

LUZIA FRANCO

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA O CONTROLE
DE QUALIDADE DE DERIVADOS DE *Pelargonium sidoides* D.C.**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de concentração de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Departamento de Farmácia, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira

CURITIBA
2009

TERMO DE APROVAÇÃO

LUZIA FRANCO

Título: "Desenvolvimento de metodologia analítica para o controle de qualidade de matérias-primas e produtos contendo *Peiargonium sidoides* D.C."

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, área de concentração Insumos, medicamentos e correlatos.



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
Orientador



Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello
Universidade Estadual de Maringá



Prof. Dr. Roberto Pontarolo
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 05 de dezembro de 2008.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela vida, bênção e proteção;

Aos meus pais, Luiz e Lourdes, pelo constante incentivo e exemplo à vida acadêmica e, principalmente, pelas mãos que sempre estarão a me amparar;

Às minhas irmãs, Joceline e Letícia Franco, parceria fundamental em minha vida;

À Alexandre Toschi, pelo companheirismo, amparo, amizade e apoio;

Ao professor Brás Heleno de Oliveira pela experiente orientação dedicada a este trabalho;

À Tomoe Nakashima, pela dedicação dispensada na iniciação científica que estimulou meu apreço ao estudo de plantas medicinais;

Ao Herbarium Laboratório Botânico (HLB) e colegas da empresa, pelo incentivo e apoio, em especial à Laerte Dall'Agnol, pela contribuição desde a idéia do projeto;

Aos amigos do departamento de desenvolvimento analítico do HLB: Camila Zucchi Hermes, Cristiane Kopke, Cláudio de Souza Filho, Gustavo Bertol, Letícia Schiavo, Lia Mara Dellinocente e Melissa Guilherme, que ofereceram auxílio técnico e psicológico;

À Ana Carolina Asbahr pela amizade, incentivo e colaboração sempre presentes;

Aos professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas;

À professora Letícia N. C. Rodrigues;

À Daniel Altino de Jesus (LACEN- PR);

Ao Laboratório de ressonância magnética nuclear (UFPR).

RESUMO

As raízes de *Pelargonium sidoides* D.C. são utilizadas para o tratamento de infecções agudas e crônicas das vias aéreas superiores. Estudos farmacológicos relatam a correlação destes efeitos com cumarinas altamente oxigenadas, com destaque à uncalina (7-hidroxi-5,6-dimetoxicumarina). O presente trabalho descreve o desenvolvimento e a validação de métodos para o controle de qualidade de derivados de *P. sidoides*, por CLAE. O isolamento, a identificação e a determinação de pureza da uncalina permitiram a utilização deste analito como substância de referência. Todas as amostras foram analisadas em coluna C₁₈, eluídas com acetonitrila (45% v/v) em água, com fluxo de 0,75 mL.min⁻¹ e detecção a 330 nm. As raízes foram extraídas em ultra-som com acetona (50% v/v) em água enquanto, para a tintura, dois procedimentos para purificação, por extração em fase sólida (SPE) e partição líquido-líquido (LLE), foram desenvolvidos e comparados. A purificação do xarope foi realizada pelo mesmo protocolo estabelecido para a tintura por SPE, no qual foram empregados cartucho C₁₈, purificação com acetonitrila 20% (v/v) em água e recuperação da uncalina com metanol. O método por LLE utilizou éter etílico como solvente. Todos os métodos foram, então, submetidos aos testes de validação. A seletividade foi demonstrada pelo paralelismo entre a curva de padrão e padrão adicionado de amostra, comparação do perfil espectral entre padrão e amostra, pureza de pico e análise do placebo do xarope. A linearidade da curva padrão resultou em um coeficiente de correlação (r) de 0,9998. Os limites de detecção e quantificação foram, respectivamente, 8,9 e 29,8 ng.mL⁻¹ para todos os métodos. O procedimento para análise das raízes apresentou bons resultados de validação com desvio padrão relativo (DPR) inferiores a 3% para repetibilidade e precisão intermediária; linearidade com r de 0,9998 e recuperação superior a 95,15%. Para a tintura, os dois métodos de purificação apresentaram resultados similares. A repetibilidade demonstrou DPR de 1,17% para o método por SPE e 1,29% para LLE e precisão intermediária de 1,60% para SPE e 2,91% para LLE. A recuperação de ambos os métodos foi superior a 95,09% e a linearidade mostrou r superiores que 0,999. O método de análise do xarope revelou o valor de 0,95% para DPR da repetibilidade e 2,22% para precisão intermediária; linearidade com r de 0,9990 e recuperação superior a 97,82%. Os testes de robustez evidenciaram que os parâmetros cuja alteração provocou mudança no tempo de retenção alteraram significativamente a resposta do método (fluxo, coluna e proporção da fase móvel). Estes testes ainda comprovaram a viabilidade de utilização de outros dois cartuchos C₁₈ como alternativa para purificação da amostra. O presente trabalho, então, demonstrou que todos os métodos desenvolvidos permitem a realização de um controle de qualidade adequado e confiável para derivados da espécie *P. sidoides*.

Palavras-chave: *Pelargonium sidoides* D.C. Validação. Controle de Qualidade. CLAE.

ABSTRACT

Roots of *Pelargonium sidoides* D.C. are used for the treatment of acute and chronic infections of the respiratory tract and ear, nose and throat (ENT). Pharmacological studies have related these effects to highly oxygenated coumarins, mainly umckalin (7-hydroxy-5,6-dimethoxycoumarin). This present study describes the development and validation of methods to quality control of *P. sidoides* derivatives, by HPLC. The isolation, identification and purity analysis of umckalin allowed the use of this analyte as standard. All samples were injected in a C₁₈ column, eluted with acetonitrile (45% v/v) in water, with 0.75 ml.min⁻¹ and detection at 330 nm. The roots were extracted in ultrasound with acetone (50% v/v) in water, while, for tincture, two procedures for clean up, solid phase extraction (SPE) and liquid-liquid extraction (LLE), were developed and compared. Syrup was cleaned as the same protocol of tincture, by SPE, which was performed with a C₁₈ cartridge, cleaned with acetonitrile 20% (v/v) in water and the analyte was eluted with methanol. The LLE used diethyl ether as solvent. All methods were, then, submitted to validation tests. Selectivity of methods was demonstrated by parallelism between calibration curve and those of analyte spiked with the samples, comparison of spectral profile of samples and standard, peak purity and analysis of syrup blank. The linearity of standard solution resulted in a correlation coefficient (r) of 0.9998. The detection and quantification limit were 8.9 and 29.8 ng.mL⁻¹ for all methods, respectively. The roots procedures presented good validation results with relative standard deviation (RSD) inferior to 3% for repeatability and intermediate precision; linearity with r equal to 0.9998 and recovery between 95.15 and 100.51%. For tincture, two clean up methods presented similar results. The repeatability demonstrated the RSD of 1.17% for SPE procedure and 1.29% for LLE and the intermediate precision resulted in RSD of 1.60% for SPE and 2.91% for LLE. Recovery for both methods was higher than 95.09% and linearity showed r better than 0.999. The syrup method demonstrated 0.95% of RSD of repeatability and 2.22% for intermediate precision, linearity with r of 0.9990 and recovery above 97.82%. The robustness tests showed that the parameters that changed the retention time caused variations on the method response (flow rate, column and acetonitrile percentage in mobile phase). These tests also showed the viability of using more two alternative cartridges. The present study has therefore demonstrated that all methods for *Pelargonium sidoides* derivatives are adequate and reliable for their quality control.

Key words: *Pelargonium sidoides* D.C. Validation. Quality control. HPLC.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	OBJETIVO GERAL	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3	REVISÃO DE LITERATURA	16
3.1	O GÊNERO <i>Pelargonium</i>	16
3.2	A ESPÉCIE <i>Pelargonium sidoides</i> D.C.	16
3.2.1	Atividades terapêuticas	18
3.2.2	Principais constituintes químicos	20
3.2.3	Métodos analíticos	23
3.2.3.1	Métodos cromatográficos	23
3.2.3.2	Métodos de detecção e visualização	24
3.2.3.3	Métodos de preparo de amostras	25
3.2.4	Planejamento fatorial de experimentos	26
3.2.5	Métodos para isolamento da uncalina	28
3.3	VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	28
3.3.1	Especificidade e seletividade	30
3.3.2	Linearidade e intervalo de aplicação	30
3.3.3	Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	32
3.3.4	Precisão	34
3.3.5	Exatidão	35
3.3.6	Robustez	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	OBTENÇÃO DA UNCALINA	39
4.2	MÉTODO PARA CCD DAS MATÉRIAS-PRIMAS DE <i>P. sidoides</i>	40
4.3	DETERMINAÇÃO DE UNCALINA EM DERIVADOS DE <i>P. sidoides</i>	41
4.3.1	Análise cromatográfica	41
4.3.2	Extração e purificação das amostras	41
4.3.2.1	Otimização da extração das raízes por planejamento fatorial	41
4.3.2.2	Otimização da limpeza da amostra tintura	41
4.3.2.3	Purificação da uncalina no xarope	42
4.3.3	Métodos selecionados para quantificação da uncalina	42
4.3.3.1	Condições cromatográficas	42
4.3.3.2	Purificação da uncalina nas raízes	42
4.3.3.3	Purificação da uncalina na tintura por partição líquido-líquido (LLE)	43
4.3.3.4	Purificação da uncalina na tintura por extração em fase sólida (SPE)	43
4.3.3.5	Purificação da uncalina no xarope, por SPE	43
4.3.4	Avaliação da adequação do sistema	43

