

**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 <sup>1</sup>H-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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.01 M), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (0.4%), and (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH (0.4%); pump B - methanol:aqueous (95:5) solution containing H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.05 M), H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (2%), and (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH (0.2%); pump C - acetonitrile:aqueous (90:10) solution containing H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.05 M) and H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (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.<sup>1</sup> Conhecida no Brasil como barbasco ou verbasco,<sup>2</sup> 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.<sup>3</sup> 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).<sup>1</sup>

Atualmente, um componente foi isolado dessa espécie, o fenilpropanoide verbascosídeo [2-(3,4-dihidroxifenil-etil)-1-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 → 3)- $\beta$ -D-(4-*O*-cafeil)-glucopiranosídeo], também conhecido como acteosídeo.<sup>4</sup> 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.<sup>5</sup> Outros estudos demonstraram que o verbascosídeo apresenta atividade antinociceptiva, sendo mais ativo que o ibuprofeno, e<sup>6</sup> também inibe a enzima prolil oligopeptidase (POP), uma protease que hidrolisa pequenos peptídeos com prolina.<sup>4</sup> 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.<sup>7</sup>

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.<sup>8</sup>

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 E<sub>2</sub>, 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.<sup>9</sup>

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<sup>o</sup>

\*e-mail: dani\_mso@yahoo.com.br

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.<sup>10</sup> 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.<sup>11</sup>

Existem várias literaturas, na área de medições químicas e recomendações publicadas por órgãos internacionais e nacionais, que exigem a validação de métodos analíticos.<sup>12</sup> 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.<sup>13</sup>

Dada a importância deste composto, o objetivo deste estudo foi realizar o isolamento e identificação da substância verbacosídeo 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.<sup>14</sup> 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., CHCl<sub>3</sub> 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 ressuspenso em MeOH e submetido à cromatografia em cromatoplaça de sílica, utilizando como fase móvel AcOEt, H-COOH e H<sub>2</sub>O (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 - H<sub>2</sub>O + 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, FB - ACN + 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 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 - H<sub>2</sub>O + 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, FB - ACN + 0,1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 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-<sup>1</sup>H e técnicas mono e bidimensionais, em CD<sub>3</sub>OD e temperatura ambiente.

O padrão de trabalho verbacosídeo 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 H<sub>2</sub>O. Os frascos 49 a 90 foram reunidos e injetados em coluna preparativa C18 (HPLC) no método: fase móvel A: H<sub>2</sub>O + 0,1% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 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 <sup>13</sup>C e <sup>1</sup>H.<sup>15</sup>

## 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,01 M, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,4% e (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH 0,4%; bomba B - MeOH: solução aquosa constituída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 M, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 2% e (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>NH 0,2%, na proporção de 95:5; bomba C - ACN: solução aquosa constituída de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,05 M e H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 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 (H<sub>2</sub>O + 2% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). 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.<sup>13</sup>

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

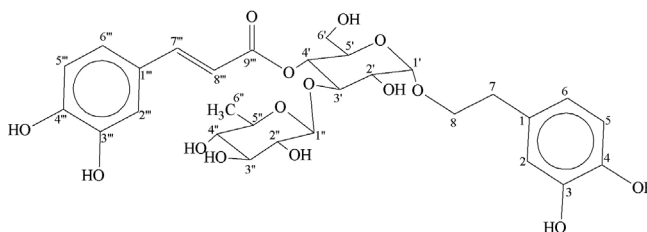
do analito adicionado à amostra e deve estar entre 95 e 105%.<sup>13</sup>

