

ISOLAMENTO DO VERBASCOSÍDEO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae)**Daniella M. S. de Oliveira***, Marilis D. Miguel, Milena Kalegari, Obdúlio G. Miguel e Thais F. Moreira

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, 80210-170 Curitiba – PR, Brasil

Recebido em 08/05/2013; aceito em 20/09/2013; publicado na web em 01/11/2013

ISOLATION OF VERBASCOSIDE AND VALIDATION OF METHOD TO STANDARDIZE THE CRUDE EXTRACT OF THE AERIAL PARTS OF *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae). Phenylpropanoid glycoside verbascoside was isolated and identified from the ethyl acetate fraction of the aerial parts of *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. by ¹H-NMR. A method using high-performance liquid chromatography has been developed and validated for determination of verbascoside in alcoholic crude extract of the aerial parts of *B. stachyoides*. Analysis was performed on a Phenomenex® Gemini-NX C18 analytical column (250 mm × 4.6 mm; 5 μm) using a mobile phase (pump A - aqueous solution containing H₂SO₄ (0.01 M), H₃PO₄ (0.4%), and (C₂H₅)₂NH (0.4%); pump B - methanol:aqueous (95:5) solution containing H₂SO₄ (0.05 M), H₃PO₄ (2%), and (C₂H₅)₂NH (0.2%); pump C - acetonitrile:aqueous (90:10) solution containing H₂SO₄ (0.05 M) and H₃PO₄ (2%)) and a diode array detector at 325 nm. The method was validated in accordance with ANVISA guidelines and may be applied to quality control of herbal medicine with aerial parts of *B. stachyoides*.

Keywords: *Buddleja stachyoides*; phenylpropanoid verbascoside; method validation.**INTRODUÇÃO**

A espécie vegetal *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. pertence à família Scrophulariaceae.¹ Conhecida no Brasil como barbasco ou verbasco,² é utilizada na medicina caseira com base na tradição popular como anti-hemorroidal, béquica (acalma a tosse), analgésica, sudorífica, calmante, emoliente e anti-reumática. Cresce espontaneamente em pastagens e terrenos baldios, onde é considerada planta daninha.³ Essa espécie tem origem nativa, não é endêmica do Brasil, tem como domínios fitogeográficos Cerrado, Mata Atlântica e Pampa. No Brasil, sua distribuição geográfica contempla as regiões Nordeste (Bahia, Alagoas), Centro-Oeste (Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul).¹

Atualmente, um componente foi isolado dessa espécie, o fenilpropanoide verbascosídeo [2-(3,4-dihidroxifenil-etil)-1-*O*- α -L-rampiranosil-(1 → 3)- β -D-(4-*O*-cafeil)-glucopiranosídeo], também conhecido como acteosídeo.⁴ As propriedades biológicas dessa substância têm sido descritas na literatura, e possui diversas atividades, incluindo antioxidante, anti-inflamatória, fotoprotetora e quelante. A atividade anti-inflamatória do verbascosídeo foi confirmada por um ensaio *in vitro* realizado em culturas de células primárias de queratinócitos humano, em que o verbascosídeo foi capaz de reduzir significativamente, de forma dose-dependente, a liberação de quimiocinas pró-inflamatórias. Esse estudo também demonstrou que ele promove a melhora e reparação de inflamações na pele, devido às suas atividades: sequestradora de espécies reativas de oxigênio (ERO), antioxidante, quelante de ferro e propriedade indutora da glutatona transferase (GST). Um estudo *in vivo*, conduzido em inflamação da mucosa intestinal, demonstrou que ele é capaz de inibir a ativação de proteínas pró-inflamatórias e, conseqüentemente, a atividade enzimática da matriz metaloproteinase, esta última também envolvida nos fenômenos de envelhecimento da pele. Os resultados desse estudo sugeriram que o verbascosídeo tem a função de eliminar os radicais intracelulares, reduzindo os sinais microscópicos e macroscópicos de colite em rato. Assim, a administração de verbascosídeo pode

ser benéfica para o tratamento de doença inflamatória do intestino.⁵ Outros estudos demonstraram que o verbascosídeo apresenta atividade antinociceptiva, sendo mais ativo que o ibuprofeno, e⁶ também inibe a enzima prolil oligopeptidase (POP), uma protease que hidrolisa pequenos peptídeos com prolina.⁴ É notável o aumento dos efeitos neuroprotetores e de melhora cognitiva com a utilização de inibidores da POP. Essas substâncias são importantes para o tratamento de condições clínicas, tais como perturbações neuropsiquiátricas e doenças neurodegenerativas.⁷

