



IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA A PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE *CHROMOLAENA ODORATA* (L.) R.M.KING & H.ROB.

IDENTIFICATION OF BIOMARKERS FOR THE STANDARDIZATION OF CHROMOLAENA ODORATA (L.) R.M.KING & H.ROB.

Temistocles Barroso de Oliveira¹; Lucas Gomes Bezerra¹; Milla Monteiro Moraes¹; Simone Sacramento Valverde¹.

Laboratório de Química Medicinal de Produtos Bioativos – LaQMed/TECBIO – Farmanguinhos/FIOCRUZ
simone.valverde@fiocruz.br

RESUMO

Identificar e qualificar biomarcadores é indispensável para garantir a concentração e características físico-químicas destes, necessárias à produção, a uniformidade do produto farmacêutico, conseqüentemente, a padronização desses IFAVs (insumos farmacêuticos ativos vegetais) para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou fitomedicamentos com segurança e eficácia. *Chromolaena odorata* (CO) é uma espécie da família Compositae, nativa da América Central e do Sul espalhada nas áreas tropicais e subtropicais do mundo. No Brasil, essa espécie está distribuída em todas as regiões e é popularmente conhecida como “arnica do mato”. Em todo o território nacional, existem muitas espécies diferentes denominadas “arnicas”, todas descritas para o tratamento de feridas, edema e outras doenças inflamatórias tópicas. Neste trabalho, nosso objetivo foi identificar os biomarcadores, qualificar e padronizar os IFAVs para desenvolver um produto farmacêutico uniforme, seguro e eficaz. A mistura dos triterpenos α e β -amirina (ABA) é obtida de diversas espécies vegetais e apresenta atividades amplamente descritas na literatura científica como anti-inflamatória, analgésica, sedativa, ansiolítica, hepatoprotetora, antidepressiva, entre outras. Em folhas de *Chromolaena odorata* (COF) essa mistura foi isolada e determinada através das análises cromatográficas: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida em coluna (CLC) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrofotometria de ultravioleta por arranjo de fotodiodos (CLAE-UV-PDA). Outras análises cromatográficas, como a cromatografia em fase gasosa, acoplada à



espectrometria de massas (CG-EM) e espectroscópicas, como a ressonância magnética nuclear (RMN) também foram utilizadas para as frações obtidas, até a identificação dos seus principais constituintes, permitindo relacionar seu uso tradicional espécie como antibacteriana, antiespasmódica, antitripanossoma, antifúngica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, diurética, adstringente, antiprotozoária, como agente hepatotrópico e, especialmente como cicatrizante de acordo com as substâncias presentes e atividades biológicas descritas na literatura científica para esta espécie. COF teve seus extratos padronizados a partir da concentração da mistura de ABA, expressos em teor de amirinas ($50\pm 5\%$).

Palavras-chave: α - e β -amirinas; Biomarcadores; Padronização de extratos; *Chromolaena odorata*.

ABSTRACT

The identification and qualification of biomarkers from medicinal plants is essential to ensure the concentration and their physicochemical characteristics, necessary for the production and standardization of IFAVs (plant active pharmaceutical ingredients) for the development of phytomedicines and/or herbal medicines effective and safe. *Chromolaena odorata* (CO) is a species of the Compositae family, native to Central and South America, spread throughout the tropical and subtropical areas of the world. In Brazil, this species is distributed in all regions and it is popularly known as “arnica do mato”. Across our Brazilian territory, there are many different species called “arnica”, all described for the treatment of wounds, edema and other topical inflammatory diseases. In this work, our main goal was to identify the biomarkers, qualify and standardize the IFAVs to develop an uniform, safe and effective pharmaceutical product. The mixture of α and β -amyrin triterpenes (ABA) is obtained from several plant species and has activities widely described in the scientific literature as anti-inflammatory, analgesic, sedative, anxiolytic, hepatoprotective, antidepressant, among



others. In leaves of *Chromolaena odorata* (COF) this mixture was isolated and determined through chromatographic analysis: thin layer chromatography (TLC), column liquid (CLC) and high efficiency liquid coupled to ultraviolet spectrophotometry by photodiode array (HPLC-UV-PDA). Other chromatographic analyses, such as gas chromatography, coupled with mass spectrometry (GC-MS) and spectroscopy, such as nuclear magnetic resonance (NMR) were also used for the fractions obtained, to the identification of their main constituents, allowing a relationship with its traditional and popular use as antibacterial, antispasmodic, antitrypanosome, antifungal, antihypertensive, antiinflammatory, diuretic, astringent, antiprotozoal, as a hepatotropic agent and especially as a healing agent in accordance with the present substances and biological activities described in the scientific literature for this species. COF extracts were standardized based on the concentration of the ABA mixture, expressed in amirin content ($50\pm 5\%$).

