foram identificados e quantificados como betasitosterol e lupeol, conforme figura 25. A identificação se deu por retenção relativa do acetato de tocoferol (padrão interno). Os resultados encontram-se na tabela 45 e justificam os dados apresentados na revisão de literatura sobre a constituição química do agrião.

FIGURA 25 – PERFIL POR CG DO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS (EATF)

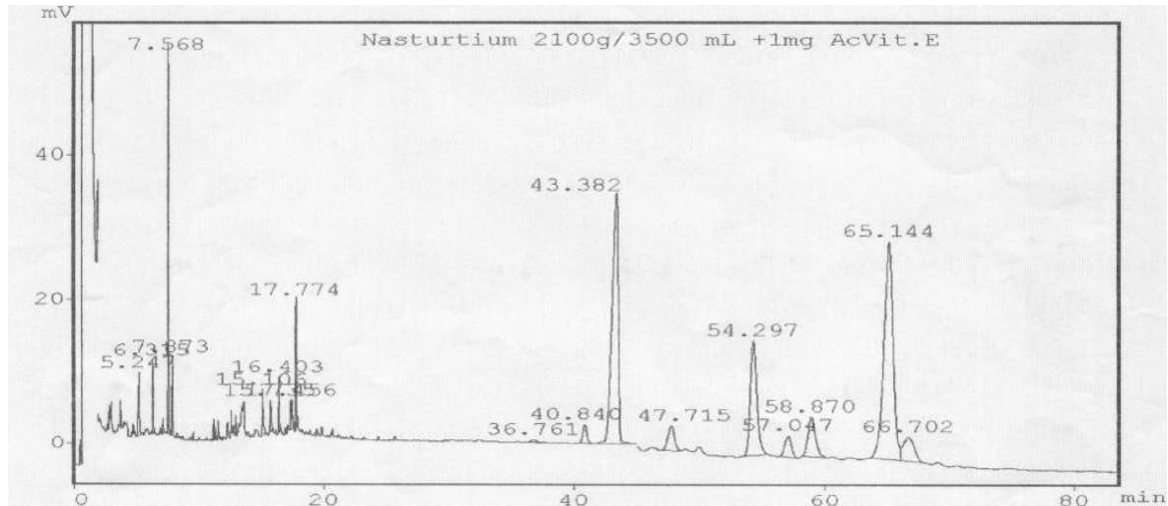


TABELA 45 – RESULTADOS DO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS (EATF) ANALISADOS POR CG.

Referência	tr	Área	RR	Fc	[mg/mL]
Não identificado	7,568	58833	0,174	1	1,1
Não identificado	17,774	30234	0,410	1	0,56
Acetato de tocoferol (pi)	43,382	89936	1,000	1	1,67
Beta sitosterol	54,297	60336	1,252	1, 478	1,65
Lupeol	65,144	91345	1,502	1, 756	2,54

RR e Fc: segundo CARVALHO (2001), pág. 50.

4.3.2.2 Fração do Extrato Analítico Talos e Folhas (EATF) e Sinigrin Silanizados

Após a silanização verificou-se a presença de dois compostos em maior concentração na solução de sinigrin, com tempo de retenção 11,685 e 18,039 min e retenção relativa de 0,258 e 0,399, considerando o acetato de tocoferol como padrão interno, figura 26. O tempo de retenção de 18,039 min é do sinigrin ou propenil glucosinolato (silanizado).

Na fração obtida do extrato analítico talos e folhas (EATF), que foi silanizada, verificou-se também dois compostos com tempo de retenção de 3,673 e 19,718 min e retenção relativa de 0,083 e 0,446, considerando o acetato de tocoferol como padrão interno. O tempo de retenção de 19,718 min representa provavelmente o feniletil glucosinolato (silanizado), figura 27.

FIGURA 26 – PERFIL POR CG DA SOLUÇÃO DE SINIGRIN SILANIZADO.

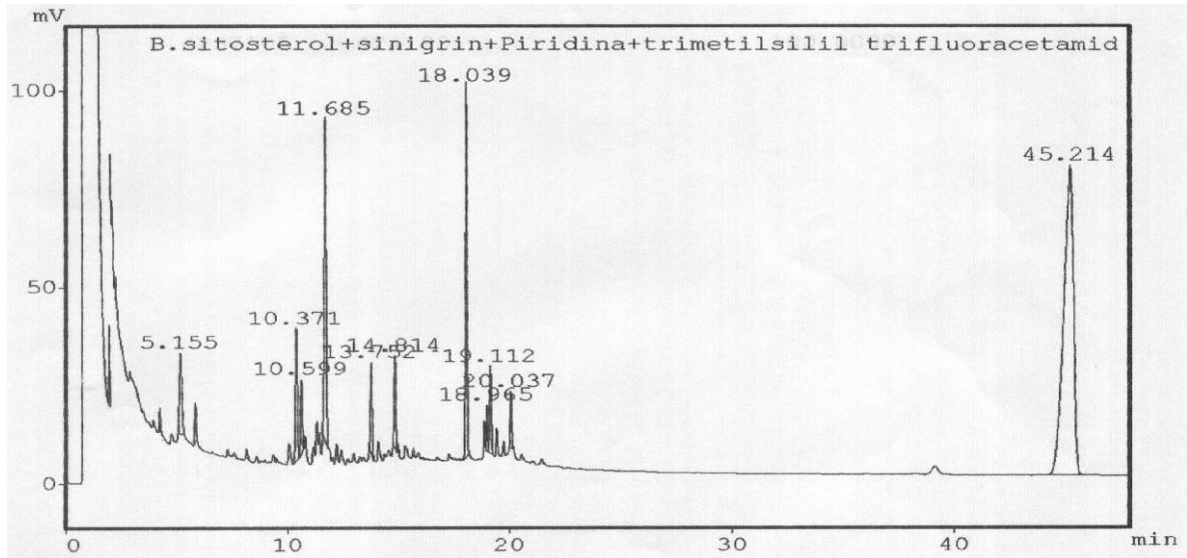
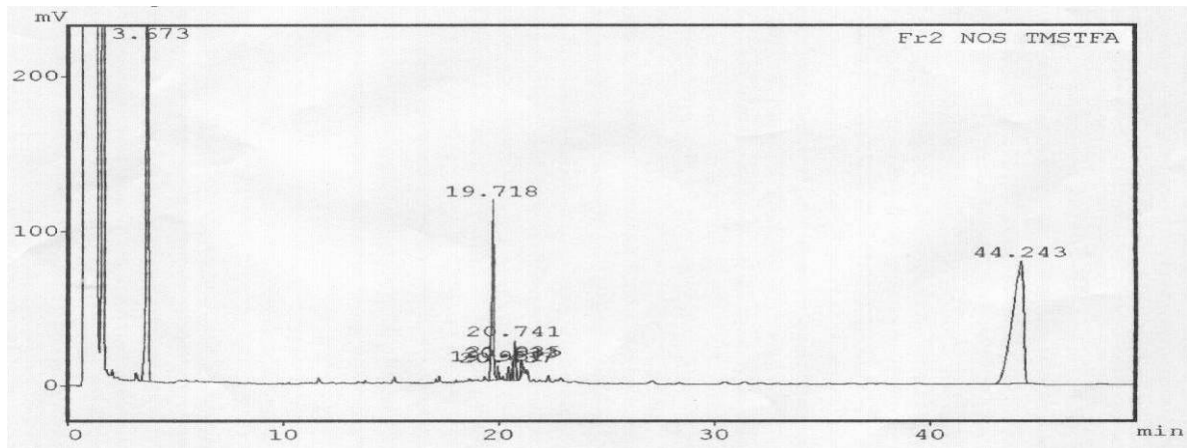


FIGURA 27 – PERFIL POR CG DA FRAÇÃO DO EXTRATO ANALÍTICO TALOS E FOLHAS SILANIZADA.



4.3.3 Análises por espectrometria de massa - MS

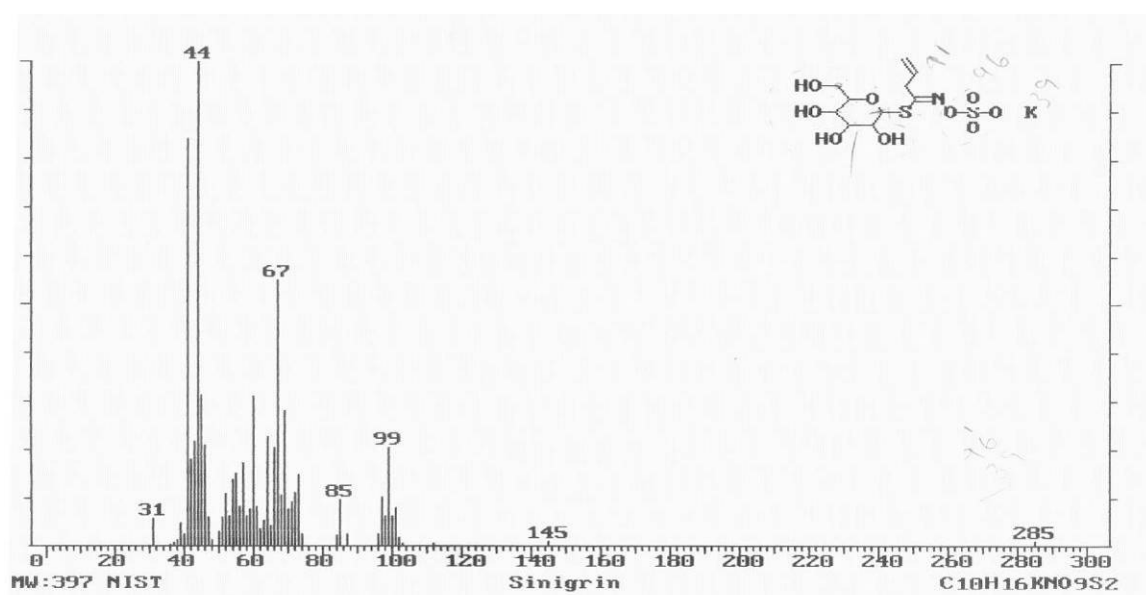
Primeiramente efetuou-se a análise da substância de referência sinigrin pela injeção direta no *probe* do detector de MS. Na referência de sinigrin (analisado na Central de Análises da UFSC) os fragmentos encontrados são idênticos aos da biblioteca NIST, conforme as figuras 28, 29 e 33.

Em seguida efetuou-se a derivatização da referência sinigrin e analisou-se por GC/MS (Laboratório de Bioquímica da UFPR), sendo que foram verificados fragmentos correspondentes à adição do trimetil silano (TMS) conforme representado nas figuras 29, 30 e 33 e cujos cálculos das fragmentações encontram-se representados na figura 33. O pico de fragmentação 145 da figura 29 corresponde ao pico de fragmentação de 361 na figura 30.

Procedeu-se a mesma metodologia para análise da fração do extrato analítico talos e folhas contendo o provável feniletil glucosinolato. A fração não derivatizada e a derivatizada apresentaram o mesmo comportamento que a referência sinigrin conforme representado demonstrado nas figuras 31, 32 e 34. O pico de 252 da figura 31 e 34 corresponde ao de 399 na figura 32 e 34.

Onde observou-se que os fragmentos verificados nas análises foram identificados por comparação com o estudo de fragmentação feito pelo autor e demonstrado nas figuras 33 e 34.

FIGURA 28 – ESPECTRO DE MASSA DO PADRÃO DE SINIGRIN



FONTE: Biblioteca NIST

FIGURA 29 – ANÁLISE DIRETA NO PROBE DO DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSA NA UFSC, DO PADRÃO DE SINIGRIN UTILIZADO COMO COMPOSTO DE REFERÊNCIA

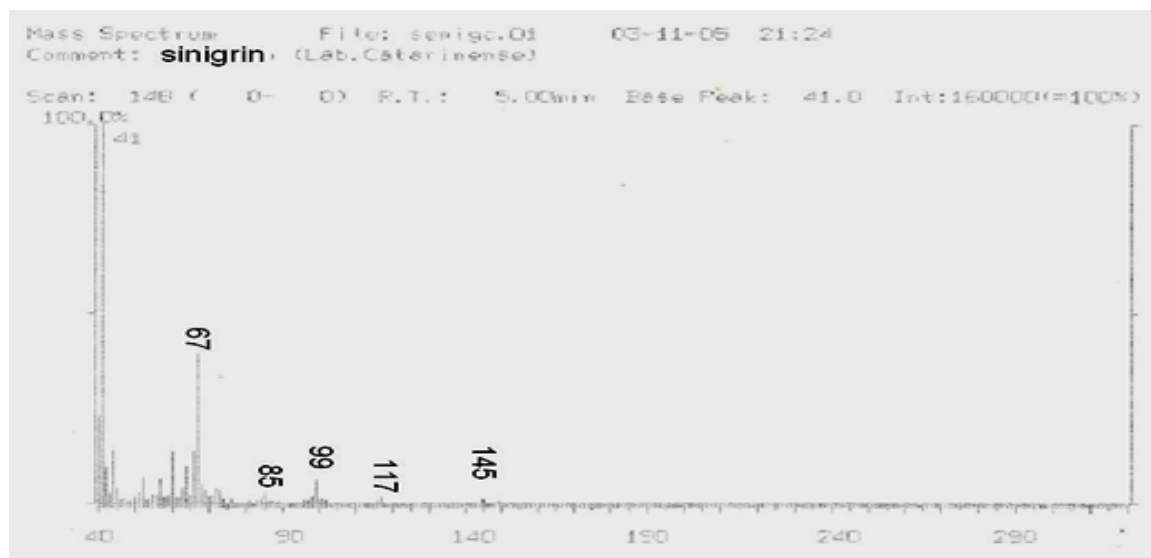


FIGURA 30 – ANÁLISE POR CG/MS NA UFPR DO PADRÃO DE SINIGRIN DERIVATIZADO COM TMS UTILIZADO COMO COMPOSTO DE REFERÊNCIA

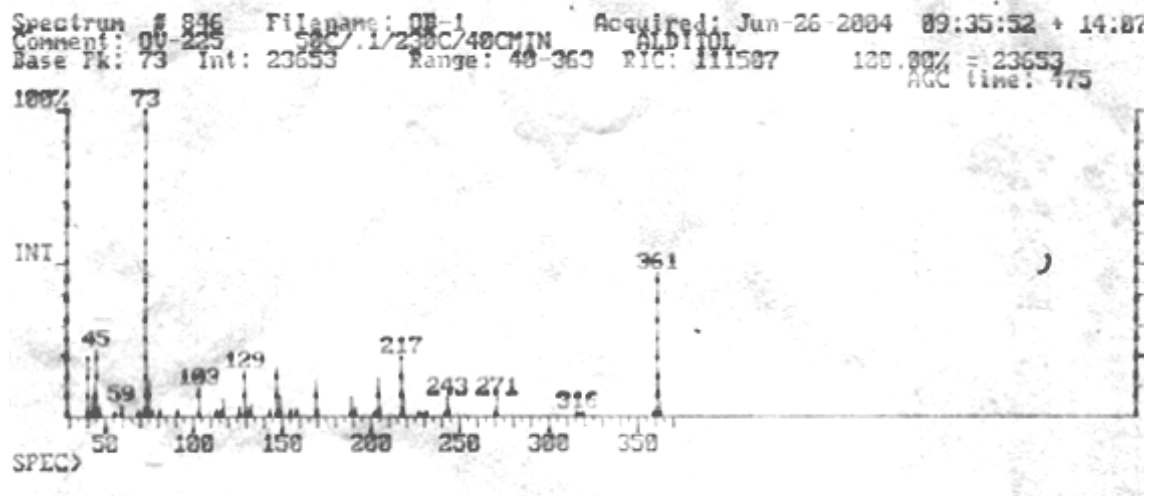


FIGURA 31 – ANÁLISE DIRETA NO PROBE DO DETECTOR DE ESPECTROMETRIA DE MASSA NA UFSC, DO PROVÁVEL GLUCONASTURTIUM ACIDO

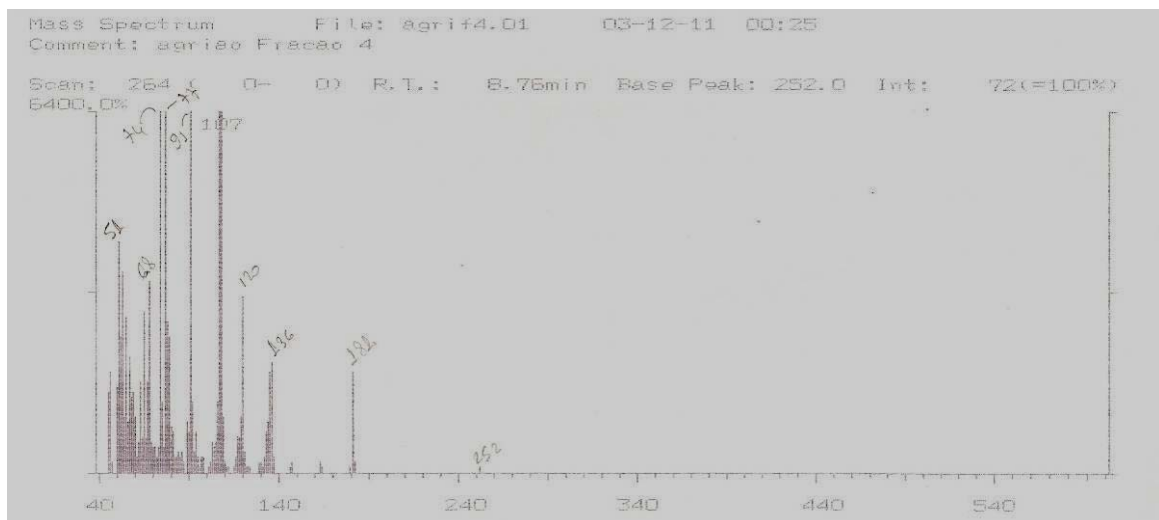


FIGURA 32 – ANÁLISE POR CG/MS NA UFPR, DO PROVÁVEL GLUCONASTURTIUM ACIDO DERIVATIZADO COM TMS

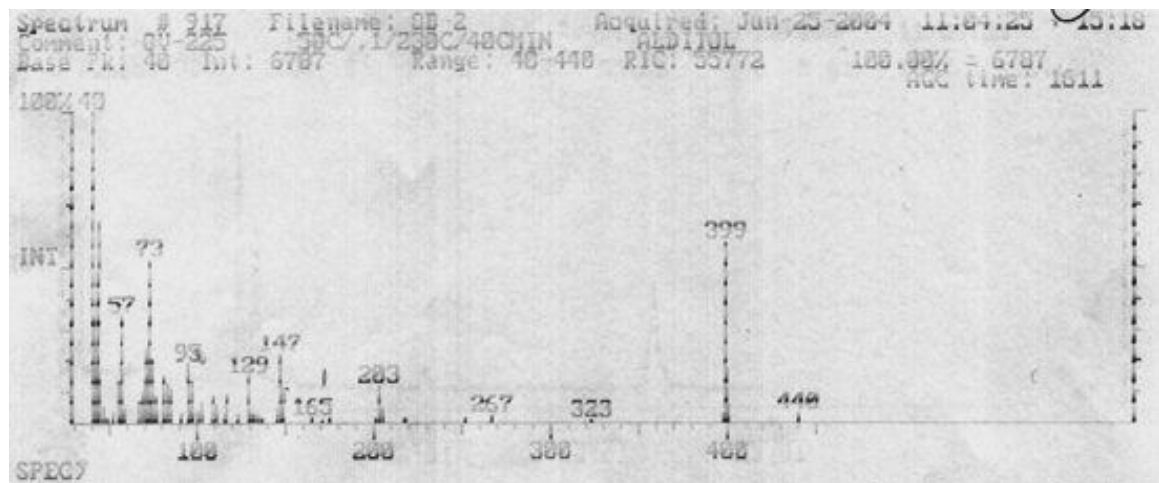


FIGURA 33 – ESTRUTURAS QUÍMICAS DO ESPECTRO DE MASSA DO SINIGRIN

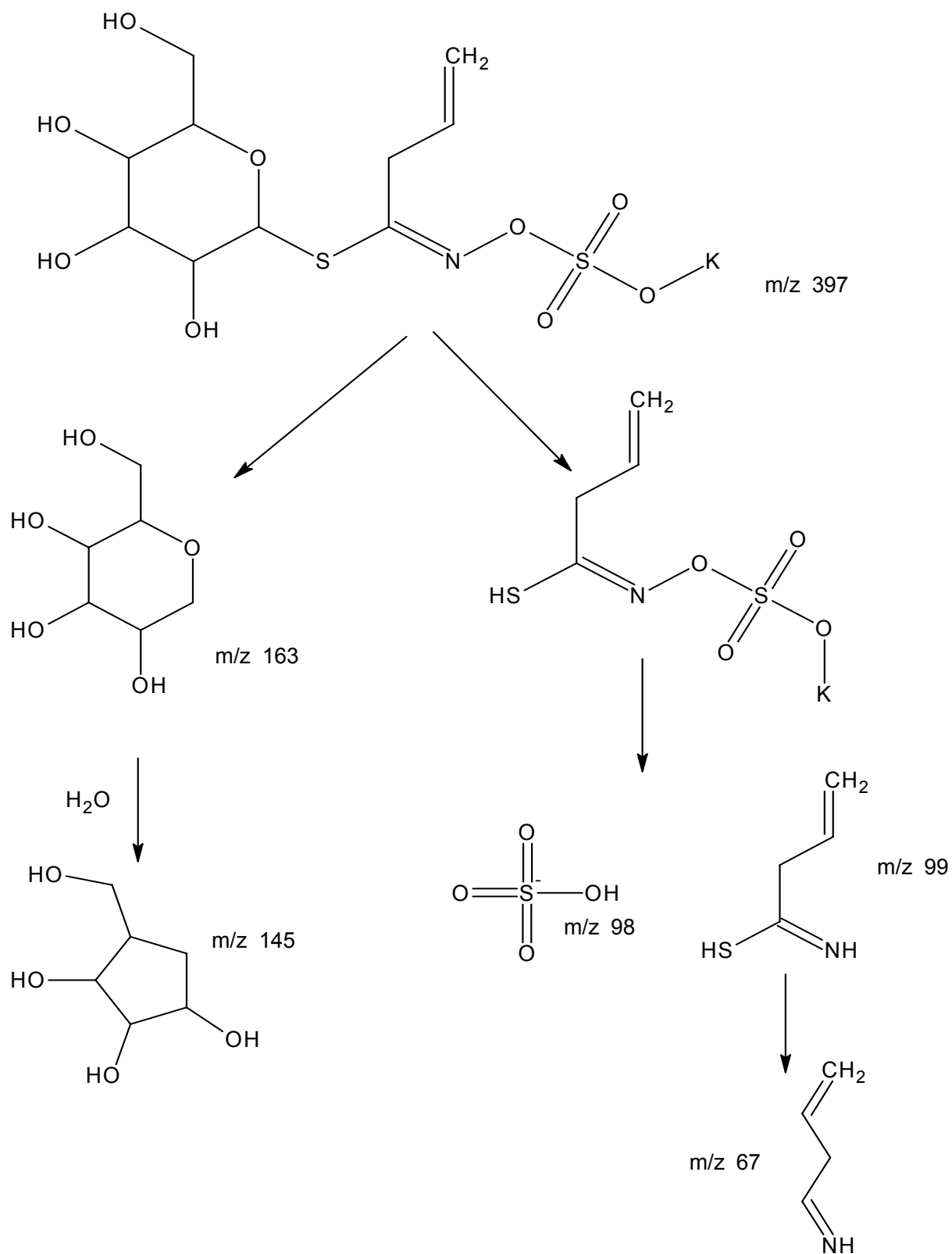
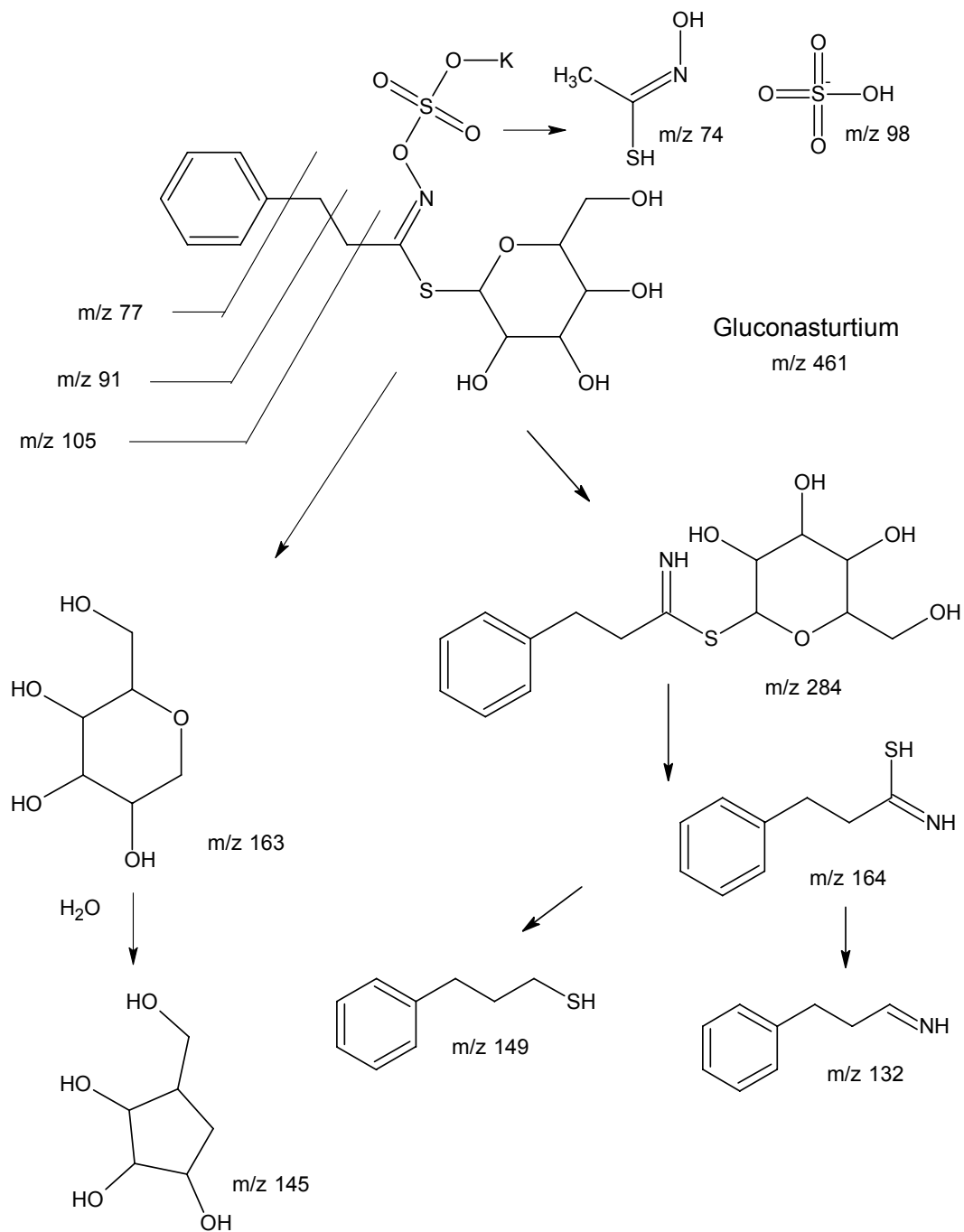


FIGURA 34 – ESTRUTURAS QUÍMICAS PARA ANÁLISE DOS FRAGMENTOS DOS ESPECTROS DE MASSA



4.3.4 Análises por cromatografia líquida de alta eficiência - CLAE

Foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) as seguintes amostras: alcoolatura de agrião, droga vegetal talos e folhas na forma de extrato (EATF), extrato fluido de agrião, tintura de agrião, extrato seco de agrião, xarope de agrião e solução oral de agrião. As análises foram realizadas de acordo com metodologia validada para o feniletil glucosinolato.

A droga vegetal talos e folhas, na forma de extrato analítico talos e folhas (EATF), foi analisada, segundo metodologia não validada, para qualificação (*fingerprint*) e semi-quantificação (>95%) de compostos fenólicos, nitrogenados e esteróides por CLAE.

4.3.4.1 Resultados da validação analítica do doseamento do feniletil glucosinolato por CLAE

4.3.4.1.1 Linearidade

A linearidade foi determinada pela análise dos resultados provenientes da comparação das curvas contemplando as 7 concentrações obtidas utilizando os diferentes solventes.

Exemplo dos cromatogramas e dos espectros obtidos da solução padrão estão demonstrados nas figuras 35 e 36.

FIGURA 35 – CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO 0,10 MG/ML

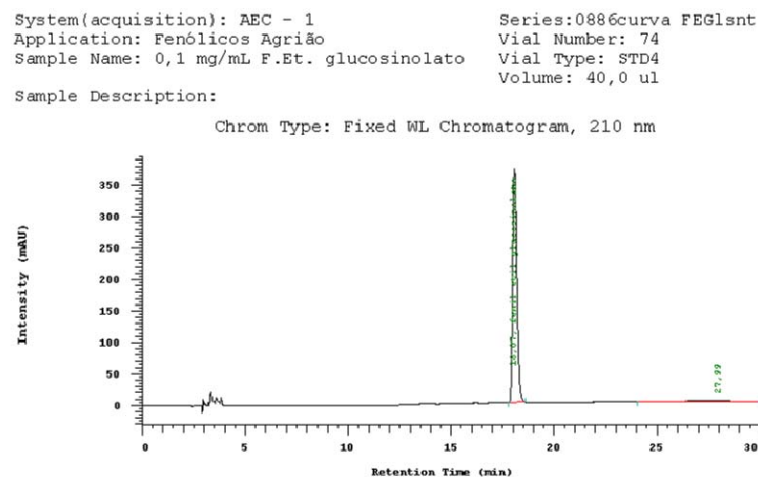
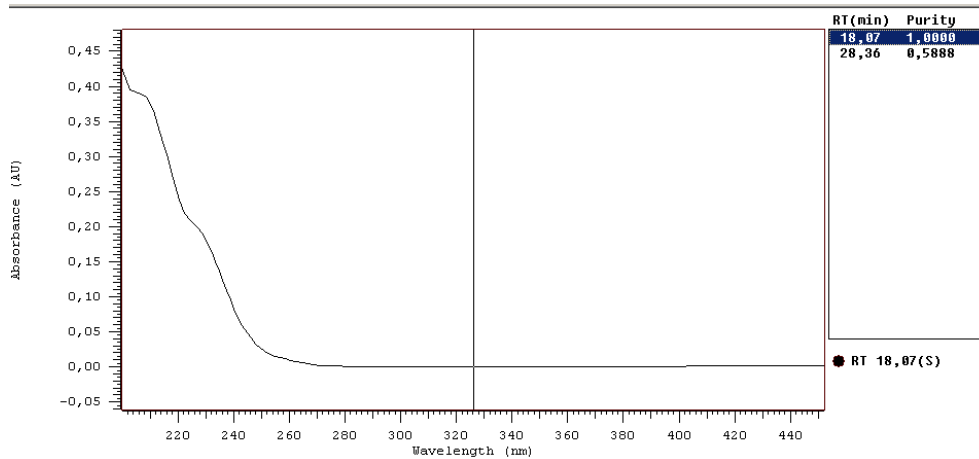
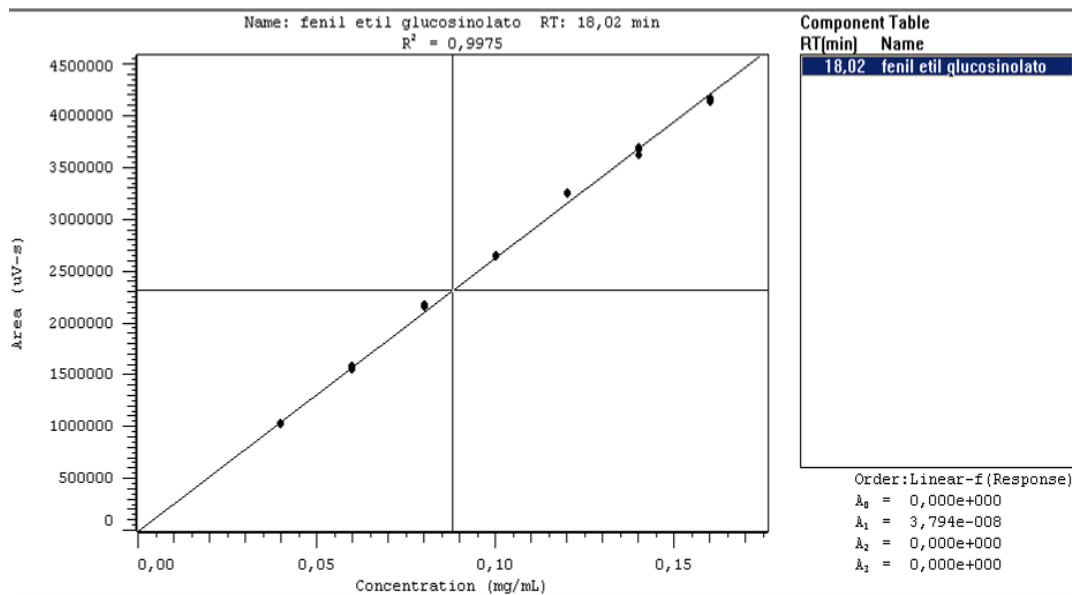


FIGURA 36 – ESPECTRO E PUREZA DO PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO 0,10 MG/ML



O método demonstrou-se linear na faixa de trabalho pretendida, pois o coeficiente de correlação é de 0,9975, estando dentro dos limites esperados, ou seja, maior ou igual a 0,98, conforme demonstrado na figura 37 apresenta a curva de linearidade.

