

ESTABELECIMENTO DE PERFIL FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA EFICIÊNCIA (CCD-AE) PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DAS CASCAS DO CAULE DE *LIBIDIBIA FERREA* (MART.) L.P. QUEIROZ

Alice Oliveira de Arruda¹; Luiz Alberto de Lira Soares

¹Estudante do Curso de Farmácia - CCS – UFPE; E-mail: alicearruda92@hotmail.com, ²Docente/pesquisador do Depto de Farmácia – CCS – UFPE. E-mail: phtech@uol.com.br.

Sumário: *Libidibia ferrea* Martius conhecida popularmente como jucá é extensamente utilizada na medicina popular devido a suas atividades antifúngica, antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante. Apesar de grande importância medicinal ainda as metodologias para o controle de qualidade da espécie são escassas. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi estabelecer o perfil fitoquímico por Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCD-AE), para o controle de cascas do caule de *L. ferrea*. Para tanto, foram utilizadas 6 amostras do material vegetal obtidas em diferentes regiões. As amostras foram submetidas à caracterização físico-química de acordo com os métodos gerais em Farmacognosia, preconizados pela Farmacopeia Brasileira 5 (FB5). A preparação da solução extrativa amostra e os sistemas de eluição foram executados de acordo com metodologia descrita por Wagner e Blat (2006). Os testes físico-químicos apresentaram resultados dentro dos parâmetros estabelecidos pela FB5. O método por CCD-AE foi otimizado de acordo com o fator de retenção (Rf) obtido para os padrões utilizados. Dessa forma, foram observadas as presenças de: açúcares redutores, derivados cinâmicos, saponinas, flavonoides, taninos hidrolisáveis, taninos condensados e triterpenos/terpenos nas amostras avaliadas. Por fim, a eficiência de separação e a reprodutibilidade dos cromatogramas sugerem que o procedimento apresenta a robustez necessária para seu emprego como alternativa para o controle de caule de *L. ferrea*.

Palavras-chave: CCD-AE; *Libidibia ferrea*; perfil fitoquímico.

INTRODUÇÃO

Libidibia ferrea (Mart.) L.P. Queiroz é uma árvore que pertence à família Fabaceae, conhecida popularmente como jucá ou pau-ferro, ocorrendo na caatinga nordestina e estendendo-se até a região sudeste (CAVALHEIRO, 2009). Estudos etnofarmacológicos na região amazônica indicam o uso de *L. ferrea* como antifúngico, antimicrobiano e anti-inflamatório (CARVALHO, 1996). Considerando sua composição química, as cascas do caule apresentam flavonoides, saponinas, taninos, cumarinas, esteroides e compostos fenólicos (VASCONCELOS et al., 2011; ARAÚJO et al., 2014). Sendo *L. ferrea* uma planta medicinal potencialmente utilizada pela população em geral, para impulsionar seu uso pela indústria é necessário o desenvolvimento de métodos de análise que assegurem a autenticidade química da droga vegetal. Dentre os métodos existentes para avaliação química de extratos vegetais se destacam as técnicas cromatográficas, especialmente a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCD-AE), técnica que possui maior resolução, reprodutibilidade, sensibilidade e eficiência nos processos de separação e identificação de compostos químicos quando comparada à CCD convencional (KLEIN, 2010; COLLINS, 2011). Nesse contexto, o objetivo principal do projeto era o desenvolvimento de metodologia analítica por CCD-AE para identificar e comparar o

perfil químico de diferentes amostras das cascas do caule de *L. ferrea*, garantindo maior eficiência, rapidez e baixo custo agregado ao processo. O projeto poderá fornecer subsídios científicos necessários para o estabelecimento de uma ferramenta eficaz na realização do controle de qualidade químico da matéria prima vegetal, facilitando a inserção desta no mercado de insumos farmacêuticos e, podendo também, fortalecer a economia da região Nordeste do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foram coletadas 6 amostras de cascas de caule de *L. ferrea*, respectivamente de Palmares, Limoeiro, Maceió, Caruaru e duas de Recife (uma destas foi tomada como amostra autêntica, após identificação no IPA-PE). Após a coleta, os materiais vegetais foram submetidos a secagem em estufa a 40 °C e posteriormente pulverizados em moinho de facas. Em seguida, foi realizada a caracterização físico-química (determinação de matéria estranha, análise granulométrica, determinação de umidade e teor de cinzas totais), segundo a Farmacopeia Brasileira 5 edição (2010). As condições de preparação das soluções extrativas, os sistemas de eluição, padrões de referência e reveladores foram preparados de acordo com Wagner (2006); além disso, as polaridades dos sistemas foram ajustadas de acordo com o fator de retenção (Rf) obtido para os padrões utilizados. Foram avaliados os seguintes metabólitos secundários: polifenóis (flavonoides, derivados cinâmicos, cumarinas, derivados antracênicos, taninos hidrolisáveis e condensados), triterpenos/esteroides, glicosídeos cardioativos/saponinas, açúcares redutores e alcaloides. A prospecção fitoquímica foi realizada, inicialmente, utilizando extratos obtidos a partir da amostra considerada autêntica. Uma vez otimizado os sistemas de solventes adequados para cada classe de metabólito, estes foram reproduzidos, nas demais amostras. Dessa forma, foi possível traçar o perfil fitoquímico da droga vegetal constituída das cascas do caule de *L. ferrea*, bem como possibilitou a comparação da composição de metabólitos secundários entre amostras de diferentes localidades (n = 6 amostras).

