

Controle de qualidade dos extratos polares de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae

Ely E. S. Camargo,^{*,1,2} Wagner Vilegas¹

¹Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química, UNESP, Rua Francisco Degni s/n, Bairro Quitandinha, 14800-900 Araraquara -SP, Brasil

²Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Rodovia Araraquara/Jaú, km 1, 14801-902 Araraquara-SP, Brasil.

RESUMO: Este trabalho descreve o desenvolvimento de metodologia para o controle de qualidade dos extratos etanólicos e infusão de *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae, usando como marcadores os compostos fenólicos. Essa espécie é usada popularmente como afrodisíaca e antiulcerogênica. Foram usadas técnicas cromatográficas: CLAE acoplada com detector de ultravioleta e cromatografia em camada delgada. Foram detectados flavonóides como os principais componentes da planta.

Unitermos: *Turnera diffusa*, Turneraceae, controle de qualidade, flavonoides.

ABSTRACT: "Quality control of polar extracts from *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae." This work describes the development of a methodology for the quality control of ethanol and infusion extracts from *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae, using phenolic compounds as chemical markers. This species is used both as aphrodisiac and antiulcerogenic. We used chromatographic techniques: HPLC coupled to ultraviolet detector as well as thin layer chromatography. Flavonoids were detected as major compounds in this species.

Keywords: *Turnera diffusa*, Turneraceae, quality control, flavonoids.

INTRODUÇÃO

A *Turnera diffusa* Willd. ex Schult., Turneraceae, é um arbusto aromático perene, caracterizado por apresentar uma altura máxima de 2 m, folhas simples pecioladas e lanceoladas, com aproximadamente 2,5 cm de comprimento, coloração verde amarelada, apresentando na parte inferior venação saliente. Suas flores são pequenas, axilares, amarelas, que aparecem no final do verão e são seguidas por um fruto capitular, globoso e pequeno que contém numerosas sementes (Alonso, 1998). *Turnera diffusa* é uma planta predominantemente de regiões áridas e semi-áridas, que se estende desde a Califórnia e México até América do Sul. Também é encontrada na Índia (Alcaraz-Meléndes et al., 1994).

Na família Turneraceae são encontradas espécies com importância medicinal. No México e em Cuba, os índios usam o extrato aquoso de *Turnera diffusa* como expectorante, diurético, afrodisíaco e em outros tratamentos (Perez et al., 1984). O decoto de folhas de *T. diffusa* também é usado para curar distúrbios digestivos (Krag, 1976; Ishikura, 1982). Na Bolívia, o extrato aquoso das folhas é usado no tratamento da blenorragia. O chá de *T. ulmifolia*, preparado usando-se a planta inteira, é indicado para mulheres em período pós-parto e para

aquelas que apresentam amenorréia (Ayensu, 1978). Em Cuba, o extrato aquoso a quente das flores é utilizado para alívio das cólicas menstruais. Na Jamaica, o extrato aquoso das folhas é utilizado como antipirético e na Colômbia o decoto das folhas é usado como abortivo.

Atualmente, as farmácias de manipulação, por não disporem de equipamentos para moagem e na maioria dos casos não terem espaço físico em seus estabelecimentos, adquirem as drogas vegetais já pulverizadas no comércio, ficando difícil a identificação botânica e na maioria das vezes adquirem as plantas de fornecedores não idôneos, atraídos por custos bem menores dos praticados no mercado. A identificação, neste caso, é difícil, pois seria necessário um controle químico, o que implicaria em estabelecer uma quarentena para o uso da droga, uma vez que os estabelecimentos trabalham com estoques mínimos. Portanto, não tem noção do que está sendo adquirido, onde pode-se observar na substituição da *Turnera diffusa*, pouco encontrada no Brasil, com a *Turnera ulmifolia*, bastante difundida em todo território brasileiro. Em virtude dessas dificuldades de identificação, em grande parte por falta de monografias de controle da qualidade, acabam levando as pessoas consumirem fitoterápicos erradamente, o que pode ocasionar supressão de efeitos ou mesmo apresentando efeitos indesejáveis e até tóxicos.

