

# Desenvolvimento e validação da metodologia de quantificação gravimétrica de resina glicosídica em fitoterápicos contendo *Operculina macrocarpa* (L.) Urban

Luciana R. Lima<sup>1</sup>, Haroudo S. Xavier<sup>2</sup>, Juliana L. Meira<sup>3</sup>, Pedro J. Rolim Neto<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

<sup>2</sup>Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil,

<sup>3</sup>Núcleo de Controle de Qualidade de Medicamentos e Correlatos, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, 50740-521, Recife, PE, Brasil

**RESUMO:** O extrato de tubérculos de *Operculina macrocarpa* (Jalapa do Brasil) é um produto fitoterápico, com eficácia no tratamento de constipação, como laxante. A resina quantificada é extraída com solução hidroalcoólica apresentando constituintes orgânicos e inorgânicos, podendo ser dividida em duas frações principais: uma solúvel em éter, chamada de jalapina e outra, mais polar, ainda pouco estudada, denominada convolvulina. O interesse principal deste trabalho foi propor uma otimização da metodologia gravimétrica para doseamento da resina descrita na Farmacopéia Brasileira primeira edição e sua validação com o objetivo de diminuir os custos e o tempo de partição das fases. Os resultados obtidos na validação foram tratados estatisticamente por análise de variância *one-way* (ANOVA) e teste *t* de *Student*. O método demonstrou atender aos requisitos de boas práticas em laboratórios exigidos pela legislação brasileira em vigor, RE n° 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, sendo, portanto, sensível, exato e preciso para o doseamento do extrato de *Operculina macrocarpa*, conhecida popularmente como Jalapa-do-Brasil.

**Unitermos:** *Operculina macrocarpa*, jalapa do Brasil, doseamento, validação, fitoterápico.

**ABSTRACT:** "Development and validation of the gravimetric quantification of the glucoside resin in phytomedicine containing *Operculina macrocarpa* (L.) Urban". The tubercle extract of *Operculina macrocarpa* (Jalap of Brazil) is a phytomedicine, with effectiveness in the treatment of constipation, as laxative. The quantified resin is extracted with hydro-alcoholic solution, presenting organic and inorganic constituents, separable in two main fractions: one soluble in ether, called jalapina and other, more polar, still little studied, called convolvulina. The main objective of this work was to consider the optimization of the gravimetric methodology for assay of the resin described in the Brazilian Pharmacopeia, First Edition and its validation, with the objective to diminish the costs and the partition time of the phases. The results achieved in the validation had been statistically treated by one-way Variance Analysis (ANOVA) and *t* test of *Student*. The method demonstrated to attend to the Good Manufacture Practice requirements for laboratories, demanded by actual brazilian law, RE n° 899 of May 29<sup>th</sup> of 2003 from the National Agency of Sanitary Vigilance, being therefore, sensible, accurate and precise for the assay of the *Operculina macrocarpa* extract, known popularly as Jalap of Brazil.

**Keywords:** *Operculina macrocarpa*, Jalap of Brazil, assay, validation, phytomedicine.

## INTRODUÇÃO

A *Operculina macrocarpa* (L.) Urban é uma Convolvulaceae anual, com hábitos de trepadeira, distribuída principalmente em regiões tropicais e subtropicais. Fazem parte também desta família as espécies do gênero *Ipomoea*, que produzem a conhecida raiz tuberosa de batata doce (Joly, 1975).

A jalapa é encontrada em regiões compreendidas entre Antilhas e o Brasil, além de regiões temperadas dos Andes Mexicanos, em regiões lamacentas e de solo

profundo. (Planchon, 1937). No Brasil é encontrada em vários estados recebendo assim diversas sinonímias populares, dentre as mais citadas na literatura estão: batata-de-purga, xalapa, jalapa-de-São Paulo, purga-do-Amaro Leite, jalapa-do-Brasil (Cruz, 1980; Michelin; Salgado 2004).

