

PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS DE *Cissus sicyoides* L. (INSULINA VEGETAL) E IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENOS

Geraldo Alves da Silva*
Ligia Bicudo de Almeida-Muradian**
Gokithi Akisue***
Vicente de Oliveira Ferro***

A espécie vegetal *Cissus sicyoides* L. é vulgarmente conhecida como insulina vegetal, cipó-pucá e anil-trepador. O presente trabalho pretende fornecer subsídios para a caracterização dos componentes da droga vegetal. Foi preparado o extrato acetônico das folhas, do qual foram extraídos e identificados os carotenos. Também foram determinados o perfil cromatográfico e os parâmetros físico-químicos dos extratos fluidos obtidos da planta.

UNITERMOS: *Cissus sicyoides* L.; insulina vegetal; pucá; perfil cromatográfico; carotenos.

* Dept. de Farmácia, Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas

** Dept. de Alimentos e Nutrição Experimental, Fac. de Ciências Farmacêuticas, USP

*** Dept. de Farmácia, Fac. de Ciências Farmacêuticas, USP

1. INTRODUÇÃO

A espécie vegetal *Cissus sicyoides* L. pertence à família Vitaceae, vulgarmente chamada de insulina vegetal, anil-trepador^{02,11}, cipó-pucá^{02,03,08}, tinta-dos-gentios e uva-brava⁰². É um arbusto escandente com gavinhas opostas as folhas e raízes aéreas pêndulas que atingem vários centímetros.

As folhas são simples com filotaxia alterna de contorno ovado, ápice acuminado, base reentrante-auriculada, margem ondulada e provida de pequenos mucrons originados da projeção das nervuras secundárias para o lado de fora da lâmina foliar¹⁰. A inflorescência é do tipo cimosa constituída de umbela de dicásio formada por pequenas flores hermafroditas com nectários amarelos. O fruto é uma baga azul anil, apresentando cerca de 1 cm de diâmetro e apenas uma semente¹⁰.

Para uso tópico é utilizada contra o reumatismo e cura de abscessos^{02,11}. Sob a forma de cataplasma é aplicada em inflamação muscular¹³. Apresenta ação anticonvulsivante^{05,12} sendo por este motivo utilizada em casos de epilepsia e derrame cerebral⁰⁶.

A espécie apresenta antocianinas¹¹ nos seus frutos, e nos extratos obtidos da planta encontram-se aminoácidos, proteínas, alcalóides, flavonóides⁰⁶, saponinas e taninos⁰⁶.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A. MATERIAL

O material de estudo foi constituído de folha e caule de *Cissus sicyoides* L., devidamente coletados no horto de plantas medicinais da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas, Minas Gerais. Foi preparada uma exsicata que depois da identificação da espécie foi colocada no herbário do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, onde recebeu a numeração SP: 251:212.

B. MÉTODOS

B.1. PREPARO DOS EXTRATOS FLUIDOS

Foi retirada uma quantidade de droga seca que foi pulverizada em moinho de martelos, obtendo-se um pó semifino. Com a droga pulverizada foram preparados os extratos fluidos pelos processos A e C de acordo com a Farmacopéia Brasileira, Segunda Edição⁰⁷, empregando-se como líquido extrator o álcool 50%.

Foram realizadas as seguintes determinações nos extratos fluidos: Densidade⁰⁷ pelo picnómetro, viscosidade⁰⁷ pelo viscosímetro de Ostwald, Resíduo seco⁰⁷, Resíduo pela incineração⁰⁷ e pH através de um pHmetro da Incibrás.

B.2. DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS

B.2.1. PREPARO DAS AMOSTRAS

20 mL de extrato fluído obtido pelo processo A⁰⁷ foram colocados em cápsula de porcelana e concentrados até quase secura em banho-maria a 50° C. Depois, o extrato foi submetido a agitação com 3 porções de 10 mL de hexano. As frações hexânicas foram reunidas e concentradas a temperatura ambiente até 3 mL.

As frações benzênica, clorofórmica, acetônica e metanólica foram preparadas de modo semelhante à fração hexânica. Os extratos assim obtidos receberam as seguintes denominações: Fração 1 (hexânica), fração 2 (benzênica), fração 3 (clorofórmica), fração 4 (acetônica) e fração 5 (metanólica).

