

Análise de β -ecdisona em plantas *in vivo* e *in vitro* de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, através da Cromatografia em Camada Delgada

FLORES, R.^{1*}; CEZAROTTO, V.²; BRONDANI, D.²; GIACOMELLI, S.R.²; NICOLOSO, F.T.¹

¹Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Centro de Ciências Naturais e Exatas (CCNE), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Avenida Roraima, 1000, Cidade Universitária, Bairro Camobi, CEP: 97105-900, Santa Maria-Brasil. *rejane.flores@terra.com.br, ftnicoloso@yahoo.com ²Laboratório de Análises Químicas e Farmacêuticas (LAQUIFAR), Universidade Regional Integrada (URI), CEP: 98400-000, Rua Assis Brasil, 709, Frederico Westphalen-Brasil. laquifar@fw.uri.br

RESUMO: *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, conhecida como ginseng brasileiro, é uma planta extensivamente usada na medicina popular em decorrência de possuir propriedades fitoterápicas. O objetivo deste trabalho foi verificar a presença de β -ecdisona nas raízes e partes aéreas de plantas *in vivo* e *in vitro* provenientes de dois acessos (BRA e JB-UFSM) de *Pfaffia glomerata* através da cromatografia em camada delgada (CCD). Nas plantas *in vivo*, as manchas cromatográficas demonstraram que a β -ecdisona está presente na raiz e na parte aérea. Os acessos não apresentaram diferenças em relação ao perfil de manchas cromatográficas. A análise em CCD não detectou a presença de β -ecdisona nas plantas cultivadas *in vitro*.

Palavras-chave: ginseng brasileiro, CCD, ecdisteróides, controle de qualidade, cultivo *in vitro*

ABSTRACT: Analysis of β -ecdysone from *in vivo* and *in vitro* cultured plants of *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen using Thin-Layer Chromatography. *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, known as Brazilian ginseng, is a plant extensively used in folk medicine due to its phytotherapeutic characteristics. The aim of this study was to evaluate the presence of β -ecdysone in the roots and shoots of *in vivo* and *in vitro* cultured plants of two sources (BRA and JB-UFSM) of *Pfaffia glomerata* using Thin-Layer Chromatography (TLC). For *in vivo* cultured plants, TLC plates showed that β -ecdysone was present in the roots and shoots. Sources showed no differences concerning TLC plates. TLC analysis did not detect β -ecdysone in the *in vitro* cultured plants.

Key words: Brazilian ginseng, TLC, ecdysteroids, quality control, *in vitro* culture

INTRODUÇÃO

Várias indústrias farmacêuticas brasileiras produzem fitoterápicos e suplementos alimentares contendo em sua formulação raízes de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen (Brasil, 2004). Esta espécie, conhecida popularmente como ginseng brasileiro, apresenta várias propriedades medicinais, destacando-se os efeitos antidepressivos, tônicos e afrodisíacos, além de ser utilizada para o tratamento de diabetes, reumatismo, esgotamento físico e mental, falta de memória e estresse (Magalhães, 2000; Zimmer et al., 2006). Vários compostos foram isolados e identificados a partir das raízes de *P. glomerata*, como o ácido glomérico, ácido oleanólico, ácido famérico, além de vários ecdisteróides (Shiobara et al., 1993). Nos dias atuais, o ecdisteróide β -

ecdisona é utilizado como marcador químico no controle de qualidade da matéria-prima e dos medicamentos produzidos com *P. glomerata* (Magalhães, 2000; Zimmer et al., 2006).

Em função dos critérios de eficácia, segurança e qualidade exigida para a obtenção do registro de medicamentos fitoterápicos no Ministério da Saúde (Brasil, 2004), diversos ensaios farmacológicos foram conduzidos com *P. glomerata*, tendo em vista o desenvolvimento e a validação de técnicas necessárias para o controle da qualidade da matéria-prima (Zimmer et al., 2006).

A cromatografia em camada delgada (CCD) é uma das técnicas mais empregadas no controle da qualidade de plantas medicinais devido à

simplicidade, rapidez, praticidade e baixo custo; a grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna a CCD uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (Gil et al., 2005).

Em *P. glomerata*, a obtenção de perfil cromatográfico de amostras de raízes mostra-se ferramenta valiosa para a identificação, quantificação e avaliação da estabilidade da matéria-prima e ou extratos derivados. Recentemente, Vigo et al. (2004) salientaram a importância da CCD para a padronização farmacognóstica e correta identificação de *P. glomerata*, possibilitando o controle de qualidade.