A interação do verbascosídeo com membranas fosfolipídicas foi avaliada por um estudo em que observou-se uma alta afinidade desta substância com as membranas carregadas negativamente dos compostos de fosfatidilglicerol (PG). Ele promoveu a separação de fase dos domínios lipídicos em membranas de fosfatidilcolina (PC) e formou um complexo estável com o lipídio (fosfolipídio/verbascosídeo). Apesar do seu caráter hidrofílico, a porção cafeoil do verbascosídeo foi localizada profundamente no núcleo hidrofóbico da membrana de PC. Também alterou o comportamento de ionização do grupo fosfato PG e interagiu com a superfície das vesículas. Os efeitos do verbascosídeo sobre as propriedades físicas das membranas podem contribuir para explicar algumas das suas atividades biológicas, como a antimicrobiana e a antioxidante.⁸

Em outros relatos o verbascosídeo inibiu a atividade enzimática da enzima conversora da angiotensina, o que pode ser benéfico contra a hipertensão arterial, inibiu a formação de prostaglandina E₂, o fator de necrose tumoral e óxido nítrico e também suprimiu a atividade enzimática da ciclooxigenase (COX-2). Em uma série de estudos *in vitro* demonstrou claramente que possui atividade imunomoduladora, anti-viral e anti-metástase.⁹

Devido ao interesse farmacológico, torna-se importante a utilização de um método analítico validado para quantificar este componente do extrato alcoólico bruto de *B. stachyoides* que contém o marcador verbascosídeo. Tal método poderá auxiliar na padronização de um medicamento fitoterápico das partes aéreas de *B. stachyoides* e ser utilizado na análise de doseamento no controle de qualidade.

A regulamentação brasileira em vigor para o registro de medicamentos fitoterápicos é a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n°

*e-mail: dani_mso@yahoo.com.br

ISOLAMENTO DO VERBACOSÍDEO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DAS PARTES AÉREAS DE *Buddleja stachyoides* Cham. & Schltdl. (Scrophulariaceae)

Daniella M. S. de Oliveira*, Marilis D. Miguel, Milena Kalegari, Obdúlio G. Miguel e Thais F. Moreira

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, 80210-170 Curitiba – PR, Brasil

Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento (J) obtidos do espectro de RMN-¹H, Figura 1S, e da projeção do RMN-¹³C para o isolado verbacosídeo foram: RMN -¹H, δ 1,08 (3H, d, $J = 6,24$ Hz, H-6''), δ 2,80 (2H, m, H-7), δ 3,29 (1H, t, $J = 9,5$ Hz, H-4''), δ 3,39 (1H, t, $J = 8,4$ Hz, H-2'), δ 3,56 (1H, m, H-5', H-3'', H-5''), δ 3,52-3,61 (2H, m, H-6'), δ 3,71 - 4,05 (2H, m, H-8a, H-8b), δ 3,81 (1H, t, $J = 9,17$ Hz, H-3'), δ 3,92 (1H, dd, $J = 3,3$ Hz, $J = 1,83$ Hz, H-2''), δ 4,38 (1H, d, $J = 7,89$ Hz, H-1'), δ 4,92 (1H, m, H-4'), δ 5,18 (1H, d, $J = 1,47$ Hz, H-1''), δ 6,28 (1H, d, $J = 15,77$ Hz, H-8'''), δ 6,56 (1H, dd, $J = 7,89$ Hz, $J = 2,02$ Hz, H-6), δ 6,66 (1H, d, $J = 7,89$ Hz, H-5), δ 6,69 (1H, d, $J = 2,02$ Hz, H-2), δ 6,77 (1H, d, $J = 8,07$ Hz, H-5'''), δ 6,96 (1H, dd, $J = 8,25$ Hz, $J = 2,2$ Hz, H-6'''), δ 7,06 (1H, d, $J = 2,02$ Hz, H-2'''), δ 7,60 (1H, d, $J = 15,77$ Hz, H-7'''). Projeção RMN -¹³C: δ 18,5 (C-6''), δ 36,4 (C-7), δ 62,1

(C-6'), δ 70,2 (C-4'), δ 71,3 (C-3''; C-5'; C-5''), δ 72 (C-2''), δ 72,1 (C-8), δ 73,7 (C-4''), δ 76 (C-2'), δ 81,4 (C-3'), δ 102,7 (C-1''), δ 103,9 (C-1'), δ 114,2 (C-8'''), δ 114,8 (C-2'''), δ 116,2 (C-5, C-5'''), δ 117,2 (C-2), δ 120,9 (C-6), δ 123 (C-6'''), δ 125,8 (C-1'''), δ 129,7 (C-1), δ 143,1 (C-4), δ 144,7 (C-3), δ 145,5 (C-3'''), δ 148,1 (C-7'''), δ 148,4 (C-4'''), δ 166,5 (C-9''').^{1S,2S}

REFERÊNCIAS

- 1S. Gitzel Filho, A.; Morel, A. F.; Adolpho, L.; Ilha, V.; Giralt, E.; Tarragó, T.; Dalcol, I. I.; *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 1472.
- 2S. Escalona, C. D. R. A.; *Dissertação de Monografia*, Universidade do Chile, Chile, 2006.

