

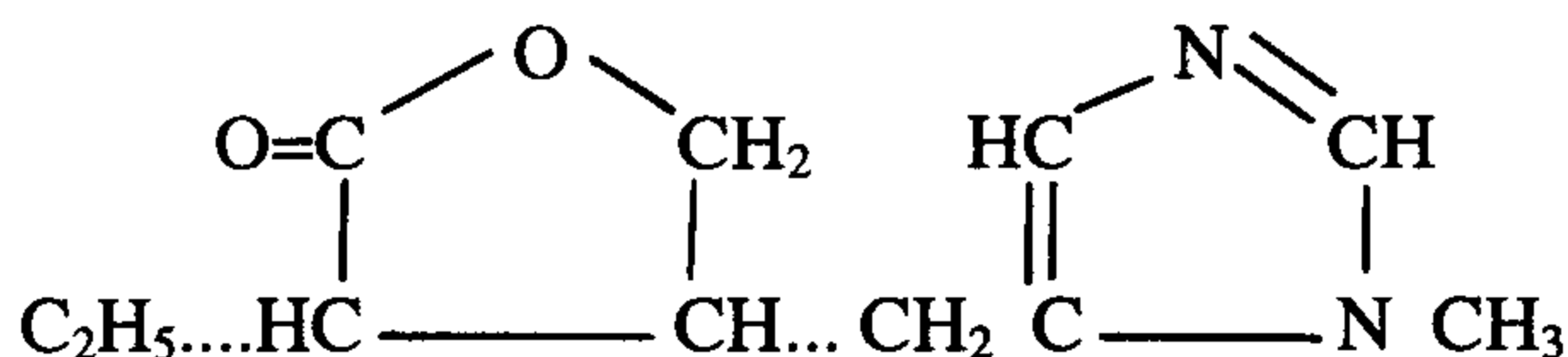
# TÉCNICA COLORIMÉTRICA PARA RÁPIDA DETERMINAÇÃO DE ALCALÓIDES DO JABORANDI (*Pilocarpus* spp.)<sup>1</sup>

F. F. Feitosa Teles<sup>2</sup>  
Eliana Renuncio<sup>3</sup>  
Ana A. C. Alencar<sup>4</sup>  
Valéria E. L. Borges<sup>3</sup>

## 1. INTRODUÇÃO

Os principais alcalóides encontrados nas folhas do jaborandi (*Pilocarpus jaborandi* Holmes - 'jaborandi-pernambuco'; *Pilocarpus microphyllus* Stap - 'jaborandi-maranhão') da família Rutaceae são a pilocarpina, pilocarpidina, isopilocarpina, jaborina e jaboridina (2, 3, 5).

A pilocarpina, principal componente econômico desta Rutaceae, é o 3-etildihidro-[(1 metil-1H-imidazol-5-il) metil]-2 (3H) - furanona, com fórmula bruta C<sub>11</sub> H<sub>16</sub> N<sub>2</sub> O<sub>2</sub>.



<sup>1</sup> Financiado, parcialmente, pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Aceito para publicação em 05.08.1994.

<sup>2</sup> Pesquisador do CNPq junto à Universidade Federal do Ceará, Rua Agapito dos Santos, 376/101 - 60010-250 Fortaleza, CE.

<sup>3</sup> Bolsista do CNPq.

<sup>4</sup> Aluna do curso de Farmácia da UFC.

Como a maioria dos alcalóides, a análise da pilocarpina e seus afins só é feita com precisão com a substância, suficientemente pura, principalmente livre de albuminóides, que apresentam reações químicas semelhantes a vários reagentes de identificação, como os Reagentes de Bouchardat, Meyer, Dragendorff, Marmé etc. (3, 4).

Para se atingir um estágio de pureza que permita uma reação pelo menos semiquantitativa dos alcalóides do jaborandi, há de se proceder à extração e purificação das folhas, a qual é geralmente extraída com benzeno, clorofórmio ou diclorometano em pH alcalino, seguida de filtração sobre papel e carvão, acidificada com ácido sulfúrico diluído e reextraída com clorofórmio por separação de fases. Após a extração e purificação por sucessivas passagens da fase aquosa (ácida) para a fase orgânica (clorofórmio alcalino), o solvente é evaporado e os alcalóides determinados gravimetricamente (1, 3, 4) ou por cromatografia gás-líquido (4) ou cromatografia líquida de alta resolução (resultados não-publicados). Em ambos os casos, o processo é moroso, caro e requer aparelhagem ou pessoal especializado.