Dentre as várias utilizações populares, as mais frequentes são como laxante e purgativo em prisão de ventre e constipação crônica. Emprega-se também como depurativo do sangue e na leucorréia, diarréia, disenteria, fraqueza geral. Esta planta tem também a propriedade

de regularizar a menstruação (Cruz, 1980; Michelin; Salgado 2004).

Classicamente a constituição química de Convolvulaceae é definida por dois grupos resinosos principais, um deles solúvel em éter, denominado de jalapina e outro, mais polar, ainda pouco estudado, denominado de convolvulina (Noda, 1987). Ainda fazem parte da constituição das resinas outros compostos orgânicos e inorgânicos (Shellard, 1961).

A grande utilização da *Operculina macrocarpa* levou à sua inclusão na primeira e segunda Farmacopéia Brasileira (Brandão et al., 2006).

É exigência da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução (RDC N° 48, 2004), que regula os medicamentos fitoterápicos, que para efeito de registro, se faz necessário a elaboração de um relatório de controle de qualidade, incluindo análises qualitativas e quantitativas dos princípios ativos e/ou marcadores, quando conhecidos, ou classes de compostos químicos característicos da espécie.

Sendo parte integrante da qualidade, a validação segundo normas da ANVISA (Resolução RE n° 899, 2003), tem como objetivo garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar especificidade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, exatidão, adequados à análise, demonstrando que o método é apropriado para a finalidade pretendida, ou seja, a determinação qualitativa, semi-quantitativa e/ou quantitativa de fármacos e outras substâncias em produtos farmacêuticos. O uso de ferramentas estatísticas adequadas, tais como teste T Student e teste F, análise de variância, regressão linear entre outras, estão indicadas para demonstração dessa evidência objetiva da validade do método (Barros, 2002).

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver e validar uma metodologia de doseamento para o extrato de Jalapa do Brasil a partir de método gravimétrico.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material

Foram coletadas amostras de *Operculina Macrocarpa* em São José de Espinhais no Estado da Paraíba, numa vegetação de caatinga, situada nas coordenadas: 06°50'50''S e 37°19'33''W. A responsável pela identificação da espécie foi a prof. Maria Bernadete Costa e Silva, a exsiccata se encontra depositada no IPA (Empresa Pernambucana de Pesquisa Agropecuária) sob n° de registro 66.300.

O material utilizado foi o extrato hidroalcoólico 50% de Jalapa do Brasil (*Operculina macrocarpa*),

clorofórmio (Nuclear®), citrato de potássio (Nuclear®), água destilada, acetato de etila (Nuclear®), propanol (Merck®), metaperiodato de sódio (Merck®), benzidina (Merck®), placas cromatográficas de gel de sílica Merck.

### Preparação do extrato de jalapa

Foram pesados 400 g de batata de purga secas e trituradas com tamanho de partícula entre 400 – 840 µm e transferidas para um percolador de aço inox onde foi submetida a um processo de maceração por 24 horas utilizando 2000 mL de solução hidroalcoólica 50%.

Este processo foi definido a partir de ensaios em diferentes condições, fazendo variar o tamanho de partículas, o tempo de maceração e a proporção de solução hidroalcoólica.

O método gravimétrico (Farmacopéia Brasileira 1ª ed., 1926) determina que sejam tomados 20 mL de extrato e transferidos para um funil de separação, em seguida adiciona-se 10 mL de clorofórmio, 12 g de citrato de potássio e 12 mL de água destilada, agita-se vigorosamente e deixa em repouso por 12 horas. Ocorre uma separação em duas fases: uma clorofórmica (superior) e uma aquosa (inferior). A fase inferior é descartada e a fase superior é transferida para uma cápsula previamente tarada e concentrada em banho-maria. O resíduo é seco a 100°C até peso constante.

