CAPÍTULO 6

Análise Exploratória da Extração por Ultrassom do Extrato Glicólico da Camomila

6.1 – A CAMOMILA

A camomila - *Matricaria chamomilla* L. (*Asteraceae*) - é uma planta nativa da Europa e nordeste da Ásia, sendo o Brasil um dos países que atualmente produz a planta para o mercado internacional.

As partes usadas com finalidade terapêutica são os capítulos florais secos que é composta por flavonóides, cumarinas, fenilpropanóides, sendo os principais flavonóides apigenina, luteolina, quercetina, naringenina, rutina, quercitrina, apigenina e luteolina-7-O-glucosídeos, entre outros. As principais cumarinas são herniarina e umbeliferona e os principais fenilpropanóides são ácidos clorogênico e cafêico.[1]

A camomila é uma das plantas medicinais mais representativas devido ao seu interesse farmacológico, cosmético e usado em indústria de alimentos.[2] Na medicina popular a camomila é usada sob a forma de chá como digestivo e anti-espasmódico,[3] seu uso ainda se deve às propriedades antiflogística, atividades bacteriostáticas e fungistáticas que contribuem para seu valor medicinal.[4] Industrialmente a planta é usada como componente de sabonetes e perfumes devido a presença de óleos essenciais.[1] Os extratos da camomila são usados em loções e aplicações de uso tópico, possuem efeito anti-inflamatório, sendo úteis para tratar inflamação de pele, mucosas, eczema, entre outros. A camomila é considerada segura, entretanto, algumas alergias têm sido reportadas, principalmente em pessoas que são sensíveis ao pólen das flores da família *Compositae*.

De acordo com Ahamad e Misra, a herniarina tem mostrado atividades hemistática, anti-elmíntica, antifúngica e antibacteriana.[5] De acordo com Waleczek e colaboradores alfa-bisabolol contribui para as propriedades anti-inflamatórias e anti-oxidativa do óleo de camomila[6] e pelo trabalho de Zekovic *et al.,* a atividade espasmolítica da camomila é principalmente atribuída a presença dos flavonóides, sendo que os componentes voláteis do óleo essencial possuem efeitos antiflogístico e espasmolítico.[7] O ácido clorogênico mostra propriedades antioxidantes.[8] Apigenina e seus glicosídeos possuem efeitos antiinflamatórios, antipruríticos e anti-eritema.

6.1.1 - Análise e Extração dos Componentes da Camomila

O controle de qualidade oficial da camomila na farmacopéia[9] é baseado na determinação dos principais componentes do óleo essencial, como borneol, acetato de bornila, bisabolol e guaiazuleno por cromatografia em camada delgada.[2,10]

Nos métodos convencionais a extração de ácido clorogênico é feita por refluxo, uma desvantagen deste procedimento é devido a ionização, hidrólise e oxidação durante o processo de extração. Li e colaboradores investigaram as condições de extrações do ácido clorogênico das folhas de *E.ulmodies* utilizando ultrassom. O ácido clorogênico é um composto contendo muitos grupos hidroxilas conferindo portanto solubilidade em água ou álcool.[11]

De Maria e Moreira revisaram os métodos analíticos para a determinação do ácido clorogênico, os métodos apresentados foram: a gravimetria e volumetria, a espectrofotometria, cromatografia em papel, cromatografia gasosa, HPLC e eletroforese capilar. A gravimetria foi o primeiro método desenvolvido para a quantificação de ácido clorogênico em plantas, baseado na precipitação do ácido clorogênico com sal de chumbo neutro, saponificação, extração com éter e evaporação do solvente. Outro estudo gravimétrico/volumétrico consistiu em desengordurar o café, precipitação com acetato de chumbo e hidrólise com ácido sulfúrico, adição de hidróxido de sódio e titulação com tiossulfato de sódio, entretanto nesta última etapa ocorreram reações de outros compostos fenólicos. A espectrofotometria foi adotada como método oficial da Association of Official Analytical Chemists (AOAC), sendo realizada análise em 324 nm, após extração aquosa e precipitação com acetato de chumbo. O método baseado na cromatografia em camada delgada foi iniciado a partir da década de 50, foi realizado sobre placas com sílica gel, com revelação com solução aquosa de nitrato e molibdato de sódio. Na cromatografia gasosa, usada pela primeira vez em 1958, o extrato foi liofilizado e derivatizado com trimetil-cloro-silano, sendo injetado diretamente no cromatógrafo com detecção de ionização em chama. A partir da década de 70, HPLC foi usada na detecção e quantificação do ácido clorogênico em extratos vegetais. Em um dos estudos o ácido clorogênico foi derivatizado com 2-difenila-1-picrilhidrazila,

em comprimento de onda de 515 nm. Outro método utilizou a extração em fase sólida antes da análise por HPLC.[12]