4.3.5 Avaliação da estabilidade das soluções de padrão e das soluções amostra	43
4.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	44
4.4.1 Especificidade e seletividade	44
4.4.1.1 Comparação de curvas analíticas.....	44
4.4.1.2 Comparação dos perfis espectrais da uncalina da amostra e do padrão.....	45
4.4.1.3 Análise da pureza do pico referente à uncalina, nas amostras	45
4.4.1.4 Análise do placebo	45
4.4.2 Linearidade e intervalo de aplicação.....	45
4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação.....	46
4.4.4 Repetibilidade.....	47
4.4.5 Precisão intermediária.....	47
4.4.6 Exatidão.....	47
4.4.7 Robustez.....	48
4.5 ANÁLISE DOS PRODUTOS CONTENDO <i>P. sidoides</i>	49
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 OBTENÇÃO DE UNCALINA	50
5.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	51
5.1.2 Espectrometria de massas (EM).....	58
5.1.3 Espectrometria UV-VIS	59
5.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV).....	59
5.1.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	61
5.2 CCD DAS MATÉRIAS-PRIMAS DE <i>P. sidoides</i>	62
5.3 DESENVOLVIMENTO DAS METODOLOGIAS	62
5.3.1 Otimização da extração das raízes de <i>P. sidoides</i>	64
5.3.1.1 Otimização da limpeza da amostra de tintura.....	69
5.3.1.2 Otimização da limpeza do xarope por extração em fase sólida (SPE).....	71
5.3.2 Avaliação da adequação do sistema.....	72
5.3.3 Avaliação da estabilidade das soluções padrão	73
5.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	75
5.4.1 Parâmetros de validação do método cromatográfico.....	75
5.4.1.1 Especificidade e seletividade	75
5.4.1.1.1 Comparação dos perfis espectrais entre amostras e padrão.....	75
5.4.1.1.2 Análise da pureza de pico da uncalina no padrão e nas amostras	76
5.4.1.2 Linearidade para padrão de uncalina.....	77
5.4.1.3 Limite de detecção e quantificação	78
5.4.1.4 Robustez para parâmetros cromatográficos	79
5.4.2 Validação da análise das raízes de <i>P. sidoides</i>	81
5.4.2.1 Seletividade (método de adição de padrão)	81
5.4.2.2 Linearidade.....	81
5.4.2.3 Repetibilidade.....	83

5.4.2.4	Precisão intermediária.....	84
5.4.2.5	Exatidão.....	85
5.4.2.6	Robustez	87
5.4.3	Validação da análise da tintura por LLE e SPE	88
5.4.3.1	Seletividade (método de adição de padrão)	88
5.4.3.2	Linearidade.....	88
5.4.3.3	Repetibilidade.....	91
5.4.3.4	Precisão intermediária.....	92
5.4.3.5	Exatidão.....	93
5.4.3.6	Robustez	97
5.4.4	Validação de determinação de uncalina no xarope	98
5.4.4.1	Seletividade (análise do placebo)	98
5.4.4.2	Linearidade.....	99
5.4.4.3	Repetibilidade.....	100
5.4.4.4	Precisão intermediária.....	101
5.4.4.5	Exatidão.....	102
5.4.4.6	Robustez	103
5.5	QUANTIFICAÇÃO DE UNCALINA NOS PRODUTOS A BASE DE <i>P. sidoides</i>	103
6	CONCLUSÃO	105
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE <i>P. sidoides</i> E <i>P. reniforme</i>	19
TABELA 2 – CUMARINAS PRESENTES NAS RAÍZES DE <i>P. sidoides</i> E <i>P. reniforme</i>	22
TABELA 3 – VALORES ACEITÁVEIS DE EXATIDÃO SEGUNDO HUBER (2001)	36
TABELA 4 - COMPARAÇÃO COM OS SINAIS (PPM) DE RMN- ¹ H DA LITERATURA.....	52
TABELA 5 – COMPARAÇÃO COM RESULTADOS DE RMN- ¹³ C DA LITERATURA	54
TABELA 6 – RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS DOS MÉTODOS EM DESENVOLVIMENTO ...	63
TABELA 7 – ÁREAS DAS INJEÇÕES SUCESSIVAS EM COLUNA NOVA E ANTIGA	73
TABELA 8 – ÁREAS DAS AMOSTRAS APÓS EXTRAÇÃO: TEMPO 0 E 24 HORAS	74
TABELA 9 – PUREZAS DO PICO DE UNCALINA NO PADRÃO E NAS AMOSTRAS	77
TABELA 10 – DADOS PARA AVALIAÇÃO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO	79
TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO DE UNCALINA PARA LINEARIDADE DAS RAÍZES	82
TABELA 12 – REPETIBILIDADE PARA O MÉTODO DE ANÁLISE DAS RAÍZES.....	84
TABELA 13 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA O MÉTODO DE ANÁLISE DAS RAÍZES	85
TABELA 14 – QUANTIDADES DE UNCALINA EM ADIÇÃO DE PADRÃO À AMOSTRA (RAÍZES)..	85
TABELA 15 – RECUPERAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DAS RAÍZES	87
TABELA 16 – CONCENTRAÇÃO DE UNCALINA PARA LINEARIDADE NA TINTURA.....	89
TABELA 17 – REPETIBILIDADE PARA ANÁLISE DA TINTURA POR SPE E LLE	92
TABELA 18 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA ANÁLISE DA TINTURA POR SPE E LLE.....	93
TABELA 19 – QUANTIDADE DE UNCALINA EM ADIÇÃO DE PADRÃO À AMOSTRA - TINTURA..	94
TABELA 20 – RECUPERAÇÃO DA ANÁLISE DA TINTURA VIA LLE	95
TABELA 21 – RECUPERAÇÃO DA ANÁLISE DA TINTURA VIA SPE.....	97
TABELA 22 – REPETIBILIDADE PARA O MÉTODO DE ANÁLISE DO XAROPE.....	101
TABELA 23 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA A ANÁLISE DO XAROPE	101
TABELA 24 – RECUPERAÇÃO DA ANÁLISE DO XAROPE	102
TABELA 25 – UNCALINA NOS PRODUTOS DE <i>P. sidoides</i> COMERCIALIZADOS NO BRASIL	104

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS CUMARINAS PRESENTES EM <i>P. sidoides</i> . 21	
QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES PARA A ANVISA	29
QUADRO 3 – ENSAIOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO.....	29
QUADRO 4 – DETALHES PARA LINEARIDADE SEGUNDO ÓRGÃOS REGULADORES.....	31
QUADRO 5 – PARÂMETROS AVALIADOS NA ROBUSTEZ	48
QUADRO 6 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA O MÉTODO ANALÍTICO	63
QUADRO 7 – FATORES PARA TRIAGEM DA EXTRAÇÃO DAS RAÍZES.....	65
QUADRO 8 – FATORES PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DAS RAÍZES.....	67

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – FLORES DE <i>P. sidoides</i> (1) E <i>P. reniforme</i> (2).....	17
FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DO GÊNERO <i>Pelargonium</i> (CRONQUIST).....	18
FIGURA 3 – ESTRUTURA BASE DAS CUMARINAS DA ESPÉCIE <i>P. sidoides</i>	21
FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA UNCALINA (7-HIDROXI-5,6-DIMETOXICUMARINA).....	22
FIGURA 5 – PERFIL ESPECTRAL DA UNCALINA SEGUNDO WHITE (2006).....	24
FIGURA 6 – CORRELAÇÃO DAS CURVAS DE PADRÃO E PADRÃO + AMOSTRA.....	35
FIGURA 7 – ESTRUTURA DA UNCALINA COM ATRIBUIÇÃO DOS HIDROGÊNIOS	51
FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN- ¹ H (400 MHz) EM CDCl ₃ DA UNCALINA ISOLADA.....	52
FIGURA 9 – ESPECTRO RMN- ¹³ C (400 MHz) EM CDCl ₃ DA UNCALINA ISOLADA	53
FIGURA 10 – MAPA DE CONTORNO HSQC (400 MHz) EM CDCl ₃ DA UNCALINA ISOLADA.	55
FIGURA 11 – MAPA DE CONTORNO HMBC (400 MHz) UNCALINA ISOLADA.....	56
FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DAS CORRELAÇÕES DA UNCALINA	56
FIGURA 13 – MAPA DE CONTORNO HMBC (400 MHz) DA UNCALINA ISOLADA.....	57
FIGURA 14 – ESPECTRO DE MASSAS (EMS 1) DA UNCALINA	58
FIGURA 15 – PERFIL ESPECTRAL DA UNCALINA EM METANOL	59
FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DA UNCALINA ISOLADA	60
FIGURA 17 – ESPECTRO EM 3D DO CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE UNCALINA.....	60
FIGURA 18 – CURVA DE DSC APRESENTADA PELA UNCALINA.....	61
FIGURA 19 – CROMATOPLACA DE CCD DAS AMOSTRAS	62
FIGURA 20 – GRÁFICO DE PARETO PARA EFEITOS PADRONIZADOS	66
FIGURA 21 – GRÁFICOS COM AS INFLUÊNCIAS DOS PARÂMETROS PARA TRIAGEM	66
FIGURA 22 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EXTRAÇÃO DAS RAÍZES DE <i>P. sidoides</i>	68
FIGURA 23 – CROMATOGRAMA DAS RAÍZES.....	69
FIGURA 24 – CROMATOGRAMA DA TINTURA COM INJEÇÃO DIRETA (SEM PURIFICAÇÃO)....	69
FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DA TINTURA EXTRAÍDA POR LLE	70
FIGURA 26 – CROMATOGRAMA DA TINTURA EXTRAÍDA POR SPE	71
FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DO XAROPE APÓS EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA	71
FIGURA 28 – CURVAS DAS SOLUÇÕES PADRÃO ANALISADAS EM 0, 30, 60, 90 E 180 DIAS....	74
FIGURA 29 – COMPARAÇÃO DE PERFIL ESPECTRAL ENTRE PADRÃO E AMOSTRAS	76
FIGURA 30 – RESULTADO DA LINEARIDADE DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO	77
FIGURA 31 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO .	78
FIGURA 32 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE ANÁLISE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO...	80
FIGURA 33 – LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DAS RAÍZES.....	82
FIGURA 34 – RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE (RAÍZES).....	83
FIGURA 35 – CURVAS PADRÃO E PADRÃO + AMOSTRA PARA ANÁLISE DA RAIZ	86
FIGURA 36 – LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DA TINTURA POR LLE	90
FIGURA 37 – RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE (TINTURA POR LLE)	90
FIGURA 38 – LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DA TINTURA POR SPE	91