Apesar de, nos dias atuais, o metabólito β -ecdisona ser utilizado como produto de referência no controle de qualidade das raízes de *P. glomerata*, há poucas pesquisas referentes à presença deste composto em outros órgãos da planta, tampouco em relação à presença do mesmo em plantas *in vitro*. Estes estudos fornecerão novas informações à indústria farmacêutica, além de contribuir para um melhor entendimento do papel fisiológico dos ecdisteróides nas plantas. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi verificar a presença de β -ecdisona nas raízes e partes aéreas de plantas *in vivo* e *in vitro*, oriundas de dois acessos de *P. glomerata*, através da cromatografia em camada delgada.

MATERIAL E MÉTODO

Utilizaram-se dois acessos (BRA e JB-UFSM) de *P. glomerata* (Spreng.) Pedersen, sendo o acesso BRA coletado no município de Querência do Norte, PR e o acesso JB-UFSM coletado no Jardim Botânico da UFSM, Santa Maria, RS. Uma excisada desta espécie encontra-se depositada no Herbário do Departamento de Biologia da UFSM (SMDB 7606).

Segmentos nodais (1 cm) de ambos os acessos foram desinfestados e cultivados em meio MS (Murashige & Skoog, 1962), suplementado com sacarose (30 g L⁻¹), mio-inositol (100 mg L⁻¹) e ágar (6 g L⁻¹) (Nicoloso et al., 2001). O pH foi ajustado para 5,9. As plantas foram cultivadas em sala de crescimento com temperatura de 25 ± 2°C, 16 horas de fotoperíodo e 35 mM m⁻² s⁻¹ de luminosidade. Após 30 dias de cultivo, as plantas foram aclimatizadas e transferidas para condições de cultivo em solo, no município de São Pedro do Sul, RS, Brasil.

A presença da β -ecdisona (Figura 1) foi analisada nas raízes e partes aéreas das plantas *in vitro* (30 dias de idade), bem como, nas plantas transferidas para o campo (*in vivo*), as quais foram coletadas, durante a primavera, dois anos após o plantio no solo. O material vegetal foi seco em estufa a 50°C (Simões et al., 2001) e triturado em gral. As amostras (200 mg) foram extraídas com metanol (2 vezes, 5 mL) em banho ultra-sônico, durante 20

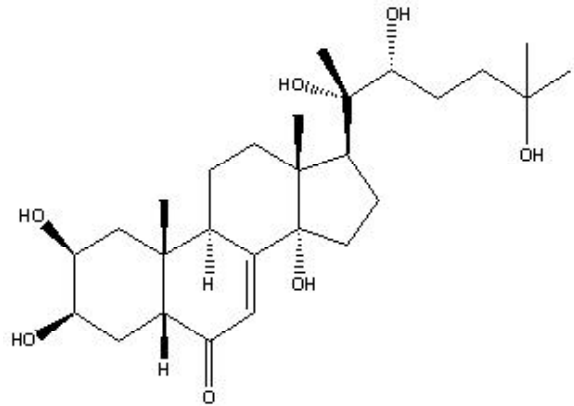


FIGURA 1. Estrutura do fitoecdisteróide β -ecdisona.

minutos. O sobrenadante foi removido após centrifugação a 1000 g durante 10 minutos e os extratos obtidos das duas extrações foram combinados (10 mL) (Flores, 2006).

Foram aplicados 15 L das amostras e do padrão da β -ecdisona, com auxílio de capilar graduado, em cromatofolhas de alumínio (AL TLC Silicagel 60 F₂₅₄, Merck, 20 x 20 cm). O sistema foi mantido em câmara de saturação com os eluentes: n-butanol, acetato de etila, ácido fórmico e água (4:1:0,6:0,5). A visualização das manchas foi efetuada por exposição à luz UV a 254 nm e a revelação com vanilina sulfúrica, em capela, com posterior aquecimento em estufa até o aparecimento de cores na placa. O método cromatográfico utilizado seguiu a metodologia proposta por Vigo et al. (2004) para esta espécie.

As placas foram confeccionadas em triplicata e documentadas por fotografia digital. A presença de β -ecdisona na placa cromatográfica foi realizada pela comparação dos Fatores de Retenção (Rf) das manchas das amostras com o do padrão β -ecdisona adquirido da ChromaDex Inc. (Califórnia, U.S.A.). A solução de β -ecdisona foi preparada em metanol a 25 mg mL⁻¹. Realizou-se a co-cromatografia para confirmar a identificação da β -ecdisona.

RESULTADO E DISCUSSÃO

As análises cromatográficas das amostras das plantas *in vivo* dos acessos de *P. glomerata* (Spreng) Pedersen mostraram a presença de β -ecdisona tanto nas raízes como na parte aérea das plantas. A mancha correspondente à β -ecdisona apresentou Rf=0,7 e coloração esverdeada, o que a diferenciou das demais manchas observadas na placa cromatográfica.