Como, pela estrutura da substância e por outros fatores, o uso de pilocarpina sintética é antieconômico e as reservas de jaborandi estão ficando cada vez mais escassas, surgiu a necessidade de as companhias produtoras de pilocarpina iniciarem seus programas de plantio e replantio de jaborandi.

Entretanto, para que se eliminem dos viveiros de mudas as plantas pouco produtivas, necessário se faz uma metodologia rápida e fácil, permitindo ao melhorista selecionar as mudas mais produtivas para o plantio definitivo.

No intuito de tentar desenvolver uma técnica mais rápida e mais fácil de ser realizada em laboratórios de campo, fez-se o presente trabalho.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Amostras

As amostras foram adquiridas em comerciantes de folhas de jaborandi, em São Luís (MA). Foram selecionadas folhas de melhor aspecto e mais ricas em glândulas.

### 2.2. Preparo das Amostras

As folhas foram cortadas em pedaços de, aproximadamente, 4 cm<sup>2</sup> e postas para secar em estufa com aeração forçada a 60-63°C durante 3

horas. Em seguida, moídas em moinho tipo Wiley, modelo intermediário, com peneira de 20 mesh.

### 2.3. *Extração*

Para um cilindro graduado, de vidro borossilicato, de 250 ml, com tampa de vidro esmerilado, foram transferidos 1.500 mg de folhas secas e moídas e 100 ml de ácido clorídrico 0,1 N adicionados. Agitou-se por inversão do cilindro, em movimentos suaves, por 5 minutos, filtrou-se sobre papel qualitativo seco uma alíquota de 50 ml.

