

Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem

Adriana de Carvalho Osório e Jorge Luiz Seferin Martins*

Laboratório de Controle de Qualidade Físico-químico de Medicamentos e Cosméticos, Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

***Correspondência:**

J. R. S. Martins
Departamento de Farmácia
Laboratório de Controle de Qualidade
Físico-químico de Medicamentos e
Cosméticos
Faculdade de Ciências Farmacêuticas –
USP
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13
05508-901 – São Paulo - SP
E-mail: adriana.osorio@bol.com.br

O objetivo do trabalho foi desenvolver um método de doseamento de cumarina (1,2-benzopirano) em extrato fluido e tintura de guaco (Mikania glomerata Sprengel). O método desenvolvido foi por espectrofotometria derivada de primeira ordem, que se mostrou preciso, exato, reprodutível e de fácil execução.

Unitermos:

- Mikania glomerata
- Guaco
- Cumarina
- Espectrofotometria derivada
- Extrato fluido
- Tintura

INTRODUÇÃO

O guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) é uma planta medicinal brasileira empregada em medicamentos para tosse e problemas respiratórios (Panizza, 1997). Encontra-se comercializado, principalmente nas formas farmacêuticas de extrato fluido, tintura e xarope. Esta planta tem uso muito difundido, sendo usada pelos índios para picada de cobra e, até hoje, é amplamente utilizada na medicina popular como remédio para aliviar tosse, bronquite e resfriado (Di Stasi *et al.*, 1994; Panizza, 1997).

Das atividades farmacológicas atribuídas à *Mikania glomerata* Sprengel, Oliveira *et al.* (1985) constataram a ação antiinflamatória do extrato fluido através do teste da atividade antiedema em pata do rato, induzida por carragenina e quantificada por pletismografia. Os resultados obtidos apresentaram aumento do volume percentual da pata de 75,4%, após 300 minutos e de 81,6%, comparando com o grupo controle. Essas inibições foram ligeiramente menores do que a produzida por fenilbutazona.

Leite *et al.* (1993) estudaram de modo comparativo os efeitos do extrato hidroalcoólico da *Mikania glomerata* Sprengel em relação aos produzidos pela cumarina (1,2-benzopirano) encontrada na planta, submetendo a ensaios *in vivo* (edema de pata induzido pela carragenina em rato) e *in vitro* (preparações de jejuno de rato, íleo de cobaia e

traquéia de rato utilizando acetilcolina e histamina como agonistas). Os resultados mostraram efeitos espasmolítico, antiinflamatório e broncodilatador do extrato e, também, da solução de cumarina. A diferença na intensidade dos efeitos farmacológicos observados indica que a cumarina contribuiu para o efeito farmacológico juntamente com outras substâncias químicas presentes no extrato.

Ruppelt *et al.* (1991) estudaram a atividade analgésica e antiinflamatória do chá de guaco, usando os respectivos ensaios de número de contorções em camundongos e difusão do corante azul de Evans no peritônio, segundo a técnica de Whittle modificada por Fernandes. O grupo de camundongos que ingeriu o chá de guaco apresentou inibição de contorções de 63,1% e difusão do corante de 48,92%, em relação ao grupo controle. Esses resultados indicam que o guaco demonstra atividade analgésica e em menor intensidade atividade antiinflamatória.

Pereira *et al.* (1994) estudaram a atividade antifídica da cumarina extraída da *Mikania glomerata* Sprengel frente ao veneno da jararaca (*Bothrops jararaca*). A sobrevivência dos animais foi avaliada em 6, 24 e 48 horas e registrada em porcentagem de animais vivos. A cumarina apresentou taxas de sobrevivência de 80%, 50% e 40%, respectivamente aos intervalos de 6, 24 e 48 horas, enquanto, o grupo controle apresentou para os mesmos intervalos taxas de 30%, 0% e 0% de sobrevivência, respectivamente.

