

# Avaliação de parâmetros de extração da *Cinchona* Vahl por métodos farmacopéicos e não farmacopéicos

Iarah Daniela Dantas Silva, Cícero Flávio Soares Aragão\*

Laboratório de Controle de Qualidade de Medicamentos, Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Av. General Cordeiro de Faria s/n, Petrópolis, 59.010-180 Natal-RN, Brasil

**RESUMO:** O presente estudo teve como objetivo a otimização de parâmetros cinéticos de extração da *Cinchona pubescens* Vahl por ultra-som, usando métodos farmacopéicos e não farmacopéicos. Na extração por ultrassom variaram-se o tempo, a massa, a faixa granulométrica, o volume de solvente e o tipo de solvente. Na decocção, as extrações foram feitas no tempo e temperatura descrita na Farmacopéia Brasileira IV, variando-se o sistema solvente. Na extração por maceração variaram-se o tempo e o sistema solvente. O teor de alcalóides quinolínicos foi monitorado por espectrofotometria no UV a 325 nm. O método decocção foi o que apresentou o maior rendimento na extração dos alcalóides, dados equivalentes foram conseguidos com o método ultra-som, no tempo de 5 min e solvente acidificado pH 4, com um rendimento maior ao da maceração. Pela aplicação do planejamento fatorial para o método do ultra-som foi visto que há uma interação entre as variáveis, necessitando de um melhor ajuste entre elas a fim de melhorar a eficiência extrativa do método do ultra-som.

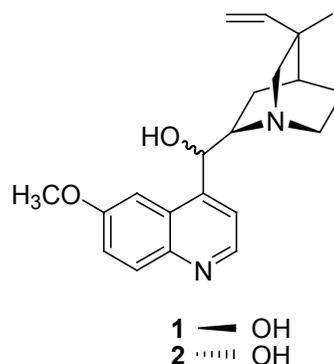
**Unitermos:** *Cinchona pubescens*, Rubiaceae, farmacopéia, ultra-som, decocção, maceração.

**ABSTRACT:** "Extraction parameters from *Cinchona pubescens* Vahl using pharmacopeia and no pharmacopeia methods". The present study for ultrasound had as objective the optimization of kinetic parameters of extraction of the *Cinchona pubescens* Vahl, using pharmacopeia and no pharmacopeia methods. In the extraction for ultrasound they had varied the time, the solvent type, the mass, the volume of solvent and grain size of the sample. In the decoction, the extractions had been made according to the time and temperature described in Brazilian Pharmacopeia IV, varying the solvent system. In the extraction for maceration the time and the solvent system had varied. The alkali of the *Cinchona pubescens* Vahl, was monitored by spectrophotometry in UV 325 nm. The method decoction was the one that presented the biggest income in the alkaloids extraction, given equivalent data had been obtained with the method ultrasound, in the solvent acidified pH 4 and time of 5 min, with a bigger income than the one of the maceration.

**Keywords:** *Cinchona pubescens* Vahl, Rubiaceae, pharmacopeia, ultrasound, decoction, maceration.

## INTRODUÇÃO

*Cinchona pubescens* Vahl é uma entre várias espécies de cinchonas, da família Rubiaceae, da qual é extraído o alcalóide quinina, um potente anti-malárico, e a quinidina, um redutor dos batimentos cardíacos. O uso medicinal dessa erva vai desde o tratamento da malária, até neuralgia, espasmos musculares, fibrilação cardíaca; também encontra uso na indústria alimentícia como flavorizante amargo (Weisman et al., 2006; Mariath et al., 2009). A droga contém de 7-12% de alcalóides totais dos quais a quinina (1) representa 70-90% e quinidina (2) até 1% (McCalley, 2002, Barbosa-Filho et al, 2005).