A legislação atual que regulamenta o registro e comercialização de fitoterápicos no Brasil, foi publicada em março de 2004 pela Anvisa, a qual revogou as portarias números 123 e 6 do SNVS/MS e RDC 17 Anvisa, apresenta como exigências o controle botânico, controle microbiológico e o controle químico de qualidade, além da exigência de ensaios pré-clínicos e clínicos da droga. Para estes últimos a ANVISA estabeleceu um prazo para os fabricantes comprovarem eficácia clínica (Anvisa, 2004). Porém, em 2009, através de consulta pública a câmara técnica de fitoterápicos da Anvisa definiu novas regras para registros de produtos fitoterápicos baseados no uso popular da planta medicinal, a qual deverá apresentar através de relatos e depoimentos seu uso nos últimos 20 anos, caracterizando os efeitos terapêuticos e não toxicidade observada.

Apesar das exigências implícitas na legislação vigente, pode-se observar que algumas empresas brasileiras não têm se preocupado em garantir a qualidade dos produtos fitoterápicos. Vale ressaltar que desde de dezembro de 1993 a Organização Mundial de Saúde, através de um relatório, expõe a importância do controle de qualidade de fitoterápicos, visando uma preocupação com a saúde da população mundial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico

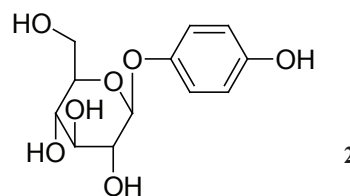
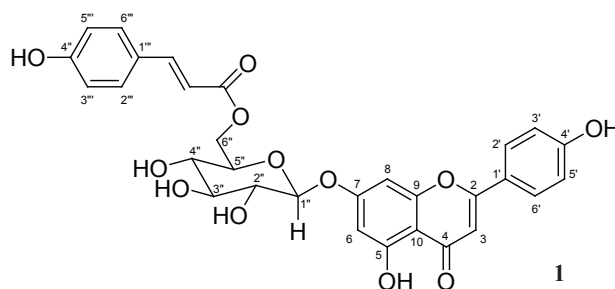
As plantas utilizadas foram fornecidas pelo Departamento de Fisiologia do Instituto de Biociências da Unicamp, provenientes de Quintana Roo, México, onde foram identificadas macro e microscopicamente, depositada no herbário do Centro de Investigação Científica de Yucatan sob número 3773. Os extratos foram preparados por maceração a partir das folhas secas e moídas de *T. diffusa* em etanol (EtOH 96%) por sete dias, após filtrou-se e concentrou-se em evaporador rotativo a 50 °C até completa evaporação do EtOH 96% (Poser & Mentz, 2004).

Análises cromatográficas

Os experimentos foram feitos em cromatógrafo Waters modelo Millipore, equipado com sistema binário de bombas modelo 501 Waters, detector UV (Waters modelo 486), coluna Phenomenex C-18 em fase reversa (250 x 4,60 mm, 5 μ). As condições cromatográficas foram estabelecidas após experimentos realizados com diversos sistemas de solventes, sendo que, na quantificação da apigenina-7-O- β -D-*p*-coumaroil (1 \rightarrow 6) glucopiranosídeo (**1**) foi por modo gradiente com acetonitrila/água e ácido fórmico 0,5 %. A mistura foi estabelecida, iniciando-se com uma concentração de 30% de acetonitrila e 70 % de água/ácido fórmico, aumentando-se progressivamente a concentração de acetonitrila até 40 % em um período de

40 min, passando a 100% em 5 min, permanecendo nessa concentração por mais 20 min. O sistema de solventes utilizados na quantificação da *p*-arbutina (**2**), foi por modo gradiente com metanol/água, inicialmente com uma concentração de metanol 10%, passando a 50% em 30 min, na seqüência elevou-se a concentração de MeOH para 100%, permanecendo assim por aproximadamente 20 min (Collins, 1977).

