



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS

Departamento de Química

Bacharelado em Química Tecnológica

Anna Maria Romano Silva

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado

Pesquisa na área de Química de Produtos Naturais Bioativos

Belo Horizonte

2023



CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS

Departamento de Química

Bacharelado em Química Tecnológica

Relatório Final Estágio Curricular Obrigatório

Pesquisa na área de Química de Produtos Naturais Bioativos

Anna Maria Romano Silva

Estagiária

Esther Maria Ferreira Lucas

Orientadora

Belo Horizonte

2023

CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERAIS

Departamento de Química

Bacharelado em Química Tecnológica

Relatório Final Estágio Curricular Obrigatório

Química de Produtos Naturais Bioativos

Anna Maria Romano Silva

DECLARAÇÃO

Eu Tânia Maria de Almeida Alves, como supervisor do estágio obrigatório, estou ciente deste relatório de estágio supervisionado, redigido pela estagiário(a) Anna Maria Romano Silva, e concordo com as informações descritas, confirmo a sua veracidade e aprovo o mesmo.

Tânia Maria de Almeida Alves

Supervisora de Estágio

Belo Horizonte

2023

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	5
2 OBJETIVO.....	7
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	8
3.1 PLANTAS MEDICINAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	8
3.2 ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	9
4 METODOLOGIA.....	15
4.1 PROCEDIMENTOS GERAIS ESTUDADOS PARA ANÁLISE DE EXTRATOS VEGETAIS.....	15
4.1.1 Amostragem e tratamento do material vegetal.....	15
4.1.2 Procedimentos de preparação dos extratos.....	16
4.1.3 Concentração dos extratos.....	17
4.1.4 Caracterização preliminar dos extratos.....	19
4.1.5 Fracionamento e caracterização dos extratos.....	20
4.1.6 Testes biológicos para avaliação da bioatividade.....	21
4.2 EXEMPLIFICAÇÃO DE ESTUDOS FITOQUÍMICOS REALIZADOS.....	22
4.2.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br.....	22
4.2.2 <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.....	24
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
5.1 <i>Lippia alba</i> (Mill.) N.E. Br.....	27
5.2 <i>Jacaranda cuspidifolia</i> Mart.....	29
6 CONCLUSÃO.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

1 INTRODUÇÃO

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) refere-se à mais destacada instituição de ciência e tecnologia em saúde da América Latina, cujo princípios de atuação institucional são a promoção da saúde e o desenvolvimento social. Como objetivo principal, a Fundação busca atuar como um agente da cidadania por intermédio da geração e difusão de conhecimentos científicos e tecnológicos de suas linhas de atuação (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, [S. d.] a). Possuindo vínculo com o Ministério da Saúde, a FIOCRUZ tem como meta colaborar para o Sistema Único de Saúde, além de ter o compromisso de ampliação no papel da concretização de políticas públicas voltadas para às condições da saúde do cidadão brasileiro (INSTITUTO RENÉ RACHOU, [S. d.]a).

Iniciada em 25 de maio de 1900, a história da Fundação Oswaldo Cruz se deu a partir da criação do Instituto Soroterápico Federal, localizada Fazenda de Manguinhos, Zona Norte do Rio de Janeiro. Instituída com o objetivo original de fabricar soros e vacinas para combater a peste bubônica da época, a Fundação apresentou uma trajetória de desenvolvimento paralela com desenvolvimento da saúde pública do país. Com a liderança do bacteriologista Oswaldo Cruz, a FIOCRUZ foi a principal responsável pela reforma sanitária que ocasionou a erradicação da epidemia de peste bubônica e febre amarela da cidade carioca. Tal realização logo ultrapassou os limites da região do Rio de Janeiro, corroborando para que o Instituto fosse uma chave para a criação do Departamento Nacional de Saúde Pública do Brasil, em 1920 (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, [S. d.]b).

No século 21, em seu centenário com mais de 120 anos de história, a FIOCRUZ apresentou e vem apresentando uma trajetória robusta, onde com seu estatuto publicado, tornou-se Centro Colaborador para Saúde Global e Cooperação Sul-Sul da OMS. Além disso, o instituto participou do lançamento do primeiro volume da Pesquisa Nacional de Saúde (PNS), em parceria com o Ministério da Saúde e o IBGE. Neste mesmo século, apresentou grandes feitos como o deciframento do genoma do BCG (bactéria usada na vacina contra a tuberculose), e atuou como um dos principais núcleos de pesquisa na pandemia de Influenza A(H1N1), bem como na epidemia de zika vírus e microcefalia. Durante pandemia do Covid-19, por sua vez, a Fundação Oswaldo Cruz apresentou um papel imprescindível e para produção de uma das vacinas contra a doença, com distribuição de milhões de doses de imunizantes ao SUS, contribuindo para a imunização da população brasileira (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, [S. d.]b).

Atualmente, a Fundação conta com instalações em 10 estados brasileiros, bem como um escritório em Moçambique, na África. A unidade mineira da instituição, nomeada como

Instituto René Rachou (IRR), localizada na avenida Augusto de Lima, número 1715 – Barro Preto, possui como missão a melhoria da qualidade de vida da população, de maneira a atender a situações prioritárias nacionais de saúde, por intermédio da ação integrada de pesquisa, desenvolvimento tecnológico, ensino e serviços de referência. Desde a sua criação, em 1955, as pesquisas e atividades do respectivo instituto estão envolvidas com a procura de desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, bem como métodos para diagnóstico, promoção e controle de doenças infecciosas e parasitárias, doenças degenerativas crônicas. Outrossim, seus núcleos de pesquisa buscam envolver as temáticas de envelhecimento, educação em saúde, saúde e ambiente, genômica, bioinformática. Nesse sentido, os grupos de pesquisa do IRR têm como objetivo trabalhar em temas como a doença de Chagas, malária, as leishmanioses, dengue, esquistossomose e outras helmintoses, bem como doenças crônico-degenerativas (INSTITUTO RENÉ RACHOU, [S. d.]b).

O laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos refere-se à um dos núcleos de pesquisa do Instituto René Rachou, localizado no laboratório 603, no qual apresenta as linhas de pesquisa de bioprospecção, fracionamento biomonitorado de extratos vegetais e fúngicos bioativos, assim como a síntese de substâncias bioativas (INSTITUTO RENÉ RACHOU, [S. d.]c). A justificativa para tal linha de pesquisa se baseia na premissa de que o estudo farmacológico de fitofármaco de espécies medicinais, bem como sua elucidação estrutural, caracteriza-se como atividades fundamentais para a farmacopeia, já que propiciam os avanços tecnológicos para produção de novos fármacos e fitoterápicos, contribuindo para a produção tecnológica de recursos que garantem a qualidade da saúde pública (FERNANDES, 2020).

2 OBJETIVO

O objetivo das análises efetuadas no laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos (QPNB) do Instituto René Rachou (FIOCRUZ MINAS) é a realização de pesquisas com a finalidade de descobrir substâncias bioativas, por intermédio das linhas de pesquisa de bioprospecção e fracionamento biomonitorado de extratos bioativos, com foco em estudo para doenças endêmicas. Para o estágio em questão, objetivou-se o aprendizado e aplicação de técnicas fitoquímicas de um estudo biomonitorado, a partir de extratos de plantas do laboratório QPNB.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PLANTAS MEDICINAIS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2022), as plantas medicinais orientam-se como espécies de plantas capazes de atuar no organismo de forma a exercer uma função sob determinada enfermidade, seja na sua prevenção, tratamento ou até mesmo cura. Constituídas como práticas milenares da humanidade, o uso deste tipo de espécies estabeleceu-se em observações empíricas e procedimentos populares de comunidades tradicionais para o desenvolvimento da produção de remédios caseiros e comunitários (FERNANDES, 2020).

Atualmente, é de conhecimento técnico-científico que a cultura da hipermedicalização de fármacos sintéticos refere-se à uma problemática complexa construída ao longo dos anos. Isto pois, a necessidade quase coletiva e irracional de uma população ser medicalizada a todo contato com um profissional da saúde está atrelada a diversos tipos de complicações (CORRÊA, 2016). As plantas medicinais, nesta lógica, são apontadas como fontes alternativas terapêuticas que complementam e integram a prevenção e tratamento de enfermidades. Além disso, apesar do incremento produtivo da indústria farmacêutica quanto à produção de medicamentos alopáticos, o uso de tais plantas com finalidades terapêuticas ainda se faz muito presente em diversas comunidades, sendo caracterizadas como insumos da medicina tradicional, também conhecida como medicina popular (FERNANDES, 2020).

À vista desta perspectiva, paralelamente com o desenvolvimento da indústria farmacêutica de medicamentos alopáticos na contemporaneidade, surgiu-se também um ramo muito importante das ciências farmacêuticas direcionado para a área das ervas medicinais, a farmacognosia: uma ciência multidisciplinar que visa a identificação e extração de produtos naturais bioativos, verificando-se também suas propriedades toxicológicas, físico-químicas e farmacológicas (SIMÕES et al., 2010). Além disso, a etnofarmacologia constitui-se como uma subárea importante da farmacognosia que, em seu âmbito conceitual, é uma disciplina dedicada ao estudo do complexo conjunto de relações das plantas com as sociedades humanas de diferentes espaços de tempo. De maneira mais específica, tal ciência investiga os componentes presentes nas plantas medicinais utilizados em sistemas tradicionais da medicina, sendo este segmento amplamente utilizado como ferramenta de busca de substâncias ativas presentes nas plantas de uso popular terapêutico (SIMÕES et al., 1999).