Keywords: α - and β -amyrins; Biomarkers; Standardization of extracts; *Chromolaena odorata*.

INTRODUÇÃO

A identificação e a qualificação de biomarcadores em plantas medicinais são indispensáveis para garantir a concentração e características físico-químicas destes, necessárias à produção e a padronização de IFAVs (insumos farmacêuticos ativos vegetais) para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou fitomedicamentos com segurança e eficácia.

A família Compositae é constituída por 326 gêneros, e 2205 espécies amplamente distribuídas no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2020). Espécies dessa família têm hábitos arbustivo, arbóreo, herbáceo, subarbustivo ou ocorrem ainda como lianas. São mundialmente conhecidas pelas suas propriedades farmacológicas, como a camomila, equinácea, arnica, carqueja, entre tantas outras. O gênero *Chromolaena* é



representado por cerca de 70 espécies, sendo 45 delas endêmicas no Brasil, que são quimicamente caracterizadas pela presença de terpenos, alcaloides, substâncias fenólicas, como flavonoides e componentes de seu óleo essencial (HUNG, 2011; OLIVEIRA 2012; Di STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). Este gênero representa um grande número de espécies da família Compositae, que é a maior família de plantas com flores. (KING e ROBINSON, 1970; Di STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Chromolaena odorata (L.) R.M.King & H.Rob. (CO) é nativa da América Central e do Sul espalhada nas áreas tropicais e subtropicais do mundo (MAN, 2010) e conhecida como arnica do mato, sião de plantas daninhas, mato amargo, entre outros. Há poucos relatos desta espécie na Europa, Ásia e África tropical. No Brasil, essa espécie está distribuída em todas as regiões e tem como domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal (OLIVEIRA, 2012). Essa espécie é um arbusto perene cujos ramos ficam emaranhados com altura entre 1,5 e 2,0m. (MAN, 2010; CHAKRABORTY & RAMBHADE, 2011). Várias espécies da família Compositae são conhecidas como “arnicas brasileiras” sendo utilizadas amplamente pela população as seguintes espécies: *Solidago chilensis*; *Chromolaena odorata*; *Tithonia diversifolia*; *Sphagneticola trilobata*; *Porophyllum ruderale*; *Lychnophora ericoides* entre outras. (ABAD, BEDOYA, BERMEJO, 2013; CHAKRABORTY & RAMBHADE, 2011)

Devido ao seu grande uso e comercialização, à escassez de estudos relacionados à sua efetividade na saúde humana e ao fato de muitas delas serem produtoras de sesquiterpenolactonas que apresentam hepatotoxicidade, faz-se necessário o estudo químico e biológico dessas espécies, de seus extratos, além da determinação dos marcadores químicos e/ou biológicos (biomarcadores), além de avaliação toxicológica. Na medicina tradicional, possui propriedades antibacteriana, antiespasmódica, antitripanossoma, antifúngica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, diurética, adstringente, antiprotozoária e como agente hepatotrópico. (MAN, 2010) Suas ações farmacológicas são atribuídas principalmente aos flavonoides, alcaloides, taninos e compostos fenólicos. Em contraste ao seu uso popular, há uma carência na literatura



científica de estudos comprobatórios dessa diversidade de atividades biológicas da CO, principalmente em relação às suas propriedades anti-inflamatórias. (SUKANYA, 2011)

Entre os principais parâmetros para a padronização extratos vegetais, encontra-se a avaliação química para a definição dos constituintes relacionados com a ação biológica ou farmacológica da espécie em estudo. Assim, a identificação de substâncias obtidas de produtos naturais é realizada através de técnicas espectroscópicas e espectrométricas que visam garantir sua identidade inequívoca. (NIKAM *ET AL.*, 2012; BELE & KHALE, 2011; GAEDCKE & STEINHOFF, 2003).

