

25 e Df 33-39 foram purificadas por recristalização em metanol.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq/IMSEAR e CAPES pelo apoio financeiro e ao Banco de Dados NAPRALERT, da Universidade de Illinois, USA, pelo levantamento bibliográfico.

Referências Bibliográficas

- ¹ Heywood, V.H. *Flowering plants of the world*. London: B.T. Batsford LTD, 1993.
- ² Kinghorn, A.D.; Balandrin, M.F.; Lin, L.J. Alkaloids of the Papilionoideae. *Phytochemistry*, v.21, p.2269-2275, 1982.
- ³ Braz-Filho, R.; Gottlieb, O.R.; Pinho, S.L.V.; Monte, F.J.Q.; Rocha, A.I. Flavonoids from amazonian leguminosae. *Phytochemistry*, v.12, p.1184, 1973.
- ⁴ Correia, M.P. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: IBDF/Ministério da Agricultura, 1984. vol VI
- ⁵ Almeida, J.R.G.S.; Silva, M.S.; Barbosa-Filho, J.M.; Cunha, E.V.L.; Braz-Filho, R.; Marques, A.S.; Zheng, C. The assignment of ¹H and ¹³C NMR spectra and X-ray crystallographic analysis of furanoflavan isolated from *Diploptropis ferruginea* Benth. *Annals of Magnetic Resonance* 2003 (submetido).
- ⁶ Razdan, T.K.; Harkar, S.; Qadri, B.; Qurishi, M.A.; Khuroo, M.A. Lupene derivatives from *Skimmia laureola*. *Phytochemistry*, v.27, p.1890-1892, 1988.

* Autor para correspondência

José Maria Barbosa Filho
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica,
Universidade Federal da Paraíba
CEP 58051-970 - João Pessoa - PB
jbarbosa@ltf.ufpb.br

Validação da metodologia de quantificação espectrofotométrica das saponinas de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen - Amaranthaceae

Vigo, C.L.S.²; Narita, E.²; Marques, L.C.^{1*}

¹Departamento de Farmácia e Farmacologia, Universidade Estadual de Maringá

²Bolsistas de iniciação científica

Resumo

Realizou-se validação analítica espectrofotométrica das saponinas totais das raízes de *Pfaffia glomerata*. Em testes iniciais utilizou-se saponina Merck em cinco concentrações (0,08-0,28 mg/ml) para obtenção da curva de calibração e verificação da linearidade, repetibilidade e reprodutibilidade. As raízes foram avaliadas em extratos hidroalcoólicos purificados com n-butanol. O reagente cromogênico escolhido foi Cloreto de Cobalto 0,2% em pico experimental em 284 nm. O tempo de leitura ideal foi de 10-20 minutos após o início da reação. O método mostrou linearidade para a faixa de concentrações utilizadas ($R^2 = 0,9963$). A precisão (coeficientes de variação) situou-se entre 7-12%, indicando boa reprodutibilidade. O limite de quantificação situou-se em 0,08 mg/ml e o limite de detecção em 0,02 mg/ml. A exatidão do procedimento forneceu erro relativo de 6,3; 3,4; 3,5; 1,8 e 0,3% para as concentrações utilizadas. Os dados da curva-padrão foram aplicados em várias amostras de raízes levando ao valor média de $13,5 \pm 2,0\%$. Os dados obtidos permitem a quantificação espectrofotométrica das saponinas totais das raízes de *P. glomerata*.

Abstract

Was made standardization for the spectrophotometric quantification method of *Pfaffia glomerata* roots saponins. The initial tests made use of Merck saponin, prepared in five different concentrations (0.08-0.28 mg/ml) for obtaining the calibration curve and

linearity; the tests with the roots were carried out with hydroalcoholic extracts purified with n-butanol. The chromogenic reagent was Cobalt chloride in the concentration of 0.2% and the scanning of 200 through 400 nm of wavelength led to a maximum absorption peak in 284 nm. The method showed linearity for the concentrations range used ($R^2=0.9963$). The precision (variance coefficients) was between 7 and 12% and the quantification limit was 0.08 mg/ml, and the detection limit 0.02 mg/ml. The accuracy of the proposed procedure presented relative error of 6.3; 3.4; 3.5; 1.8 and 0.3% for the concentrations used. The data from the standard curve were applied in some roots samples, leading to the values of total saponins average $13,5\pm 2,0\%$. The data obtained allow the spectrophotometric quantification of Merck saponin and the saponins from the *P. glomerata* roots.

