

Validação de metodologia analítica para quantificação de Boldina em um fitoterápico composto contendo *Peumus boldus* Molina e *Solanum paniculatum* L.

Luciene de Oliveira Morais¹, Jéssica Salvador Areias de Araújo² & Elizabeth Valverde Macedo³

¹Farmacêutica, Doutoranda da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

²Farmacêutica, Mestranda da Pós-Graduação do Instituto Nacional de Controle da Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ

³Docente e Vice-Diretora do Laboratório Universitário Rodolpho Albino – LURA, da Universidade Federal Fluminense - UFF

¹Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica – LAQFA. Estrada do Galeão, 4001 – Ilha do Governador, Rio de Janeiro. CEP:21.941-292. E-mail: lucieneom@yahoo.com.br, Tel./Fax +55-21-21017407

³Laboratório Universitário Rodolpho Albino – LURA. Rua Mário Viana, 523 – Santa Rosa, Niterói, RJ. CEP. 24241-002. E-mail: bethvalverde1@gmail.com, Tel./Fax +55-21-26299597

RESUMO

Com a aprovação no Brasil da Política Nacional de Plantas Nacionais e Fitoterápicos em 2006, as empresas produtoras foram estimuladas a desenvolver e comercializar medicamentos fitoterápicos, e conseqüentemente à validar as respectivas metodologias analíticas. Tais métodos validados contribuem para o alcance da confiabilidade dos resultados obtidos. Entre as plantas medicinais mais populares no Brasil se destacam o boldo (*Peumus boldus* Molina) e a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), indicado para tratamento de distúrbios digestivos. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi desenvolver e validar uma metodologia analítica empregada para a quantificação do marcador boldina presente em comprimido fitoterápico composto, que contém 10mg de extrato seco de boldo (*Peumus boldus* Molina) e 120mg de extrato seco de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). Inicialmente procedeu-se a extração ácido-base dos ativos, seguida da separação e quantificação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Os parâmetros determinados foram: especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez. Todos os resultados foram satisfatórios, e o método demonstrou-se adequado para a quantificação de boldina presente no comprimido fitoterápico composto, conforme guia para validação de métodos analíticos estabelecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA através da Resolução 899/2003.

Palavras-chave: *Peumus boldus*, CLAE, validação.

ABSTRACT

After approval in Brazil the National Domestic Plants and Herbal Policy in 2006, the production companies were required to research and produce herbal medicines and also perform validation of these analytical methodologies. Validated methods meet the requirements of applications, ensuring the reliability of the results. Among the most popular medicinal plants in Brazil we can highlights the Boldo (*Peumus boldus* Molina) and the Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), which are indicated for the treatments of digestive disorders. Thus, the aim of this study was to develop and validate an analytical methodology used to quantify the marker boldine in herbal tablets that contains 10mg of boldo dry extract (*Peumus boldus* Molina) and 120 mg dry extract of jurubeba (*Solanum paniculatum* L.). Initially we proceeded to extract the acid-base of assets, followed by separation and quantification by Liquid Chromatography of High Efficiency (HPLC). The parameters determined were: specificity / selectivity, linearity, range, precision, accuracy and robustness. All results were satisfactory, and the method was demonstrated suitable for quantification of this boldine in herbal tablets as established in guide for validation of analytical methods from National Health Surveillance Agency - ANVISA through Resolution 899/2003.

Keywords: *Peumus boldus*, HPLC, validation.

INTRODUÇÃO

Em 2006 o governo brasileiro, através do Ministério da Saúde, tornou oficial a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos levando em consideração a necessidade do reconhecimento da medicina tradicional como parte integrante dos sistemas de saúde do Brasil (Brasil, 2006). Entre as plantas medicinais mais populares no Brasil se destacam o boldo (*Peumus boldus* Molina) e a jurubeba (*Solanum paniculatum* L.).

A boldina ((S) – 2,9 – dihidroxi – 1,10 – dimetoxiaporfina) é um alcaloide extraído do boldo tradicionalmente indicado para distúrbios no sistema digestivo com comprovada ação antioxidante (Speisky & Cassels, 1994; Ruiz *et al.*, 2008; O'Brien, Carrasco-Pozo & Speisky, 2006; Klimaczewski *et al.*, 2014). Preparações a base de boldo já são descritas em compêndios oficiais como a Farmacopeia Brasileira (FB), assim como preparações com base na jurubeba, que também são utilizadas em distúrbios hepáticos e digestivos (Brasil, 2011; Nurit, Agra & Basílio, 2007).