Diferentes parâmetros de extração são aplicados na otimização de métodos utilizados no controle de qualidade de fitoterápicos (Helou, 1987-1989; Luz et al., 1997-1998; Aragão et al., 2000; Costa, 2002; Brandão et al., 2006, 2008; Veiga-Junior & Mello, 2008; Bueno & Bastos, 2009). A extração com o uso de ultra-som, apresentando-se como uma técnica extrativa promissora por promover a extração exaustiva de princípios ativos de drogas vegetais com gasto de energia relativamente pequeno, economia de tempo e maior segurança no processo. As ondas de ultra-som com frequências acima de 20 kHz são geradas por um transdutor que converte energia elétrica em mecânica. (Gambá et al., 2006). Essas ondas propagam-se no meio líquido, originando variações de pressão, responsáveis pela cavitação, ou seja, a criação e implosão de microbolhas de gás no centro de um líquido. Essa alta frequência forma ondas de choque no momento da implosão das bolhas (Barboza & Serra, 1992), e também produz um efeito vibratório na célula vegetal, capaz de levá-la a ruptura e, com isso, a liberação do seu conteúdo (Rocha et al., 2009).

O presente estudo visa a otimização de parâmetros cinéticos de extração para alcalóides das cascas da *Cinchona pubescens* Vahl por ultra-som e outros métodos.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

A matéria-prima vegetal utilizada foi a casca de *Cinchona pubescens* Vahl adquiridas no comércio da cidade de Natal-RN, Brasil e identificadas através da análise de suas características macroscópicas com base na descrição presente na monografia da planta na Farmacopéia Brasileira IV edição, 1988.

Na preparação da amostra foi realizada uma secagem a sombra, seguida de uma escovação vigorosa para a retirada de qualquer resíduo existente, as cascas secas foram então pulverizadas em moinho mecânico, promovendo a separação do pó numa faixa granulométrica de 210-420  $\mu\text{m}$ .

### Extração segundo a farmacopéia oficial

No processo de extração descrito na Farmacopéia Brasileira IV edição, 1988, para os alcalóides quinolínicos presentes na *Cinchona pubescens* Vahl utilizou-se 1 g de amostra com granulometria de 210-420  $\mu\text{m}$  onde 10 mL de água e 7 mL de ácido clorídrico 2 M aquecido durante o tempo de 30 min numa temperatura de 65 °C em banho-maria. Deixou-se esfriar e adicionou 25 mL de diclorometano, 50 mL de éter etílico e 5 mL de hidróxido de sódio a 20% (p/v). As análises foram realizadas em triplicata.

### Modificações do método farmacopeico (Decocção)

Outros três diferentes métodos através da mudança do solvente utilizado segundo a farmacopéia oficial pelos sistemas solventes: água, HCl com pH 4 e etanol:água (2:8).

### Extração por ultra-som

A extração dos alcalóides presentes nas cascas da *Cinchona pubescens* Vahl foi realizada em triplicata em uma cuba de Ultra-som da marca UNIQUE, modelo USC 1400, utilizando 1 g de amostra, com faixa granulométrica de 210-420  $\mu\text{m}$ , através de 100 mL de dois líquidos extratores diferentes: a água e uma solução aquosa com HCl em pH 4, durante 1 e 5 min.

### Extração por maceração

O terceiro processo extrativo realizado, também em triplicata, foi através da maceração, onde os parâmetros utilizados anteriormente foram mantidos constantes com 1 g de amostra numa granulometria de 210-420  $\mu\text{m}$  com volume do solvente extrativo de 100 mL, de três diferentes líquidos extratores: água, solução aquosa acidificada com HCl até pH 4 e etanol:água (2:8) durante os tempos de 1 e 528 h.

Um resumo das condições experimentais, para as diferentes técnicas de extrações encontra-se na Tabela 1.

### Análise dos extratos

Os diferentes extratos de *Cinchona pubescens* Vahl obtidos pelos métodos farmacopeicos e não farmacopeicos foram analisados por espectrofotometria visando a quantificação dos alcalóides quinolínicos através da medição direta no comprimento de onda de 325 nm, obtido na Farmacopéia Japonesa XIV edição, 2001 (JP XIV 2001), com realização das leituras nos extratos diluídos em uma proporção de 1:100, no mesmo solvente de extração.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Há uma necessidade progressiva de atualização dos dados analíticos a respeito de plantas medicinais que sejam comparáveis e consistentes, isso requer, portanto, a busca e otimização de métodos analíticos e sua validação, para a obtenção de resultados rápidos, confiáveis, de baixo custo e mais seguros.