Logo, o avanço de pesquisas na área farmacêutica ao longo das últimas décadas possibilitou, portanto, um melhor entendimento das ações terapêuticas promovidas pelos

extratos vegetais, de maneira a assimilar as relações de biossíntese de metabólitos das espécies vegetais com o ambiente em que se encontram (PEREIRA, CARDOSO, 2012). Assim, os princípios ativos terapêuticos destas espécies de plantas estão estritamente relacionados à presença de componentes químicos oriundos de sua biossíntese, sendo denominados cientificamente como metabólitos secundários, também chamados de produtos naturais (DEWICK, 2009).

Os metabólitos secundários das plantas, nesse sentido, diferem-se dos metabólitos primários, uma vez que não são classificados como essenciais à vida (como os carboidratos, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos que constituem os metabólitos primários), mas garantem certas vantagens para sobrevivência do seu organismo produtor, possuindo vias bioquímicas únicas, das quais concebem elementos de diferenciação entre as espécies. Dentre as funções específicas que tais classes de compostos exercem nas plantas que os produzem, destacam-se: a proteção contra herbívoros e patógenos, atração de agentes polinizadores, microrganismos simbiotes, entre outros (SILVA, 2013).

Ainda, a complexidade química dos milhares tipos de produtos naturais os permitem ser subdivididos em classes específicas, de acordo com determinadas características em comum, como estrutura química, rotas sintéticas e entre outros (DEWICK, 2009). Outrossim, o metabolismo secundário é responsável pela síntese de três principais grupos de metabólitos: os *compostos fenólicos* (que abrangem, dentre diversas substâncias, os flavonoides, ligninas e taninos); os *terpenos* (constituídos principalmente de óleos essenciais, saponinas e carotenóides); e os *alcalóides* (compostos que apresentam um átomo de nitrogênio compondo um anel, derivados de aminoácidos aromáticos) (PERES, 2004).

Muitas vezes tais produtos naturais apresentam uma bioatividade sobre outras espécies de organismos vivos. Logo, para estes tipos de metabólitos bioativos que apresentam uma função farmacológica sobre patógenos associados a doenças que acometem o homem, foi designado uma nova nomenclatura, denominando-os de fitofármacos que, segundo Simões et al. (2010), “são substâncias extraídas de plantas, que apresentam atividade farmacológica, podendo ou não apresentar aplicação terapêutica”.

3.2 ESTUDO FITOQUÍMICO BIOMONITORADO DE PLANTAS MEDICINAIS

O estudo fitoquímico de plantas medicinais refere-se a um processo científico da área de química de produtos naturais que possui diversas aplicações práticas. A elucidação estrutural e estudo farmacológico de fitofármacos de espécies medicinais caracteriza-se como um exemplo fundamental para a farmacopéia, uma vez que propicia os avanços tecnológicos de

produção de novos fármacos e fitoterápicos (FERNANDES, 2020). Nesta perspectiva, o procedimento analítico experimental que envolve o isolamento e estudo das estruturas químicas e atividade biológica destes produtos naturais é chamado de estudo fitoquímico biomonitorado, referente à uma série de etapas experimentais que operam um determinado extrato vegetal proporcionando tal objetivo (HAVLIEK, SPIZEK, 2014).

A sequência experimental do estudo fitoquímico biomonitorado de um extrato vegetal envolve cinco fases principais: tratamento do material vegetal; preparação e estudo farmacológico do extrato; fracionamento e estudo farmacológico das frações do extrato; isolamento das frações bioativas e determinação estrutural dos fitofármacos isolados (RUSSEL, 2008).

A primeira fase do estudo, portanto, referente ao tratamento do material vegetal, diz respeito aos procedimentos de coleta e secagem da matéria prima vegetal. Em termos técnicos, a coleta da espécie vegetal deve ser realizada considerando-se os fatores extrínsecos do ambiente que induzem uma maior produção dos metabólitos de interesse, como o local e horário de coleta, estação do ano e etc (SIMÕES et al., 2010). A segmentação da fração vegetal também refere-se a um fator importante, uma vez que proporciona uma maior superfície de contato com o solvente extrator, corroborando para uma maior eficiência da extração. Reações de oxidação e degradação são indesejáveis para esta operação, podendo ocorrer quando se tem uma exposição indevida da droga vegetal com o ar ou na ocorrência de rupturas dos tecidos vegetais (HAVLIEK, SPIZEK, 2014).

A secagem da fração vegetal, por sua vez, também pode apresentar vantagens para o procedimento de extração (a depender das características dos produtos naturais que se desejam ser extraídos). Isto pois, ao se diminuir o conteúdo de água é corroborada a concentração preliminar dos metabólitos, bem como há o retardamento da degradação destes (pois evita o crescimento microbiano, reações enzimáticas e paralelas) (LEITE, 2009).

Seguidamente, há o preparo do extrato vegetal, do qual deve ser realizado de acordo com as características químicas dos produtos naturais de interesse e objetivos de análise. São diversos os métodos existentes de extração, sendo que a escolha do método mais adequado a ser utilizado depende diretamente de alguns fatores primordiais, como a sua eficiência, natureza da espécie vegetal de partida, tipo de interesse de obtenção (completa ou parcial) dos metabólitos, bem como as respectivas estabilidades destes (TOMASI, 2021). Nesta operação, para melhor eficiência de extração, na escolha do solvente extrator ideal, devem ser levadas em consideração as afinidades químicas deste com os metabólitos de interesse, bem como as constantes dielétricas entre soluto e solvente devem ser semelhantes. Ainda, fatores como pH,

temperatura, agitação e tempo de extração também são primordiais neste procedimento, os quais são capazes de alterar diretamente a seletividade do processo e efetividade de extração das substâncias de interesse (LEITE, 2009).

As técnicas extrativas, nesta perspectiva, baseiam-se em operações unitárias de transferência de massa, das quais são aplicadas ao fenômeno de difusão. Assim, os componentes químicos de interesse são retirados da matéria-prima vegetal por intermédio de sua afinidade química com o solvente selecionado. Tal matéria, portanto, pode ser extraída com a aplicação de diferentes mecanismos, sejam eles a frio (como a maceração, percolação e turbo-extração) ou a quente (a exemplo da infusão, decocção e Soxhlet). Ainda, estes procedimentos são classificados quanto à sua capacidade de esgotamento do vegetal, sendo eles exaustivos, dos quais retiram quase a totalidade da substância desejada, ou não exaustivos, cuja extração é parcial (SIMÕES et al., 1999). A tabela 1 correlaciona alguns dos variados métodos extrativos comumente utilizados com a sua classificação de eficiência de extração.

Tabela 1 - Relação entre alguns métodos extrativos com sua capacidade de esgotamento da matéria-prima vegetal

Tipos de extração	Métodos
Exaustivo	Percolação
	Turbo-extração
	Soxhlet
Não exaustivo	Maceração
	Infusão
	Decocção

Fonte: Adaptado de Tomasi (2021)

Posteriormente, um estudo preliminar da bioatividade do extrato é necessário para dar prosseguimento às análises dos metabólitos que o compõem, de forma a verificar se realmente há a existência de fitofármacos nele. Para tal, o extrato preparado é submetido a testes biológicos *in vitro* que analisam sua atividade contra um referido patógeno de interesse de estudo farmacológico (HAVLIEK, SPIZEK, 2014).

Caso o extrato apresente uma atividade positiva contra o patógeno de interesse, mesmo que em baixo teor, é interessante promover o fracionamento deste, de maneira a investigar quais de suas frações apresentam os fitofármacos responsáveis pela atividade biológica testada. Segundo Russel (2008), o fracionamento do extrato vegetal diz respeito ao processo de

separação das substâncias presentes no conjunto de metabólitos extraídos na etapa anterior de extração. Nesse sentido, este processo é conjuntamente realizado com um monitoramento por ensaios biológicos, a fim de se direcionar as operações de fracionamento para isolar os compostos de interesse das frações que apresentam atividade positiva contra o patógeno de estudo (SIMÕES et al., 2010).

Atualmente, o monitoramento e os processos de fracionamento dos extratos vegetais vêm sendo realizados por intermédio de técnicas instrumentais cromatográficas, que podem ou não ser hifenadas a métodos espectroscópicos e espectrométricos de análise, os quais possibilitam a elucidação estrutural dos constituintes químicos do extrato (RUSSEL, 2008).