FIGURA 37 – CURVA DE LINEARIDADE DE FENILETIL GLUCOSINOLATO



Na tabela 46 estão dispostos os valores encontrados na curva de linearidade e o cálculo do desvio padrão (DP) e desvio padrão relativo (DPR) entre os valores encontrados nas 3 curvas realizadas e entre a média dos valores encontrados e o valor teórico de cada ponto da curva.

TABELA 46 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO E DESVIO PADRÃO RELATIVO

	Entre $X_{\text{encontrados}}$ Curvas 1, 2 e 3		Entre $X_{\text{teórico}}$ e Média $X_{\text{encontrados}}$ Curvas	
	DP	DPR	DP	DPR
Ponto 1	0,000251	0,640450	0,000608	1,553191
Ponto 2	0,000620	1,037967	0,000176	0,294672
Ponto 3	0,000418	0,508546	0,001563	1,900871
Ponto 4	0,000105	0,104067	0,000349	0,347594
Ponto 5	0,000239	0,194076	0,002324	1,884685
Ponto 6	0,001316	0,947385	0,000786	0,565628
Ponto 7	0,000690	0,438993	0,001959	1,245746

4.3.4.1.2 Exatidão

Para a determinação da exatidão do método foi realizado o ensaio de adição do padrão.

Para a realização do ensaio utilizou-se a tintura de Agrião e o padrão de feniletíl glucosinolato na concentração de 0,4 mg/mL.

Foram analisadas 9 determinações contemplando o intervalo linear.

A primeira amostra foi obtida pela adição de 25µL da tintura de Agrião, 50µL do padrão 0,4 mg/mL, 925 µL da fase diluente.

Os cromatogramas obtidos das 3 determinações estão exemplificados nas figuras 38 a 40.

Considerando que a tintura de Agrião possui uma concentração de 1,429903mg/mL de feniletíl glucosinolato, a concentração teórica da solução analisada deveria ser de 0,0557475 mg/mL de feniletíl glucosinolato (cálculo abaixo). Os resultados estão dispostos na tabela 46.

Cálculo teórico de feniletíl glucosinolato proveniente do padrão

0,4 mg feniletíl glucosinolato - 1000 µL

x - 50 µL

x = 0,02 mg feniletíl glucosinolato

Cálculo teórico de feniletíl glucosinolato proveniente da tintura

1,429903 mg – 1000 µL

X – 25 µL

X = 0,0357475 mg feniletíl glucosinolato presente da tintura

Concentração teórica total de feniletíl glucosinolato na amostra

0,02 mg + 0,0357475 mg = 0,0557475 mg de feniletíl glucosinolato em 1000µL da amostra.

FIGURA 38 – CROMATOGRAMA DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 01

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 210 nm

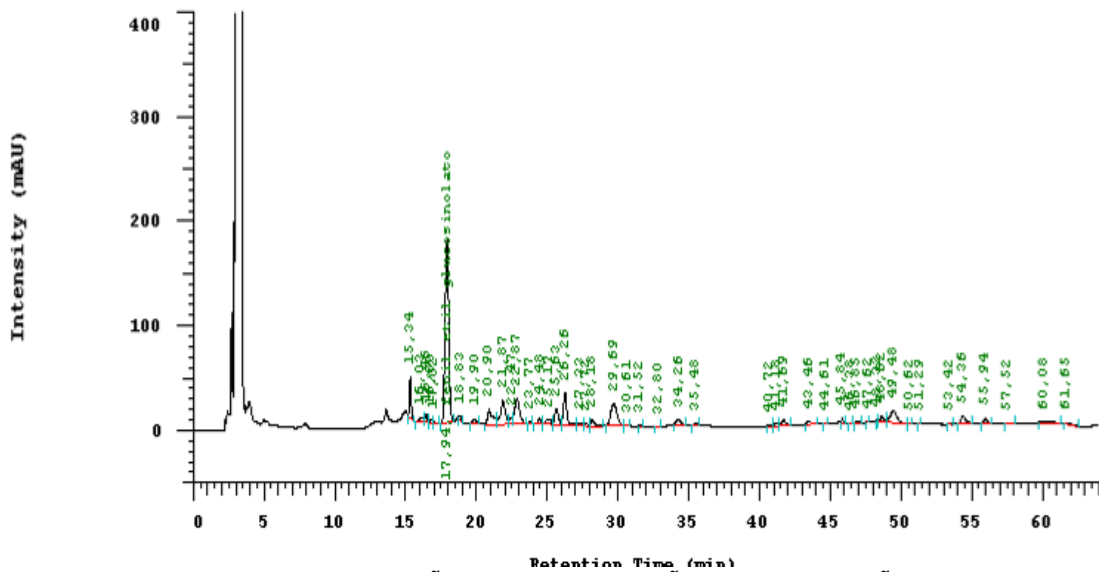


FIGURA 39 – ESPECTRO DO PICO DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 01

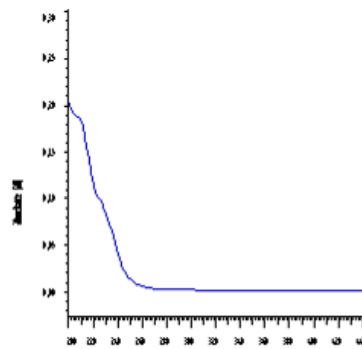


FIGURA 40 – MULTICROMATOGRAMA AGRIÃO TINTURA – EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 01

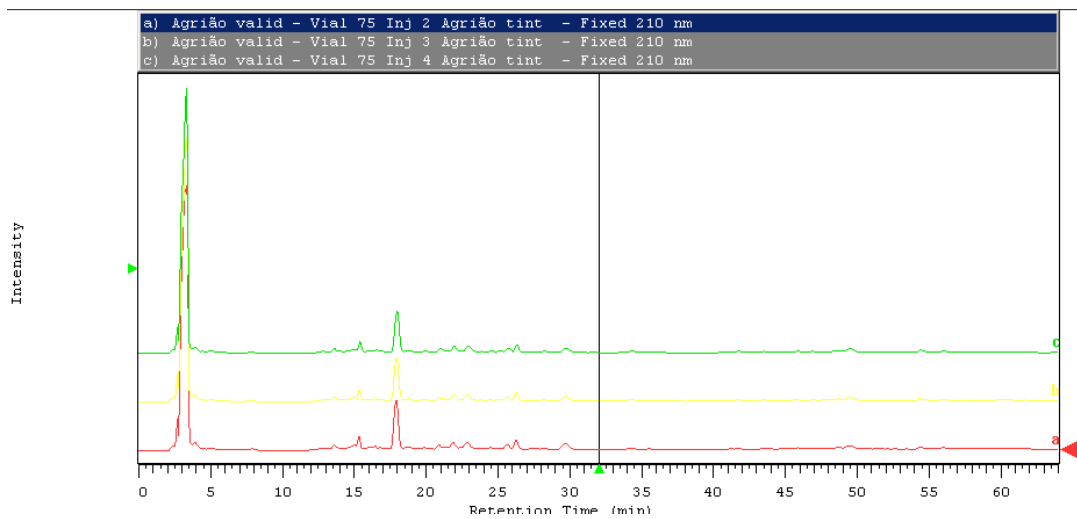


TABELA 46 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 01

Amostras	Concentração teórica (mg/mL)	Concentração encontrada (mg/mL)	Recuperação (%)
Amostra 01		0,0559932	100,44
Amostra 02	0,0557475	0,0562589	100,92
Amostra 03		0,0567386	101,78
Média		0,0563302	101,05

A segunda amostra foi obtida pela adição de 25µL da tintura de Agrião, 175 µL do padrão 0,4 mg/mL e 800 µL da fase diluente. Os cromatogramas das 3 determinações estão exemplificados nas figuras 41 a 43.

Considerando que a tintura de Agrião possui uma concentração de 1,429903 mg/mL de feniletíl glucosinato, a concentração teórica da solução analisada deveria ser de 0,1057475 mg/mL de feniletíl glucosinato (cálculo abaixo). Os resultados estão dispostos na tabela 47.

Cálculo teórico de feniletíl glucosinato proveniente do padrão:

0,4 mg feniletíl glucosinato - 1000 µL

x - 175 µL

x = 0,07 mg feniletíl glucosinato

Cálculo teórico de feniletíl glucosinato proveniente da tintura:

1,429903 mg – 1000 µL

X – 25 µL

X = 0,0357475 mg feniletíl glucosinato presente da tintura

Concentração teórica total de feniletíl glucosinato na amostra:

0,07 mg + 0,0357475 mg = 0,1057475 mg de feniletíl glucosinato em 1000 µL da amostra.

FIGURA 41 – CROMATOGRAMA DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 02

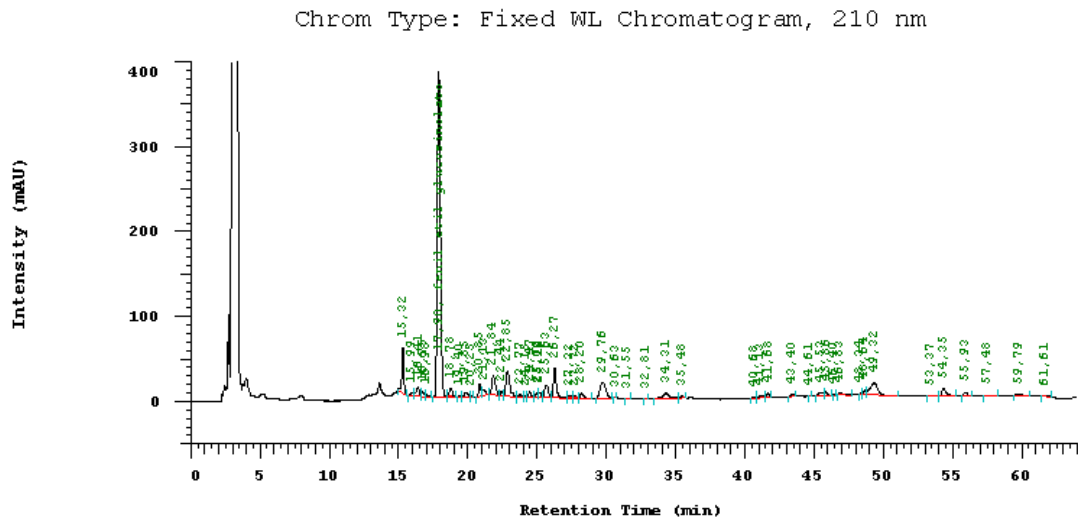


FIGURA 42 – ESPECTRO DO PICO DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 02

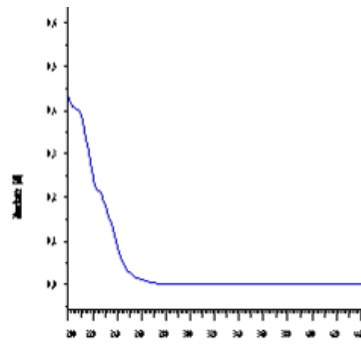


FIGURA 43 – MULTICROMATOGRAMA AGRIÃO TINTURA – EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 02

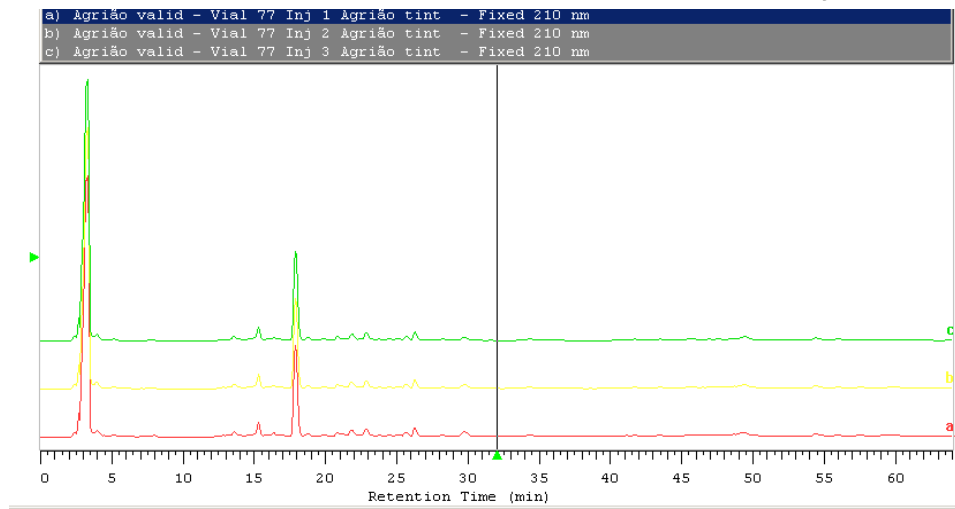


TABELA 47 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 02

Amostras	Concentração teórica (mg/mL)	Concentração encontrada (mg/mL)	Recuperação (%)
Amostra 01		0,106294	100,52
Amostra 02	0,1057475	0,104809	99,11
Amostra 03		0,106273	100,04
Média		0,105792	100,04

A terceira amostra foi obtida pela adição de 25µL da tintura de Agrião, 275 µL do padrão 0,4 mg/mL e 700 µL da fase diluente. Os cromatogramas das 3 determinações estão exemplificados nas figura 44 a 46.

Considerando que a tintura de Agrião possui uma concentração de 1,429903 mg/mL de feniletil glucosinolato, a concentração teórica da solução analisada deveria ser de 0,1457475 mg/mL de feniletil glucosinolato (cálculo abaixo). Os resultados estão dispostos na tabela 48.

Cálculo teórico de feniletil glucosinolato proveniente do padrão:

$$\begin{aligned} 0,4 \text{ mg feniletil glucosinolato} &- 1000 \mu\text{L} \\ x &- 275 \mu\text{L} \\ x &= 0,11 \text{ mg feniletil glucosinolato} \end{aligned}$$

Cálculo teórico de feniletil glucosinolato proveniente da tintura:

$$\begin{aligned} 1,429903 \text{ mg} &- 1000 \mu\text{L} \\ X &- 25 \mu\text{L} \\ X &= 0,0357475 \text{ mg feniletil glucosinolato presente da tintura} \end{aligned}$$

Concentração teórica total de feniletil glucosinolato na amostra:

0,11 mg + 0,0357475 mg = 0,1457475 mg de feniletil glucosinolato em 1000µL da amostra.

FIGURA 44 – CROMATOGRAMA DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 03

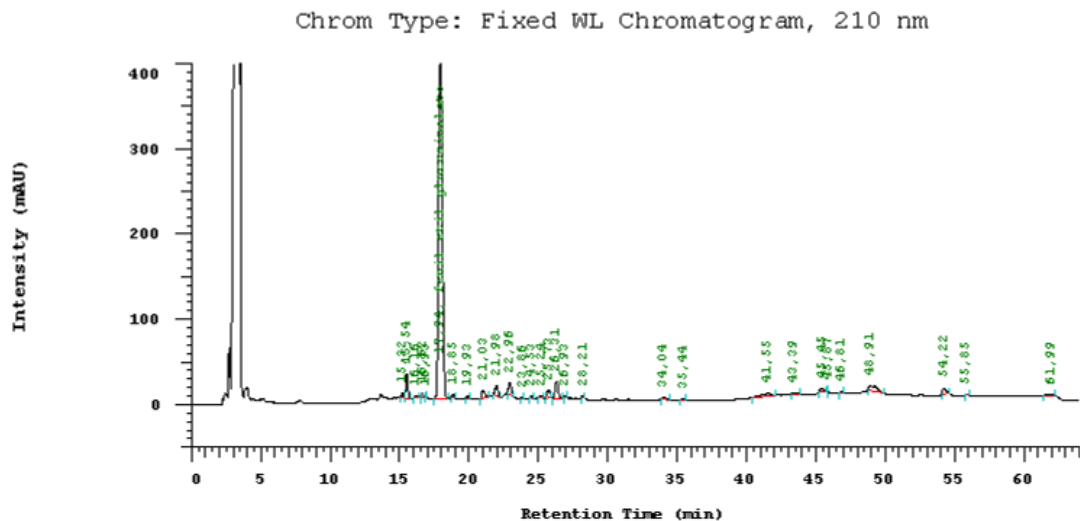


FIGURA 45 – ESPECTRO DO PICO DE AGRIÃO TINTURA EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 03

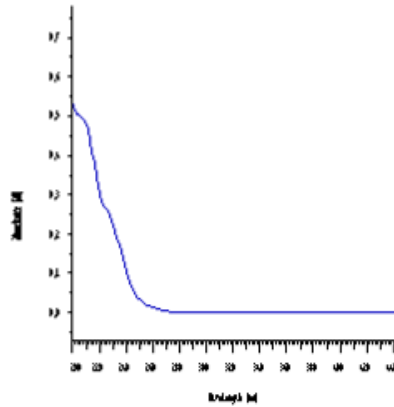


FIGURA 46 – MULTICROMATOGRAMAS AGRIÃO TINTURA – EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 03

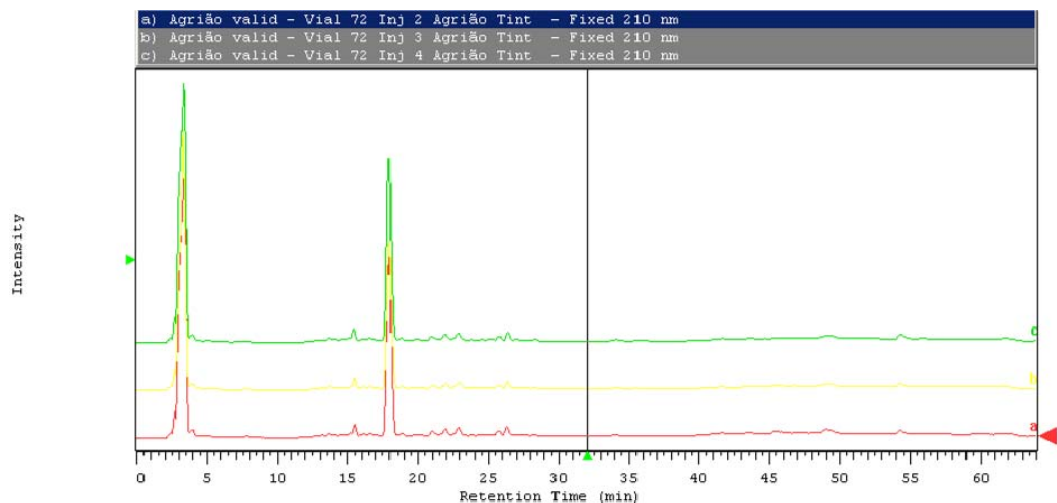


TABELA 48 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE EXATIDÃO CONCENTRAÇÃO 03

Amostras	Concentração teórica (mg/mL)	Concentração encontrada (mg/mL)	Recuperação (%)
Amostra 01		0,146882	100,78
Amostra 02	0,1457475	0,148048	101,58
Amostra 03		0,148858	102,13
Média		0,147929	101,50

Analisando os resultados provenientes das três concentrações, conclui-se que o método proposto apresenta exatidão, pois todos os resultados estão dentro do limite esperado, ou seja, os índices de recuperação do padrão adicionado permaneceram dentro da faixa de 95% a 105%.

4.3.4.1.3 Especificidade

A especificidade da metodologia foi analisada por três maneiras.

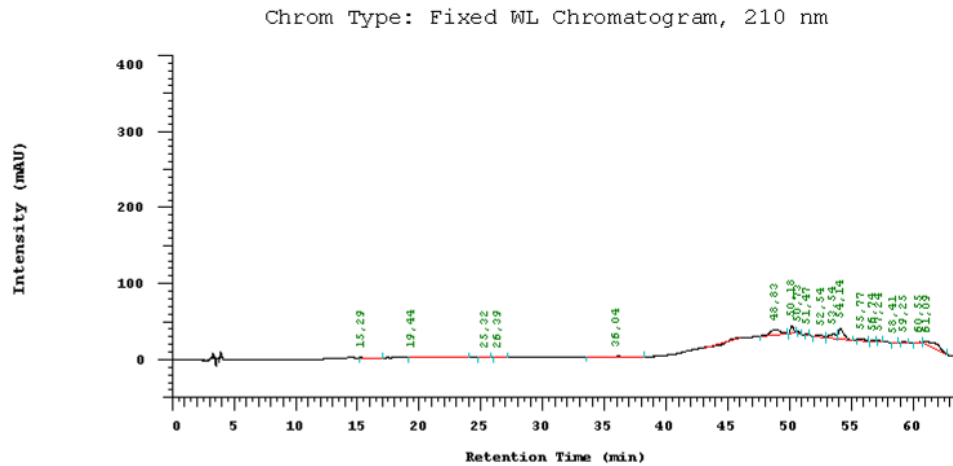
Avaliou-se a possível interferência dos excipientes da amostra na detecção do analito feniletil glucosinolato.

Preparo da amostra do excipiente da matéria-prima/ tintura/extrato líquido:

O excipiente utilizado na produção da tintura de Agrião e na extração de matéria-prima é o etanol. Injetou-se a solução de etanol para avaliação do seu comportamento no método proposto.

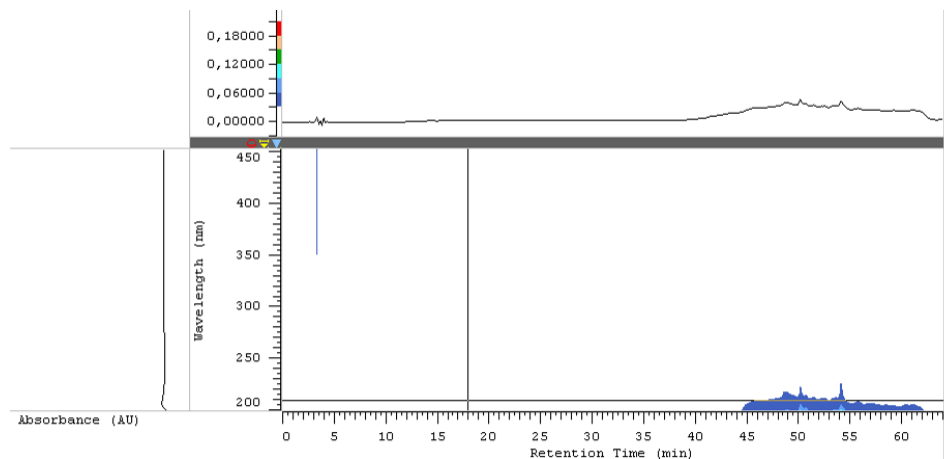
O cromatograma obtido foi demonstrado na figura 47.

FIGURA 47 – CROMATOGRAMA DO ETANOL 77%



A figura 48 mostra a visualização dos possíveis picos interferentes no excipiente etanol 81% no comprimento de onda estipulado na metodologia (210 nm).

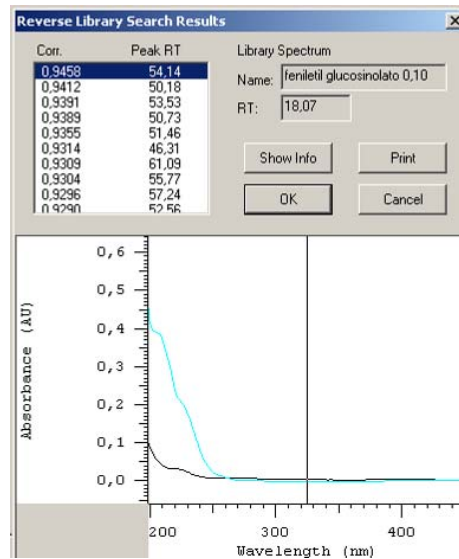
FIGURA 48 – CROMATOGRAMA DO ETANOL 81%



Analisando a figura 48, verificou-se que no comprimento de onda selecionado (210nm) não há detecção significativa de nenhum pico durante toda a corrida. Na figura 48 foi demarcado o tempo de retenção do analito feniletil glucosinolato, e como podemos verificar não há detecção de nenhuma substância que possa promover alguma interferência no seu doseamento.

Para comprovar que realmente não há presença de nenhum pico com espectro semelhante ao espectro do padrão de feniletíl glucosinolato na corrida do etanol, foi feita a comparação dos espectros de todos os sinais que foram detectados no comprimento de onda de 210 nm com o espectro padrão de feniletíl glucosinolato. A visualização dos resultados está demonstrado na figura 49.

FIGURA 49 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS PRESENTES NO CROMATOGRAMA DO ETANOL COM O PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO.

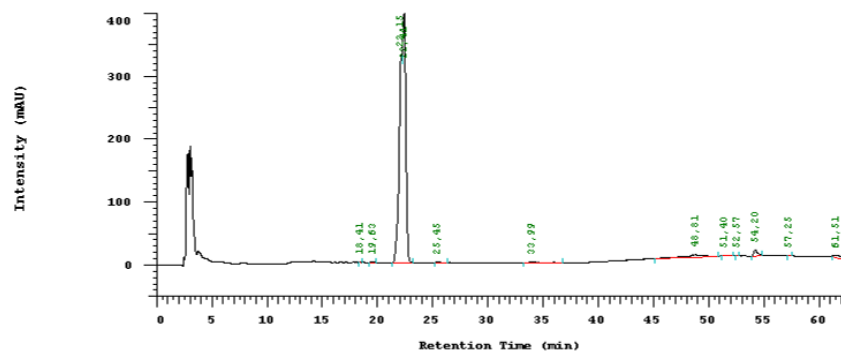


Conforme verificamos na figura 49, não há nenhum pico que possua semelhança satisfatória em relação ao padrão de feniletíl glucosinolato. Dessa forma, comprovou-se que o etanol 81% não possui nenhum componente que possa promover interferência na detecção do analíto (feniletíl glucosinolato).

FIGURA 50 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE

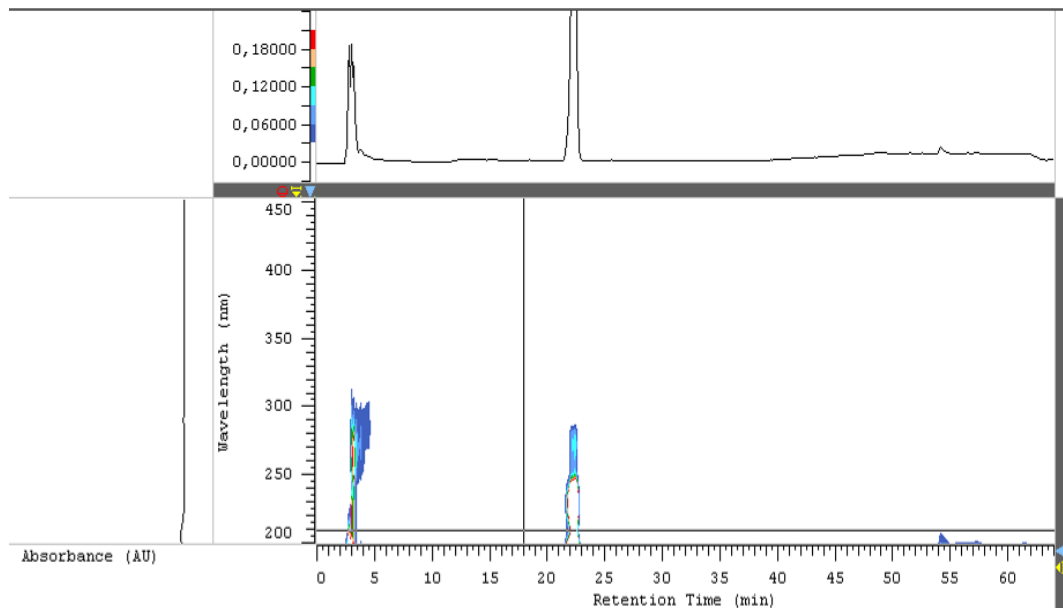
```
System(acquisition): AEC - 1
Application: Fenólicos Agrião
Sample Name: Xarope excipiente
Injection from this vial: 1 of 2
Sample Description:
Series:0938 Excipientes
Vial Number: 66
Vial Type: UNK
Volume: 40,0 ul
```

Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 210 nm



A figura 50 mostra a visualização dos possíveis picos interferentes no xarope no comprimento de onda estipulado na metodologia (210 nm).

FIGURA 51 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE



Analisando a figura 51, verificou-se que no comprimento de onda selecionado (210nm) há detecção de um pico aproximadamente no tempo 22,5 minutos, o qual corresponde ao conservante da formulação o benzoato de sódio. Na figura acima está demarcado o tempo de retenção de 18 minutos (relativo ao tempo de retenção do analíto feniletil glucosinolato), comprovando desta forma que o tempo de retenção entre o feniletil glucosinolato e o pico de benzoato não coincidem, não tendo o benzoato de sódio, portanto, a capacidade de se sobrepor ao pico de interesse.