Fierro *et al.* (1999) avaliaram frações obtidas do extrato etanólico de *Mikania glomerata* Sprengel para as propriedades antialérgica e antiinflamatória, no qual se obtiveram resultados que sugeriram que as frações estudadas são efetivas na inibição da inflamação imunológicas.

O estudo químico do guaco mostra as seguintes substâncias isoladas: cumarina (1,2-benzopirano), ácido caurenóico, ácido cinamolglandiflóroco, estigmasterol, friedelina, e lupeol (Oliveira *et al.*, 1984; Vilegas *et al.*, 1995; Veneziani *et al.*, 1999).

A cumarina (1,2-benzopirano) foi escolhida como substância marcadora por ser um dos constituintes majoritários do vegetal e contribuir para o efeito farmacológico (Leite *et al.*, 1993).

O objetivo deste trabalho foi desenvolver um método de doseamento de cumarina (1,2-benzopirano) por espectrofotometria derivada em extrato fluido e tintura de guaco, contribuindo para o controle de qualidade desta droga.

MATERIAL E MÉTODOS

Material botânico

As partes aéreas do vegetal foram fornecidas pelo Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Unicamp. A planta foi identificada segundo a descrição da Farmacopéia Brasileira 1ª ed. (Silva, 1929) e pulverizada.

Preparação de extratos

Extrato fluido e tintura foram preparados de acordo com a Farmacopéia Brasileira 1ª ed. (Silva, 1929). O líquido extrator utilizado foi álcool/água (2:1) (Lucas, 1942).

Solução do padrão de cumarina

Foi dissolvido 0,1 g de cumarina (1,2-benzopirano) em 5 mL de etanol em balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com água destilada (1 mL = 2 mg de cumarina).

Construção da curva de calibração do padrão de cumarina

Foram transferidos alíquotas da solução padrão de cumarina de 1,0 mL, 1,5 mL, 2,0 mL, 2,5 mL, 3,0 mL, 3,5 mL, 4,0 mL, 4,5 mL, 5,0 mL, 5,5 mL e 6,0 mL para balões volumétricos de 100 mL. A cada balão adicionaram-se, aproximadamente, 20 mL de água destilada e 5 mL de acetato de chumbo 5%. Completou-se o volume com água destilada. Filtrou-se, desprezando os primeiros 10 mL,

transferiu-se uma alíquota de 10,0 mL do filtrado para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com solução de HCl 0,1 M. A leitura da absorbância na derivada de primeira ordem de cada solução foi efetuada a 320 nm, em Espectrofotômetro Shimadzu 1601 UV-Visível, pela técnica de *zero-crossing*. Empregou-se como branco a solução de HCl 0,1 M.

Aplicação do método para extrato fluido e tintura de guaco

Alíquotas de 2,0 mL de extrato fluido e 5,0 mL de tintura foram transferidas, respectivamente, para balões volumétricos de 100 mL e prosseguiu-se de acordo com o procedimento utilizado na curva de calibração do padrão. As leituras das absorbâncias na derivada de primeira ordem foram efetuadas a 320 nm, comparando-se com solução padrão de cumarina a 12 µg/mL. Foram feitas 10 determinações de cada uma das amostras para avaliação do desvio padrão relativo. Para extrato fluido foram repetidas 5 determinações após 2 semanas e mais 5 determinações após 4 semanas.

Teste de recuperação

Adicionou-se a determinada quantidade de extrato fluido quantidade de solução padrão de cumarina (2 mg/mL) na seguinte proporção: I - 1,0 mL da solução padrão de cumarina + 2,0 mL do extrato fluido, II - 2,0 mL de solução padrão de cumarina + 2,0 mL de extrato fluido. O teste foi feito em duplicata, de acordo com o procedimento utilizado na preparação da curva de calibração do padrão. O cálculo para obtenção da porcentagem de recuperação foi determinado utilizando-se a concentração de alíquotas de 1,0 mL e 2,0 mL de solução padrão de cumarina e com alíquota de 2,0 mL de extrato fluido.