FIGURA 39 – RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE (TINTURA POR SPE)	91
FIGURA 40 – CURVA PADRÃO E PADRÃO + AMOSTRA PARA ANÁLISE DA TINTURA VIA LLE .	94
FIGURA 41 – CURVA PADRÃO E PADRÃO + AMOSTRA PARA ANÁLISE DA TINTURA VIA SPE	96
FIGURA 42 – ROBUSTEZ APRESENTADA PELOS MÉTODOS DE ANÁLISE DA TINTURA.....	98
FIGURA 43 – CROMATOGRAMA DO PLACEBO DO XAROPE DE PELARGÔNIO	99
FIGURA 44 – LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DO XAROPE.....	100
FIGURA 45 – RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE PARA O XAROPE.....	100
FIGURA 46 – CROMATOGRAMA DE GLICEROL (PLACEBO)	104

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\lambda_{\text{máx}}$	– Comprimento de onda de absorção máxima
ANVISA	– Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	– Cromatografia em camada delgada
CG	– Cromatografia gasosa
CIM	– Concentração inibitória mínima
CLAE	– Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	– Detector de arranjo de diodos
DSC	– Differential scanning calorimetry (calorimetria exploratória diferencial)
EM	– Espectrometria de massas
FDA	– Food and Drug Administration
HMBC	– Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	– Heteronuclear single quantum coherence
ICH	– International Conference on Harmonisation
INMETRO	– Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	– International Union of Pure and Applied Chemistry
LLE	– Liquid-liquid extraction (partição líquido-líquido)
MeCN	– Acetonitrila
min	– Minutos
m/z	– Relação massa-carga
ppb	– Partes por bilhão
ppm	– Partes por milhão
q.s.p	– Quantidade suficiente para
RMN- ¹³ C	– Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN- ¹ H	– Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SPE	– Solid phase extraction (extração em fase sólida)
USP	– United States Pharmacopoeia
UV-VIS	– Ultravioleta-visível

1 INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos representam uma classe de medicamentos largamente utilizada no país e constituem um mercado em potencial expansão. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados no Brasil, garante a segurança dos fitoterápicos por meio do registro de medicamentos, etapa na qual estes são avaliados quanto à sua segurança, eficácia e qualidade antes de serem expostos à venda para posterior utilização pela população (CARVALHO *et al.*, 2008). A garantia da qualidade dos derivados vegetais envolve análises físico-químicas e microbiológicas de matérias-primas e do produto acabado, como etapa fundamental para alcançar um padrão de qualidade necessário a um medicamento (BARA *et al.*, 2006).

As matérias-primas vegetais são constituídas por matrizes complexas, característica realçada pela insuficiência de dados fitoquímicos e pelo desconhecimento dos componentes responsáveis pelo efeito terapêutico. Essas características exigem a elaboração de métodos mais apurados para um controle de qualidade adequado. O desenvolvimento desses métodos deve iniciar pela seleção de um marcador, isto é, um componente ou grupo químico presente na matéria-prima vegetal, o qual é utilizado como referência para o seu controle de qualidade ou de seus derivados. É ideal que este marcador seja o princípio ativo ou preferencialmente relacionado ao efeito terapêutico (BRASIL, 2004).

De uma forma geral, aqueles fitoterápicos que utilizam como marcador um grupo químico e não apenas um componente isolado são analisados por metodologias espectrométricas de análise (UV-VIS), com preparação prévia da amostra por partição com solventes orgânicos e posterior reação colorimétrica. Entretanto, uma vez dentro de uma matriz complexa, é alta a possibilidade de ser encontrado um resultado falso-positivo. A utilização de técnicas analíticas de separação como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG) permitem diminuir a possibilidade de interferência de outros constituintes da amostra. Um importante fator limitante para o emprego dessas técnicas baseia-se na comercialização escassa de padrões de referência, item fundamental para a realização deste tipo de análise.

Um exemplo de matéria-prima vegetal que não apresenta marcador definido é a espécie *Pelargonium sidoides* D.C. Suas raízes são conhecidas há muito tempo pelos Zulus do sul da África para o tratamento de problemas gastrintestinais e infecções agudas e crônicas do trato respiratório (KOLODZIEJ; KAYSER, 1998; LIS-BALCHIN *et al.*, 1998). Atualmente, elas oferecem uma importante alternativa para a diminuição da prescrição precoce de antibióticos que podem levar a resistência bacteriana bem como provocar efeitos colaterais (HAIDVOGL *et al.*, 1996; KOLODZIEJ; KAYSER, 1998).

As apresentações comerciais contendo *P. sidoides*, largamente difundidas na Europa, consistem geralmente de soluções orais preparadas a base de extratos hidroalcoólicos das raízes da espécie, como o EPs[®] 7630 (Umckaloabo[®], Licença: Izo-Arzneimittel, Ettlingen, Alemanha) (HAIDVOGL *et al.*, 1996; KOCH; BIBER, 2007; KOLODZIEJ, 2007). No Brasil, duas soluções orais preparadas a partir desse extrato padronizado vêm sendo indicadas por pediatras como adjuvantes no tratamento de infecções respiratórias. A maioria dos produtos comercializados apresenta como especificação apenas a quantidade desse extrato presente no produto, sem relatar qual o marcador utilizado para o controle de qualidade.

A importância terapêutica apresentada por *P. sidoides* estimulou o interesse da empresa Herbarium Laboratório Botânico Ltda. Porém, o registro de um produto contendo esta espécie foi dificultado pelo alto custo demandado para a aquisição do padrão de uncalina. Este ativo apresenta-se como mais adequado para marcador da espécie por apresentar correlação terapêutica e ser específico da planta. Assim, este trabalho teve por objetivo primordial tornar possível a realização do controle de qualidade tanto da matéria-prima quanto do produto acabado, etapa fundamental para o deferimento do registro de um medicamento.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e validar métodos para quantificação de uncalina nos derivados da espécie *Pelargonium sidoides* D.C.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar, identificar e determinar a pureza da uncalina, marcador específico da espécie em estudo;
- Desenvolver e validar métodos analíticos, em CLAE, para quantificação de uncalina nas raízes de *P. sidoides*, tintura e um xarope contendo a tintura desta planta;
- Utilizar a metodologia desenvolvida para analisar produtos de *P. sidoides* comercializados no Brasil.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 O GÊNERO *Pelargonium*

O gênero *Pelargonium* compreende mais de 270 espécies, encontradas como pequenos arbustos perenes, que são limitados na sua distribuição geográfica. Cerca de 80% das espécies deste gênero são encontradas ao Sul da África e o restante ocorre na Austrália, Nova Zelândia e no extremo Oriente. Estas espécies normalmente crescem em gramados e algumas vezes entre arbustos e árvores em solos pedregosos. As plantas são verdes quando cultivadas, mas não sobrevivem à seca e inverno intensos (VAN DER WALT e VOSTER, 1985 *apud* MATIVANDLELA e MEYER, 2006). São normalmente conhecidas como ornamentais e estudos mostram a presença de ácidos orgânicos, derivados do ácido cinâmico, flavonóides, taninos, algumas cumarinas, fitoesteróis, alcalóides e óleo essencial (KOLODZIEJ, 2007). A infusão, o decocto e/ou aquecimento em leite fervente de tubérculos frescos são comumente utilizados como antidiarréicos ou contra infecções respiratórias. Além destes métodos, a raiz pode ser, ainda, mastigada diretamente ou misturadas aos alimentos na forma de pó (DREYER *et al.*, 1995).

3.2 A ESPÉCIE *Pelargonium sidoides* D.C.

Em 1897, o inglês Charles Henry Stevens foi às montanhas sul-africanas na tentativa de curar a tuberculose contraída e recebeu de um Zulu o preparado fervido da raiz, vulgarmente conhecida como Umckaloabo. Após três meses de tratamento com duas doses diárias, Stevens considerou-se curado. Convencido do restabelecimento da saúde levou a droga para Inglaterra a fim de introduzi-la na terapia da tuberculose, que ainda não possuía tratamento eficaz. (LIS-BALCHIN *et al.*, 1998; BLADT; WAGNER, 2007). Em 1920, Adrien Sechehaye, médico missionário suíço aprendeu o "Remédio de Stevens" e, durante nove anos, tratou 800 pacientes no seu país com preparações homeopáticas desta droga (ALONSO, 1998). Na Alemanha, extratos das raízes desta espécie têm sido comercializados desde 1983 para tratamento de infecções de ouvido, garganta e trato respiratório.

