

Produção e avaliação físico-química de extratos vegetais de *Bidens pilosa* (picão preto)

Autores: Bianca de Fátima Bredariol Oliveira¹, Júlio César Borella²

^{1,2}Centro Universitário Barão de Mauá

¹*biancabredariol@hotmail.com*, ²*julio.borella@barãodemaua.br*

Resumo

O trabalho pesquisou as características físico-químicas, cromatográficas e quantitativas dos extratos hidroalcoólicos, hidroglicólicos e aquosos de *Bidens pilosa* (picão preto) obtidos por maceração. Os extratos aquosos apresentaram maior seletividade para a extração do marcador em análise. Nos quesitos de resíduo seco e teor de flavonoides, os extratos hidroalcoólicos e hidroglicólicos foram semelhantes e superiores aos extratos aquosos.

Introdução

O desenvolvimento das monografias de insumos vegetais nos compêndios oficiais brasileiros, com a finalidade de aumentar a qualidade dos fitoterápicos, induziu a uma maior investigação e pesquisa quanto às espécies medicinais brasileiras e suas técnicas analíticas.

A espécie *Bidens pilosa*, conhecida como picão preto, pode ser incluída na lista das espécies que necessitam de uma melhor investigação quanto as suas informações analíticas.

Esta espécie pertence à ordem Asterales, família Asteraceae e tribo Coreoideae. Ela tem origem na América do Sul e pode ser encontrada em países tropicais e subtropicais, bem como em regiões da Europa. No Brasil, *B. pilosa* é encontrada em quase todo o território, mas com maior concentração nas regiões agrícolas do Centro-Sul (BRASIL, 2015).

As atividades terapêuticas da espécie incluem atividades antimicrobiana, antimalárica, anti-histamínica, antioxidante, antibacteriana, anticarcinogênica, antidiabética, antifúngica, anti-helmíntica, anti-herpética, anti-inflamatória, antiparasitária, antiviral, fotoprotetora, imunossupressora, imunomoduladora e de alteração da permeabilidade intestinal (BRASIL, 2015). Além disso, ela possui potencial para ser usada no SUS, pois está incluída na lista de plantas de interesse – RENISUS.

Com o intuito de oferecer formulações eficazes e seguras à população, são necessários estudos sobre algumas espécies vegetais que possuem potencial para serem utilizadas, como a espécie *B. pilosa*.

Entre seus constituintes químicos incluem-se os acetilenos e flavonoides, os quais podem ser os responsáveis pelas suas atividades farmacológicas (GILBERT; ALVES; FAVORETO, 2013). Ademais, já existem preparações patenteadas a partir desta espécie com indicação para tratamento de dermatites atópicas (HORIUCHI; SEYAMA, 2008) e uso no tratamento da obesidade, incluindo redução de peso e ganho de massa muscular (YANG; CHANG; LIANG, 2019).

Assim, a partir do estudo e pesquisa das propriedades de seus extratos, será possível facilitar a inclusão de sua monografia nas próximas edições da farmacopeia nacional, além de fornecer confiabilidade nas preparações que serão utilizadas posteriormente.

Para a produção de formulações é comumente utilizado alguns tipos de extratos com características físicas e químicas quali e quantitativamente distintas, dependendo de vários fatores, como o tipo de solvente, sua polaridade e sua seletividade para os constituintes da espécie extraída.

As tinturas são muito utilizadas na fitoterapia e podem ser obtidas por técnicas descritas na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira. As preparações usando uma parte do vegetal para dez partes do solvente, utilizando misturas de água com etanol são denominadas de extratos hidroalcoólicos e, os extratos usando como líquido extrator misturas de propilenoglicol com água são chamadas de extratos hidroglicólicos.

Os ensaios e testes que possuem finalidade de caracterizar físico-quimicamente e realizar o controle de qualidade dos insumos vegetais levam em consideração alguns aspectos: a identificação botânica da espécie usada, os ensaios que avaliam a pureza do produto e a avaliação quali e quantitativa de sua composição química (BRASIL, 2019). Por conta disto, os extratos que serão caracterizados devem passar, por exemplo, por avaliação da densidade, pH, resíduo seco, perfil cromatográfico, quantificação de princípios ativos, entre outros.

