

Estudo fitoquímico de *Erythraea centaurium*, *Jacaranda caroba*, *Remijia ferruginea* e *Solanum paniculatum* visando identificar marcadores químicos para o fitoterápico Ierobina®

Braga, F.C.^{1, *}, Valadares, Y.M.¹, Costa, M.A.¹, Lombardi, J.A.², Oliveira, A.B. de¹

¹Laboratório de Fitoquímica e Biologia Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG

²Departamento de Botânica, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG

Resumo

O fitoterápico Ierobina®, comercializado no mercado nacional há 67 anos, tem uso indicado para o tratamento de dispepsias. O fitoterápico é constituído pelos extratos fluidos de três espécies nativas (*Solanum paniculatum*, *Remijia ferruginea* e *Jacaranda caroba*) e uma exótica (*Erythraea centaurium*). O presente estudo descreve a identificação de marcadores químicos para os extratos das espécies constituintes da Ierobina® e a obtenção de perfis cromatográficos de referência para os mesmos, os quais contribuirão para o estabelecimento de protocolos para o controle de qualidade do fitoterápico.

O mercado brasileiro de fitoterápicos encontra-se em franca expansão, de maneira semelhante à tendência mundial, tendo movimentando cerca de US\$ 355 milhões em 1994¹. Apesar da proliferação no uso de fitoterápicos e de sua publicidade cada vez maior, o controle destes produtos, na maioria dos casos, é ainda inadequado. Assim, segundo Alonso "é necessário legislar a respeito, não somente para acabar com a indústria de especulação e fraude, mas também para promover e incentivar os estudos de fitoterápicos, garantindo a qualidade destes produtos e protegendo a saúde da população"². A atual legislação brasileira sobre fitoterápicos visa atender a esta demanda, através das

Portarias 6/95, 16/95 e, mais recentemente, pela resolução RDC 17/00 da ANVISA. Esta legislação evidencia a necessidade de melhoria da qualidade técnica dos fitoterápicos, os quais passam a ser objeto de testes de farmacologia pré-clínica, toxicologia pré-clínica e ensaios clínicos, além de rigoroso controle de qualidade.

Neste contexto, insere-se o presente estudo, que visou identificar marcadores químicos para o fitoterápico Ierobina®, comercializado no mercado nacional há 67 anos (Laboratório Belfar, Belo Horizonte), indicado para o tratamento de dispepsias. A administração de Ierobina® para ratos, anteriormente à ingestão de dieta contendo alto teor de lipídios, indicou um aumento de 40% na atividade da lipase lipoprotéica do tecido adiposo epididimal, enzima responsável pela captação de triacilgliceróis, em relação ao grupo controle, atestando a eficácia do fitoterápico na dispepsia³.

O fitoterápico Ierobina® é constituído pelos extratos fluidos das espécies nativas *Solanum paniculatum* L. (Solanaceae), denominada vulgarmente de jurubeba, *Remijia ferruginea* D.C. (Rubiaceae), popularmente conhecida como quina da serra ou quina mineira, e *Jacaranda caroba* D.C. (Bignoniaceae), de nome vulgar caroba ou carobinha, além da espécie exótica *Erythraea centaurium* (L.) Borkh. (Gentianaceae), denominada vulgarmente de centáurea. Todas essas espécies são empregadas popularmente como amargos, dentre outros usos^{4,5}.

Os estudos fitoquímicos necessários à validação de fitoterápicos compreendem as etapas de isolamento e elucidação estrutural de metabólitos secundários, os quais são utilizados como marcadores químicos na identificação da espécie vegetal, no planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológica e em estudos de estabilidade⁴. Além disso, a composição qualitativa de materiais vegetais de referência também deve ser avaliada, a partir dos perfis cromatográficos obtidos por HPLC e CCD ("impressão digital"), sendo auxiliares úteis na autenticação da matéria prima vegetal.

Assim, realizaram-se inicialmente ensaios de prospecção fitoquímica para os extratos de referência e os extratos fluidos fornecidos pela empresa, utilizados na manufatura do fitoterápico. De maneira geral observou-se uma correspondência entre os resultados dos extratos de referência e os da empresa, sugerindo a autenticidade do material vegetal utilizado para produção do fitoterápico. Iridóides, triterpenos e esteróides foram detectados em todas as espécies, bem como cumarinas e alcalóides, ausentes em *J. caroba*. Flavonóides foram detectados em todos os extratos de referência, mas não nos extratos de *J. caroba* e *S. paniculatum* fornecidos pela empresa.