Teste de linearidade

O teste de linearidade foi feito preparando-se uma solução de cumarina a 1 mg/mL e adicionando-se alíquotas de 1,0 mL, 2,0 mL, 3,0 mL, 4,0 mL e 5,0 mL a 1,0 mL de extrato fluido e prosseguindo-se de acordo com o procedimento utilizado na preparação da curva de calibração do padrão.

Estudo de interferências dos componentes do extrato fluido de guaco

O estudo de interferência foi efetuado empregando-se cromatografia preparativa. A fase móvel utilizada foi

heptano/acetona (10:3) em fase estacionária sílica-gel 60. Prosseguiu-se, adicionando-se 1 mL de acetato de chumbo a 2 mL de extrato fluido, filtrou-se e o filtrado foi aplicado em linha na placa cromatográfica preparativa paralelamente ao padrão de cumarina. Foram reveladas duas porções da placa, com os respectivos reveladores sulfovanílico e KOH 5%, para visualização das faixas obtidas. As dez faixas resultantes foram separadas e diluídas em 10 mL de álcool/água 2:1 (veículo utilizado na preparação do extrato fluido). Efetuaram-se varreduras espectrais individuais de cada faixa resultante e sobrepostas na primeira ordem, juntamente com a varredura espectral do padrão de cumarina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados referentes à curva de calibração da solução do padrão de cumarina encontram-se à Figura 1, Tabela I. O coeficiente de linearidade da curva de calibração foi de 0,9951 indicando que o método é linear quando aplicado à substância pura (Brittain, 1998).

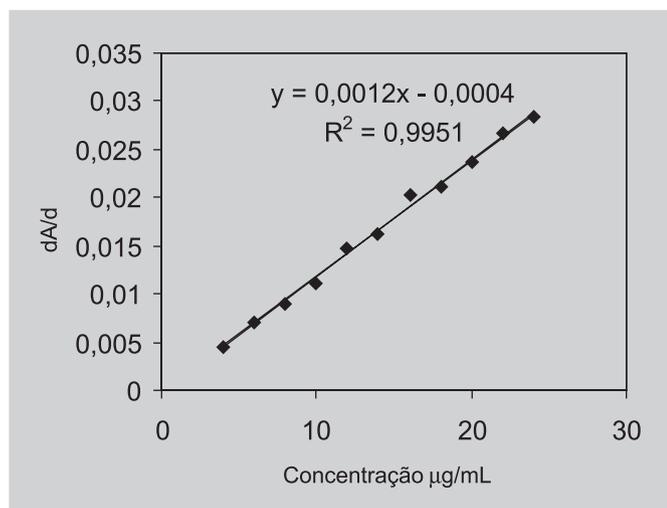


FIGURA 1 – Curva de calibração da solução padrão da cumarina, em 320 nm, onde se obteve $y = 0,0012x - 0,0004$, $R^2 = 0,9951$ e $R = 0,9975$. Os valores obtidos são referentes à Tabela I.

O método desenvolvido por espectrofotometria derivada foi padronizado em bases experimentais. A adição de acetato de chumbo 5% e posterior filtração é necessária para precipitação de taninos. O pico máximo no espectro de primeira ordem para o extrato fluido e o padrão de cumarina foi de 290 nm, mas a leitura foi estabelecida em 320 nm (Figura 2). Este comprimento de onda foi definido pelo estudo de interferência dos componentes do extrato fluido de guaco. A faixa que na placa cromatográfica se

TABELA I - Valores utilizados para a construção da curva da solução do padrão de cumarina pelo método da espectrofotometria derivada de primeira ordem

	Concentração do padrão de cumarina em $\mu\text{g/mL}$	$dA/d\lambda$ na absorvância em 320nm
1	4	-0,0045
2	6	-0,0071
3	8	-0,0090
4	10	-0,0111
5	12	-0,0148
6	14	-0,0162
7	16	-0,0203
8	18	-0,0212
9	20	-0,0236
10	22	-0,0266
11	24	-0,0283