Giuffreda e autores compararam o uso da extração por fluido supercrítico com extração por Soxhlet, destilação a vapor e maceração para o isolamento de componentes da folha da camomila, sendo analisados por CG-MS e HPLC no modo reverso. O rendimento de óleo essencial foi maior utilizando fluido supercrítico. A recuperação da apigenina por fluido supercrítico, após 30 min de extração foi maior comparada com Soxhlet (6 h de extração) e maceração por 3 dias.[13]

A chave da separação em eletroforese capilar é baseada na relação massa carga. A carga do composto varia de acordo com o pH do eletrólito. Ácido cafêico é o potencial precursor de flavonóides e é sempre extraído das plantas juntamente com flavonóides em meio ácido.[14] Em geral, o pKa de flavonóide com diferentes posições do grupo hidroxila varia de 7-12; em meio ácido ácido cafêico age como ânion devido o seu pKa_1 de 4,64 e pKa_2 de 9,45. Wang e colaboradores avaliaram a separação de flavonóides variando o pH de 8-10, sendo a ótima separação em pH 8,9, os autores concluíram sobre as diferentes posições de substituintes no fator de migração. Flavonas com grupo hidroxil na posição 4, tais como apigenina, luteolina, kaempferol, quercetina e miricetina são mais rápidos em mobilidade e maior em tempo de migração devido a grande quantidade de carga, sendo parcial ou completamente ionizados.

De acordo com Simon e colaboradores[15] o melhor pH para a separação de flavonóides foi de 9,5 e 9,6, sendo de acordo também com Pietta *et al.*[16]

6.1.2 - Extração em Meio Hidroglicólico

Os solventes utilizados para extração dos princípios ativos, com finalidade cosmética, são: água, propilenoglicol, butilenoglicol (em menor grau devido o seu alto custo), a glicerina, o álcool, entre outros. São também obtidos extratos hidroglicólicos, em uma mistura água e álcool.[17]

6.2 - OBJETIVO

Neste trabalho o efeito do ultrassom na preparação de extrato glicólico de camomila de uso cosmetológico foi investigado; foram variados o tempo e temperatura de extração, visando o maior rendimento para compostos fenólicos, sendo o marcador utilizado o ácido clorogênico. A extração foi comparada com o processo envolvendo a maceração e um extrato obtido em um processador a temperatura ambiente. A validação da metodologia foi realizada.

6.3 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

6.3.1 - Instrumentação

Todos os experimentos foram realizados em um equipamento de eletroforese capilar (modelo $HP^{3D}CE$, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com um detector de arranjo de diodo o comprimento de onda utilizado foi de 337 nm, com controlador de temperatura e com programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01).

Para a validação da metodologia analítica as soluções foram injetadas hidrodinamicamente a 40 mbar durante 3 s sendo o sistema operado em polaridade normal com tensão constante de 20 kV. Foi usado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, E.U.A.) com dimensões de 48,5 cm de comprimento total, 40,0 cm comprimento efetivo e 75 μm d.i., 375 μm d.e. No início de cada dia o capilar foi condicionado com NaOH 1 mol L^{-1} (5 min), seguido por 5 min de água deionizada e eletrólito (30 min). Entre as corridas o capilar foi lavado com eletrólito por 3 min.

6.3.2 – Reagentes, Padrões e Soluções

Foram utilizados reagentes de grau analítico, solventes de grau cromatográfico e água purificada por deionização (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, E.U.A.). Soluções estoque de padrões de polifenóis e cumarina (apigenina, luteolina, umbeliferona, ácido cafêico, ácido clorogênico, luteolina-7-O-glucosídeo, quercetina, rutina, naringenina) da Sigma e ExtraSynthese foram preparados na concentração de 1000 mg L^{-1} cada, em etanol, estocadas a 4 ^{o}C e usadas após adequada dissolução.

6.3.3 – Amostra e Seu Preparo

A planta utilizada neste trabalho foi a *Matricaria chamomile* na forma de pó da empresa Quimer (São Paulo – SP). A proporção de planta/solvente usada foi de 1/10.