Nas análises por cromatografia comparativa em camada delgada (CCCD), na identificação de *p*-arbutina presente somente nos extratos etanólico e infusão de *T. diffusa*, utilizou-se placas, as quais foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 (Merck) em água destilada, na proporção 1:2 (p/v), sobre placas de vidro 5 x 10 ou 20 x 10 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente. Após a preparação das placas, as mesmas foram deixadas em repouso por aproximadamente 8 h à temperatura ambiente e após a secagem, foram colocadas em estufa a 120 °C por um período de 30 min para ativação (Collins, 1977).



Determinação de cinzas

No desenvolvimento da análise de cinzas totais foram tomados 3,0 g de folhas secas e moídas de *T. diffusa* e *T. ulmifolia*, em cadinho previamente calcinado, resfriado e pesado. As amostras foram incineradas até a eliminação de todo o carvão. Após resfriamento em dessecador, aquiratou-se a massa do conjunto. Na determinação de cinzas insolúveis em ácido o resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido por 5 min com 25 mL de HCl, em cadinho coberto com vidro de relógio. Lavou-se o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando a água ao cadinho. Recolheu-se o

resíduo insolúvel sobre papel de filtro isento de cinzas, lavou-se com água quente até neutralização do filtrado, transferiu-se o papel contendo o resíduo para um cadinho seco e incinerou-se, sendo a massa determinada ao final do processo (F. Bras IV, 1988).

Doseamento de flavonóides totais

Na determinação de flavonóides totais, colocou-se em um balão de fundo redondo de 100 mL, 0,4 g da droga moída com granulometria 1-0,8 mm, exatamente pesados, acrescidos de 1 mL de uma solução de urotropina (hexametileno-tetramina) a 0,5%, 20 mL de acetona R e 2 mL de ácido clorídrico R e aqueceu-se em manta, mantendo sob refluxo, por 30 min. Filtrou-se através de uma pequena quantidade de algodão para um balão volumétrico de 100 mL. Lavou-se o resíduo da droga e o algodão, em balão de fundo redondo, com duas porções de 20 mL de acetona, sob refluxo, por 10 min. Após arrefecimento a temperatura ambiente, as soluções foram filtradas, através de algodão para um balão volumétrico, completando-se o volume com acetona. Em funil de separação, foi adicionado 20 mL da solução acetônica, 20 mL de água destilada. A extração foi realizada com 15 mL de acetato de etila R, repetindo-se por três vezes, com porções de 10 mL. As frações de acetato de etila foram reunidas e lavadas em funil de separação com duas porções de 50 mL de água destilada e colocadas em balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com acetato de etila (solução mãe - SM). Foi adicionado 1 mL do reagente de cloreto de alumínio (colocou-se 1,0 g de AlCl_3 em um balão volumétrico de 50 mL, completando-se o volume com solução metanólica de ácido acético a 98 %) a 10 mL da solução mãe, diluindo-se a 25 mL com solução metanólica de ácido acético R (colocou-se 5 mL de ácido 98 % em um balão volumétrico de 100 mL, o qual se completa o volume com metanol), obtendo-se assim a solução amostra - SA. Ao mesmo tempo, 10 mL da solução mãe foram diluídas a 25 mL com solução metanólica de ácido acético R (solução comparativa - SC). Após 30 min mediu-se a absorvância de SA a 425 nm, em cubeta com 1 cm de espessura contra SC (Camargo, 2001). O cálculo do teor baseia-se na absorvância específica da quercetina, $E_{1\%}^{1\text{cm}} = 500$, segundo a fórmula:

$$Q = \frac{\text{Abs. } 6250}{500e.(100-t)}$$

onde:

Abs = absorvância medida;

e = massa da droga em g;

t = perda por dessecação (%; m/m).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise quantitativa da apigenina-7-O- β -D-p-coumaroil (1 \rightarrow 6) glucopiranosídeo (1) foi realizada utilizando-se o método do padrão externo. Foram preparadas soluções-padrão da substância, isolada do extrato EtOH 96% e identificada por RMN ^1H , ^{13}C (Harborne & Williams, 2000), e massas (Stobiecki, 2000), nas seguintes concentrações: 0,66, 2,0 e 6,0 $\mu\text{g/mL}$. O preparo da amostra se deu a partir do extrato EtOH 96%, onde coletou-se 100 mg do mesmo e diluiu-se em 1 mL de metanol. A infusão foi preparada a 10% (p/v) da planta seca em água destilada fervente até arrefecimento.