As raízes de *P. sidoides* (De Candolle, 1824), Geraniaceae, são encontradas na Europa como ornamental, pela beleza de suas flores (KOLODZIEJ; KAYSER, 1998). São popularmente conhecidas como kalverbossie, rabassam ou umckaloabo, que remetem aos vocábulos Zulus: "umkhulkane" (denotando as infecções respiratórias) e "uhlabo" (referente a dor torácica). A denominação botânica deriva do grego *Pelargos* = cegonha, numa alusão à semelhança dos frutos da espécie ao bico dessa ave (ALONSO, 1998).

A espécie caracteriza-se por apresentar raízes marrom-escuras, folhas caducas grandes, arredondadas na ponta e com a textura felpuda. Apresenta ainda, inflorescências vermelhas a vermelho-escuras com pétalas que variam de coloração. Essas variações de cor promoviam a dificuldade em diferenciar as espécies *P. sidoides* e *P. reniforme* (ALONSO, 1998; KOLODZIEJ, 2002). Não adulterada, elas podem ser distinguidas pela forma de suas folhas e pela coloração de suas flores. Enquanto a primeira espécie apresenta flores vermelho-escuras, comumente pretas, alongadas e delgadas, *P. reniforme*, por sua vez, apresentam flores de coloração rósea (FIGURA 1) (MITCHELL *et al.*, 1998; KOLODZIEJ, 2007).



FIGURA 1 – FLORES DE *P. sidoides* (1) E *P. reniforme* (2)

FONTE: WHITE (2006)

Por muito tempo houve a classificação de *P. sidoides* como uma variedade natural de *P. reniforme* e, por isso, não há uma diferenciação clara entre as duas espécies em literaturas mais antigas. Até 1820, ambas eram inseridas no gênero

Geranium, quando Sweet e outros botânicos classificaram-nas novamente no gênero *Pelargonium* (FIGURA 2)(KOLODZIEJ; KAYSER, 1998).

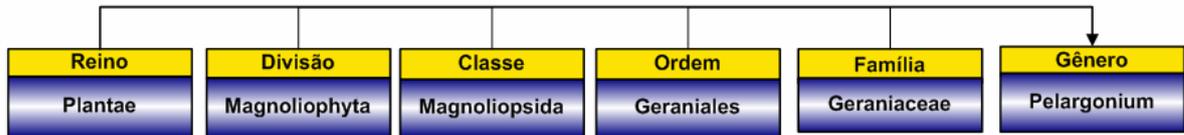


FIGURA 2 – CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA DO GÊNERO *Pelargonium* (CRONQUIST)

3.2.1 Atividades terapêuticas

Os produtos comercializados a partir das raízes de *P. sidoides* e *P. reniforme* são indicados para o tratamento de infecções agudas e crônicas, principalmente do trato respiratório e da região otorrinolaringológica. Os efeitos farmacológicos principais constituem-se de ação antimicrobiana e/ou estimulantes do sistema imunológico inespecífico (ERDELMEIER *et al.*, 2004).

Estudos apresentam a atividade de extratos de *P. sidoides* contra alguns cocos gram-positivos como *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Ainda, apresentam ações contra as bactérias gram-negativas *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Haemophilus influenzae* (KAYSER; KOLODZIEJ, 1995; KAYSER; KOLODZIEJ, 1997; KAYSER *et al.*, 2001).

Um estudo mostrou concentração inibitória mínima (CIM) de $5 \times 10^3 \text{ mg.L}^{-1}$ contra *H. influenzae*, *M. catarrhalis* e *S. pneumoniae* e patógenos fúngicos com os extratos de *P. sidoides* e sua combinação (1:1) com *P. reniforme* (MATINVADLELA *et al.*, 2006). Outro estudo comparou as atividades antimicrobianas de raízes, folhas e alguns componentes isolados das duas espécies frente a alguns microorganismos (TABELA 1). A eficácia das amostras analisadas em relação aos antibióticos comerciais penicilina G e eritromicina levaram KAYSER *et al.* (2001) a sugerir que a atividade farmacológica das espécies de pelargônio contra doenças respiratórias não é decorrente apenas da atividade antimicrobiana. A tabela destaca ainda, que a uncalina representa a cumarina com maior ação para todas as bactérias analisadas por apresentar menor concentração inibitória mínima (KAYSER; KOLODZIEJ, 1997; KOLODZIEJ, 2000).

TABELA 1 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DE *P. sidoides* E *P. reniforme*

EXTRATO	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>St. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>H. influenzae</i>
<i>P. sidoides</i> (r)	5	7,5	7,5	5	7,5	5
<i>P. sidoides</i> (f)	5	7,5	7,5	7,5	> 10	> 10
<i>P. reniforme</i> (r)	7,5	5	2,5	5	7,5	5
<i>P. reniforme</i> (f)	5	5	5	5	7,5	7,5
7-hidroxi-6-metoxicumarina (escopoletina)	0,5	0,5	0,5	0,4	1	1
7-hidroxi-5,6-dimetoxicumarina (uncalina)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,5	0,5
5,6,7- trimetoxicumarina	1	1	1	1	0,5	0,5
6,8-dihidroxi-5,7-dimetoxicumarina	0,22	0,25	0,22	0,2	0,5	0,5
Penicilina G	0,025	0,005	0,005	0,005	0,016	0,016
Eritromicina	0,025	0,025	0,125	0,005	0,125	0,005

FONTE: KAYSER e KOLODZIEJ (1997)

NOTA: Valores de concentração inibitória mínima (CIM) em mg.mL⁻¹; r: raízes; f: folhas. Destaque à CIM da uncalina

PORTEVIN *et al.* (1997) apontaram que as espécies *P. sidoides* e *P. reniforme*, além da ação antimicrobiana, também apresentam atividade antiinflamatória, em virtude da ação antioxidante de fenóis totais do extrato.

In vitro, o extrato alemão EPs[®] 7630 aumentou a frequência do batimento ciliar de forma significativa e sugere que a aplicação local de *P. sidoides* na mucosa nasal estimula a frequência do batimento das células ciliares locais, aumentando a função protetora contra infecções bacterianas (NEUGEBAUER *et al.*, 2005).

MATTHYS *et al.* (2003) mostraram, por meio de estudo randomizado e duplo-cego com 468 adultos, que o extrato EPs[®] 7630 é eficaz no tratamento de bronquite aguda. Medicamentos contendo essas duas espécies vêm se demonstrando úteis para o fortalecimento da defesa imunológica, principalmente decorrente da ação das cumarinas, como por exemplo, a uncalina. Ao lado da ação antibacteriana direta, têm-se características imunomodulatórias potentes devido às cumarinas hidrolisadas que promoveram a liberação de interleucinas e a conseqüente ativação dos macrófagos. Em contrapartida às substâncias isoladas, uma mistura do extrato (com ácido caféico, flavonóides e escopoletina) mostrou ter efeitos bacteriostáticos contra *Streptomyces aureus*. A presença de catequinas e

antocianinas, cujo efeito antimicrobiano é conhecido, enfatizam o perfil de ação antimicrobiana dessas espécies (DOME; SCHUSTER, 1996; HAIDVOGL *et al.*, 1996; BERBER; DEL-RIO-NAVARRO, 2001; BEREZNOY *et al.*, 2003; MATTHYS *et al.*, 2003; MATTHYS; HEGER, 2007).

Foi demonstrado que o extrato EPs[®] 7630, que contém apenas *P. sidoides*, induziu fortemente a expressão dos genes da óxido nítrico sintase e uma série de RNAm citocinas, que representam importantes agentes na resposta antibacteriana (HEIL; REITERMANN, 1994).

KOCH e BIBER (2007) avaliaram a ação anticoagulante das cumarinas da espécie em estudo, uma vez que esta característica é observada em outras cumarinas, como por exemplo, a varfarina. Não foi observada ação anticoagulante pela administração de EPs[®] 7630 por um período de 2 semanas. Os autores correlacionam esta ação com a presença de substituição de hidroxila na posição C-4 e um substituinte não polar na posição C-3, estruturas não observadas na espécie em questão (FIGURA 3 e QUADRO 1).

No Brasil, KIRK e NETO (2007) apresentaram um estudo de segurança e eficácia com 1667 pacientes submetidos a tratamento com Umckan[®], produto contendo 825 mg.mL⁻¹ de EPs 7630[®], sendo 53% destes pacientes com idade inferior a 6 anos de idade. A redução da sintomatologia foi observada em 90% dos pacientes dentre tosse ou vontade de tossir, febre, coriza, cefaléia e bronquite com 1,4% de taxa de efeitos adversos.

3.2.2 Principais constituintes químicos

Os principais constituintes das raízes de *P. sidoides* são proantocianidinas, constituídas principalmente por unidades de catequinas e galocatequinas, taninos com alto peso molecular bem como fenóis simples metabolizados a ácido gálico (KOLODZIEJ, 2002). Além destes componentes, destaca-se a presença de cumarinas simples com alto grau de oxigenação (tri e tetra oxigenadas), uma vez que aparentam ser um sinal característico da estrutura do gênero *Pelargonium* e o provável grupo responsável pela ação farmacológica (FIGURA 3, QUADRO 1 e TABELA 2)(KAYSER; KOLODZIEJ, 1995; KAYSER; KOLODZIEJ, 1997; LATTÉ *et al.*, 2000; KOLODZIEJ *et al.*, 2003; GODECKE *et al.*, 2005; KOCH; BIBER, 2007).