Obs: A curva de calibração foi construída em valores absolutos de $dA/d\lambda$

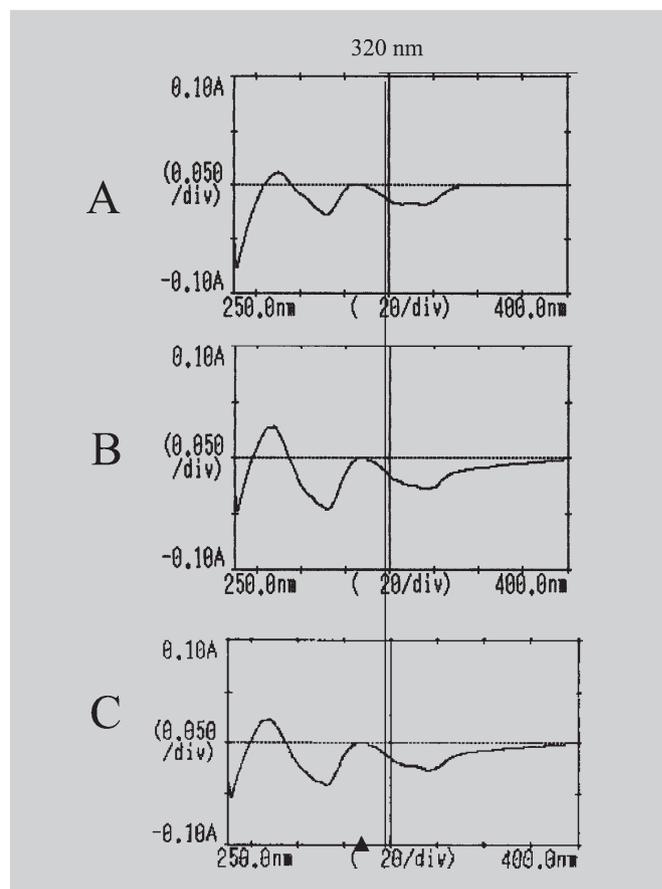


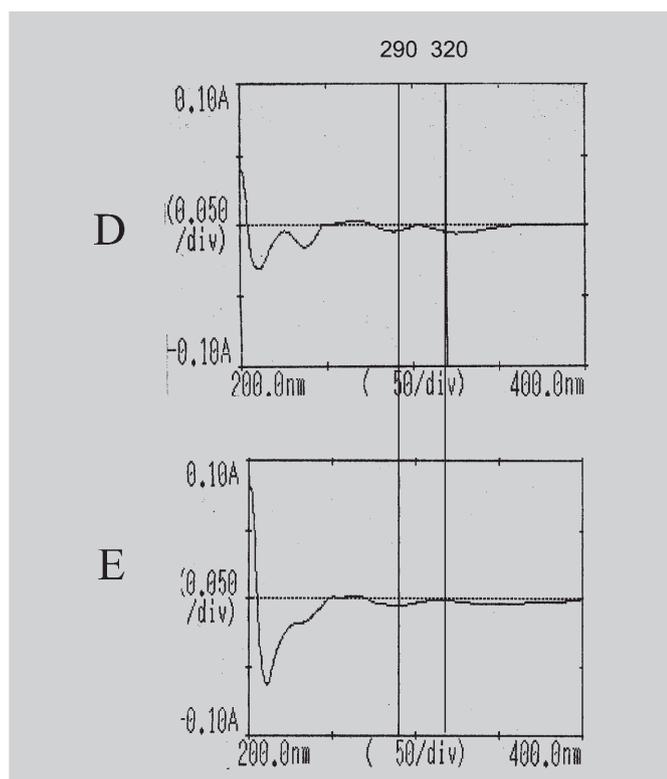
FIGURA 2 - Derivadas de primeira ordem das varreduras espectrais: A - solução padrão de cumarina, B - extrato fluido de guaco, C - tintura de guaco.