RESULTADOS e DISCUSSÃO

Quanto à presença de material estranho, os resultados obtidos permaneceram com valor médio de 0,0607% (4,8%), abaixo dos valores especificados pela FB5 (<2%). De acordo com a análise granulométrica, as amostras apresentaram tamanho médio das partículas de 565 µm (1); 450 µm (2); 410 µm (3); 450 µm (4); 425 µm (5); e 535 µm (6), os quais foram determinados pelo ponto interseção das curvas de retenção e passagem. Os teores de umidade e cinzas totais obtidos para as amostras permaneceram dentro da especificação farmacopeicas. A etapa de otimização dos sistemas de solventes foi realizada por CCD e posteriormente aplicada ao processo de CCD-AE, possibilitando assim o desenvolvimento do perfil fitoquímico com maior qualidade. A partir dos sistemas utilizados por Wagner (2006), foram ajustadas as proporções dos solventes considerando a constante dielétrica dos mesmos, objetivando otimizar o Rf das bandas dos padrões e extratos. Os sistemas considerados adequados a serem empregados para a pesquisa da classe de compostos de interesse estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1. Sistemas de solventes otimizados quanto à polaridade.

Classe de metabólito	Sistemas de solventes otimizados
Açúcares redutores	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O (50:20:10:10)
Alcaloides	AcOEt - HCOOH - H ₂ O (90:5:5)
Cumarinas	EtOEt - Tolueno - AcOH 10% (50:50:50)
Derivados antracênicos	AcOEt - álcool n-butílico - H ₂ O - AcOH (20:30:15:0,5)
Derivados cinâmicos	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O (100:2:11:4)
Saponinas	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O (100:11:11:27)

Flavonóides	AcOEt - HCOOH - AcOH - H ₂ O (100:2:11:15)
Taninos hidrolisáveis	AcOEt - HCOOH - H ₂ O (90:5:20)
Taninos condensados	AcOEt - HCOOH - H ₂ O (90:10:20)
Triterpenos/Esteróides	Tolueno - AcOEt (70:30)

AcOEt = Acetato de etila; HCOOH = Ácido fórmico; AcOH = Ácido acético; EtOH = Álcool etílico; H₂O = Água; UV = ultravioleta; NEU = ácido etilborilaminoéster a 1% em metanol.

Foram analisados os principais metabólitos secundários com os seus respectivos padrões e reveladores, descritos no quadro 1, sendo considerado como “Presente” o metabólito que demonstrou banda correspondente ao padrão utilizado em, pelo menos, uma amostra das 6 amostras avaliadas no estudo. Alcaloides, Cumarinas, Derivados Antracênicos e Derivados Cinâmicos não foram evidenciados nas amostras analisadas.

Quadro 1. Análise por CCD-AE das cascas de *Libidibia ferrea* Martius.

Metabólito	Padrão	Revelador	Resultado
Açúcares redutores	Maltose e Manose	Timol 0,5% EtOH	Presente
Saponinas	Escina	Lieberman Buchard	Presente
Flavonoides	Rutina, Quercetina, Kampferol	NEU + PEG	Presente
Taninos hidrolisáveis	Ác. gálico	Cloreto férrico	Presente
Taninos condensados	Catequina	Vanilina clorídrica	Presente
Terpenos	β - sitosterol	Lieberman Buchard	Presente

EtOH: Etanol; NEU: ácido etilborilaminoéster a 1% em metanol.

Triterpenos/Esteroides (Figura 1): após a observação sob luz ultravioleta em 365 nm, pode-se observar que todas as amostras (A1, A2, A3, A4, A5 e A6) apresentaram banda correspondente em Rf 0,45 e coloração ao padrão utilizado, β -sitosterol. Além disso, as amostras apresentaram outras bandas com coloração azulada e bandas de coloração vermelha, características de Triterpenos.

Saponinas (Figura 2): após a observação em luz branca sob comprimento de onda 254 nm foi visualizado um Rf (0,40) e uma coloração característica do padrão Escina em todas as amostras.