Na construção da curva de calibração da apigenina-7-O- β -D-p-coumaroil (1 \rightarrow 6) glucopiranosídeo foi encontrado um valor de índice de correlação de 0,99959. O cromatograma mostra a separação dos componentes presentes no extrato EtOH 96% de *T. diffusa*. Pode-se perceber que a separação dos componentes foi obtida em aproximadamente 40 min, obtendo-se boa resolução cromatográfica dos picos. O pico correspondente à substância apigenina-7-O- β -D-p-coumaroil (1 \rightarrow 6) glucopiranosídeo elui com tempo de retenção 23,37 min, (Figura 1) o que foi comprovado pelo enriquecimento do extrato pela adição do mesmo composto, isolado pelos procedimentos fitoquímicos. Esse pico apresentou boa resolução de linha base, de forma a permitir não só o controle qualitativo, mas também quantitativo da substância presente no extrato EtOH 96% e na infusão das folhas secas e moídas de *Turnera diffusa*.

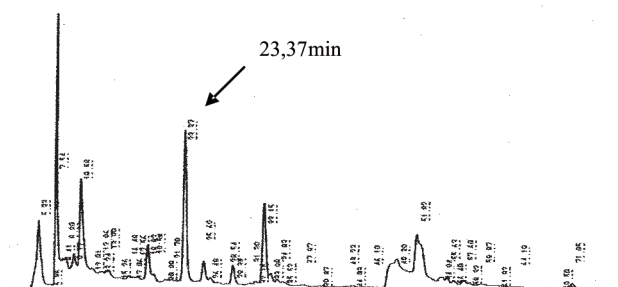


Figura 1. Cromatograma do extrato EtOH 96% de *Turnera diffusa*, obtido por HPLC/UV para quantificação da apigenina-7-O- β -D-p-coumaroil (1 \rightarrow 6) glucopiranosídeo (1).

Os resultados foram obtidos através da equação por regressão linear, conseguidos pelo cálculo das áreas, de diversas concentrações diferentes do pico correspondente à apigenina-7-O- β -D-p-coumaroil (1 \rightarrow 6) glucopiranosídeo, onde, após identificação e cálculo da média das áreas obtidas determinou-se a concentração da substância em análise, no extrato EtOH 96%, obtendo 4,4 $\mu\text{g/mL}$ e na infusão a concentração de 1,4 $\mu\text{g/mL}$.

Na análise quantitativa da *p*-arbutina (2), no extrato EtOH 96% e infusão das folhas secas e moídas,

observou-se que o pico correspondente a substância, identificada no cromatograma por injeção direta do padrão externo e confirmado por enriquecimento do extrato EtOH 96% e da infusão de *T. diffusa* adicionando 100 µL do padrão externo, em diluição 1:100. Verificou-se que o tempo de retenção foi bastante baixo, próximo ao *front* do solvente, devido à alta polaridade da molécula (Stobiecki, 2000). Mesmo assim considerou-se o melhor sistema de solventes para quantificação da *p*-arbutina no extrato e infusão de *T. diffusa*. Nas condições descritas anteriormente, a *p*-arbutina (2) elui com TR = 11,34. Dessa forma aquilatou-se a massa a partir do cálculo médio da área do pico correspondente, aplicado a equação obtida pela curva de calibração por regressão linear com uso de padrão externo onde foi determinada a concentração da substância *p*-arbutina na extrato EtOH 96%, obtendo 1,0 µg/mL e na infusão a concentração de 1,2 µg/mL.