Também se observaram semelhanças entre os perfis cromatográficos obtidos por HPLC para os extratos de referência e da empresa, como pode ser visualizado para a espécie *R. ferruginea* (Fig. 1). As variações observadas foram atribuídas às diferenças na polaridade dos extratos, já que todos os de referência foram obtidos por percolação com EtOH 96% e aqueles da empresa com concentrações variadas de EtOH, de 10% a 50%. Também não podem ser descartadas variações sazonais dos materiais vegetais utilizados na produção dos extratos, que poderiam influenciar na impressão digital dos mesmos.

Tendo em vista a ausência de estudos fitoquímicos para as espécies nativas e/ou de constituintes micromoleculares comercialmente disponíveis, procedeu-se ao isolamento de marcadores químicos dos extratos de referência das espécies vegetais constituintes do fitoterápico. Foram isolados ácido

ursólico, a-amirina e uma mistura dos ácidos ursólico e oleanólico de *J. caroba*; ácido oleanólico, ácido maslínico e álcool alifático de *E. centaurim*; ácido ursólico de *Remijia ferruginea* e paniculonina B de *S. paniculatum* (Fig. 2). Alguns dos marcadores químicos isolados foram detectados nos extratos fluidos empregados para fabricação do fitoterápico, em análises por CCD.

O estabelecimento dos perfis cromatográficos de referência para os extratos e o isolamento e identificação de marcadores químicos das espécies, realizados no presente trabalho, contribuirão para o estabelecimento de protocolos para o controle de qualidade do fitoterápico. Os marcadores químicos são especialmente válidos para autenticar o material vegetal utilizado na produção dos extratos, ponto crucial para garantir a qualidade do produto, já que, à exceção de *E. centaurium*, todas as espécies constituintes são nativas e coletadas da flora espontânea.