Para garantir a eficácia destas formulações o controle de qualidade da indústria farmacêutica precisa utilizar métodos validados, capazes de garantir por meio de estudos experimentais o atendimento às exigências legais (Brasil, 2003), assegurando a confiabilidade dos resultados.

Orsi *et al.*, (1997) desenvolveram um método de análise de boldina em formulações farmacêuticas utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O método proposto para extração, separação, identificação e quantificação do ativo apresentou uma exatidão acima de 98%, porém, com uma variação de 6% nos ensaios de precisão.

Câmara *et al.*, (2010) determinaram quantitativamente o percentual de boldina em boldo por ensaio de voltametria cíclica. A validação do método proposto mostrou-se eficaz com custos reduzidos em comparação a metodologias CLAE.

Por último, Han *et al.*, (2008) desenvolveram uma metodologia de determinação simultânea de quatro alcaloides presentes em *Lindera aggregata* (boldina, noboldina, reticulina e linderegatina). O método proposto utilizou Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) acoplada a espectrômetro de massas e mostra-se eficiente para as determinações.

Desta forma o objetivo do presente trabalho foi desenvolver e validar uma metodologia analítica simples e de baixo custo empregada para a quantificação do marcador boldina presente em comprimido fitoterápico composto, indicado para o tratamento de distúrbios digestivos, que contém

10mg de extrato seco de boldo (*Peumus boldus* Molina) e 120mg de extrato seco de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), correspondente a 0,01mg de boldina e 4mg de solanina, respectivamente.

METODOLOGIA

Os materiais e reagentes utilizados foram: comprimidos do fitoterápico composto, contendo 10mg de extrato seco de boldo (*Peumus boldus* Molina) e 120mg de extrato seco de jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), correspondente a 0,01mg de boldina e 4mg de solanina, respectivamente, padrão primário de boldina (Chromodex), clorofórmio P.A, solução de ácido clorídrico 0,1M, hidróxido de amônio P.A, e solução de ácido fosfórico 0,1%. Os reagentes utilizados para a CLAE (acetonitrila, metanol e água purificada) apresentaram grau compatível com a técnica.

A extração do alcalóide foi feita por adição de ácido clorídrico 0,1M à amostra e posterior aquecimento a 80°C. A suspensão resultante foi filtrada, seguida de extrações do filtrado com clorofórmio. A fase clorofórmica foi reservada e ao meio aquoso foi adicionado hidróxido de amônio até alcançar pH 9. Após essa etapa foi feita nova adição de clorofórmio e a fase clorofórmica resultante, reunida com a anterior foi levada para rotovaporização. Após evaporação completa do clorofórmio o resíduo foi suspenso em metanol e estocado para análise.

A solução padrão de boldina foi preparada dissolvendo 10 mg do padrão primário em metanol obtendo uma solução padrão de 50µg/mL. A solução padrão foi sonicada por 5 min.

Os ensaios foram realizados utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE) da marca *Shimadzu* (Kyoto, Japão) série LC-20A, equipado com um controlador de bombas Série LC-20AT, injetor manual RHEODYNE 7725, degaseificador modelo DGU20A3, detector UV-VIS modelo SPD-20A, gerenciado pelo controlador CBM-20. No estudo foi utilizada a coluna *Hypersil* BDS RP-C18 de 250 mm de comprimento com 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula 5µm, a qual foi mantida a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). A fase móvel foi constituída de acetonitrila e solução de ácido fosfórico 0,1% (77:23 v/v) e filtrada por membrana 0,45µm. O fluxo do eluente foi de 2,1mL/min, sob condição isocrática. O volume de amostra injetada foi de 20µL. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 304nm.

Para a validação da metodológica foram respeitados os parâmetros de especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, exatidão e robustez.

A especificidade / seletividade foi determinada pela injeção do padrão, amostra, placebo e placebo fortificado com padrão na concentração de 10ppm utilizando os procedimentos de preparação e condições analíticas descritas para o composto em estudo. A amostra também foi submetida às condições de estresse. O critério de aceitação para este parâmetro foi a ausência de sinais analíticos nos tempos de retenção do analito e do padrão nas análises cromatográficas. Foram usados como agentes de degradação: a) a luz, através de exposição das amostras por 72 horas; b) o calor, através de aquecimento a 60°C pelo mesmo intervalo; c) hidrólise alcalina, através da adição de solução de NaOH 0,1M nas amostras; d) hidrólise ácida, através da adição de solução de HCl 0,1M nas amostras; e e) oxidação através da adição de H₂O₂.