O espectro do pico presente no xarope foi comparado ao espectro do padrão de feniletil glucosinolato para verificação se estes são ou não semelhantes, podendo dessa forma interferir ou não no processo de doseamento do analíto. No canto esquerdo da figura 52 e na figura 53 podemos visualizar o espectro do pico selecionado (benzoato de sódio).

FIGURA 52 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE – ANÁLISE DO PICO DE BENZOATO DE SÓDIO

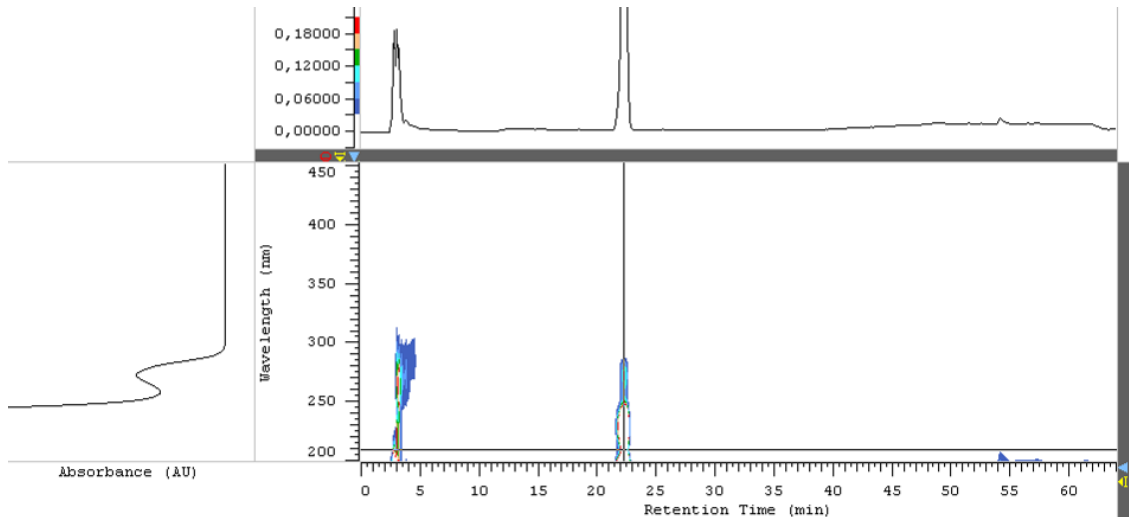
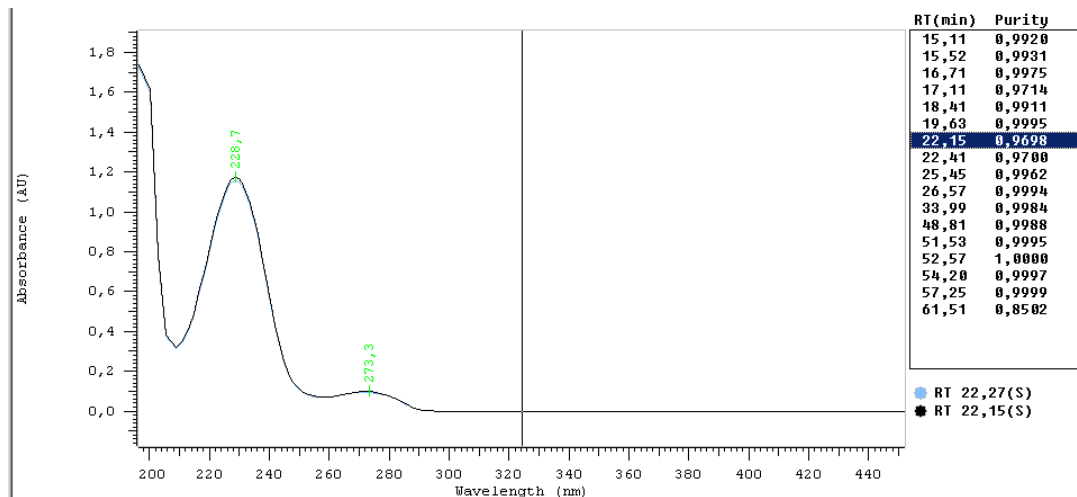
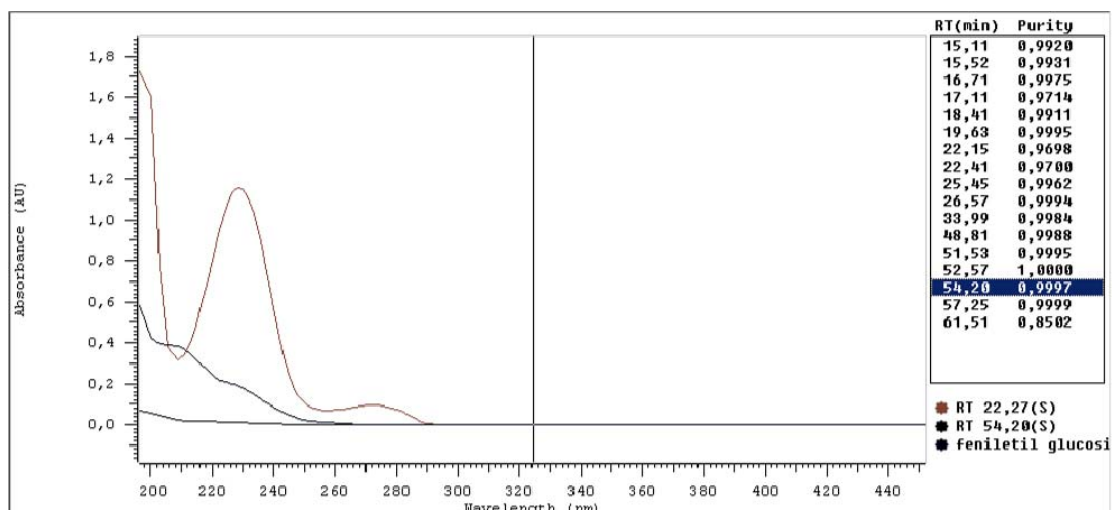


FIGURA 53 – ESPECTRO DO PICO SELECIONADO DO XAROPE



A figura 54 faz a visualização dos espectros dos picos selecionados com o espectro do padrão de feniletil glucosinolato.

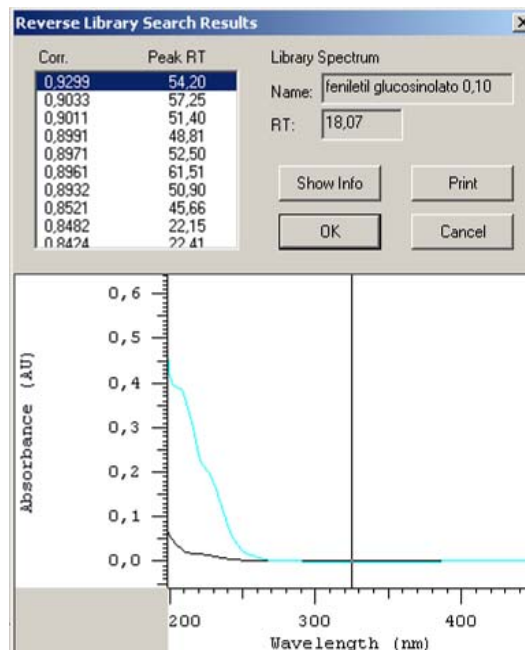
FIGURA 54 – ESPECTRO DO PICO SELECIONADO DO XAROPE E DO PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO



Como podemos visualizar na Figura 54 o espectro do pico do benzoato de sódio não é semelhante ao espectro do pico padrão de feniletíl glucosinolato, não sendo desta forma capaz de interferir no processo de doseamento do analíto.

Para confirmar que realmente não há presença de nenhum pico com espectro semelhante ao espectro do padrão de feniletíl glucosinolato na corrida da solução do xarope, foi feita a comparação dos espectros de todos os sinais que foram detectados no comprimento de onda de 210 nm com o espectro padrão de feniletíl glucosinolato, através da ferramenta Reverse library search. A visualização dos resultados está demonstrado na Figura 55.

FIGURA 55 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS PRESENTES NO CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE COM O PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO.



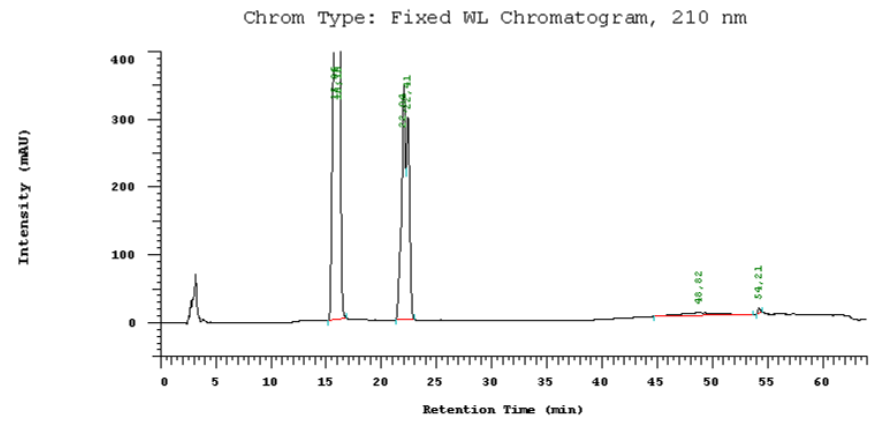
A ferramenta "reverse library search" compara o espectro do padrão selecionado (no caso o feniletíl glucosinolato) com o espectro de todos os sinais detectados no comprimento de onda selecionado (210 nm), dispondo os resultados em ordem decrescente de semelhança, ou seja, o pico que possui mais semelhança está no topo da lista. Analisando a figura 55, comprovamos que não há nenhum pico detectado com a semelhança espectral que possa interferir no doseamento de feniletíl glucosinolato.

Dessa forma, comprovou-se que a solução de xarope não possui nenhum componente o qual possa promover interferência na detecção do analíto (feniletíl glucosinolato).

Preparo da amostra do excipiente da solução oral:

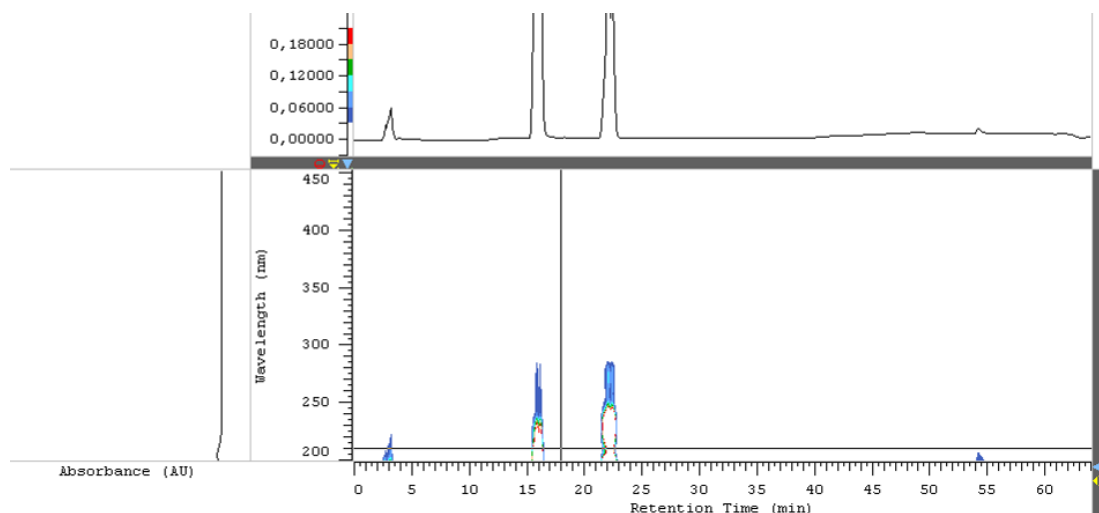
A amostra contendo os excipientes foi preparada conforme procedimento descrito no item 3.7. Preparação das amostras xarope e solução oral. Injetou-se a solução. O cromatograma obtido está representado na figura 56.

FIGURA 56 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL



A figura 57 mostra a visualização dos possíveis picos interferentes na solução oral no comprimento de onda estipulado na metodologia (210nm).

FIGURA 57 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL



Analisando a Figura 57, verificou-se que no comprimento de onda selecionado (210nm) há detecção de dois picos aproximadamente nos tempos 15,95 minutos (pico 1) e 22,4 minutos (pico 2). Na figura acima está demarcado o tempo de retenção de 18 minutos (relativo ao tempo de retenção do analito feniletil glucosinolato), comprovando desta forma que o tempo de retenção entre o feniletil

glucosinolato e os picos detectados não coincidem, não tendo os componentes do excipiente, portanto, a capacidade de se sobrepor ao pico de interesse.

Os espectros dos picos presentes na solução oral foram comparados ao espectro do padrão de feniletil glucosinolato para verificação se estes são ou não semelhantes, podendo dessa forma interferir no processo de doseamento do analíto. No canto esquerdo da figura 58 e na figura 59 podemos visualizar os espectros dos picos selecionados.

FIGURA 58 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL – ANÁLISE DOS PICOS

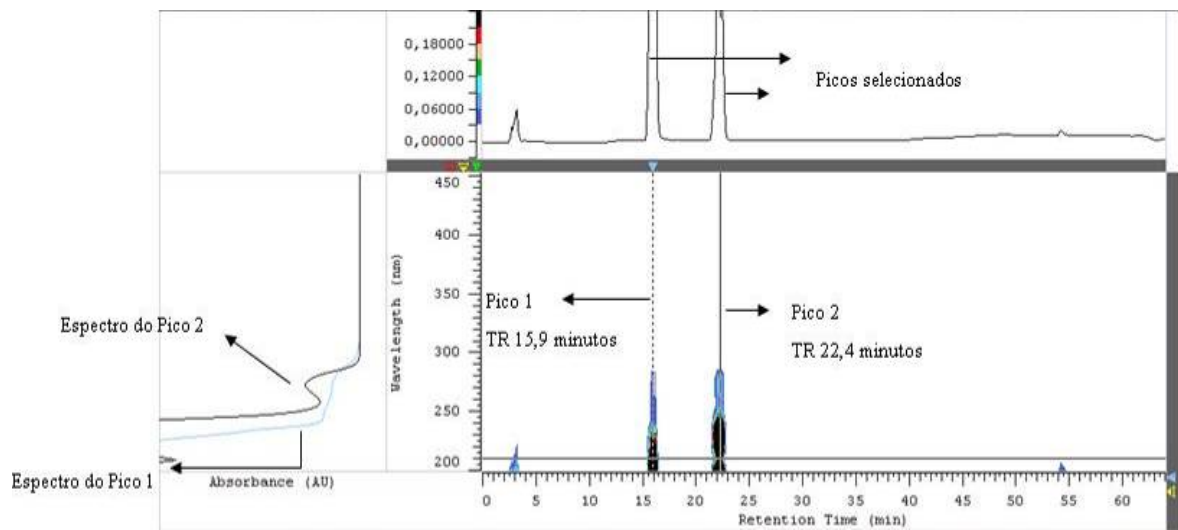
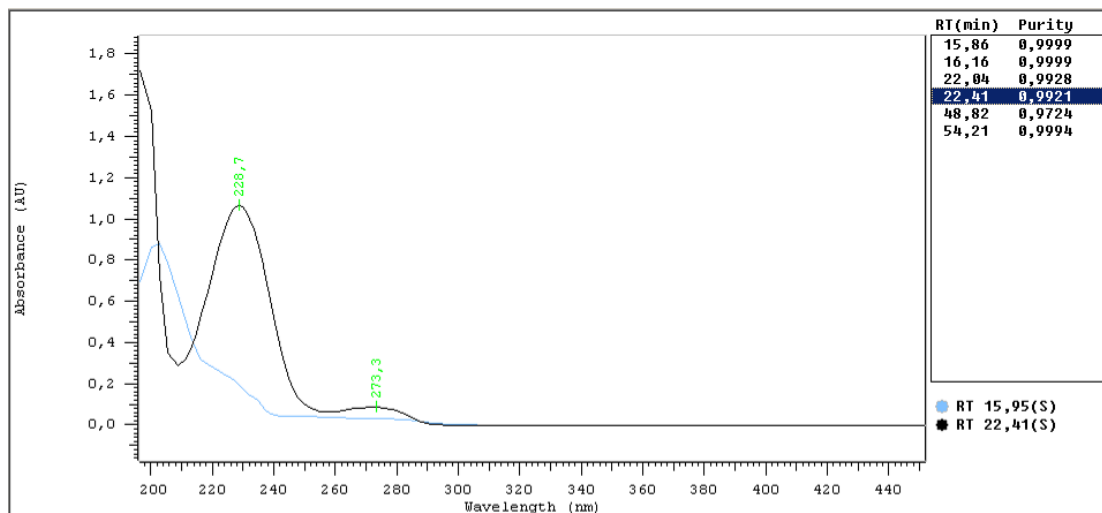
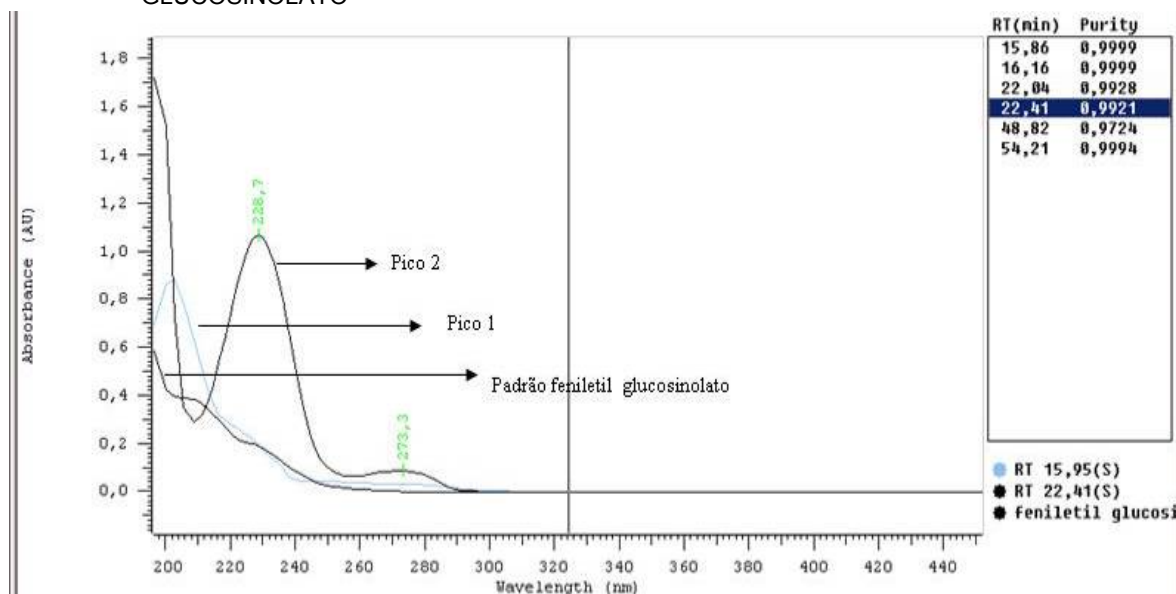


FIGURA 59 – ESPECTROS DOS PICOS SELECIONADOS DA SOLUÇÃO ORAL



A figura 60 apresenta a visualização dos espectros dos picos selecionados com o espectro do padrão de feniletil glucosinolato.

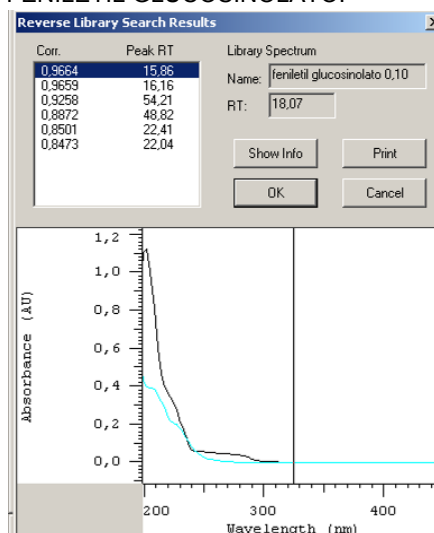
FIGURA 60 – ESPECTROS DOS PICOS SELECIONADOS DA SOLUÇÃO ORAL E DO PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO



Como podemos visualizar na Figura 60 os espectros dos picos 1 e 2 não são semelhantes ao espectro do pico padrão de feniletíl glucosinolato, não sendo desta forma capaz de interferir no processo de doseamento do analíto.

Para confirmar que realmente não há presença de nenhum pico com espectro semelhante ao espectro do padrão de feniletíl glucosinolato na corrida da solução oral, foi feita a comparação dos espectros de todos os sinais que foram detectados no comprimento de onda de 210 nm com o espectro padrão de feniletíl glucosinolato, através da ferramenta Reverse library search. A visualização dos resultados está demonstrada na figura 61.

FIGURA 61 – COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS PRESENTES NO CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL COM O PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO.



Analisando a Figura 61 verificamos que o pico que possui a maior correlação com o padrão feniletíl glucosinolato sai no tempo 15,86 (correlação de 0,9664). Porém ao analisarmos o espectro da substância com o padrão (Figura 61) comprovamos que estes não são semelhantes.

Dessa forma, comprovou-se que a solução oral não possui nenhum componente o qual possa promover interferência na detecção do analíto (feniletíl glucosinolato).

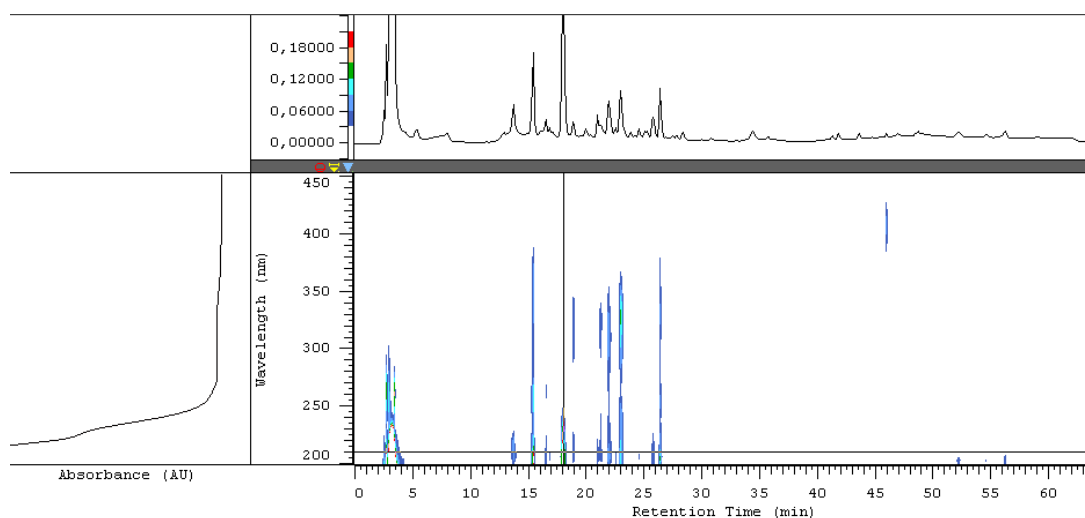
4.3.4.1.3.1 Análise da pureza do pico

Avaliou-se o pico a ser quantificado nas amostras de Agrião tintura, cápsulas, xarope e solução oral, em relação à pureza e comparou-se seu espectro com o padrão de feniletíl glucosinolato.

Injetou-se a amostra de tintura de Agrião conforme descrito, item 3.7.2. Preparação da amostra para tintura. Analisou-se a pureza do pico e realizou-se a comparação espectral com o espectro do padrão de feniletíl glucosinolato.

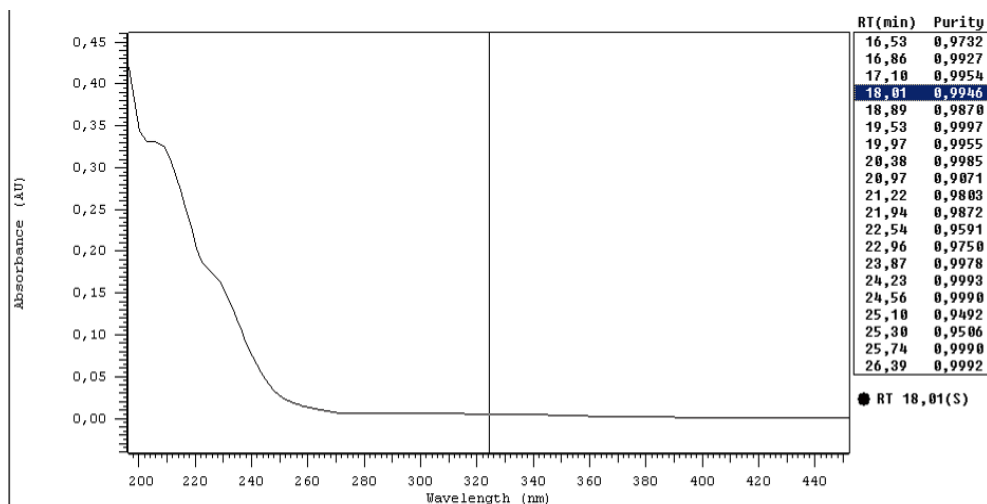
O cromatograma da amostra de Agrião tintura está disposto na Figura 62. Nessa figura podemos visualizar o cromatograma da corrida, o espectro do pico selecionado e o comprimento de onda de trabalho.

FIGURA 62 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15



O pico analisado é o pico correspondente a feniletíl glucosinolato na amostra, a figura 63 demonstra o espectro e a pureza do pico.

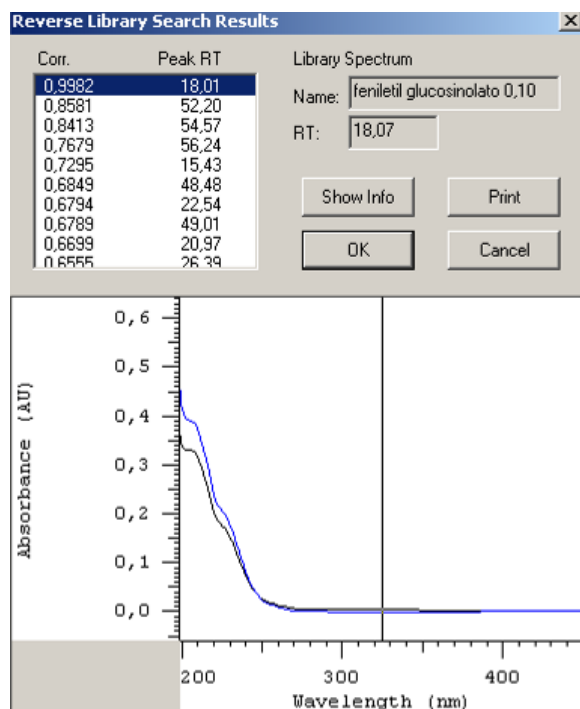
FIGURA 63 – ESPECTRO DO PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO NA TINTURA DE AGRIÃO



Pela análise através do detector de arranjo de diodos (DAD) verificamos que o pico correspondente a feniletíl glucosinolato na amostra está puro, com índice de pureza igual a 0,9946, ou seja, pureza de 99,46% (figura 63).

A figura 64 mostra a comparação espectral entre o pico de feniletíl glucosinolato presente na tintura e a feniletíl glucosinolato padrão.

FIGURA 64 – COMPARAÇÃO ESPECTRAL ENTRE FENILETIL GLUCOSINOLATO PADRÃO E O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO NA TINTURA DE AGRIÃO



Ao compararmos a análise espectral do pico de feniletíl glucosinolato da tintura com o espectro do padrão de feniletíl glucosinolato, verificou-se que os espectros são semelhantes, possuindo uma correlação de 0,9982, ou seja, 99,82% (figura 64).

4.3.4.1.4 Precisão por repetibilidade

A repetibilidade do método foi determinada pelos resultados de 6 determinações a 100% da concentração teste.

Foi utilizada a solução da tintura de Agrião, na proporção de 1:15 em fase diluente para realização das análises.

Os cromatogramas da tintura de Agrião são representados nas figuras 65, 66 e 67.

FIGURA 65 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 01

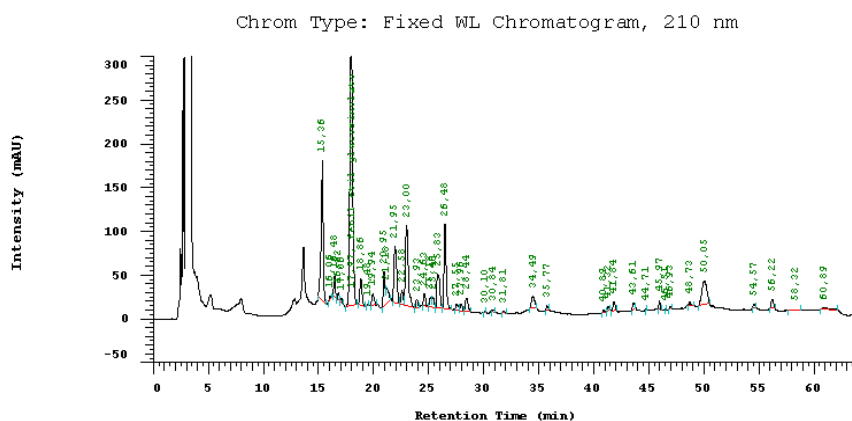


FIGURA 66 – ESPECTRO DO PICO DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 01

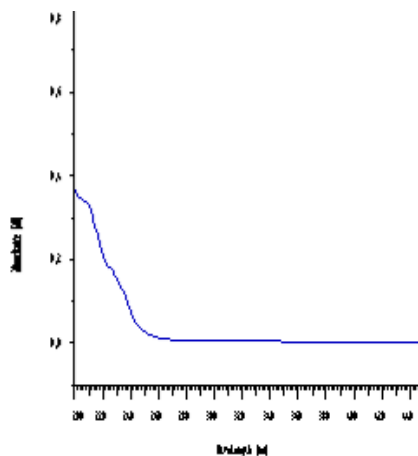
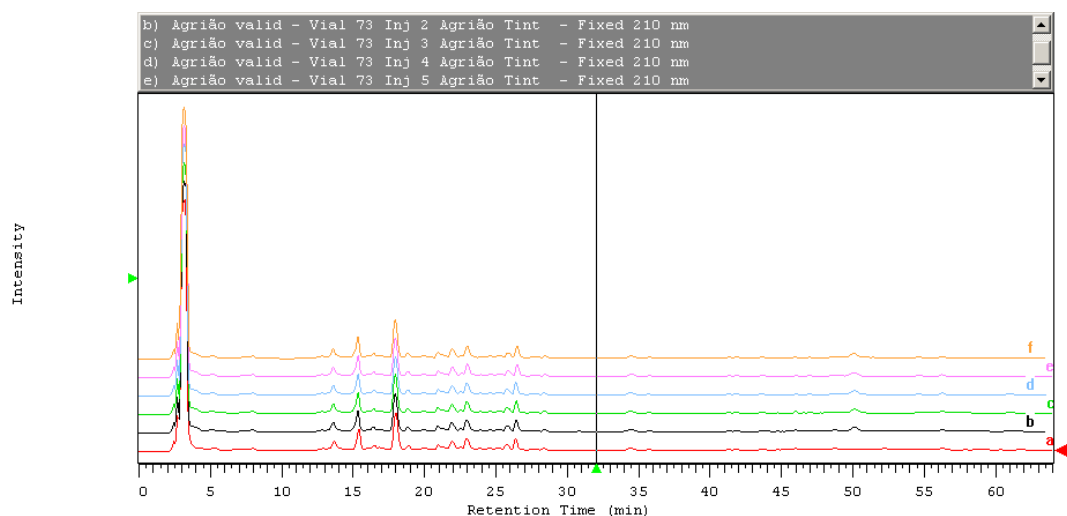


FIGURA 67 – MULTICROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE PRECISÃO DA TINTURA DE AGRIÃO DO ANALISTA 01



A tabela 49 mostra os resultados de desvio padrão (DP) e o desvio padrão relativo (DPR%) das 6 determinações.