Como referência para o cálculo do Rx, utilizou-se o corante sudam III. Também foram cromatografados os extratos fluidos obtidos pelos processos A e C⁰⁷ da Farmacopéia Brasileira. Os extratos e o corante receberam as seguintes denominações: Extrato fluído obtido pelo processo A (A), extrato fluído obtido pelo processo C (C) e corante sudam III (R).

As manchas obtidas foram anotadas em tabelas, levando-se em consideração a cor, intensidade e Rx. Para análise da intensidade de cada mancha, adotou-se o seguinte critério: forte (+++), média (++) e fraca (+).

B.2.2. SISTEMAS CROMATOGRÁFICOS

Os seguintes sistemas cromatográficos foram utilizados neste estudo:

1) SISTEMA CROMATOGRÁFICO 1

- cromatoplaca: Art. 5553 DC-Alufolien Kieselgel 60 (MERCK) - 20x20 cm - 0,2 mm
- fase móvel: benzeno:acetato de etila (9:1)
- saturação: completa
- percurso: 10 cm
- desenvolvimento: simples
- visualização: Luz natural, após nebulização do reativo anisaldeído sulfúrico e aquecimento a 105° C por 10 minutos.

2) SISTEMA CROMATOGRÁFICO 2

- cromatoplaca: Art. 5553 DC-Alufolien Kieselgel 60 (MERCK) - 20x20 cm - 0,2 mm
- fase móvel: benzeno:acetato de etila (95:5)
- saturação: completa
- percurso: 10 cm
- desenvolvimento: simples
- visualização: luz natural, após nebulização da solução de ácido sulfúrico 5% em etanol e vanilina 1% em etanol, seguida de aquecimento a 105°C por 10 minutos

B.2.3. ANÁLISE DE CAROTENOS DAS FOLHAS DE *Cissus Sicyoides* L.

O método utilizado foi o mesmo utilizado por ALMEIDA & PENTEADO⁰¹ que se basearam em RODRIGUEZ et al⁰⁹.

O método consta de extração com acetona, seguida de saponificação a frio com solução metanólica de KOH a 10% e transferência dos pigmentos para o éter de petróleo em funil de separação com auxílio de água. A solução contendo os carotenóides livre de álcalis foi evaporada em rotavapor a 30°C e em seguida utilizou-se o seguinte sistema cromatográfico em coluna:

- coluna de vidro 20x2,5cm
- fase estacionária MgO:Hyflosupercel (1:1)
- fase móvel: gradiente crescente de acetona em éter de petróleo

As frações foram isoladas e em seguida realizou-se leitura em espectrofotômetro (BECKMAN DU-70) com registrador acoplado, fazendo-se a varredura de 320 a 520 nm utilizando-se como solvente o éter de petróleo.

Realizou-se ainda o teste para reação cis-trans⁰⁴.

Foi realizada também a cromatografia em camada delgada em placas de vidro 20x20 cm com fase estacionária composta por silicagel 60 G (Merck Art. 7731) com 250µ de espessura e fase móvel metanol:benzeno (97:3).

3. RESULTADOS

A. PADRONIZAÇÃO DOS EXTRATOS FLUIDOS

A seguir serão apresentadas as Tabelas 01, 02 e 03 que representam determinações físico-químicas e os perfis cromatográficos dos extratos fluidos e suas frações.

TABELA 1.

DETERMINAÇÕES	EXTRATO FLUIDO A	EXTRATO FLUIDO C
Densidade relativa	1,01	0,99
Viscosidade - tempo de escoamento (min/seg)	3/19	3/44
Resíduo seco	16,17%	11,88%
Resíduo pela incineração	3,64%	1,77%
pH	4,83	4,61

TABELA 2. Cor e Rx obtidos na CCD dos extratos fluidos e frações de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) - Sistema Cromatográfico 1 (padrão sudam III = 6,4 cm).

