

**SCREENING FITOQUÍMICO DO *Nasturtium officinale* R. Br.:
CONTROLE DE QUALIDADE.**

**PHYTOCHEMICAL SCREENING OF *Nasturtium officinale* R. Br.:
QUALITY CONTROL.**

CARVALHO, J. L. S.¹; CUNICO, M. M.¹;
MIGUEL, M. D.¹; MIGUEL, O. G.^{1*}

¹Laboratório de Fitoquímica, Departamento de Farmácia, UFPR, Curitiba-PR
Av. Lothario Meissner, 632 CEP: 80210170 -Curitiba – Paraná – Brasil.

*E-mail: obdulio@ufpr.br

RECEBIDO:10/07 ACEITE: 11/08

RESUMO

No Brasil, a atual exploração comercial de plantas medicinais, tanto para consumo interno como para exportação é ainda muito limitada, visto que produção e produtividade dependem de incentivos e estudos que possibilitem agregar valor a estes produtos agrícolas. Portanto, a necessidade de investigações fitoquímicas, além de desenvolvimento de novas tecnologias na área de fitoterápicos que contribuam para a melhoria e controle de qualidade das plantas torna-se evidente. Nesta perspectiva, realizou-se um screening fitoquímico do *Nasturtium officinale* R. Br.; planta pertencente à família Brassicaceae, popularmente conhecida por agrião. Para comparação dos resultados obtidos, realizou-se uma avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD). A presença de compostos fenólicos simples e heterosídicos (fenilpropanóides e flavonóides), saponinas (esteróidais e terpênicas policíclicas) e compostos contendo enxofre (glucosinolatos) detectadas no screening fitoquímico foi confirmada por CCD. A identificação dos mesmos se deu por meio de comparação com amostras autênticas e dados de literatura, permitindo desta forma, qualificar o *Nasturtium officinale* R. Br com as propriedades referenciadas na literatura para a sua eficácia e aplicabilidade fitoterápica.

Palavras-chave: *Nasturtium officinale*; agrião; CCD.

* Trabalho realizado com o auxílio financeiro do CNPQ (Processo n. 301668/88-4)

^{1*} Departamento de Farmácia - Laboratório de Fitoquímica - Universidade Federal do Paraná – Av. Lothario Meissner, 632 CEP: 80210170 -Curitiba – Paraná – Brasil.

ABSTRACT

A phytochemical screening of *Nasturtium officinale* R. Br., Brassicaceae (water-cress) has been accomplished. The comparative phytochemical analysis has been also conducted by using thin layer chromatography (TLC). A qualitative phytochemical analysis was performed for the presence of simple and heterosidic phenolic compounds (phenylpropanoids and flavonoids), saponins (steroidal and policyclic terpenic) and compounds containing sulfur (glucosinolates). The medicinal uses of this plant are also reported.

Palavras-chave: *Nasturtium officinale*; water-cress; TLC.

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a importação de insumos e matérias-primas vegetais para o setor farmacêutico tem contribuído para o desequilíbrio da balança comercial brasileira, despertando grande interesse na busca de alternativas que possibilitem o equilíbrio nas contas do país por meio de um desenvolvimento sustentável, de qualidade e ecologicamente correto.

Sendo o Brasil um país de grande biodiversidade vegetal, inúmeras plantas são utilizadas por grande parte de nossa população, na forma de fitoterápicos, nutracêuticos ou alimentos, das quais destaca-se o agrião, *Nasturtium officinale* R. Br., planta herbácea e vivaz, pertencente à família Brassicaceae (BLUMENTHAL et al., 2000). Suas partes aéreas são consumidas em grande quantidade na alimentação humana (CRUZ et al., 2006), apresentando odor característico, sabor agradável levemente amargo e picante (BUFFON et al., 2005). Esta espécie vegetal é popularmente utilizada no tratamento de infecções infantis do trato urinário e como expectorante no tratamento de bronquites (BLUMENTHAL et al., 2000). Também há indicações de uso do agrião no tratamento de icterícia e em doenças periodontais como as gengivites (LOGGIA, 1993), e quando misturado com água de colônia, pode ser utilizado no tratamento da queda de cabelo (QUER, 1992).

O agrião apresenta em sua composição química o glucosinolato gluconasturtium, que gera o fenil etil isotiocianato e nitrilas tais como a 3 fenil propionitrila e 8 metil tioctanona nitrila. Além disso, também contém os sais minerais manganês, ferro, iodo, potássio e cálcio e as vitaminas A, C, E e nicotinamida (BLUMENTHAL et al., 2000).