A linearidade foi determinada através da construção de uma curva de calibração utilizando a solução padrão de boldina, nas concentrações de 40µg/mL, 45µg/mL, 50µg/mL, 55µg/mL e 60µg/mL, compreendendo o intervalo de análise de 80% a 120% de quantificação do valor rotulado no produto. Este parâmetro foi avaliado pelo coeficiente de correlação linear, entre as relações de áreas do ativo nos padrões e as concentrações correspondentes deste composto na curva de resposta. Para a elaboração da curva conjugada foram utilizadas as áreas individuais de injeções em triplicata. O critério de aceitação considerado foi $r \geq 0,99$, conforme preconizado na Resolução RDC 899/2003 da ANVISA.

O parâmetro precisão foi avaliado a partir da análise de 6 determinações de igual concentração teórica (10µg/mL), efetuadas em diferentes dias, analistas diferentes, porém com o mesmo equipamento. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR).

Para a determinação da exatidão, foram calculados os valores de recuperação em três faixas de concentração: baixa (80%), média (100%) e alta (120%). A recuperação foi determinada, através de análise em triplicata do placebo fortificado, e calculado considerando-se a concentração da solução-amostra (mg/mL). A recuperação foi obtida pelo cálculo da concentração percentual obtida em relação à concentração teórica do estudo.

A robustez do método cromatográfico foi determinada por análises das amostras em diferentes condições de temperatura (ambiente e 40°C) e diferentes lotes dos solventes. Os efeitos nos parâmetros tempo de retenção e área dos picos foram observados.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após a extração e as análises por CLAE, o cromatograma típico observado apresentou um sinal com tempo de retenção de 3,52 minutos referente à boldina, conforme ilustrado na Figura 1.

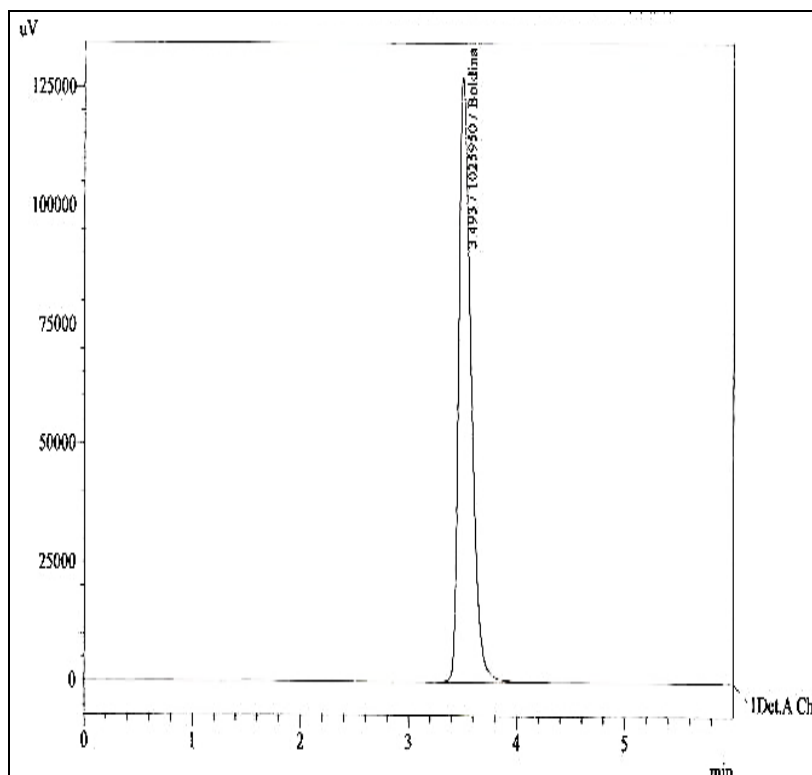


Figura 1 – Cromatograma típico das análises.

Especificidade / seletividade

Durante os ensaios observou-se que no comprimento de onda de 304 nm ocorreu maior absorção do analito. A fase móvel constituída por acetonitrila e solução de ácido fosfórico 0,1% (77:23 v/v), assim como o solvente metanol não apresentaram absorção neste comprimento de onda. A coluna *Hypersil* BDS RP-C18 de 250 mm de comprimento com 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho de partícula 5 μ m, foi a que proporcionou melhores parâmetros cromatográficos.