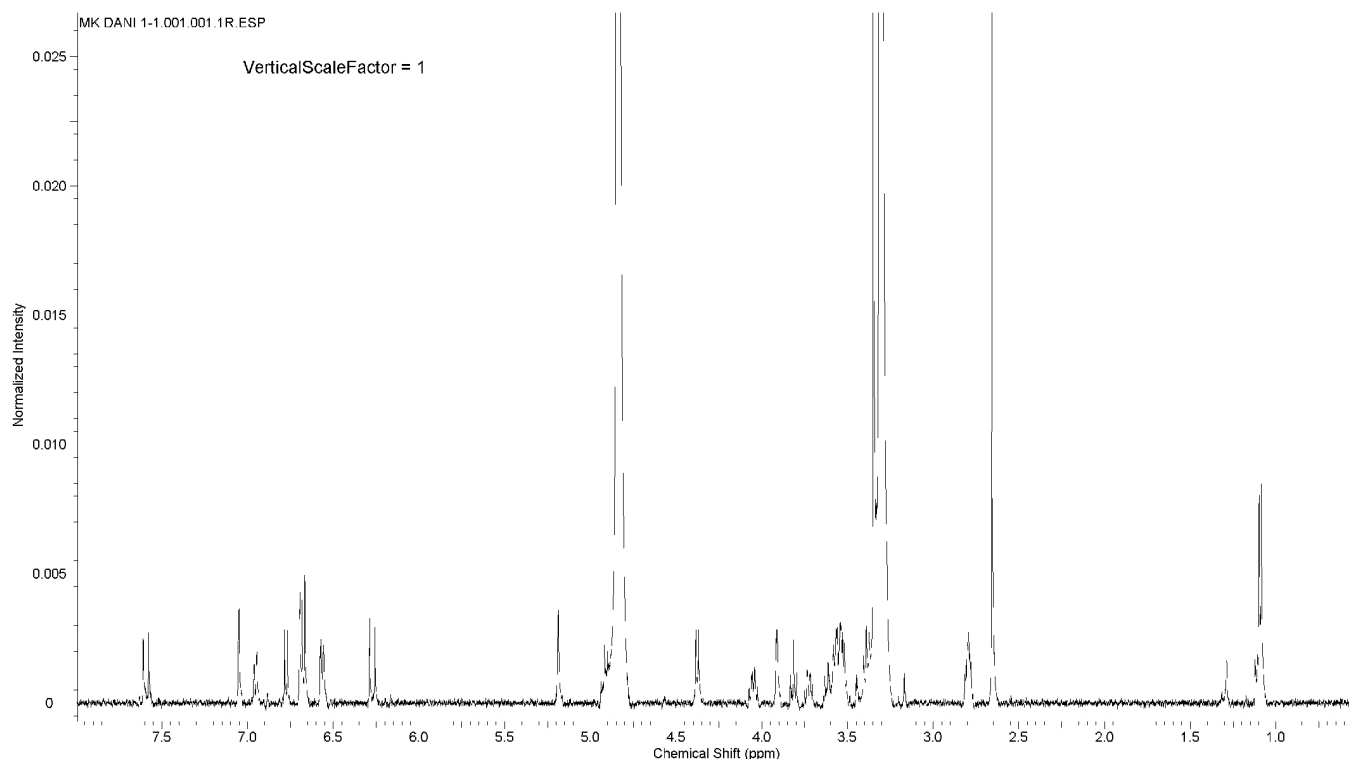


Figura 1S. Espectro de hidrogênio obtido por Ressonância Magnética Nuclear para o componente isolado verbacosídeo

14, de 31 de março de 2010, criada pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que determina os aspectos essenciais ao registro, como identificação botânica das espécies vegetais utilizadas, padrão de qualidade e identidade e provas de eficácia e segurança que validem as indicações terapêuticas propostas.¹⁰ A validação de método analítico para determinação de um marcador é outro requisito do processo de registro e, para que este método gere informações confiáveis sobre a amostra, a validação torna-se um aspecto vital para verificar a garantia da qualidade analítica.¹¹

Existem várias literaturas, na área de medições químicas e recomendações publicadas por órgãos internacionais e nacionais, que exigem a validação de métodos analíticos.¹² Entre elas encontra-se a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos", pertencente à ANVISA e utilizada neste estudo.¹³

Dada a importância deste composto, o objetivo deste estudo foi realizar o isolamento e identificação da substância verbascosídeo da fração acetato de etila e desenvolver e validar um método para quantificação e padronização do extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *B. stachyoides*.