Como a exploração comercial de plantas medicinais, tanto para consumo interno como para exportação é ainda muito limitada, visto que produção e produtividade dependem de incentivos e estudos que possibilitem agregar valor a estes produtos agrícolas, a necessidade de investigações fitoquímicas, além de desenvolvimento de novas tecnologias na área de fitoterápicos para o controle de qualidade das mesmas torna-se evidente.

Nesta ótica, a realização do screening fitoquímico é justificada pela importância que representa para a melhoria da qualidade do *Nasturtium officinale* R. Br. enquanto fitoterápico, e conseqüentemente, na eficiência terapêutica do mesmo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL VEGETAL

Raízes e partes aéreas de agrião foram coletadas junto ao produtor e fornecedor credenciado, Joemi comércio de frutas e verduras LTDA, sito a rua Bortolo Pellanda, 1489, em Umbará, bairro de Curitiba, Paraná-Brasil, no período de janeiro a dezembro de 2000. A identificação botânica desta espécie vegetal foi realizada pelo Dr. Gerdt Hatschbach do Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba, Paraná, onde herborizou-se e depositou-se uma exsicata, sob o número 248503.

O material vegetal coletado (10 kg de material fresco) foi submetido à dessecação em estufa com tiragem de ar úmido, a 45 °C, por 72 h. Em seguida, a droga vegetal obtida (700 g) foi moída em moinho de martelos com tela de 3 mm, para obtenção de extratos.

2.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO VEGETAL PARA ANÁLISE DE CCD

O extrato bruto metanólico (EBM) foi obtido por maceração a frio de 100 g da planta fresca em metanol PA (MERCK), durante 72 h e filtração a vácuo.

2.3 SCREENING FITOQUÍMICO (MOREIRA, 1979)

2.3.1 Extrato Hidroalcoólico a 20% (EH₂₀)

Para obtenção do extrato (EH₂₀), 50 g da droga vegetal foram submetidos à maceração (banho-maria, 60 °C) em 250 mL de solução etanólica (70% - v/v), durante 3 horas.

2.3.2 Pesquisa de alcalóides

Nesta análise, 50 mL de extrato EH₂₀ foram levados à secura em evaporador rotatório. O extrato seco obtido foi dissolvido em etanol (5 mL) e adicionado a 20 mL de ácido clorídrico a 1 %. Alíquotas do extrato clorídrico obtido (1 mL) foram transferidas para tubos de ensaio (5), e pela adição dos reativos gerais (MAYER, DRAGENDORFF, BOUCHARDT e BERTRAND) a pesquisa de alcalóides foi realizada. A confirmação da presença de alcalóides no extrato analisado se dará pelo aparecimento de precipitados.

Para confirmação dos resultados, 15 mL do extrato EH₂₀ foram alcalinizados com hidróxido de amônio até pH 10, e após transferência para um funil de separação e adição de 15 mL do sistema éter:clorofórmio (3:1 – v/v), por 2 vezes, extratos etéreo-clorofórmio-amoniaco foram coletados, reunidos e levados a secura em banho-maria (60 °C). Ao extrato seco obtido adicionou-se 0,5 mL de álcool etílico e 5 mL de solução aquosa de ácido clorídrico a 1%, o qual foi submetido a um ligeiro aquecimento. Em seguida, transferiu-se para tubos de ensaio (5) alíquotas de 1 mL do extrato clorídrico, efetuando-se a pesquisa de alcalóides com os reativos gerais para alcalóides. A

presença de alcalóides será confirmada pela formação de precipitados, os quais serão dissolvidos pela adição de até 2 mL de solução etanólica de ácido tartárico a 5 %.

2.3.3 Pesquisa de flavonóides

Para a realização desta pesquisa, 5 mL do extrato EH₂₀ foram transferidos para tubos de ensaio. Em seguida, adicionou-se em cada tubo, 200 mg de limalha de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico fumegante (pelas paredes do tubo). O desenvolvimento das respectivas colorações laranja, violácia e vermelha comprovará a presença de flavonas, flavanonas e flavonóis no extrato analisado.

