

DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE *Crataegus pinnatifida* POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Wilson Nathan de Carvalho Previato (PIC/UEM), Bruna Gheller de Souza (Colaboradora), Andréa Diniz (Coorientadora), Fernanda Belincanta Borghi Pangoni (Orientadora), e-mail: wilsonnathanwn13@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde /
Departamento de Farmácia / Maringá, PR.

Farmácia/ Análise e Controle de Qualidade de Medicamentos

Palavras-chave: Medicina Tradicional Chinesa, Controle de Qualidade, Fitoterápico.

Resumo:

A espécie *Crataegus pinnatifida* é popularmente conhecida na Medicina Tradicional Chinesa (MTC) devido ao seu alto teor polifenólico e aos seus efeitos terapêuticos. Neste trabalho foi realizado o desenvolvimento de método para caracterização do perfil em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) da espécie *C. pinnatifida* para utilização no controle de qualidade de medicamento fitoterápico. O método desenvolvido, capaz de caracterizar o perfil da espécie vegetal foi baseado na identificação por CCD de *Passiflora incarnata*. Este apresentou-se seletivo e foi possível a identificação de três marcadores, Hiperosídeo, Ácido clorogênico e Quercetina.

Introdução

Há muito tempo o Espinheiro (*Crataegus* spp.) é utilizado por muitas culturas devido a suas atividades terapêuticas. Atualmente a espécie *Crataegus pinnatifida* é popularmente conhecida na Medicina Tradicional Chinesa (MTC) devido ao seu alto teor polifenólico, apresentando grande potencial antioxidante, redutor de colesterol, com atuação em doenças cardiovasculares, inflamatórias, e estimulador digestivo (Jurikova, 2012).

O controle de qualidade de um medicamento engloba medidas que garantem a identidade, atividade, teor, pureza, eficácia e inocuidade do produto. Um parâmetro de controle de qualidade muito utilizado para a identificação de uma espécie vegetal, preconizado por compêndios nacionais e internacionais, é a avaliação do perfil em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) (ANVISA, 2019).

O objetivo do trabalho foi desenvolver um método para caracterização do perfil em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) dos frutos de *C. pinnatifida* para controle de qualidade do medicamento fitoterápico comercializado no Brasil (Shan Zha).

Materiais e métodos

Preparo de padrões

Os marcadores Hiperosídeo, Rutina, Ácido clorogênico, Epicatequina e Quercetina, foram escolhidos baseados na descrição de Jurikova e colaboradores (2012), como sendo componentes majoritários nos frutos de *C. pinnatifida*. Os padrões foram preparados em metanol nas seguintes proporções: Hiperosídeo (1:5), Rutina (1:5), Ácido clorogênico (1:2), Epicatequina (1:1), Quercetina (1:5). As soluções foram fracionadas, em vials âmbar de 1,5 mL para posterior aplicação em cromatoplaça. Foi aplicado 10,0 µL de cada padrão em placa.

Preparo de amostras

A amostra de fruto foi considerada como “perfil padrão” em comparação ao perfil do extrato encapsulado comercializado no Brasil (Shan Zha). Ambas amostras, tanto fruto chinês, cominuído, como o extrato encapsulado (Shan Zha), foram submetidos ao mesmo processo de extração. Separadamente foi extraído 1,0 g de cada amostra em 4,0 mL de metanol PA, com auxílio do banho de ultrassom, sem aquecimento, por 15 minutos. As soluções foram então filtradas em membrana de 0,45 µm (PVDF) e acondicionadas em vials âmbar de 1,5 mL para posterior aplicação em cromatoplaça.

Preparo de reagentes

Foram preparadas duas soluções reveladoras, ácido difenilbórico 1% em metanol (NP) e Polietilenoglicol 5% em metanol (PEG), ambos preparados baseado na metodologia da espécie *Passiflora incarnata* (Farmacopeia Europeia 10ª Ed., 2019).