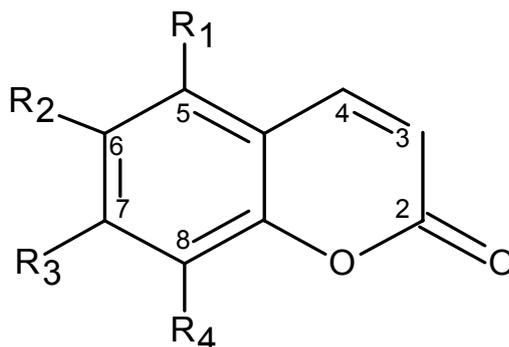


FIGURA 3 – ESTRUTURA BASE DAS CUMARINAS DA ESPÉCIE *P. sidoides*

Nº	OXIG.	COMPOSTO	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	6,7	7-hidroxi-6-metoxicumarina	H	OCH ₃	OH	H
2	5,6,7	7-hidroxi-5,6-dimetoxicumarina	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
3		7-acetoxi-5,6-dimetoxicumarina	OCH ₃	OCH ₃	OAc	H
4		5,6,7- trimetoxicumarina	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
5		6-hidroxi-5,7-dimetoxicumarina	OCH ₃	OH	OCH ₃	H
6		5,6-diidroxi-7-metoxicumarina	OH	OH	OCH ₃	H
7		6,7,8-triidroxicumarina	H	OH	OH	OH
8	6,7,8	6,8-diidroxi-7-metoxicumarina	H	OH	OCH ₃	OH
9		8-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina	H	OCH ₃	OCH ₃	OH
10		6,8-diidroxi-5,7-dimetoxicumarina	OCH ₃	OH	OCH ₃	OH
11	5,6,7,8	8-hidroxi-5,6,7-trimetoxicumarina	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH
12		5,6,7,8-tetrametoxicumarina	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
13		5,6-dimetoxicumarina-7-sulfato	OCH ₃	OCH ₃	OSO ₃ H	H
14		6-hidroxi-5,7-dimetoxicumarina-8-sulfato	OCH ₃	OH	OCH ₃	OSO ₃ H
15		8-hidroxi-5,7-dimetoxicumarina-6-sulfato	OCH ₃	OSO ₃ H	OCH ₃	OH

QUADRO 1 – DESCRIÇÃO DAS ESTRUTURAS DAS CUMARINAS PRESENTES EM *P. sidoides*

FONTE: LATTÉ *et al.* (2000)

NOTA : Oxic.: posição dos radicais contendo oxigênio

Estudos da composição química das raízes de *P. sidoides* e *P. reniforme* apontam que ambas apresentam estruturas baseadas em cumarinas oxigenadas nas posições C-7 e C-8. Além disso, a estrutura de 6,7,8-triidroxicumarina representa uma característica comum e específica a estas duas espécies.

Apesar da alta semelhança em cumarinas, nota-se que apenas *P. reniforme* apresenta o arranjo 5,6,7-trioxigenado além de hidroxila livre em C-6. Em contrapartida, *P. sidoides* exibe dimetoxilas nas posições C-5 e C-6 bem como

cumarinas sulfatadas e glicosiladas (TABELA 2). Como moléculas exclusivas desta espécie, tem-se 7-hidroxi-5,6-dimetoxicumarina (uncalina) e 5,6,7-trimetoxicumarina, que antes haviam sido equivocadamente relatadas nas duas espécies em decorrência de uma ambigüidade taxonômica (WAGNER *et al.*, 1974; KAYSER; KOLODZIEJ, 1997; KOLODZIEJ, 2007).

TABELA 2 – CUMARINAS PRESENTES NAS RAÍZES DE *P. sidoides* E *P. reniforme*

Nº	COMPOSTO	NOME	<i>P. sidoides</i> ¹	<i>P. reniforme</i> ¹
1	7-hidroxi-6-metoxicumarina	Escopoletina	0,002	0,0003
2	7-hidroxi-5,6-dimetoxicumarina	Uncalina	0,02	
3	7-acetoxi-5,6-dimetoxicumarina		0,0004	
4	5,6,7- trimetoxicumarina		0,003	
5	6-hidroxi-5,7-dimetoxicumarina	Fraxinol		0,0003
6	5,6-diidroxi-7-metoxicumarina	Isofraxetina		0,004
7	6,7,8-triidroxicumarina		0,0004	0,002
8	6,8-diidroxi-7-metoxicumarina		0,0002	
9	8-hidroxi-6,7-dimetoxicumarina	Fraxidina		0,002
10	6,8-diidroxi-5,7-dimetoxicumarina		0,01	
11	8-hidroxi-5,6,7-trimetoxicumarina			0,001
12	5,6,7,8-tetrametoxicumarina	Artelina	0,0007	
13	5,6-dimetoxicumarina -7-sulfato		0,007	
14	6-hidroxi-5,7-dimetoxicumarina-8-sulfato		0,006	
15	8-hidroxi-5,7-dimetoxicumarina-6-sulfato			

FONTE: KAYSER E KOLODZIEJ (1995); LATTÉ *et al.* (2000); KOLODZIEJ (2007);

NOTA: Destaque ao comportamento da uncalina, sua concentração superior em *P. sidoides* e não existente em *P. reniforme*. ¹Percentual relativo ao peso seco

KOLODZIEJ (2002; 2007) destaca, ainda, que a uncalina (FIGURA 4) é exclusiva das raízes e partes aéreas de *P. sidoides* e sua concentração é superior às demais cumarinas encontradas na planta. Estas afirmações permitem sugerir a uncalina como marcador para análise qualitativa desta espécie (KOLODZIEJ, 2007).

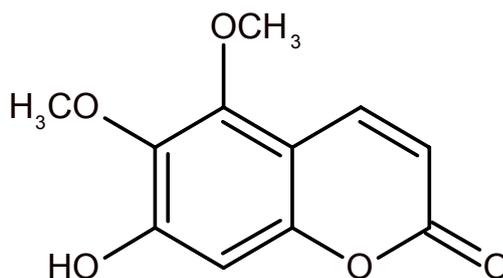


FIGURA 4 – ESTRUTURA QUÍMICA DA UNCALINA (7-HIDROXI-5,6-DIMETOXICUMARINA)

3.2.3 Métodos analíticos

A Farmacopéia Européia apresenta o controle de qualidade das raízes de *P. sidoides* e *P. reniforme* em mínimo 2% de taninos, expressos como pirogalol. Esta análise utiliza o procedimento geral para taninos de alto peso molecular, retidos em pó de pele (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2008). Porém, nota-se que esta análise não diferencia as espécies. Os métodos que serão discutidos a seguir trazem a avaliação do analito uncalina, o que traduz em procedimentos específicos da espécie em estudo.

3.2.3.1 Métodos cromatográficos

Para a avaliação cromatográfica de alguns constituintes presentes em amostras de *P. sidoides*, KAYSER E KOLODZIEJ (1997) propuseram um método analítico com utilização de coluna de fase reversa C₁₈ de 250 mm e fase móvel metanol:água (9:1 a 3:7) e fluxo de 1,5 mL.min⁻¹ para a determinação de ácido gálico (4,20 min), ácido gálico metil éster (14,60 min), catequina (16,48 min), escopoletina (22,90 min), diidroxí-5,7-dimetoxicumarina (26,92 min), uncalina (**32,94 min**) e 5,6,7-trimetoxicumarina (45,12 min). A proporção utilizada como fase móvel foi corrigida por WHITE (2006) e confirmada pelos autores como sendo água:metanol e não o contrário, como descrito. WHITE (2006) sugeriu a otimização do método anteriormente descrito, para quantificar apenas a uncalina, propondo um gradiente de acetonitrila:água (7:3 a 3:7) com adição de 0,05% de ácido trifluoracético a 1 mL.min⁻¹, em coluna de 12,5 cm de comprimento. Esta alteração proporcionou a redução do tempo de retenção da uncalina de 32,9 para 7,7 minutos.

Uma alternativa interessante para a determinação de uncalina pode ser obtida utilizando sistemas cromatográficos para determinação de escopoletina (7-hidroxi-6-metoxicumarina) ou cumarina (1,2-benzopirona). A cumarina é o marcador utilizado em amostras de guaco, como *Mikania glomerata* ou *Mikania levigatae*, e alguns métodos para sua determinação estão descritos na literatura. CELEGHINI *et al.* (2001) avaliou amostras de guaco utilizando CLAE com coluna C₁₈ (250 mm x 4 mm x 5 µm) a uma temperatura de 30 °C. A eluição com acetonitrila:água (40:60) a 1 mL.min⁻¹ permitiu análise da cumarina em cerca de

4 min. A avaliação de amostras de guaco também foi realizada por SANTOS (2005), utilizando coluna C_{18} (150 mm x 3,9 mm x 4 μ m) a 30 °C. As condições cromatográficas incluíam a fase móvel acetonitrila:ácido acético 0,01%, com pH 3,9 (20:80) sob fluxo de 1,2 min, obtendo um tempo de retenção de cerca de 11 min para a cumarina.

3.2.3.2 Métodos de detecção e visualização

As cumarinas possuem um espectro no ultravioleta (UV) característico, o qual é fortemente influenciado pela natureza do solvente e posição dos grupos constituintes. Esta característica permite a detecção em cromatografia líquida acoplada a detector de ultravioleta bem como visualização das manchas nas placas de cromatografia em camada delgada (CCD) (KUSTER; ROCHA, 2004).