Primordialmente, a separação física dos componentes químicos presentes nos extratos faz-se necessária para então a posterior elucidação estrutural das moléculas de interesse (PERES, 2004). À vista deste fator, a cromatografia é um processo físico-químico efetivo de separação, na qual as substâncias a serem segregadas distribuem-se gradualmente em duas fases: uma fase estacionária (que pode ser um composto sólido ou líquido acondicionado em uma coluna) e uma fase móvel (seja ela um solvente líquido ou um gás de arraste). Dessa forma, em seu princípio, as diferentes interações dos compostos químicos presentes na amostra com as fases móvel e estacionária proporcionam um diferente grau de velocidade de eluição, que varia em conformidade com os graus de afinidade química das espécies. São diversos os tipos e classificações das técnicas cromatográficas de análise, que variam desde a composição da fase estacionária até o mecanismo de partição dos componentes da amostra pela fase móvel. Ao final do processo, para a cromatografia planar, é possível determinar os fatores de retenção de cada substância eluída, enquanto que para a cromatografia em coluna (seja gasosa ou líquida), é obtido um espectro cromatográfico que quantifica os tempos de retenção de cada substância eluída na amostra (COLLINS et al., 2006).

Para o estudo em questão, a Cromatografia em Camada Delgada (CCD), por se tratar de um método eficiente, versátil e relativamente rápido, é utilizada principalmente com o objetivo de promover uma caracterização prévia dos produtos naturais e marcadores químicos do extrato a ser analisado (MOREIRA *et. al.*, 2010). Nesta técnica, a fase estacionária constitui-se de uma camada fina formada por um sólido granulado (seja ele sílica, alumina, poliamida, etc.). Tal sólido é depositado sobre um suporte inerte, podendo ser uma placa de vidro ou de alumínio. Logo, pequenas gotas de solução das amostras do analito são aplicadas em um ponto inferior da placa, deixando-a secar, para então colocá-la em um recipiente contendo a fase móvel. A polaridade de tal solvente, por sua vez, deverá ser de acordo com as propriedades do analito. Como somente a base da placa fica submersa, o solvente começa a arrastar os analitos pela fase

estacionária, sob efeitos de capilaridade, de acordo com seu grau de afinidade. Assim, deixa-se secar a placa após o deslocamento da fase móvel sobre ela, revelando-a posteriormente com um reativo que é capaz de colorir as substâncias de interesse (COLLINS et al., 2006).

Ainda, conjuntamente com a caracterização preliminar promovida pela CCD, podem ser realizadas também reações fitoquímicas qualitativas dos extratos das plantas, das quais referem-se à reações colorimétricas e de precipitação que visam a identificação preliminar das classes de metabólitos secundários extraídos nos extratos (SIMÕES et al., 2010).

Para fins de fracionamento dos metabólitos secundários presentes nos extratos vegetais, é empregada a técnica de Cromatografia Líquida em Coluna, bem como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em escala preparativa. Nesse sentido, na Cromatografia Líquida em Coluna, os extratos vegetais são submetidos à uma coluna preparativa de fracionamento, onde ao apresentarem diferentes graus de interação entre fase móvel e estacionária selecionada, há a separação dos componentes do extrato em diferentes tempos de retenção, sendo, portanto, coletados em recipientes individuais à medida que saem da coluna. Esses eluentes coletados em diferentes recipientes contêm os componentes fracionados do extrato vegetal. Após a primeira corrida, tais eluentes podem ser submetidos a uma nova coluna cromatográfica ou a técnicas de fracionamento adicionais, como a CLAE em escala preparativa por exemplo, para se obter frações mais puras ou separar componentes mais complexos (RUSSEL, 2008).

A elucidação estrutural dos componentes fracionados dos extratos vegetais, por sua vez, pode ser realizada mediante o emprego das técnicas instrumentais hífenadas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplada à um Espectrômetro de Massas (EM), bem como com a técnica Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM). Tais métodos hífenados são amplamente empregados em laboratórios analíticos de diversas áreas, justamente por sua rapidez, alta seletividade e sensibilidade (MOREIRA et al., 2010). À vista disso, a técnica de CG-EM é utilizada principalmente para caracterização de compostos voláteis dos extratos, empregando-se um gás de arraste como fase móvel que deve ser compatível com o seu respectivo detector. Já para amostras vegetais cujos componentes são não voláteis, a técnica de CLAE-EM é uma boa opção, já que possibilita a análise de metabólitos não voláteis. Este método, por sua vez, utiliza colunas metálicas contendo as partículas extremamente finas e empacotadas na fase estacionária (cuja composição pode variar de acordo com as características dos componentes da amostra), oferecendo a devida resistência para o fluxo de alta pressão da fase móvel. Logo, nas colunas, tais componentes da mistura complexa são separados e eluídos em diferentes tempos de retenção, cuja alta pressão e eluição isenta de

pulsos garantem uma rápida velocidade e eficiência de separação da mistura homogênea que constitui a amostra na coluna cromatográfica. Assim, após a eluição dos componentes nas colunas, as substâncias separadas em diferentes tempos de retenção são ionizadas, gerando-se íons e seus respectivos fragmentos, dos quais são acelerados em diferentes velocidades pela aplicação de uma voltagem, proporcionando sua identificação proporcionais à razão massa/carga (m/z) dos íons (COLLINS *et. al*, 2006).

Com o fracionamento do extrato, por Cromatografia Líquida em Coluna ou pela técnica de CLAE em modo preparativo, as frações então são encaminhadas para os respectivos testes biológicos *in vitro* com intuito de averiguar quais destas apresentam atividade positiva contra o patógeno de estudo farmacológico. Em caso de resultado satisfatório, prossegue-se à quarta e quinta fase do estudo, onde se dá continuidade às operações de fracionamento a fim de se isolar e purificar os componentes químicos responsáveis por tal atividade. A purificação final dos fitofármacos, portanto, geralmente é acompanhada de técnicas apropriadas como recristalização, sublimação ou até mesmo destilação. Assim, elucidação estrutural das substâncias é viabilizada, podendo ser efetuada mediante a aplicação de técnicas espectroscópicas, como espectroscopia na região do Ultravioleta Visível (UV-Vis), espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e até mesmo Espectrometria de Massas (EM) (RUSSEL, 2008).

4 METODOLOGIA

4.1 PROCEDIMENTOS GERAIS ESTUDADOS PARA ANÁLISE DE EXTRATOS VEGETAIS

4.1.1 Amostragem e tratamento do material vegetal

As amostras de espécies de plantas utilizadas nas pesquisas do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos do Instituto René Rachou são oriundas de suas coletas em regiões específicas de estudo dos respectivos projetos de pesquisa do grupo. Ressalta-se ainda que os procedimentos de coleta são executados conforme as descrições da bibliografia de Simões et al. (2010), executando-os de maneira sistemática, por intermédio da retirada de ramos, folhas e frutos, cortados a aproximadamente 30 cm do solo, e aparentemente isentos de parasitas ou demais microrganismos indesejados.

Seguidamente, é necessário a realização de um registro a respeito do tipo de amostra que será estudada pelo grupo de pesquisa, bem como os respectivos dados de sua coleta. Tal registro, por sua vez, é efetuado em biblioteca virtual, bem como nos livros de registro do grupo.

Nesta perspectiva, de posse dessas amostras, torna-se necessário a efetuação de um tratamento do material vegetal, do qual envolve os procedimentos de secagem e fracionamento. O processo de secagem, em geral, é somente usual para alguns tipos de material vegetal, a depender dos objetivos de análise, e pode ser realizado utilizando-se uma estufa de secagem à temperatura aproximada de 50°C, por um determinado período de tempo até que a massa do material vegetal permaneça constante e sem decaimentos, ou mantendo-se a fração vegetal secando naturalmente à temperatura ambiente por um período de tempo.

Em seguida, o fracionamento dos respectivos materiais vegetais faz-se necessário com a finalidade de aumentar a superfície de contato destes com o solvente extrator a ser utilizado na preparação dos extratos. Para tal, com o auxílio de uma tesoura de poda, picota-se o material vegetal de maneira homogênea, reservando-os em placas Petri ou vidros de relógios, previamente tarados, para posterior aferição de sua massa nas balanças analíticas Marca Sartorius (modelo BP211D; carga máxima de 180g; precisão de $\pm 0,00001$ g) e Marca Shimadzu (modelo UX6200H; carga máxima de 6200g; precisão de $\pm 0,01$ g) previamente calibradas. Outrossim, a verificação da calibração da balança, por intermédio da aferição dos seus respectivos pesos metálicos de referência é essencial nas análises cotidianas do laboratório, uma vez que por se tratarem de análises quantitativas, é preciso garantir a confiabilidade dos dados.

4.1.2 Procedimentos de preparação dos extratos

Tendo em vista os materiais vegetais, anteriormente pesados e fracionados, é efetuado o processo de extração de seus metabólitos bioativos de interesse. Em geral, as técnicas extrativas empregadas no Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos (QPNB) são, primordialmente, a maceração e a extração por Soxhlet.

O processo de maceração, portanto, consiste em uma técnica não exaustiva de extração, baseada em manter a matéria prima vegetal em contato com o líquido extrator, em um recipiente fechado ao abrigo de luz. O sistema em questão deve ser submetido à temperatura ambiente, sob agitação ou não, em um período de tempo pré-estabelecido. A figura 2, descrita abaixo, exemplifica um sistema de maceração.