PARTE EXPERIMENTAL

Coleta

O material vegetal foi coletado na Universidade Federal do Paraná, campus Jardim Botânico, Curitiba, Paraná, nos meses de maio e junho. A identificação botânica da espécie foi realizada no Herbário do Museu Botânico Municipal também localizado na cidade de Curitiba e comparada com a exsiccata registrada sob o número 339899 *B. stachyoides* pelo curador Osmar do Santos Ribas.

Extração

As partes aéreas da planta seca foram rasuradas, pesadas (5970 g) e posteriormente extraídas em aparelho de Soxhlet modificado com álcool etílico hidratado de cereais 96 °GL (Cereálcool®), obtendo-se o extrato alcoólico bruto.¹⁴ Para obtenção das frações foi utilizado o método de partição sistema líquido-líquido, utilizando-se solventes de diferentes polaridades seguindo esta ordem: n-hexano P.A., CHCl₃ P.A., AcOEt P.A., também em equipamento de Soxhlet.

Equipamentos

Para purificação do precipitado utilizou-se o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da Gilson®, com detectores DAD 171 e ELSD TMII, bomba modelo 322 e coluna cromatográfica preparativa C18 Luna® PFP com 250 mm de comprimento, 21,20 mm de d.i. e 5 µm de tamanho de partícula, e o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da Waters® modelo PDA 996, com detector ELSD 2420 e coluna cromatográfica analítica C18 Luna® PFP com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de d.i. e 5 µm de tamanho de partícula.

Para identificação da substância isolada utilizou-se o espectrometro de RMN da Bruker® modelo 600 MR, operando a 600 MHz para frequência do hidrogênio e tubo de 2 mm.

Para a validação do método analítico utilizou-se o sistema de cromatografia líquida de alta eficiência da Merck-Hitashi®, com bomba modelo L7100, degaseificador de solventes modelo L7812; injetor automático modelo L-7200; detector DAD modelo L7455; interface L7000 conectada ao sistema operacional Windows Professional e coluna cromatográfica analítica C18 Phenomenex® Gemini-NX com 250 mm de comprimento, 4,6 mm de d.i. e 5 µm de tamanho de partícula.

Isolamento e identificação

A fração acetato de etila foi fracionada em coluna de sílica gel 60 Merck®, para a qual 10 g da fração foram utilizadas. A amostra foi eluída com mistura de solventes, iniciando-se com 100% de n-hexano P.A., depois uma mistura de hexano e AcOEt P.A. na proporção 70:30, utilizando AcOEt como gradiente de polaridade e aumentando o intervalo de 5 em 5% até 100% do mesmo. Em seguida, utilizou-se a mistura AcOEt e MeOH P.A. na proporção 90:10, utilizando MeOH como gradiente de polaridade e aumentando o intervalo de 5 em 5% até 100% do mesmo. As frações foram recolhidas (107 amostras) e secas à temperatura ambiente. Após esse procedimento, 3 frações apresentaram-se cristalizadas, as quais foram reunidas e centrifugadas obtendo-se 20 mg de um precipitado.

Esse precipitado foi ressuspensionado em MeOH e submetido à cromatografia em cromatoplaça de sílica, utilizando como fase móvel AcOEt, H-COOH e H₂O (90:0,5:0,5) e como revelador ácido difenilbórico 2- aminoetiléster em EtOH. Obteve-se 10 mg de um componente, o qual foi analisado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio, porém não se apresentou puro. Para tanto, realizou-se uma segunda purificação em cromatografia preparativa por HPLC, onde 10 mg foram dissolvidos em 300 µL de DMSO e injetaram-se 300 µL no método: [Fase móvel: FA - H₂O + 0,1% H₃PO₄, FB - ACN + 0,1% H₃PO₄; tempo 0-20 minutos (80-FA:20-FB), tempo 20-27 minutos (75-FA:25-FB), tempo 27 minutos (0-FA:100-FB); fluxo 24 ml/min]. Uma terceira purificação foi realizada com coluna analítica em HPLC. Foram dissolvidos 1,2 mg em 300 µL de metanol, com os quais fizeram-se injeções de 50 e 100 µL, recuperando-se manualmente o pico principal. O método utilizado foi: [Fase móvel: FA - H₂O + 0,1% H₃PO₄, FB - ACN + 0,1% H₃PO₄; tempo 0-20 minutos (80-FA:20-FB), tempo 22-29 minutos (0-FA:100-FB), tempo 30 minutos (80-FA:20-FB); fluxo 1,0 mL/min]. Após essa purificação, foi recuperado 0,4 mg do componente com pureza de 99,93% (HPLC) e realizou-se a identificação por RMN-¹H e técnicas mono e bidimensionais, em CD₃OD e temperatura ambiente.