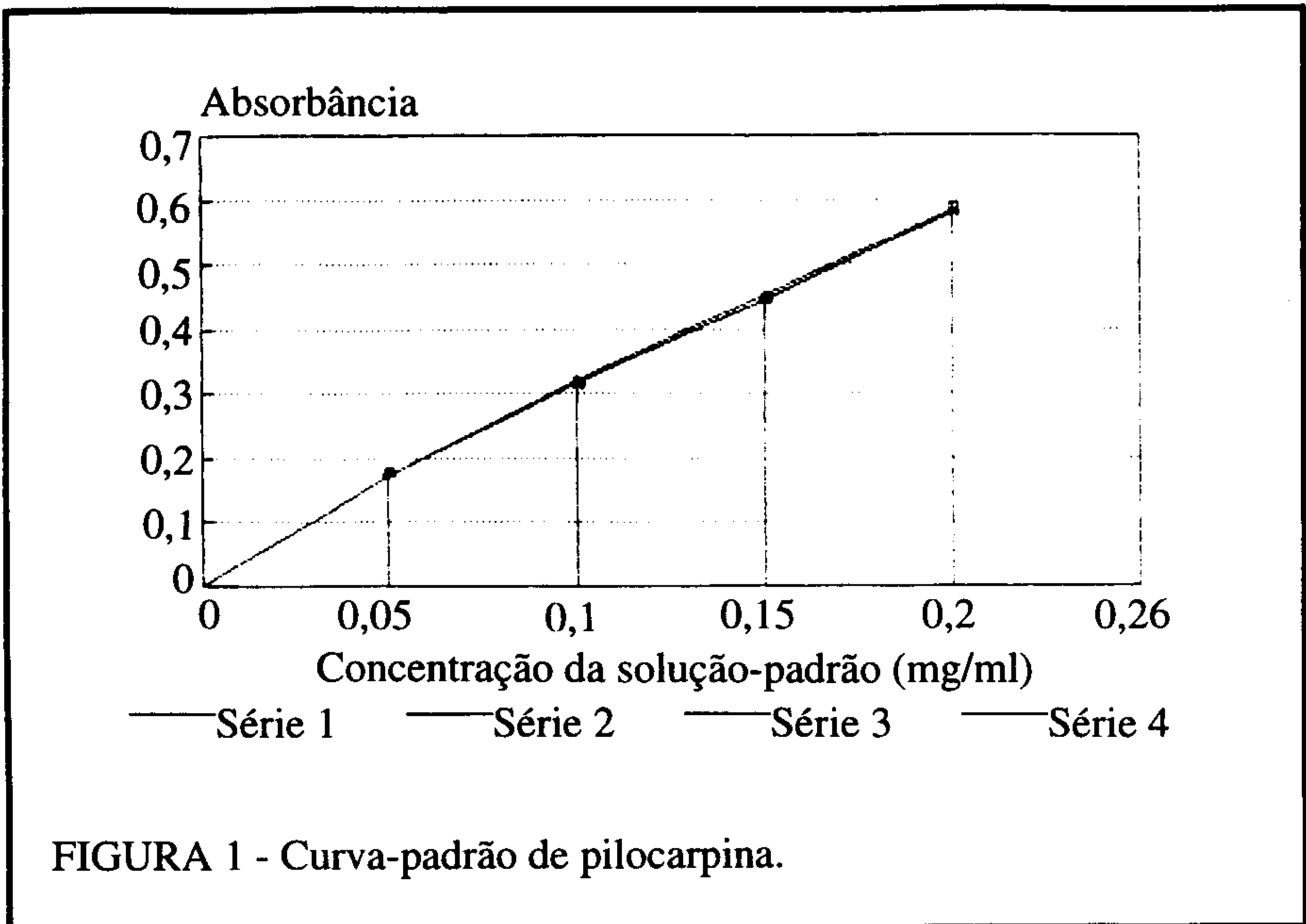
### 2.4. *Purificação*

Com auxílio de uma pipeta volumétrica TD, alcalinizou-se uma alíquota de 10 ml do “extrato aquoso” com carbonato de sódio 10% (peso/volume) até pH 9 (determinado com papel indicador). Em seguida, extraíram-se os alcalóides com 2 porções de 12,5 ml de diclorometano, em funil de separação, combinando-se os extratos em balão volumétrico de 25 ml. Para a feitura da curva-padrão, soluções-padrão de pilocarpina nitrato substituíram o “extrato aquoso”.

### 2.5. *Colorimetria*

Transferiram-se, com pipeta volumétrica TD, 15 ml da fase orgânica para o funil de separação. Adicionou-se 1 ml de ácido acético 20% (v/v), agitou-se por rotação suave, adicionou-se 1 ml de dicromato de potássio 5% ml (p/v) agitou-se por 5 segundos e adicionaram-se 5 ml de água oxigenada a 1% (partindo do produto de título mínimo de 30%) e agitou-se por 60 segundos, ventilando a pressão. Transferiram-se 10 ml da fase orgânica colorida para a leitura colorimétrica a 560 nm (Espectrofotômetro Coleman Jr. II-A), usando-se diclorometano como branco. A determinação quantitativa foi realizada com auxílio de uma curva-padrão feita com nitrato de pilocarpina p.a. (C<sub>11</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>) em concentrações de 0; 0,05; 0,10; 0,15; e 0,20 mg/ml em HCl 0,1N, submetendo-se o branco a todo o procedimento analítico (Figura 1).

Para a comparação de métodos utilizou-se a metodologia clássica, a qual consiste em: (1) extrair os alcalóides das folhas secas, moídas e alcalinizadas (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) com três porções sucessivas de benzeno; (2) purificar através de extração dos alcalóides com três porções sucessivas de ácido sulfúrico 0,1N; (3) alcalinizar (NH<sub>4</sub>OH) e reextrair com três porções sucessivas de diclorometano; (4) deixar evaporar o solvente; (5) esfriar e dessecar sobre H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; e (6) pesar o resíduo.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Exemplo de determinação de alcalóides totais em folhas secas de jaborandi (*Pilocarpus sp.*)

Peso da amostra moída e seca: 1.500 mg

Absorbância medida: 0,360

Diluição: 100 ml/10 ml alíquota (10 ml do extrato = 150 mg de folha)

Equação da reta:  $x = (0,3458 \times \text{abs}) - 0,0053$

$$x = 0,119188 \text{ mg/ml}$$

em que  $0,119188 \text{ mg/ml} \times 10 \text{ ml} = 1,192 \text{ mg}$  de nitrato de pilocarpina

Peso molecular (PM) da pilocarpina = 208

PM do nitrato de pilocarpina = 260...  $F = 208/260 = 0,8$

ou  $0,8 \times 1,192 = 0,954 \text{ mg}$  de pilocarpina em 150 mg de folha, portanto, 0,64%

Fórmula resumida:  $\% = [(0,346 \times \text{abs}) + (-0,005)] \times 5,33$

Observando-se os dados contidos no Quadro 1, pode-se ver que não houve muita diferença entre as leituras das diversas séries (repetições). Os desvios-padrão mais altos para as soluções mais concentradas são esperados, uma vez que é aumentada a probabilidade de erro das medidas feitas volumetricamente com o mesmo aparelho (pipeta volumétrica TD de

QUADRO 1 - Leitura das absorvâncias das soluções-padrão de nitrato de pilocarpina em HC1 0,1N

Concentração (mg/ml)	Absorvâncias					
	Série 1	Série 2	Série 3	Série 4	Média	Desv.-pdr. (n-1)
0,00	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	-
0,05	0,170	0,173	0,175	0,174	0,173	0,00216
0,10	0,320	0,317	0,314	0,317	0,317	0,00245
0,15	0,455	0,448	0,450	0,447	0,450	0,00356
0,20	0,582	0,580	0,578	0,588	0,582	0,00432

10 ml). Entretanto, o uso de pipeta TC seguida de lavagem dificultaria, em muito, a execução da técnica.