Figura 2 – Exemplo de sistema de maceração



Fonte: Autoria própria (2023)

Como observação, ressalta-se ainda que, para se obter uma melhor pureza dos solventes utilizados nos extratos em maceração, um processo de destilação deste solvente extrator pode ser efetuado, utilizando-se uma montagem clássica de destilação fracionada, descrita pela bibliografia de Engel et al. (2011), e montagem ilustrada pela figura 3.

Figura 3 – Sistema de destilação fracionada em série

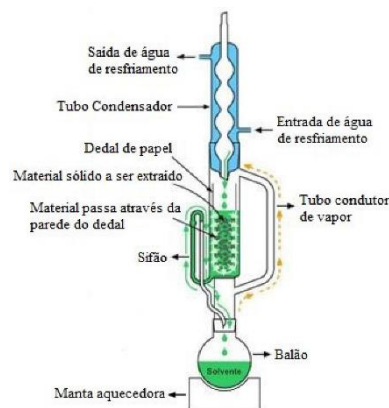


Fonte: Autoria própria (2023)

Por outro viés, a extração por Soxhlet, cujo instrumento é evidenciado na figura 3, caracteriza-se por constituir-se de uma técnica de destilação. Nesse sentido, é um procedimento

realizado a quente, cujo solvente extrator volátil é capaz de extrair os analitos de interesse, de acordo com suas afinidades químicas. Em sua montagem, a matéria prima vegetal é empacotada e inserida em uma câmara extratora do aparelho, enquanto o solvente extrator é submerso a um balão de destilação, sob aquecimento. Ao entrar em ebulição, os vapores do solvente extrator são liquefeitos ao atingirem a coluna de condensação, sendo depositados sobre os constituintes vegetais inseridos no aparelho de Soxhlet. Os componentes a serem extraídos, por sua vez, são transferidos ao solvente liquefeito e retirados do equipamento por meio da abertura do sifão localizado na lateral do referido aparelho. Para o reaproveitamento deste ciclo de destilação, o líquido extrativo é retornado ao balão de destilação, garantindo assim uma maior eficiência do processo e concentração das substâncias de interesse (JENSEN, 2007). Ao final, registra-se o número de ciclos efetuados durante o processo, que depende diretamente do tempo de extração gasto durante o sistema.

Figura 3 - Instrumentação da destilação por Soxhlet.



Fonte: Costa et al. (2022)

Ainda, para ambos os tipos de extração, a escolha do solvente extrator deve ser feita de maneira minuciosa, uma vez que suas características químicas interferem diretamente nos tipos de metabólitos a serem extraídos. Logo, deve-se consultar na literatura as características de polaridade e afinidade química do solvente extrator de forma a serem compatíveis com os metabólitos secundários que se desejam extrair, verificando se estes caracterizam-se como metabólitos de baixa, média ou alta polaridade, escolhendo-se tal solvente em função destes parâmetros.

4.1.3 Concentração dos extratos

Após os procedimentos de extração dos metabólitos secundários dos materiais vegetais de estudo, a remoção dos respectivos solventes é realizada empregando-se um aparelho de rotaevaporador (BUCHI Waterbath B-480). O processo de concentração dos extratos, portanto,

é efetuado baseando-se na literatura de Engel et al. (2011), onde deve-se inserir o extrato a ser concentrado em um balão de rotavapor, acoplado à um banho maria à temperatura aproximada de 45°C, com rotação constante para homogeneização do aquecimento. Uma bomba de vácuo é associada ao aparelho a fim de promover uma destilação do solvente sob condições de vácuo, garantindo uma menor temperatura de ebulição do solvente a ser destilado e depositado no balão de destilação. A montagem do sistema de rotaevaporação dos extratos é ilustrada na figura 4.

Figura 4 – Montagem do sistema de concentração por rotaevaporador

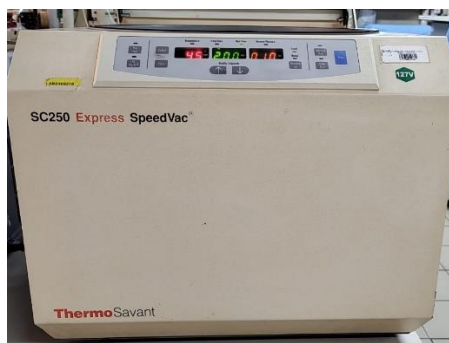


Fonte: Autoria própria (2023)

Ainda, a concentração do extrato deve controlada de maneira a deixar somente uma pequena fração deste no balão de rotaevaporador. Ressalta-se que, para concentração de extratos diferentes, deve-se realizar uma limpeza e ambiente das vidrarias com os respectivos solventes a serem destilados.

Ao final do processo, com o auxílio de uma pipeta, faz-se a transferência quantitativa de cada extrato concentrado para tubos de cintilação, devidamente etiquetados e tarados, dos quais são encaminhados para uma centrífuga à vácuo (Marca Thermo Fisher Scientific), ilustrada na figura 5, para retirada do solvente remanescente. Neste processo, deve-se alinhar os tubos equivalentes de massas iguais em direções opostas na disposição da centrífuga, a fim de promover um eficiente processo de centrifugação, sem trepidações do sistema. A configuração de uma temperatura aproximada de 45°C, alinhada com uma baixa pressão de vácuo, promove então a retirada do solvente remanescente dos tubos de cintilação, do qual é condensado e encaminhado para um recipiente coletor. Como observação, ressalta-se que alguns tipos de solvente extrator não podem ser adicionados à centrífuga de vácuo, devido à sua menor densidade. Nestes casos, os tubos de cintilação devem permanecer abertos em capela de exaustão para a evaporação dos solventes remanescentes.

Figura 5 – Centrífuga de Vácuo Savant



Fonte: Autoria própria (2023)

4.1.4 Caracterização qualitativa dos extratos

A caracterização qualitativa do perfil dos extratos das plantas estudadas no laboratório de QPNB do Instituto René Rachou é feita, primordialmente, por técnicas de cromatografia e de reações fitoquímicas colorimétricas.

As reações colorimétricas referem-se à uma técnica preliminar de identificação das classes de metabólitos secundários, das quais dão indícios da existência de grupos como alcalóides, flavonóides, terpenos, cumarinas, saponinas, e entre outros. Como procedimento prático, para a identificação de cada classe de produtos naturais são utilizados os reagentes químicos específicos de reação descritos pela bibliografia de Simões et al. (2010). Logo, com o intuito de se obter uma melhor identificação destas classes de metabólitos, é empregada a técnica de Cromatografia por Camada Delgada (CCD).

Nesse sentido, para esta técnica, como fase estacionária, utiliza-se placas cromatográficas de Sílica gel 60 F₂₅₄ (Marca Merck Millipore), recortadas geralmente em dimensões de 10 x 10 cm, e com marcação à lápis do ponto final de eluição. Anteriormente à aplicação em capilar dos extratos, verifica-se também a existência de impurezas em cada uma das placas, ao inseri-las em um espectofotômetro de incidência de raios Ultravioleta, em comprimentos de onda de 366 nm. Posteriormente, solubiliza-se completamente os extratos com seus respectivos solventes extratores, de forma a obter uma concentração aproximada de 1 mg de extrato para 1 mL de solvente. Faz-se em seguida a aplicação destes nas placas cromatográficas com o auxílio de um tubo capilar, aplicando-se, em geral, 3 bandas dos extratos processados no canto inferior da respectiva fase estacionária.

Como fase móvel, pesquisa-se primeiramente uma metodologia baseada nas instruções descritas por Wagner e Bladt (2001), de forma a determinar o melhor tipo de solução eluente e revelador para caracterização dos metabólitos de interesse. Determinada a metodologia de eluição, prepara-se a solução da fase móvel, bem como a solução de revelação (se necessário),

adicionando a fase móvel em uma cuba de vidro cromatográfica. Em seguida, posiciona-se a placa cromatográfica na parede da cuba, e aguarda-se a eluição do solvente, até o ponto final de eluição marcada na placa. Ao final, faz-se a revelação da placa cromatográfica utilizando-se um borrifador e o respectivo revelador. Em alguns casos, a leitura da placa deve ser feita adicionando-se um aquecimento ou deve ser vista por meio de a aplicação de uma luz ultravioleta (com o auxílio de um espectrofotômetro de ultravioleta).

A análise do perfil químico da placa, portanto, é efetuada calculando-se o tempo de retenção de cada produto natural revelado, comparando-os posteriormente com a bibliografia presente no livro de Wagner e Bladt (2001).

4.1.5 Fracionamento e caracterização dos extratos

Posteriormente à caracterização qualitativa dos extratos estudados no Laboratório de Química de Produtos Naturais, faz-se necessária uma caracterização destes, bem como a realização de seu fracionamento. Ambos os processos, nesse sentido, podem ser efetuados aplicando-se as técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) por impacto eletrônico, para o caso de detecção de componentes voláteis dos extratos das plantas estudadas, ou com a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas (CLAE-EM).