O aparelho de ultrassom usado foi da marca Unique, modelo USC-1850[A], com freqüência de 25 kHz e potência de 120 W.

A extração por ultrassom da camomila foi realizada pelo modo direto, no qual a planta é colocada diretamente no recipiente do equipamento de ultrassom. A extração foi realizada com agitação a 1000 rpm. O solvente de extração utilizado consistiu de uma mistura de glicerina, propilenoglicol, água e álcool na proporção de 2%, 60%, 20% e 11%, respectivamente.

As temperaturas de análises no ultrassom foram de 30 ^{o}C e 50 ^{o}C, sendo monitoradas continuamente de uma em uma hora, até 8 horas.

A extração por ultrassom foi comparada com a maceração em tempo de 69 h e também utilizando um processador industrial, simulando um reator de uma indústria, porém em escala piloto, sendo que amostra foi retirada de 1 em 1 hora até o tempo total de 6 h. A agitação pelo misturador não foi feita continuamente devido ao alto calor produzido pelo motor, o extrato era misturado por 3 minutos e deixado em repouso até o tempo de retirada da amostra seguinte.

Após a coleta, as amostras foram centrifugadas em um aparelho da marca International Equipment Company, modelo Micromax, a 10.000 rpm por 5 min. O sobrenadante foi retirado, sendo diluído em 1:1 em água.

6.3.4 - Validação:

6.3.4.1 - Linearidade: Para a obtenção da curva analítica seis concentrações de cada padrão foram preparadas na faixa de 12,5 a 400 μg mL^{-1}, sendo que foram realizadas análises em triplicata para cada ponto.

6.3.4.2 - Precisão: A precisão foi avaliada pela repetibilidade, no próprio dia (intra-dia) e precisão intermediária, entre dias (inter-dia). A repetibilidade foi avaliada a partir dos resultados da área do pico de cada

padrão. As amostras foram injetadas 5 vezes consecutivamente. A precisão intermediária foi realizada em 2 dias diferentes, sendo que todo o método foi testado desde a extração. O extrato foi preparado a cada dia, sendo injetado 3 vezes.

6.3.4.3 - Exatidão: A exatidão foi expressa como porcentagem de recuperação. A recuperação foi realizada com adição de padrão de ácido clorogênico de concentração conhecida na amostra, durante a extração por ultrassom a 50° C, pelo tempo de 6 h. A amostra foi centrifugada e dissolvida 1:1 (v:v) em água.

6.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração da camomila foi realizada de 3 modos: por ultrassom, pela variação de parâmetros tais como tempo de sonicação e variação de temperatura, com devida agitação; por maceração por 69 horas, a temperatura ambiente e, um extrato foi obtido em um processador por 6 horas, a temperatura ambiente.

A extração foi monitorada pela técnica de eletroforese capilar, sendo o eletroferograma de um extrato de camomila obtido por ultrassom (50° C) apresentado na Figura 51. Como pode se verificar nesta figura o extrato hidroglicólico obtido apresentou os seguintes componentes: luteolina 7-O-Glu, ácido clorogênico, apigenina e luteolina, sendo que estes foram identificados a partir dos tempos de migração de cada composto, pelos espectros obtidos de cada padrão comparados com os armazenado sem uma biblioteca de dados do programa e pela adição de padrão. O ácido clorogênico foi utilizado como marcador devido a boa separação dos outros componentes da amostra e boa detecção. Os componentes 2, 3, 4 não foram identificados no extrato e os compostos 8 e 9 não estavam presentes.