Deste modo, o presente trabalho visa avaliar as características físico-químicas de extratos de *B.*

pilosa visando dar embasamento para inclusão desta espécie nos compêndios farmacêuticos nacionais.

Objetivos

O objetivo do trabalho realizado foi avaliar as características físico-químicas de extratos da espécie *B. pilosa* (densidade, pH, resíduo seco, perfil cromatográfico, quantificação de princípios ativos), a partir do seu preparo com diversos tipos de líquidos extratores.

As avaliações realizadas dos extratos tiveram o objetivo de evidenciar os processos extrativos mais adequados para a droga vegetal desta espécie, visando obter preparações com características físico-químicas adequadas e com concentrações elevadas das substâncias que possuem ação terapêutica.

Métodos/Procedimentos

Obtenção da droga vegetal

A espécie foi obtida a partir das partes aéreas de *B. pilosa*, as quais foram colhidas após cultivo, secadas e pulverizadas.

Obtenção das soluções extrativas

Os extratos foram preparados por maceração, baseando-se na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). Após maceração, foram obtidos os extratos etanol:água 77:23 (v/v); propilenoglicol:água 1:1 (v/v); água (proporção de uma parte de droga para dez partes do solvente). A droga vegetal foi misturada com o solvente de extração e permaneceu em repouso e ambiente fechado, com agitação diária, por sete dias. A mistura foi prensada e filtrada para obter os extratos hidroalcoólicos (EtOH:H₂O), hidroglicólicos (PEG:H₂O) e aquoso. Assim, foram obtidas três amostras (n=3).

Densidade relativa

Os valores foram obtidos baseados na descrição da Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019). O cálculo foi realizado pelo quociente entre a massa da solução extrativa e a massa de água, usando picnômetro de 10 mL a 20°C. A análise foi realizada em triplicata.

pH

A técnica utilizada foi a descrita na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), com o uso do aparelho de marca Tecnophon (modelo mPA-210), soluções-tampão de pH=4,0 a 7,0 e 10 mL de amostra de cada extrato. O procedimento foi realizado em triplicata.

Resíduo seco

A técnica realizada foi baseada na Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019), contendo 2g de cada

extrato como amostra. Foi realizado o processo de evaporação em banho de água quente em cápsulas de porcelana de 10 mL de capacidade. Posteriormente elas foram levadas à estufa para dessecação por 3 horas a 105°C. A pesagem foi realizada após resfriamento. As análises foram realizadas em triplicata e o valor foi obtido em porcentagem.

Perfil cromatográfico

A cromatografia em camada delgada foi a técnica utilizada para obtenção do perfil cromatográfico, tendo como amostra a solubilização de 0,1g de resíduo seco com auxílio de 1mL de etanol:água (50:50 v/v). A fase estacionária utilizado foi sílica GF254 e, como fase móvel, a mistura de acetato de etila:clorofórmio:ácido acético (80:19:1).

Foi aplicado 30 µL da amostra na placa e 10 µL da solução referência (composição: 10 mg de quercetina solubilizada em 10 mL de metanol). O percurso cromatográfico foi de 10 cm e a revelação foi feita com nebulização de vanilina sulfúrica com aquecimento subsequente a 110°C na estufa, conforme Farmacopeia Brasileira 6ª edição (2019).

Teor de flavonoides

O método que foi utilizado para quantificação dos princípios ativos teve como fundamento uma reação cromática dos compostos flavonoides que apresentam propriedades químicas semelhantes. Para quantificação dos flavonoides, a espectrofotometria foi utilizada e o padrão utilizado foi a Quercetina. Nesta técnica ocorre a pré-purificação dos extratos por partição com tetracloreto de carbono e depois, reação com cloreto de alumínio (BORELLA; FONTOURA, 2002).

Foi preparado o reagente contendo piridina (20 mL), água (80 mL) e 2,5 g de solução de cloreto de alumínio com metanol. Logo após, as soluções padrões foram preparadas usando 0,1 mL, 0,2 mL, 0,3 mL e 0,5 mL da mistura de quercetina (0,050g) com 100 mL de álcool 70% (v/v), juntamente com 0,4 mL de ácido acético glacial e 4,0 mL do reagente, completado com álcool 70% (v/v).