Nos cromatogramas resultantes das amostras contendo somente os componentes da matriz do comprimido, não foram observados sinais analíticos nos tempos de retenção da boldina, indicando ausência de interferentes detectáveis.

Quanto aos resultados do teste de estresse, estes demonstraram que nas amostras submetidas à hidrólise alcalina e hidrólise ácida não foram registradas degradações. A degradação das amostras submetida à luz, ao calor e ao agente oxidante foi inferior a 6,0%, e não foram observadas interferências detectáveis, o que demonstrou a estabilidade intrínseca do analito frente a condições extremas ao qual foi submetido.

O método proposto mostrou-se específico e seletivo para o marcador boldina, mesmo na presença de outros componentes da matriz do comprimido.

Linearidade e Intervalo

A curva analítica traçada, conforme visto na figura 2, por padronização externa para boldina, demonstrou excelente linearidade na faixa de 40-60 $\mu\text{g/mL}$ com coeficiente de correlação (r) de 0,9975. Isto demonstra a linearidade do método, pois obedece a uma correlação linear nos intervalos de concentração avaliados.

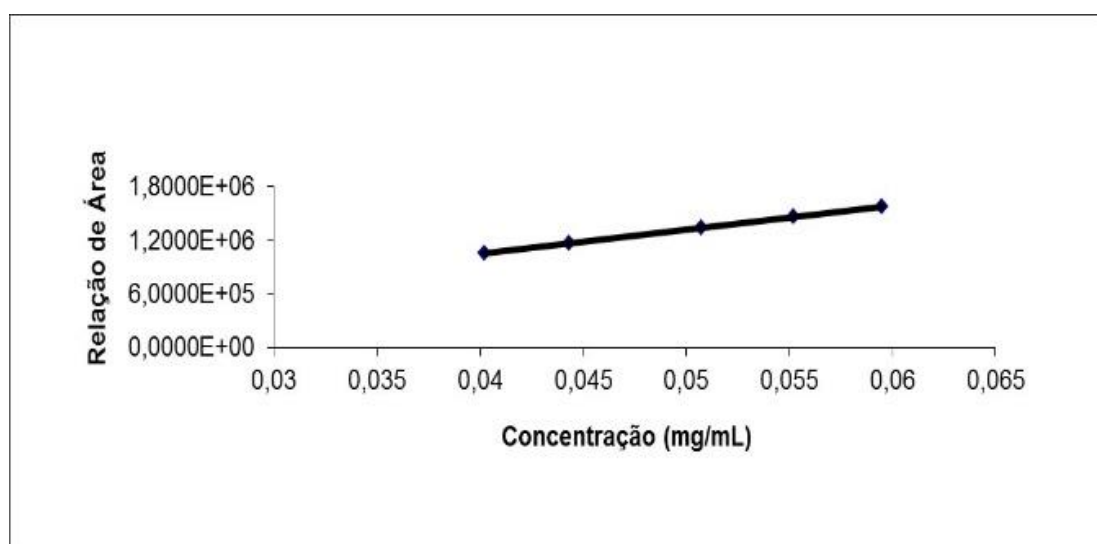


Figura 2 – Resultado dos ensaios de linearidade.

Exatidão

A exatidão foi avaliada por meio do percentual de recuperação utilizando o método de adição padrão. A média do percentual recuperado foi de 98,9% (baixa), 100,6% (média) e 100,4% (alta) em três níveis de concentrações e em triplicata. Como o resultado médio obtido para recuperação foi compreendido entre 90 e 110 % do valor teórico, o método foi considerado exato, evidenciando a consistência do mesmo. O ótimo fator de recuperação do analito pode ser explicado

por meio das condições otimizadas do processo de extração, tais como, escolha do solvente extrator, temperatura e tempo.

Tabela 1 – Resultado dos ensaios de exatidão.