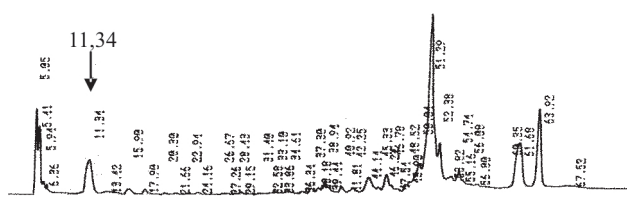


Tabela 1. Resultados obtidos por determinação de cinzas totais e insolúveis em ácido das espécies *Turnera ulmifolia* e *Turnera diffusa*.

	Cinzas insolúveis em ácido (%)	Cinzas totais (%)
<i>Turnera ulmifolia</i>	0,12	0,75
<i>Turnera diffusa</i>	2,30	6,67

CONCLUSÕES

Na quantificação dos compostos: apigenina-7-*O*- β -D-*p*-coumaroil (1 \rightarrow 6) glucopiranosídeo (**1**) e *p*-arbutina (**2**), nos extratos EtOH 96% e infusão, observou-se que a substância (**1**) apresentou concentração maior no extrato etanólico que na infusão, porém a substância (**2**) apresentou-se inversamente no extrato e na infusão, o que pode-se caracterizar a alta polaridade do composto (**2**) em relação ao solvente usado na extração.

Os testes farmacognósticos apresentados no trabalho demonstraram índices confiáveis para determinação qualitativa das espécies, garantindo a identificação segura da *Turnera diffusa*, Willd.

Assim, pode-se concluir que o conjunto de experimentos realizados nesse trabalho indicaram a que os resultados obtidos podem ser adequadamente empregados para a realização de ensaios de controle de qualidade de *Turnera diffusa* Willd., Turneraceae.

REFERÊNCIAS

- Alcaraz-Meléndez L, Real-Cosío S, Bashan Y 1994. Domestication of micropropagated plants of the spice damiana (*Turnera diffusa*), *Plant Cell Rep* 13: 679-682.
- Alonso JR 1998. *Tratado de fitomedicina - Bases clínicas y farmacológicas*. Isis Ediciones S.R.L. Buenos Aires, 1039 p.
- Anvisa 2000. Resolução-RDC nº 17 de 24.2.2000. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União 25.2.2000.
- Anvisa 2004. Resolução-RDC nº 48 de 16.3.2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da União 18.3.2004.
- Ayenu ES 1978. *Medicinal plants from West Indies*. Manuscript, 110 p.
- Camargo EES 2001. Perfil químico e controle de qualidade de *Turnera diffusa*. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. Araraquara, 103 p.
- Collins CH, Braga GL, Bonato PS 1977. *Introdução a Métodos Cromatográficos*. Campinas Unicamp, 7ª edição.
- Farmacopéia Brasileira 1988. 4 ed. São Paulo. Atheneu.
- Falkenberg MB 2004. Introdução a análise fitoquímica. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 229-246.
- Harborne JB, Williams CA 2000. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry* 55: 481-504.

- Ishikura N 1982. Flavonol glycosides in the flowers of *Hibiscus mutabilis* v. *versicolor*. *Agr Bio Chem Tokyo* 46: 1705-1706.
- Krag KJ 1976. *Plants used as contraceptives by North-American Indians. An ethnobotanical study*. Thesis BS, Harvard University, 117 p.
- Ministério da Saúde 1994. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS nº 123 de 19.10.94. Estabelece normas para o registro de produtos fitoterápicos, determinando 30 dias para os questionamentos fundamentados visando o seu aperfeiçoamento. Diário Oficial da União 20.10.1994.
- Ministério da Saúde 1995. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria SVS nº 6 de 31.1.95. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da União 6.2.1995.
- Perez RM, Ocegueda GA, Munoz JL, Avila JG, Morrow WW 1984. A study of the hypoglycemic effect of some Mexican plants. *J Etnopharmacol* 123: 253-262.
- Poser GLV, Mentz LA 2004. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia - da planta ao medicamento*. 5ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 75-90.
- Stobiecki, M. 2000. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 54: 237-56.