Torna-se de primordial importância, então, a obtenção de parâmetros analíticos que visam melhorar a eficiência da extração dos princípios ativos contidos em plantas medicinais, através da utilização de técnicas modernas.

O método oficial proposto para extração dos

**Tabela 1.** Resumo das diferentes condições avaliadas.

Método	Extração	Solvente	Volume (mL)	Tempo (min.)
A	Decocção	H <sub>2</sub> O	100	30
B	Decocção	EtOH:H <sub>2</sub> O (2:8)	100	30
C	Decocção	H <sub>2</sub> O pH 4	100	30
D*	Decocção	HCl 2M; Éter etílico; Diclorometano H <sub>2</sub> O	7 25 50 qsp. 100	30
E	Ultrason	H <sub>2</sub> O	100	1
F	Ultrason	H <sub>2</sub> O	100	5
G	Ultrason	H <sub>2</sub> O pH 4	100	1
H	Ultrason	H <sub>2</sub> O pH 4	100	5
I	Maceração	H <sub>2</sub> O	100	60
J	Maceração	H <sub>2</sub> O	100	31.680
K	Maceração	H <sub>2</sub> O pH 4	100	60
L	Maceração	H <sub>2</sub> O pH 4	100	31.680
M	Maceração	EtOH:H <sub>2</sub> O (2:8)	100	60
N	Maceração	EtOH:H <sub>2</sub> O (2:8)	100	31.680

\*Método segundo a Farmacopéia Brasileira IV.

alcalóides da *Cinchona pubescens* Vahl é a decocção em meio ácido, que tem como inconvenientes a utilização de solvente de manuseio perigoso e o gasto elevado de energia, necessário ao aquecimento do sistema, o que concorre para o estudo do emprego de técnicas modernas de maior eficiência extrativa (Farmacopéia, 1988).

É com esta visão que será tratada a otimização da cinética de extração dos alcalóides presentes nas cascas da *Cinchona pubescens* Vahl, de modo a fornecer dados confiáveis a laboratórios de pesquisa e produção, com a finalidade de proporcionar uma redução nos custos e no tempo de extração, e a órgãos de vigilância, a fim de facilitar o controle de qualidade de medicamento e a fiscalização.

O monitoramento do teor de alcalóides quinolínicos nos extratos obtidos a partir da *Cinchona pubescens* Vahl através de medição direta por espectrofotometria no UV, mostrou haver bandas de absorções no comprimento de onda de 325 nm, Figura 1, na qual foi utilizada para quantificar os alcalóides como quinina, tomando por base o espectro no UV do sulfato de quinina (Figura 2) descrita na Farmacopéia Japonesa, XIV ed, 2001.

#### **Análise comparativa entre a decocção, maceração e ultra-som**

A Figura 3 mostra a comparação entre os diferentes métodos (decocção, ultrason e maceração) na eficiência de extração em diferentes sistemas solventes.

O uso do solvente em pH ácido, método D, foi capaz de tornar os alcalóides mais solúveis no meio extrativo, devido ao caráter alcalino desses compostos e a conseqüente conversão em sal, porém em condição extrema de pH de 0,2, elevada temperatura de 65 °C e maior tempo de extração de 30 min.

Porém, as alterações realizadas no método decocção, preconizado na Farmacopéia Brasileira IV edição, com o uso do solvente EtOH:H<sub>2</sub>O, método B, apresentou uma maior eficiência extrativa, uma vez que o etanol foi capaz de baixar a constante dielétrica da água, melhorando em princípio a solubilidade das substâncias semi-polares como é o caso dos alcalóides.

Valores equivalentes de extração dos alcalóides quinolínicos foram conseguidos com o método ultrason, no tempo de 5 min e solvente em pH 4, método H, com a vantagem de se trabalhar com um menor tempo de extração, temperatura ambiente e condições mais brandas de pH. Já a extração pelo método da maceração apresenta valores bem próximos para os três sistemas solventes utilizados, não atingindo os 0,40 de absorvância, o que se encontra bem abaixo da eficiência extrativa conseguida com os demais métodos utilizados.