Recentemente, devido à importância das raízes do ginseng brasileiro para a fabricação de fitoterápicos, a presença e o doseamento de β -ecdisona vêm sendo muito estudados (Flores, 2006),

porém as pesquisas estão limitadas ao sistema radicular da planta (Magalhães, 2000; Vigo et al., 2004). Contudo, os resultados obtidos neste estudo mostraram que a parte aérea de *P. glomerata* também contém β -ecdisona, além de vários outros metabólitos, cujas manchas não foram detectadas nas raízes (Figuras 2A, 1B, 1E e 1F). De fato, várias pesquisas vêm demonstrando que os fitoecdisteróides podem ser biossintetizados e/ou acumulados em diferentes órgãos das plantas. Em *Pfaffia iresinoides*, estudos sobre o teor órgão-específico de ecdisteróides mostraram que a β -ecdisona estava presente tanto nas raízes como no caule e folhas desta espécie (Nishimoto et al., 1987), o que concorda com os resultados obtidos neste estudo.

Por outro lado, manchas correspondentes à β -ecdisona não foram detectadas nos extratos metanólicos das raízes e partes aéreas das plantas *in vitro*, em ambos os acessos estudados (Figuras 2C, 1D, 1G e 1H). Apesar de estas amostras apresentarem manchas com Rf muito similar àquele do padrão de β -ecdisona (Figura 2P), a co-cromatografia mostrou que as manchas detectadas nas plantas *in vitro* não se tratavam da β -ecdisona, pois aquelas apresentavam coloração diferente quando comparada à mancha da β -ecdisona. Ao contrário, estudos conduzidos com plantas *in vitro* *Ajuga* evidenciaram um alto teor de fitoecdisteróides (Tomás et al., 1993). Contudo, é importante salientar que é muito difícil comparar a produção de determinado metabólito produzido a partir de células e/ou tecidos *in vitro*, com aqueles produzidos nos tecidos de plantas completas, cultivadas a campo. Neste estudo, a não detecção da β -ecdisona nas plantas *in vitro* pode ser devido a pouca diferenciação

dos tecidos e órgãos, além do reduzido tempo de cultivo *in vitro* (30 dias), quando comparado às plantas cultivadas a campo, as quais apresentavam dois anos de idade. A diferenciação dos tecidos, a idade da planta e as condições do meio ambiente são importantes fatores que afetam a produção de metabólitos secundários.

Constatou-se que os perfis cromatográficos das amostras *in vivo* e *in vitro* do acesso JB-UFSM (Figuras 2A, 1B, 1C, 1D) foram similares as do acesso BRA (Figuras 2E, 1F, 1G, 1H). Estes resultados demonstram que, apesar da *P. glomerata* apresentar grande variabilidade genética e morfológica (Magalhães, 2000), os acessos estudados neste trabalho não apresentaram diferenças marcantes em relação à composição química. O padrão geral das manchas, bem como o Rf e a coloração da mancha correspondente à β -ecdisona obtidos neste estudo, com as plantas *in vivo*, foram similares aos encontrados por Vigo et al. (2004), em amostras de raízes de *P. glomerata*.

Apesar de a β -ecdisona não ter sido detectada nas amostras *in vitro*, a comparação dos perfis cromatográficos das partes aéreas das plantas *in vivo* e *in vitro*, mostrou que as últimas apresentam um maior número de manchas (Figuras 2D, 2H) quando comparado às plantas coletadas a campo (*in vivo*) (Figuras 2B, 2F). Várias pesquisas têm mostrado que as condições impostas durante o cultivo *in vitro* podem influenciar na biossíntese e/ou acúmulo de diferentes metabólitos, inclusive de ecdisteróides (Tomás et al., 1993).

O sistema cromatográfico adotado neste estudo mostrou-se como uma alternativa viável para a detecção rápida de β -ecdisona em amostras de