Na aplicação da técnica de CG-EM por impacto eletrônico, em geral, é estabelecido primeiramente uma metodologia de análise, baseada em referências bibliográficas preliminares sobre eluições cromatográficas da planta a ser analisada. Em geral, utiliza-se o Hélio como gás de arraste, juntamente com a utilização de uma coluna capilar de composição a ser selecionada de acordo com a metodologia de análise escolhida. Logo, para seu procedimento de análise, adiciona-se uma pequena quantia do extrato concentrado a um tubo de vials. Em seguida, faz-se a diluição da amostra, ao acrescentar-se 1 mL do solvente estabelecido na metodologia de análise. Adiciona-se o tubo de vials contendo a amostra diluída em um amostrador automático. Assim, ao programar o equipamento, o injetor automático é responsável por promover a limpeza da seringa, com respectivos solvente de limpeza, bem como a ambientação e purga da amostra. À posteriori, o programa efetua automaticamente a injeção da amostra, primeiramente para a pré-coluna com um split de 100:1, e seguidamente para a coluna cromatográfica de fase estacionária, cuja composição depende da metodologia de análise selecionada. Em seguida, programa-se uma eluição da amostra, com aplicação ou não de um gradiente de temperatura, a depender da metodologia escolhida. Após a eluição, os componentes da amostra, separados em diferentes tempos de retenção, são encaminhados para o Espectrômetro de Massa por Impacto

Eletrônico. Logo, em geral, aplica-se um feixe de elétrons de energia de 70eV, com o objetivo de ionizar e fragmentar a matriz. Ao final, obtém-se um cromatograma associado aos espectros de massa da espécie aromática analisada, que deve ser posteriormente analisado e comparado com a bibliografia.

A caracterização e fracionamento de amostras não voláteis, no entanto, é feita aplicando-se a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-EM). Em geral, os extratos do laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos são submetidos ao Cromatógrafo Líquido de Ultra Alta Eficiência (UHPL) acoplado por um Espectrômetro de Massas por Tempo de Vôo (TOF). Nesse sentido, nas análises, os tipos de eluição podem ser feitos em fase normal ou reversa, com solventes de altíssima pureza. O tipo de análise, bem a composição das fases móvel e estacionária, assim como nas análises por CG-EM, são estabelecidos previamente tendo como base bibliografias anteriores da planta de interesse analítico. Em geral, nesta técnica, a preparação da amostra é feita empregando-se uma pequena porção do extrato vegetal e solubilizando-o em DMSO. O processo de injeção automática é feito de maneira similar ao do Cromatógrafo Gasoso, com limpeza e ambientação da seringa, bem como a purga da amostra, seguida da aplicação de um split de 100:1. A programação do cromatógrafo pode ser feita de maneira isocrática ou em gradiente (dependendo da metodologia). Logo, ao final da eluição, as substâncias separadas em diferentes tempos de retenção são ionizadas, gerando-se íons e seus respectivos fragmentos, dos quais são acelerados em diferentes velocidades pela aplicação de uma voltagem, proporcionando sua identificação pelos respectivos tempos de vôo proporcionais à razão massa/carga (m/z) dos íons. Em seguida, de maneira similar ao processo de análise por GC-MS, também é gerado um cromatograma da análise com os respectivos espectros de massa dos componentes do extrato, que devem ser estudados e comparados com a literatura.

4.1.6 Testes biológicos para avaliação da bioatividade

De posse dos extratos concentrados e fracionados, a avaliação de suas bioatividades é feita por intermédio de testes de bioensaios de plaqueamento para triagem *in vitro* de drogas, bem como ensaios *in vitro* de IC_{50} , dos respectivos patógenos de interesse. No caso do Laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos do Instituto René Rachou, os extratos vegetais brutos ou fracionados são encaminhados para a Plataforma de Bioensaios para Triagem de Drogas da Rede de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz, que envolvem a triagem de drogas anti - *Trypanosoma cruzi*, anti - *Plasmodium falciparum* ou anti - *Leishmania amazonenses*.

Logo, as análises biológicas são realizadas no laboratório de bioensaios, cujos resultados são encaminhados para o QPNB.

Em caso de resultado positivo para os extratos brutos ou suas frações, é necessário dar continuidade aos procedimentos de fracionamento, descritos anteriormente, a fim de se isolar e purificar os componentes químicos responsáveis por tal atividade. Logo, a purificação final dos fitofármacos, geralmente é realizada por intermédio de técnicas como recristalização, sublimação ou até mesmo destilação, enquanto a elucidação estrutural das substâncias pode ser efetuada mediante a aplicação de técnicas espectroscópicas e espectométricas.

4.2 EXEMPLIFICAÇÃO DE ESTUDOS FITOQUÍMICOS REALIZADOS

A exemplificar os procedimentos gerais descritos anteriormente, apresenta-se neste relatório algumas metodologias realizadas para as análises preliminares feitas para as espécies *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br e *Jacaranda mimosifolia*, D. Don.

4.2.1 *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br.

A *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. (figura 7) refere-se à uma espécie da família Verbenaceae, da qual é originária do continente América do Sul. No Brasil, esta planta está presente em todo território, sendo popularmente conhecida como erva cidreira, erva cidreira de folha, falsa-melissa, alecrim do campo e entre outros (CARVALHO, 2006).

Figura 7 - *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br.



Fonte: Autoria própria (2022)

Dentre os principais empregos desta espécie na medicina tradicional, é destacado na literatura o seu uso com ação anti-inflamatória, antigripal, analgésica, bem como sua indicação para cólicas intestinais e problemas de hipertensão. Quanto a sua atividade no Sistema Nervoso Central, popularmente a *Lippia alba* é descrita por apresentar características sedativas e atividades ansiolíticas e entre outras (CARVALHO, 2006).

Segundo o estudo descrito por Hennebelle et al. (2008) existem na literatura algumas pesquisas com o intuito de isolar e identificar os principais metabólitos secundários presentes nas espécies de *Lippia*. Nesse sentido, as análises sobre este referido gênero identificaram a presença de alguns terpenos, sendo um dos principais o linalol, bem como substâncias flavonóidicas. No caso da *Lippia alba*, em especial, é mencionada a detecção de linalol, limoneno, geranial, geraniol, carvona, β -cariofileno, piperitona, p-cimeno, citral, mirceno e γ -terpineno, e entre outras substâncias. Ainda, a presença de ácidos fixos, compostos aminados, esteróides e/ou triterpenos, fenóis e heterosídeos antociânicos também é relatada em estudos preliminares (HENNEBELLE et al. 2006).

Quanto à atividade farmacológica desta presente espécie, já foram demonstradas pela literatura a sua potencial ação antioxidante, antimicrobiana, protetora de mucosa gástrica e analgésica. Ainda, um resumo feito por Carvalho (2006) demonstrou um reconhecimento da atividade central da *Lippia alba*. Dentre os efeitos destacados pelo estudo, a atividade sedativa e anticonvulsivante foram as mais evidenciadas por estudos em testes *in vivo* em populações de camundongos, em conformidade com algumas das indicações descritas pela medicina tradicional. Relata-se ainda que estes dois efeitos possivelmente podem estar, respectivamente, atrelados à presença de flavonoides e alguns compostos voláteis como citral, beta-mirceno e limoneno (CARVALHO, 2006). Outrossim, autores como Hennebelle et al. (2008) e Antoun et al. (2001) trazem citações sobre a atividade biológica desta espécie contra o protozoário *Plasmodium falciparum*, parasita este responsável pela transmissão da doença endêmica da Malária.

À vista disso, para o trabalho deste relatório em questão, foi efetuado um estudo fitoquímico preliminar de uma amostra de folhas de *Lippia alba*, coletada sob as coordenadas geográficas de 19°57'5.633S e 43°59'43.631W. Nesse sentido, a droga vegetal foi submersa à um processo de maceração empregando-se etanol P.A como solvente extrator e um tempo de sete dias, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse período, o extrato etanólico foi filtrado e transferido para frascos de cintilação, previamente etiquetados e tarados, sendo posteriormente levado à secura em centrífuga a vácuo Savant. Em seguida, o respectivo extrato foi caracterizado preliminarmente por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), em placa cromatográfica de sílica gel F₂₅₄ (marca Merck Millipore), de forma a obter um perfil qualitativo de suas classes de metabólitos secundários.

Em primeiro plano, foi efetuada uma primeira eluição utilizando-se uma fase móvel composta por acetato de etila/ ácido fórmico/ ácido acético glacial/ água (100:11:11:26), com revelação pelo Reagente de produtos Naturais – Polietileno glicol e visualização em incidência

de raios Ultravioleta de comprimentos de onda de 366nm. A aplicação da amostra na placa, por sua vez, foi realizada mediante sua solubilização total em etanol P.A e aplicação capilar em bandas com o auxílio de um tubo capilar. Uma segunda eluição da amostra foi realizada de maneira a identificar a presença de metabólitos secundários de caráter ligeiramente menos polares, utilizando-se uma fase móvel composta por tolueno e acetato de etila, em proporções de (93:7) e revelação em vanilina sulfúrica e aquecimento.

Posteriormente à esta caracterização fitoquímica preliminar, o extrato etanólico bruto de *Lippia alba* foi encaminhado para o Laboratório de Bioensaios do Instituto René Rachou, de maneira a realizar uma triagem de ensaios de drogas anti - *Trypanosoma cruzi*, anti - *Plasmodium falciparum* e anti - *Leishmania amazonense*. Em primeiro plano, portanto, foi efetuado um ensaio de triagem *in vitro* sobre as formas amastigota e tripomastigota dos protozoários em questão. Em seguida, para a confirmação desta atividade, o extrato foi encaminhado para os bioensaios de IC₅₀ , CC₅₀, índice de seletividade e citotoxicidade.