Foi desenvolvida uma metodologia na qual o citrato de potássio foi retirado e a fase quantificada passou a ser a inferior. Também foi viabilizada uma redução no tempo de partição das fases que passou de 12 para 2 horas sem redução na capacidade de partição das duas fases. Esta avaliação ocorreu a partir da observação da qualidade da partição em diferentes tempos.

### Estudo da validação

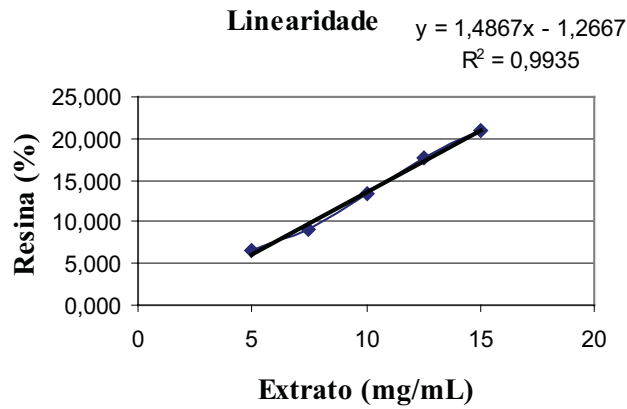
Os parâmetros avaliados foram a Robustez, Linearidade, Especificidade, Precisão, Limite de Detecção (LD), Limite de Quantificação (LQ) e Exatidão.

### Linearidade

A linearidade foi avaliada através do tratamento dos dados por regressão linear pelo método dos mínimos quadrados dos pontos médios de 3 (três) curvas de calibração autênticas, contendo cinco concentrações equivalentes a 5; 7,5; 10; 12,5 e 15 mg/mL da resina de Jalapa.

### Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção e o de quantificação foram calculados pela divisão do desvio padrão dos coeficientes



**Figura 1.** Curva de regressão linear obtida da média das três curvas de calibração autênticas.

**Tabela 1.** Resultados da análise de variância para linearidade

Fonte	SQ	gl	MQ	F	F-crítico
Modelo	414,4083	1	414,4083	946,52562	4,6672
Residual	5,6917	13	0,4378	Curva linear	
Falta de ajuste	2,6917	3	0,8972	2,9907	3,7083
Erro puro	3,0000	10	0,3	Não há falta de ajuste	
Total	420,1000	14	30,0071		

SQ = Soma Quadrática; gl = Graus de Liberdade; MQ = Média Quadrática

**Tabela 2.** Resultados da avaliação da robustez de acordo com ANOVA e teste *t* de Student

Parâmetros	Variáveis	Média	CV%	t cal	t crít	Fcal	Fcrít
Luz	Ausência	13,33	2,17	2,121	2,776	-	-
	Presença	12,83	2,25				
Citrato	Ausência	13,17	2,19	1,414	2,776	-	-
	Presença	12,83	2,25				
Tempo	12h	13,5	3,7	-	-	1,185	4,066
	6h	12,83	2,25				
	3h	13,17	4,38				
	2h	13,17	2,19				

lineares das três curvas de calibração do ensaio de linearidade pela média dos coeficientes angulares destas respectivas curvas e multiplicado por 3,0 e 10,0 respectivamente. (Resolução RE nº 899, 2003)

**Robustez**

A robustez do método avaliou as seguintes variáveis: presença ou ausência de citrato, presença ou ausência de luz e tempo de partição das fases. A avaliação

dos resultados foi realizada através da análise de variância *one-way* (ANOVA) e teste *t* de Student.

**Especificidade**

Foi avaliada a partir da análise do placebo solução hidroalcoólica 50% em cromatografia de camada delgada, utilizando como fase móvel: acetato de etila/propanol/água (5,7:3,2:1,3), fase fixa: placa cromatográfica de gel de sílica Merck e substância reveladora: metaperiodato

de sódio/benzidina

**RESULTADOS E DISCUSSÃO****Precisão**

A precisão foi avaliada nos níveis: repetitividade e precisão intermediária. A repetitividade foi determinada pela análise de seis amostras individuais (sextuplicata). A precisão intermediária foi determinada em dois dias por dois analistas diferentes.