Extratos fluidos A-C e frações - cores e Rx obtidos							
Manchas	1	2	3	4	5	A	C
1	Violeta (+++) 1,12	Violeta (+) 1,15	Violeta (+++) 1,12	Violeta (++) 1,14	Violeta (+) 1,14		
2	Verde Escuro (+++) 1,03	Verde Escuro (+++) 1,06	Verde Escuro (+++) 1,04	Verde Escuro (+++) 1,06	Verde Escuro (+++) 0,98	Cinza (+++) 1,06	Cinza (+++) 1,06
3	Cinza (+) 0,85	Cinza (+) 0,85	Cinza (+) 0,93	Cinza (+) 0,89	Cinza (+) 0,85		
4	Cinza (+) 0,73	Cinza (+) 0,75	Cinza (+) 0,75	Cinza (+) 0,78	Cinza (+) 0,76		
5	Violeta (++) 0,65	Violeta (++) 0,67	Violeta (++) 0,65	Violeta (++) 0,75	Violeta (++) 0,67	Violeta (+) 0,68	Violeta (+) 0,68
6	Violeta (++) 0,54	Violeta (+++) 0,56	Violeta (++) 0,56	Violeta (++) 0,57	Violeta (++) 0,57	Violeta (+) 0,59	Violeta (+) 0,59
7	Violeta (++) 0,39	Violeta (+) 0,43	Violeta (+) 0,48	Violeta (+) 0,45	Violeta (++) 0,43	Violeta (+) 0,43	Violeta (+) 0,43
8	Cinza (++) 0,28	Cinza (+++) 0,34	Cinza (+++) 0,34	Cinza (+++) 0,37	Cinza (+++) 0,37	Cinza (+++) 0,31	Cinza (+++) 0,31
9				Vermelho* Alaranjado (++) 0,17			
10		Cinza (++) 0,14			Cinza (+) 0,15	Cinza (+) 0,15	Cinza (+) 0,15
11		Cinza (++) 0,09		Cinza (++) 0,10	Cinza (+) 0,10	Cinza (+) 0,10	Cinza (+) 0,10
12		Cinza (++) 0,06		Cinza (++) 0,07	Cinza (+) 0,07	Cinza (+) 0,09	Cinza (+) 0,09

1- fração hexânica; 2- fração benzênica; 3- fração clorofórmica; 4- fração acetônica; 5- fração metanólica; A- extrato fluido obtido pelo processo "A"; C- extrato fluido obtido pelo processo "C"; (*) a mancha desaparece com o tempo.

TABELA 3. Cor e Rx obtidos na CCD dos extratos fluidos e frações de *Cissus sicyoides* L. (insulina vegetal) - Sistema Cromatográfico 2 (padrão sudam III = 5,0 cm).

Extratos fluidos A-C e frações - cores e Rx obtidos							
Manchas	1	2	3	4	5	A	C
1	Azul Anil (+++) 2,02		Azul Anil (+) 2,06	Azul Anil (+) 2,10			
2			Azul Claro (++) 1,80				
3							
4	Cinza (+++) 1,52	Cinza (+++) 1,54	Cinza (+++) 1,52	Cinza (+++) 1,56	Cinza (+++) 1,56	Cinza (++) 1,54	Cinza (++) 1,5
5							
6	Azul (++) 1,14	Azul (+) 1,18	Azul (+) 1,14	Azul (+) 1,20	Azul (+) 1,20		
7							
8							
9	Azul (++) 0,82	Azul (+) 0,76	Azul (+) 0,94	Azul (+) 0,92	Azul (+) 0,94		
10	Azul (++) 0,54	Azul (++) 0,50	Azul (+) 0,52	Azul Anil (++) 0,54	Azul Anil (++) 0,54	Azul Anil (+) 0,52	Azul An (+) 0,51
11	Cinza (+) 0,44	Cinza (+) 0,32	Cinza (+) 0,32	Cinza (+) 0,36	Cinza (+) 0,34		
12	Cinza (++) 0,30	Cinza (+) 0,24	Cinza (+) 0,24	Cinza (+) 0,30	Cinza (+) 0,30	Cinza (+) 0,26	Cinza (+) 0,21
13	Cinza (+) 0,20	Cinza (+) 0,14	Cinza (+++) 0,18	Cinza (+) 0,20	Cinza (+) 0,22	Cinza (+) 0,18	Cinza (+) 0,21
14	Cinza (+++) 0,12	Cinza (+++) 0,10	Cinza (+++) 0,10	Cinza (+++) 0,14	Cinza (++) 0,16	Cinza (+) 0,12	Cinza (+) 0,11

1- fração hexânica; 2- fração benzênica; 3- fração clorofórmica; 4- fração acetônica; 5- fração metanólica; A- extrato fluido obtido pelo processo "A"; C- extrato fluido obtido pelo processo "C".

