

Análise Quantitativa de Cumarina em Amostras Comerciais de "Guaco" por Cromatografia Líquida de Alta eficiência (CLAE)

Celeghini, Renata M. dos S.¹, Vilegas, Janete H. Y.², Lanças, Fernando M.²

¹ Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, Departamento de Química e Física Molecular, Caixa Postal 780, 13560-970, São Carlos, SP, Brasil

RESUMO: Foram analisadas 7 amostras comerciais de "guaco", sendo 5 comercializadas sob a forma de droga e 2 sob a forma de extrato hidroalcoólico. Dentre as sete amostras, apenas uma apresentou concentração de cumarina próxima de uma amostra referência de *Mikania glomerata* Spreng. (Compositae). Utilizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta para quantificar a cumarina no extrato hidroalcoólico de referência e nos extratos hidroalcoólicos das amostras comerciais.

Palavras Chave: CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência); "guaco"; *Mikania glomerata* Spreng.; cumarina; controle de qualidade

ABSTRACT: Quantitative Analyses of Coumarin in Commercial Samples of "Guaco" by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). Seven commercial samples of "guaco", five commercialized as drug and two as crude extracts, were analyzed by the authors. Among seven commercial samples, only one showed concentration of coumarin close the standard sample of *Mikania glomerata* Spreng. (Compositae). High performance liquid chromatography with ultraviolet detector was utilized for the coumarin quantitation in hydroalcoholic extracts of standard and commercial samples.

Key words: HPLC (High performance liquid chromatography); "guaco"; *Mikania glomerata* Spreng.; coumarin; quality control.

INTRODUÇÃO

Para a utilização segura de qualquer planta medicinal como medicamento, é necessário que ela seja padronizada, isto é, deve-se estabelecer a autenticidade da droga vegetal e o seu teor de princípios ativos dentro dos parâmetros utilizados como critério de qualidade. Os métodos cromatográficos podem ser aplicados ao controle de qualidade de plantas medicinais devido às suas vantagens como eficiência, rapidez e possibilidade de utilização em sistemas automatizados. Através desta técnica pode-se identificar as substâncias presentes, tanto os princípios ativos quanto os "marcadores", estes últimos utilizados na identificação da espécie vegetal.

Os extratos vegetais cuja composição química é conhecida, podem ser analisados por comparação com um padrão o qual geralmente é um dos princípios ativos presente no extrato vegetal. Em outros casos, não se conhecendo o princípio ativo, o extrato é comparado cromatograficamente a um extrato de referência, preparado de forma padronizada a partir de uma amostra autêntica do material vegetal de interesse. Para o gênero *Mikania* são descritas cerca de 415 espécies, distribuídas principalmente na América Central e do Sul, sendo 171 espécies no Brasil, de ocorrência sobretudo nas regiões Sul e Sudeste (King & Robinson, 1987). No presente estudo optou-

se por investigar a espécie *Mikania glomerata* Spreng. por ser a única inscrita na primeira edição da Farmacopéia Brasileira.

Mikania glomerata Spreng. é vulgarmente conhecida pelos nomes de guaco, guaco liso, guaco de cheiro e cipó caatinga (Lucas, 1942; Oliveira et al., 1984). O "guaco", como a maioria das nossas plantas indígenas, é empregado empiricamente pela nossa população, que lhe atribui as mais variadas aplicações. No estudo dos efeitos farmacológicos do extrato hidroalcoólico preparado a partir das folhas de *Mikania glomerata*, observou-se atividade antiinflamatória em testes farmacológicos "in vitro" e efeito inibitório da musculatura intestinal e uterina "in vivo". Estes testes constataram também sua atividade broncodilatadora, sendo a cumarina (Figura 1) responsável por cerca de 50 a 60% de tal atividade em relação à atividade total do extrato bruto (Leite et al., 1992; Silva et al., 1992).

Frente à importância farmacológica da cumarina e à relativa facilidade de análise cromatográfica da mesma, foram desenvolvidos métodos de análise quantitativa da cumarina como "marcador" do guaco, na análise da droga vegetal bruta por cromatografia gasosa de alta resolução (Vilegas et al., 1997) ou de extratos hidroalcoólicos por CLAE (Celeghini, 1997). Neste trabalho, aplicou-se esta última metodologia para a análise de várias amostras comerciais de "guaco", visando conhecer o panorama atual da qualidade de fitoterápicos desta planta.