As amostras passaram pelo processo de centrifugação por 5 minutos contendo 5,0 mL do extrato, 2,0 mL de tetracloreto de carbono e 3,0 mL de água. Após centrifugação, 1 mL do sobrenadante foi retirado e misturado com 0,4 mL de ácido acético glacial e 4,0 mL do reagente, completando o balão volumétrico de 25 mL com álcool 70% (v/v).

As análises espectrofotométricas dos padrões e das amostras foram realizadas com comprimento de onda de 420 nm e o aparelho de UV foi zerado com álcool 70% (v/v). As curvas de dosagem foram realizadas e os concentrações dos

flavonoides foram calculados com o auxílio do programa Excel.

Análises estatísticas

Inicialmente foram realizadas as análises de variância (ANOVA) a partir dos resultados das determinações e, em seguida, os testes de comparações múltiplas de Tukey-Kramer ($p < 0,05$).

Resultados e discussões

Os resultados das análises realizadas estão descritos na Figura 1 e Tabelas 1 e 2.

FIGURA 1 – Representação do perfil cromatográfico em camada delgada obtido com os extratos de *B. pilosa*

Parte superior da placa			
	Zona de coloração azul escura		Zona de coloração azul escura
	Zona de coloração roxa	Zona de coloração roxa	Zona de coloração roxa
	Zona de coloração roxa	Zona de coloração roxa	Zona de coloração roxa
Quercetina: Zona de coloração amarela	Zona de coloração amarela	Zona de coloração amarela	Zona de coloração amarela
	Zona de coloração roxa	Zona de coloração roxa	
		Zona de coloração cinza	
	Zona de coloração roxa		
Solução referência	Extrato hidroetanólico	Extrato hidroglicólico	Extrato aquoso

Fase estacionária: sílica GF²⁵⁴; fase móvel: acetato de etila:clorofórmio:ácido acético 80:19:1; revelador: vanilina sulfúrica com aquecimento.

(Fonte: Autores)

Tabela 1 – Valores médios dos parâmetros físico-químicos: densidade relativa, pH e resíduo seco dos extratos de *B. pilosa*

Extrato	Densidade Relativa	pH	Resíduo seco (%m/m)
Hidroalcoólico	0,8741 ^a	6,29 ^a	2,40 ^a
Hidroglicólico	1,0418 ^b	6,32 ^a	2,70 ^a
Aquoso	0,9954 ^c	6,95 ^b	0,53 ^b

$n = 3$; $p < 0,05$ – ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si.

Tabela 2 – Valores médios de quantificação de flavonoides e índice de seletividade dos extratos de *B. pilosa*

Extrato	Teor de flavonoides totais (%m/m)	Índice de seletividade (%flav/resíduo seco)
Hidroalcoólico	0,009 ^a	0,004
Hidroglicólico	0,008 ^a	0,003
Aquoso	0,003 ^b	0,006

$n = 3$; $p < 0,05$ – ANOVA seguido pelo teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer. Médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas, nas colunas, não diferem estatisticamente entre si. Teor de flavonoides totais estimados como Quercetina.

O perfil cromatográfico demonstrou que a Quercetina (marcador) estava presente, mesmo que em pequena quantidade, nos extratos produzidos. Os perfis dos extratos hidroalcoólicos e hidroglicólicos mostraram maior número de zonas de coloração, evidenciando maior diversidade de substâncias presentes, em comparação com aquosos, que apresentaram menor número, detectáveis pela revelação com vanilina sulfúrica (Figura 1).

Os valores de densidade obtidos tinham significativa diferença e uma das razões pode ser devido às características dos líquidos usados para extração (Tabela 1).

Os resultados de pH observados foram ácidos para todos os extratos analisados, sugerindo que houve a extração de princípios ativos que possuem características ácidas como, por exemplo, os flavonoides. Em comparação com o extrato aquoso, os extratos hidroalcoólicos e hidroglicólicos apresentaram maior acidez (Tabela 1).

Os resíduos secos apresentaram valores maiores para os extratos hidroalcoólicos e hidroglicólicos, em comparação aos extratos aquosos, como podemos observar na Tabela 1. Isto sugere uma maior eficiência dos solventes na extração das substâncias que estão presentes nos tecidos da espécie.