METODOLOGIA

Material vegetal

Folhas de CO foram coletadas no Fórum Itaboraí (FIT-Fiocruz-Petrópolis) (22°51'57.134"S; 43°18'86.719"W) e submetidas à identificação, com exsicata depositada no Jardim Botânico do RJ. Os projetos do LaQMed relacionados ao acesso a esta espécie estão devidamente registrados no SISGEN sob o código A99E095, conforme a Resolução CGen nº 19, de 31 de outubro de 2018, de acesso ao patrimônio genético nacional. (MMA, 2018) As folhas coletadas 121,0 g foram secas em estufa em temperatura de 40°C durante 7 dias e, em seguida, pulverizadas em moinho de facas. O material foi submetido à extração com metanol por maceração dinâmica em *shaker* durante 5 horas. O filtrado resultante foi concentrado sob pressão reduzida em rotaevaporador, mantendo a temperatura do banho em torno de 40°C. O extrato metanólico obtido de folhas de CO (EMCOF) (12,45 g) foi submetido às análises cromatográficas a saber: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia líquida em coluna (CLC), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrofotometria de ultravioleta por arranjo de fotodiodos (CLAE-UV-PDA). Outras análises cromatográficas, como a cromatografia em fase gasosa, acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e espectroscópicas, como a ressonância magnética



nuclear (RMN) também foram utilizadas para as frações obtidas, até a identificação dos seus principais constituintes.

Análises Cromatográficas – EMCOF

CLAE-UV

Nessas análises, foi utilizada coluna Hibar Lichrospher (Merck®, Código 1.50377.001) para escala analítica, com 250mm de comprimento, 4mm de diâmetro e 5mm de tamanho de partícula, usando C18 como fase estacionária. A CLAE-UV-PDA foi realizada através de duas metodologias diferentes, uma já utilizada pelo nosso grupo, para comparação do perfil químico entre as arnicas brasileiras por nós, estudadas (VALVERDE e col., 2009) utilizando-se uma mistura binária como sistema eluente isocrático, composta por ácido trifluoracético 0,05% e acetonitrila. As amostras foram diluídas na proporção de 1mg/10mL e alíquotas de 1µL foram injetadas. A separação ocorreu à temperatura de 30 °C, com fluxo de 1mL min⁻¹. As substâncias eluídas foram analisadas quanto à sua absorção em UV entre 210 e 400nm. Outra metodologia foi utilizada, de acordo com levantamento científico realizado para a espécie em estudo, visando a identificação dos flavonoides eupatilina e eupatorina já descritos anteriormente para o gênero *Eupatorium*, antiga denominação do gênero *Chromolaena*. (DIAS e col., 2011) Nas duas metodologias, foram utilizados como padrões os flavonoides eupatilina e eupatorina, além do padrão triterpênico, alfa-amirina (Figura 1).

CLC

A CLC, foi realizada em coluna de vidro aberta, sob pressão ambiente, com sílica para coluna em fase normal (Merck®) e solventes (grau P.A.) em gradiente de polaridade crescente (hexano ao metanol), recolhendo-se frações (20 mL) que foram monitoradas por CCD, em presença dos padrões disponíveis, reveladas fisicamente sob



lâmpada de UV, quimicamente com solução de anisaldeído sulfúrico, sob aquecimento (WAGNER & BLADT, 1996) e reunidas por semelhança cromatográfica.

CG-EM

As frações reunidas por semelhança cromatográfica, submetidas à CG-EM utilizando-se as seguintes condições: 60°C (10 min) a 280°C e taxa de aquecimento de 6°C/min, 120-290°C (15°C/min); 290°C (17 min); gás carreador, He, fluxo 1mL/min; Injeção da amostra: 1mg diluída em hexano; técnica de injeção *splitless*; 70eV, no modo de ionização eletrônica (EI); temperatura da fonte 200°C; *scan* mass m/z 40-650 e temperatura de interface, 300°C (VEIGA JR. e col., 1997) (Figura 2).