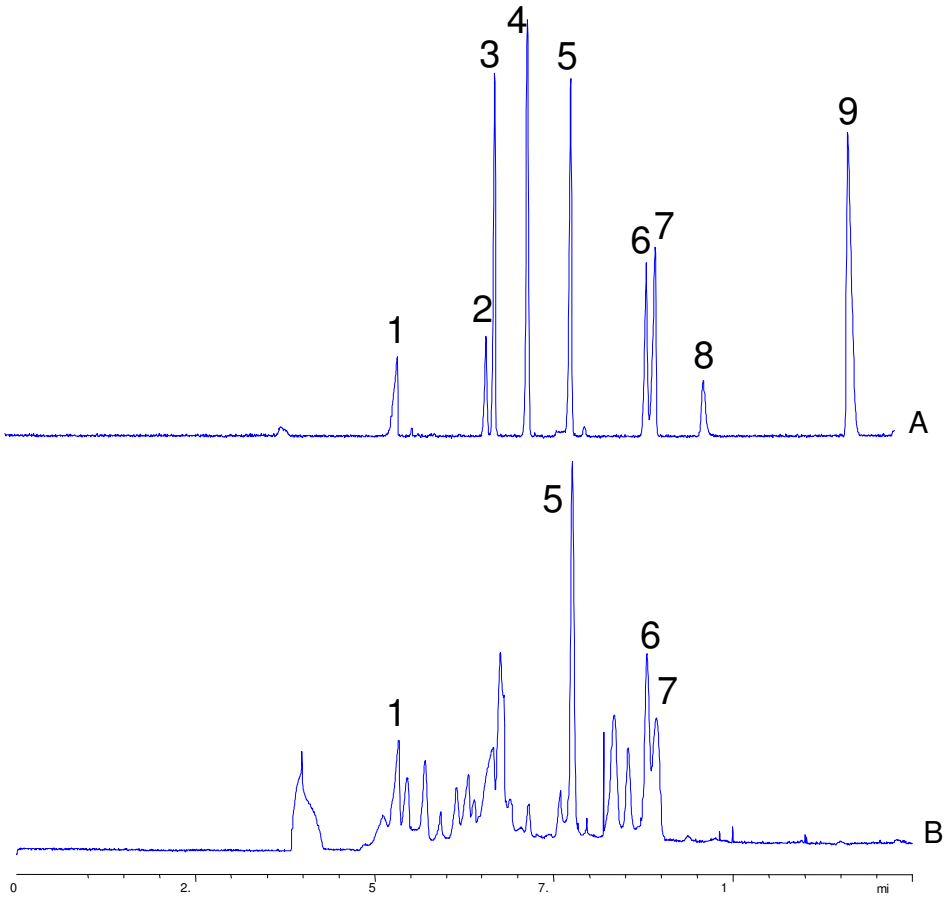

Figura 51 – Eletroferograma dos padrões da camomila e de um extrato hidroglicólico. Condições de análise: tampão 30 mmolL^{-1} TBS, pH 9,3, injeção 40 mbar / 3s, tensão 20 kV, 20° C. (A) Padrões da camomila (B) Extrato HG da camomila obtido por ultrassom. 1 – Luteolina 7-O-glu, 2 – Rutina, 3 – Naringenina, 4 – Umbeliferona, 5 – ácido clorogênico, 6 – Apigenina, 7 – Luteolina, 8 – Quercetina, 9 – Ácido cafêico.

As extrações foram realizadas em um ultrassom em temperaturas de 30 e 50° C, separadamente. A temperatura de 30° C não apresentou estabilidade, havendo variações de 30 a 46° C durante a extração.

A Figura 52 apresenta a área do ácido clorogênico em função do tempo de cada extração realizada por ultrassom a 30 e 50° C e por processador industrial. Verificou-se que todas as extrações realizadas em 1 h apresentaram praticamente a mesma concentração do ácido clorogênico, a partir de 5 h a diferença entre as extrações foi marcante, sendo melhor utilizando ultrassom a 50° C. O método de extração foi

validado utilizando extrato obtido por ultrassom a 50° C, por 6 h de extração. A extração por maceração não foi apresentada neste gráfico pois o tempo do extrato obtido foi em 69 h, apresentando área de 1,17, inferior às análises usando outros métodos, nos quais em 5 h de extração já se obtinha esse valor de área.

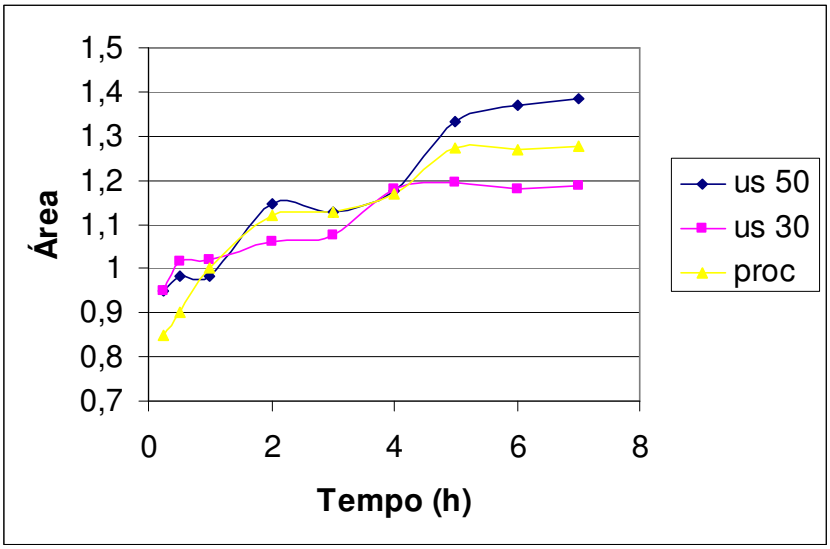

Figura 52 – Otimização da extração da camomila usando ácido clorogênico como marcador. US 50 = ultrassom a 50° C; US 30 = ultrassom a 30° C; Proc = processador industrial.