2.3.4 Pesquisa de cumarinas

Nesta pesquisa, após a transferência de 50 mL do extrato EH₂₀ para um copo de Béquer, 2 mL de ácido clorídrico 1N foram adicionados. O volume do extrato clorídrico obtido foi reduzido a 10 mL, em banho-maria (60 °C), diluído em 5 mL de água deionizada e particionado em funil de separação com éter etílico, em três porções de 10 mL. O volume de extrato orgânico coletado (extrato etéreo) foi reduzido a 5 mL em banho-maria (60 °C). Em seguida, 3 gotas deste extrato etéreo foram depositadas em papel de filtro previamente demarcado, e após secagem, aplicou-se 1 gota de hidróxido de sódio 1N sobre elas. A visualização de fluorescência azul ou verde-amarelada sob luz ultravioleta (ondas longas), indicará a presença de cumarinas no extrato analisado. A visualização de fluorescência azul ou verde-amarelada observada sob luz ultravioleta quando extrato etéreo (5 mL) é adicionado à 2 mL de hidróxido de amônio SR, também indicará a presença de cumarinas no extrato analisado.

2.3.5 Pesquisa de antraquinonas

Em um balão de fundo chato de 100 mL foram transferidos 30 mL do extrato EH₂₀ e 5 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico a 10 %. O balão foi acoplado a um

condensador e levado ao refluxo por 30 minutos. O extrato foi filtrado a quente, em papel de filtro. Ao filtrado foram adicionados 30 mL de água deionizada, que transferido para um funil de separação, foi particionado, 2 vezes, com 10 mL de éter etílico. A fase orgânica coletada foi concentrada a 5 mL, em banho-maria (60 °C), e transferida para um tubo de ensaio, onde 5 mL de solução de hidróxido de amônio 1N foram acrescentadas. Após agitação lenta, a visualização das respectivas colorações rósea-vermelha, violeta e azul indicará a presença de antraquinonas, naftoquinonas e benzoquinonas no extrato analisado.

2.3.6 Pesquisa de esteróides e triterpenos

Em um copo de Béquer, 30 mL do extrato EH₂₀ foram levados à secura em banho-maria (60 °C). O extrato seco foi dissolvido em 5 mL de clorofórmio e filtrado. Alíquotas de 0,1 mL, 0,5 mL e 1,0 mL do extrato clorofórmico assim obtido foram pipetadas para tubos de ensaio, reajustando-se o volume para 2,0 mL com clorofórmio. Foi adicionado em cada tubo de ensaio 1 mL de anidrido acético e 1 a 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado (reação de LIEBERMAN-BURCHARD). O desenvolvimento das respectivas colorações verde azulada, vermelha-rósea-púrpura ou violácea, indicará a provável presença de núcleo esteroidal e de policíclicos triterpênicos no extrato analisado.

2.3.7 Extrato Aquoso a 20% (EA₂₀)

Para obtenção do extrato aquoso (EA₂₀), 50 g da droga vegetal foram submetidos à maceração a quente (banho-maria, a 60 °C), por 3 horas, utilizando-se como líquido extrator água destilada (250 mL).

2.3.8 Pesquisa de heterosídeos antociânicos

Volumes de 5 mL do extrato EA₂₀ foram colocados em tubos de ensaio (3). O primeiro tubo foi acidificado com ácido sulfúrico 1N até pH 1, o segundo tubo foi alcalinizado com hidróxido de sódio até pH 10 e o terceiro tubo foi neutralizado até pH 7. O aparecimento de diferentes colorações indicará a presença de heterosídeos antociânicos no extrato analisado.

2.3.9 Pesquisa de saponinas

Os três tubos de ensaio utilizados na análise de heterosídeos antociânicos foram agitados energicamente por cinco minutos. Em seguida foram deixados em repouso por trinta minutos. A existência de espuma persistente, maior ou igual a um centímetro comprovará a presença de heterosídeos saponínicos no extrato analisado.

2.3.10 Pesquisa de heterosídeos cianogenéticos

Neste ensaio, 15 mL do extrato EA₂₀ foram transferidos para um tubo de ensaio. Em seguida, sem umidecer as paredes do tubo, adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico 1N. Com o auxílio de uma rolha de cortiça, suspendeu-se uma tira de papel picrossódico, cuidando-se para que a tira não tocasse no extrato. O tubo de ensaio foi para o banho-maria a 60 °C, durante 30 minutos. Se o papel adquirir coloração vermelha, a presença de heterosídeos cianogenéticos será comprovada no extrato analisado.