As raízes de *Pfaffia glomerata*, denominadas como 'ginseng brasileiro', são empregadas na fitoterapia como medicamento de ação adaptógena². Quimicamente são ricas em saponinas triterpênicas, sendo a β -ecdisona seu principal componente. A confirmação dos seus efeitos positivos em aprendizagem e memória de animais e humanos, bem como sua baixa toxicidade crônica⁸, tem estimulado esforços na busca da sua validação científica como medicamento.

A quantificação de princípios ativos de espécies deste gênero vem sendo feita através de vários métodos, desde semiquantificações por métodos físico-químicos como o índice de espuma ou doseamento gravimétrico das saponinas totais⁹ até padronizações por cromatografia líquida de alta eficiência⁷. Embora esta última metodologia seja bem mais precisa que as outras disponíveis, o alto custo do equipamento, seus acessórios e padrões acabam por constituir-se em impedimento real para sua reprodutibilidade em escala comercial e industrial. Essa dificuldade estimulou a busca de métodos igualmente precisos e um pouco mais acessíveis em termos de custo e disponibilidade de equipamento.

Nesse contexto utilizou-se a técnica espectrofotométrica para a quantificação das saponinas triterpênicas das raízes de *P. glomerata*, buscando-se a realização da validação do método em atendimento às recomendações técnicas da área e às exigências da Resolução RE n° 899 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária¹.

Padronização da metodologia

Cloreto de cobalto diluído em água foi testado como reagente cromogênico de saponina padrão Merck

em diferentes concentrações (0,2%, 0,4%, 0,6%, 0,8%, 1,0%), definindo-se a solução a 0,2% como a mais apropriada na reação de complexação (saponina, cloreto de cobalto aquoso e ácido sulfúrico concentrado). O comprimento de onda estabelecido para a saponina padrão foi de 284 nm (Figura 1). O tempo ideal de leitura após a adição dos componentes foi verificado, encontrando-se um aumento da absorvância até 20 minutos, quando então se inicia uma fase de declínio (Tabela 1). Assim, definiu-se o tempo ideal de leitura como sendo de 10 a 20 minutos.

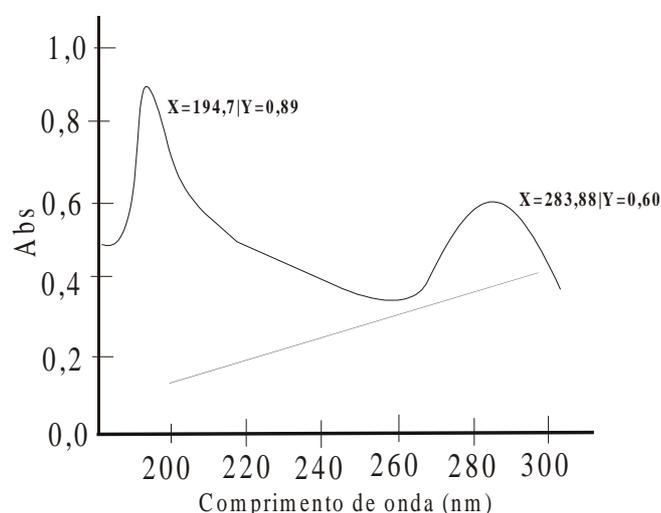


Figura 1. Varredura espectrofotométrica UV de solução aquosa de saponina Merck 0,3 mg/ml e cloreto de cobalto 0,2%

Tabela 1. Determinação do tempo ideal de leitura espectrofotométrica (N= 2)

| Tempo (min.) | Absorvância (nm) |
|--------------|------------------|
| 5 | 0,5990 |
| 10 | 0,6019 |
| 20 | 0,6050 |
| 30 | 0,5998 |
| 40 | 0,5969 |
| 50 | 0,5971 |
| 60 | 0,5944 |

Estabelecimento da curva-padrão

Foi preparada uma solução mãe de 1 mg/ml,

em triplicata, empregando-se a saponina padrão Merck. A partir desta preparou-se as concentrações de 0,08; 0,12; 0,16; 0,20 e 0,28 mg/ml e para cada concentração foram realizadas cinco leituras, calculando-se a média aritmética e o desvio de regressão linear das três soluções mãe. Os resultados obtidos constam da Figura 02.