WAGNER *et al.* (1974) encontraram um valor de 221 e 330 nm como comprimento de onda máximo ($\lambda_{\text{máx}}$) da uncalina em solução metanólica, enquanto KAYSER e KOLODZIEJ (1995) e WHITE (2006) citaram 210 e 328 nm nas mesmas condições. A FIGURA 5 destaca a representação gráfica do perfil espectral apresentado pela solução metanólica da uncalina isolada por WHITE (2006).

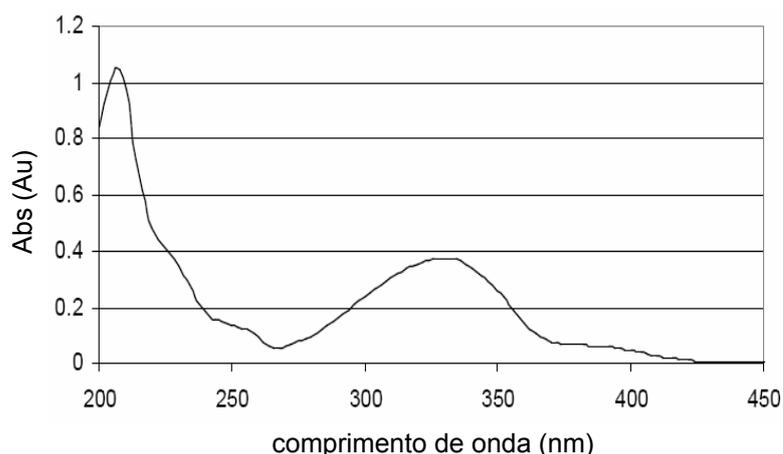


FIGURA 5 – PERFIL ESPECTRAL DA UNCALINA SEGUNDO WHITE (2006)

3.2.3.3 Métodos de preparo de amostras

O conceito básico de um método para preparo de amostras é converter a matriz real em uma amostra adequada para a análise. Os procedimentos mais comuns de preparo de amostras incluem: remoção de interferentes potenciais, aumento da concentração do analito e conversão do analito em uma forma mais adequada à separação ou detecção, evitando a dependência da variação da matriz (SMITH, 2003).

Para extração da uncalina nas raízes de *P. sidoides*, a acetona e combinações acetona e água têm sido utilizadas como principais solventes extratores. WHITE (2006) demonstrou que a extração com acetona foi cinco vezes superior à extração com etanol (KAYSER; KOLODZIEJ, 1995; KAYSER; KOLODZIEJ, 1997; LATTÉ *et al.*, 2000; KOLODZIEJ *et al.*, 2003).

Após extração, a amostra pode necessitar de uma pré-purificação (*clean up*), que visa eliminar contaminantes que possam interferir na análise além de preservar os componentes do sistema cromatográfico.

A forma de purificação mais comumente utilizada, principalmente para fitoterápicos, é a partição líquido-líquido (LLE). Uma alternativa a ela pode ser a extração em fase sólida (SPE), que constitui uma técnica de separação líquido-sólido, baseada no princípio de separação cromatográfica. Usualmente emprega-se uma pequena coluna aberta (cartucho de extração), a qual contém a fase sólida ou fase estacionária (LANÇAS, 2004). FRITZ e MACKA (2000) destacam algumas vantagens da SPE em relação à LLE como rapidez e menor manipulação, utilização de uma quantidade reduzida de solvente orgânico e ainda, possibilidade de separação em multi-estágios pela hifenação de cartuchos.

Uma separação por SPE deve ser realizada em 4 etapas:

- acondicionamento: passagem de um pequeno volume de acetonitrila ou metanol para eluição de possíveis resíduos de solventes orgânicos ou impurezas adsorvidos na superfície das partículas do recheio;
- adsorção: passagem da amostra líquida pelo cartucho, com aplicação de pressão, mantendo o fluxo de forma constante. SMITH (2003) enfatiza a importância do pré-acondicionamento e o controle do fluxo;

- lavagem: as amostras mais comuns extraídas por SPE constituem de analitos orgânicos extraídos de amostras aquosas. Utiliza-se água pura ou água contendo cerca de 10 a 20% de componente orgânico;
- eluição: a remoção do analito retido no leito do cartucho é comumente realizada com solvente orgânico. Deve-se selecionar um solvente capaz de retirar facilmente o analito do cartucho e ser possível de remoção (evaporação, por exemplo) ou que seja compatível com o método analítico selecionado (FRITZ; MACKA, 2000).

A utilização mais comum de SPE é a da purificação de amostras aquosas. Nestes casos, os cartuchos mais comuns são os de fase reversa, sendo aqueles contendo sílica C₁₈, os mais populares. A retenção de fenóis por sílica C₁₈ é resultante das interações apolares de Wan der Waals entre analitos e o sorbente. Estes fenóis podem ser eluídos com acetato de etila, metanol, acetonitrila e acetona. O volume dependerá do tipo de solvente, quantidade do sorbente, quantidade e a polaridade do analito (FRITZ; MACKA, 2000; RODRÍGUEZ *et al.*, 2000).

3.2.4 Planejamento fatorial de experimentos

Um dos problemas mais comuns para quem faz experimentos é determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre uma ou outra variável de interesse. Tal informação não é possível com a realização de experimentos univariados. Para estudar estes efeitos, pode-se utilizar o planejamento fatorial de experimentos (NETO *et al.*, 2003; ZIVANOVIC *et al.*, 2008).

Para tal, convencionou-se a realização da triagem e otimização. A primeira irá considerar os fatores que possuem ou não influência significativa nos resultados bem como suas combinações, sem, necessariamente a preocupação quantitativa. A otimização, por sua vez, tem por finalidade avaliar quais os valores ótimos para cada parâmetro julgado significativo na triagem.

Para a triagem, sendo κ variáveis controladas pelo experimentador, um planejamento completo de dois níveis (dois valores) exige a realização de $2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^{\kappa}$, sendo chamado de planejamento fatorial 2^{κ} . Para fazer e analisar os experimentos constrói-se uma matriz de combinações, denominada de matriz de planejamento, que pode ser realizada em duplicata de forma aleatória para permitir

estimar o erro experimental de uma resposta individual, sendo a extensão deste erro, importante para avaliar se existem ou não efeitos significativos para atribuir à ação dos fatores (NETO *et al.*, 2003). Quando o número de fatores investigados é alto, os efeitos principais tendem a ser mais significativos que a interação entre dois fatores, que por sua vez são mais importantes que a interação por três fatores e assim por diante. Nestes casos, a realização da metade dos ensaios do planejamento completo (2^{k-1}) permite reduzir o número de experimentos sem perda significativa da influência.

A otimização é avaliada pela metodologia de superfície de resposta (MSR – response surface methodology), técnica baseada em planejamento fatorial que vem sendo utilizada com muito sucesso na modelagem de diversos processos industriais. As equações resultantes desta análise podem ser representadas graficamente como superfícies de resposta, que podem ser utilizadas de três formas: descrever como as variáveis do teste afetam a resposta, determinar a inter-relação entre as variáveis em teste e descrever os efeitos combinados de todas as variáveis em teste sobre a resposta (MONTGOMERY, 2001). Para esta avaliação, os modelos mais utilizados são o planejamento composto central (*central composite design*) e *Box-Behnken*.

Um planejamento composto central com dois fatores considera os seguintes ensaios experimentais:

- a) pontos cúbicos: que caracteriza o cruzamento dos níveis mais altos e mais baixos de cada variável;
- b) pontos centrais: que considera réplicas do centro do cubo;
- c) pontos estrela: que avalia dos pontos de cruzamento dos níveis médios de todas as variáveis, exceto com um nível extremo da última variável.

Para este modelo, o número total de ensaios será $n = 2^k + 2k + m$, sendo 2^k , o número de pontos fatoriais; $2k$, o número de pontos axiais (de estrela); e m , o número de replicações do ponto central.

O modelo de *Box-Behnken* considera variações em três níveis: cubo baixo, central e cubo alto. Cada experimento cruza o nível extremo das duas ou três variáveis do projeto com os valores médios das outras, além de incluir os pontos centrais.

3.2.5 Métodos para isolamento da uncalina

KAYSER e KOLODZIEJ (1995) apresentaram uma separação cromatográfica para fins de isolamento das cumarinas extraídas a partir de um extrato das raízes de *P. sidoides*. A metodologia propôs separação com solventes de polaridades crescentes e partição em Sephadex[®] LH-20, sílica gel e sílica C₁₈. A purificação final foi realizada por cromatografia líquida de média pressão (MPLC) usando como eluente misturas de água e metanol.

O protocolo descrito por LATTÉ *et al.* (2000) citava, para os mesmos fins, o uso do resíduo aquoso de *P. sidoides* com utilização de coluna preparativa de fase reversa C₁₈ (250 x 20 mm), empregando a mistura metanol:água (9:1 a 3:7 v/v) como fase móvel em 40 min de corrida.

KOLODZIEJ *et al.* (2003) utilizaram esta técnica para fracionar as raízes pulverizadas e secas de *P. sidoides*, com extração exaustiva com acetona:água (4:1, v/v). A análise cromatográfica indicou que as raízes possuíam 0,041% de uncalina (base seca).

3.3 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Um método analítico desenvolvido deve ser validado para assegurar sua confiabilidade e adequada aplicação. A validação representa um conjunto de etapas que desafiam a metodologia a fim de garantir que os resultados fornecidos serão exatos, específicos, precisos e invariáveis frente a pequenas alterações possíveis do método.

Segundo RIBANI *et al.*, 2004, é possível distinguir a validação em dois tipos:

- validação “in house”: consiste em avaliar a confiabilidade de um novo método desenvolvido localmente ou em verificar a aplicação de um método obtido de outras fontes;
- validação completa: envolve um estudo mais profundo de desempenho, avaliando a reprodutibilidade interlaboratorial do método. Este conjunto de testes constitui a exigência para a inclusão de uma metodologia oficial.