TABELA II - Resultados estatísticos do doseamento por espectrofotometria derivada de primeira ordem a 320 nm para extrato fluido e tintura de guaco

	Extrato fluido	Extrato fluido após 2 semanas	Extrato fluido após 4 semanas	Tintura
Média (mg/mL)*	3,79**	3,82***	3,84***	1,10**
Desvio padrão	0,08	0,10	0,053	0,019
Desvio padrão relativo	0,021	0,026	0,013	0,017
Coef. de variação	2,10%	2,60%	1,38%	1,72%

Obs:mg de cumarina por mL de extrato, **n=10, ***n=5

identificava com padrão (Figura 3-D) teve coincidência com varredura espectral da solução do padrão de cumarina (Figura 2-A). O pico apresentado pela cumarina localiza-se em 290 nm, mas neste comprimento de onda há outra faixa que apresenta absorção (Figura 3). Em 320 nm apresentou leitura somente para faixa que corresponde ao padrão e neste ponto os espectros das demais faixas se anulam, portanto a técnica escolhida para determinar a concentração foi zero-crossing, no qual o valor absoluto da absorbância é medido a partir da linha da abscissa do eixo de anulação e onde as outras substâncias se anulam.

**FIGURA 3** - Derivadas de primeira ordem das varreduras espectrais das soluções obtidas das faixas resultantes da cromatografia preparativa em camada delgada. D - faixa correspondente ao padrão de cumarina; E - faixa que apresentou leitura em 290 nm.

Os resultados estatísticos obtidos para o método da espectrofotometria derivada (Tabela II) indicam: precisão por apresentar desvio padrão relativo menor que 1; exatidão por apresentar teste de recuperação em torno de 102% (Tabela III) e reprodutibilidade pelo valor de desvio padrão obtido (Brittain, 1998).

TABELA III -Valores obtidos no teste de recuperação do extrato fluido de guaco pelo método de espectrofotometria derivada de primeira ordem.

	% recuperação
I	103,37
II	102,50

Obs: Os valores são médias de duas determinações, com diferença <1%.

Para o estudo de linearidade, testou-se a correlação entre quantidade conhecida de padrão adicionado ao extrato fluido e a quantidade encontrada em análise. O coeficiente de correlação da reta encontrado foi de 0,9987 indicando que o método é linear para aplicação no extrato fluido (Figura IV, Tabela IV).

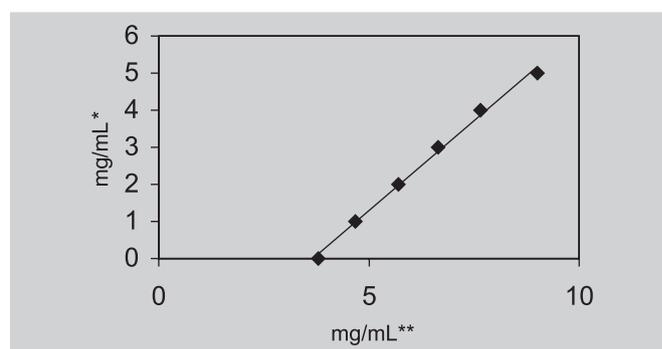
**FIGURA 4** - Curva do teste de linearidade em que obteve-se $R^2=0,9976$ e $R=0,9987$. (*) e (**) correspondem, respectivamente, aos valores em mg/mL do padrão de cumarina adicionada ao extrato e mg/mL determinado na análise.

TABELA IV – Concentrações calculadas no teste de linearidade empregando método da espectrofotometria derivada no extrato fluido de guaco

Quantidade de cumarina adicionada ao extrato fluido de guaco em mg/ml	Concentração determinada no extrato fluido de guaco em mg/mL
0	3,80
1	4,67
2	5,70
3	6,64
4	7,66
5	9,01

Obs: Média de duas determinações, com diferença <1%.

CONCLUSÃO

Os métodos usuais descritos na literatura para determinação de especificidade e linearidade utilizados para substâncias incorporadas na forma farmacêutica são de difícil aplicação em extratos vegetais, uma vez que recorrem à preparação de um placebo e incorporação do princípio ativo em concentração determinada; isto é impossível para extratos vegetais, porque nas plantas há mistura natural de compostos.