TABELA 49 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ANALISTA 01

	Concentração de feniletíl glucosinolato encontrada (mg/mL)					
	Conc 1	Conc 2	Conc 3	Conc 4	Conc 5	Conc 6
Agrião	1,42450	1,43635	1,42899	1,43180	1,43636	1,42671
Média	1,430785					
DP	0,00495					
DPR (%)	0,35					

O método proposto apresenta precisão por repetibilidade, pois o desvio padrão relativo (DPR%) encontrado (0,35%) entre as seis determinações realizadas está dentro dos limites esperados, isto é, menor ou igual a 5%.

A figura 68 apresenta o cálculo do desvio padrão relativo (% *standard deviation*) das concentrações encontradas nas 6 injeções para o pico de feniletíl glucosinolato.

FIGURA 68 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO RELATIVO (% STANDARD DEVIATION) DAS CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS PARA O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO

Conc. Stats. (Rep. Injs.) Title: Concentration (Conc1)

Name	Mean Conc 1 mg/mL	Standard Deviation	% Standard Deviation	Variance
fenil etil glucosinolato	1,43079	4,945E-03	0,35	2,445E-05

Analisando os resultados, comprova-se que o método proposto possui precisão por repetibilidade.

A figura 69 apresenta o cálculo do desvio padrão relativo (% standard deviation) dos tempos de retenção (RT) obtidos nas 6 injeções para o analíto analisado (feniletil glucosinolato).

FIGURA 69 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO RELATIVO (% STANDARD DEVIATION) DOS TEMPOS DE RETENÇÃO ENCONTRADOS PARA O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO

RT Stats. (Rep. Injs.) Title: Retention Time

Name	Mean RT(Min)	Standard Deviation	% Standard Deviation	Variance
fenil etil glucosinolato	17,981	1,197E-02	0,07	1,433E-04

Através dos resultados encontrados pode-se confirmar que o método proposto é reprodutível.

4.3.4.1.5 Precisão intermediária

A repetibilidade intermediária do método foi determinada pela comparação dos resultados de 6 injeções da amostra de Agrião tintura a 100% da concentração teste, de 2 analistas diferentes em dias diferentes.

Os cromatogramas das análises realizadas pelo analista 02 estão demonstradas nas figuras 70 a 72 e os resultados das análises dispostos na tabela 50.

FIGURA 70 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 02

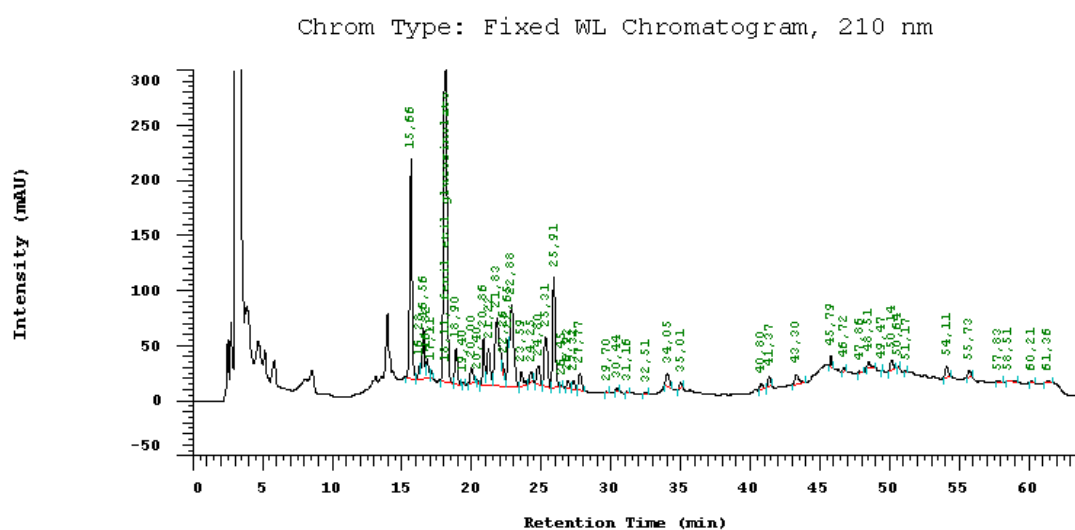


FIGURA 71 – ESPECTRO DO PICO DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 02

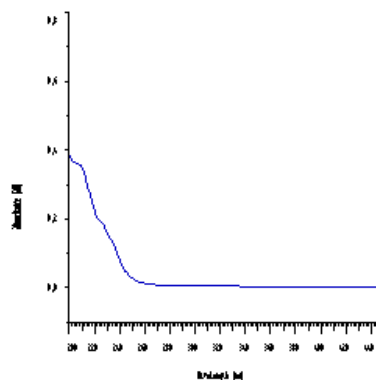


FIGURA 72 – MULTICROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE PRECISÃO DA TINTURA DE AGRIÃO DO ANALISTA 02

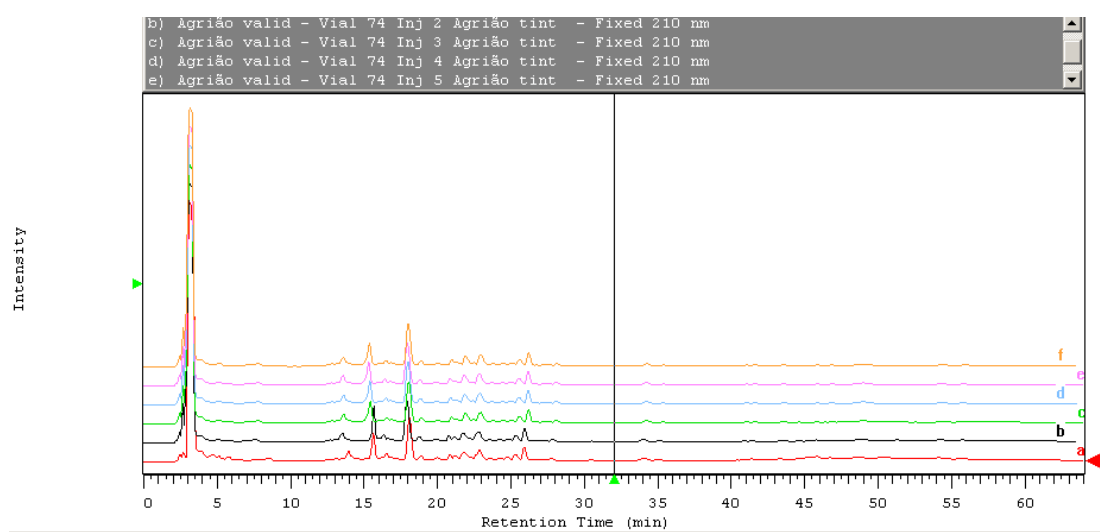


TABELA 50 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ANALISTA 02

Concentração de feniletíl glucosinolato encontrada (mg/mL)						
Análise	Conc 1	Conc 2	Conc 3	Conc 4	Conc 5	Conc 6
Agrião	1,41365	1,40363	1,42611	1,43492	1,45276	1,44305
Média	1,42902					
DP	0,0183					
DPR (%)	1,28					

O método em questão confirma que apresenta precisão por repetibilidade, pois o desvio padrão relativo (DPR%) encontrado (1,28%) entre as seis determinações realizadas está dentro dos limites esperados, isto é, menor ou igual a 5%.

A figura 73 apresenta o cálculo do desvio padrão relativo (%standard deviation) das concentrações encontradas nas 6 injeções (analista 02) para o analito analisado (feniletíl glucosinolato).

FIGURA 73 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO RELATIVO (% STANDARD DEVIATION) DAS CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS PARA O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO

Conc. Stats. (Rep. Injs.) Title: Concentration (Conc1)

Name	Mean Conc 1 mg/mL	Standard Deviation	% Standard Deviation	Variance
fenil etil glucosinolato	1,42902	1,835E-02	1,28	3,368E-04

Analisando os resultados, comprova-se, mais uma vez, que o método proposto possui precisão por repetibilidade.

A figura 74 apresenta o cálculo do desvio padrão relativo (%standard deviation) dos tempos de retenção (RT) obtidos nas 6 injeções (analista 02) para o analíto analisado (feniletíl glucosinolato).

FIGURA 74 – CÁLCULO DESVIO PADRÃO RELATIVO (% STANDARD DEVIATION) DOS TEMPOS DE RETENÇÃO ENCONTRADOS PARA O PICO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO

RT Stats. (Rep. Injs.) Title: Retention Time

Name	Mean RT(Min)	Standard Deviation	% Standard Deviation	Variance
fenil etil glucosinolato	18,018	6,035E-02	0,33	3,642E-03

Através dos resultados encontrados pode-se novamente confirmar que o método proposto é reprodutível.

A figura 75 e a tabela 51 mostram a comparação dos resultados da análise de precisão dos dois analistas.

FIGURA 75 – MULTICROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE PRECISÃO DA TINTURA DE AGRIÃO DOS ANALISTAS 01 E 02

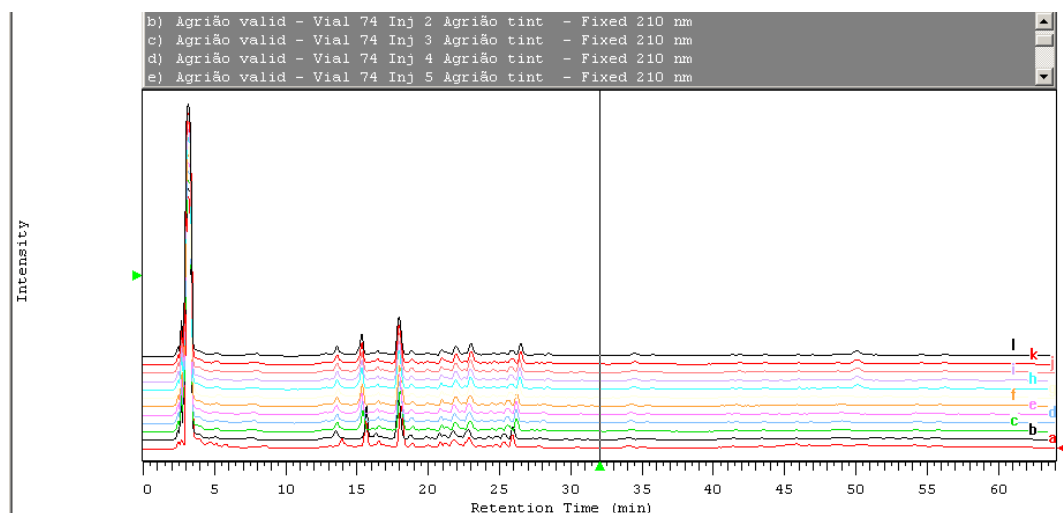


TABELA 51 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Análise	Média da concentração de feniletil glucosinolato encontrada (mg/mL)
Primeiro analista	1,430785
Segundo analista	1,42902
Média	1,429903
DP	0,01285
DPR %	0,898663

O método proposto apresenta precisão intermediária, pois o desvio padrão relativo (DPR) encontrado (0,899%) entre as análises realizadas pelos dois analistas estão dentro dos limites esperados, isto é, menor ou igual a 5%.

4.3.4.1.5 Robustez

4.3.4.1.5.1 Composição da Fase Móvel

Avaliou-se a influência da composição da fase móvel.

Diluiu-se a fase ácida em água deionizada na proporção de 1:2. Realizou-se o doseamento de Agrião tintura utilizando essa solução como fase móvel (Fase A).

O cromatograma e o espectro obtidos nessa análise estão demonstrados nas figuras 76 e 77.

FIGURA 76 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 – INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

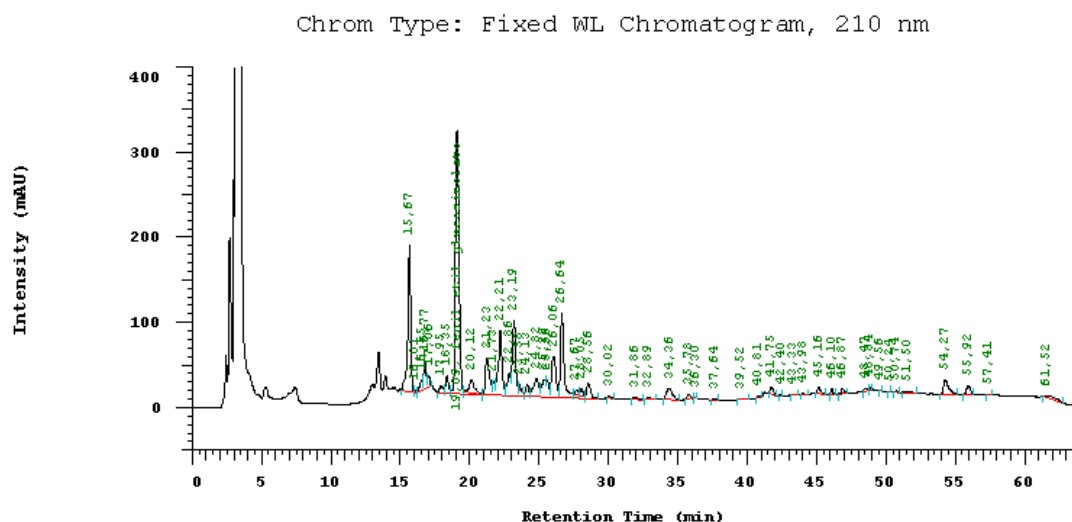
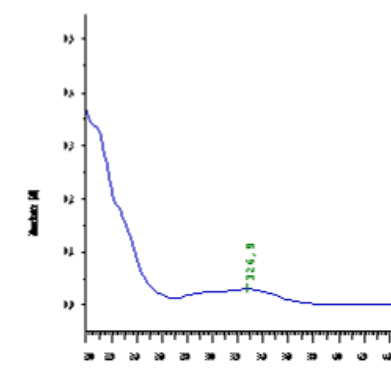


FIGURA 77 – ESPECTRO DO PICO DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 – INFLUÊNCIA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL



A concentração encontrada para essa análise está demonstrada na tabela 52.

TABELA 52 – RESULTADO DA ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

Análise	Concentração de feniletíl glucosinolatos (mg/mL)
Agrião tintura	1,49310
Agrião tintura	1,45324
Média	1,47317

A figura 78 apresenta a comparação dos cromatogramas da tintura de Agrião utilizando o método original (cromatograma c) e utilizando a fase ácida diluída (cromatograma a e b). Os resultados provenientes da comparação dos dois métodos estão dispostos na tabela 53.

FIGURA 78 – MULTICROMATOGRAMAS DA TINTURA DE AGRIÃO – INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

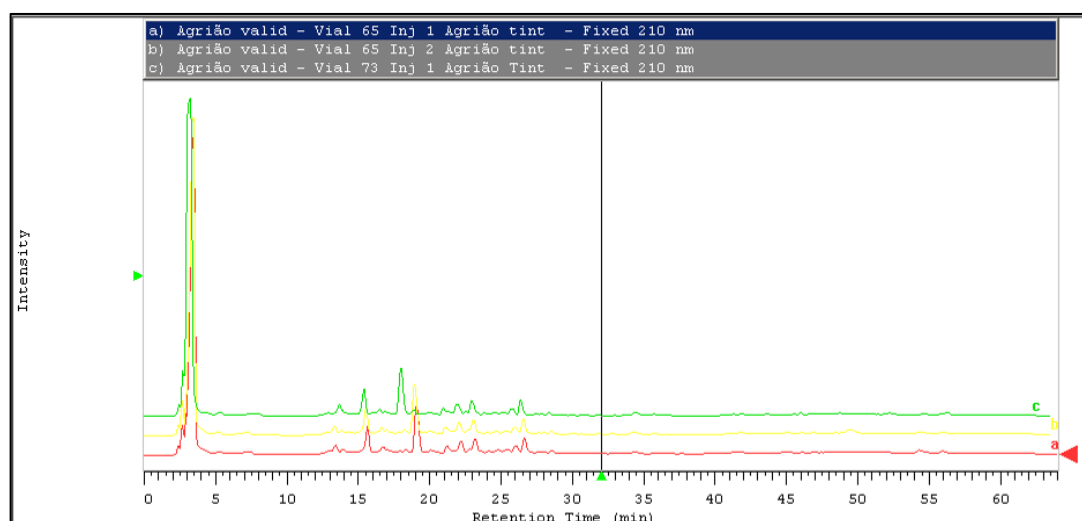


TABELA 53 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS MÉTODOS – INFLUÊNCIA DA COMPOSIÇÃO DA FASE MÓVEL

Análise	Média da concentração de feniletil glucosinolato (mg/mL)
Média –Precisão intermediária tintura	1,429903
Média - Robustez FM	1,47317
Média	1,451537
DP	0,030594
DPR %	2,107724

A análise dos resultados demonstrou que esse método é robusto para essa alteração, apesar de promover uma pequena diferença no tempo de retenção do pico, esta não promoveu mudanças no teor de feniletil glucosinolato dosado, resultando em um desvio padrão relativo de 2,1%, abaixo do limite máximo permitido, que é de 5%.

4.3.4.1.5.2 Diferentes lotes de colunas

Durante toda a validação foi utilizada a coluna Phenomenex de número de série 2729131-12, exceto para a análise de repetibilidade do agrião tintura do analista 02, o qual foi utilizada uma coluna Phenomenex Gemini (C-18 250 x 4,6mm) de número de série 327163-27.

Cromatograma obtido está novamente demonstrado na figura 79 e 80. Os resultados provenientes da comparação das diferentes colunas estão dispostos na tabela 54.

FIGURA 79 – CROMATOGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 02

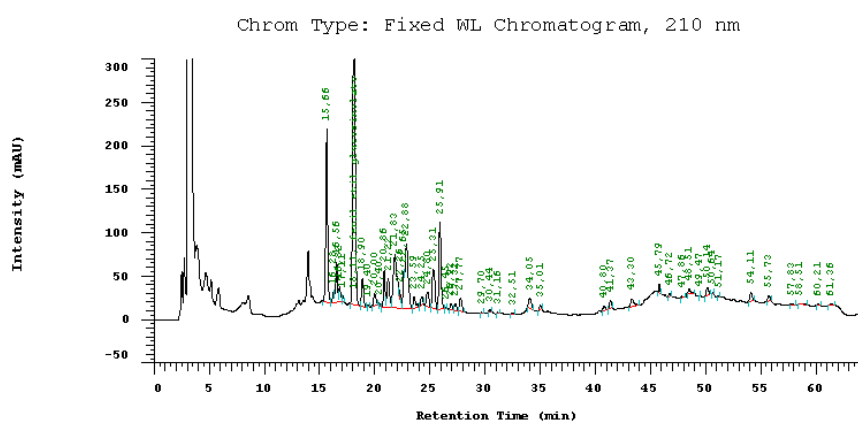


FIGURA 80 – ESPECTRO DO PICO DA TINTURA DE AGRIÃO 1:15 DO ANALISTA 02

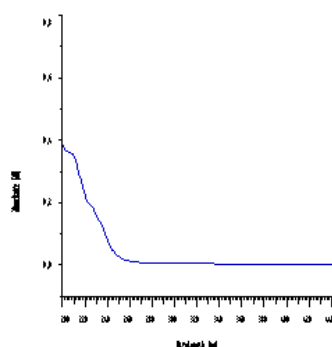


TABELA 54 – RESULTADO DA ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA TROCA DE COLUNA

Análise	Concentração de feniletíl glucosinolato (mg/mL)
Agrião tintura	1,42902
Média Analista 02	

A figura 81 apresenta a comparação dos cromatogramas da tintura de Agrião utilizando o método original (cromatograma a até f) e o novo lote de coluna Phenomenex de número de série 327163-27 (cromatograma g até l). Os resultados provenientes da comparação dos dois métodos estão dispostos na tabela 55.

FIGURA 81 – MULTICROMATOGRAMAS DAS AMOSTRAS DE PRECISÃO DO AGRIÃO SOLUÇÃO ORAL DOS ANALISTAS 01 E 02 – INFLUÊNCIA DA TROCA DE COLUNA

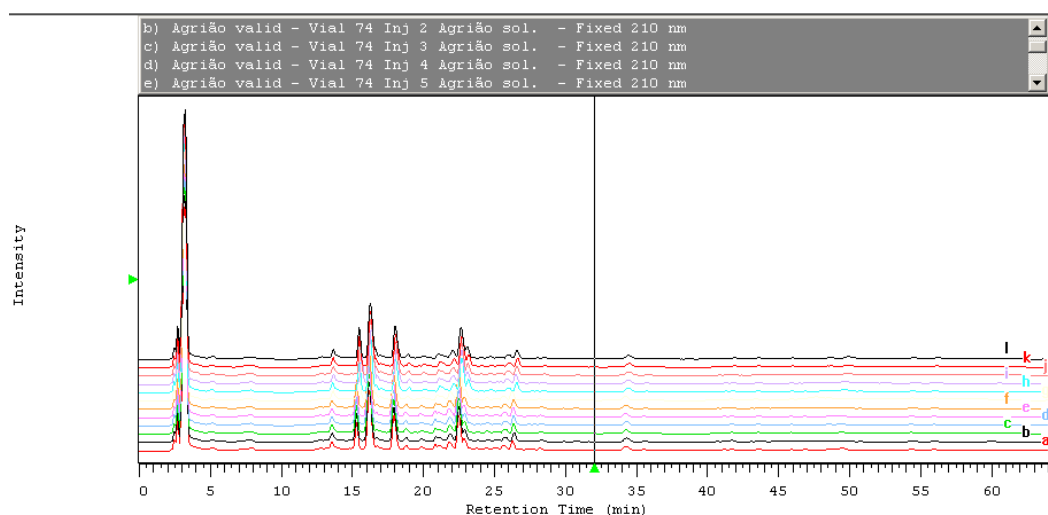


TABELA 55 – RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

Análise	Média da concentração de feniletíl glucosinolato encontrada (mg/mL)
Primeiro analista	1,430785
Segundo analista	1,42902
Média	1,429903
DP	0,01285
DPR %	0,898663

Através do laudo de análise do fabricante, verificou-se que a coluna Phenomenex de série nº. 279131 - 12 possui número de pratos teóricos igual a 85508 p/m; e a coluna Phenomenex de série nº. 327163 - 27 possui um número de pratos teóricos igual a 81367 p/m. Essa diferença de números de pratos teóricos das colunas justifica a pequena variação nos tempos de retenção da amostra entre as duas análises.

A análise dos resultados demonstrou que esse método é robusto para essa alteração, pois apesar da pequena diferença no tempo de retenção dos picos, esta não promoveu mudanças significativas no teor de feniletil glucosinolato dosado, resultando em um desvio padrão relativo de 0,899%, abaixo do limite máximo permitido, que é de 5%.

4.3.4.1.5.3 Estabilidade das soluções

A solução de Agrião xarope juntamente com padrão de feniletil glucosinolato em fase diluente utilizada para a análise da exatidão do xarope concentração II foi guardada, e após 24 hs do seu preparo foi injetada para a verificação da estabilidade da solução final. A média encontrada na análise exatidão II para Agrião xarope servirá de comparação para o cálculo dos resultados.

O cromatograma e o resultado obtido estão demonstrados nas figuras 82 e 83 e na tabela 56.

FIGURA 82 – CROMATOGRAMA DA SOLUÇÃO DE XAROPE EXATIDÃO II – ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO FINAL

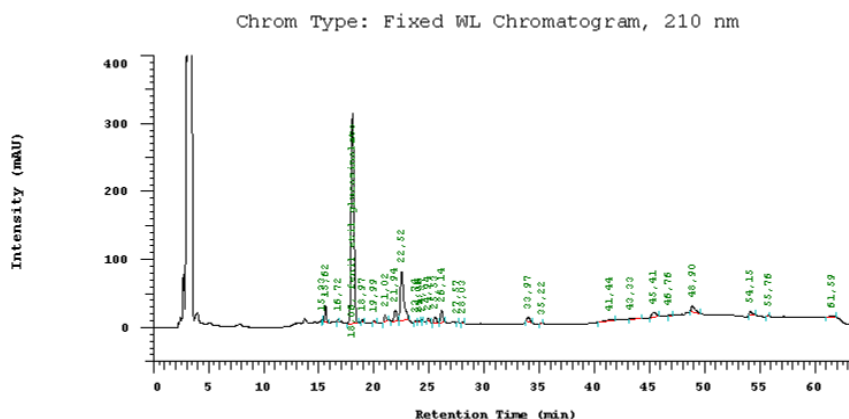


FIGURA 83 – ESPECTRO DO PICO DA SOLUÇÃO DE XAROPE EXATIDÃO II – ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO FINAL

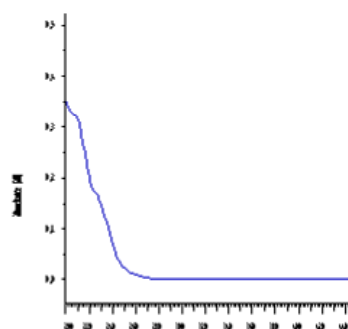


TABELA 56 – RESULTADO DA ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO

Análise	Concentração de feniletil glucosinato (mg/g)
Agrião xarope – exatidão II	0,0981070
Após 24 horas do preparo	

Os resultados provenientes da comparação do doseamento de feniletil glucosinato no momento 0 (média encontrada na análise de exatidão concentração II) e após 24 horas do seu preparo estão dispostos na tabela 57. A Figura 84 apresenta a comparação dos cromatogramas da solução de exatidão de xarope no momento zero (cromatogramas a, b, c) e após 24 horas (cromatograma d).

FIGURA 84 – MULTICROMATOGRAMA DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO

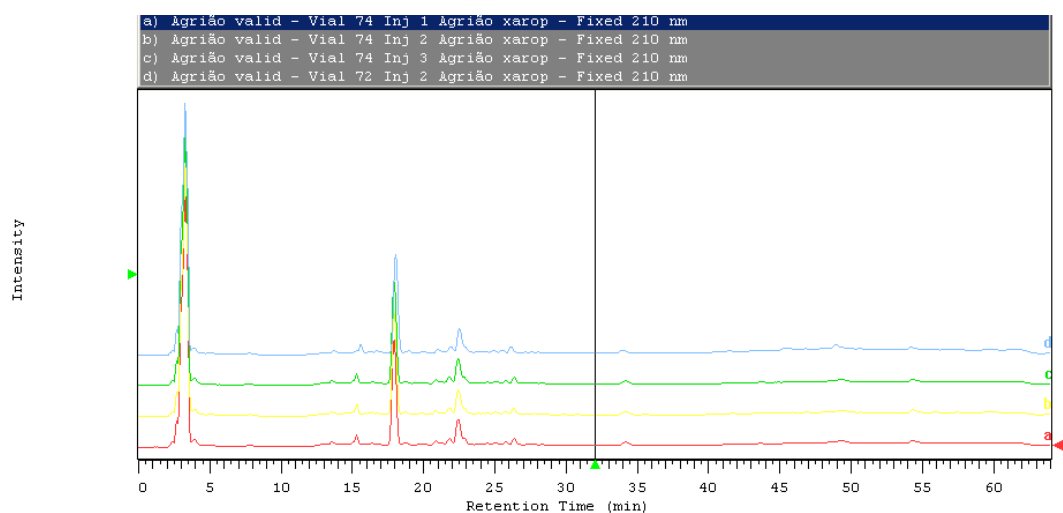


TABELA 57 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DA ESTABILIDADE DA SOLUÇÃO FINAL DE AGRIÃO XAROPE E PADRÃO DE FENILETIL GLUCOSINOLATO EM FASE DILUENTE

Tempo percorrido entre o preparo da amostra e sua análise	Média da concentração de feniletil glucosinato (mg/g)
0 horas	0,096583
24 horas	0,098107
Média	0,097345
DP	0,001078
DPR %	1,106949

Analisando os resultados, verificou-se que o método apresentou robustez para esse parâmetro, pois além de não alterar o perfil cromatográfico, o desvio padrão relativo (DPR%) foi de 1,1%, sendo, portanto, inferior ao especificado (5%).

4.3.4.2 Resultados das análises do feniletíl glucosinolato por CLAE

As amostras foram quantificadas de acordo com o item 4.3.4.1 e utilizando os dados da curva de linearidade da validação analítica e qualificadas pelo tempo de retenção do feniletíl glucosinolato dos cromatogramas e espectrogramas, conforme exemplificado na validação e demonstrado nas figuras 85 a 91, cujos resultados dos teores estão relatados na tabela 58. Segundo o PDR (2002), os teores de glucosinolatos para agrião devem conter no mínimo 0,72 % ou 7,2 mg/g de feniletíl glucosinolato em peso seco, observou-se no extrato analítico um teor de 14,4 mg/g evidenciando a época adequada da coleta e da eficiência do método extrativo para obtenção de insumos padronizados conforme especificação farmacopéica.