2.3.11 Pesquisa de taninos

Cinco (5) gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 % foram adicionadas ao extrato EA₂₀ (5 mL). O aparecimento das colorações verde-azulada, cinza, marron ou formação de precipitado indicará a presença de tanóides no extrato analisado.

Duas (2) gotas de solução aquosa de sulfato de ferro amoniacal a 1 % foram adicionados a 5 mL do extrato EA₂₀. O aparecimento de coloração verde-azulado indicará a presença de tanóides no extrato analisado.

Ao volume de 5 mL do extrato EA₂₀ foram adicionados 5 mL de ácido acético a 10 % e 5 mL de solução aquosa de acetato de chumbo a 10 % (gota a gota). A formação de precipitado indicará a presença de tanóides no extrato analisado.

Foram transferidos para tubos de ensaio, respectivamente, volumes de 0,5 mL, 1,0 mL e 2 mL do extrato EA₂₀. Adicionou-se em cada tubo 2,0 mL da solução de gelatina a 2,5 %. A formação de precipitado indicará a presença de tanóides no extrato analisado.

Foram transferidos para um balão de fundo chato com capacidade para 100 mL, 30 mL do extrato EA₂₀, 6,0 mL de formaldeído e 4,0 mL de ácido clorídrico concentrado. O balão foi acoplado a um condensador de bolas e levado ao refluxo por uma hora. Em seguida, foi filtrado (a quente). O resíduo retido no papel de filtro foi lavado com álcool etílico a 70 %, e em seguida foi lavado com gotas de solução aquosa de hidróxido de sódio a 5 %. O desenvolvimento de coloração azul indicará a presença de taninos condensados. Ao filtrado adicionou-se excesso de acetato de sódio e três gotas de solução aquosa de cloreto férrico a 1 %. O desenvolvimento de coloração azul ou formação de precipitado escuro indicará a presença de taninos hidrolisáveis.

2.3.12 Pesquisa de aminogrupos

Em um copo de Béquer, 10 mL do extrato EA₂₀ foi concentrado em banho-maria (60 °C), até o volume de 5 mL. Em papel de filtro foram aplicadas 5 gotas do extrato concentrado, em pontos previamente determinados. Após secar, o papel foi nebulizado com reativo de ninhidrina e levado para a estufa à temperatura de 100 °C, por 15 minutos. O desenvolvimento de coloração azul-violácea comprovará a presença de aminogrupos.

2.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Na análise por CCD, realizadas pela otimização de metodologias descritas por STAHL (1969), LOGGIA (1993) e MABRY (1970), 10 µL do EBM e das amostras de referência (conc. 1 mg/mL em metanol) foram aplicados em cromatoplasmas de sílica gel F₂₅₀ (20 cm x 20 cm - MERCK), respectivamente. Como fase móvel utilizou-se o sistema eluente tolueno:acetato de etila:ácido acético:ácido fórmico:água (9:68:2:9:12). O ensaio foi realizado em duplicata, para permitir a revelação das placas por nebulização com os reativos de NEU a 1 % em metanol e vanilina fosfórica (vanilina a 2 % em etanol e adicionada de 20 % de ácido fosfórico). O aparecimento da coloração alaranjada após nebulização do reativo de NEU revelará a presença de compostos fenólicos no extrato analisado. Saponinas, glucosinolatos, esteróides e terpenos policíclicos serão caracterizados, respectivamente, pelo aparecimento das colorações azul violácea, amarelo alaranjado, verde azulado e vermelho, após nebulização com vanilina.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 SCREENING FITOQUÍMICO

Os dados obtidos no screening fitoquímico realizado com o extrato EH_{20%} do agrião indicaram a presença de cumarinas, flavonóides e triterpenóides e/ou esteróides. Em contrapartida, o EA_{20%} revelou a presença de tanóides, heterosídeos antociânicos, heterosídeos saponínicos e aminogrupos (Tabela 1).

TABELA 1 - SCREENING FITOQUÍMICO DOS EXTRATOS DE AGRIÃO

GRUPOS	SCREENING FITOQUÍMICO EH _{20%}	SCREENING FITOQUÍMICO EA _{20%}	ESPECIFICAÇÃO
Alcalóides	-		
Cumarinas	++		Fluorescência azul
Flavonóides	+		Laranja
Quinóides	-		
Triterpenóides e/ou Esteróides	+++		Verde
Tanóides		+	Em todas as reações
Taninos condensados		-	
Taninos hidrolisáveis		-	
Heterosídeos antociânicos		-	
Heterosídeos saponínicos		+++	Nos três tubos
Amino-grupos		++	Mancha violeta
Ácidos voláteis		-	
Heterosídeos cianogenéticos		-	

3.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO (EBM)

O EBM obtido (33 mL) apresentou 1013 mg de teor de sólidos em 100 g de material vegetal verde.