A espectrofotometria por derivada de primeira ordem, pelo coeficiente de linearidade alto (0,9987), quando de sua aplicação em extrato fluido de guaco, mostrou-se útil para a aplicação em extratos vegetais.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro, e ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), da Unicamp, pelo fornecimento do material vegetal.

ABSTRACT

Determination of coumarin in fluid extract and tincture of "guaco" by first derivative spectrophotometry

The objective of this work was to develop a method for coumarin(1,2-benzopyran) dosage in fluid extract and tincture of "guaco" (Mikania glomerata Sprengel). First

derivative spectrophotometry was developed and proved to be accurate, exact, reproductive and of easy execution.

UNITERMS: Mikania glomerata. Guaco. Coumarin. First Derivative spectrophotometry. Fluid extract.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRITAIN, H. Validação de métodos analíticos não cromatográficos. *Pharm. Technol., Ed. Bras.*, São Paulo, v.2, p.4-9, 1998.
- DI STASI, L. C. *et al.* Plantas medicinais da medicina popular no município de Botucatu-SP. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 13., Fortaleza, 1994. *Livro de Resumos*. Fortaleza: CNPq, 1994. Res. 320.
- FIERRO, I. M.; SILVA, A. C. B.; LOPES, C. S.; MOURA, R. S.; FIDALGO, C. B. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. *J. Ethnopharmacol.*, Shannon, v.66, n.1, p.19-24, 1999.
- LEITE, M. G. R.; SOUZA, C. L.; SILVA, M. A. M.; MOREIRA, L. K. A.; MATOS, F. J. A.; VIANA, G. S. B. Estudo farmacológico comparativo de *Mikania glomerata* Sprengel (guaco), *Justicia pectoralis* Jacq (anador) e *Torresea cearensis* (cumaru). *Rev. Bras. Farm.*, Rio de Janeiro, v.74, n.1, p.12-15, 1993.
- LUCAS, V. Estudo farmacognóstico do guaco. *Rev. Flora Med.*, Rio de Janeiro, v.9, n.3, p.101-132, 1942.
- OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M. A.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Isolamento e identificação de componentes químicos de *Mikania glomerata* Sprengel e de *Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker. *Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.20, n.2, p.169-183, 1984.
- OLIVEIRA, F.; OGA, S.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. Parâmetros físicos e químicos e efeito antiedema dos extratos fluidos de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) e de guaco de mato (*Mikania laevigata* Schutz Bip. ex Baker). *An. Farm. Quim.*, São Paulo, v.25, n.1/2, p.50-54, 1985.
- PANIZZA, S. *Plantas que curam*: cheiro de mato. São Paulo: IBRASA, 1997. p.117-118.

- PEREIRA, N. A.; PEREIRA, B. M. R.; NASCIMENTO, M. C.; PARENTE, J. P.; MORS, W. B. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. IV. Protection against jararaca venom by isolated constituents. *Planta Med.*, Stuttgart, v.60, p.99-100, 1994.
- RUPPELT, B. M.; PEREIRA, E. F. R.; GONÇAVES, L. G.; PEREIRA, A. N. Pharmacological screening of plants recommended by folk medicine as anti-snake venom. I. Analgesic and anti-inflammatory activities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.86, n.2, p.203-205, 1991.
- SILVA, R. A. *Pharmacopeia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Ed. Nacional, 1929. p.384-387, 425, 495, 893-894, 929.
- VENEZIANI, R. C. S.; CAMILO, D.; OLIVEIRA, R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. *Biochem. Syst. Ecol.*, Oxford, v.27, n.1, p.99-102, 1999.
- VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. Extration of low-polarity compounds (with emphasis on coumarin and Kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* ('guaco') leaves. *Phytochem. Anal.*, Chischester, v.8, p.266-270, 1997.

Recebido para publicação em 15 de julho de 2003

Aceito para publicação em 08 de outubro de 2004.