RMN

As frações reunidas por semelhança cromatográfica observada em cromatografia em camada delgada (CCD) por revelação química com solução reagente de anisaldeído sulfúrico, foram submetidas à ressonância magnética nuclear de ^1H e de ^{13}C , visando sua identificação inequívoca. A RMN foi obtida em um espectrômetro Bruker Avance III 400WB[®]. Em todas as análises foram utilizados tubos de 5mm, tetrametilsilano (TMS) como referência interna, clorofórmio (CDCl_3) e dimetilsulfóxido (DMSO-d_6) como solventes. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nenhum dos padrões utilizados nas análises cromatográficas em CLAE-UV-PDA de EMCOF, foi detectado/identificado, portanto, essa análise nos permitiu verificar o perfil cromatográfico, que não apresentou substâncias em comum ou semelhança cromatográfica com outras arnicas brasileiras estudadas pelo nosso grupo, como a presença de diterpenos labdânicos encontrados em *Solidago chilensis* (arnica silvestre) ou de sesquiterpenolactonas, como as identificadas em *Tithonia diversifolia* (arnicão) (**Figura 1**). (Oliveira e Valverde, 2017) Em EMCOF foi observada mistura binária de

alfa e beta-amirinas (ABA), através de CCD de uma e duas dimensões, confirmada através de padrão comercial de alfa-amirina e através de CG-EM, onde sua fragmentação pela EM também pode ser confirmada (**Figura 2**), juntamente com taraxasterol e espatulenol. A mistura de ABA, após isolamento através de CLC e CCD do tipo preparativa, pode ser identificada inequivocamente, através de RMN ^1H e ^{13}C , uma vez que esta técnica revelou a diferença entre os carbonos olefínicos nas posições 12 e 13 dessas substâncias, devido ao acoplamento formado entre a metila em C19 na alfa-amirina e a ligação dupla entre os carbonos 12 e 13. Fato não observado para a beta-amirina, em função do posicionamento geminal das metilas no C20 (Tabela 1).

Figura 1 - CLAE-UV-PDA do extrato metanólico de folhas de *Chromolaena odorata* (EMCOF).