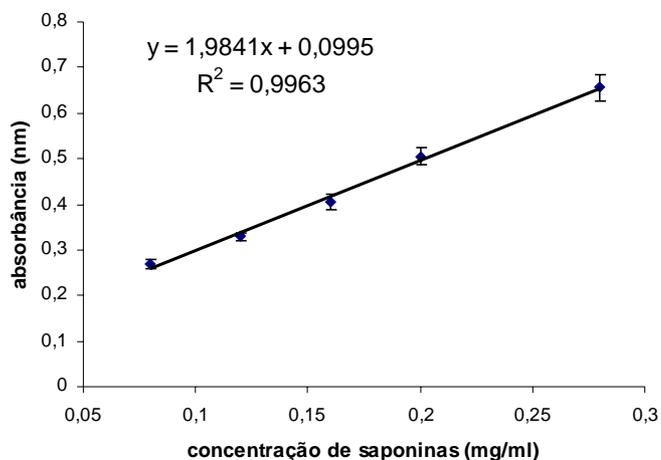


Figura 2. Curva de regressão linear (média \pm dp) com saponina Merck realizada nas concentrações de 0,08 a 0,28 mg/ml

Obteve-se uma reta linear com $R^2=0,9963$ confirmando-se a linearidade de leitura das concentrações adotadas, bem como a precisão do método verificada pelos coeficientes de variação encontrados (7-12%). A exatidão do procedimento proposto forneceu erro relativo de 6,3; 3,4; 3,5; 1,8 e 0,3% para as concentrações utilizadas.

Quanto aos outros parâmetros de validação, testes preliminares com concentrações menores que 0,08 mg/ml levaram a coeficientes de variação superiores a 20%, demonstrando que essa concentração corresponde ao limite de quantificação da técnica. Já o limite de detecção foi estabelecido na concentração de 0,02 mg/ml (concentração mínima que se diferencia do valor zero com determinada confiabilidade ¹).

Testes para a droga vegetal raízes de *Pfaffia glomerata*

Aplicou-se a técnica de extração e purificação das saponinas nas raízes coletadas em Maringá (lote 01, 02, 03, 04 e 05), Porto Rico (lote 06) e Querência do Norte (lote 07). A aplicação dos cálculos da curva-padrão para a absorbância do extrato total desses lotes de raízes produziu os valores de saponinas totais da droga vegetal, conforme apresentados na Tabela 03.

Tabela 3 . Valores de saponinas totais nas raízes de *Pfaffia glomerata*.

| | N | Absorbância | Concentração |
|--------|---|-------------|--------------|
| Lote 1 | 2 | 0,60 | 12,6 % |
| Lote 2 | 2 | 0,78 | 17,1 % |
| Lote 3 | 2 | 0,57 | 11,9 % |
| Lote 4 | 2 | 0,56 | 11,6 % |
| Lote 5 | 2 | 0,68 | 14,6 % |
| Lote 6 | 2 | 0,57 | 11,9 % |
| Lote 7 | 2 | 0,68 | 14,6 % |

Estes dados quantitativos evidenciam que as raízes de *P. glomerata* apresentam percentuais expressivos de saponinas totais - média de $13,5 \pm 2,0\%$, em quantidades similares às citadas por OLIVEIRA e colaboradores ⁹ para *P. paniculata* (11,1%). Em outro aspecto, considerando-se a saponina β -ecdisona como marcadora dessa droga vegetal, verifica-se que está presente em valores inferiores a 1,0 % ⁸; os dados quantitativos acima apresentados mostram que provavelmente outras saponinas devem ocorrer em maiores concentrações que esse marcador, o que estimula a realização de estudos fitoquímicos visando a sua identificação e quantificação na droga.

Dos vários lotes avaliados, o de número 2 apresentou maior a concentração das saponinas totais. Esse lote veio do município de Maringá, região de solo argiloso, e tal informação confirma dados de MAGALHÃES ⁷ que refere maior rendimento das saponinas dessa droga em solos argilosos ou mais férteis. De todo modo, indica-se a necessidade de avaliação quantitativa de lotes de outras regiões bem como coletados em diferentes estações, de modo a estabelecer-se adequadamente a possível variação sazonal e influência ambiental sobre os teores de saponinas totais dessa droga vegetal.

O método espectrofotométrico avaliado mostrou-se, portanto, adequado tanto à quantificação da saponina padrão quanto das saponinas das raízes de *P. glomerata*, podendo ser usado como técnica de controle de qualidade rotineira em laboratórios industriais fitoterápicos.

Material e Métodos

Identificação botânica: O material botânico foi coletado nas regiões de Porto Rico, Querência do Norte e Maringá (PR). A identificação foi feita pelo especialista

em *Amaranthaceae*, prof. Dr. Josafá Siqueira (PUC, Rio de Janeiro); exemplares dessa coleta foram depositados no acervo do Herbarium Friburgense (FCAB), sob o número 5426.