Desenvolvimento de metodologia de cromatografia em camada delgada

Para fins de controle e avaliação do desenvolvimento do método local para a CCD da espécie em estudo, foi utilizado o método descrito na Farmacopeia Chinesa. A partir deste, modificações e adequações foram realizadas para obter método cromatográfico com a resolução almejada.

Metodologia farmacopeica de CCD (CHINA, 2005) para análise de *C. pinnatifida*

A metodologia adotada para identificação dos frutos de *C. pinnatifida* foi a CCD, em que utilizou-se cromatoplaça de Sílica Gel 60 F₂₅₄ Merck (15 x 10 cm), em corrida de 8,0 cm. Os padrões e amostras foram aplicados com auxílio de aplicador automático, Camag, em bandas tracejadas. Foi utilizado cuba Camag (20 x 10 cm x 5 cm) bipartida. A fase móvel foi: Tolueno: Acetato de etila: Ácido fórmico (32,7: 6,5: 0,8), utilizou-se 20 mL de fase móvel em cada bipartição da cuba e a mesma permaneceu em saturação por 30 minutos, com utilização de papel filtro (20 x 10 cm). Logo após a corrida a leitura da placa foi realizada em câmara de UV 365 nm e também em UV 254 nm.

Desenvolvimento de método em CCD) para análise de *C. pinnatifida*

Esta análise baseou-se na metodologia de identificação por CCD da espécie *Passiflora incarnata*, descrita na Farmacopeia Europeia 10ª Ed., 2019.

Utilizou-se cromatoplaça de Sílica Gel 60 F₂₅₄ Merck – 20 x 10 cm, em corrida de 8,0 cm. Os padrões e amostras foram aplicados com auxílio de aplicador automático, Camag, em bandas tracejadas. Foi utilizado cuba Camag (20 x 10 cm x 5 cm) bipartida. A fase móvel foi: Acetato de etila: Metiletilcetona: Ácido fórmico: Água ultra purificada (20: 12: 4: 4). Foi utilizado 20 mL de fase móvel em cada bipartição da cuba, e a mesma permaneceu em saturação por 30 minutos, com utilização de papel filtro (20 x 10 cm). Logo após a corrida, a leitura da placa foi realizada em câmara de UV 365 nm, e foi levada em estufa a 100- 105°C por 1 minuto até desaparecimento total do odor da fase móvel. A cromatoplaça foi revelada com a utilização da combinação de NP e PEG. Após foi direcionada a secagem em estufa 100- 105°C por 5 minutos e novamente realizou-se a leitura em câmara de UV 365 nm.

Resultados e Discussão

Inicialmente foi avaliada a metodologia de identificação por CCD descrita na monografia de *C. pinnatifida* (CHINA, 2005). O resultado obtido pode ser observado na Figura 1.

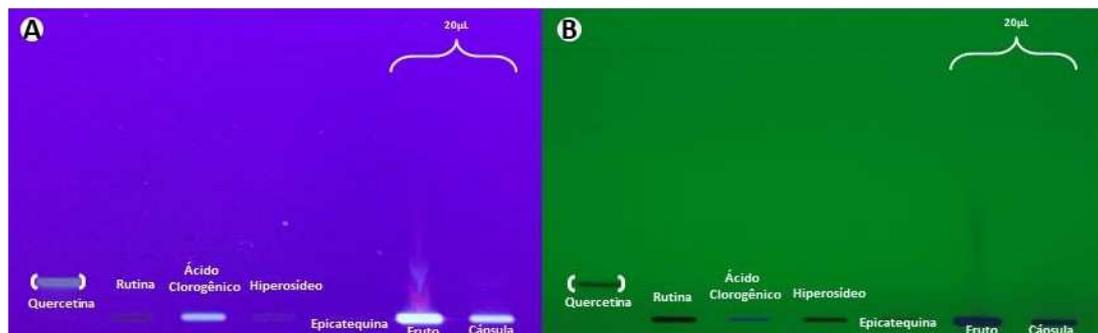


Figura 1 – Cromatoplaça realizada baseada em metodologia descrita na monografia de *Crataegus pinnatifida* (CHINA, XXXX). **A-** UV 365 nm. **B-** UV 254 nm.