Flavonoides (Figura 3): após a visualização em luz UV (365 nm), observou-se que não houve banda com coloração característica dos padrões Rutina (Rf = 0,86), Quercetina (Rf = 0,87) e Kampferol (Rf = 0,90) na amostra. Porém, foram observadas bandas de coloração avermelhada, nas amostras A1, A2, A4, A5 e A6 (Rf = 0,87), indicativo da presença de antocianidinas.

Taninos Hidrolisáveis (Figura 4): foi visualizada uma banda do padrão ácido gálico (Rf = 0,84) nas amostras A2 e A5.

Taninos Condensados (Figura 5): após revelação com vanilina clorídrica foram observadas bandas de coloração avermelhada características destes Padrões em todas as amostras.

Açúcares Redutores (Figura 6), após visualização em luz branca foi observado um Rf (0,25) e uma coloração característica do padrão Maltose em todas as amostras. Além disso, também foram observadas bandas correspondentes ao padrão Manose (Rf = 0,45).

Figura 1. Cromatograma de Triterpenos/Esteroides.

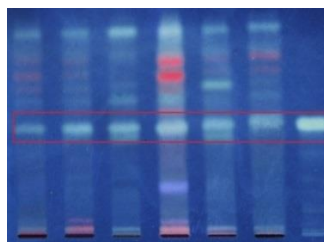


Figura 2. Cromatograma de Saponinas.

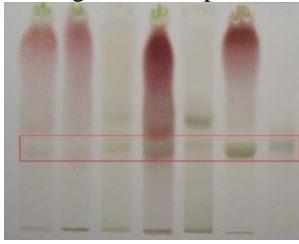


Figura 3. Cromatograma de Flavonoides.

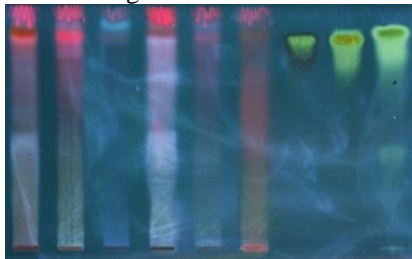


Figura 5. Cromatograma de Taninos Condensados.

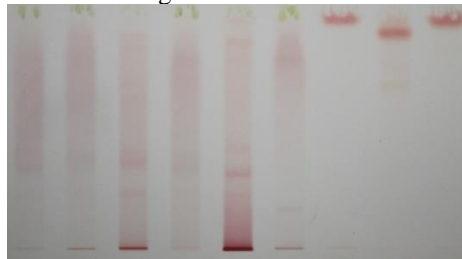


Figura 4. Cromatograma de Taninos hidrolisáveis.

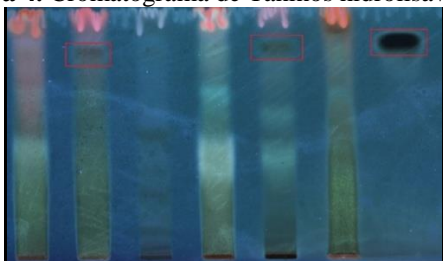
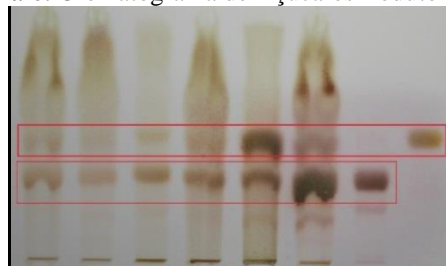


Figura 6. Cromatograma de Açúcares Redutores.



CONCLUSÕES

A partir da caracterização fitoquímica das cascas do caule de *L. ferrea* (Jucá) foi possível estabelecer o perfil fitoquímico para a droga vegetal. Contribuição importante para a avaliação da qualidade deste material vegetal, facilitando a inserção desta no mercado de insumos farmacêuticos, o que pode fortalecer o seu emprego na região Nordeste do Brasil. Nesse sentido, o procedimento cromatográfico otimizado e aplicado a técnica de CCD-AE realizado neste estudo demonstrou as condições necessária para ser aplicado com êxito ao controle de qualidade das cascas do caule do jucá, além de apresentar fácil execução operacional, reprodutibilidade e rapidez.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à colaboração dos integrantes do Laboratório de Farmacognosia, aos financiamentos do CNPq, FACEPE e ANVISA, além do suporte do programa PIBIC UFPE/CNPq pela bolsa concedida.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO A.A., et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 2014.
- CARVALHO, J.C.T., et al. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, p. 175-178, 1996.
- CAVALHEIRO, M.G., et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 586-591, 2009.
- COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5 ed., Brasília: ANVISA, 2010.
- VASCONCELOS, C.F.B., et al. Hypoglycaemic activity and molecular mechanisms of *Caesalpinia ferrea* Martius bark extract on streptozotocin-induced diabetes in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1533-1541, 2011.
- WAGNER, H., BLADT, S. **Plant Drug Analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2^a. ed. Berlim: Springer – Verlag, 2006.