

VALIDAÇÃO DA DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE QUERCETINA EM EXTRATOS VEGETAIS
PETROVÍCK, P.R.; KNORST, M.T.
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO
SUL, PORTO ALEGRE, RS, BRASIL.

INTRODUÇÃO: A utilização de extratos vegetais quer como forma farmacêutica quer como produto intermediário para a obtenção de formas derivadas deve obedecer os critérios de qualidade pré-estabelecidos para os métodos e operações. Dentre estes, a avaliação quantitativa, muitas vezes, é dificultada devido às limitações metodológicas (2) as quais podem ser observadas, por exemplo, na quantificação de determinada classe de substâncias. Embora preconizada na literatura (1), não reflete a concentração real dos componentes da classe, pois estes apresentam diferentes valores de máximos de absorvância. Face às limitações deste procedimento é preconizada a quantificação de uma ou mais substâncias-referência presentes nos extratos, preferencialmente majoritárias, as quais podem ou não, apresentar atividade farmacológica (2, 3, 4, 5).

Neste trabalho, para a determinação quantitativa de quercetina foi utilizada como droga modelo Achyrocline satureioides (Lam.) DC. Asteracea e como método de avaliação, cromatografia em papel associada a espectrofotometria no ultravioleta (Método CP/UV) (6). Para verificar a segurança do método foram avaliadas as influências do tempo de extração e do suporte cromatográfico no procedimento de quantificação utilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

O material vegetal foi coletado no município de Guaporé (RS) em março de 1988. Sua identificação foi realizada pela Prof. Lilian Auler Mentz, do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da UFRGS. As sumidades floridas foram separadas manualmente e secas ao abrigo da luz solar direta, à temperatura ambiente ($30^{\circ}\text{C}\pm 2$) e umidade relativa do ar entre 65-72%. A droga foi reduzida em moinho de martelos, dotado de tamis com abertura de malha de 7mm. Os extratos hidroalcoólicos foram preparados por maceração de acordo com as condições propostas por SONAGLIO (1987).

Para a determinação quantitativa foi aplicado $100,0\mu\text{l}$ de extrato sobre papel de filtro comum ($81,21\text{g}/\text{m}^2$) numa linha de 5cm. O cromatograma foi desenvolvido em câmara saturada até altura de 16cm, sendo utilizado como eluente ácido acético a 40% (V/V). A zona correspondente a quercetina foi recortada do cromatograma, picotada e tratada com 5ml de metanol, sob refluxo em banho de água. Após resfriamento, a solução foi transferida para balão volumétrico de 10ml completando-se o volume com o mesmo solvente e procedendo-se leitura das absorvâncias em espectrofotômetro de ultravioleta a 255nm.

Para a obtenção da curva padrão efetuou-se procedimento idêntico para soluções metanólicas de quercetina nas concentrações de 0,20; 0,40; 0,60; 0,80; 1,00 e 1,20mg/ml.

Paralelamente, para a obtenção da curva padrão diretamente por ultravioleta determinaram-se as absorvâncias das soluções metanólicas de quercetina no mesmo comprimento de onda.

A concentração de quercetina foi calculada utilizando-se a equação (1):

$$\text{CQ} = \frac{A - a}{b} \cdot \text{Fd} \quad (\text{equação 1})$$

Onde: CQ = Concentração de quercetina ($\mu\text{g/ml}$);
 A = Absorvância;
 a = intersecção com o eixo y;
 b = inclinação da reta;
 Fd = Fator de diluição.

Os resultados correspondem a média de três determinações. Para a validação do método CP/UV forma analisados estatisticamente os valores das absorvâncias do padrão.

A influência do tempo de extração, sob refluxo, foi verificada submetendo-se solução metanólica de quercetina 1,20 mg/ml ao procedimento acima descrito, durante 15, 30, 45 e 60 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da influência do tempo de extração sob refluxo demonstra que não houve diferença significativa entre os valores de absorvância obtidos.

As curvas-padrão de quercetina através do ultravioleta direto (UV direto) e CP/UV apresentaram linearidade entre absorvância e concentração na faixa de 2,00 a 12,00 $\mu\text{g/ml}$. As retas obtidas apresentaram inclinações aproximadas diferenciando-se quanto a seus pontos de intersecção com o eixo das absorvâncias (Figura 1). O maior distanciamento da origem para a reta correspondente ao método CP/UV poderia estar relacionado com a existência de algum fator de interferência.

Analisando-se os valores das absorvâncias obtidas através das duas técnicas de quantificação observa-se que houve correlação altamente significativa entre as mesmas. O fator de relação de 1,022 (Figura 2) poderia ser interpretado, a primeira vista, como eficiência total no método indireto de quantificação. Uma avaliação mais criteriosa demonstrou, no entanto, que os valores obtidos no método CP/UV foram influenciados pela absorção, no ultravioleta, dos componentes do papel.