Recebido para publicação em 22/ 12/ 98 e aceito para publicação em 31/ 03/ 99.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Material vegetal

Amostras autênticas de *Mikania glomerata* foram obtidas por propagação vegetativa de um exemplar autêntico classificado pelo Dr. Ayrton Amaral Jr. (UNESP- Botucatu, SP). Um exemplar está depositado no herbário da UNESP-Botucatu, sob o nº BOTU 19.813. As folhas utilizadas neste trabalho foram coletadas em Junho de 1995 pela Dr^a. Ana Maria Soares Pereira (UNAERP- Ribeirão Preto, SP) e secas a 40°C com ventilação forçada, por 3 dias. As folhas secas foram pulverizadas e tamisadas, utilizando somente as partículas entre 0,5-1,0 mm. Esta amostra foi utilizada como referência.

As amostras comerciais de "guaco" (planta seca e extrato fluido) foram adquiridas no comércio das cidades de São Paulo, São Carlos e Curitiba, e estão descritas na Tabela 1.

2. Extração do material vegetal

a - Maceração

Misturou-se um grama das folhas secas e moídas de "guaco" a 10 mL de etanol: água (1:1, v/v). A mistura foi colocada em ultra-som, à temperatura ambiente, por 20 minutos. O material foi filtrado e o extrato bruto obtido foi analisado diretamente por CLAE-UV (cromatografia líquida de alta eficiência- detector ultra violeta). As extrações foram feitas em triplicata.

b - Extrato fluido de "guaco" segundo a primeira edição da Farmacopéia Brasileira

Um grama das folhas secas e moídas de "guaco" foi extraído com 10 mL de etanol: água (1:1) durante 6 horas, em recipiente fechado. Este material foi introduzido em um percolador e adicionou-se mais solvente extrator até saturação. A torneira do percolador foi fechada e deixou-se em repouso por 2 horas. Iniciou-se a percolação vagarosamente até completo esgotamento da droga.

O material foi filtrado e o extrato bruto obtido foi analisado diretamente por CLAE-UV.

3. Análises cromatográficas

As análises por CLAE-UV foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu LC-10 com detector UV (Photodiodearray) Shimadzu SPD-M10A, no comprimento de onda de 274 nm, utilizando coluna RP-18 (Supelco) de 250mm x

4mm x 5mm. O volume injetado de amostra foi de 20 mL e a temperatura da coluna 30 °C. Utilizou-se como fase móvel acetonitrila: água (40:60), modo isocrático, com fluxo de 1mL/min. As análises foram realizadas em triplicata.

4. Análise quantitativa

Para a análise quantitativa de cumarina, foi utilizado o método do padrão externo (Smith, 1988). Utilizou-se soluções-padrão de cumarina de concentrações conhecidas: 1, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/mL. Obteve-se o cromatograma correspondente a cada uma delas, e construiu-se um gráfico relacionando-se as áreas obtidas com as concentrações. Através deste gráfico calculou-se a concentração de cumarina nas amostras, por interpolação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 encontram-se os resultados das análises da concentração de cumarina nos extratos hidroalcoólicos preparados a partir das amostras comerciais de "guaco" (planta seca). Na Tabela 3 encontram-se os resultados obtidos para as amostras comerciais de extrato fluido de "guaco". As Figuras 2 e 3 apresentam respectivamente o perfil cromatográfico (CLAE) dos extratos hidroalcoólicos da amostra referência de *M. glomerata* e de uma das amostras comerciais. O perfil cromatográfico das diversas amostras comerciais foi muito semelhante, estando a diferença mais significativa no teor de cumarina encontrado.

Comparando-se os resultados obtidos para as amostras comerciais e a amostra de referência (Tabela 2), verifica-se a grande necessidade do controle de qualidade para o "guaco" no comércio do Estado de São Paulo. Dentre as 5 amostras comerciais analisadas, somente uma apresentou concentração de cumarina próxima da amostra de referência. Um dos problemas constatados nas amostras comerciais de "guaco" é que, na maioria das amostras, encontrou-se uma maior presença de caules, ao invés das folhas, parte da planta a qual apresenta a maior concentração de cumarina (Celeghini, 1997). Isto provavelmente ocorre porque o caule é responsável por aproximadamente 30% do peso da planta; possivelmente, os produtores, visando maior lucro, não separam as folhas dos caules (Pereira et al., 1996). Um outro fator que pode justificar a baixa concentração de cumarina nas amostras comerciais é a influência do processo

de secagem: provavelmente os produtores submetem a planta a uma longa exposição, a temperaturas suficientemente altas para que ocorra a perda de cumarina, devido à sua volatilidade.