O padrão de trabalho verbascosídeo foi isolado da fração acetato de etila das folhas de *Duranta vestita* Cham., Verbenaceae. A purificação desta fração foi realizada utilizando coluna de sílica gel 60 Merck®, para a qual foi preparada uma pastilha com 5 partes de sílica para 1 parte da fração. Em seguida, a amostra foi eluída com mistura de solventes, iniciando-se com 100% de n-hexano P.A., utilizando AcOEt P.A. como gradiente de polaridade e aumentando o intervalo de 10 em 10% até 100% do mesmo. Em seguida, utilizou-se a mistura AcOEt e MeOH P.A. na proporção 90:10, utilizando MeOH como gradiente de polaridade e aumentando o intervalo de 10 em 10% até 100% do mesmo. Posteriormente foi utilizado água como gradiente, com intervalo de 50% até 100% de H₂O. Os frascos 49 a 90 foram reunidos e injetados em coluna preparativa C18 (HPLC) no método: fase móvel A: H₂O + 0,1% de H₃PO₄ e fase móvel B: MeOH; gradiente: tempo 0-7 minutos (85 a 80%-FA:15 a 20%-FB) e tempo 8-32 minutos (35%-FA:65%-FB). A substância isolada apresentou-se como um pó bege, com pureza de 99,89% (HPLC) e sua estrutura identificada por RMN de ¹³C e ¹H.¹⁵

Desenvolvimento e validação do método analítico

Para o desenvolvimento e validação do método analítico utilizou-se coluna analítica em HPLC e como fase móvel os seguintes solventes: bomba A – solução aquosa constituída de H₂SO₄ 0,01 M, H₃PO₄ 0,4% e (C₂H₅)₂NH 0,4%; bomba B - MeOH: solução aquosa constituída de H₂SO₄ 0,05 M, H₃PO₄ 2% e (C₂H₅)₂NH 0,2%, na proporção de 95:5; bomba C - ACN: solução aquosa constituída de H₂SO₄ 0,05 M e H₃PO₄ 2%, na proporção de 90:10. Os cromatogramas

foram integrados no comprimento de onda 325 nm. A temperatura do forno foi 35 °C. As amostras foram diluídas em MeOH e fase diluente (H₂O + 2% de H₃PO₄). O volume de injeção foi de 40 µL. O gradiente de fase móvel está descrito na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente do método analítico desenvolvido em HPLC para análise do extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides*

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)	Fase C (%)	Fluxo (mL/min)
0,0	100	0	0	1,1
3,0	100	0	0	1,2
5,0	90	7	3	1,2
15,0	81	16	3	1,2
28,0	70	21	9	1,2
36,0	70	21	9	1,2
40,0	59	26	15	1,2
45,0	59	26	15	1,2
47,0	20	65	15	1,2
53,0	20	65	15	1,2
54,0	100	0	0	1,1
60,0	100	0	0	1,1

A concentração de verbascosídeo nas amostras foi calculada através do sistema interface L7000 conectado ao Windows Professional (equipamento Merck-Hitashi), considerando a área encontrada, a equação da reta e fatores reais de diluição [Concentração (mg/g) = Área x Fator de diluição x Equação da reta (escalar)].

Os parâmetros avaliados na validação analítica do método para doseamento de verbascosídeo foram: especificidade, linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez, de acordo com a Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003, elaborada pela ANVISA.¹³

A curva analítica foi preparada com a solução padrão de verbascosídeo na concentração de 0,30 mg/mL em MeOH. A partir dessa solução foram preparadas cinco concentrações dissolvidas em fase diluente (0,08 mg/mL; 0,09 mg/mL; 0,10 mg/mL; 0,11 mg/mL; 0,12 mg/mL) e injetadas em triplicata.

A repetibilidade foi realizada com 6 determinações a 100% da concentração do teste para verificar a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. A precisão intermediária foi também realizada com 6 determinações a 100% da concentração do teste e serviu para verificar a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias e analistas diferentes. Neste ensaio as amostras sofreram uma diluição de 1:250 para permanecerem dentro da curva analítica.