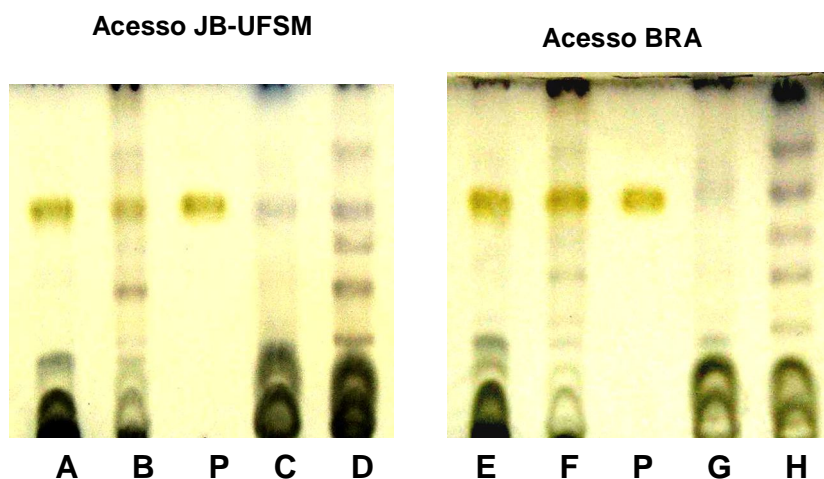


FIGURA 2. Comparação cromatográfica dos extratos metanólicos das raízes e partes aéreas de plantas *in vivo* e *in vitro* de dois acessos de *Pfaffia glomerata*. **A)** raízes do acesso JB-UFSM *in vivo*, **B)** parte aérea do acesso JB-UFSM *in vivo*, **C)** raízes do acesso JB-UFSM *in vitro*, **D)** parte aérea do acesso JB-UFSM *in vitro*, **E)** raízes do acesso BRA *in vivo*, **F)** parte aérea do acesso BRA *in vivo*, **G)** raízes do acesso BRA *in vitro*, **H)** parte aérea do acesso BRA *in vitro*, **P)** padrão β -ecdisona.

ginseng brasileiro. A obtenção de um perfil cromatográfico de amostras de raízes de diferentes acessos de *P. glomerata* mostra-se útil para o controle da qualidade da matéria-prima, principalmente na avaliação da estabilidade das drogas ou extratos derivados. Além disso, Vigo et al. (2004) ressaltaram a importância da CCD na avaliação da pureza e da autenticidade de diferentes drogas comercializadas como sendo provenientes de raízes *P. glomerata*.

Apesar de a CCD ser uma ferramenta muito útil para a identificação rápida de compostos de interesse em uma amostra, neste estudo, esta técnica mostrou-se pouco sensível para a análise de β -ecdisona em amostras de plantas cultivadas *in vitro*. A metodologia de CCD adotada mostrou-se adequada apenas para a detecção de β -ecdisona quando em concentração igual ou superior a 25 mg mL⁻¹. Desta forma, a não visualização da mancha referente à β -ecdisona nas plantas *in vitro* pode ser devido a ausência do composto no material, pela presença da Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil) pelo fornecimento do acesso BRA de *Pfaffia glomerata*.

CONCLUSÃO

Os resultados permitiram concluir que: a) a CCD é técnica viável para a detecção de β -ecdisona nas raízes e partes aéreas de plantas *in vivo* de *P. glomerata*; b) os acessos BRA e JB-UFSM não apresentam diferenças marcantes em relação ao perfil de bandas cromatográficas e c) a análise em CCD não detecta β -ecdisona em plantas *in vitro*.

AGRADECIMENTO

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Brasília, DF, Brasil) pelo fornecimento do acesso BRA de *Pfaffia glomerata*.

REFERÊNCIA

- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- FLORES, R. **Cultura de tecidos e produção de β -ecdisona em *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Pfaffia tuberosa* (Spreng.) Hicken**. 2006. 168p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Produção Vegetal) - Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.
- GIL, E.S. et al. **Controle físico-químico de qualidade de medicamentos**. Campo Grande: UNIDERP, 2005. 438p.
- MAGALHÃES, P.M. Agrotecnologia para el cultivos de fafia e ginseng brasileiro. In: MARTINEZ, J.V. et al. **Fundamentos de agrotecnologia de cultivo de plantas medicinales iberoamericanas**. Bogotá: CYTED, 2000. p.323-32.
- MURASHIGUE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v.5, p.473-97, 1962.
- NICOLOSO, F.T. et al. Micropropagação do Ginseng brasileiro [*Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen]. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.3, p.11-8, 2001.
- NISHIMOTO, N. et al. Ecdysteroids from *Pfaffia iresinoides* and reassignment of some ¹³CNMR chemical shifts. **Phytochemistry**, v.26, n.9, p.2505-7, 1987.
- SHIOBARA, Y. et al. A nortriterpenoid, triterpenoid and ecdysteroids from *Pfaffia glomerata*. **Phytochemistry**, v.32, p.1527-30, 1993.
- SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 833p.
- TOMÁS, J. et al. Phytoecdysteroid production by *Ajuga reptans* tissue culture. **Phytochemistry**, v.32, n.2, p.317-24, 1993.
- VIGO, C.L.S. et al. Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius - Amaranthaceae Kuntze. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p.7-19, 2004.
- ZIMMER, A.R. et al. HPLC method for the determination of ecdysterone in extractive solution from *Pfaffia glomerata*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.40, n.2, p.450-3, 2006.