Conclusões graves podem ser também obtidas dos resultados na Tabela 3. Como o próprio nome diz, o termo "extrato" pode induzir o consumidor à falsa idéia de estar adquirindo um produto mais concentrado, ou seja, com uma maior concentração de cumarina. Porém, isto não foi verificado em nenhuma das amostras comerciais analisadas; pelo contrário, a concentração de cumarina foi significativamente inferior, comparada com a encontrada no extrato obtido através do método descrito pela Farmacopéia Brasileira (1ª edição), o qual os laboratórios deveriam, supostamente, seguir como método padrão de extração.

A metodologia desenvolvida no presente estudo mostrou-se útil para avaliar a qualidade das amostras comercializadas como "guaco" em relação à concentração do princípio ativo (cumarina) utilizado como marcador. No entanto, o estudo comparativo entre *Mikania glomerata* e *Mikania laevis* demonstrou que os perfis cromatográficos destas duas espécies são bem semelhantes, assim como as concentrações de cumarina encontradas em ambas (Celeghini, 1997).

Uma hipótese que não pode ser descartada no presente trabalho é a substituição ou adulteração por outras espécies de *Mikania*, cujo conteúdo de cumarina e perfil cromatográfico ainda não foram estudados, mas os dados obtidos não fornecem subsídios significativamente seguros que permitam identificar as amostras comerciais de "guaco" como *Mikania glomerata* Spreng. Está em andamento no Laboratório de Cromatografia do IQSC-USP o desenvolvimento de metodologia analítica para a identificação inequívoca da autenticidade de fitoterápicos contendo *Mikania glomerata*.

AGRADECIMENTOS

À Drª. Ana Maria Soares Pereira da UNAERP (Ribeirão Preto - SP) pelas amostras de "guaco" e à CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro (bolsas e auxílio-pesquisa).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CELEGHINI, R.M.S. **Extração e análise cromatográfica (HPLC) de cumarinas em plantas medicinais brasileiras**. São Carlos, 1997. 151p. Tese (Doutorado em Ciências)- Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- DIAS da SILVA, R.A. **Pharmacopéia dos Estados Unidos do Brasil**. São Paulo: Nacional, 1929. p. 385, 425, 495.
- KING, R. M., ROBINSON, H. **The genera of the Eupatorieae (Asteraceae)**. Lawrence: Allen, 1987. 581p.
- LEITE, M.G.R. et al. Atividade broncodilatadora em *Mikania glomerata*, *Justicia pectoralis* e *Torresia cearensis*. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992**, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1992. p.21.
- LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco. **Revista da Flora Medicinal**, v.9, n.3, p.101-32, 1942.
- OLIVEIRA, F. et al. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Spreng. e de *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 20, n.2, p.169-83, 1984.
- PEREIRA, A.M.S. et al. Efeito da adubação na produção de biomassa de *Mikania glomerata* (guaco). In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 14, 1996**, Florianópolis. *Anais...* Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 1996. p.33.
- SILVA, M.A.M. et al. Efeitos farmacológicos de *Justicia pectoralis*, *Mikania glomerata* e *Torresia cearensis* na musculatura lisa. In: **SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 12, 1992**, Curitiba. *Anais...* Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 1992. p.51.
- SMITH, R. M. **Gas and liquid chromatography in analytical chemistry**. Chichester: John Wiley, 1988. 402p.
- VILEGAS, J. H. Y. et al. Determination of coumarin and kaurenoic acid in *Mikania glomerata* Spreng ("guaco") leaves by capillary gas chromatography. **Phytochemical Analysis**, v.8, p.74-7, 1997.

Tabela 1 - Descrição das amostras comerciais de "guaco", submetidas a análise por CLAE.

<i>Amostra</i>	<i>Procedência</i> ^a	<i>Aspectos macroscópicos</i>	<i>Dados da identificação da amostra</i> ^b
		<i>Planta seca</i>	
1	São Paulo- SP	Folhas rasuradas e caules	<i>Mikania cordifolia</i> Will., guaco cipó; lote embalado em 11/95; validade 2 anos.
2	São Paulo- SP	Poucas folhas rasuradas; muitos caules	Guaco; lote embalado em 5/94; validade 3 anos.
3	São Paulo- SP	Maior porcentagem de caules	Guaco; lote embalado em 6/96; validade 3 anos.
4	Curitiba- PR	Folhas rasuradas	Guaco; sem identificação de prazo de validade; vendido a granel.
5	São Carlos- SP	Maior porcentagem de caules	Guaco; validade 7/96.
		<i>Extratos</i>	
6	São Carlos- SP	Líquido marrom claro	Extrato fluido de guaco; validade 7/96
7	São Paulo- SP	Líquido marrom escuro	Extrato fluido de guaco; lote embalado em 12/95; validade 1 ano.