## CONCLUSÃO

Os resultados mostraram a seguinte ordem de prioridade na seleção do método de extração dos alcalóides das cascas de *Cinchona pubescens*: método B > A=C=D=H > E=F=G=J=L > M=N=K > I.

O método de extração utilizando o ultrassom, método H, dos alcalóides da *Cinchona pubescens* Vahl, mostrou-se com um rendimento extrativo equivalente, método D. O método H reduziu significativamente o tempo de extração, além de reduzir o custo com solvente em condições mais brandas. Mostrou-se, ainda, superior a todos os resultados conseguidos com o método de extração por maceração.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Norte (FAPERN-RN) e a Propesq/UFRN pelo suporte financeiro.

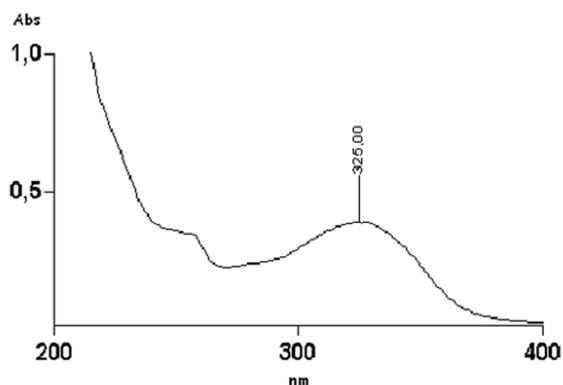


Figura 1. Espectro na região de ultravioleta do extrato de quina.

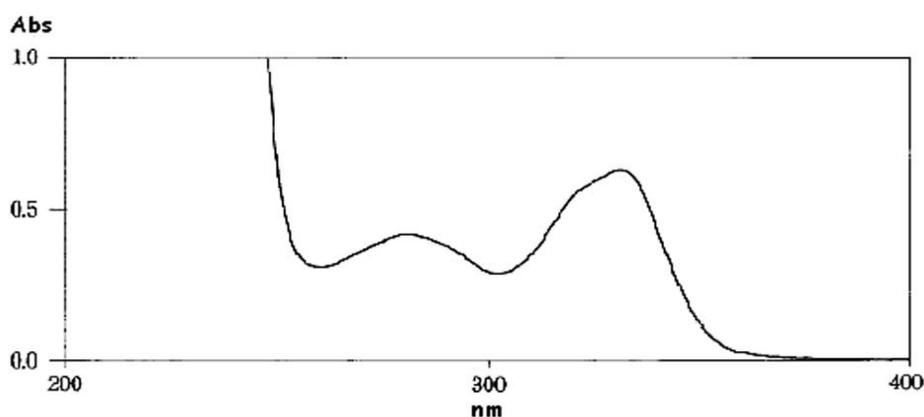


Figura 2. Espectro na região de ultravioleta do sulfato de quinina (XIV JP, 2001).