4.2.2 *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

O *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (figura 10), popularmente conhecido como jacarandá, caroba e bolacheira, é uma espécie pertencente à família Bignoniaceae, considerada uma árvore de médio porte com altura variável de 3-10 metros. De característica apícola, tal espécie é utilizada principalmente na arborização e ornamentação de ruas, justamente devido a beleza das flores arroxeadas (ARRUDA et al., 2012).

Figura 10 - *Jacaranda cuspidifolia* Mart.



Fonte: Autoria própria (2023)

Quanto à suas propriedades farmacológicas, é relatado em bibliografias propriedades inseticidas da raiz desta espécie, sendo ela utilizada no tratamento contra sarna. Além disso, o *J. cuspidifolia* é classificado como depurativo do sangue e empregado em infecções bacterianas, principalmente contra sífilis e blenorragia (ARRUDA et al., 2012). As cascas, madeira e folhas

desta árvore também são popularmente utilizadas no combate à febre. Prado et al. (2022) também cita o uso tradicional desta espécie por suas atividades antimalárica, antitumoral, antiviral, antirreumática, antifúngica, antiinflamatória, antineoplásica e antiulcerativa.

Um estudo fitoquímico de extratos etanólicos das folhas e caules da espécie de *Jacarandá cuspidifolia*, feito por Amâncio (2019), detectou a presença de flavonoides, cumarinas, terpenos e esteróis, e um dímero feniletanóide. De acordo com o autor, há a detecção de uma maior variedade de flavonoides nas folhas que nos caules, mostrando ser esta classe de metabólito secundário mais presente na folhas neste gênero. Dentre os compostos identificados, destacam-se: naringenina no extrato etanólico do caule, além de apigenina e derivados glicosilados, isoquercitrina, luteolina, metoxiluteolina e derivado glicosilado.

De maneira análoga à espécie de *Lippia alba*, para o trabalho em questão, foi efetuado um estudo preliminar dos metabólitos secundários presentes em um extrato etanólico de folhas de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. A amostra foi coletada sobre as coordenadas de 19° 54' 11.033" S e 43° 58' 17.484" W. O extrato então foi preparado utilizando-se o método de maceração, permanecendo-se em repouso, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz, por um período de tempo de aproximadamente sete dias. Em seguida, realizou-se uma filtração à vácuo do conteúdo obtido, levando-o à secura pela utilização de uma rotavaporação, configurando o aparelho à temperatura de 45°C. Ao final, o extrato concentrado foi transferido, com o auxílio de uma pipeta de vidro, para tubos de cintilação previamente etiquetados e tarados, sendo submetidos à centrifugação à vácuo, pelo emprego da centrífuga Sanvant, até a sua total secura.

A caracterização preliminar dos metabólitos secundários presentes neste respectivo extrato foi realizada mediante o emprego da técnica de reações fitoquímicas colorimétricas. À vista disso, foram realizados testes fitoquímicos para identificação dos grupos de alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, saponinas e triterpenos/esteroides. Para cada classe de metabólitos a ser identificada, foram utilizados os reagentes específicos de identificação descritos pela bibliografia de Simões et al. (2010).

Em primeiro plano, pesou-se na balança analítica de precisão da marca Sartorius (modelo BP211D; carga máxima de 180g; precisão de $\pm 0,00001$ g) cerca de 100 mg da amostra de extrato seco em um béquer devidamente tarado, de forma a solubilizá-lo completamente com 50 mL de solução hidrometanólica (50:50). Em seguida, o extrato solubilizado foi subdividido em 6 porções iguais, em tubos de ensaios, dos quais foram submetidos aos respectivos testes de caracterização.

Nesta perspectiva, para o teste de identificação de alcaloides, no tubo de ensaio 1, contendo uma porção do extrato solubilizado, foi adicionado cerca de 2 mL de ácido clorídrico

(10%), de forma a manter o tubo sob aquecimento em banho maria por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se à solução 2 gotas do reativo de Dragendorff e observou-se a coloração da solução final.

O teste de identificação de flavonoides, por outro lado, foi baseado em sua reação com ácido sulfúrico concentrado. Nesta perspectiva, em um segundo tubo de ensaio contendo uma fração do extrato solubilizado, foi adicionado cerca de 2 mL de H₂SO₄ concentrado, sob agitação manual. Ao final, observou-se a coloração final da solução.

O teste para identificação de cumarinas foi baseado em sua reação com reagentes alcalinos. Logo, adicionou-se aproximadamente 2 mL de uma solução de hidróxido de sódio (10%) no extrato vegetal presente no tubo de ensaio 3. Agitou-se a solução e observou-se sua coloração final. Testou-se também a reação reversa para este teste, acrescentando-se no mesmo tubo de ensaio cerca 2 mL de ácido clorídrico (10%), e observou-se a variação da coloração da mistura.

A caracterização da presença de taninos no respectivo extrato, por sua vez, foi realizada conforme a descrição de sua reação de complexação com cloreto férrico. Dessa maneira, de acordo com os procedimentos descritos por Simões et al. (2010), adicionou-se na fração do extrato presente no tubo de ensaio 4 cerca de 2 mL de uma solução de cloreto férrico (10%), observando-se ao final se houve formação de um precipitado de coloração azulada.

Para o teste de saponinas, foi adicionado 2 mL de ácido clorídrico (10%), aquecido em banho maria, no extrato presente no tubo de ensaio 5. Após, aguardou-se o resfriamento da solução, e agitou-se-a vigorosamente, deixando-a em repouso por aproximadamente 20 minutos. Ao final, verificou-se se houve a formação ou não de espumas em um volume mínimo de 1 cm na solução final.

Por fim, a reação para a identificação de triterpenos e esteroides baseou-se na reação de Liebermann-Burchard. Assim, no tubo de ensaio 6, contendo uma porção do extrato solubilizado, adicionou-se cerca de 2 mL deste respectivo reagente e observou-se a coloração final da solução resultante.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br.

A caracterização preliminar das classes de metabólitos secundários presentes nos extratos etanólicos das folhas de *Lippia alba* foi viabilizada mediante o emprego da técnica de Cromatografia em Camada Delgada por duas eluições distintas. Neste sentido, utilizando-se uma fase móvel composta por acetato de etila/ ácido fórmico/ ácido acético glacial/ água (100:11:11:26), com revelação pelo Reagente de produtos Naturais – Polietileno glicol e visualização em incidência de raios Ultravioleta de comprimentos de onda de 366nm, tornou-se possível obter um panorama preliminar sobre a presença de compostos fenólicos, como flavonóides e cumarinas neste extrato. Isto pois, segundo Wagner e Bladt (2001), a utilização do revelador de Produtos Naturais é específica para a identificação de substâncias pertencentes à esta classe de metabólitos, uma vez que sua reatividade é específica para seus grupos reativos, gerando-se uma fluorescência em visualização em luz UV de 366 nm, que é intensificada pela adição conjunta do revelador Polietileno Glicol.

Nesse sentido, para esta caracterização, evidenciada na figura 8 da placa cromatográfica revelada, observou-se duas bandas de coloração azul de fatores de retenção iguais a 0,52 e 0,79, respectivamente, e uma banda de coloração verde de fator de retenção igual a 0,86. De acordo com Wagner e Bladt (2001), estas colorações, portanto, confirmam a presença de flavonóides glicosilados no extrato etanólico de *Lippia alba*, de forma que segundo os autores, o aparecimento de bandas de coloração verde refere-se principalmente a flavonas, enquanto bandas de coloração azuis referem-se à ácidos carboxílicos fenólicos. A presença destas substâncias observadas, portanto, é esperada uma vez que são relatos pelas pesquisas de Carvalho (2006) e Hennebelle et al. (2008) a existência de compostos flavonoides em extratos de folhas de *L. alba*.

Figura 8 – Revelação com revelador de Produtos Naturais – Polietileno glicol e luz UV 366nm da placa cromatográfica eluída por acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:26)



Fonte: Autoria própria (2023)

Os diferentes fatores de retenção também possibilitaram inferências sobre os aspectos de polaridade destes compostos observados, de forma com que a substância referente à banda de R_f igual a 0,52 apresentou-se uma afinidade relativamente maior com a sílica gel (de maior polaridade), do que com a fase móvel ligeiramente menos polar, indicando um caráter mais polar da estrutura de tal composto. A inferência oposta é equivalente para a substância observada com o fator de retenção igual a 0,86, do qual permaneceu-se pouco retido pela fase estacionária, induzindo-se de que sua estrutura apresenta um caráter menos polar.

Ademais, de maneira a identificar a presença de metabólitos secundários de caráter ligeiramente menos polares, a segunda eluição foi realizada com o extrato, utilizando-se uma fase móvel composta por tolueno e acetato de etila, em proporções de (93:7). O emprego desta fase móvel, de caráter menos polar do que a anterior, foi utilizada principalmente para a separação de terpenos, fenilpropanóides e seus derivados. Nesse sentido, com o intuito de se obter um panorama geral deste tipo de metabólitos presentes no extrato de *L. alba*, utilizou-se um revelador universal de vanilina sulfúrica com aquecimento da placa.