Feito o dispersograma seguido de análise de regressão linear, demonstrou-se a linearidade da curva representada na Figura 1 na qual se nota quase que uma superposição das série de repetições, com coeficiente de correlação  $R = 0,9983$ , o coeficiente de determinação  $R^2 = 0,9966$  e a equação da regressão linear de X sobre Y expressa da seguinte maneira:  $X = (0,345820) * Y + (-0,005268)$ , o que permite facilmente um cálculo algébrico da percentagem diretamente da leitura da absorvância. Esta leitura é sobremaneira facilitada no espectrofotômetro "Coleman Jr II-A" o qual tem sua escala de absorvância calibrada no módulo linear-log, evitando assim a transformação matemática das leituras de transmitância em absorvância nas soluções mais concentradas.

A comparação dos resultados obtidos pela metodologia clássica (gravimétrica) e pela técnica proposta está expressa no Quadro 2. Análise estatística feita pelo teste "t", a 1% de probabilidade, mostrou que não houve diferença estatística significativa entre as duas médias, o que, tendo em vista a facilidade de execução e o menor tempo gasto, torna a nova técnica muito promissora.

#### 4. CONCLUSÕES

A nova metodologia proposta é mais rápida, mais simples e mais barata que a metodologia clássica (gravimétrica); evita o uso do benzeno, que é reconhecidamente cancerígeno (leucemia benzênica); e usa apenas 1,5 g de amostra, contra 10 g do método gravimétrico, evitando-se assim a depleção foliar de plantas muito jovens (mudas destinadas ao plantio).

QUADRO 2 - Comparação entre o método proposto (colorimétrico) e a metodologia clássica (gravimétrica)

Amostra	Absorbância	Pilocarpina (%)*	
		colorimétrico	gravimétrico
1	0,360	0,637	0,605
2	0,354	0,626	0,630
3	0,362	0,641	0,625
4	0,348	0,615	0,640
média**	0,356	0,630	0,625
desv.-pdr(n-1)	0,0063	0,0117	0,0147

\* Alcalóides totais expressos em % de pilocarpina.

\*\* A comparação das médias das percentagens obtidas pelo método colorimétrico e pelo gravimétrico não diferiram, estatisticamente, pelo teste "t", a 0,01.

## 5. RESUMO

Uma técnica simples, rápida e acurada foi desenvolvida para determinação dos alcalóides do jaborandi (*Pilocarpus sp.*). Além da simplicidade, a nova metodologia dispensa o uso do benzeno e reduz o tamanho da amostra de 10 para 1,5 g de folhas, permitindo o seu uso em programas de melhoramento de plantas para uso industrial.

## 6. SUMMARY

(A RAPID COLORIMETRIC TECHNIQUE FOR THE DETERMINATION OF JABORANDI (*Pilocarpus spp.*) ALKALOIDS)

A new technique was developed for rapid determination of jaborandi (*Pilocarpus spp.*) alkaloids. It is simple, accurate and avoids the use of benzene as extractant reducing sample size from 10 to 1.5g, consequently, allowing the technique to be used in plant breeding programs.

## 7. LITERATURA CITADA

1. BASTOS, M. L. *Química Analítica dos Alcalóides*. Curitiba, Imprensa da Universidade do Paraná, 1964. 63p.

2. BEVAN, J. A. *Fundamentos de Farmacologia*. S. Paulo, Editora Harper & Row do Brasil, 1979. 588p.
3. CASAMADA, R. S. M. *Farmacognosia General*. 2a. ed. Barcelona, Editorial Científico-Médica, 1958. 416 p.
4. IKAN, R. *Natural Products, a Laboratory Guide*. London, Academic Press, 1969. 293p.
5. WINDHOLS, M. (Ed.) *The Merck Index*. 10 k ed. Rahway, N.J., Merck & Co. 1983. 2.093p.