^a Considerou-se o laboratório responsável pela embalagem do material, por falta de informações mais precisas em todas as amostras comerciais.

^b Transcrição das informações contidas nas embalagens de cada amostra comercial.

Tabela 2 - Concentração de cumarina nos extratos hidroalcoólicos preparados a partir das amostras comerciais de "guaco" (droga bruta)

<i>Amostra</i>	<i>Concentração (µg/mL) ± d.p</i>	<i>d.p. relativo (%)</i>
<i>M. glomerata</i> (referência)	656,15 ± 14,65	2,23
1	101,57 ± 7,91	7,79
2	15,23 ± 1,02	6,70
3	26,51 ± 0,86	3,24
4	593,78 ± 16,91	2,85
5	245,48 ± 15,53	6,33

(n= 3)

d.p.: desvio-padrão

Tabela 3 - Concentração de cumarina em amostras comerciais de extrato fluido de "guaco"

<i>Amostra</i>	<i>Concentração (µg/mL) ± d.p</i>	<i>d.p. relativo (%)</i>
<i>M. glomerata</i> (referência)*	561,99 ± 21,30	3,79
6	17,26 ± 1,01	5,85
7	132,77 ± 5,90	4,44

*Extrato preparado conforme a descrição da Farmacopéia Brasileira

(n= 3)

d.p.: desvio-padrão

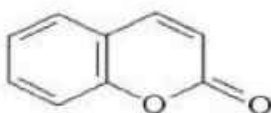
**CUMARINA**

Figura 1 - Estrutura da cumarina

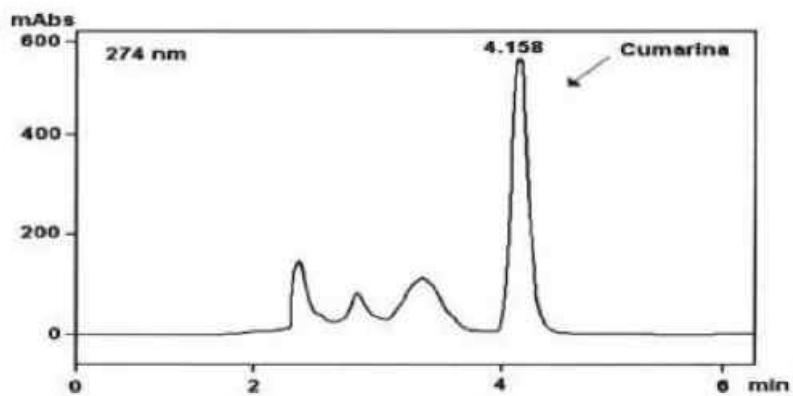
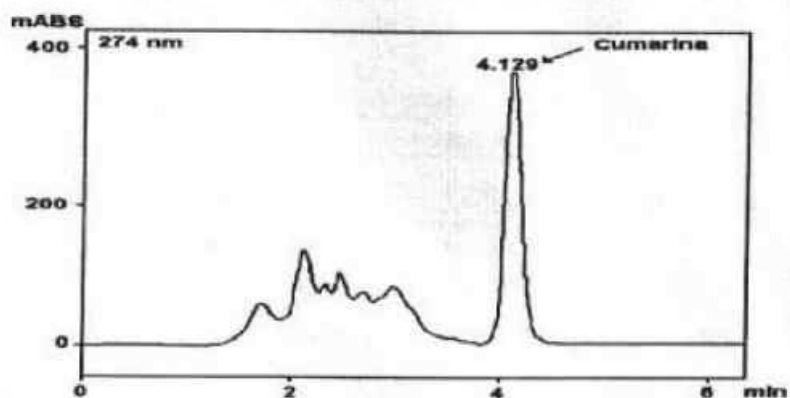
Figura 2 - Cromatograma (CLAE-UV) do extrato hidroalcoólico da amostra referência de *M. glomerata* obtido por maceração com ultra-som.

Figura 3. Cromatograma (CLAE-UV) do extrato hidroalcoólico da amostra comercial número 4.