6.4.1 - Validação

As tabelas abaixo mostram os resultados de validação do método para o extrato de camomila HG.

Tabela 30 - Valores de curva analítica, coeficiente de correlação, LOD e LOQ

Composto	Equação	r^2	LOD (µg mL^{-1})	LOQ (µg mL^{-1})
Ácido clorogênico	y = 0,00065x –0,0061	0,9999	6,03	19,89

Intervalo de concentração de 12,5 – 400 µg mL^{-1}

Tabela 31 - Valores Inter-dia

Composto	Média da área	CV (%)
Ácido clorogênico	71	1,62

n = 6

Tabela 32 - Valores intra-dia (para 5 corridas consecutivas padrão 100 μg mL^{-1})

Composto	Média da área	CV (%)
Ácido Clorogênico	0,49	1,14

Tabela 33 – Recuperação (n = 6)

Composto	Sem adição (μg mL^{-1})	Adicionado (μg mL^{-1})	Encontrado (μg mL^{-1})	Recuperação (%)
Ácido clorogênico	71	10	89	90

6.5 - CONCLUSÕES

O extrato obtido por ultrassom a 50° C sob agitação constante em 5 h apresentou a melhor eficiência de extração comparada ao próprio ultrassom em menor temperatura, em maceração e ao processador.

Esta extração é de baixo custo, com um tempo relativamente curto, comparada a extração por maceração, que não atingiu o valor por ultrassom em 69 h.

6.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - POVH, N.P.; MARQUES, M.O.M.; MEIRELES, M.A.A., *J. Supercrit. D vvvFluids,* v.21, p.245-256, 2001.

2 - MEDIC-SARIC, M.; STANIC, G.; MALES, Z.; SARIC, S., *J. Chromatogr. A,* v.776, p.355-360, 1997.

3 - AHMAD A.; MISRA L.N., *Int. J. Pharmacogn.*, v.35, n.2, p.121-125, 1997.

4 - DE SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A., *Constituintes Químicos Ativos De Plantas Medicinais Brasileiras*, Fortaleza, EUFC, 1991.

5 - AHAMAD A., MISRA, L.N. *Int. J. Pharmacogn.*, v.35,n.2, p.121-125, 1997.

6 - WALECZEK, K.J., MARQUES, H.M.C., HEMPEL, B., SCHIMIDT, P.C., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, p.1-5, 2003.

7 - ZEKOVIC, Z.; PEKIC, B.; LEPOJEVIC, Z.; PETROVIC. L., *Chromatographia*, v.39, n.9/10, p.587-590, 1994.

8 - HINNEBURG, I.; MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.H.H., *Chromatographia.* v.59, n.9/10, p.591-594, 2004.

9 - United States Pharmacopoeia 26.ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2003.

10 - PADULA, L.Z.; RONDINA, R.V.D.; COUSSIO, J.D., *Planta Med.,* v.30, p.272-280, 1976.

11 - LI, H.; CHEN, B.; YAO, S., *Ultrason. Sonochem.,* v.12, p.295-300, 2005.

12 - DE MARIA, C.A.B.; MOREIRA R.F.A., *Quím. Nova*, v.27, n.4, p.586-592, 2004.

13 - SCALIA S.; GIUFFREDA, L.; PALLADO, P., *J. Pharm. Biomed. Anal.,* v.21, p.549-558, 1999.

14 - WANG, S-P; HUANG, K-J, *J. Chromatogr. A*, v.1032, p.273-279, 2004.

15 - SIMON, B.F.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T., *Chromatographia,* v.41, n.7/8, p.389-392, 1995.

16 - PIETTA, P.G.; MAURI, P.L.; ZINI, L.; GARDANA, C., *J. Chromatogr. A*, v.680 p.175, 1994 .

17 - *Cosméticos & Perfumes*, 21, out-nov, 2002.