Nível de Concentração	Concentração Teórica (mg/mL)	Relação de Área	Concentração Obtida (mg/mL)	Recuperação (%)	Média das Recuperações (%)
Baixa	0,0401	1043341	0,0397	99,0%	98,9%
		1071488	0,0407	101,5%	
		1013286	0,0386	96,2%	
Média	0,0504	1347067	0,0506	100,3%	100,6%
		1339225	0,0504	100,0%	
		1360380	0,0511	101,4%	
Alta	0,0594	1596723	0,0597	100,5%	100,4%
		1594512	0,0596	100,3%	
		1594405	0,0596	100,3%	

Precisão

A precisão do método foi analisada por meio das determinações de repetibilidade (intra-corrída) e precisão intermediária (inter-corrídas) da solução extrativa. Para avaliar a repetibilidade analítica da metodologia empregada na análise, foram preparadas 6 amostras que foram injetadas em triplicata no mesmo dia, nas mesmas condições cromatográficas e pelo mesmo analista. As respostas foram expressas como desvio padrão relativo (DPR). Para avaliar a precisão intermediária, utilizou-se o mesmo procedimento anterior e instrumento analítico, repetindo os ensaios com analista em dias diferentes. Segundo a RE 899/2003 - ANVISA (Brasil, 2003), o valor máximo aceitável deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, concentração do analito na amostra, tipo da matriz, não se admitindo valores maiores que 5%.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos nesta análise. O desvio padrão relativo (DPR) encontrado foi de 1,45%, demonstrando boa precisão nas análises para quantificação de boldina, visto que os valores de DPR estão abaixo dos critérios aceitáveis pela legislação vigente (Brasil, 2003).

Tabela 2 – Resultado dos ensaios de precisão.

Replicata	Relação de Área	Concentração Obtida (mg/cpo)	DPR (%)
1	1460480	0,0096	1,45%
2	1406805	0,0092	
3	1451031	0,0095	
4	1461333	0,0096	
5	1431554	0,0094	
6	1448083	0,0095	
1	1460019	0,0096	1,45%
2	1427531	0,0094	
3	1435475	0,0094	
4	1470425	0,0096	
5	1438690	0,0094	
6	1447233	0,0095	

Robustez

Os testes de robustez, em geral, servem para indicar os fatores que podem interferir, significativamente, na resposta do método utilizado. Tal fato fornece a dimensão do problema que ocorre quando o método é repetido em diferentes condições ou é transferido, por exemplo, para outro laboratório ou equipamento. No teste de robustez foram feitas variações dos parâmetros de temperatura e lotes dos solventes utilizados. Como resposta observou-se que estes parâmetros não alteraram de forma significativa os valores de área sob a curva das amostras que continham boldina na concentração de 10µg/mL, diluídas com metanol. As quantificações realizadas mantiveram-se na faixa de aceitação (90-110% do valor rotulado) mesmo variando-se temperatura e lotes dos solventes utilizados, demonstrando que o método é robusto nas condições avaliadas.

Comparando-se o método apresentado neste estudo aos desenvolvidos por Orsi *et al.*, (1997), Câmara *et al.*, (2010), Han *et al.*, (2008) e o inscrito na Farmacopeia Brasileira (2010) pôde-se verificar que somente o de Orsi *et al.*, (1997) e o da Farmacopeia Brasileira (2010) empregaram CLAE. O método desenvolvido por Câmara *et al.*, (2010) utilizou voltametria cíclica e o de Han *et*

al., (2008) a CLUE. Assim, verificou-se que os três métodos que utilizaram métodos cromatográficos líquidos realizaram as leituras no comprimento de onda 304nm, o que significa que todos analisaram a mesma emissão oriunda da boldina. Quanto aos sistemas cromatográficos somente Orsi *et al.*, (1997) empregou método com gradiente de polaridade. Os demais operaram métodos isocráticos, inclusive o apresentado neste estudo. Quanto às colunas cromatográficas utilizadas todas foram de fase reversa. Orsi *et al.*, (1997) empregou uma RP-C8 e a Farmacopeia Brasileira (2010) uma RP-C18. Neste estudo foi utilizada uma RP-C18. Quanto às fases móveis escolhidas e aos fluxos implementados, estes fatores são diretamente relacionados aos componentes presentes na amostra analisada porque por meio deles é possível alcançar a resolução dos sinais. O que há de comum em todos os métodos cromatográficos líquidos observados é o caráter ácido da fase móvel, em torno de pH 3,0. No método da Farmacopeia Brasileira (2010), que é aplicável à droga *Peumus boldus* Molina verificou-se que o ácido empregado foi o ácido fórmico, enquanto que no método de Orsi *et al.*, (1997) utilizou-se solução de perclorato de sódio. No presente trabalho foi utilizado o ácido fosfórico.