3.3 ANÁLISE POR CCD

Os resultados obtidos na análise do EBM por CCD (Tabela 2) revelaram a presença de glucosinolatos, saponinas, clorofilas, esteróides, β -sitosterol, fenilpropanóides, ácido felúrico, luteolina 7-glicosídica, rutina e flavonóides nos extratos analisados.

TABELA 2 – RESULTADOS DA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DE CAMADA DELGADA (CCD) E DO SCREENING FITOQUÍMICO REALIZADOS COM EXTRATOS DO *Nasturtium officinale* R. Br.

Referência	EBM CCD	Screening fitoquímico do EH_{20%}	Screening fitoquímico do EA_{20%}
Aminogrupos			++
Tanóides			+
Cumarinas		++	
Glucosinolatos	+++		
Saponinas	++		+++
Heterosídeos saponínicos			+++
Esteróides	+	+++	
Beta sitosterol	+		
Fenilpropanóide 330 nm	+	+	
Ácido p-cumárico	-		
Ácido ferúlico	+		
Ácido caféico	+		
Flavonóides	++	+	
Rutina	++		
Luteolina 7-glicosídica	+		

+, baixa visualização; ++, moderada visualização; +++, alta visualização; -, não detectado

4 CONCLUSÃO

A análise fitoquímica preliminar apontou a presença de triterpenos e/ou esteróides, flavonóides, fenilpropanóides e heterosídeos saponínicos, os quais, foram confirmados em análise posterior por CCD. Cumarinas e aminogrupos detectados no screening fitoquímico não foram confirmados na análise em CCD.

O método de CCD permitiu identificar os analitos glucosinolatos, saponinas, fenilpropanóides e flavonóides, por meio de comparação com amostras autênticas e dados de literatura, qualificando o *Nasturtium officinale* R. Br com as propriedades referenciadas na literatura para a sua eficácia e aplicabilidade fitoterápica. Entretanto, a fim de garantir a qualidade dos fitoterápicos e suprir as exigências mercadológicas e legais (RDC17), o controle químico de analitos deve ser intensificado, pois a obtenção de extratos padronizados a partir de marcadores específicos, depende de fatores associados ao plantio, manejo, colheita e beneficiamento.

5 AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gerdt Hatschbach do Museu Botânico Municipal da Prefeitura de Curitiba (MBM), pela identificação da espécie vegetal.

REFERÊNCIAS

ANVISA, 2000; Resolução RDC nº 17 de 24 de fevereiro de 2000, http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2000/17_00rdc.htm, acessada em Julho 2006.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMAANN, J. **Herbal medicine**, 1. ed., Integrative Medicine Communications, p. 404-407, 2000.

BUFFON, M. C. M. ; LIMA, M. L. C. ; LIMA, V. C. N. ; GALARDA, I. ; CARVALHO, J. L. S. ; MIGUEL, O. G. ; MIGUEL, M. D. Estudo do efeito do extrato de *Nasturtium officinale*, R. BR. no controle do crescimento de microrganismos presentes na cavidade bucal e placa dentária *in vitro*. **Visão Acadêmica**. v.6, n.1, p.33-41, 2005.

CARVALHO, J. L. S. **CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E ANÁLITICO DO *Nasturtium officinale* R. Br., BRASSICACEAE**. 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade

Federal do Paraná, Curitiba.

CRUZ , A. R. M. S.; VIEIRA, B. M. C.; SILVA, C. L. M. A. Effect of heat and thermosonication treatments on peroxidase inactivation kinetics in watercress (*Nasturtium officinale*). **Journal of Food Engineering**. v. 72, p.8-15, 2006.

LOGGIA, R. D. **Piante officinali per infuse e tisane**. Organizzazione Editoriale Medico Farmacêutica, 3 ed. p. 354, 1993.

MABRY, T.J. et al. **The systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag, Berlin, p. 4-14, 1970.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica, **Tribuna Farmacêutica**. v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

QUER, F. P. **Plantas medicinales**. Editorial Labor, p 273-275, 1992.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography**, 2. ed. New York 1969.