No parâmetro exatidão foi utilizado o método de adição de padrão, no qual adicionou-se quantidades conhecidas do padrão de trabalho (verbascosídeo) ao extrato alcoólico bruto. O estudo foi realizado em 3 concentrações (baixa, média e alta) no intervalo da curva analítica, em triplicata, perfazendo um total de 9 ensaios. Para obter a concentração 1 próxima à teórica (0,083 mg/mL) foram adicionados 125 µL da amostra extrato alcoólico bruto 1:50, 100 µL do padrão 0,30 mg/mL de verbascosídeo e 775 µL de fase diluente. Para obter a concentração 2 próxima à teórica (0,107 mg/mL) foram adicionados 125 µL da amostra extrato alcoólico bruto 1:50, 180 µL do padrão 0,30 mg/mL de verbascosídeo e 695 µL de fase diluente. Para obter a concentração 3 próxima à teórica (0,119 mg/mL) foram adicionados 125 µL da amostra extrato alcoólico bruto 1:50, 220 µL do padrão 0,30 mg/mL de verbascosídeo e 655 µL de fase diluente. A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida

do analito adicionado à amostra e deve estar entre 95 e 105%.¹³

No parâmetro robustez realizou-se a análise de estabilidade da solução, a mesma amostra utilizada no parâmetro de precisão por repetibilidade foi injetada após 24 h do seu preparo. Outras formas de avaliar a robustez do método foi diluir a fase móvel A (1:2), conseqüentemente o pH foi alterado de 2,0 para 3,0 e também a temperatura do forno foi modificada para 40 °C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Identificação

Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento (*J*) obtidos do espectro de RMN ¹H demonstraram que o componente isolado é o verbascosídeo, Figura 1.

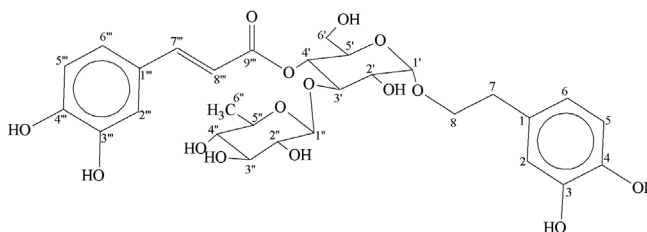


Figura 1. Estrutura do componente isolado verbascosídeo

Validação

A curva analítica do padrão de verbascosídeo apresentou-se linear na faixa de trabalho pretendida, com um coeficiente de determinação (*r*²) de 0,9869, sendo maior que a especificação para fitoterápicos que é de 0,98, como mostra a Figura 2. Após obtenção da curva analítica, foi possível calcular a concentração de verbascosídeo presente na amostra de extrato alcoólico bruto das partes aéreas. Foram pesadas 134 mg da amostra extrato alcoólico bruto (equivalente a 1 g de droga vegetal) e diluídas para balão volumétrico de 50 mL com MeOH, depois foi diluída 1:5 em fase diluente obtendo-se uma diluição final de 1:250. A concentração encontrada foi de 21,47 mg/g de verbascosídeo, como mostra a Figura 3. A amostra foi diluída para ficar dentro da curva analítica conforme o cálculo: 21,47 mg/ 250 ml = 0,085 mg/ml de concentração final de verbascosídeo.

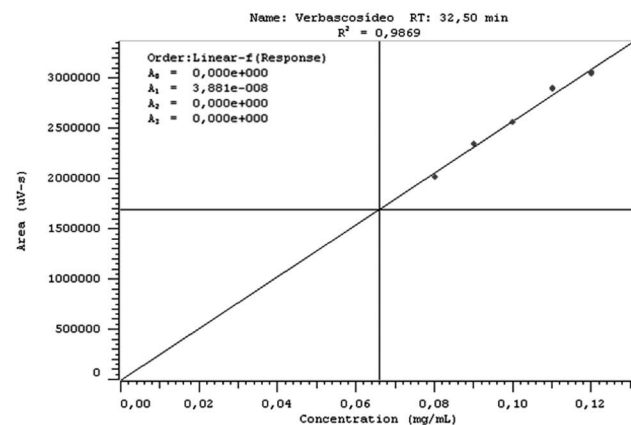


Figura 2. Curva analítica obtida com o padrão de trabalho verbascosídeo

Devido ao teor elevado de verbascosídeo quantificado no extrato alcoólico bruto das partes aéreas, escolheu-se este marcador para realização de uma validação analítica, podendo ser utilizado para a padronização no controle de qualidade de um possível

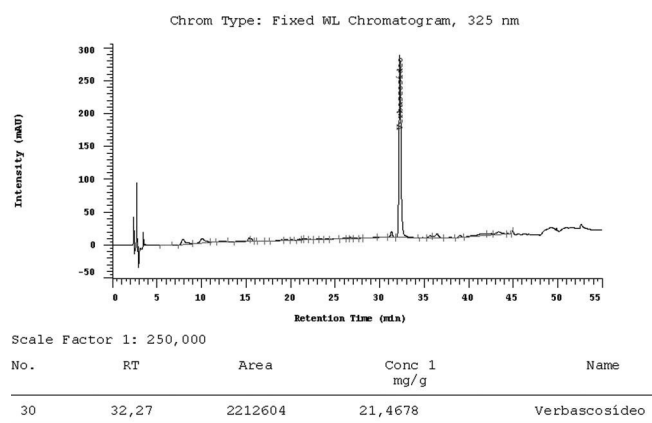


Figura 3. Concentração de verbascosídeo presente no extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides*

medicamento fitoterápico desenvolvido com as partes aéreas de *Buddleja stachyoides*.