Este método mostrou que a metodologia não se apresentou reprodutível. Houve uma grande retenção ou retenção total no local de aplicação, tanto nos padrões, como também nas amostras. Isto pode ter ocorrido devido a não seletividade da fase móvel frente aos padrões e ao fitocomplexo das amostras. A composição e proporção dos componentes da fase móvel são diretamente relacionados aos fatores de retenção de cada marcador.

Após o método ter se apresentado irreprodutível para a identificação dos marcadores, foi então desenvolvido uma nova tentativa, utilizando o método baseado na identificação por CCD de *Passiflora incarnata* (Farmacopeia Europeia 10ª Ed., 2019). O resultado Obtido pode ser observado na Figura 2.

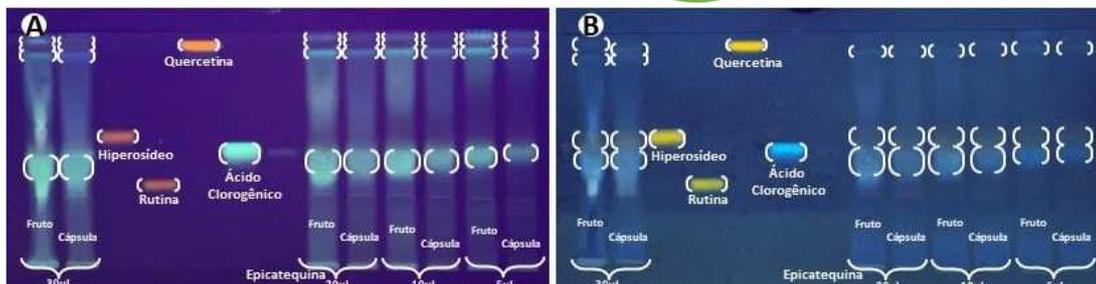


Figura 2 – Cromatoplaça realizada baseada em metodologia descrita na monografia de *Passiflora incarnata* (Farmacopeia Europeia 10ª Ed., 2019). **A-** Leitura após corrida. **B-** Leitura após aplicação do revelador.

Este método apresentou-se seletivo aos marcadores e ao fitocomplexo do fruto e do extrato encapsulado. Desta forma, pode-se observar a presença de três dos marcadores utilizados, Hiperosídeo, Ácido clorogênico e Quercetina. É notável que as bandas apresentaram-se com tonalidades mais fracas se comparado as bandas referência, e isto pode estar relacionado ao modo de preparo das amostras, solvente utilizado e método de extração. Novos testes devem ser realizados para melhor padronização e aperfeiçoamento de metodologia.

Conclusões

Concluiu-se que o método farmacopeico Chinês para identificação da espécie *C. pinnatifida* não foi reprodutível, no entanto, o método desenvolvido baseado na metodologia de *P. incarnata* foi capaz de identificar três dos marcadores analisados. Obteve-se um perfil característico a espécie, comprovando a possibilidade de sua utilização no controle de qualidade do fitoterápico. Também concluiu-se que novos ensaios devem ser realizados para melhor padronização e aperfeiçoamento metodológico.

Agradecimentos

Universidade Estadual de Maringá (UEM), Marcos Yau e ao Herbarium Laboratório Botânico.

Referências

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira 6ª ed., v. 1 e 2, Brasília: ANVISA, 2019.

CHINA Pharmacopoeia Committee. In Chinese Pharmacopoeia (I); Hua Xue Gong Ye Press: Beijing, China, 2005; p 23.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA 10.0 ed. Strasbourg: Council of Europe. v. 1, 2019.

JURIKOVA, Tunde et al. Polyphenolic profile and biological activity of Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* BUNGE) fruits. **Molecules**, 2012.