Existe vasta literatura na área de medições químicas e recomendações publicadas por organizações nacionais e internacionais. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são os órgãos credenciados para avaliar a competência destes ensaios. Os parâmetros de validação preconizados pelo ICH (International Conference on Harmonisation) e o INMETRO, por meio da norma DOQ-CGCRE-008, de 2003, são: especificidade e seletividade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, linearidade, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência (*bias*), precisão, robustez e incerteza de medição. Já a ANVISA, por meio da RE nº 899, de 29/05/03, determina os testes segundo a categoria da análise (QUADRO 2).

CATEGORIA	FINALIDADE DO TESTE
I	Determinação de princípios ativos em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaios limite para determinar impurezas de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (ex. dissolução, liberação de ativo)
IV	Testes de identificação

QUADRO 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS TESTES PARA A ANVISA

FONTE: BRASIL, 2003

PARÂMETRO	CATEGORIA I	CATEGORIA II		CATEGORIA III	CATEGORIA IV
		QUANTITATIVO	ENSAIO LIMITE		
Especificidade	Sim	Sim	Sim	1	Sim
Linearidade	Sim	Sim	Não	1	Não
Intervalo	Sim	Sim	1	1	Não
Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
Precisão Intermediária	2	2	Não	2	Não
Limite de detecção	Não	Não	Sim	1	Não
Limite de quantificação	Não	Sim	Não	1	Não
Exatidão	Sim	Sim	1	1	Não
Robustez	Sim	Sim	Sim	Não	Não

QUADRO 3 – ENSAIOS PARA VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

FONTE: BRASIL, 2003

NOTA: Destaque à categoria em que se enquadram as amostras avaliadas neste trabalho. ¹Pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico; ²se houver comprovação de reprodutibilidade não é necessária a comprovação de precisão intermediária

3.3.1 Especificidade e seletividade

Um método específico é aquele que produz resposta para uma única substância de interesse e um método seletivo é aquele capaz de quantificar exatamente um ou mais analitos em presença de interferentes. A avaliação destes parâmetros é de fundamental importância uma vez que componentes da matriz ou produtos de degradação podem sobrepor à resposta do analito de interesse (EURACHEM, 1998; FDA, 2001; THOMPSON *et al.*, 2002; ICH, 2005). Esses dois termos são frequentemente confundidos e, por isso, convencionou-se utilizar apenas a seletividade, como sugerido pela IUPAC, uma vez que poucos são os métodos que respondem apenas a uma substância (HUBER, 2001; THOMPSON *et al.*, 2002; INMETRO, 2003).

Segundo SHABIR (2003) e RIBANI *et al.* (2004), a seletividade pode ser avaliada por alguns testes como:

- a) comparar a matriz isenta da substância de interesse e esta adicionada de padrão. O analito deve se apresentar isolado de qualquer possível interferente;
- b) caso a matriz isenta da substância não seja possível, pode-se confrontar uma curva analítica do padrão e outra do padrão adicionado à amostra. Curvas paralelas indicam que a matriz não interfere na determinação da substância de interesse;
- c) analisar se as respostas (picos) do analito na amostra e de uma substância de referência pura são equivalentes. Para isto, deve-se utilizar detectores modernos como arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas (EM) (FDA, 2001; HUBER, 2001);
- d) avaliar a semelhança do resultado do método com relação a outra técnica mais específica como espectroscopia de massas, ressonância magnética nuclear ou espectroscopia no infravermelho.

3.3.2 Linearidade e intervalo de aplicação

Linearidade consiste na habilidade do método analítico de produzir resultados diretamente proporcionais à concentração do analito dentro de um

intervalo especificado (EURACHEM, 1998; SWARTZ; KRULL, 1998; FDA, 2001; BARROS, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005). A indicação da faixa de concentração para a realização do teste varia de acordo com o órgão regulador (QUADRO 4).

ÓRGÃO	NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO	RANGE PARA ANALITO NA MATÉRIA-PRIMA OU PRODUTO ACABADO ¹
IUPAC	6 ou mais pontos	0 – 150% ou 50 – 150% em duplicata, no mínimo
ANVISA	5 concentrações	80 a 120%
INMETRO	7 ou mais pontos	Abrange limite de quantificação e especificação do produto
ICH	5 ou mais pontos	80 a 120%
USP	5 ou mais pontos	80 a 120%
FDA	-	80 a 120%

QUADRO 4 – DETALHES PARA LINEARIDADE SEGUNDO ÓRGÃOS REGULADORES

FONTE: ICH, 1995; FDA, 2001; THOMPSON *et al.*, 2002; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; USP, 2007

NOTA: ¹Percentual sobre a concentração teórica do teste

A linearidade do método deve ser avaliada, inicialmente, por meio da obtenção do coeficiente de correlação (r) da curva obtida pelo gráfico (resposta *versus* concentração do analito). Uma correlação satisfatória entre os pontos resultará em um valor próximo a 1 (um). De acordo com a RE 899 da ANVISA, esse valor deve ser igual ou superior a 0,99; segundo o INMETRO (2003), superior a 0,90 e, para o FDA (2001), os métodos cromatográficos devem apresentar coeficiente de correlação superior a 0,999 (BRASIL, 2003). Depois de observada relação linear aparente do método, recomenda-se avaliar os resultados por ferramentas estatísticas apropriadas como soma residual dos quadrados mínimos (BRASIL, 2003). O gráfico de resíduos deve dar a impressão de ter sido produzido por uma distribuição normal, com pontos dispostos de forma aleatória, de modo a não indicar que sua variação é constante (PIMENTEL; NETO, 1996).

O intervalo de aplicação compõe a faixa de concentração do analito que apresenta exatidão, precisão e linearidade aceitáveis (BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP), 2007). Conforme o tipo de ensaio, a ANVISA sugere algumas faixas para análise:

- a) determinação quantitativa do analito em matérias-primas ou de formas farmacêuticas: de 80 a 120% da concentração do teste;

- b) determinação de impurezas: do nível de impureza até 120% do limite máximo especificado;
- c) uniformidade de conteúdo: de 70 a 130% da concentração teórica do teste;
- d) ensaio de dissolução: de $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para intervalo.

Para este trabalho, destaca-se a faixa de 80 a 120%, uma vez que serão trabalhadas matérias-primas e um produto acabado (BRASIL, 2003).

3.3.3 Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção consiste na menor concentração detectável do analito na amostra, mas não necessariamente quantificável. O limite de quantificação representa a menor concentração determinada na amostra com precisão e exatidão aceitáveis nas condições experimentais (FDA, 2001; BRASIL, 2003).

A determinação do LD pode ser obtida por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectado. Este valor pode ser determinado por método visual, método da relação sinal-ruído ou baseados nos parâmetros de curva analítica.

O LQ pode ser estabelecido por meio de análise de quantidades decrescentes e baixas de analito até a menor concentração em que os dados se mostram com precisão e exatidão aceitáveis. Este poderá ser avaliado por meio da relação sinal-ruído ou baseado na curva analítica (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). A análise desses limites podem ser avaliados pelos métodos descritos:

- a) método visual: utilizado para limite de detecção, este método avalia a menor concentração injetada que permite a visualização de um pico cromatográfico (RIBANI *et al.*, 2004);
- b) método da relação sinal-ruído: este método é realizado para LD e LQ em procedimentos que apresentam ruído na linha de base, submetendo a matriz ao teste a avaliando seu ruído. Para limite de detecção, considera-se um valor de concentração que corresponde de 3 a 3,3 vezes superior à concentração que equivale a área do ruído observado. Para limite de quantificação, o valor aceitável será de 10 a 20 vezes superior a esta concentração (HUBER, 2001; BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004);

c) método baseado em parâmetros da curva analítica: para cálculo deste método, uma curva analítica deverá ser feita utilizando a matriz contendo o composto de interesse na faixa de concentração próxima ao limite de detecção, que poderá ser sugerido pelos métodos acima descritos. Nesta avaliação, a RE 899 da ANVISA descreve a EQUAÇÃO 1 para limite de detecção e a EQUAÇÃO 2 para limite de quantificação (BRASIL, 2003) equações estas, semelhantes às citadas por RIBANI et al. (2004). A alteração ocorre no numerador em que, ao invés do desvio padrão, é utilizado o coeficiente linear da curva analítica. A EQUAÇÃO 3 mostra o limite de detecção e, a EQUAÇÃO 4, o limite de quantificação.

$$LD = \frac{DP \times 3}{a} \quad (1)$$

$$LQ = \frac{DP \times 10}{a} \quad (2)$$

$$LD = \frac{3,3 \times b}{a} \quad (3)$$

$$LQ = \frac{10 \times b}{a} \quad (4)$$

Onde:

DP: desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação;

a: inclinação da curva de calibração (sendo $y = ax + b$);

b: coeficiente linear da equação da reta da curva de calibração.

RIBANI *et al.* (2004) destaca que o ruído é dependente de alguns parâmetros cromatográficos como, por exemplo, o tempo de utilização da coluna. Desta maneira, a avaliação dos limites considerando este ruído pode trazer interferências nos resultados. Os autores concluem, ainda, que o método baseado na curva analítica é estatisticamente mais confiável.