FIGURA 85 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DA ALCOOLATURA

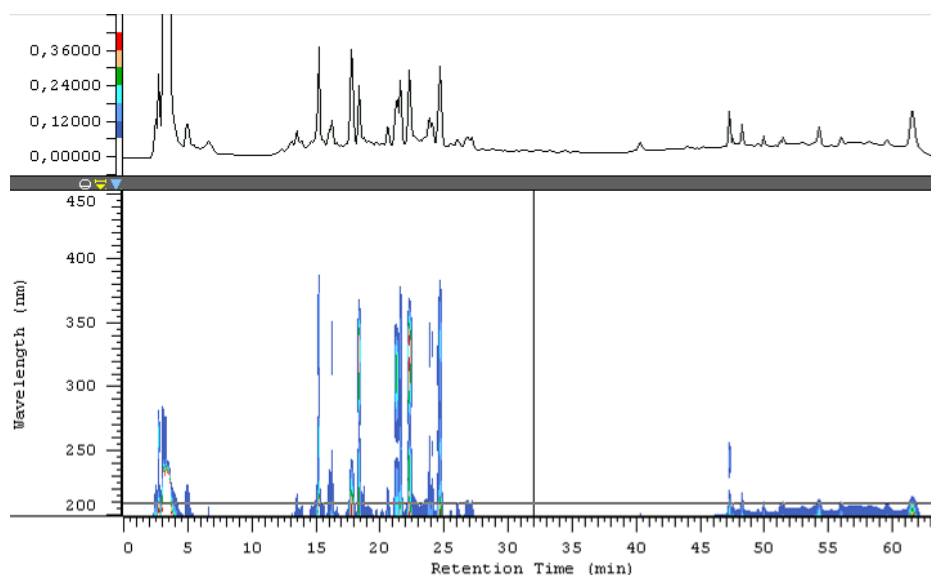


FIGURA 86 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DA DROGA VEGETAL TALOS E FOLHAS

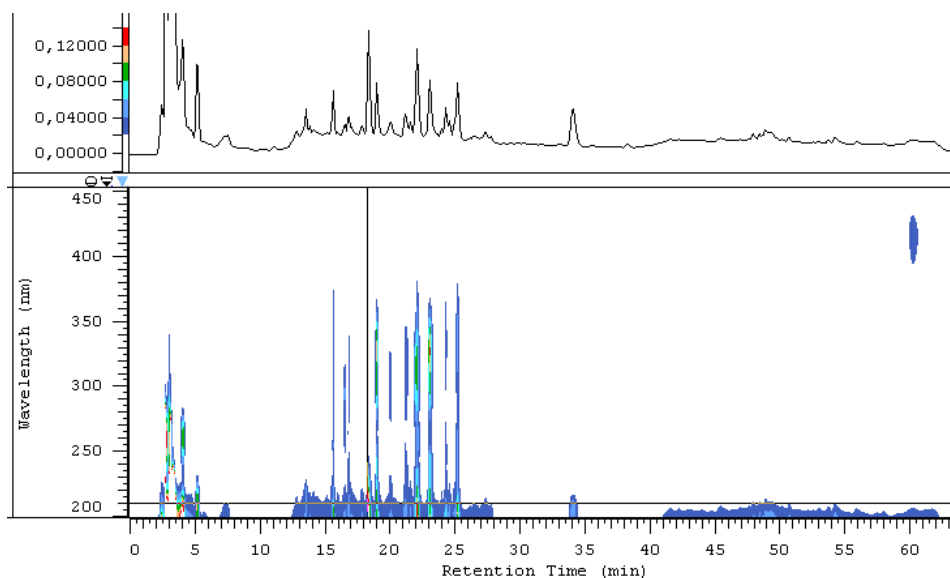


FIGURA 87 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO EXTRATO FLUIDO DE AGRIÃO

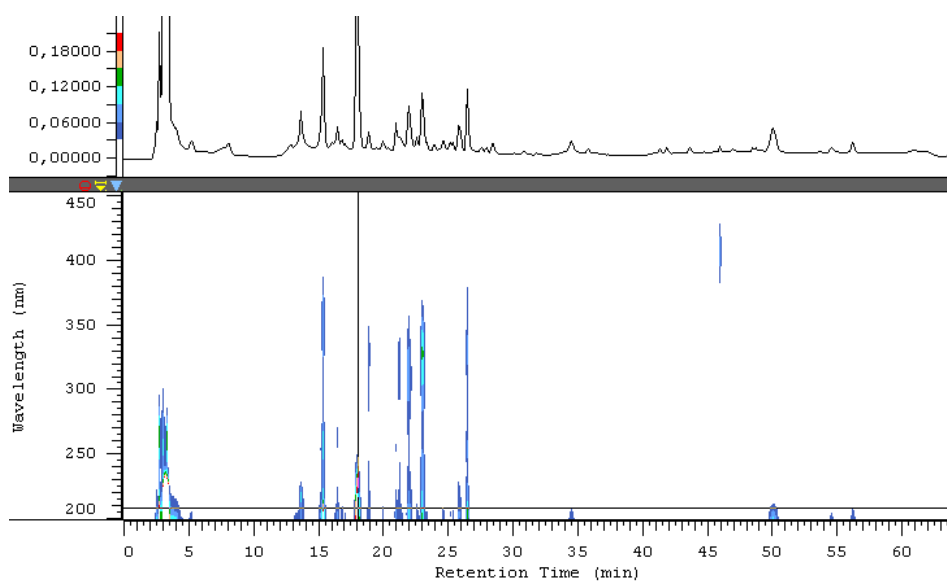


FIGURA 88 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DA TINTURA DE AGRIÃO

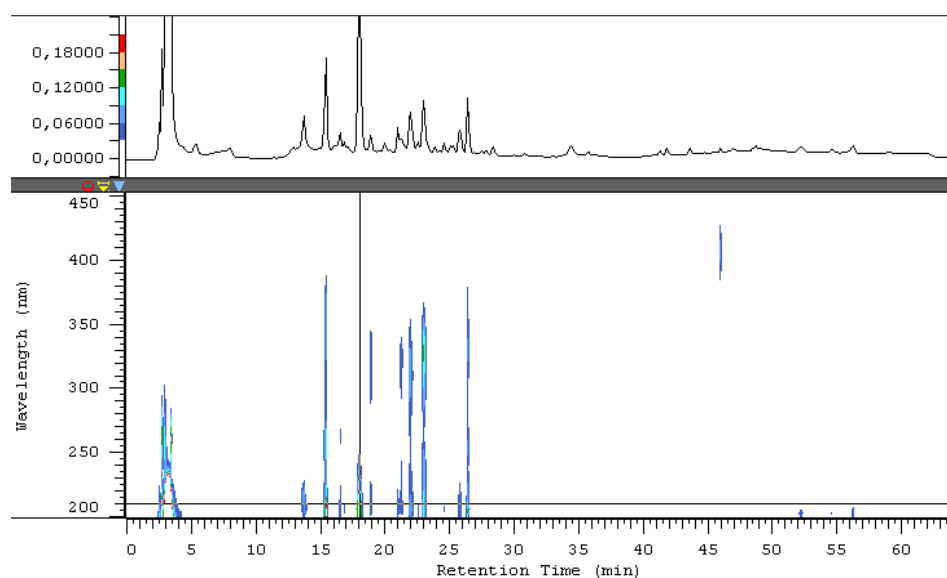


FIGURA 89 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO EXTRATO SECO DE AGRIÃO

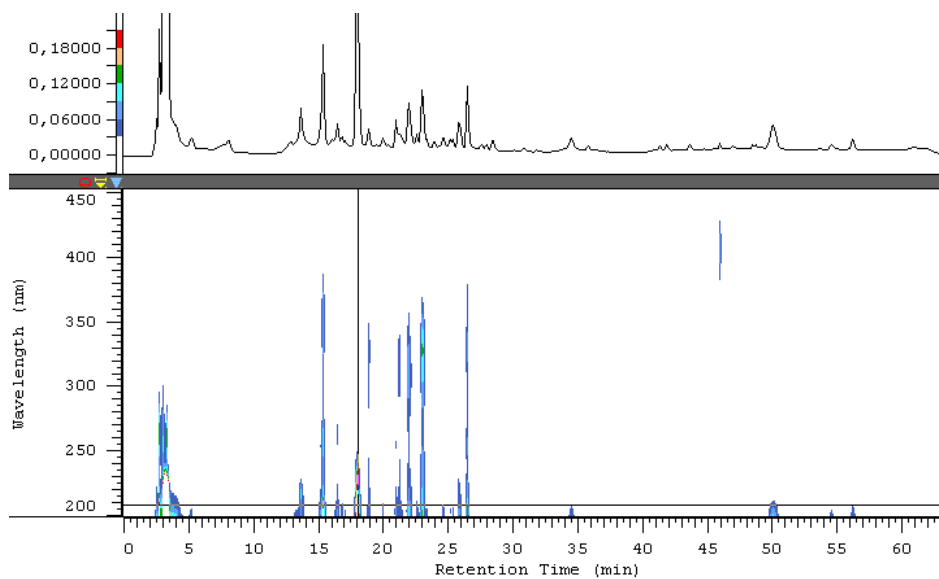


FIGURA 90 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DO XAROPE

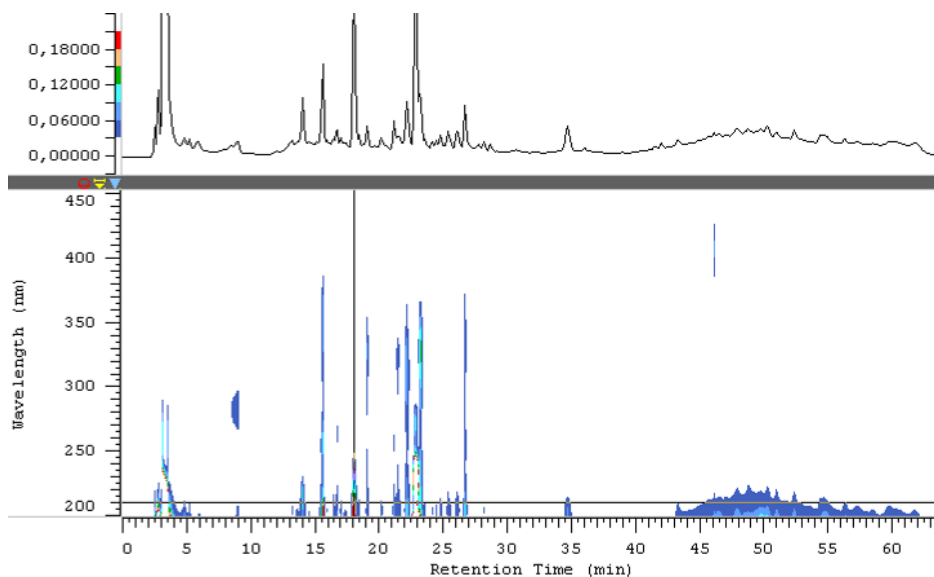


FIGURA 91 – CROMATOGRAMA E ESPECTROGRAMA DA SOLUÇÃO ORAL

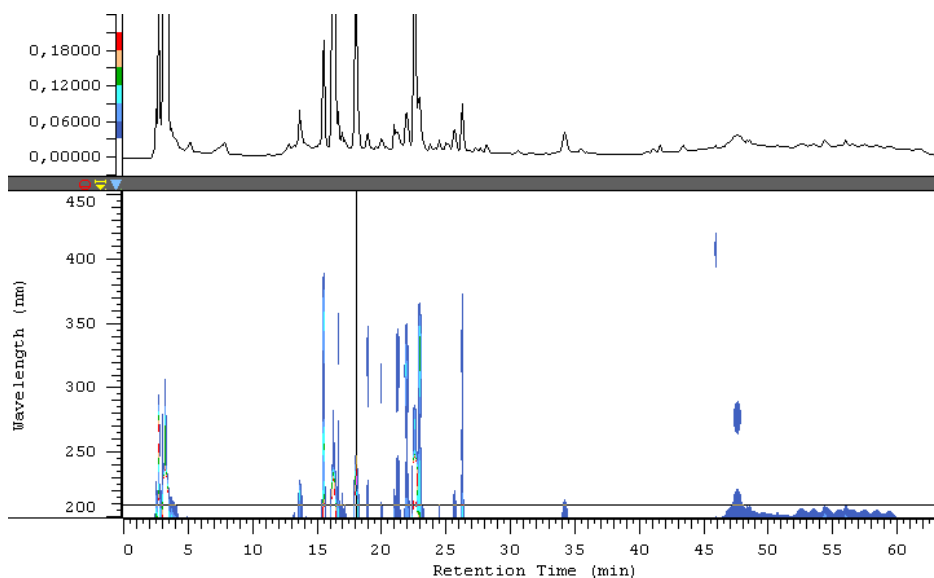


TABELA 58 – TEOR DE FENILETIL GLUCOSINOLATO

Amostra	Teor de feniletíl glucosinolato
Alcoolatura	0,623 mg/g
Droga vegetal talos e folhas (EATF)	14,4 mg/g
Extrato fluido de agrião	7,33 mg/g
Tintura de agrião	1,43 mg/mL
Extrato seco de agrião	17,4 mg/g
Xarope de agrião	0,663 mg/mL
Solução oral de agrião	0,657 mg/mL

4.3.4.3 Resultados das análises para qualificação (*fingerprint*) e semi-quantificação (>95%) de compostos fenólicos, nitrogenados e esteróides por CLAE

As amostras dos extratos analíticos foram quantificadas pela estatística da curva de cada composto e pelo espectro da biblioteca de espectros derivados dos cromatogramas das curvas das soluções padrão para qualificação e quantificação de fenólicos, nitrogenados e esteróides. Os compostos analisados justificam a composição química encontrada na literatura com vistas à finalidade terapêutica do extrato analítico como insumo para obtenção de fitoterápicos.

As curvas de fenólicos (figura 92 a 109), nitrogenados (figura 110 a 115) e esteróides (figura 116 a 121) do preparo das soluções padrão para determinação dos marcadores e qualificação por *fingerprint* dos padrões (figura 122) da amostra EATF utilizado para análise por CLAE para determinação de fenólicos (figura 123), nitrogenados (figura 124) e esteróides (figura 125) os quais apresentam-se relatados nas tabelas 59, 60 e 61 conforme publicações de GONG *et al.* (2004), SPRINGFIELD *et al.* e ZHAO *et al.*

FIGURA 92 – CROMATOGRAMA DA CURVA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO E FINGERPRINT DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

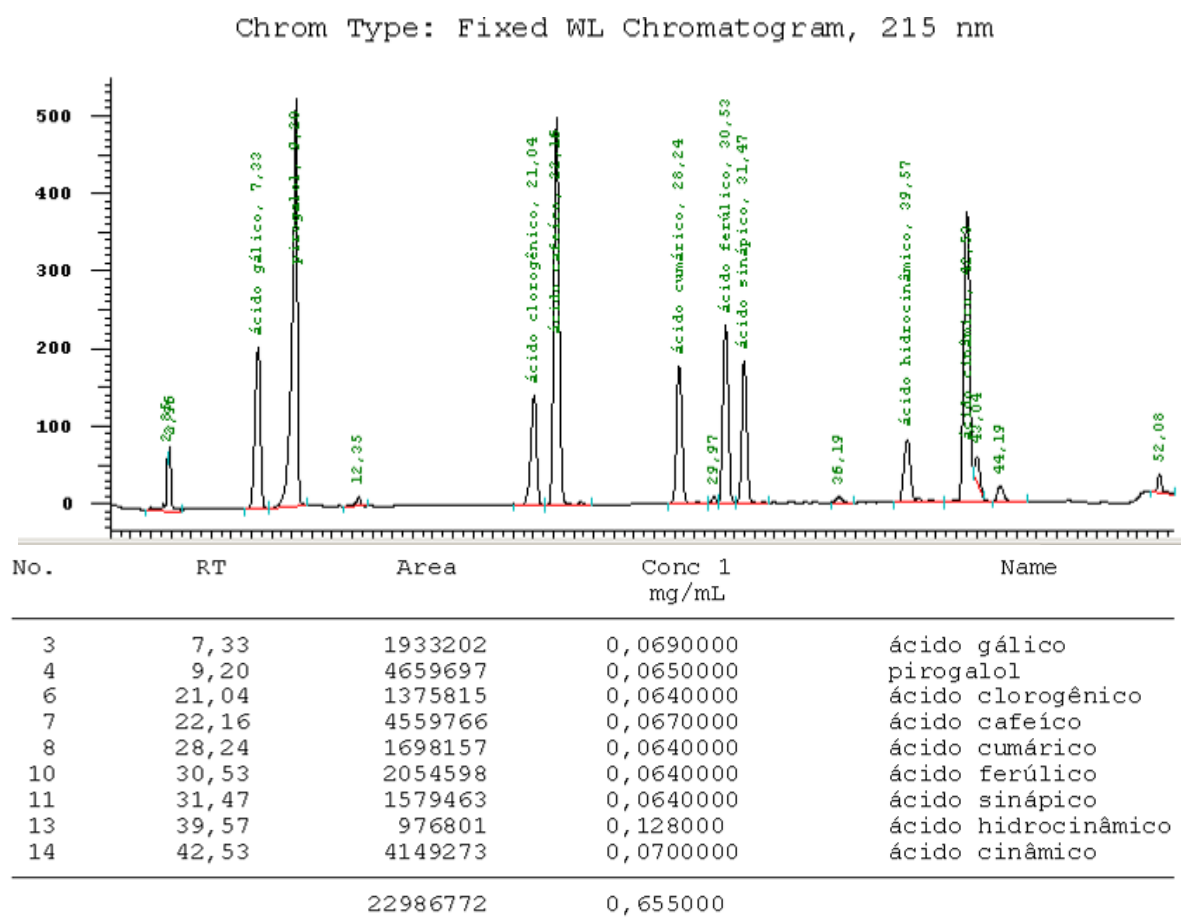


FIGURA 93 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO GÁLICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 7,60 min

$R^2 = 0,9952$

$A_0 = 0,000e+000$

$A_1 = 3,585e-008$

$A_2 = 0,000e+000$

$A_3 = 0,000e+000$

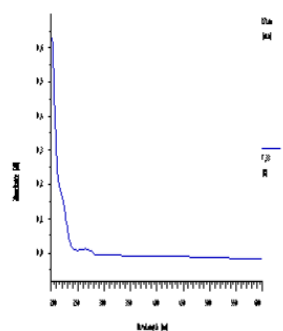


FIGURA 94 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO PIROGALOL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 9,50 min

$R^2 = 0,9973$

$A_0 = 0,000e+000$

$A_1 = 1,415e-008$

$A_2 = 0,000e+000$

$A_3 = 0,000e+000$

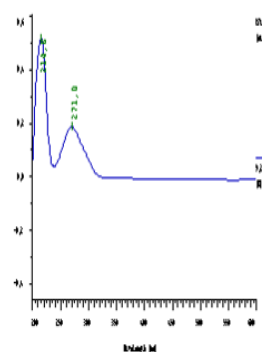


FIGURA 95 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CLOROGÊNICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 21,30 min

$R^2 = 0,9970$

$\bar{A}_0 = 0,000e+000$

$\bar{A}_1 = 4,587e-008$

$\bar{A}_2 = 0,000e+000$

$\bar{A}_3 = 0,000e+000$

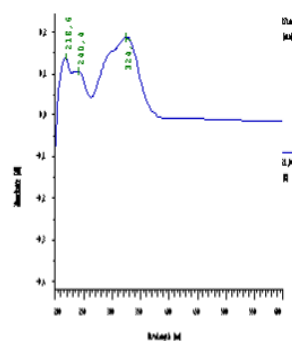


FIGURA 96 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CAFEICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 22,50 min

$R^2 = 0,9986$

$\bar{A}_0 = 0,000e+000$

$\bar{A}_1 = 1,464e-008$

$\bar{A}_2 = 0,000e+000$

$\bar{A}_3 = 0,000e+000$

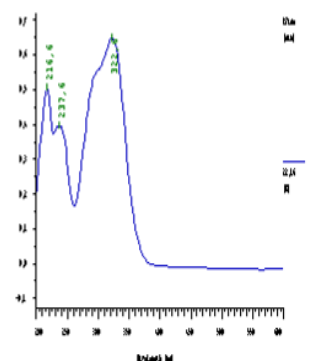


FIGURA 97 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO PARA CUMÁRICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 28,50 min

$R^2 = 0,9911$

$\bar{A}_0 = 0,000e+000$

$\bar{A}_1 = 3,784e-008$

$\bar{A}_2 = 0,000e+000$

$\bar{A}_3 = 0,000e+000$

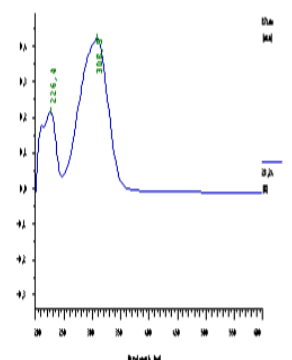


FIGURA 98 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO FERÚLICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 30,70 min

$R^2 = 0,9871$

$\bar{A}_0 = 0,000e+000$

$\bar{A}_1 = 3,194e-008$

$\bar{A}_2 = 0,000e+000$

$\bar{A}_3 = 0,000e+000$

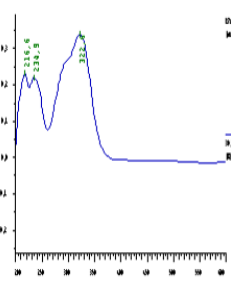


FIGURA 99 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO SINÁPICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 32,00 min

$R^2 = 0,9923$

$\bar{R}_0 = 0,000e+000$

$\bar{R}_1 = 6,337e-008$

$\bar{R}_2 = 0,000e+000$

$\bar{R}_3 = 0,000e+000$

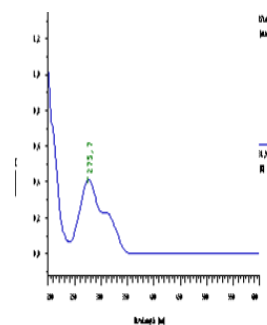


FIGURA 100 – VALORES ESTATÍSTICO CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO HIDROCINÂMICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 39,80 min

$R^2 = 0,9905$

$\bar{R}_0 = 0,000e+000$

$\bar{R}_1 = 1,301e-007$

$\bar{R}_2 = 0,000e+000$

$\bar{R}_3 = 0,000e+000$

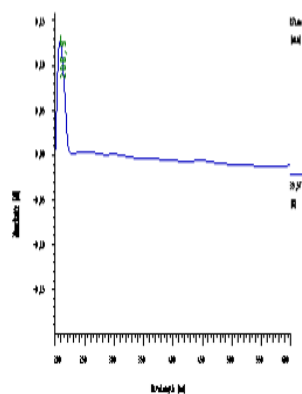


FIGURA 101 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CINÂMICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM FENILPROPANÓIDES

RT= 42,80 min

$R^2 = 0,9925$

$\bar{R}_0 = 0,000e+000$

$\bar{R}_1 = 1,710e-008$

$\bar{R}_2 = 0,000e+000$

$\bar{R}_3 = 0,000e+000$

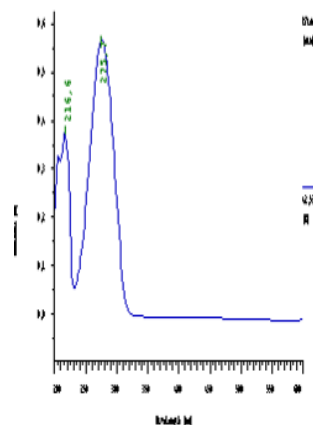


FIGURA 102 – CROMATOGRAMA DA CURVA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO E FINGERPRINT DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES

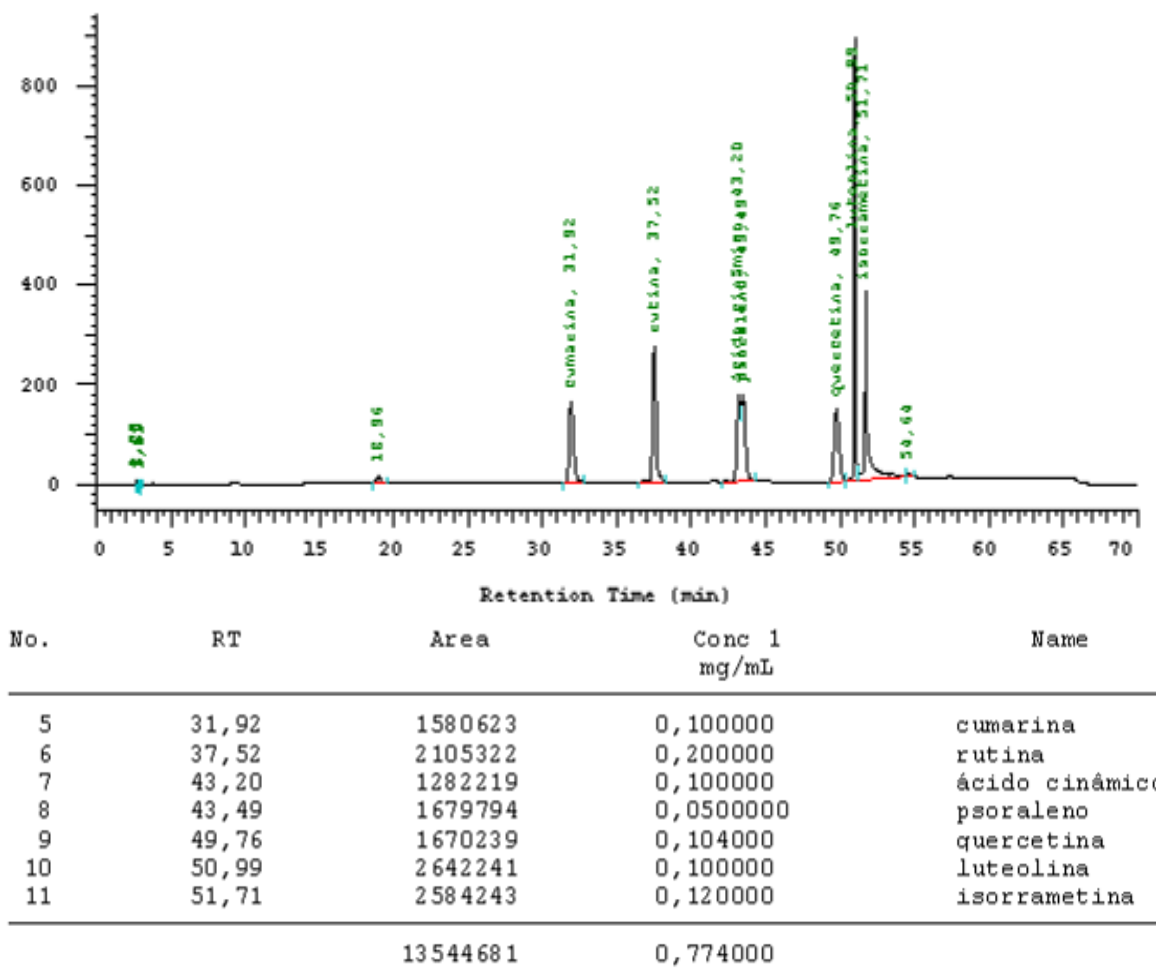


FIGURA 103 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA CUMARINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES

RT= 32,00 min

$R^2 = 0,9923$

$A_0 = 0,000e+000$

$A_1 = 6,337e-008$

$A_2 = 0,000e+000$

$A_3 = 0,000e+000$

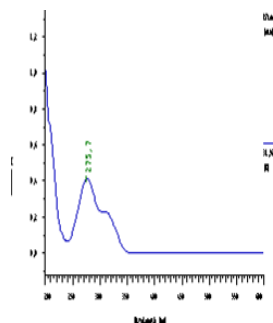


FIGURA 104 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA RUTINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES

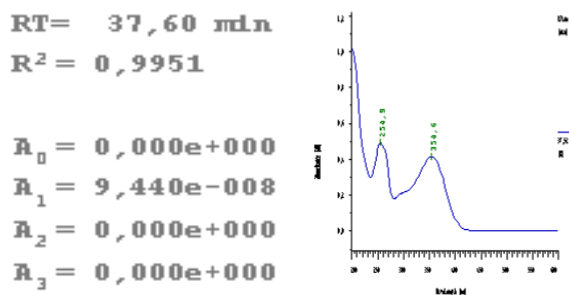


FIGURA 105 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CINÂMICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES

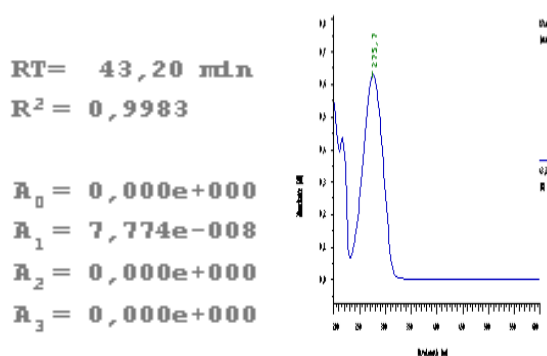


FIGURA 106 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO PSORALENO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES

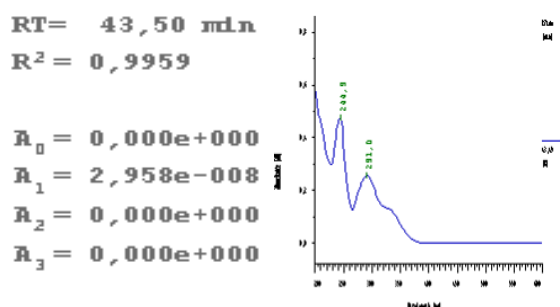


FIGURA 107 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA QUERCETINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES

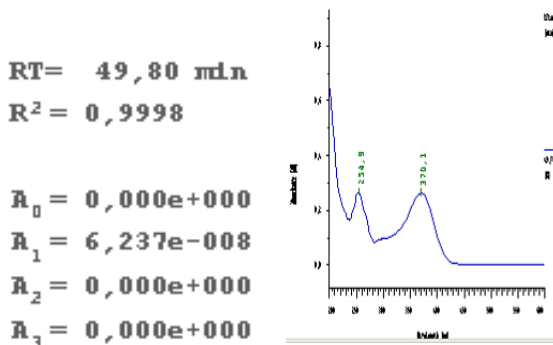


FIGURA 108 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA LUTEOLINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES

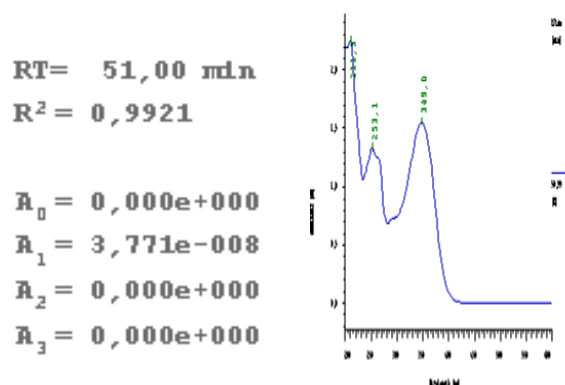


FIGURA 109 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA ISORRAMETINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS EM CUMARINAS E FLAVONÓIDES

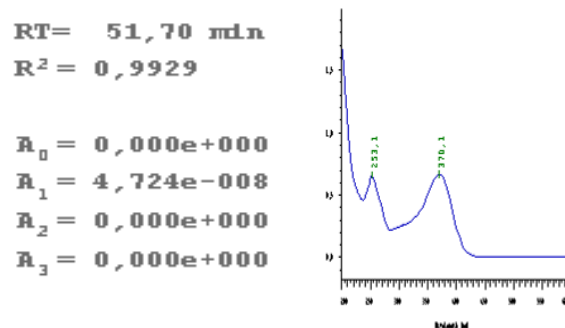
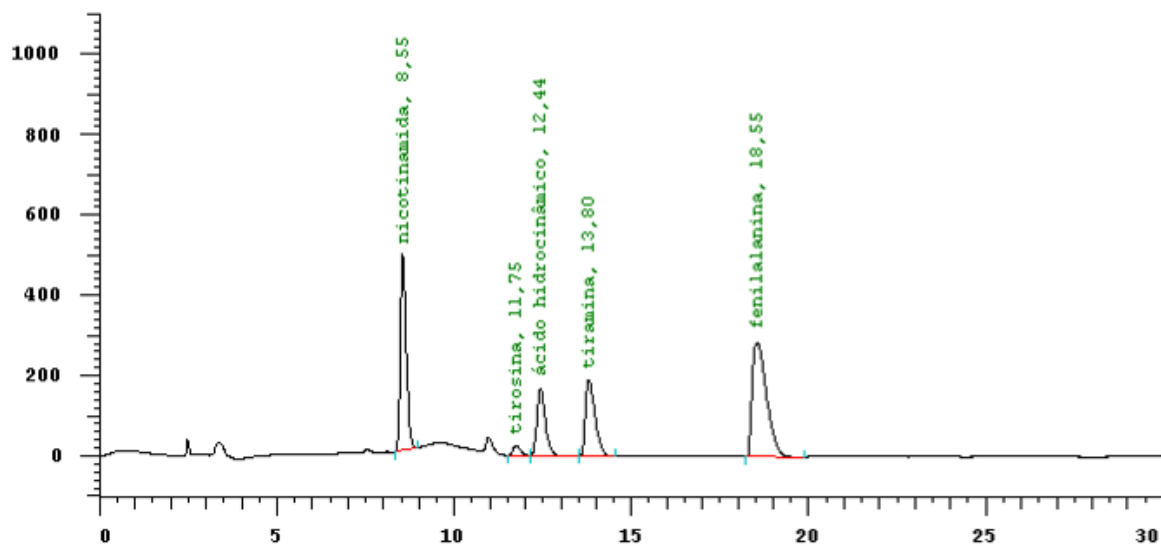