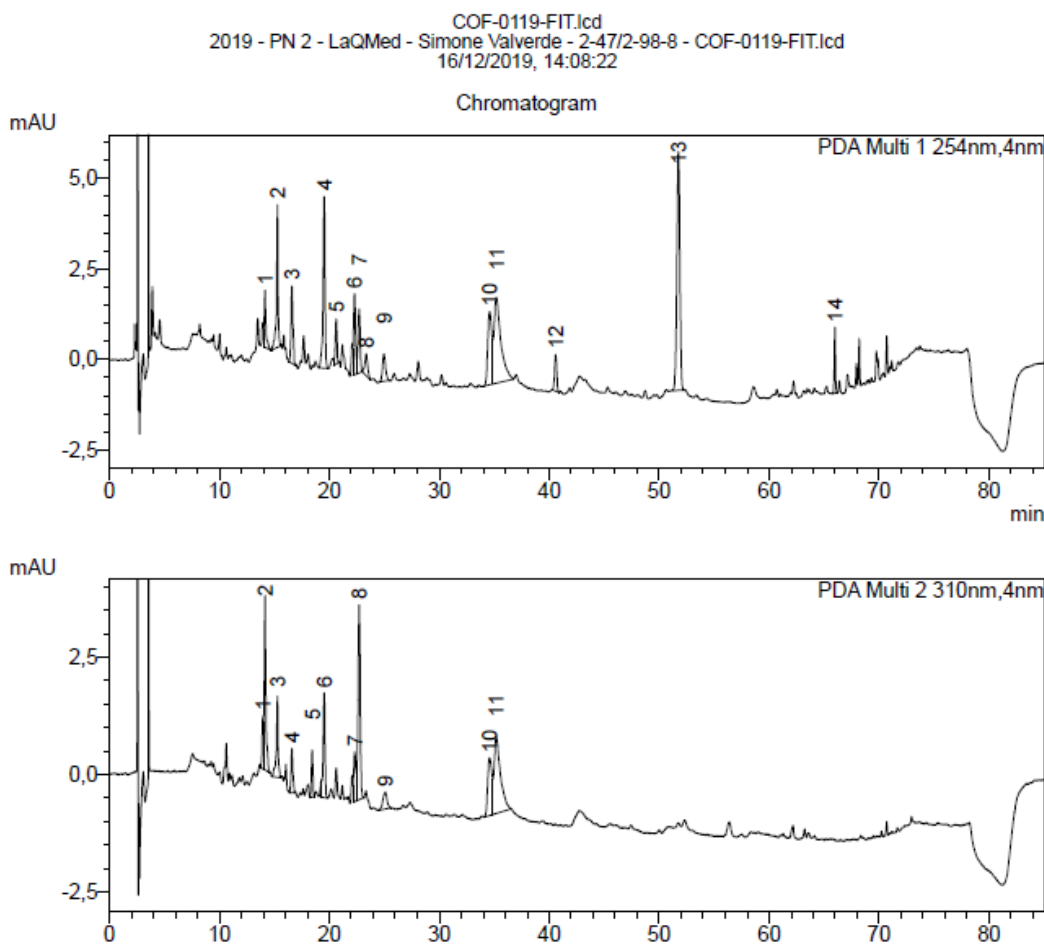
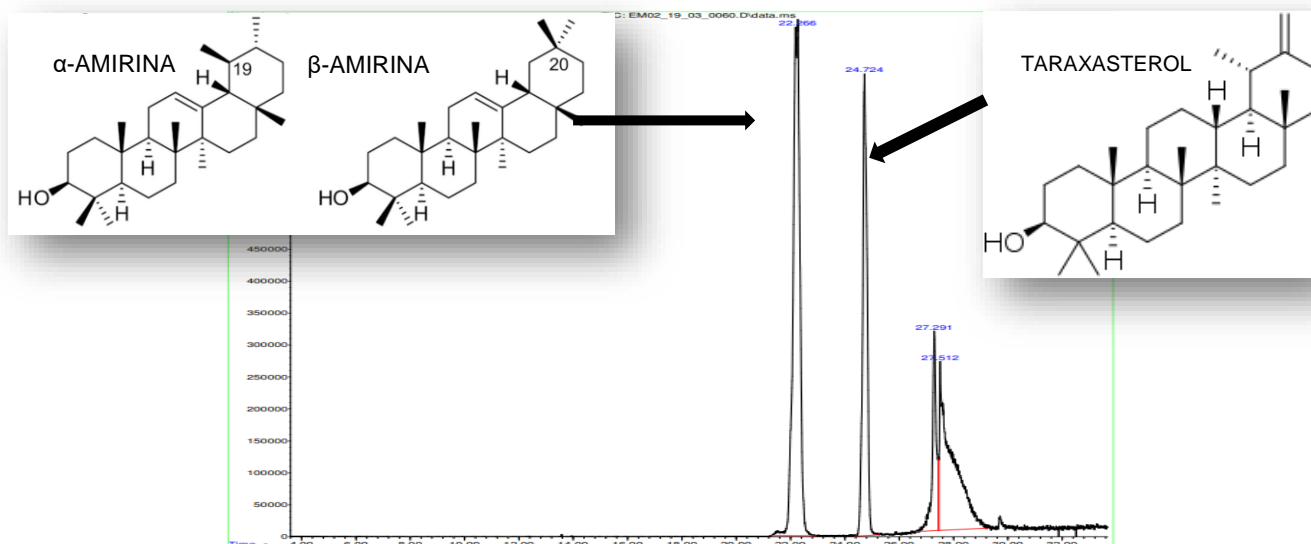


Figura 2 – TIC – Cromatograma de íons totais - CG-EM das frações reunidas por semelhança cromatográfica com identificação de ABA (em mistura binária) + taraxasterol por CG-EM



C (Nº)	RMN ¹ H (1)	RMN ¹³ C (1)	RMN ¹ H	RMN ¹³ C
	500MHz; CDCl ₃	500MHz; CDCl ₃	400MHz; CDCl ₃	400MHz; CDCl ₃
C3 - carbinólico	3,16 / 3,15	79,6 / 79,3	3,18 / 3,22	78,68 / 78,70
C12 - olefínico	5,06 / 5,12	124,4 / 121,7	5,12 / 5,17	124,43 / 121,73
C13 - olefínico	-	139,5 / 145,2	-	139,6 / 145,3