Os valores obtidos para o teor de flavonoides mostram que há maior concentração destes princípios ativos nos extratos hidroalcoólicos e hidroglicólicos, comparando com os aquosos (Tabela 2). Ao confrontar estes resultados com aqueles obtidos por Silva (2008), pode-se observar que os valores das concentrações de flavonoides são inferiores aos apresentados naquele trabalho (0,24%). No entanto, Silva (2008) não preparou os extratos avaliados seguindo as técnicas descritas na Farmacopeia Brasileira, como o preparo da tintura por maceração, na proporção de 1:10. Ademais, outra

explicação para a variação dos valores pode ter sido a diversidade das drogas de *B. pilosa* que foram utilizados nestes trabalhos.

Após cálculo do índice de seletividade para flavonoides, foi observado que, apesar do extrato aquoso ter menor concentração de flavonoides, a água foi o solvente mais seletivo para este princípio ativo, em comparação com os demais utilizados.

Conclusões

Com os resultados obtidos após a realização das análises, foi observado que para resíduo seco e teor de flavonoides, os extratos hidroalcoólicos e hidroglicólicos foram semelhantes e superiores aos extratos aquosos. Porém, o extrato aquoso teve maior seletividade para a extração dos flavonoides.

Apesar disso, o perfil cromatográfico indicou que os extratos hidroalcoólicos e hidroglicólicos apresentaram maior número de zonas de coloração, quando comparados com os extratos aquosos, mesmo o marcador (Quercetina) sendo visualizado em todos.

O menor valor de concentração do marcador nos extratos que foram produzidos neste trabalho, em comparação com outros trabalhos da literatura, o que pode ser explicado pelas técnicas de extração diferentes e pelas características variantes da espécie *B. pilosa* usada nos trabalhos.

Referências

BORELLA, Júlio César; FONTOURA, Andrea. Avaliação do perfil cromatográfico e do teor de flavonoides em amostras de *Baccharis trimera* (Less.) DC. Asteraceae (carqueja) comercializadas em Ribeirão Preto, SP, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 12, n. 2, p.63-67, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbfar/v12n2/a02v12n2>>. Acesso em: 03 jan. 2020..

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. (org.). **Farmacopeia Brasileira**. 6. ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2019. 1 v. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33832/259143/Volume+I+Pronto.%20pdf/4ff0dfe8-8a1d-46b9-84f7-7fa9673e1ee1>. Acesso em: 03 jan. 2020.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. (org.). **Monografia da espécie *Bidens pilosa* (Picão-preto)**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 85 p. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/11/Monografia-Bidens.pdf>. Acesso em: 13 fev. 2020.

GILBERT, Benjamin; ALVES, Lucio Ferreira; FAVORETO, Rita. *Bidens pilosa* L. Asteraceae

(Compositae; subfamília Heliantheae). **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 8, p.1-72, jan. 2013.

Disponível em:

<http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/194/174>. Acesso em: 10 jan. 2020.

HORIUCHI, Masako; SEYAMA, Yoshiyuki. Improvement of the Antiinflammatory and Antiallergic Activity of *Bidens pilosa* L. var. radiata SCHERFF Treated with Enzyme (Cellulosine).

Journal Of Health Science, [s.l.], v. 54, n. 3, p.294-301, 2008. Pharmaceutical Society of Japan. Disponível em:

<https://www.jstage.jst.go.jp/article/jhs/54/3/54_3_294/_pdf/-char/en>. Acesso em: 15 fev. 2020.

SILVA, Fabiana Lima. **Contribuição à farmacognosia de *Artemisia annua* L. e *Bidens pilosa* L. (Asteraceae). Acompanhamento da variação de metabólitos secundários em diferentes fases fenológicas, órgãos e extratos vegetais, aspectos botânicos e avaliação da atividade antileishmania in vitro**.

2008. 237 f. Tese (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008. Disponível em:

<[https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-18092017-](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-18092017-143745/publico/Fabiana_Lima_Silva_Mestrado.pdf)

[143745/publico/Fabiana_Lima_Silva_Mestrado.pdf](https://teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-18092017-143745/publico/Fabiana_Lima_Silva_Mestrado.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2020.

YANG, Wen-chin; CHANG, Lee-tian; LIANG, Yu-chuan. **Beneficial effect of *Bidens pilosa* on fat decrease and muscle increase**. 2019.

Disponível em:

<<https://patentimages.storage.googleapis.com/fb/3c/7e/d8c162b51e19d8/US20190000904A1.pdf>>. Acesso em: 10 jan. 2020.