B. IDENTIFICAÇÃO DE CAROTENOS NAS FOLHAS

Foram identificados nas folhas de *Cissus sicyoides* L. como carotenos principais o α -caroteno e o β -caroteno. As características destes carotenos encontram-se na Tabela 04.

TABELA 4. Absorção e valores de Rf dos carotenóides isolados de *Cissus sicyoides* L.

FRAÇÃO	IDENTIFICAÇÃO	ABSORÇÃO (nm)	VALORES (Rf)
1	α -caroteno(trans)	413-440-470	0,99
2	β -caroteno (trans)	425-447-474	0,99

As Figuras 01 e 02 representam os espectros de absorção em éter de petróleo dos carotenos isolados das folhas *Cissus sicyoides* L. antes e depois da reação com iodo para a verificação do tipo de isômero encontrado.

Figura 01. Espectro de absorção do α -caroteno (todo-trans) em éter de petróleo, antes da isomerização (A) e depois da isomerização (B).

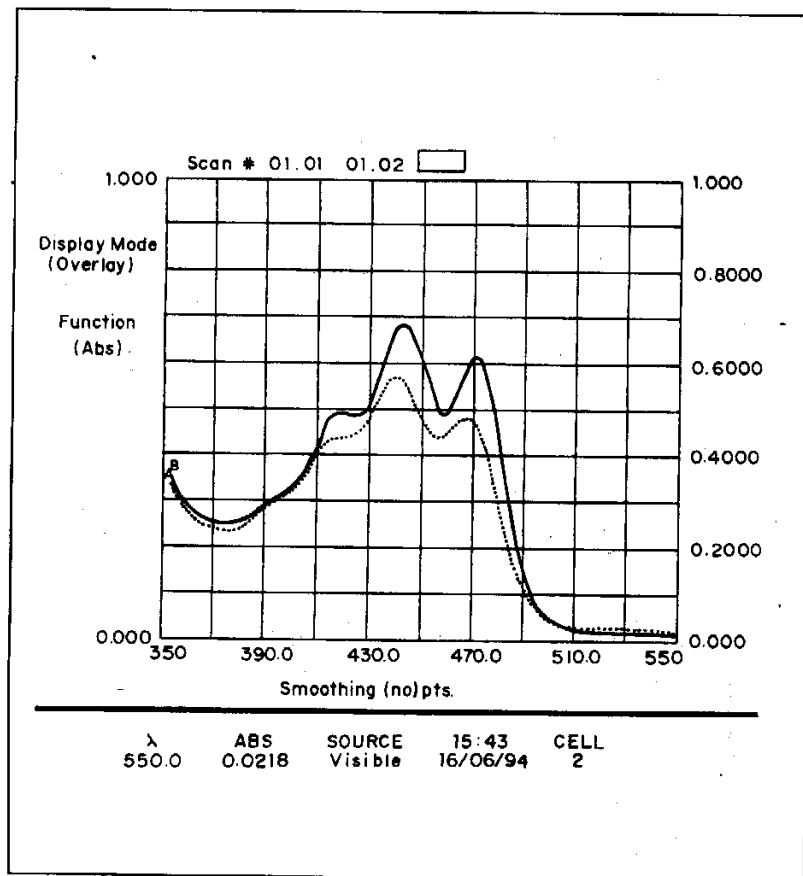
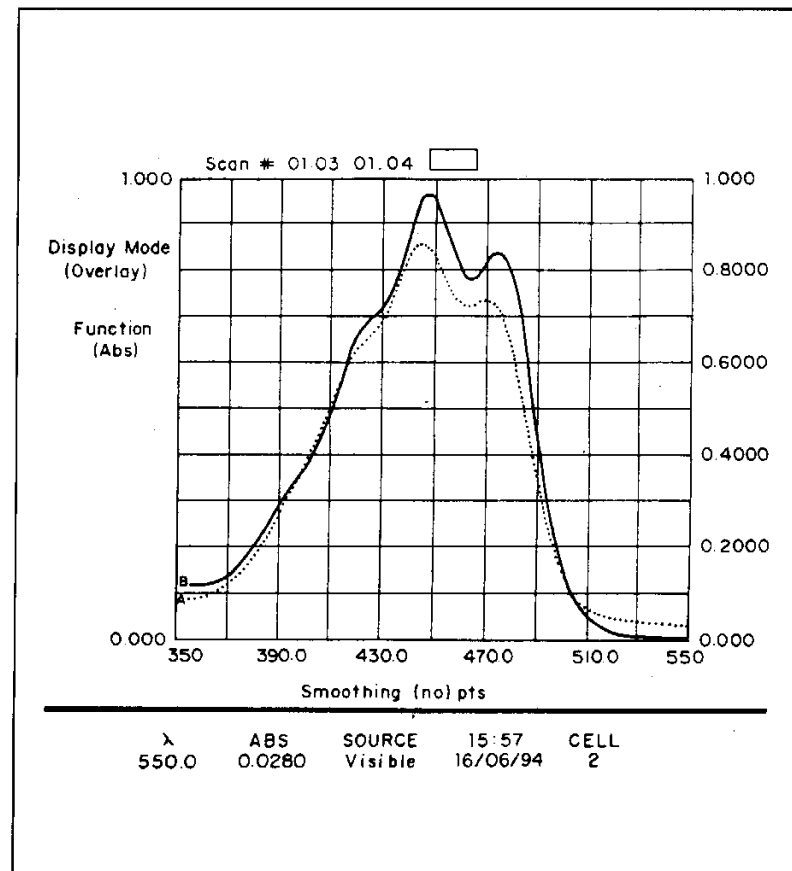