FIGURA 110 – CROMATOGRAMA DA CURVA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO E FINGERPRINT DE NITROGENADOS



No.	RT	Area	Conc 1 mg/mL	BC
1	8,55	2759416	0,0800000	BB
2	11,75	185034	0,0800000	BB
3	12,44	1375350	0,0800000	BB
4	13,80	1793281	0,0800000	BB
5	18,55	4007030	0,0800000	BB
			10120111	0,400000

FIGURA 111 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA NICOTINAMIDA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS

RT= 8,73 min

$R^2 = 0,9906$

$\bar{A}_0 = 0,000e+000$

$\bar{A}_1 = 2,900e-008$

$\bar{A}_2 = 0,000e+000$

$\bar{A}_3 = 0,000e+000$

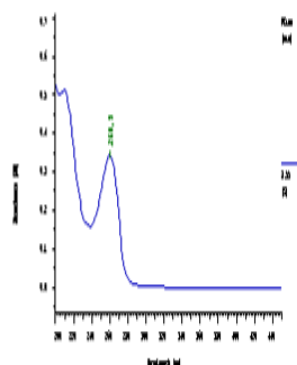


FIGURA 112 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA TIROSINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS

RT= 11,91 min

$R^2 = 0,0000$

$\bar{A}_0 = 0,000e+000$

$\bar{A}_1 = 6,383e-007$

$\bar{A}_2 = 0,000e+000$

$\bar{A}_3 = 0,000e+000$

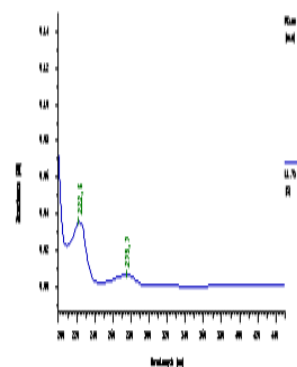


FIGURA 113 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO HIDROCIÂNICO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS

RT= 12,27 min

$R^2 = 0,9812$

$\bar{A}_0 = 0,000e+000$

$\bar{A}_1 = 6,483e-008$

$\bar{A}_2 = 0,000e+000$

$\bar{A}_3 = 0,000e+000$

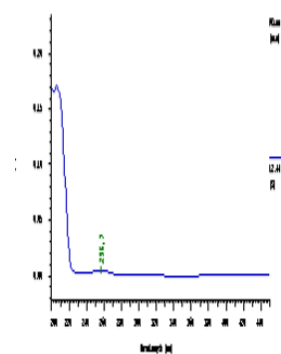


FIGURA 114 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA TIRAMINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS

RT= 13,99 min

$R^2 = 0,9989$

$\bar{A}_0 = 0,000e+000$

$\bar{A}_1 = 4,480e-008$

$\bar{A}_2 = 0,000e+000$

$\bar{A}_3 = 0,000e+000$

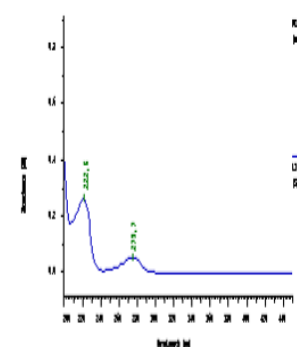


FIGURA 115 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA FENILALANINA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE NITROGENADOS

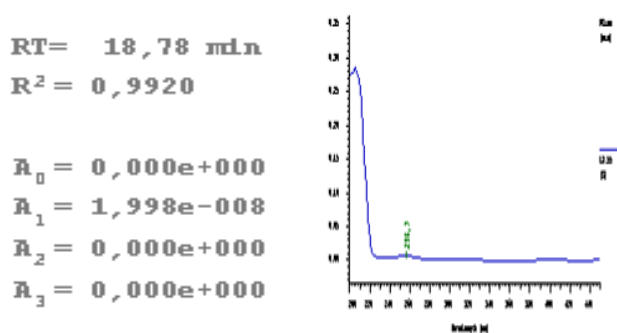
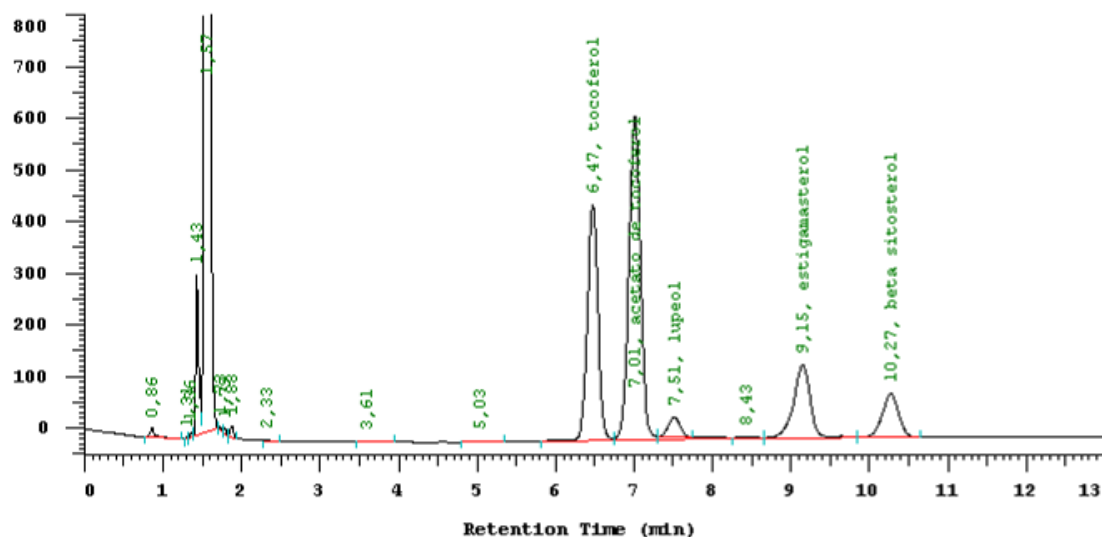


FIGURA 116 – CROMATOGRAMA DA CURVA DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO E FINGERPRINT DE ESTERÓIDES



No.	RT	Area	Conc 1 mg/mL	Name
12	6,47	2138346	0,0840000	tocoferol
13	7,01	3300378	0,1040000	acetato de tocoferol
14	7,51	189151	0,1950000	lupeol
16	9,15	1026227	0,2120000	estigamasterol
17	10,27	600467	0,2050000	beta sitosterol
		7254569	0,8000000	

FIGURA 117 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO TOCOFEROL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES

RT= 6,10 min

$R^2 = 0,9915$

$A_0 = 0,000e+000$

$A_1 = 3,958e-008$

$A_2 = 0,000e+000$

$A_3 = 0,000e+000$

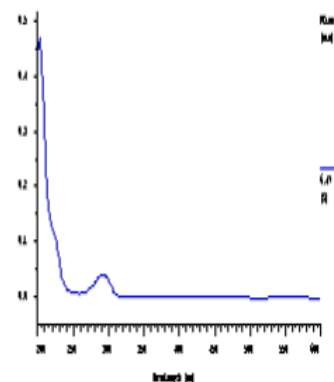


FIGURA 118 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DO ACETATO DE TOCOFEROL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES

RT= 6,85 min

$R^2 = 0,9899$

$A_0 = 0,000e+000$

$A_1 = 3,145e-008$

$A_2 = 0,000e+000$

$A_3 = 0,000e+000$

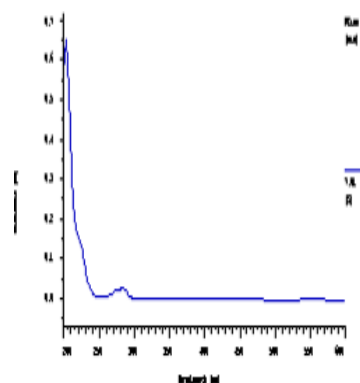


FIGURA 119 – VALORES ESTATÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA CURVA E ESPECTRO DO LUPEOL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES

RT= 7,35 min

$R^2 = 0,9874$

$A_0 = 0,000e+000$

$A_1 = 1,032e-006$

$A_2 = 0,000e+000$

$A_3 = 0,000e+000$

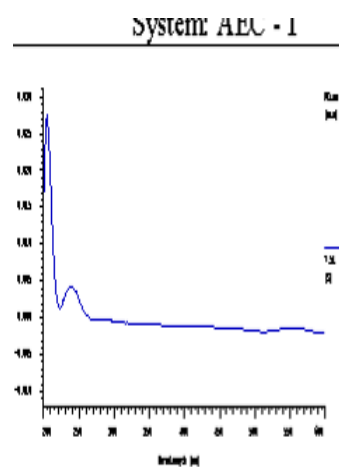


FIGURA 120 – VALORES ESTADÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA CURVA E ESPECTRO DO ESTIGMASTEROL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES

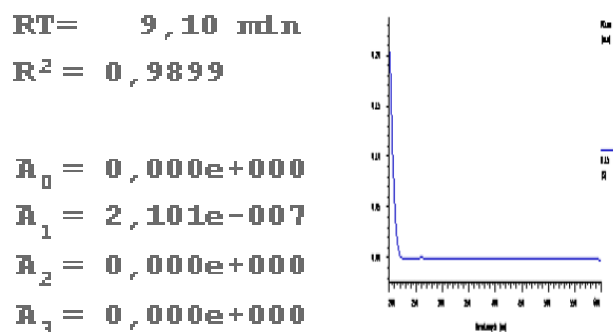


FIGURA 121 – VALORES ESTADÍSTICO DA CURVA E ESPECTRO UV DA CURVA E ESPECTRO DO BETA SITOSTEROL DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DE ESTERÓIDES

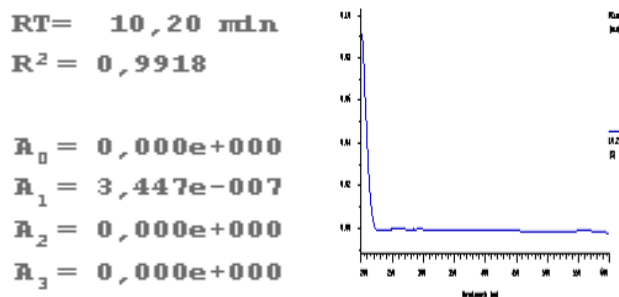


FIGURA 122 – CROMATOGRAMA E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS DO EATF

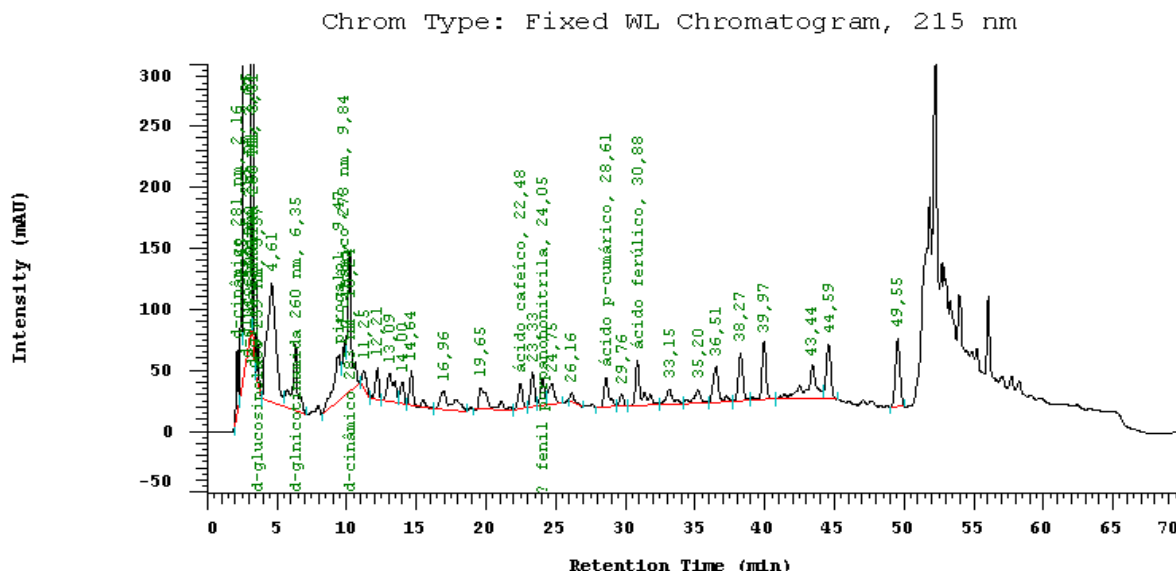


TABELA 59 – TEOR DE FENÓLICOS NO EATF

Fenólicos	Teor (mg/g)
Ácido clorogênico	0,06
Ácido cafeico	0,36
Ácido p-cumárico	0,49
Ácido ferúlico	2,74
Rutina	0,29
d-rutina ⁽¹⁾	2,26
d-rutina ⁽²⁾	1,74
d-rutina ⁽³⁾	5,26
d-rutina ⁽⁴⁾	2,07

⁽¹⁾ derivado da rutina (tr= 38,27)

⁽²⁾ derivado da rutina (tr= 39,97)

⁽³⁾ derivado da rutina (tr= 43,44)

⁽⁴⁾ derivado da rutina (tr= 44,59)

FIGURA 123 – CROMATOGRAMA E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE NITROGENADOS

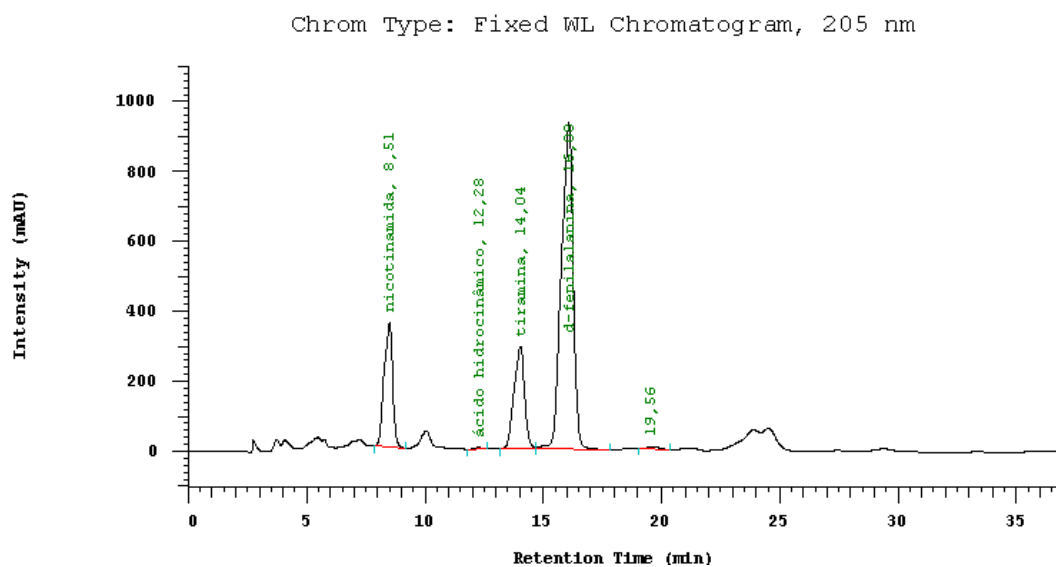


TABELA 60 – TEOR DE NITROGENADOS NO EATF

Nitrogenados	Teor (mg/g)
Nicotinamida	0,65
Tiramina	0,58
d-fenilalanina ⁽¹⁾	1,52

⁽¹⁾ derivado da fenilalanina

FIGURA 124 – CROMATOGRAMA E DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ESTERÓIDES NO EATF
Chrom Type: Fixed WL Chromatogram, 205 nm

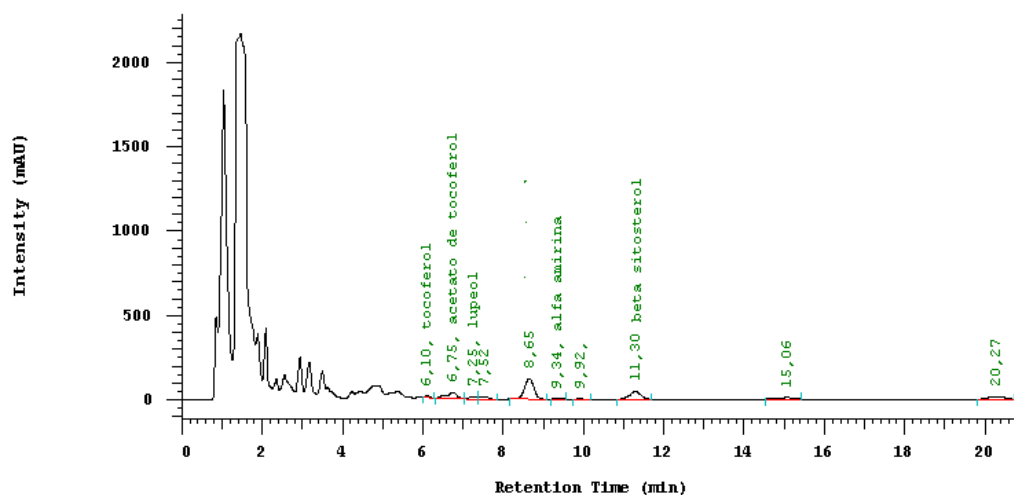


TABELA 61 – TEOR DE ESTERÓIDES NO EATF

	Teor em mg/g
Não identificado Tr=8,65	1,6
Beta sitosterol	1,3

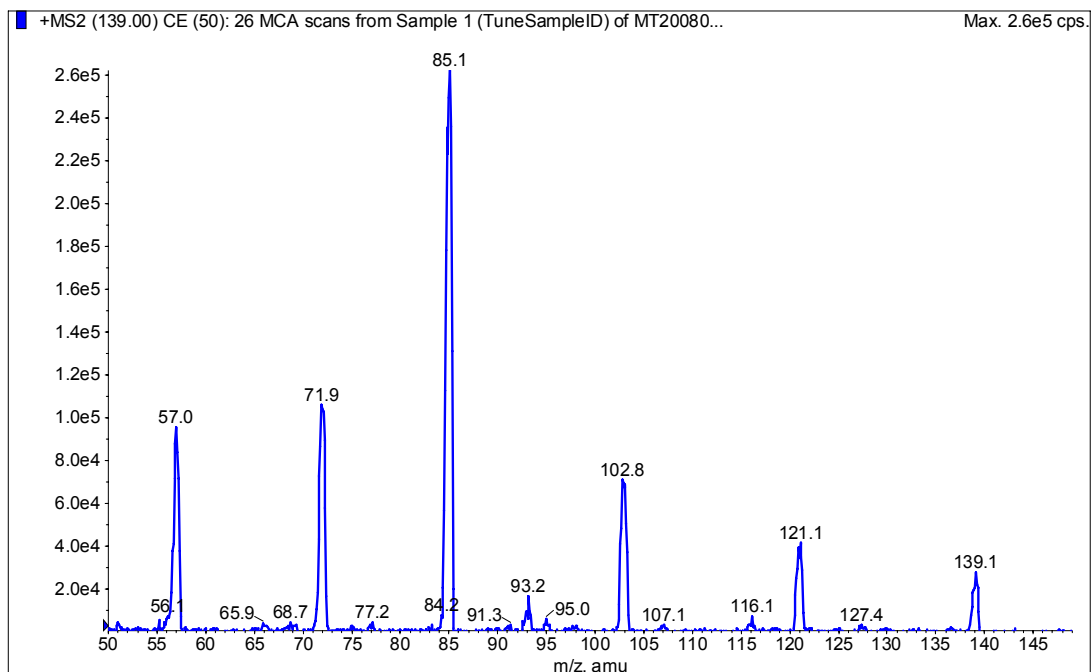
4.3.5 Análises por CLAE preparativa e avaliação por espectrometria de massa (LC-MS)

As análises foram executadas no Centro de Bioequivalência do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná.

Três frações, dentre as isoladas, foram qualificadas por comparação espectral como prováveis derivados do feniletíl glucosinato, possuindo uma correlação maior que 0,95 em comparação com o espectro do feniletíl glucosinato da biblioteca de espectros do equipamento.

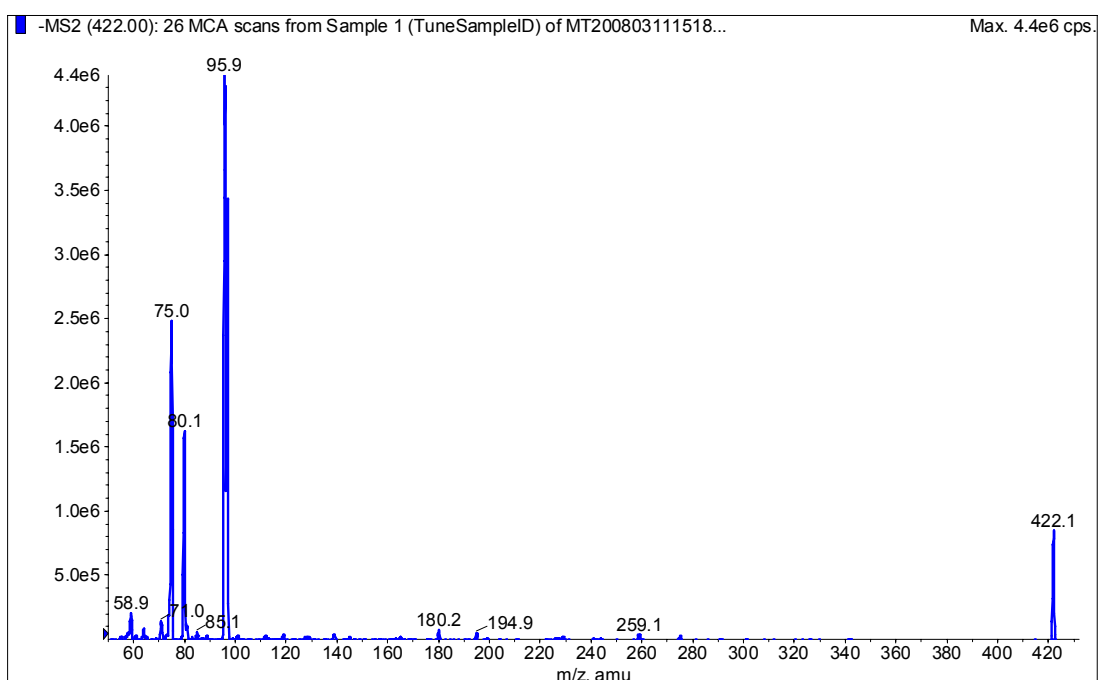
A primeira fração que foi analisada no espectrômetro de massa (modo positivo), cujo tempo de retenção foi de 17 minutos no CLAE, demonstrado na figura 125, apresentou fragmentos de um provável glucosinato derivado de uma cadeia alifática com radical propenil ou butenil de acordo com a análise espectral. Os fragmentos encontrados apontam para derivados de glucosinatos com íons fragmentados de nitrila e isotiocianato, contudo esse composto não foi claramente identificado.

FIGURA 125 – ESPECTRO DE MASSAS DA FRAÇÃO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 17 MINUTOS



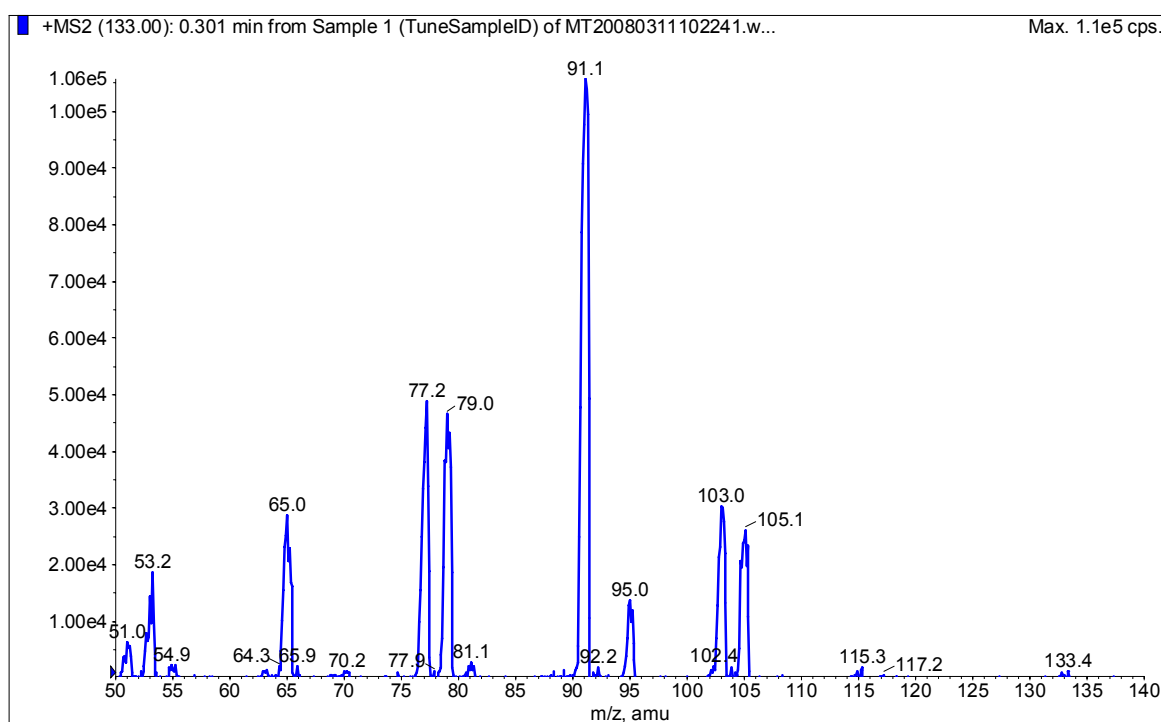
A segunda fração que foi analisada no espectrômetro de massa (modo negativo), cujo tempo de retenção foi de 22 minutos no CLAE, demonstrado na figura 126, apresentou fragmentos característicos do feniletil glucosinolato. Pode-se inferir nesse sentido, pois se observou a presença do íon molecular 422 (m/z) dentre outros demonstrados teoricamente na figura 34. O composto também foi qualificado pela metodologia da validação analítica.

FIGURA 126 – ESPECTRO DE MASSAS DA FRAÇÃO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 22 MINUTOS



A terceira fração que foi analisada no espectrômetro de massa (modo positivo), cujo tempo de retenção foi de 27 minutos no CLAE, demonstrado na figura 127, apresentou fragmentos característicos da decomposição do feniletil glucosinolato, sendo qualificada como fenilpropionitrila. Pode-se inferir nesse sentido, pois se observou a presença do íon molecular 133,4 (m/z) dentre outros demonstrados teoricamente na figura 34, como os fragmentos 77, 91, 103 e 105 (m/z).

FIGURA 127 – ESPECTRO DE MASSA DA FRAÇÃO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 27 MINUTOS



4.3.6 Análises qualitativas por UV/VIS

De todas as 17 frações obtidas por purificação em sílica e Sephadex-LH-20 chegou-se a um total de 7 frações finais obtidas (fração 1 a 7) no item 3.5.4.4.1., cujos espectros UV estão demonstrados na figura 129.

Primeiramente verificou-se, conforme figura 128, a resolução necessária para a separação em coluna Sephadex LH 20, utilizando os compostos de referência, rutina e quercetina, segundo JOHNSTON (1968).

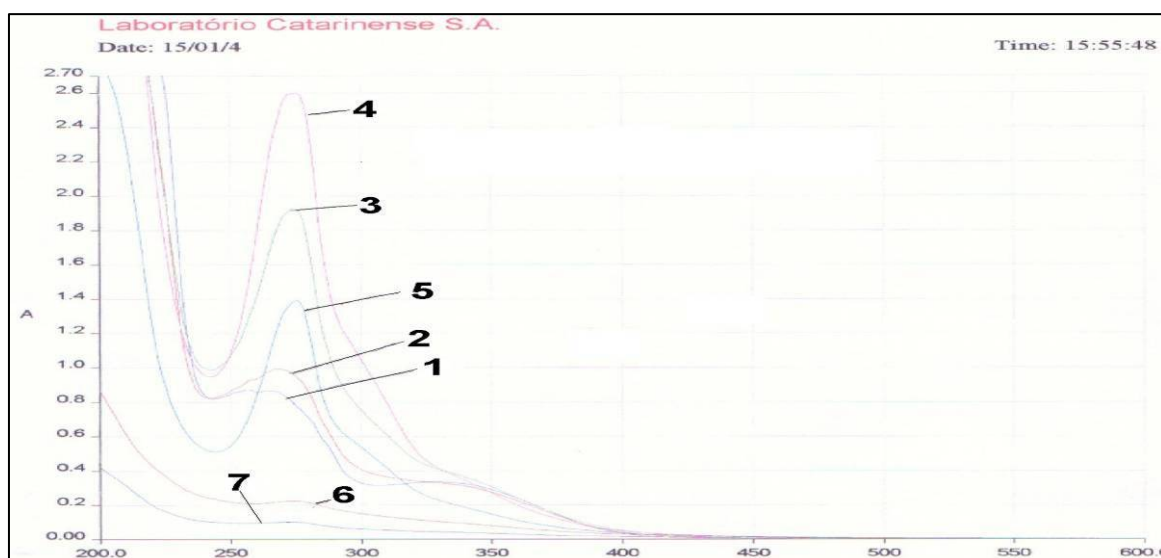
Nesta verificação observa-se que na 5ª fração, contendo rutina (flavonóide glicosilado), após 25 mL de solvente percolado, apresentou espectro UV característico (MARBY, 1970) e na 9ª fração obteve-se a quercetina (composto aglicona), após 33 mL de solvente percolado, que apresentou espectro UV característico segundo (MARBY, 1970).

FIGURA 128 – ANÁLISE, POR ESPECTROFOTOMETRIA UV, DAS REFERÊNCIAS RUTINA E QUERCETINA OBTIDAS NO PARTIÇÃOAMENTO POR SEPHADEX LH 20



As frações de 1 a 7 (figura 129) foram analisadas por UV e apresentam o provável gluconasturtium na sua composição, apenas variando a sua concentração e na presença de impurezas, devido à sobrecarga de amostra complexa em relação à massa de Sephadex-LH20.