Nesta perspectiva, após a revelação da placa cromatográfica, evidenciada na figura 9, observou-se a presença de bandas de coloração violeta avermelhadas, com fatores de retenção iguais a 0,07, 0,18 e 0,68, respectivamente. De acordo com Wagner e Bladt (2001), esta coloração é típica de fenilpropanóides, o que levou a inferência da presença deste tipo de metabólito no extrato de *Lippia alba*. De maneira análoga à eluição anterior, a análise dos respectivos fatores de retenção das substâncias permitiu a inferência sobre os aspectos de polaridade destas, de forma com que àqueles que apresentaram menor R_f , e portanto permaneceram-se mais retidas pela sílica, apresentam caráter mais polar do que àquelas que

foram mais eluídas pela fase móvel. Assim como a detecção de flavonoides pela eluição anterior, a detecção de tais fenilpropanóides também é esperada para o extrato em questão, já que trata-se de uma classe de compostos já identificados em estudos por Carvalho (2006).

Figura 9 – Revelação com vanilina sulfúrica e aquecimento da placa cromatográfica eluída com tolueno e acetato de etila (97:3)



Fonte: Autoria própria (2023)

Posteriormente à esta caracterização fitoquímica preliminar, o resultado apresentado pelo respectivo extrato para a triagem de ensaios de drogas anti - *Trypanosoma cruzi*, anti - *Plasmodium falciparum* e anti - *Leishmania amazonense* sobre suas formas amastigota e tripomastigota, foi satisfatório somente para as células de *Plasmodium falciparum*. Segundo o laboratório, são consideradas ativas os extratos que apresentam atividade iguais ou superiores a 70%. Em seguida, nos testes biológicos de IC_{50} , CC_{50} , índice de seletividade e citotoxicidade para a confirmação desta atividade, a amostra apresentou um resposta para IC_{50} de $10,7 \pm 0,6$, CC_{50} de $48,2 \pm 2,6$, e índice de seletividade ($IS = CC_{50}/IC_{50}$) igual à 5. Neste sentido, o extrato apresentou-se como tóxico para as células avaliadas. No entanto, ainda é preciso avaliar a atividade das frações dos extratos, a fim de se verificar se há um resultado diverso para estes mesmos testes em cada fração do extrato da espécie. Esta etapa, contudo, ainda não foi realizada, visto que o fracionamento deste respectivo extrato ainda será feito em laboratório. Portanto, os resultados destas respectivas etapas ainda não poderão ser abordadas neste relatório.

5.2 *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

A caracterização preliminar dos metabólitos secundários presentes no extrato etanólico de folhas de *Jacarandá cuspidifolia* foi realizada mediante o emprego da técnica de reações fitoquímica colorimétricas, sendo efetuados testes fitoquímicos para identificação dos grupos de alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, saponinas e triterpenos/esteroides. Assim, como

resultados obtidos, foi identificado um teste positivo para flavonoides e cumarinas, conforme ilustra a tabela 2. A presença de flavonoides e cumarinas no respectivo extrato de *J. cuspidifolia* já é esperada, uma vez que referem-se à classes de substâncias citadas por Amâncio (2019). Contudo, o teste negativo para terpenos e esteróis entra em divergência com os estudos apontados para este mesmo autor, indicando a necessidade do emprego de outras técnicas de caracterização.

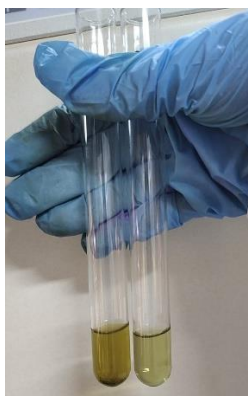
Tabela 2 – Resultados encontrados para o estudo fitoquímico colorimétrico para o extrato de *Jacaranda cuspidifolia* Mart.

Classe de metabólito	Reagente indicador	Resultado do teste colorimétrico
Alcaloides	Reagente de Dragendorff em meio ácido	-
Flavonoides	Ácido sulfúrico concentrado	+
Cumarinas	Hidróxido de sódio 10% (reação reversa com HCl 10%)	+
Taninos	Cloreto férrico 10%	-
Saponinas	Ácido clorídrico 10%	-
Triterpenos e esteroides	Reagente de Liebermann-Burchard	-

Fonte: Autoria própria (2023)

Nesta perspectiva, para o teste de identificação de alcaloides, seguiu-se a reação descrita por Simões et al. (2010). De acordo com os autores, as reações gerais para alcaloides consistem na formação de precipitados insolúveis, em meio ácido, com os reativos de Mayer, Dragendorff, ou Wagner. Segundo Simões et al. (2010), resulta-se um teste positivo os extratos que apresentarem a formação de um precipitado de coloração laranja avermelhado, oriundas da complexação de seus alcaloides com o reativo de Dragendorff. Para a amostra em questão, este resultado não foi observado, conforme ilustra a figura 11.

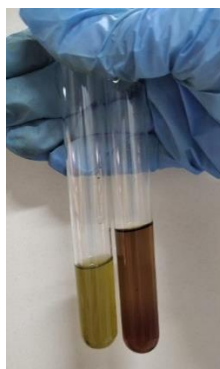
Figura 11 – Resultado negativo para o teste de alcaloides



Fonte: Autoria própria (2023)

O teste de identificação de flavonoides, por outro lado, foi baseado em sua reação com ácido sulfúrico concentrado. De acordo com a bibliografia, os compostos flavônicos formam sais de oxônio com ácido sulfúrico concentrado, que podem ou não ser precipitados pela adição de água. Nesse sentido, as flavonas e flavonóis formam soluções fortemente amareladas, enquanto as flavanonas apresentam-se na forma de sais de coloração laranja a vermelho. As chalconas e auronas são identificadas com coloração vermelho a carmim. Para o teste do extrato em questão, ao se adicionar o ácido concentrado, observou-se a formação de uma solução de coloração avermelhada, conforme evidenciada na figura 12, que indica um resultado positivo para presença desta classe de metabólitos. De fato, o resultado positivo para este teste já é esperado, uma vez que é citado pela bibliografia de Amâncio (2019) a existência deste tipo de produto natural em extratos de *J. cuspidifolia*. No entanto, com este teste preliminar ainda não é viável a identificação da estrutura química dos compostos flavonoides presentes, sendo necessário a utilização de outras técnicas elucidativas e confirmativas.

Figura 12 – Resultado positivo para o teste de flavonoides

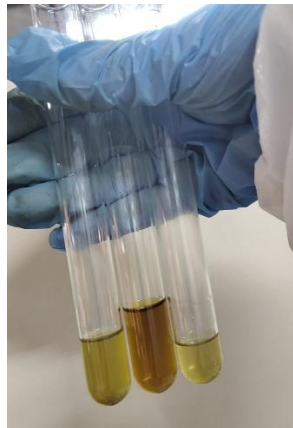


Fonte: Autoria própria (2023)

O teste para identificação de cumarinas, por outro lado, baseou-se na sua reação com reagentes alcalinos, dos quais são capazes de gerar o rompimento de seu anel lactônico, gerando-se uma solução de coloração amarela. Além disso, esta mesma reação pode ser revertida pela adição de uma solução ácida (SIMÕES et al., 2010). Nesta perspectiva, ao se adicionar aproximadamente 2 mL de uma solução de hidróxido de sódio (10%) no extrato em questão, observou-se a intensificação da coloração amarelada presente no extrato. No entanto, para se confirmar tal ocorrência, a adição de 2 mL de ácido clorídrico (10%) nesta solução proporcionou a reversibilidade da coloração original do extrato, indicando a presença desta classe de produtos naturais, por intermédio de sua reação com a solução alcalina. A figura 13 ilustra tal sequência reacional aplicada, justamente com as respectivas evidências

colorimétricas observadas. Assim como a detecção de flavonoides, a presença de cumarinas no extrato das folhas de *Jacaranda cuspidifolia* também é esperado, conforme é descrito pela bibliografia de Amâncio (2019).

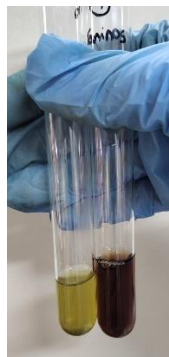
Figura 13 – Resultado positivo para o teste de cumarinas



Fonte: Autoria própria (2023)

A caracterização da presença de taninos no respectivo extrato, por sua vez, foi realizada conforme a descrição de sua reação de complexação com cloreto férrico. Dessa maneira, de acordo com Simões et al. (2010), os oxigênios das hidroxilas da estrutura química dos taninos são capazes de serem complexados pelo Fe^{3+} , de forma a gerar um complexo de coloração azul. No entanto, para a reação do extrato de Jacarandá, ao se adicionar 2 mL da solução de cloreto férrico (10%), não foi observada a formação deste complexo azul, como evidenciado pela figura 14, apenas observou-se uma mudança de coloração do extrato para vermelho castanho, cor esta respectiva da presença de ferro (III).