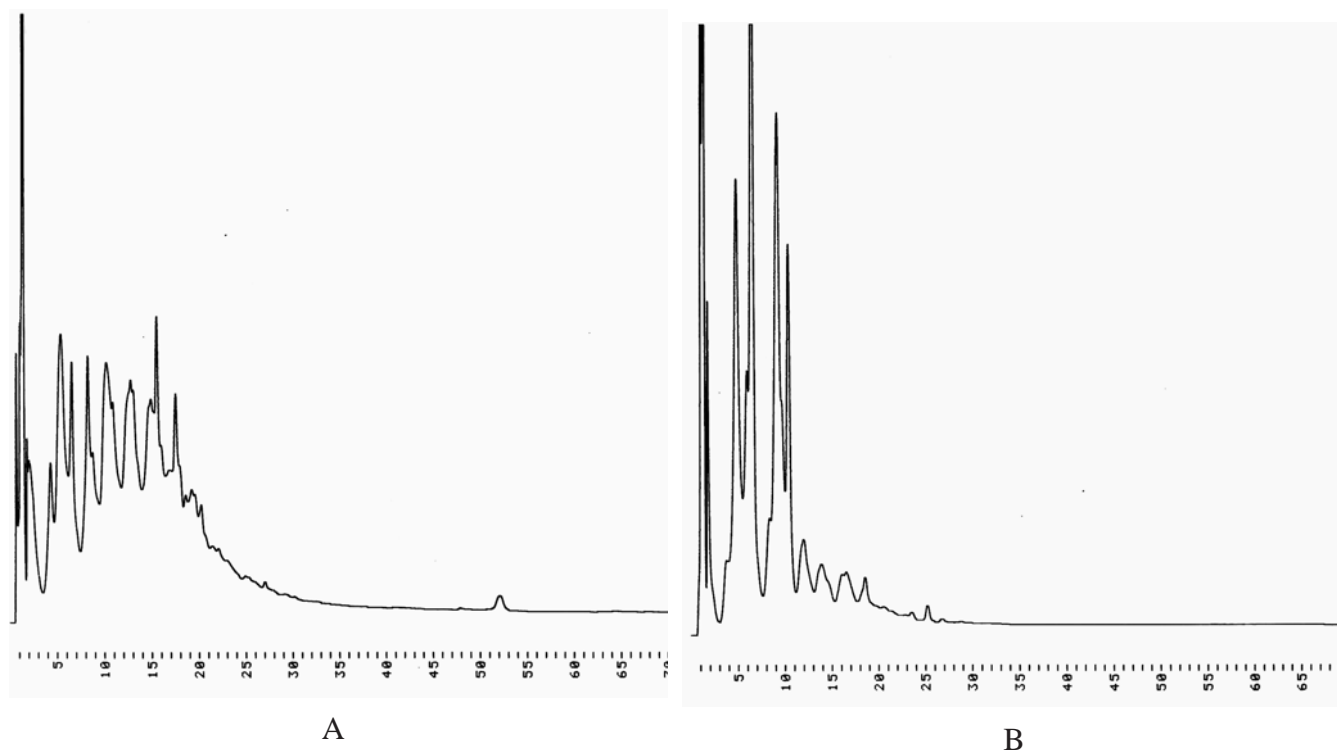


Figura 1. Cromatogramas, obtidos por RP-HPLC, para o extrato de referência (A) e extrato fluido (B) de *Remijia ferruginea*. Condições cromatográficas: vide Material e Métodos

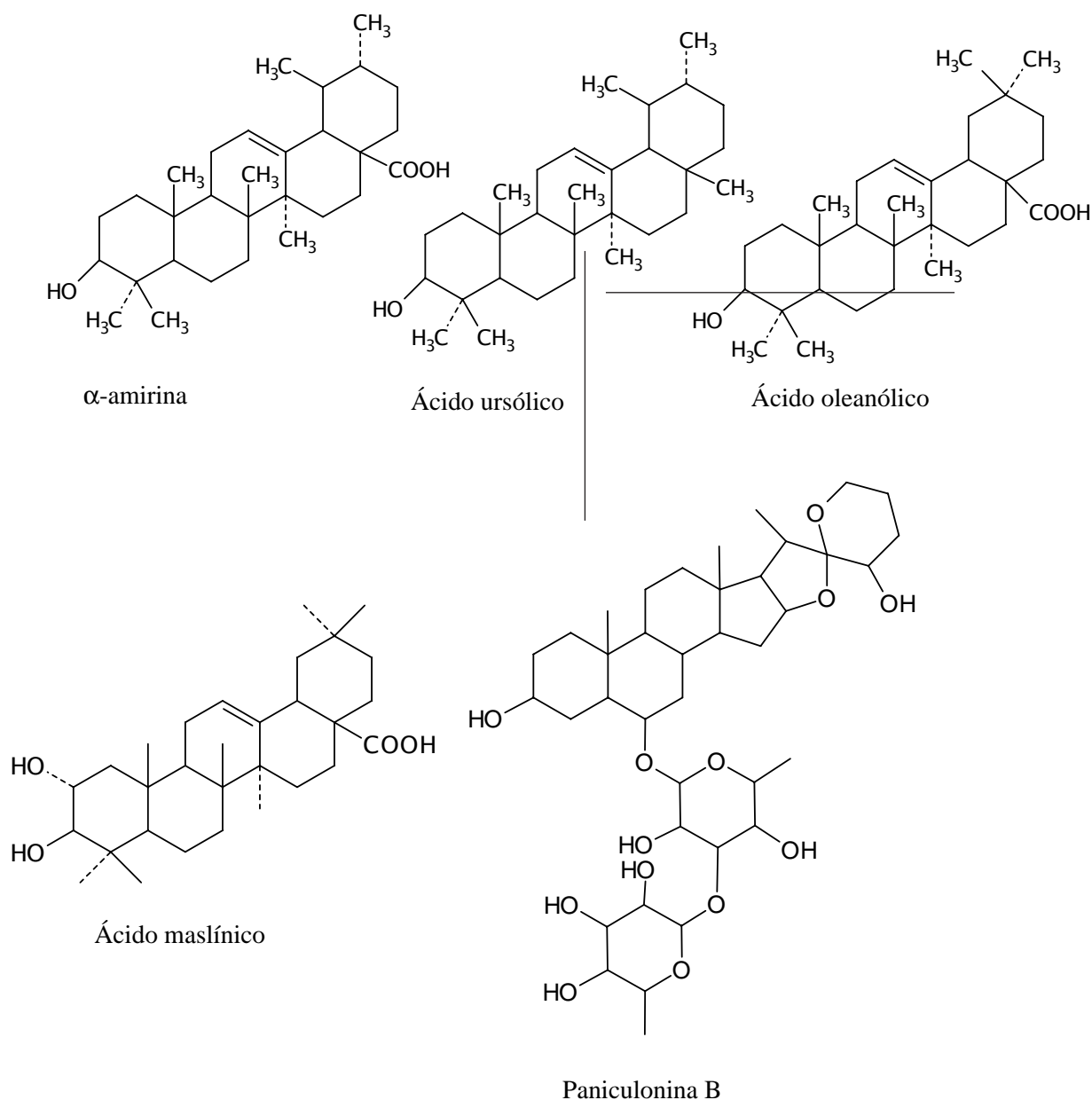


Figura 2. Estruturas químicas das substâncias isoladas das espécies constituintes do fitoterápico Ierobina®