FIGURA 129 – ANÁLISE, POR ESPECTROFOTOMETRIA UV, DAS FRAÇÕES 1 A 7 OBTIDAS NO PARTIÇÃOAMENTO POR SEPHADEX LH 20



Dessas 7 frações, a fração 5 foi analisada por CLAE (figura 130 e 131) e apresentou pureza superior a 85% do provável gluconasturtium, porém não foi purificada, pois houve a aquisição do padrão analítico comercial (LKT Laboratório), tornando desnecessária a continuidade do processo de purificação.

FIGURA 130 – PERFIL POR UV DA FRAÇÃO 66 OBTIDA DA FRAÇÃO ETANÓLICA 85% DO EXTRATO OBTIDO POR PARTICIONAMENTO DIRETO EM APARELHO SOXHLET MODIFICADO NA COLUNA XTERRA TM

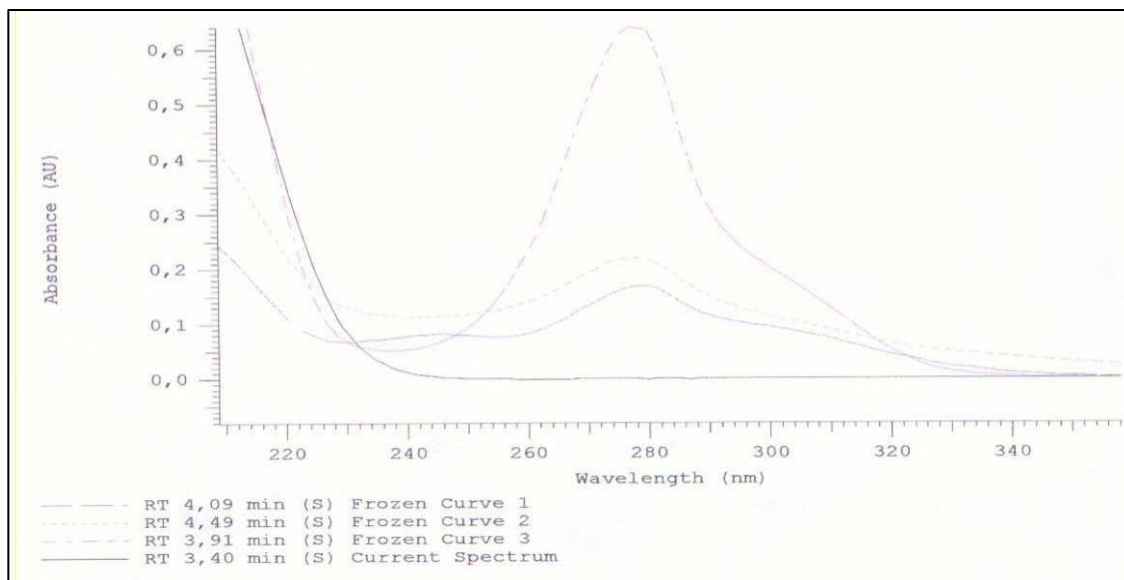
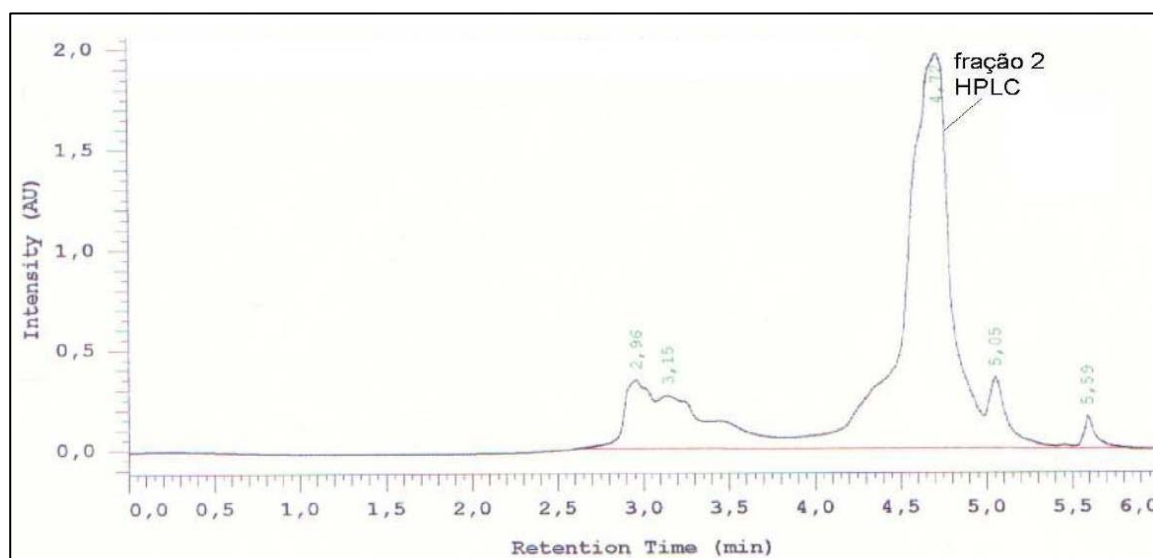


FIGURA 131 – PERFIL POR CLAE DA FRAÇÃO 66 OBTIDA DA FRAÇÃO ETANÓLICA 85% DO EXTRATO OBTIDO POR PARTICIONAMENTO DIRETO EM APARELHO SOXHLET MODIFICADO NA COLUNA XTERRA TM



4.3.7 Análises qualitativas por IR

A análise da suspensão do precipitado da 5ª fração, obtida no item 3.5.4.4.1., foi realizada em paralelo com o padrão de sinigrin (propenil glucosinolato) para análise em conjunto do grupo funcional glucosinolato.

A análise espectral da 5ª fração (figura 132), comparada com o padrão de sinigrin (figura 133) em conjunto com o espectro do etil benzeno da biblioteca NIST (figura 134), demonstrou, pela análise das bandas de absorção, que a amostra é o provável gluconasturtium (feniletíl glucosinolato), segundo SILVERSTEIN (1994).

FIGURA 132 – ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE IR DA SUSPENSÃO DO PRECIPITADO

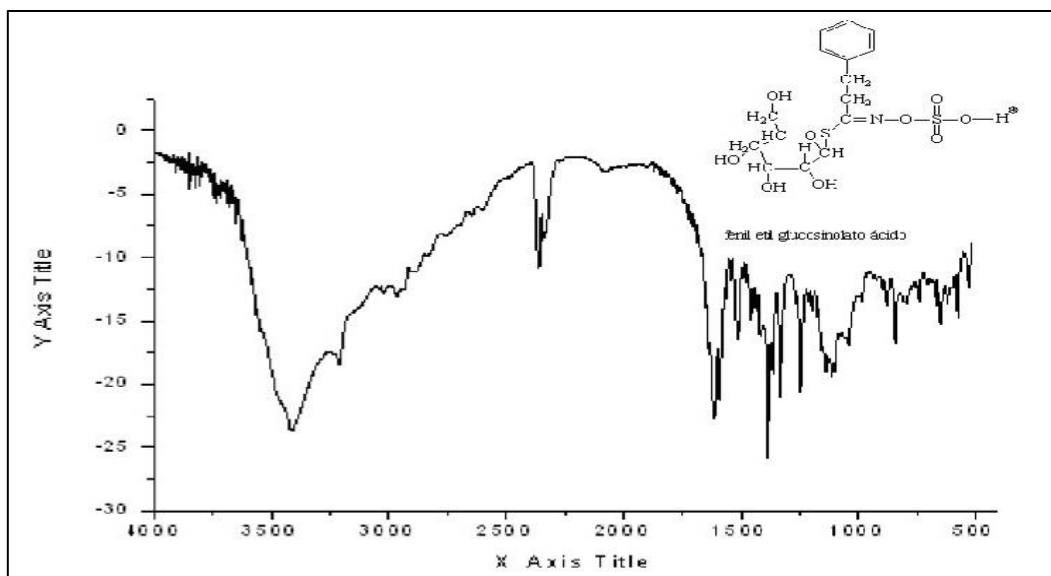


FIGURA 133 – ANÁLISE POR ESPECTROFOTOMETRIA DE IR DO SINIGRIN

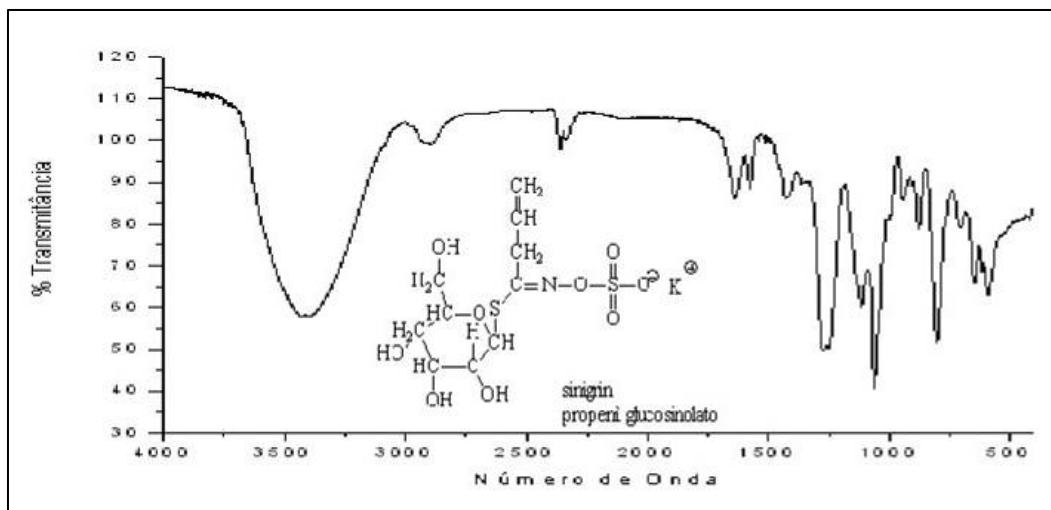
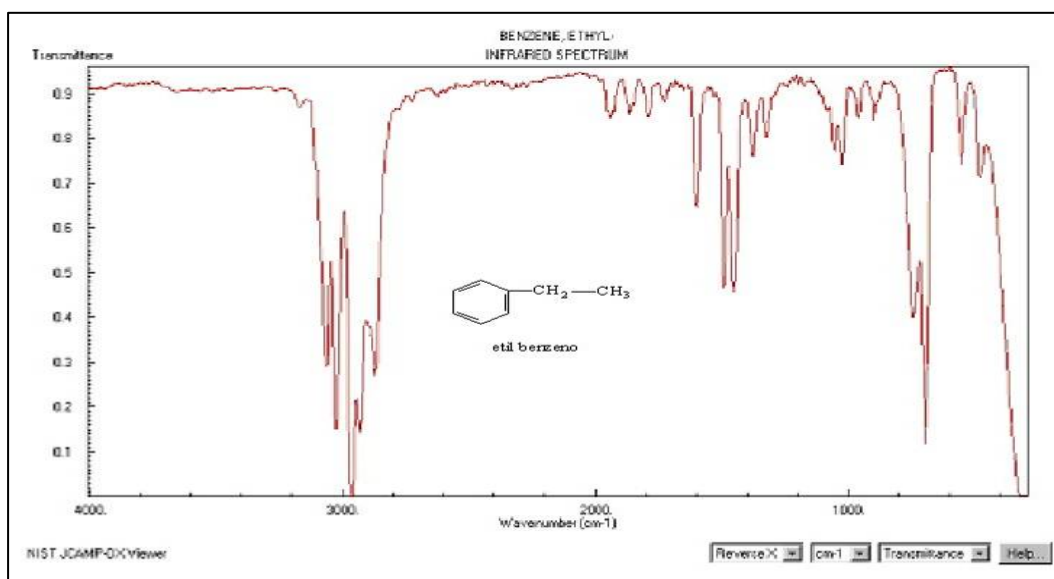


FIGURA 134 – ESPECTRO DE IR DA NIST DO ETIL BENZENO



4.4 TRATAMENTO DO RESÍDUO SECO

4.4.1 Determinação gravimétrica de perda em mufla, no resíduo da droga vegetal estabilizada

A droga vegetal depois de submetida à extração, o resíduo foi seco em estufa com ventilação a 70°C a fim de esgotar o solvente extrator, sendo controlado a secagem por perda a 105°C até atingir uma perda inferior a 5%.

Após a obtenção do resíduo seco, este foi submetido à trituração em moinho de martelo com tela de 0,4 mm e envasado em sacos plásticos de polipropileno para isolamento da umidade ambiente. Para as análises físico-químicas e microbiológica, foram coletadas amostras a fim de obter um insumo denominado suporte matricial para extrato seco, este derivado da própria droga vegetal, apresenta o elenco residual da mesma composição química orgânica e inorgânica.

Considerando os resultados obtidos na composição mineral (química inorgânica) decorrente da análise de metais em macro e micronutrientes.

Os resultados das análises, nos três tipos de resíduo da droga vegetal obtidos, resíduo de talos e folhas (RDVTF), resíduo de folhas (RDVF) e resíduo de talos (RDVT), apresentou-se em porcentual, na tabela 62, para cada patamar de temperatura.

TABELA 62 – RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA PERDA GRAVIMÉTRICA EM MUFLA PARA OS RESÍDUOS DA DROGA VEGETAL ESTABILIZADA

Droga vegetal	45°C (%)	105°C (%)	250°C (%)	450°C (%)	675°C (%)
RDVTF	4,48	10,85	53,33	84,14	85,51
RDVF	6,65	11,09	48,62	83,40	85,75
RDVT	4,25	11,93	58,06	86,12	87,04

4.5 DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO

4.5.1 Extrato Fluído Padronizado de Agrião

O extrato fluído padronizado de agrião foi submetido às análises organolépticas, físico-químicas e microbiológica e todas atenderam as necessidades para o registro da ANVISA RDC 48 (2004). Os resultados das análises constam nas tabelas 63 a 66.

TABELA 63 – ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS DO EPTF

Parâmetro	Especificação	Resultado
Cor	Marrom esverdeado	Conforme
Odor	Característico	Conforme
Sabor	Amargo	Conforme

TABELA 64 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO EPTF

Parâmetro	Especificação	Resultado
pH	4,0 – 6,0	4,95
Teor alcoólico	55 – 75 °GL	66 °GL
Densidade	0,800 – 1,000 g/mL	0,640 g/mL
Resíduo seco	30,0 – 36,0 %	33,2 %

TABELA 65 – DOSEAMENTO DO EPTF

Marcador	Especificação	Resultado
Feniletíl glucosinolato	7,22 mg/mL ± 0,722	7,33 mg/mL

TABELA 66 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO EPTF

Análises realizadas	Limite máximo	Resultados
Contagem total de bactérias mesófilas	10 ³ UFC/ mL	< 1UFC/mL
Contagem de bolores e leveduras	10 ² UFC/ mL	< 1UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente
<i>Salmonella</i> sp	Ausência	Ausente
<i>Shigella</i> sp	Ausência	Ausente

4.5.2 Tintura de Agrião

A Tintura de Agrião foi submetida às análises organolépticas, físico-químicas e microbiológica e todas atenderam as necessidades para registro da ANVISA RDC 48 (2004). Os resultados das análises constam nas tabelas 67 a 70.

TABELA 67 – ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS DA TINTURA DE AGRIÃO

Parâmetro	Especificação	Resultado
Cor	Marrom esverdeado	Conforme
Odor	Característico	Conforme
Sabor	Amargo	Conforme

TABELA 68 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA TINTURA DE AGRIÃO

Parâmetro	Especificação	Resultado
pH	4,0 – 6,0	4,92
Teor alcoólico	55 – 75 °GL	66 °GL
Densidade	0,800 – 1,000 g/mL	0,893 g/mL
Resíduo seco	1,0 – 5,0 %	4,96 %

TABELA 69 – DOSEAMENTO DA TINTURA DE AGRIÃO

Marcador	Especificação	Resultado
Feniletil glucosinolato	1,44 mg/mL ± 0,144	1,43 mg/mL

TABELA 70 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DA TINTURA DE AGRIÃO

Análises realizadas	Limite máximo	Resultados
Contagem total de bactérias mesófilas	10 ³ UFC/ mL	< 1UFC/mL
Contagem de bolores e leveduras	10 ² UFC/ mL	< 1UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente
<i>Salmonella sp</i>	Ausência	Ausente
<i>Shigella sp</i>	Ausência	Ausente

4.5.3 Padronização do suporte sólido para uso farmacotécnico e alimentício

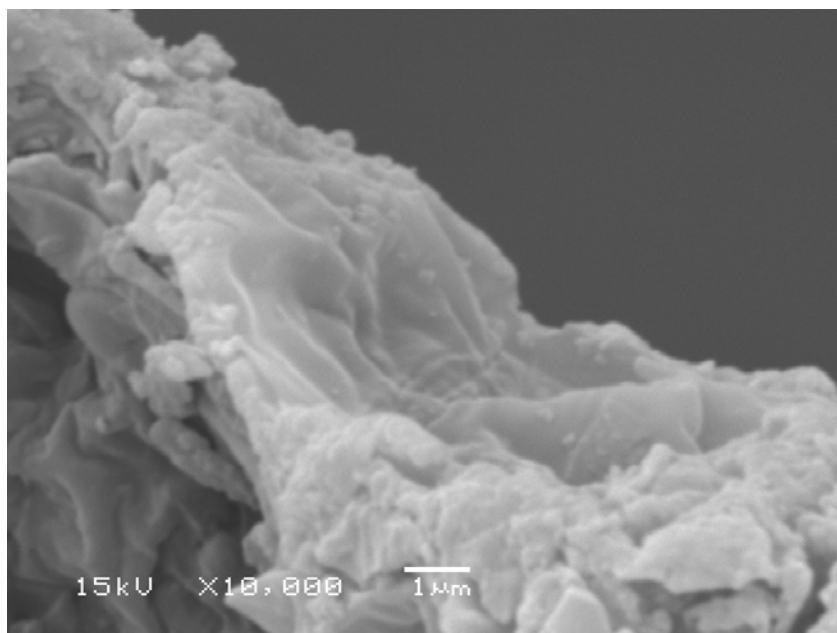
Os fragmentos do suporte matricial foram submetidos à determinação granulométrica de acordo a FARMACOPÉIA BRASILEIRA 4^a ed. 1988 (F.B. 1988). Os ensaios foram realizados em quadruplicata. A determinação da granulometria da droga vegetal obtida indicou, segundo Farm. Brás. IV. 1988, tratar-se de pó moderadamente grosso e semi-fino.

O resultado da padronização granulométrica consta na tabela 63 e figura 135. Analisando os resultados obtidos a partir da análise do resíduo da droga vegetal, pode-se propor a obtenção de um produto fitoterápico, contendo também fibras e minerais oriundos da própria droga vegetal, auxiliando na liberação prolongada do extrato quando incorporado neste.

TABELA 71 – RESULTADOS DA PADRONIZAÇÃO GRANULOMÉTRICA DO SUPORTE SÓLIDO

Abertura nominal (µm)	Determinações			
	A (g) ^(a)	B (g) ^(b)	C (g) ^(c)	D (g) ^(d)
1700	--	--	--	--
710	19,13	17,06	18,33	18,25
355	33,85	33,79	34,70	32,67
250	18,04	18,78	19,59	19,38
180	12,60	13,05	11,81	12,30
125	7,57	8,21	7,31	8,27
<125	8,59	8,97	8,02	9,01
Total	99,78	99,86	99,76	99,88

FIGURA 135 – ANÁLISE MICROSCÓPICA DO SUPORTE SÓLIDO



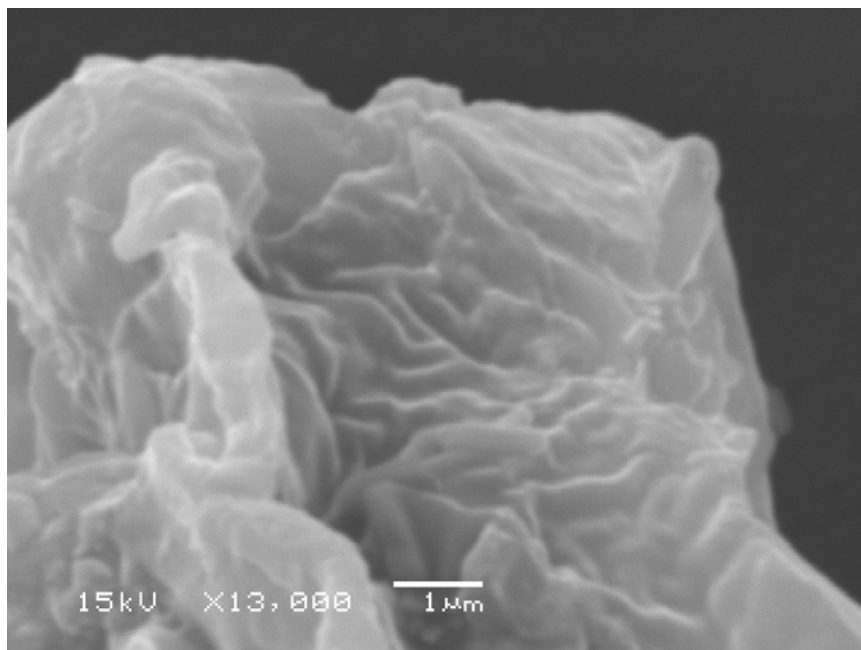
4.5.4. Extrato seco de agrião

O extrato seco padronizado de talos e folhas (figura 136) teve a finalidade de obter um extrato seco 20:1, 1 grama de extrato é equivalente a 25 g de planta verde e com resultados efetivos, em relação à quantidade de droga vegetal, por não conter açúcares oriundos do amido ou outros derivados comumente utilizado para absorção e adsorção de extratos. Tais testes apresentaram qualidade microscópica (figura 135), pela microabsorção e microadsorção por saturação do extrato fluído de agrião no suporte matricial, até obter de um de teor de 18 mg/g de feniletil glucosinolato e sendo denominado extrato seco de agrião.

FIGURA 136 – PREPARO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE AGRIÃO



FIGURA 137 – MICROSCOPIA DO EXTRATO SECO PADRONIZADO DE AGRIÃO



4.5.5 Cápsulas com extrato seco padronizado de agrião

As cápsulas da figura 138 foram produzidas com extrato padronizado de talos e folhas e suporte estabilizado do resíduo da droga vegetal, com a finalidade de obter uma cápsula totalmente natural. As cápsulas apresentaram uma proporcionalidade de 400 mg de conteúdo, equivalente a 10 g de planta verde que corresponde 1 g de droga vegetal com teor de 7,1 mg/cps de feniletíl glucosinolato. O produto não contém açúcares, caracterizando um processo eficiente na obtenção da forma farmacêutica em estudo.

FIGURA 138 – CÁPSULAS DE EXTRATO SECO PADRONIZADO DE AGRIÃO



4.5.6 Xarope de Agrião

O xarope de agrião foi submetido às análises organolépticas, físico-químicas e microbiológica e todas atenderam as necessidades para registro da ANVISA RDC 48 (2004).

Os resultados das análises constam nas tabelas 72 a 75.

TABELA 72 – ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS DO XAROPE DE AGRIÃO

Parâmetro	Especificação	Resultado
Cor	Caramelo claro	Conforme
Odor	Característico	Conforme
Sabor	Doce	Conforme

TABELA 73 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO XAROPE DE AGRIÃO

Parâmetro	Especificação	Resultado
pH	4,0 -5,0	4,28
Densidade	1,310 – 1,350 g/mL	1,341 g/mL
Resíduo seco	70 – 80 %	70,7 %
Viscosidade	120 a 180 cp à 20°C	131 cp

TABELA 74 – DOSEAMENTO DO XAROPE DE AGRIÃO

Marcador	Especificação	Resultado
Feniletil glucosinolato	0,72 mg/mL ± 0,072	0,663 mg/mL

TABELA 75 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA DO XAROPE DE AGRIÃO

Análises realizadas	Limite máximo	Resultados
Contagem total de bactérias mesófilas	10 ³ UFC/ mL	< 1UFC/mL
Contagem de bolores e leveduras	10 ² UFC/ mL	< 1UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente
<i>Salmonella sp</i>	Ausência	Ausente
<i>Shigella sp</i>	Ausência	Ausente

4.5.7 Solução oral de Agrião

A solução oral de agrião foi submetida às análises organolépticas, físico-químicas e microbiológica e todas atenderam as necessidades para registro da ANVISA RDC 48 (2004).

Os resultados das análises constam nas tabelas 76 a 79.

TABELA 76 – ANÁLISES ORGANOLÉPTICAS DA SOLUÇÃO ORAL DE AGRIÃO

Parâmetro	Especificação	Resultado
Cor	Caramelo claro	Conforme
Odor	Característico	Conforme
Sabor	Doce	Conforme

TABELA 77 – ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS SOLUÇÃO ORAL DE AGRIÃO

Parâmetro	Especificação	Resultado
pH	4,0 -5,0	4,54
Densidade	1,040 – 1,060 g/mL	1,046 g/mL
Resíduo seco	10 - 20 %	12,9%
Viscosidade	120 a 180 cp a 20°C	127 cp
Volume médio	100 mL± 2%	100 mL

TABELA 78 – DOSEAMENTO SOLUÇÃO ORAL DE AGRIÃO

Marcador	Especificação	Resultado
Feniletíl glucosinolato	0,72 mg/mL ± 0,072	0,657 mg/mL

TABELA 79 – ANÁLISE MICROBIOLÓGICA SOLUÇÃO ORAL DE AGRIÃO

Análises realizadas	Limite máximo	Resultados
Contagem total de bactérias mesófilas	10 ³ UFC/ mL	< 1UFC/mL
Contagem de bolores e leveduras	10 ² UFC/ mL	< 1UFC/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausente
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausente
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausente
<i>Salmonella sp</i>	Ausência	Ausente
<i>Shigella sp</i>	Ausência	Ausente

4.5.8 Solução para bochecho (colutório) de Agrião

A solução de bochecho de agrião contendo 5 % de extrato fluido de Agrião, com teor de 0,36 mg/mL de feniletíl glucosinolato. O colutório foi preparado e submetido a um ensaio *in vivo*, o qual deu origem a uma tese de doutorado na qual se verificou a ação do colutório de agrião no controle de placa dentária quando comparada a solução colutória de 0,2 % digluconato de clorexidine (referência padrão) e solução placebo contendo água, twen, corante e aromatizante. Estes foram relatados na tese de BUFFON 2005.

4.5.9 Pastilhas com extrato fluído e extrato seco de agrião

As pastilhas da figura 139 foram produzidas com a finalidade de obter uma pastilha totalmente natural. Estas apresentaram uma proporcionalidade de 5 g de conteúdo, equivalente a 5 g de planta verde. Ambas as formulações apresentaram as mesmas propriedades organolépticas em relação à quantidade de planta presente na pastilha. Entretanto, a obtenção da pastilha utilizando extrato seco de agrião possui melhor condicionamento para obtenção das mesmas em escala industrial, devido não conter solvente extrator na formulação.

FIGURA 139 – PASTILHAS DE AGRIÃO



4.6 PROCESSO SOXHLET COM EXTRATOR DE PLANTAS MEDICINAIS AFINS (PI 0601703-7 A)

A fusão dos equipamentos das figuras 140-A e 140-B forneceram a tecnologia para a construção do extrator industrial (PI 0601703-7 A), conforme figura 141, com capacidade entre 50 kg a 200 kg de material vegetal, de acordo com a densidade aparente da droga vegetal.

FIGURA 140 – FIGURAS PARA EXEMPLIFICAR O PROCESSO INDUSTRIAL DESENVOLVIDO

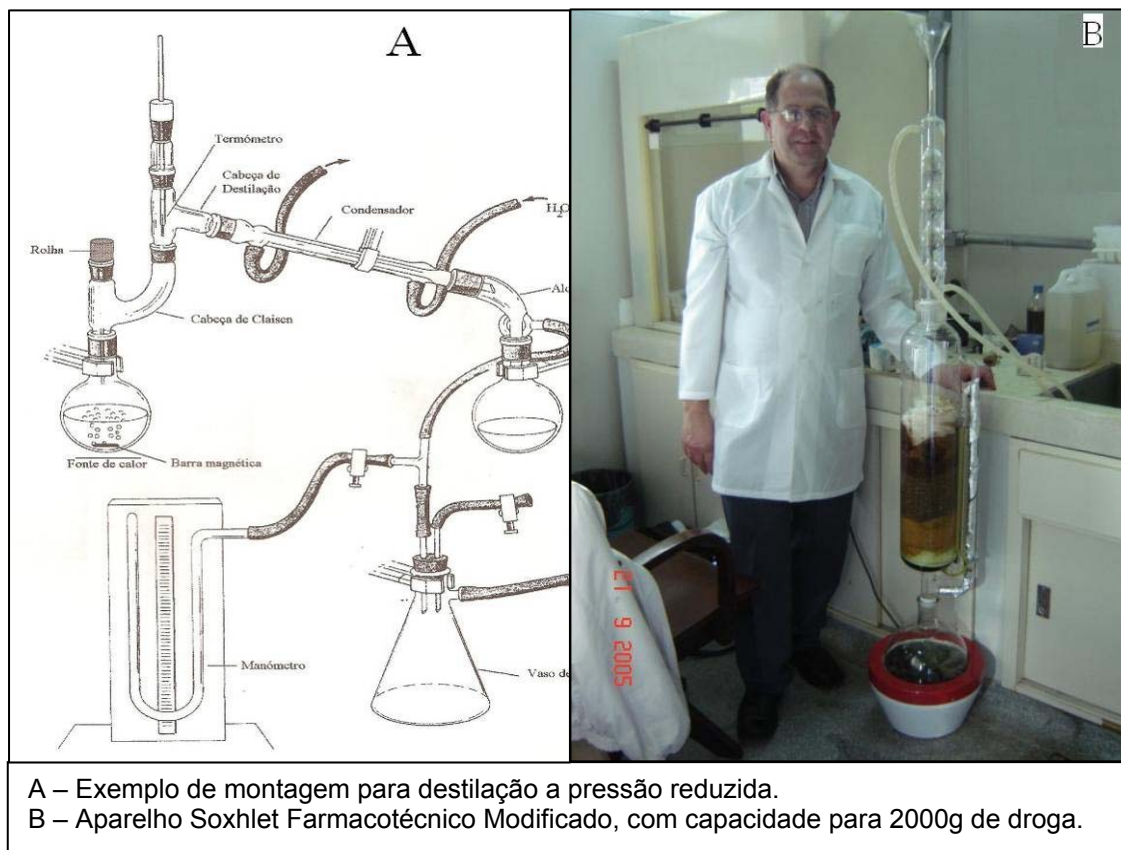


FIGURA 141 – EXTRATOR INDUSTRIAL (PI 0601703-7 A)



5 CONCLUSÕES

O material vegetal *in natura*, utilizado neste estudo para o preparo de alcoolatura e transformação em droga vegetal, apresenta um alto teor de umidade (93-94%) e baixa densidade aparente ($d \approx 0,2$ g/mL), necessitando um grande volume de solvente extrator para obter a solução na forma de alcoolatura, contudo apresentando baixo teor de ativos. Esse teor de ativos, na alcoolatura, não atenderia às quantidades preconizadas na literatura, tornando inviável o desenvolvimento de produtos.