A repetitividade foi expressa através do coeficiente de variação entre as amostras (CV) e a precisão intermediária, além do CV, foi avaliada pelo teste *t de Student*.

**Exatidão**

A exatidão do método foi avaliada a partir da análise de amostras em concentrações conhecidas do extrato de Jalapa equivalentes a 50, 100 e 150% da concentração teórica analisada. Os resultados foram avaliados através do teste *t de Student* pareado, comparando-se os resultados em relação ao valor teórico definido para cada concentração analisada.

Todas as análises foram realizadas em triplicatas e para cada parâmetro avaliado foram preparadas curvas controles diárias com as concentrações de 5, 10 e 15 mg/mL.

A partir do extrato fluido obtido e otimizado no processo, controlando-se as variáveis: tamanho de partícula, tempo de maceração e proporção da solução extrativa, foi desenvolvida e validada a metodologia analítica de tal maneira que o citrato de potássio, que tinha a função na metodologia de tornar a fase aquosa mais densa que a clorofórmica, foi retirado e a fase quantificada passou a ser a inferior.

O tempo de partição das fases (clorofórmica e aquosa) foi reduzido de 12 para 2 horas, na ausência de citrato.

A cápsula de porcelana e o banho-maria foram substituídos por placa de petri e chapa de aquecimento reduzindo, assim, o tempo de análise sem com isso prejudicar o teor do analito.

Com a retirada do citrato de potássio e a redução do tempo de partição, foram reduzidos os custos analíticos tornando a metodologia mais viável para aplicação na rotina industrial.

Para o parâmetro de linearidade, os resultados apresentados estão ilustrados (Figura 1) e demonstraram que o método é linear, tendo regressão linear estatística significativa, com equação da reta:  $Y = 1,4867(\pm 0,0521)X - 1,2667 (\pm 1,1073)$ , correlacionando concentração do extrato (X) e porcentagem de resina obtida (Y), onde  $R^2 = 0,9935$ , o que sugere que 99,35 % dos valores são

**Tabela 3.** Resultados da Repetitividade.

Concentração (ppm)						Média	D.P.	CV%
1	2	3	4	5	6			
13	13	14,5	13,5	14	14	13,67	0,61	4,43

**Tabela 4.** Resultados da precisão intermediária.

Dias	Analistas	Concentração (%)			Média	CV%
		1	2	3		
1º	I	13	13,5	13,5	13,33	2,16
	II	13	13,5	14	13,5	3,70
2º	I	14	14	13,5	13,83	2,09
	II	13	13	14	13,33	4,33

**Tabela 5.** Resultados do teste *t de Student* para precisão intermediária.

	t calc	t crít
Analistas 1 e 2 no 1º dia	0,500	
Analistas 1 e 2 no 2º dia	1,341	2,776
Analista 1 no 1º e 2º dia	2,121	
Analista 2 no 1º e 2º dia	0,377	

**Tabela 6.** Resultados da exatidão do método.

Concentração	t calc	t crít
50%	1,256	
100%	1,732	4,303
150%	1,844	



**Figura 2.** Visualização de Açúcares em Placa Cromatográfica de Gel de Sílica, eluída com Acetato de Etila/Propanol/Água (3,7:3,2:1,3) e revelada com Metaperiodato de Sódio/Benzidina.

1. Placebo-solução hidroalcolólica 50%

2. Extrato hidroalcolólico 50% de *Operculina macrocarpa*

explicados em torno da média, sendo minimizado os resíduos.

A partir da análise de variância (Tabela 1) podemos verificar a linearidade do método e a significância estatística da curva ajustada. As análises de variância dos dados demonstraram que o método é linear, na faixa de concentração testada (5 – 15 mg/mL) e que não há falta de ajuste do modelo com 95% de confiança.