Figura 14 – Resultado negativo para o teste de taninos



Fonte: Autoria própria (2023)

As saponinas, por outro viés, são identificadas pela formação de espumas persistentes, de pelo menos um volume de 1 cm de formação, na presença de ácidos minerais diluídos (SIMÕES et al., 2010). Para o teste em questão, ao seguir os procedimentos práticos em sua

reação com ácido clorídrico (10%), foi observado a formação de uma pequena quantidade de espumas, conforme ilustra a figura 15. No entanto, este volume de espumas formado não foi o suficiente descrito pela literatura para a confirmação desta classe de metabólitos secundários.

Figura 15 – Resultado negativo para o teste de saponinas



Fonte: Autoria própria (2023)

Por fim, a reação para a identificação de triterpenos e esteroides baseou-se na reação de Liebermann-Burchard (reagente específico composto por anidrido acético e ácido sulfúrico concentrado). Segundo Simões et al. (2010), em sua reação com o respectivo reagente, os triterpenos desenvolvem uma coloração mutável com o tempo, enquanto que os esteroides desenvolvem uma coloração estável ao reagirem com o reagente de Liebermann-Burchard. Para o estudo em questão, observou-se um resultado negativo para estas classes de metabólitos secundários, uma vez que, ao se adicionar tal reagente no extrato solubilizado de Jacarandá, não se observou nenhuma mudança de coloração deste, conforme evidenciado na figura 16. Apesar de um resultado negativo, baseando-se na literatura de Amâncio (2019), é esperada a presença desta classe de metabólitos para o extrato etanólico da espécie em questão, indicando a necessidade de aplicação de outras técnicas confirmativas de caracterização do respectivo extrato.

Figura 16 – Resultado negativo para o teste de triterpenos e esteroides



Fonte: Autoria própria (2023)

Outrossim, ressalta-se que tais técnicas colorimétricas empregadas referem-se apenas à testes preliminares e não confirmativos de análise. Para se dar continuidade à caracterização dos metabólitos presentes no extrato etanólico da espécie de *Jacaranda cuspidifolia* Mart., ainda é necessário o emprego da técnica de Cromatografia por Camada Delgada, para a confirmação da presença destas respectivas classes de produtos naturais identificadas nas reações colorimétricas, bem como a realização do fracionamento e caracterização das espécies fracionadas pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas. Estas etapas, no entanto, estão sendo executadas, dos quais os resultados ainda não poderão ser abordados neste relatório. Outrossim, serão efetuados também os ensaios biológicos *in vitro* para a verificação da possível atividade deste respectivo extrato contra os protozoários *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania amazonense*.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que o estágio obrigatório no laboratório de Química de Produtos Naturais Bioativos do Instituto Rene Rachou está contribuindo imensamente para a minha formação acadêmica e profissional, possibilitando a experiência profissional e a vivência em uma instituição de pesquisa. Os aprendizados e experiências em laboratórios do curso de Química Tecnológica me permitiram possuir conhecimentos prévios do trabalho realizado no estágio, principalmente no que diz respeito às matérias de Laboratório de Química Orgânica e Laboratório de Química Analítica Instrumental. Além disso, minha rotina no laboratório QPNB da Fiocruz Minas permitiu um amadurecimento de procedimentos laboratoriais, principalmente no que diz respeito às técnicas de preparo e caracterização de extratos, além do aprendizado de novas técnicas e manuseio de equipamentos que até então não havia familiaridade, como o rotaevaporador, centrífuga à vácuo, placas cromatográficas comerciais de sílica gel 60 F₂₅₄, UHPLC-MS, entre outros. Devido a todos os aprendizados e oportunidades dentro do Instituto, tal experiência está sendo extremamente enriquecedora, possibilitando maior confiança em realizar os ensaios pela autonomia que é dada aos estagiários, além de contribuir com os estudos e disciplinas do curso de Química do CEFET, uma vez que permite a execução de aprendizados adquiridos anteriormente em sala de aula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTOUN, M.D.; et. al. Evaluation of the Flora of Puerto Rico for in vitro Antiplasmodial and Antimycobacterial Activities. *Phytotherapy research*. Puerto Rico, (2001). Doi: 10.1002/ptr.880.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Orientações sobre o uso de fitoterápicos e plantas medicinais**. Brasil 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/publicacoes-sobre-medicamentos/orientacoes-sobre-o-uso-de-fitoterpicos-e-plantas-medicinais.pdf>. Acesso em: 31 mar. 2023.

AMÂNCIO, E. A. M. **Estudo fitoquímico de extratos etanólicos de espécies do gênero Jacaranda (Bignoniaceae) ocorrentes no estado de Minas Gerais e avaliação da atividade citotóxica**. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas CIPHARMA da Universidade Federal de Ouro Preto). Ouro Preto, Minas Gerais, 2019.

ARRUDA, A. L. A.; et al. Análise fitoquímica e atividade antimicobacteriana de extratos metanólicos de *Jacaranda cuspidifolia* Mart. (Bignoniaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.2, p.276-281, 2012.

CARVALHO, Rebeca Santos Marques de. **Investigação da atividade farmacológica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico, da fração butanólica e do verbacosídeo de Lippia Alba (Miller) N.E. Brown**. Dissertação (Curso de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina) - Mestre, Florianópolis, 2006.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Editora da UNICAMP, Campinas, 456 p, 2006.

CORRÊA, M. **Promoção e intervenção sobre aspectos da (hiper)medicalização em usuários de uma Unidade Básica de Saúde**. 2016. Monografia (Curso de Especialização Multiprofissional na Atenção Básica) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Março de 2016.

DEWICK, Paul M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. ed. United Kingdom: Wiley, 546 p, 2009.

ENGEL, R.G.; KRIZ, G. S.; LAMPAN, G. M.; PAVIA, D. L. **Indrotuction to organic laboratory techniques: a small scale approach**. 3 ed. Canada: Cengage Learning, 1024 p, 2011.

HAVLICEK V.; SPIZEK J. **Natural products analysis: instrumentation, methods and applications**. Hoboken. New Jersey: Wiley, 624 p, 2014.

HENNEBELLE, T.; et. Al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. *Journal of Ethnopharmacology*. 116 (2008) 211–222. Doi: 10.1016/j.jep.2007.11.044.

FERNANDES, K. N. **Avaliação da qualidade de medicamentos fitoterápicos manipulados em Belo Horizonte (MG): Análise Orgânica e Inorgânica**. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências e Técnicas Nucleares pela Universidade Federal de Minas Gerais), Belo Horizonte, 2020.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **A Fundação**. Rio de Janeiro, [S. d.]a. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/fundacao>. Acesso em: 12 maio 2023.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **História**. Rio de Janeiro, [S. d.]b. Disponível em: <https://portal.fiocruz.br/historia>. Acesso em: 12 maio 2023.

INSTITUTO RENÉ RACHOU – FIOCRUZ MINAS. **História do Instituto**. Belo Horizonte, [S. d.]a. Disponível em: <https://www.cpqr.fiocruz.br/pg/historia/>. Acesso em: 12 maio 2023.

INSTITUTO RENÉ RACHOU – FIOCRUZ MINAS. **Pesquisa no IRR**. Belo Horizonte, [S. d.]b. Disponível em: <https://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/pesquisa/>. Acesso em: 12 maio 2023.

INSTITUTO RENÉ RACHOU – FIOCRUZ MINAS. **Química de Produtos Naturais Bioativos**. Belo Horizonte, [S. d.]c. Disponível em: <https://www.cpqrr.fiocruz.br/pg/quimica-de-produtos-naturais-bioativos/>. Acesso em: 12 maio 2023.

JESSEN, W., B. The origin of the Soxhlet extractor. **Chemistry education Today**. V 84, n° 12. Toronto - Canada, 2007.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. Editora Atheneu, São Paulo, 344 p, 2009.

MOREIRA, T.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 30, n° 3, São Paulo, 2010.

PRADO, J. M. A.; et al. Prospecção fitoquímica e atividade antifúngica de extratos florais de *Tabebuia rosealba* (Ridl.) Sandwith e *Jacaranda cuspidifolia* Mart. **Revista Nativa**, Sinop, v. 10, n. 4, p. 554-558, 2022.

PERES, Lázaro E. P. Metabolismo secundário. **Metabolismo secundário**. São Paulo, 2004.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. Vol. 3, No. 4, 146-152, 2012.

RUSSELL J. M. **Bioactive natural products, detection, isolation and structural determination**. 2 and edition. Boca Raton. CRC Press, 624 p, 2008.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semiárido de Pernambuco: uma inovação no controle de fitopatógenos**. Dissertação (Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco). Pernambuco, 2013.

SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 1096 p, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; GOSMANN, G.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Santa Catarina: Editora da UFSC, 1999.

TOMASI, M. L. M.. **Aspectos relacionados ao desenvolvimento de um medicamento fitoterápico: preparação e avaliação biológica de extrato seco padronizado de erva mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.)**. 2021. Trabalho de conclusão de curso (Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina) - Santa Catarina, 2021.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatograph atlas**. 2 ed. Munich: Springer, 368 p., 2001.