No ensaio de especificidade, foi injetado o álcool etílico hidratado de cereais 96 °GL no método desenvolvido para verificar a influência do excipiente, o qual não apresentou nenhum pico com o mesmo tempo de retenção que o verbascosídeo ou alguma semelhança com o padrão. Dessa forma, comprovou-se que o solvente utilizado na extração não possui nenhum componente que possa promover interferência na detecção de verbascosídeo.

No espectro de UV, Figura 4, com absorção em 329,1 nm pode-se visualizar a pureza do pico de 99,88%, do extrato alcoólico bruto das partes aéreas, sendo maior que a especificação de 99%. Através da comparação espectral entre o pico de verbascosídeo presente na amostra e o padrão de verbascosídeo, obteve-se uma correlação espectral de 99,96%, demonstrando a existência de similaridade entre os espectros de UV e o mesmo perfil cromatográfico, como mostra a Figura 5.

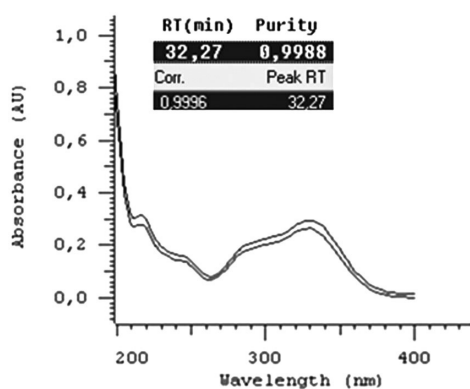


Figura 4. Espectro de UV, pureza e correlação espectral do pico do verbascosídeo presente no extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides*

No parâmetro repetibilidade, o desvio padrão relativo (DPR%) encontrado entre as 6 injeções do analista 1 foi de 0,87% com uma concentração média de 21,44 mg/g e para o analista 2 a concentração média foi de 20,57 mg/g com um desvio padrão relativo de 0,41%. Esses resultados estão dentro dos limites especificados (DPR ≤ 5%). Na precisão intermediária a concentração média das análises realizadas pelos dois analistas foi de 21,01 mg/g com desvio padrão relativo de 2,26%, valor abaixo dos limites de especificação (DPR ≤ 5%). Através desses resultados pode-se confirmar que o método proposto é reprodutível.

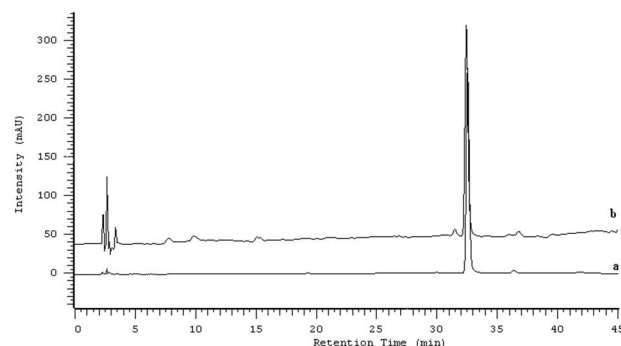


Figura 5. Perfil cromatográfico do extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides*. a) Padrão de trabalho verbascosídeo; b) Extrato alcoólico bruto

As concentrações práticas provenientes do ensaio de exatidão foram 0,083 mg/mL, 0,105 mg/mL e 0,116 mg/mL, e ao comparar com as concentrações teóricas obteve-se os índices de recuperação de 100,72%, 98,32% e 97,81% para as concentrações 1, 2 e 3, respectivamente. Portanto, o método proposto apresenta exatidão, pois os índices de recuperação do padrão adicionado permaneceram dentro da faixa de 95% a 105%.¹³

No parâmetro robustez estabilidade da solução, após 24 horas de preparo o valor do doseamento do verbascosídeo foi de 20,92 mg/g, apresentando um desvio padrão relativo em relação à média da precisão por repetibilidade de 0,28%, indicando que a amostra permanece estável, alterando pouco o teor após 24 horas do seu preparo. No parâmetro pH e composição da fase móvel, a fase móvel A foi diluída 1:2. Dessa forma, além de ter alterado a composição da fase móvel, modificou o pH (que possuía um valor aproximado de 2,0 e nesta análise ficou em torno de 3,0). Obteve-se a concentração de verbascosídeo de 20,45 mg/g e desvio padrão relativo de 1,81%. No parâmetro robustez temperatura do forno a concentração encontrada foi de 20,59 mg/g com um desvio padrão relativo de 1,41%. Os três ensaios apresentaram-se robustos para o método proposto, pois em todos os desvios padrão relativo foram inferiores ao limite especificado (DPR ≤ 5%). Os resultados obtidos para a validação analítica do doseamento de verbascosídeo estão apresentados na Tabela 2.