Diante do exposto, observou-se que a fundamentação teórica foi a mesma nos diversos sistemas cromatográficos líquidos apresentados. De modo global, quando comparado o presente método aos anteriormente já desenvolvidos e também validados observaram-se diferenças que retratam a necessidade da adequação do método analítico ao produto farmacêutico analisado. Portanto, não há melhor ou pior método analítico. Espera-se sempre um método analítico adequado ao material a ser analisado e que atenda aos requisitos apontados como imprescindíveis para o desenvolvimento da validação do referido método. No Brasil, atualmente a norma que apresenta o Guia para realização de estudos de validação de métodos analíticos é a RE 899/2003 – ANVISA.

CONCLUSÃO

A metodologia analítica desenvolvida para quantificação de boldina presente em comprimido fitoterápico composto contendo *Peumus boldus* Molina e *Solanum paniculatum* L. utilizando cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) mostrou-se satisfatória sendo específica, seletiva, linear, exata, precisa e robusta, portanto, atendendo as exigências requeridas na validação. A Tabela 3 mostra de forma sucinta os resultados obtidos e os critérios utilizados.

Tabela 3 – Sumário dos parâmetros de aceitação e valores encontrados.

Parâmetros	Crêterios de Aceitaçãõ	Resultados para o Ativo Boldina
Linearidade	$r \geq 0,99$	0,9975145
Especificidade/ Seletividade	Ausência de Interferências detectáveis no tempo de retenção do analito	Passa o teste
Exatidão	Recuperaçãõ de 90,0% a 110,0%	Baixa: 98,9% Média: 100,6% Alta: 100,4%
Repetibilidade (intra-cõrridas)	DPR < 5,0 %	1,45%
Repetibilidade (inter-cõrrida)	DPR < 5,0 %	1,45%
Estabilidade	0,90-1,10	1,01
Robustez	Recuperaçãõ de 90% – 110%	Temperatura : 95,1% Lote Diferente: 99,6%

Sendo assim, conclui-se que a metodologia analítica apresentada foi validada por atender aos requisitos da RDC 899/2003 – ANVISA. Tal metodologia pode e deve ser utilizada na quantificaçãõ do marcador boldina presente em comprimido fitoterápico composto contendo *Peumus boldus* Molina e *Solanum paniculatum* L.

REFERÊNCIAS

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União: Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1.

Brasil. Decreto n°5.813 de 22 de junho de 2006. Diário Oficial da União: Poder Executivo, Brasília, DF, 23 jun. 2006. Seção 1, p. 2.

Brasil. Farmacopéia Brasileira. 5.ed. Brasília: Anvisa, 2010. v. 2, 899p.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

Câmara CI, Bornancini CA, Cabrera JL, Ortega MG, Yudi LM. Quantitative analysis of boldine alkaloid in natural extracts by cyclic voltammetry at a liquid-liquid interface and validation of the method by comparison with high performance liquid chromatography. *Talanta*. 83(2): 623-630, 2010.

Han Z, Zheng Y, Chen N, Luan L, Zou, C, Gan L, Wu Y. Simultaneous determination of four alkaloids in *Lindera aggregata* by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1212(1-2): 76-81, 2008.

Klimaczewski CV, Saraiva RA, Roos DH, Boligon A, Athayde ML, Kamden JP, Barbosa NV, Rocha JBT. Antioxidant activity of *Peumus boldus* extract and alkaloid boldine against damage induced by Fe(II)-citrate in rat liver mitochondria *in vitro*. *Industrial Crops and Products*. 54: 240-247, 2014.

Nurit K, Agra MF, Basílio IJLD. Estudo farmacobotânico comparativo entre *Solanum paniculatum* L. e *Solanum rhytidoandrum* Sendtn.(Solanaceae). *Rev. Bras. Bioci.* 5(1):243-245, 2007.

O'Brien P, Carrasco-Pozo C, Speisky H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*, 159(1): 1-17, 2006.

Orsi D, Gagliardi L, Manna F, Tonelli D. HPLC analysis of boldine in pharmaceuticals. *Chromatograp.* 44 (11-12): 619-622, 1997.

Ruiz ALTG, Taffarello D, Souza VHS, Carvalho JE. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Braz. J. Pharmacogn.* 18(2): 295-300, 2008.

Speisky H & Cassels BK. Boldo and boldine: and emerging case of natural drug development. *Pharmacol. Res.* 29 (1): 1-12, 1994.