Figura 02. Espectro de absorção do β -caroteno (todo-trans) em éter de petróleo, antes da isomerização (A) e depois da isomerização (B).



4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

As determinações da densidade, viscosidade, resíduo seco, resíduo pela incineração e pH, foram realizadas de acordo com a Farmacopéia Brasileira e forneceram resultados satisfatórios. Na revisão bibliográfica não encontramos artigos sobre estas determinações, mas isto não impede que elas sejam usadas como padrão.

O extrato fluido A apresentou densidade, teor de cinzas e resíduo seco maiores que o extrato fluido C. Somente a viscosidade foi menor, enquanto que o pH pouco diferenciou.

Observando o sistema cromatográfico 1 correspondente à **Tabela 02** e que representa o perfil cromatográfico dos extratos fluidos e frações, podemos notar manchas comuns em diversos extratos. Duas manchas diferenciam-se de maneira destacada no perfil da fração acetônica do extrato fluido (coluna 4). A primeira com Rx 0,17, de média intensidade e cor vermelha alaranjada a vermelha tijolo. Esta mancha aparece logo após a nebulização do reativo anisaldeído-sulfúrico e aquecimento a 105°C por 10 minutos. Após este tempo, a mancha deve ser observada logo, pois desaparece em torno de 30 minutos.

No sistema cromatográfico 2 que corresponde às **Tabelas 03**, e representa o perfil cromatográfico dos extratos fluidos, chamamos atenção para o percurso de 15 cm, onde obtivemos uma melhor separação das manchas.

O sistema cromatográfico 1 foi que apresentou o maior número de manchas para os extratos fluidos A e C. Não observamos diferença no perfil cromatográfico do extrato fluido A e C. Foi possível observarmos diferenças entre os perfis dos extratos fluidos e de suas frações. Certas

substâncias aparecem no perfil das frações e não aparecem no perfil dos extratos. O extrato fluido não apresentou a mancha vermelha alaranjada que desaparece. Esta mancha somente ocorreu no sistema cromatográfico 1.