Validação é um processo dinâmico e constante que deve ser iniciado com o planejamento da estratégia analítica e continuar ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência.¹¹ O método analítico deve ser revalidado sempre que ocorrerem modificações no processo, equipamento, padronização da amostra, procedimento ou quando o mesmo for usado novamente após certo período de tempo. As normas internacionais, nacionais e sistemas da qualidade destacam a importância da validação de métodos analíticos e a documentação do trabalho de validação para a obtenção de resultados confiáveis e adequados ao uso pretendido.¹²

CONCLUSÃO

Neste estudo foi isolado o fenilpropanoide verbascosídeo, principal componente presente nas partes aéreas de *Buddleja stachyoides*, o qual apresenta atividades farmacológicas importantes como antioxidante, analgésica e inibidor da POP. Além disso, foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificação deste marcador e padronização do extrato alcoólico bruto, o qual está de acordo com os parâmetros exigidos pela Resolução – RE nº. 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA, mostrando-se sensível, preciso, reprodutível, simples e de baixo custo. Dessa forma, apresenta grande importância na pesquisa, desenvolvimento e cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos e produtos farmacêuticos a base de extratos provenientes

Tabela 2. Resultados obtidos na validação analítica do doseamento de verbascosídeo presente no extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides*

Parâmetro analisado	Especificação	Resultado
Especificidade	Influência do excipiente	Não podem interferir no doseamento do analito
	Pureza do pico	Mín.99%
	Correlação com pico padrão	Mín.95%
	Fingerprint	Amostras com mesmo perfil cromatográfico
Linearidade	Curva analítica	$r^2 \geq 0,98$
Precisão	Repetibilidade	Analista 1 DPR $\leq 5\%$
		Analista 2 DPR $\leq 5\%$
	Intermediária	DPR $\leq 5\%$
Exatidão	Adição de Padrão	Recuperação 95 a 105%
		100,72%
		98,32%
Robustez	Estabilidade da solução	0,28%
	pH e composição FM	DPR $\leq 5\%$
	Temperatura do forno	1,41%

DPR: Desvio Padrão Relativo; r^2 = coeficiente de determinação; FM: fase móvel.

de *Buddleja stachyoides*, ou ainda, de qualquer outra espécie vegetal que contenha a substância verbascosídeo.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os dados dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento (J) do isolado verbascosídeo e o espectro de RMN- ^1H , obtidos neste trabalho, estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Ao programa de Ciências Farmacêuticas da UFPR, ao Institut de Chimie de Substances Naturelles, à indústria As Ervas Curam, ao prof^o. Dr. J. C. P. de Mello da UEM e à CAPES pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

- <http://www.floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot>, acessada em Outubro 2013.
- Ferreira, H. D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1988.
- Lorenzi, H.; Matos, F. J. A.; *Plantas medicinais no Brasil: nativa e exóticas*, 2 ed., Instituto Plantarum: São Paulo, 2008.
- Gitzel Filho, A.; Morel, A. F.; Adolpho, L.; Ilha, V.; Giralt, E.; Tarragó, T.; Dalcol, I. I.; *Phytother. Res.* **2012**, *26*, 1472.
- Vertuani, S.; Beghelli, E.; Scalambra, E.; Malisardi, G.; Copetti, S.; Dal Toso, R.; Baldissarotto, A.; Manfredini, S.; *Molecules* **2011**, *16*, 7068.
- Backhousea, N.; Delportea, C.; Apablaza, C.; Farías, M.; Goitya, L.; Arraua, S.; Negrete, R.; Castroa, C.; *J. Ethnopharmacol.* **2008**, *119*, 160.
- Borges, N. S.; Dalcol, I.; Gitzel Filho, A.; Rivero, A. C.; Adolpho, L. O.; Marin, D. F.; *Anais da 25ª Jornada Acadêmica Integrada*, Santa Maria, Brasil, 2010.
- Funes, L.; Laporta, O.; Cerdán-Calero, M.; Micol, V.; *Chem. Phys. Lipids* **2010**, *163*, 190.
- Lee, J. Y.; Woo, E.; Kang, K. W.; *J. Ethnopharmacol.* **2005**, *97*, 561.
- Brasil, Ministério da Saúde, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Resolução RDC 14, de 31/03/2010, MS: Brasília, 2010.
- Barros, C. B.; *Biológico* **2002**, *64*, 175.
- Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
- Brasil, Ministério da Saúde, ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária; RE nº 899, de 29/05/2003, Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, MS: Brasília, 2003.
- Carvalho, J. L. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2001.
- Canteli, V. C. D.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2012.