Os limites de detecção (1,2816 mg/mL) e de quantificação (1,9418 mg/mL) obtidos de acordo com o tratamento descrito na RE nº 899, ANVISA, mostram que o método é bastante sensível à resina.

Os resultados da avaliação dos parâmetros da robustez foram avaliados por teste *t* de Student e análise de variância *one-way* e estão apresentados na tabela 2.

Como os valores calculados foram menores que os tabelados comprovou-se que não há diferença estatisticamente significativa entre variáveis dos diferentes parâmetros analisados, com um intervalo de confiança de 95%.

O método apresentou-se preciso nos dois níveis avaliados. A repetitividade realizada em sextuplicata com concentração a 100%, apresentou um coeficiente de variação (CV) de 4,43% inferior ao especificado pela Resolução vigente, que é de 5 % (Tabela 3).

Na precisão intermediária, não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significativas entre analistas e dias diferentes, empregando-se o teste *t* de Student, com 95% de confiança, como observado nas Tabelas 4 e 5, onde o  $t_{\text{calculado}}$  é inferior ao  $t_{\text{tabelado}}$ .

Na análise do placebo (solução hidroalcolólica 50%), não foi detectada a presença de açúcares característicos da resina da Jalapa comprovando-se a especificidade do método (Figura 2).

A exatidão do método foi comprovada pelo estudo de três concentrações diferentes (50%, 100%, 150%). Os resultados foram tratados pelo teste *t* de Student, o qual demonstrou que o  $t_{\text{calculado}}$  foi inferior ao  $t_{\text{tabelado}}$  comprovando que não houve diferença estatisticamente significativa entre os valores médios obtidos e os esperados das três concentrações analisadas, com um intervalo de 95% de confiança (Tabela 6). Para as concentrações de 50%, 100% e 150%, foram encontrados os respectivos percentuais de recuperação: 51,67%, 103,5% e 153,33%.

## CONCLUSÃO

O método apresentado foi desenvolvido e validado com a finalidade de disponibilizar uma metodologia alternativa para a quantificação da resina de *Operculina macrocarpa*. Os resultados obtidos mostram que o método atende aos requisitos de boas práticas de laboratório, pois apresenta a confiabilidade requerida para um método analítico.

Além de ser uma alternativa rápida, segura e de baixo custo para a rotina de uma indústria farmacêutica, evidencia a vital importância dessa ferramenta de qualidade no desenvolvimento de metodologias analíticas voltadas para a realidade de cada empresa no segmento de produtos fitoterápicos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem pelo financiamento à CAPES, PRONEX, CNPq e ao Laboratório Industrial Farmacêutico Sobral.

## REFERÊNCIAS

- Barros CB 2002. Validação de métodos analíticos, *Biológico* 64: 175-177.
- Brandão MGL, Cosenza GP, Moreira RA, Monte-Mor RLM 2006. Medicinal plants and other botanical products from the Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 16: 408-420.
- Cruz GL 1980. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 4 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, p. 104-105.
- Farmacopéia Brasileira 1ª ed., São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1926, p.535-536.
- Joly A 1975. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 2ª ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, p.574-576.
- Michelin DC, Salgado HRN 2004. Avaliação da atividade laxante de *Operculina macrocarpa* L. Urban (Convolvulaceae). *Rev Bras Farmacogn* 14: 105-109.
- Noda NM 1987, Resin glycosides I. Isolation and structure elucidation of orizabin-I, II, III and IV, genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. *Tetrahedron* 43: 3889-3902.
- Planchon L, Bretin P 1937. *Précis de matière médicale*. Paris: Librairie Maloine, p.1224-1235.
- RDC N° 48, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução, de 16 de Março de 2004. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DOU de 18/03/2004.
- Resolução RE N° 899, ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília DOU de 02/06/2003.
- Shellard EJ 1961. The chemistry of some convolvulaceous resins. I. Vera cruz jalap. *Chelsea Coll Sci Technol* 102-116.