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

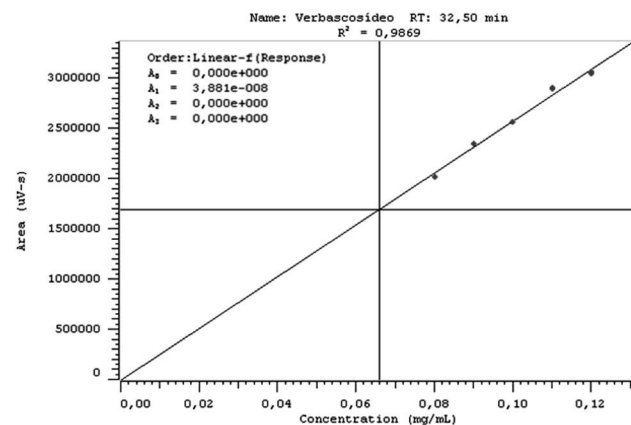
Os deslocamentos químicos e as constantes de acoplamento (*J*) obtidos do espectro de RMN <sup>1</sup>H demonstraram que o componente isolado é o verbascosídeo, Figura 1.



**Figura 1.** Estrutura do componente isolado verbascosídeo

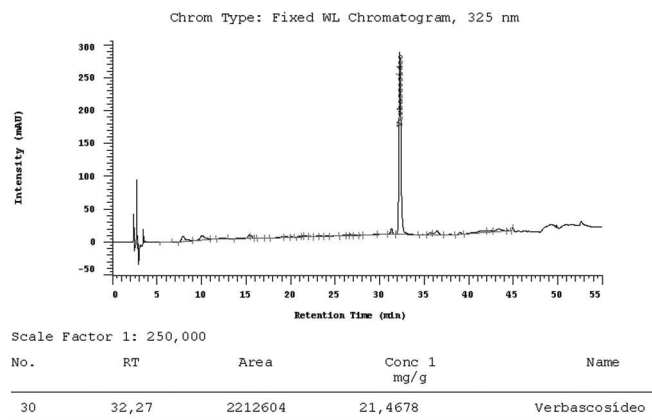
### Validação

A curva analítica do padrão de verbascosídeo apresentou-se linear na faixa de trabalho pretendida, com um coeficiente de determinação (*r*<sup>2</sup>) 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

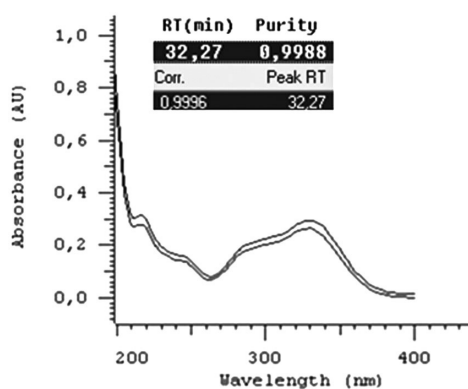


**Figura 3.** Concentração de verbascosídeo presente no extrato alcoólico bruto das partes aéreas de *Buddleja stachyoides*

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

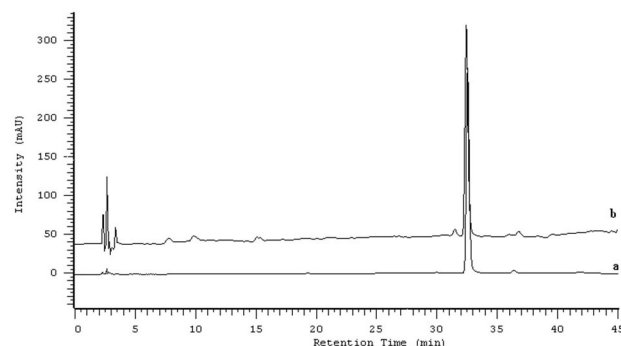
No ensaio de especificidade, foi injetado o álcool etílico hidratado de cereais 96 °GL no método desenvolvido para verificar a influência do excipiente, o qual não apresentou nenhum pico com o mesmo tempo de retenção que o verbascosídeo ou alguma semelhança com o padrão. Dessa forma, comprovou-se que 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%.<sup>13</sup>

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.<sup>11</sup> 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.<sup>12</sup>

## 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%
Linearidade	Fingerprint	Amostras com mesmo perfil cromatográfico
	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%
Robustez	Estabilidade da solução	
	pH e composição FM	DPR $\leq 5\%$
	Temperatura do forno	

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- $^1\text{H}$ , 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<sup>o</sup>. 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.