Tabela 1 - RMN de ¹H e ¹³C, dos carbonos olefínicos e carbinólico de ABA



CONCLUSÕES

As etapas referentes à padronização foram realizadas através da determinação e validação das metodologias aplicadas, sendo caracterizadas seis substâncias, o que confirmou a presença das duas amirinas, em mistura binária (55,92%) (ABA) e de mais 4 substâncias: taraxasterol (34,07%), que também apresenta efeito anti-inflamatório, *in vivo* e *in vitro*, espatulenol (0,25%) e mais 2 substâncias ainda não identificadas (5,36 e 27,51%). A mistura de ABA, presente também como biomarcadora em outras espécies vegetais, permite justificar as indicações terapêuticas de *Chromolaena odorata*, suas ações anti-inflamatória e antinociceptiva. COF teve seus extratos metanólicos de folhas padronizados a partir da concentração da mistura de ABA, obtida com alto grau de pureza, expressos em teor de amirinas (50±5%).

REFERÊNCIAS

- ABAD, M. J.; BEDOYA, L. M.; BERMEJO, P. **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components**. Academic Press, 2013.
- BELE, A. A.; KHALE, A. An overview on thin layer chromatography. **International journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 6, p. 256-267, 2011.
- CHAKRABORTY, A. K.; RAMBHADE, S. *Chromolaena odorata* (L.): An Overview. **Journal of Pharmacy Research**, v. 4, n. 3, p. 573-576, 2011.
- DIAS, Marluce Oliveira; HAMERSKI, Lidilhone; PINTO, Angelo C.. Separação Semipreparativa de α e β -Amirina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química nova**, v. 34, n. 4, p. 704-706, mai./2011.
- DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. Unesp, 2002.
- Flora do Brasil 2020**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: set. 2021.



GAEDCKE, F.; STEINHOFF, B. **Herbal Medicinal Products: Scientific and Regulatory Basis for Development, Quality Assurance and Marketing Authorisation**. 6 ed. Medpharm, 2003.

HUNG, T. M.; CUONG, T. D.; DANG, N. H.; ZHU, S.; LONG, P. Q.; KOMATSU, K.; MIN, B. S. Flavonoid Glycosides from *Chromolaena odorata* Leaves and Their in Vitro Cytotoxic Activity. **Chem. Pharm. Bull**, 59(1), p.129-131. 2011.

KING, R.M.; ROBINSON, H. Studies in the Eupatorieae (Compositae). A new genus *Austroeupatorium*. **Phytologia**, v. 19, n. 7, p. 433-435, 1970.

MAN, N.B.C. Phytochemical Analysis of the Leaves of *Chromolaena odorata* (Asteraceae) Bachelor of Science (Hons.). Chemistry Faculty of Applied Sciences University Teknologi Mara, 2010.

NIKAM, P. H. et al. Future Trends in Standardization of Herbal Drugs. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 02, n. 06, p. 38-44, 2012.

OLIVEIRA, T.B.; VALVERDE, S.S. Tagitinin C: an antiprotozoal sesquiterpene lactones from *Tithonia diversifolia* foliar surface extract. 4th International Symposium on Challenges and New Technologies in Drug Discovery & Pharmaceutical Production. Farmanguinhos / Fiocruz. 2017.

OLIVEIRA, C.T. *Chromolaena* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012. Disponível em:
<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB016060>>. Acesso em 19 dez 2012.

SUKANYA, S. L.; SUDISHA, J.; PRAKASH, H. S.; FATHIMA, S. K. Isolation and characterization of antimicrobial compound from *Chromolaena odorata*. **Journal of Phytology**, 3(10): 26-32, 2011.

VALVERDE, S.S.; AZEVEDO-SILVA, R.C.; TOMASSINI, T.C.B. Utilização de CLAE, como paradigma na obtenção e controle do diterpeno solidagenona a partir de inflorescências de *Solidago chilensis* Meyen (arnica brasileira). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 3, p. 196-199, 2009.

VEIGA JR., V. F.; PATITUCCI, M. L.; PINTO, A.C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, v. 20, n. 6, p. 612-615, dez./1997.

WAGNER, H; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. germany: Springer Science & Business Media, 1996.