Devido a esta interferência procedeu-se ao cálculo do fator de correção. O mesmo foi baseado nos valores de absorção da curva padrão de quercetina por UV direto e curva padrão corrigida (CP/UV-B). Esta última apresentou valores inferiores aos obtidos anteriormente pelo método CP/UV, mantendo porém, linearidade entre absorvância e concentração (Figura 1).

Comparando-se as retas obtidas por UV direto e CP/UV-B, nota-se uma diminuição média de 18,65% nos valores obtidos pela curva padrão corrigida (Figura 2). Esta diferença foi independente da concentração de quercetina e pode ser atribuída principalmente à absorção do suporte cromatográfico.

A mesma deve ser incluída nas equações do cálculo do teor de quercetina sob a forma de fator de correção:

$$CQ = \frac{(A \cdot Fc) - a}{b} \cdot Fd \quad (\text{equação 2})$$

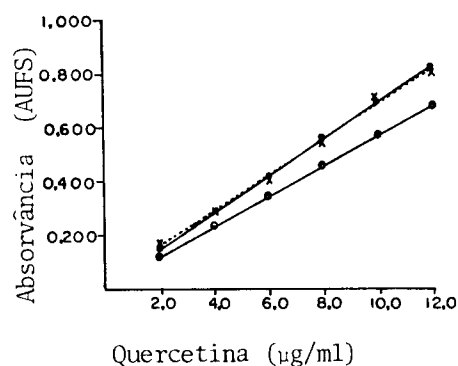


FIG. 1 - Curvas-padrão de quercetina 255nm.

(●—●) UV direto,
 (*—*) CP/UV,
 (○—○) CP/UV-B

Para avaliação da reprodutibilidade do método, a concentração de quercetina foi determinada em sete séries de macerados partindo-se da mesma matéria-prima. Os resultados obtidos não diferiram significativamente entre si ($\alpha \leq 0,01$) e apresentaram valor médio de $0,47\text{mg/ml} \pm 0,004$ ($n = 3$).

CONCLUSÕES

O método de cromatografia em papel associado a espectrofotometria no ultravioleta (CP/UV) mostrou-se viável e reprodutível na quantificação de quercetina presente em extratos hidroalcoólicos de Achyrocline satureioides.

Não houve influência do tempo de extração sobre os valores de absorvância da quercetina.

O tratamento de 15 minutos, sob refluxo em banho de água, mostrou-se suficiente para a completa extração de quercetina do suporte cromatográfico.

A absorção do suporte cromatográfico, no ultravioleta, precisa ser levada em consideração quando da utilização deste método de quantificação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BUNDESVEREINIGUNG DEUTSCHER APOTHEKERVERBAENDE, ed. Deutscher Arzneimitel - Codex 1986. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, 1986. v.2: Holunderblueten, supl.81, p.1-3.
2. HALBACH, G. Grenzen der Analytik pflanzlichen Arzneibereitung. Deutsche Apotheker Zeitung, v.123, n.14, p.668-671, 1983.
3. KOPANSKI, L. Referenzsubstanzen. In: HARNISCHFEGGER, G. Qualitätskontrolle Von Phytopharmaka. Stuttgart: Georg Thieme, 1985. cap.2, p.48-55.
4. LIST, P.H., SCHMIDT, P.C. Technologie pflanzlicher Arzneizubereitungen. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1984. p.56-57.
5. MENSSEN, H. G. Standardisierung Von Phytopharmaka. Deutsche Apotheker Zeitung, v.121, n.4, p.1255-1259, 1981.
6. SONAGLIO, D. Padronização de Extrato Hidroalcoólico das Sumidades Floridas de Achyrocline Satureioides (Lam.) DC - Compositae (marcela). Porto Alegre: Curso de Pós-graduação em Farmácia da UFRGS, 1987. 163f. Dissertação. (Mestrado em Farmácia).

(CNPq/FAPERGS)

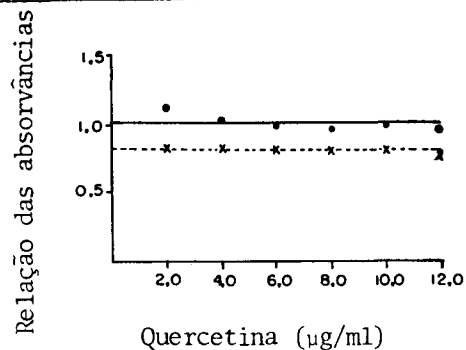


FIG. 2 - Relação entre as absorvâncias do padrão de quercetina por UV direto e CP/UV (●—●) e por UV direto e CP/UV-B (x---x).