Material e Métodos

Material vegetal: Amostras de Jacaranda caroba (partes aéreas) e *Solanum paniculatum* (folhas e caules) foram coletados no campus da UFMG, e de *Remijia ferruginea* (galhos) no Parque Estadual do Rio Preto, Minas Gerais. Exsiccatas das espécies coletadas estão depositadas no herbário BHCH, UFMG, sob números 50394, 4751 e 51460, respectivamente. Amostras de sumidades floridas da espécie exótica *Erythraea centaurium* foram enviadas pela empresa produtora.

Preparação dos extratos: Foram preparados extratos por percolação com EtOH 96% dos materiais vegetais

secos, denominados "referência". Os extratos fluidos utilizados na fabricação do fitoterápico foram fornecidos pela empresa produtora, denominados "empresa".

Prospecção fitoquímica: A prospecção fitoquímica dos extratos (referência e empresa) compreendeu a obtenção da "impressão digital" por RP-HPLC e análises por CCD, com reveladores específicos, para determinar as classes de produtos naturais presentes⁷. Para as análises por HPLC empregou-se coluna de ODS (250 x 4,0 mm d.i., 5 µm, Merck, Alemanha) fluxo de 1,0 mL/min, temperatura de 40 °C, procedendo-se à eluição com

gradiente linear de H₂O (A) e CH₃CN (B): 0 min 90% A, 10% B; 60 min 10% A, 90% B, seguido de 10 min de eluição isocrática. A detecção foi realizada no UV₂₁₀. Foram analisadas soluções metanólicas dos extratos na concentração de 10 mg/mL

Isolamento e identificação de marcadores químicos:

Os extratos de referência das quatro espécies foram fracionados empregando-se procedimentos cromatográficos variados e partições entre solventes imiscíveis. A purificação das substâncias isoladas foi realizada por sucessivas cromatografias, seguindo-se recristalização final. A identificação das substâncias baseou-se na análise dos espectros no IV e RMN de ¹H e ¹³C, com experimentos 1D e 2D (COSY, HETCOR, HMQC). Os dados obtidos foram comparados com valores relatados na literatura^{8,9}.

Agradecimentos

O presente trabalho foi financiado com recursos do CNPq e do Laboratório Belfar, no âmbito do Edital Fitoterápicos (processo 521199 / 01-8).

Referências Bibliográficas

- ¹Ferreira, S.H. (Org.) *Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil*. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 132p. 1998.
- ²Alonso, J.R. *Tratado de Fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas*. Buenos Aires: ISI Ediciones, 1998.
- ³Braga F.C. *Contribuição para validação do fitoterápico "Ierobina": estudo fitoquímico, de eficácia e toxicologia pré-clínica*. Relatório Técnico - CNPq. Belo Horizonte, 80p. 2003.
- ⁴Corrêa, M.P. *Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Rio de Janeiro: Di Giorgio, 1974.
- ⁵Tyler, V.E. *Herbs of choice. The therapeutic use of phytomedicinals*. New York: Haworth Press, 209p. 1994.
- ⁶Sonaglio, D.; Ortega, G.G.; Petrovick, P.R.; Bassani, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A., Petrovick, P.R. (Org.) Florianópolis: Editora da UFSC, p.221-258, 1999.
- ⁷Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainsky, E.M. *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer, 320 p. 1984.
- ⁸Mahato, S.B.; Kundun, A.P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, v.37, p.1517-1575, 1994.

⁹Ripperger, H.; Schreiber, K. Structure of paniculonin A and B, two new spirostane glycosides from *Solanum paniculatum* L. *Chemische Berichte*, v.101, p.2450-2458, 1968.

***Autor para correspondência**

Prof. Fernão Castro Braga
Laboratório de Fitoquímica e Biologia Farmacêutica
Faculdade de Farmácia - UFMG
Av. Olegário Maciel, 2360
30180-112 - Belo Horizonte - MG
fernao@dedalus.lcc.ufmg.br