Análise espectrofotométrica: O estudo foi realizado de acordo com as recomendações da literatura^{4,10} empregando-se espectrofotômetro Shimadzu modelo UV-1601. A padronização avaliou o grupo químico predominante na droga vegetal (saponinas) e os reagentes cromogênicos citados na literatura para esse grupo^{5,6}. Utilizou-se na fase piloto uma saponina padrão (Merck) solubilizada em água, realizando-se testes com os reagentes cromogênicos, particularmente vanilina sulfúrica e cloreto de cobalto com ácido sulfúrico concentrado. Realizou-se a varredura de 200 a 400 nm de comprimento de onda no espectrofotômetro para o estabelecimento da melhor absorbância para leitura das saponinas, e avaliou-se a estabilidade da reação de complexação para definição do tempo ideal de leitura. A curva-padrão da saponinas Merck foi realizada em cinco concentrações: 0,08; 0,12; 0,16; 0,20 e 0,28 mg/ml.

Extração e purificação da fração saponina da droga vegetal: Foram pesados 0,2 g da droga pulverizada e desengordurados com 30 ml de hexano por 2 horas. Filtrou-se e secou-se o pó em estufa. O pó foi submetido à extração sob refluxo com três alíquotas de 20 ml de metanol-água (4:1) por 30 min. Filtrou-se e concentrou-se o extrato metanólico, extraindo-se com três porções de 20 ml de n-butanol saturado com água. Recolheu-se a fração butanólica que foi concentrada até a *secura*. Dissolveu-se o resíduo em 100 ml de água. A uma alíquota de 1 ml dessa solução foram adicionados 1 ml de cloreto de cobalto 0,2% e 1 ml de ácido sulfúrico concentrado. Realizou-se a leitura da solução em 284 nm para verificar a absorbância das amostras. Aplicou-se esta técnica aos diferentes lotes da droga vegetal, oriundos das cidades anteriormente citadas.

Validação da técnica: Aplicou-se, aos dados obtidos anteriormente, a avaliação dos parâmetros de precisão, exatidão, linearidade, limites de detecção e de quantificação, e estabilidade de acordo com as determinações legais. A precisão do método foi avaliada empregando cinco réplicas da solução padrão de saponina (dois analistas, dois dias diferentes).

Apoio: CNPQ e Universidade Estadual de Maringá - Programa de Iniciação Científica (PIBIC).

Referências Bibliográficas

¹Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 899 de 29.05.2003. Determina a publicação do "Guia para

validação de métodos analíticos e bioanalíticos". *Diário Oficial da União*, 02.06.2003.

²Carlini, E.A Efeito adaptógeno ou resistógeno de algumas plantas. *Medicamentos, drogas e saúde*. São Paulo: Hucitec/Sobravime, 1995.

³Carriconde, C. Acônito: *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen. De volta às raízes, v. 9, n. 46, p. 1-3, 1994.

⁴Clark, B.J.; Frost, T.; Russel, M.A. *Techniques in visible and ultraviolet spectrometry*. London, Chapman and Hall, 1993.

⁵Grebnyova, N.Y.; Kharitonova, N.P.; Blinova, M.P. Quality assessment of rhizomes and roots of *Polemonium caeruleum* L. in relation to total saponin content. *Rastit. Resur.*, v. 31, n. 3, p. 111-115, 1995.

⁶Hiai, S.; Oura, H.; Nakajima, T. Color reaction of some saponin and saponins with vanillin and sulfuric acid. *Planta Medica*, v. 29, p. 116-122, 1976.

⁷Magalhães, P.M. *Agrotecnologia para o cultivo da Pfaffia*. Campinas: CPQBA-UNICAMP, 1998.

⁸Marques, L.C. *Avaliação da ação adaptógena das raízes de Pfaffia glomerata (Sprengel) Pedersen - Amaranthaceae*. São Paulo, Escola Paulista de Medicina, 1998. Tese de doutorado em Psicobiologia

⁹Oliveira, F.; Akisue, G.; Akisue, M.K. Contribuição para o estudo farmacognóstico do "ginseng brasileiro" *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze. *An.Farm.Quim.S.Paulo*, v. 20, n. ½, p. 261-277, 1980.

¹⁰Watson, D.G. *Pharmaceutical analysis*. London: Churchill Livingstone, 1999.

* Autor para correspondência

Prof. Dr. Luís Carlos Marques
Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Farmácia e Farmacologia
Av. Colombo 5790 - bloco T22
CEP 87020-900, Maringá - PR
tel/fax (44) 263-6245
Email: lmarques@teracom.com.br