O processo de secagem do agrião necessita ser rápido, para não haver decomposição dos glucosinolatos e demais compostos susceptíveis à hidrólise.

A secagem do material deve ocorrer em duas etapas: a primeira com auxílio de ventilação forçada em estufa industrial com aquecimento a 70°C, desse modo obtém-se o deslocamento do equilíbrio de pressão de evaporação até que o material atinja 30% de umidade; a segunda etapa, necessariamente, consiste em submeter o material a uma ventilação branda à temperatura de 45°C, em estufa industrial, obtendo-se então a droga vegetal estabilizada com melhor qualidade físico-química. Portanto o processo de secagem complementa a estabilização do metabolismo final do material vegetal confirmando dados apresentados por (LYON, 2006)

Concluiu-se que para cada 15 kg de vegetal *in natura* obtém-se 1 kg de droga vegetal. Comparando-se em volume obtém-se 30 litros de alcoolatura e 1 litro de extrato fluido derivado da droga vegetal.

A referida tecnologia de secagem e estabilização de acordo com os parâmetros apresentados foi possível validar.

A alcoolatura apresentou 70% de rendimento em volume cuja composição química apresentou-se a mesma dos extratos, contudo a fórmula porcentual foi diferente.

Quanto à obtenção dos extratos, conclui-se que os extratos EPF e EPTF, obtidos com etanol (81% V/V), apresentaram composição química semelhante, porém fórmula porcentual variável; e o extrato EPF quando comparado ao extrato EPT, apresentaram composição química diferenciada.

Os resultados evidenciaram que para produção de fitoterápicos deve-se utilizar o extrato de EPTF por apresentar a maior gama de compostos naturais, uma vez que utiliza-se a planta por inteiro, obtendo um melhor aproveitamento do material vegetal, seguindo, inclusive, o recomendado pela literatura consultada.

Dentre os processos extrativos relatados, o sistema Soxhlet, que utiliza renovação de solvente demonstrou melhor efetividade, tanto para fins analíticos quanto farmacotécnicos e fitoquímicos, qual serviu de base para o desenvolvimento do processo industrial á vácuo (PI 0601703-7A).

Os sistemas de extração em escala laboratorial e em escala industrial apresentaram extratos com composição química semelhante e teor de feniletil glucosinolato equivalente (CARVALHO, 2008)

O sistema Soxhlet também foi utilizado para processos de partição com gradiente de polaridade na extração direta em droga vegetal e na extração do EPTF adsorvido em sílica.

Quanto à umidade, presente na droga vegetal, esta altera a polaridade do solvente extrator e a liberação dos compostos nas células do vegetal, isto não ocorre com o extrato padronizado (EPTF) adsorvido em pastilha de sílica, pois, no processo de adsorção do extrato em sílica, o solvente (etanol:água) é evaporado e inexistem as variáveis referentes à composição estrutural do vegetal.

Em paralelo pode-se concluir que a utilização do extrato padronizado, adsorvido à pastilha de sílica, propõe um método econômico, limpo e rápido para obtenção de marcadores de interesse, ou para confirmação da composição relatada na literatura.

Observou-se que na fração etanólica, 81%, fracionada em sílica e posteriormente em colunas de Sephadex foi possível isolar o feniletil glucosinolato e a fenilpropanonitrila, que foram qualificados por cromatografia gasosa (silanização), cromatografia líquida e espectrometria de massa.

Houve ineficiência no processo de extração direta, com gradiente de polaridade, caracterizada pela presença de compostos glicosilados nos solventes apolares, desqualificando o método para partição direta em droga vegetal.

Há evidência da importância e efetividade do método de extração em etanol 81%, resultando no EPTF, haja vista que a interferência de compostos glicosilados na fase apolar não é evidenciada no processo de partição direta a partir do extrato seco adsorvido em sílica.

Esse método de isolamento de substâncias de interesse resultou na qualificação do feniletil glucosinolato, porém, mesmo apresentando teor de 85% não foi utilizado para validação analítica. Isto porque houve a aquisição de um padrão com rastreabilidade (laudo) do Laboratório LKT.

Ainda que já houvesse sido qualificado, a fração isolada contendo o feniletil glucosinolato foi avaliada em paralelo, por CLAE, com o padrão adquirido, obtendo-se por comparação espectral uma razão de 0,9982.

Após a determinação gravimétrica de perda em mufla, da droga vegetal estabilizada, dos extratos padronizados e dos resíduos de extração da droga vegetal, o material resultante (cinzas) foi avaliado por espectrofotometria de absorção atômica. Nesta análise evidenciou-se que os metais analisados apresentaram valores semelhantes, de macronutrientes e micronutrientes, aos valores especificados nas tabelas de composição de alimentos do NEPA (2004) e SGARBIERI (1996).

Verificou-se que 50% a 70% dos metais ficam no resíduo da droga vegetal (RDVTF), sendo este comumente desprezado na indústria, verificou-se um uso potencial na formulação de produtos fitoterápicos. Propondo-se a reutilização do resíduo (RDVTF), como suporte matricial, em substituição ao amido ou outro suporte sólido, no preparo do extrato seco (ESPTF), nesta perspectiva promove-se um enriquecimento no teor de metais no produto final, mantendo a composição da droga vegetal e apresentando um aspecto diferencial de micro absorção e microadsorção do extrato em relação ao suporte sólido.

Considerando o extrato padronizado talos e folhas (EPTF) como insumo primário, foram desenvolvidas preparações medicinais em formas farmacêuticas fitoterápicas, tais como: tintura, extrato seco, xarope, solução oral, colutório e pastilhas de agrião.

O colutório, apresentou potencial atividade antimicrobiana conforme trabalho de tese de doutorado de BUFFON (2005).

As pastilhas apresentaram significativas condições organolépticas e ainda necessitam de desenvolvimento complementar para a viabilização da forma farmacêutica em escala industrial.

A tintura, o xarope, a solução oral e o extrato seco foram otimizados para atender às exigências da RDC 48/2004 (ANVISA), culminando na produção de lotes-piloto, validação analítica e testes de estabilidade, de posse desses dados, elaboraram-se documentos que foram encaminhados à ANVISA para obtenção do registro dos respectivos produtos.

Em todos os produtos desenvolvidos foram analisados os aspectos organolépticos, físico-químicos, microbiológicos e composição qualitativa e quantitativa.

As análises qualitativas, por cromatografia em camada delgada, foram evidenciados fenilpropanóides, flavonóides, glucosinolatos, esteróides, saponinas, compostos nitrogenados, sendo este um *fingerprint* de grande valia nas análises preliminares do *Nasturtium officinale*.

A validação analítica do doseamento do feniletil glucosinolato atendeu todas as especificações da RE 899/2003 (ANVISA) para envio do processo de pedido de registro.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia Para Validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE-899 de 29 de maio de 2003. Disponível em <www.anvisa.gov.br>. Acessado em 10 de julho de 2007.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 18 de março de 2004.
- AS ERVAS CURAM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA LTDA; Carvalho, J. L.S, Miguel, O. G. Marilis, D. G.; Dadalt, R; **Processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos, extratos secos e derivados do agrião (*Nasturtium officinale*) e espécies medicinais afins, com modificações introduzidas em equipamento soxhlet para aplicações na indústria, área farmacêutica, cosmética, alimentícia e afins**. Int. Cl A61K 36/31 . PI 0601703-7. 05 abr 2006; 11 dez 2007. Revista da Propriedade Industrial, n. 1927, p. 92, 2007.
- BARILLARI, J.; GUEYRARD, D.; ROLLIN, P.; IORI R.; Barbarea verna as a source of 2-phenylethyl glucosinolate, precursor of cancer chemopreventive phenylethyl isothiocyanate. **Fitoterapia**, v. 72, p. 760-764, 2001.
- BARRY, K. M.; DAVIES, N. W.; MOHAMMED, C. L. Identification of Hidrolisable Tannins in the Reaction Zone of Eucalyptus nitens Wood by Hight Perfomance Liquid Chromatography-Electrospray Ionisation Mass Spectrometry, **Phytochem. Anal.**, v. 12, p. 120-127, 2001.
- BENNETT, R. N.; KIDDLE, G.; HICK, A. J.; DAWSON, G. W.; WALLSGROVE, R. Distribution and activity of microsomal NADPH-dependent monooxygenases and amino acid decarboxylases in cruciferous and non-cruciferous plants, and their relationship to foliar glucosinolate content. **Plant, Cell Environ.**, v. 19(7), p. 801-812, 1996.
- BJÖRKQVIST, BÖRJE; HASE, ANNELI. Separation and Determination of intact glucosinolatos in Rapeseed by Hight-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 435, p. 501-507, 1988.
- BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. **Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs**. Austin, TX: American Botanical Council; Boston: Integrative Medicine Communications, p. 404-407, 2000.
- BUDAVARI, S (ed.). **The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological**. 12. ed. Whitehouse Station: Merck, 1996.
- BUFFON, M.; **Aplicação do Extrato de agrião d'água (*Nasturtium officinale* R. Br.) no Controle da Placa Bacteriana, uma proposta para saúde pública**. Curitiba, 2005. Tese (Doutorado em Ciências) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.
- BURNS, J. *et al.* Identification and quantification of carotenoids, tocopherols and chlorophylls in commonly consumed fruits and vegetables. **Phytochemistry**. v 62, p. 939-947, 2003.
- CARVALHO, J. L. S.; **Contribuição ao estudo Fitoquímico e Analítico do *Nasturtium officinale* R.Br., Brassicaceae**. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saude, Universidade Federal do Paraná.
- CARVALHO, J. L. S.; CUNICO, M. M.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., Bracicaeae

por sistema Soxhlet modificado. **Química Nova**, aceito para publicação setembro de 2008.

CIOLA, R. ; **Introdução à Cromatografia em Fase Gasosa**. São Paulo: Editora Edgaard Blücher Ltda, 1973.

DÖRNEMANN, D. *et al.*; Chain Elogation of Aromatic Amino Acids: the Role of 2-benylmalic Acid in the of C6C3 of Mustard Oil Glucoside; **CAN. Journal BIOCHEM**, v. 52, p. 916-921, 1974.

ENGELEN-EIGLES, G.; HOLDEN, G.; COHEN, J. D.; GARDNER, G. The effect of temperature, photoperiod, and light quality on gluconasturtiin concentration in watercress (*Nasturtium officinale* R. Br). **J Agric Food Chem**, v. 54, p.328-334, 2006.

FRANSON, M. A. H (ed.). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 20 ed. Washington D. C.: American Public Health Association, 1998.

GETAHUN, S. M.; CHUNG, F. L. Conversion of glucosinolates to isothiocyanates in humans after ingestion of cooked watercress. **Cancer-Epidemiology-Biomarkers-and-Prevention**, v. 8 (5), p. 447-451, 1999.

GIL-V; MACLEOD-A-J; Degradation of glucosinolates of *Nasturtium officinale* R. Br. seeds. **Phytochemistry**, v. 19(8), p. 1657-1660, 1980.

GONG, F. *et al.*; Correction of retention time shifts for chromatographic fingerprints of herbal medicines; **Journal of Chromatography A**, p. 173-183, 2004.

HARBONE, J. B. **Phytochemical Methods**. 3 ed. Chapman & Hall, 1998.

HART, D. J.; SCOTT, K. J. Development and evaluation of an HPLC method for the analysis of carotenoids in foods, and the measurement of the carotenoid content of vegetables and fruits commonly consumed in the UK. **Food Chem.**, v. 54(1), p. 101-11, 1995.

HORBOWICZ, M. Vegetables as a source of vitamin E. **Biuletyn-Warzywniczy.**, Suppl. II, p. 205-209, 1989.

HUCK, C. W.; BONN, G. K. Evaluattion of Detection Methods for the Reversed-Phase HPLC Determination of 3',4',5'-Trimethoxyflavone inn Different Phytopharmaceutical products and in Human Serum. **Phytochem. Anal.**, v. 12, p. 104-109, 2001.

JIAO, D; YU, M.C.; HABNKIN, J.H.; LOW, S.; CHUNG, F; JIAO, D; LOW, S.H.; CHUNG, F.L. Total isothiocyanate contents in cooked vegetables frequently consumed in Singapore. **Journal-of-Agricultural-and-Food-Chemistry**, v. 46:3, p. 1055-1058, 1998.

JOHNSTON, K. M; STERN, D. J.; WAISS JR, A. C. Separation of flavonoid. compounds on Sephadex LH- 20. **Journ. Chromatogr.** v. 33, p. 539 541, 1968.

JUMA, B. F. *et al.* Flavones and Phenylpropenoids in the Surface Exudate of *Psidia punctulata*. **Phytochemistry**. V. 57, p. 571-574, 2001.

KANG, S.S.; KIM, J.S.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KIM, H.P. A new prenylated flavone from the roots of *Sophora flavescens*. **Phytochemistry**. V. 56, p. 875-879, 2001.

KIDDLE, G, *et al.* High-performance liquid chromatographic separation of natural and synthetic desulphoglucosinolates and their chemical validation by UV, NMR and chemical ionisation-MS methods. **Phytochem. Anal.** v. 12, p. 226-242, 2001.

KIKUCHI, Y.; SHIMAMURA, Y.; HIROKADO, Y.; YASUDA, K.; NISHIJIMA, M. Quantitative analysis of daidzin (7 glucoside, 4'-hydroxyisoflavone, MI 2794), daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) genistin (7 -D-Glucoside, 4',5- dihydroxyisoflavone) and genistein (4',5,7 trihydroxyisoflavone) in various foods by HPLC. **Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi**, v. 40 (6), p. 444-454, 1999.

LANÇAS, F; **Cromatografia Em Fase Gasosa**; São Paulo: Suprem Gráfica E Editora, 1993.

LEWKE, A.; HANKE, A.; SCHNITZLER, W. H. HPCL analysis for intact glucosinolates of vegetable Brassicaceae and their enzymic detection by myrosinase degradation. **Gartenbauwissenschaft**, v. 61(4), p. 179-183, 1996.

LOFFELHARDT, W.; KINDL, H. The conversion of L-phenylalanine into benzoic acid on the thylakoid membrane of higher plants. **Hoppe-Seylers-Z-Physiol-Chem**, v. 356(5), p. 487-93, 1975.

LOGGIA, R.D. **Piante officinali per infuse e tisane**. 3 ed. Organizzazione Editoriale Medico Farmacêutica, p. 354, 1993.

LYON, G.D. *et al.* Metabolic pathways of the diseased potato. **Scottish Crop Research Institute**. Disponível em: <www.drastic.org.uk> Acessado em 03 set de 2006.

MABRY, T.J. *et al.* **The systematic identification of flavonoids**. Berlin: Springer-Verlag, p. 4-14, 1970.

MCMURRY, J. **Química orgânica**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos editora S.A., 1997.

MELO, A. C. *et al.* CLAE Quantitation of Kaurane Diterpenes in *Xylopi* species; **Fitoterapia**, v. 72, p. 40-45, 2001.

MOFFAT, A. C. **Clarke's isolation and identification of drugs**. 2 ed. London: Pharmaceutical Press, 1986.

MOREIRA, E.A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica, **Tribuna Farmacêutica**, Curitiba, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NEPA – NÚCLEO DE ESTUDOS E PESQUISAS EM ALIMENTAÇÃO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**. 1ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2004.

NOWAK, R.; KISIEL, W. Hancokinol from *Vincetoxicum officinale*. **Fitoterapia**. v.71, p. 584-586, 2000.

OLIVIER, M. Constituents of the Stem Bark of *Ormosia wayana*. **Fitoterapia**. v. 72, p. 583-584, 2001.

OLSEN, O. SORENSEN, H.; Glucosinolates and Amines in *Reseda Media*; **Phytochemistry**. England, v. 19, p. 1783-1787, 1980.

OLSEN, O. SORENSEN, H.; Recent Advances in the Analysis of Glucosinolates. **JAACS**. p. 857-865, September, 1981.

PDR for herbal medicines. 2.ed. Montvale, NJ, EUA: Medical Economics Company. 2000.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e nutrição – Fator de Saúde e Desenvolvimento**, 5 ed. São Paulo: Ed. Unicamp, p. 135 a 155, 1994.

SGARBIERI, V. C. **Alimentação e Nutrição**, fator de saúde e desenvolvimento. Almed editora e livraria Ltda, 1996.

SHIMAMURA, Y.; HIROKADO, M.; YASUDA, K.; NISHIJIMA, M.; Quantitative analysis of daidzin (7 glucoside, 4'-hydroxyisoflavone, MI 2794), daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone) genistin (7 -D-Glucoside, 4',5- dihydroxyisoflavone) and genistein (4',5,7 trihydroxyisoflavone) in various foods by CLAE. **Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi**, v. 40 (6), p. 444-454, 1999.

SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, p. 276 a 280, 1994.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SPENCE, M. R.; TUCKNOTT, G. O. Volatiles from the Epicuticular wax of Watercress (*Roripa Nasturtium-Aquaticum*). **Phytochemistry**, Great Britain, v. 22, nº 11, p. 2521-2523, 1983.

SPRINGNGFIELD, E. P. *et al.* Quality assessment of South African herbal medicines by CLAE fingerprinting; **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, p. 75-83, 2005.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography**, 2. ed. New York: Springer-Verlag, 1969.

SVANEM, P. J.; BONES, A. M.; ROSSITER, J.T. Metabolism of [α -¹⁴C]-desulphophenethylglucosinolate in *Nasturtium officinale* R. Br.. **Phytochemistry**, v. 44:7, p. 1251-1255, 1997.

TREASE, G. E.; EVANS, W.C. **Pharmacognosy**. London: Bailliere Tindall, p. 245-311, 1992.

TREVOR, R. **The Organic Constituents of Higher Plants**. 6 ed. North Amherst, p. 69-84, 1991.

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas. **Normas para a apresentação de documentos científicos: 9 - Tabelas**. Curitiba: Ed. da UFPR, 2006.

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas. **Normas para a apresentação de documentos científicos: 2 - Teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos**. Curitiba: Ed. da UFPR, 2006.

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas. **Normas para a apresentação de documentos científicos: 6 - Referências bibliográficas**. Curitiba: Ed. da UFPR, 2006.

Universidade Federal do Paraná. Sistemas de Bibliotecas. **Normas para a apresentação de documentos científicos: 8 - Redação e editoração**. Curitiba: Ed. da UFPR, 2006.

USP24 The United States Pharmacopeia, NF 19 National Formulary, Philadelphia, USA 2000.

VOGEL, A.I. **Análise química quantitativa**. 6. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2002.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drugs Analysis**. 2 ed. Berlin: Springer, p. 298-299 e 318-319, 2001.

WATERS CORPORATION. **Chromatography columns and supplies catalog**. 2001-2002.

ZHAO L. *et al.* *Fingerprint analysis of Psoralea corylifolia L. by CLAE and LC-MS*; **Journal Of Chromatography B**, p. 67-74, 2005.

BIBLIOGRAFIA RECOMENDADA

BICCHI, B; BINELLO, A; RUBIOLO, P. Determination of phenolic diterpene antioxidants in rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) with different methods of extraction and analysis. **Phytochemical Analysis**, v. 11 , p.236-242, 2000.

LAGOS, J. B. **Estudo Comparativo da Composição Química das Folhas e Cascas da *Trichilla catigua* A. Juss. Meliaceae**. Curitiba, 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saude, Universidade Federal do Paraná.

BLUMENTHAL, M. **The complete german commission and monographs - therapeutic guide to herbal medicines**. Boston: American Botanical Council. 1998.

BROWN, P. D.; TOKUHISA, J. G.; REICHEL, M.; GERSHENZON, J. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. **Phytochemistry**, v.62, p. 471-481, 2003

CANISTRO, D; CROCE, C. D.; IORI, R.; BARILLARI, J.; BRONZETTI, G.; POI, G.; CINI, M.; CALTAVUTURO, L.; PEROCCO, P.; PAOLINI, M. Genetic and metabolic effects of gluconasturtiin, a glucosinolate derived from cruciferae. **Mutation Research**, v. 545, p. 23-25, 2004.

CHEN, L.; MOHR, S. N.; YANG, C.S. Decrease of plasma and urinary oxidative metabolites of acetaminophen after consumption of watercress by human volunteers. **Clin Pharmacol Ther**, 60(6), p. 651-60, 1996.

FAHEY, J. W.; ZALCMANN, A. T.; TALALAY, P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. **Phytochemistry**, v. 56, p. 5-51, 2001.

GIL, V.; MACLEOD, A. J. Effects of a *Lepidium sativum* enzyme preparation on the degradation of glucosinolates. **Phytochemistry**, v.19, p. 2071-2076, 1980.

OLSEN, O.; SORENSEN, H. Isolation of glucosinolates and the identification of o-(α -L-rhamnopyranosyloxy)benzylglucosinolate from *Reseda odorata*. **Phytochemistry**, v. 18, p. 1547-1552, 1979.

RANGKADILOK, N.; NICOLAS, M.E.; BENNETT, R.N.; PREMIER, R.R.; EAGLING, D.R.; TAYLOR, P.W.J. Determination of sinigrin and glucoraphanin in Brassica species using a simple extraction method combined with ion-pair HPLC analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 96, p. 27-41, 2002 .

RIBANI, M. ; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H. ; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SPENCE, R.-M. M.; TUCKNOTT, O. G.; BAKER, E. A.; HOLLOWAY, P. J. Compounds associated with the surface lipid layer of watercress. **Phytochemistry**, v. 22, p. 1753-1756, 1983.

SONGSAK, T.; LOCKWOOD, G. B. Glucosinolates of seven medicinal plants from Thailand. **Fitoterapia**, v. 73(3), p. 209-216 ,2002.

SONGSAK, T.; LOCKWOOD, G. B. Production of two volatile glucosinolate hydrolysis compounds in *Nasturtium montanum* and *Cleome chelidonii* plant cell cultures. **Fitoterapia**, v. 75, p. 296-301, 2004.

QINGGUO, T.; ROSSELOT, R. A.; SCHWARTZ, S. J. Quantitative determination of intact glucosinolates in broccoli, broccoli sprouts, Brussels sprouts, and cauliflower by high-performance liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 343, p. 93-99, 2005.

VAUGHN, S.; BERHOW, M. Glucosinolate hydrolysis products from various plant sources: pH effects, isolation, and purification. **Industrial Crops and Products**, v. 21, p. 193-202, 2005.

YANG, L.-W.; WU, D.-H.; XI, T.; WEI, P.; WANG, X.-R.; YAN, M.; SU, W.-W. Fingerprint quality control of Tianjihuang by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection. **Journal of chromatography**, v.1070, p.35-42, 2005.

WANG H.; PROVAN, G. J.; HELLIWELL, K. HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. **Food Chemistry**, v. 81(2), p. 307-312, 2003.

WANG, Q.; GRUBB, D.; ABEL, S.; Direct analysis of single leaf disks for chemopreventive glucosinolates. **Phytochemical Analysis**, v. 13(3), p.152-157, 2002.

WILKINSON, A.P.; RHODES, M. J. C.; FENWICK, R. G. Myrosinase activity of cruciferous vegetables. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 35(5), p. 543-552, 1984.

WEST, L.; TSUI, I.; HAAS, G. Single column approach for the liquid chromatographic separation of polar and non-polar glucosinolates from broccoli sprouts and seeds. **Journal of Chromatography A**, v. 966, p. 227-232, 2002.

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1 – PUBLICAÇÕES E EVENTOS.....	160
ANEXO 2 – DISCIPLINAS CURSADAS NO MESTRADO.....	163
ANEXO 3 – DISCIPLINAS CURSADAS NO DOUTORADO.....	164

ANEXO 1 - PUBLICAÇÕES E EVENTOS DE JOÃO LUIZ DE SOUZA CARVALHO

- 1 Estudo fitoquímico e analítico das partes aéreas do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae. Anais do X Encontro de Química da Região Sul - Química & Indústria: conhecimento e qualidade de vida. Joinville – SC.
- 2 Identificação de alternativas para utilização de resíduos sólidos têxteis na área de materiais I Seminário Integrado de Pesquisa e Extensão e VII seminário de Pesquisa FAP-UNIVILLE. Joinville – SC (Revista UNIVILLE 2002).
- 3 Atividade fungitóxicas de *Acácia longifolia* (ANDR.) WILLD. – Leguminosae-Mimosoideae. Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Cuiabá - MT, AG.047.
- 4 Flavonóides de *Acácia longifolia* (ANDR.) WILLD. – Leguminosae- Mimosoideae. Anais do XVII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Cuiabá - MT, AG.094.
- 5 Orientação do trabalho de conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE da aluna Lauren Timm Crippa, intitulado "Caracterização de Resíduos Sólidos Têxteis", defendida em dezembro de 2002.
- 6 Participação de Banca Examinador de Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE da aluna Carolina Kruger, intitulado "Análise da Presença de Fenol em Águas Subterrâneas por SPE/CLAE" realizada em 03 de dezembro de 2002.
- 7 Participação de Banca Examinador de Trabalho de Conclusão de curso da aluna Josiane Meurer, intitulado "Controle de Qualidade da Água Reagente em Laboratório Clínico" realizada em 13 de dezembro de 2002
- 8 Estudo Fungitóxico de Extratos de *Ptychopetalum ocaloides*, Evinci 2001
- 9 Extração de esteróides em frutos de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae, com gás liquefeito. (Miriam M. Cunico, Obdulio G. Miguel, Marilis D. Miguel, João L. S. Carvalho, Deise P. Montrucchio, José L. Ferreira, Juarez S. Oliveira) (Revista Química Nova 2003)
- 10 Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae: um teste in vivo (Cunico, M. M.; Miguel, O. G.; Miguel, D. M.; Peitz, C.; Carvalho, J. L. S.; Auer, C. G.; Grigoretti Júnior, A.). (Revista Visão Acadêmica 2003)
- 11 Estudo da atividade antifúngica de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae (Cunico, M.

- M.; Miguel, O. G.; Miguel, Kerber, V. A.; Carvalho, J. L. S.; Silva, V. C.; Montrucchio, D. P.; Auer, C. G.; Grigoretti Júnior, A.). (Artigo submetido à Revista Portuguesa de Farmácia 2003)
- 12 Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico dos órgãos totais de *Ottonia martiana* Miq., Piperaceae. (Cunico, M. M.; Miguel, O. G.; Miguel, D. M.; Carvalho, J. L. S.; Higaskino, C. E. K.; Cruz Almeida, S. C.) (Artigo submetido à Revista Brasileira de Farmacognosia)
 - 13 Bioautography investigation of *Ottonia martiana* Miq., (PIPERACEAE) and identification of a constituent with antimicrobial activity on the oral microbiota. . (M. M. Cunico; O. G. Miguel; M. D. Miguel; J. L. S. Carvalho, I. Galhardi. C. G. Auer, A. Grigoletti Junior). (Artigo submetido a Journal of Ethnopharmacology)
 - 14 Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae, Carvalho, J. L. S.; Miguel, O. G. Resumo publicado na Visão Acadêmica 2003.
 - 15 Participação de Banca Examinador de Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE do aluno César Jocias Weber, intitulado "Determinação de Fenol em efluentes Industriais Via Cromatografia Gasosa" realizada em 11 de dezembro de 2003.
 - 16 Participação de Banca Examinador de Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE do aluno Eder Marlon Ramos, intitulado "Determinação de Paracetamol em amostras de Soro por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência" realizada em 01 de dezembro de 2003.
 - 17 Orientador no Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE do aluno Arnaldo Arsiilho Malon, intitulado "Determinação Quantitativa de Peróxido de Benzoíla em Farinha de Trigo por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência" realizada em 2003.
 - 18 Orientador no Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE da aluna Sônia Richartz Prim, intitulado "Estudo de do Solvente Hexano, proveniente da Análise de Óleos e Graxas de Efluentes Industriais" realizada em 2004.
 - 19 Participação de Banca Examinador de Trabalho de Conclusão de curso do aluno

- Laufran Oscar de Gracia, intitulado "Classificação e Destinação Final dos Passivos Ambientais Gerados nos Laboratórios de Ensino e Pesquisa da UNIVILLE" realizada em 14 de dezembro de 2004.
- 20 Orientador no Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE do aluno Francisco Enoque da Costa Montenegro, intitulado "Avaliação do Extrato Lixiviado de Embalagens e Teores de Hidróxido de Sódio, Cloro Ativo e Metais Pesados de Algumas Marcas de Hipoclorito de Sódio Comercializadas na Região" realizada em 2005.
 - 21 Orientador no Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE da aluna Elaine Pereira, intitulado "Estudo da Confiabilidade e Viabilidade das Análises Espectroscópicas de Absorção Atômica, Gravimetria e Volumetria de Ferro-Liga" realizada em 2005.
 - 22 Orientador no Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE do aluno Tiago Vignola, intitulado "Avaliação e Proposta de Melhorias do sistema de efluentes da Empresa Kavo do Brasil" realizada em 2005.
 - 23 Participação de Banca Examinador de Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE o do aluno Vilmar da Silva, intitulado "Avaliação da Qualidade da Água Reagente de Laboratório de Análise, com Relação a Condutividade, Resistividade e Sólidos totais dissolvidos" realizada em 13 de dezembro de 2005.
 - 24 Participação de Banca Examinador de Trabalho de Conclusão de curso de Química Industrial na UNIVILLE da aluna Andréia Alexandre, intitulado "Adição da Curva de calibração de fluoretos no Calorímetro Merck e execução de Análise" realizada em 06 de dezembro de 2005.
 - 25 As Ervas Curam Indústria Farmacêutica Ltda; Carvalho, J.L.S.; Miguel, O.G.; Marilis,D.G.; Dadalt, R; patente referente ao processo de obtenção de extratos hidroalcoólicos, extratos secos e derivados do agrião (*Nasturtium officinale*) e espécies medicinais afins, com modificações introduzidas em equipamento soxhlet para aplicações na indústria, área farmacêutica, cosmética, alimentícia e afins, INPI 2006.

ANEXO 2 – DISCIPLINAS CURSADAS NO MESTRADO

Código	Disciplina	Carga Horária	Créditos	Conceitos	Período
	Tópicos de tecnologia farmacêuticas e afins; modulo: sistema de liberação de fármaco	60	04	A	2º semestre 2000
	Elementos da química de produtos naturais	60	4	A	2º semestre 2000
	Desenvolvimento de Fitopreparados	60	4	A	2º semestre 2000
	Métodos físicos aplicados a analítica laboratorial	30	2	B	2º semestre 2000
	Morfologia de drogas vegetais	30	2	A	2º semestre 2000
	Aspectos atuais para fins especiais	60	4	A	2º semestre 2000
	Controle de qualidade de drogas vegetais	60	4	A	2º semestre 2000
	Metodologia da pesquisa	30	2	A	2º semestre 2000

ANEXO 3 – DISCIPLINAS CURSADAS NO DOUTORADO

Código	Disciplina	Carga Horária	Créditos	Conceitos	Período
MB 711	Métodos de Separação	60 horas	04	A	2º semestre 2003
MB 714	Seminários 2003	15 horas	01	Suficiente	1º semestre 2003
MB 715	Seminários 2003	15 horas	01	Suficiente	2º semestre 2003
	Química Orgânica Avançada Aplicada As Ciências Farmacêuticas	60 horas	04	A	1º semestre 2004
	Suficiência em Espanhol			Suficiente	1º semestre 2003

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)