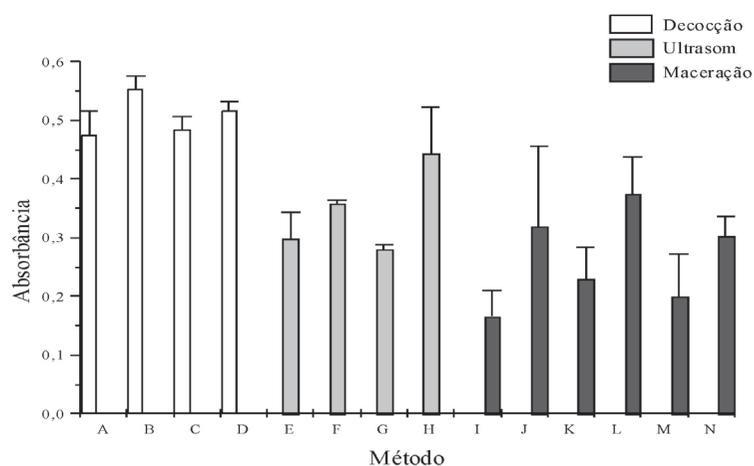


Figura 3. Comparação entre os diferentes métodos (decocção, ultrassom e maceração) na eficiência de extração; Em diferentes sistemas solventes: (A): solvente aquoso, 30 min; (B): solvente etanólico, 30 min; (C): solvente acidificado, 30 min; (D): solvente Farmacopéico, 30 min; (E): solvente aquoso, 1 min; (F): solvente aquoso, 5 min; (G): solvente acidificado, 1 min; (H): solvente acidificado, 5 min; (I): solvente aquoso, 1 h; (J): solvente aquoso, 528 h; (K): solvente acidificado, 1 h; (L): solvente acidificado, 528 h; (M): solvente etanólico, 1 h; (N): solvente etanólico, 528 h.

## REFERÊNCIAS

- Aragão CFS, Lanças FM, Macêdo RO 2000. Aplicação do SFE com modificadores polares para a extração de alcalóides das folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl (Milona) - Menispermaceae. In: *XVI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*, Recife. p. 59.
- Barbosa-Filho JM, Vasconcelos THC, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RAG, Guedes DN, Falcão HS, Moura MD, Diniz MFF, Modesto-Filho J 2005. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Rev Bras Farmacogn 15*: 392-413.
- Barboza JCS, Serra AA 1992. Ultra-som (I): influência do ultra-som na química. *Quim Nova 15*: 302-315.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn 16*: 408-420.
- Brandão MGL, Zanetti NNS, Oliveira GRR, Goulart LO, Monte-Mor RLM 2008. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn 18*: 127-134.
- Bueno PCP, Bastos JK 2009. A validated capillary gas chromatography method for guaco (*Mikania glomerata* S.) quality control and rastreability: from plant biomass to phytomedicines. *Rev Bras Farmacogn 19*: 218-223.
- Costa AF 2002. *Farmacognosia*. Lisboa: Calouste Gulbenkian.
- Farmacopéia Brasileira. 1988. 4. ed., São Paulo: Atheneu, parte 2.
- Gambá HR, Germano S, Minervi E 2006. Revisão do uso da fonoforese na absorção de fármacos. *Bio Farma. Rev Tecn Cient Farm Bioquim Anal Clin Toxicol 1*: 64-69.
- Helou JH 1987-1989. Preparações farmacêuticas obtidas por extração. *Rev Bras Farmacogn 2/3/4*: 106-169.
- JP XIV 2001. The Japanese Pharmacopoeia. Japan :The Society of Japanese Pharmacopoeia.
- Luz SFB, Sato MEO, Duarte MR, Santos CAM 1997-1998. Parâmetros para o controle de qualidade de folha de *Casearia sylvestris* SW. - guaçatonga. *Rev Bras Farmacogn 7/8*: 1-12.
- Mariath IR, Falcão HS, Barbosa-Filho JM, Sousa LCF, Tomaz ACA, Batista LM, Diniz MFFM, Athayde-Filho PF, Tavares JF, Silva MS, Cunha EVL 2009. Plants of the American continent with antimalarial activity. *Rev Bras Farmacogn 19*: 158-192.
- McCalley DV 2002. Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *J Chromatogr A 967*: 1-19.
- Rocha LG, Aragão CFS, Loiola MIB, Bezerril RA, Paiva NRF, Holanda CMCX, Brito MEF 2009. Evaluation of the leishmanicide action of ethanol extracts of *Crotalaria retusa* L. (Fabaceae). *Rev Bras Farmacogn 19*: 51-56.
- Silva IDD, Miranda AB, Aragão CFS 2006. Otimização de parâmetros cinéticos de extração da *Cinchona pubescens* Vahl por Ultra-som. *Bio Farma. Rev Tecn Cient Farm Bioquim Anal Clin Toxicol 1*: 172-180.
- Veiga-Junior VF, Mello JCP 2008. As monografias sobre plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn 18*: 464-471.
- Weisman JL, Liou AP, Shelat, Cohen FE, Guy RK, DeRisi JL 2006. Searching for new antimalarial therapeutics amongst known drugs. *Chem Biol Drug Design 67*: 409-416.