O espectro de absorção de cada pigmento cromatograficamente puro, foi registrado e comparado com valores da literatura. Além disso a ordem de eluição e a comparação de padrões auxiliou na identificação das frações.

Foram identificados dois carotenos cujas características estão apresentadas na **Tabela 04** e seus espectros de absorção nas **Figuras 1 e 2**. A primeira fração foi identificada como sendo α -caroteno todo trans e a segunda fração como β -caroteno todo-trans, uma vez ter havido diminuição no comprimento de onda após adição de solução de iodo.

5. SUMMARY

Cissus sicyoides L. has commonly been known in folk medicine as vegetable insulin and used by its hypoglycemic properties. Extracts of the plant have been examined and carotenes were identified in the acetonic fraction. Analysis of the fluid extract of the plant has also been effected and the chromatographic profile established.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01. ALMEIDA, L. B & PENTEADO, M. V. C. - Carotenoids and provitamin A value of white fleshed Brazilian sweet potatoes (*Ipomea batatas* Lam.). *J. Food Comp. Anal.*, v. 1, P. 341-352, 1988.
02. CORREA, M P. - Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1969. 6v.
03. COSTA, C. M. M - Cipó-pucá (*Cissus sicyoides* Linn.). Rio de Janeiro, 1990. (Apresentado no Curso de Especialização em Medicamentos da UFRJ. Manuscrito).
04. DAVIES, B. H. Carotenoids. In: GOODWIN, T.W. - Chemistry and biochemistry of plant pigments. 2 ed, London: Academic Press, 1976. p. 38-165.
05. ELISABETSKY, E., TEIXEIRA, K. M. C., CARRERA, M. P., MOURA, B. A. S., MULLER, A.H. - Ação Anticonvulsivante do *Cissus sicyoides* (CS), cipó-pucá. *Ciência e Cultura*, São Paulo v. 40, n. 7 supl., 1988. p. 985 (Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 1988).

06. ESTEVES, T. G., VANZELER, M. L. A., MORAES, M. S. - Contribuição ao estudo de *Cissus sicyoides* L.. *Rev. Bras. Farmacognosia*. São Paulo, supl. 01, p. 24, 1986. (Reunião da Sociedade Brasileira de Farmacognosia, Encontro de Professores, 3, São Paulo, 1986).
07. FARMACOPEIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 2 ed. São Paulo: Graf. Siqueira, 1959, 1265p.
08. MOURA, B. A. S., MULLER, A. H., BARBOSA, W. L. R., ELISABETSKY, E. - Estudo químico e farmacológico da Espécie vegetal *Cissus sicyoides* Linn. Belém, 1986. /Apresentado no Curso de Especialização em Química de Produtos Naturais da Universidade do Pará. Manuscrito/.
09. RODRIGUEZ, D. B., RAIMUNDO, L. C., LEE, T. C., SIMPSON, K. L. CHICHESTER, C. O. - Carotenoid pigment changes in ripening *Momordica charantia* fruits. *Ann. Bot.*, London, v. 40, p. 615-624, 1976.
10. SILVA, G.A. - Caracterização e padronização farmacognóstica da droga e do extrato fluído de *Cissus sicyoides* L. São Paulo, 1995, 167p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).

11. TOLEDO, M. C. F., REYES, F. G. R., IADEROZA, M., FRANCIS, F. J., DRAETTA, I. S. - Anthocyanins from anil trepador (*Cissus sicyoides* Linn.). *J. Food Sci.*, Chicago, v. 48, p. 1368-1369, 1983.
12. TROTTA, E. E., PAIVA, D. C. R., COSTA, R. S. - Screening neuroactive effects of crude extracts of amazonian healing plants. In: SIMPÓSIO BRASIL-CHINA DE QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS, Rio de Janeiro, 1989. Resumos, Rio de Janeiro, Ministério da Saúde, 1989, p. 196.
13. ZAMORA-MARTINEZ, M. C., POLA, C. N. P. - Medicinal plants used in some rural populations of Oaxaca, Puebla and Veracruz, Méxio. *J. Ethnopharmacol.*, Lausanne, v. 35, p. 229-257, 1992.