3.3.4 Precisão

Consiste na avaliação da dispersão dos resultados entre ensaios múltiplos e independentes de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas (HUBER, 2001; BARROS, 2002; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). Este parâmetro de validação é considerado em três níveis:

- a) repetibilidade: concordância entre os resultados de medições sucessivas mantendo procedimento, analista, instrumento e local. Devem ser realizadas nove determinações com três concentrações altas, médias ou baixas ou seis determinações a 100% da concentração do teste;
- b) precisão intermediária: concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas em diferentes dias, equipamentos e/ou analistas;
- c) reprodutibilidade: concordância entre resultados obtidos por laboratórios diferentes, geralmente para padronização de métodos analíticos, por exemplo, para inclusão de metodologias em farmacopéias.

A precisão de um método analítico pode ser expressa pelo desvio padrão e o desvio padrão relativo (DPR %) ou coeficiente de variação (CV %) de uma série de medidas:

$$DPR \text{ ou } CV (\%) = \frac{DP \times 100}{CMD} \quad (5)$$

Onde:

DP: Desvio padrão;

CMD: Concentração média determinada.

A RE 899 da ANVISA preconiza que o desvio padrão relativo não deve ser superior a 5% (BRASIL, 2003). O FDA (2001) sugere para métodos cromatográficos um valor inferior a 1% para preparações farmacêuticas, porém, discute que, dependendo da matriz, esse valor poderá variar de 2% a maior que 20%.

Para o INMETRO (2003), o conceito repetibilidade é chamado de repetitividade e pode ser determinado por meio da análise de padrões, material de referência ou adição de padrão ao branco em várias concentrações na faixa de trabalho. Sugerem-se sete ou mais repetições para o cálculo do desvio padrão para cada concentração, chamado desvio padrão de repetitividade.

3.3.5 Exatidão

A concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como verdadeiro é chamada de exatidão (EURACHEM, 1998; FDA, 2001; HUBER, 2001; BARROS, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Os testes mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são:

- a) materiais de referência certificados: são comparados os valores obtidos pelo laboratório da mesma amostra padrão com os valores certificados no material de referência;
- b) adição de padrão: este método é utilizado em casos cuja obtenção da matriz sem o analito de interesse seja difícil ou impossível. São adicionadas quantidades conhecidas do analito na matriz da amostra, no início da execução da metodologia. Estas amostras com o padrão incorporado são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constroem-se duas curvas analíticas (uma de padrão e outra com o padrão adicionado de amostra) em que se relaciona a quantidade de padrão adicionado (não considerar a quantidade teórica do analito presente na amostra) à área obtida no cromatograma. O ponto onde a reta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está sendo determinada, sem qualquer adição de padrão. A extrapolação da reta de padronização externa define, no eixo das abscissas, a concentração da substância na amostra analisada (FIGURA 6);

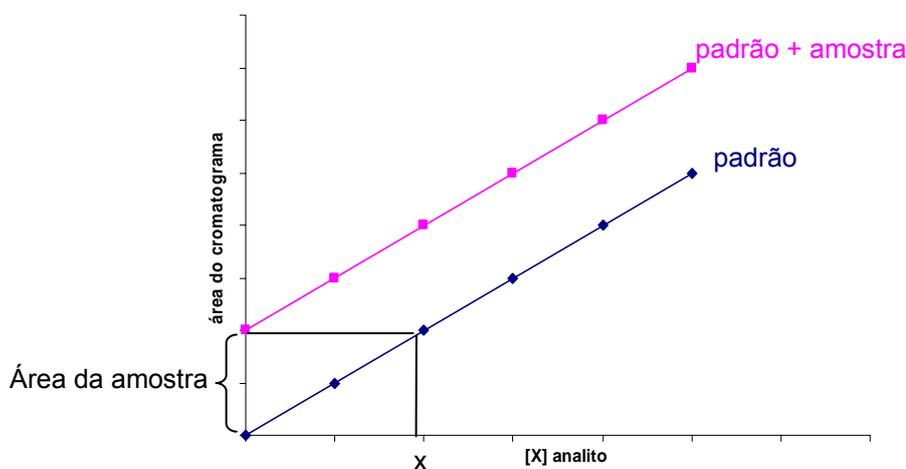


FIGURA 6 – CORRELAÇÃO DAS CURVAS DE PADRÃO E PADRÃO + AMOSTRA

c) ensaios de recuperação: pode ser verificada pela análise de uma amostra padronizada por outro método validado ou pela recuperação de uma quantidade conhecida da substância de referência adicionada à matriz. A ANVISA preconiza que os ensaios sejam realizados por nove determinações, contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, três concentrações, baixa, média e alta, com três réplicas, cada. O resultado será expresso em percentual (%) de recuperação (HUBER, 2001; BRASIL, 2003):

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração média experimental} \times 100}{\text{Concentração teórica}} \quad (6)$$

Vários autores bem como a maioria dos compêndios oficiais não recomendam uma faixa de recuperação para que um método possa ser considerado exato. Uma exceção é HUBER (2001), que sugere diferentes faixas de recuperação de acordo com a concentração do analito (TABELA 3).

TABELA 3 – VALORES ACEITÁVEIS DE EXATIDÃO SEGUNDO HUBER (2001)

ANALITO (%)	FAIXA DO ANALITO	UNIDADE	RECUPERAÇÃO (%)
100	1	100%	98 - 102
≥10	10 ⁻¹	10%	98 - 102
≥1	10 ⁻²	1%	97 - 103
≥0.1	10 ⁻³	0,1%	95 - 105
0,01	10 ⁻⁴	100 µg.mL ⁻¹	90 - 107
0,001	10⁻⁵	10 µg.mL⁻¹	80 - 110
0,0001	10⁻⁶	1 µg.mL⁻¹	80 - 110
0,00001	10 ⁻⁷	100 ng.mL ⁻¹	80 - 110
0,000001	10 ⁻⁸	10 ng.mL ⁻¹	60 - 115
0,0000001	10 ⁻⁹	1 ng.mL ⁻¹	40 - 120

FONTE: HUBER (2001)

NOTA: Destaque às principais faixas contempladas neste trabalho

3.3.6 Robustez

A robustez de um método analítico representa sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros e indica sua confiabilidade

durante o uso normal. Há um consenso na literatura de que esse teste seja realizado durante o desenvolvimento do método (EURACHEM, 1998; FDA, 2001; HUBER, 2001; SOARES, 2001; BARROS, 2002; THOMPSON *et al.*, 2002; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A robustez de um método em CLAE pode ser avaliada, por exemplo, por alterações na concentração de solvente orgânico, pH e força iônica da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel, bem como o tempo de extração ou agitação (THOMPSON *et al.*, 2002; BRASIL, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ICH, 2005).

De acordo com o INMETRO (2003) para determinar a robustez pode-se recorrer ao teste de *Youden*, que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança nos resultados por ele fornecidos.

Constatando-se a susceptibilidade do método a variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento (BRASIL, 2003).

4 MATERIAL E MÉTODOS

MATÉRIAS-PRIMAS

As raízes de *Pelargonium sidoides* D.C. foram fornecidas pela empresa African Bush (Estados Unidos). O material recebido foi armazenado à temperatura ambiente, com controle de umidade. Estas amostras foram ainda, trituradas e tamisadas. A tintura desta espécie, cedida pela empresa Finzelberg (Alemanha), foi produzida por percolação das raízes com etanol 11% (v/v) em água e contém, segundo o laudo do fornecedor, 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de uncalina. O xarope foi preparado pela adição de tintura a uma mistura de excipientes (sorbato de potássio, xarope de sacarose, aroma e água), contendo 6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de uncalina.

PRINCIPAIS REAGENTES E ITENS DE ANÁLISE

- Acetona, etanol, metanol, éter etílico e hexano grau P.A. da marca Vetec;
- Acetonitrila para CLAE, da divisão Lichrosolv da marca Merck;
- Ácido acético, éter e tolueno para CCD, da marca Merck;
- Água purificada em ultra-purificador Milli-Q;
- Padrão de escopoletina da marca Phytolab, contendo 100% de pureza declarada;
- Cartucho para SPE ChromaBond® e ChromaBond® ec, marca Macherey-Nagel (MN) (Alemanha) e Bond Elut®, marca Varian;
- Colunas cromatográficas Hypersil® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm), marca Agilent Luna® C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm) e (150 mm x 4,6 mm x 3 μm);
- Cromatoplaça sílica gel 60 F254, 1 mm de espessura, marca Merck;
- Membrana filtrante de poliéster de 0,45 μm da marca MN.

PRINCIPAIS EQUIPAMENTOS

- Agitador com rotor-estator (ultra-turrax) Polytron PT 45-60, Kinematica;
- Combi Flash modelo Retrieve, da marca Teledyne Isco®;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Agilent, modelo 1100, equipado com degasseificador, bomba quaternária, amostrador automático, termostato de coluna e detector de arranjo de diodos (190 a 400 nm);

- Manifold para 12 posições com torneira de Teflon, da marca MN;
- Milli-Q gradient modelo BOKN32002.C da marca Millipore;
- Ultra-som 1440 DA, com 50/60 kHz de frequência e aquecimento até 40 °C, da marca Ondontobrás;

4.1 OBTENÇÃO DA UNCALINA

A extração da uncalina a partir das raízes de *P. sidoides* iniciou com a sua trituração. Na seqüência, o pó foi adicionado de etanol 15% em água (m/m) e a mistura foi levada à turbólise em ultra-turrax, a 5000 rpm por 15 min. A amostra foi filtrada e macerada exaustivamente com éter etílico. O solvente foi evaporado e o resíduo, fracionado em coluna de sílica em equipamento Combi Flash. A eluição foi realizada com misturas de hexano e éter etílico e as frações contendo uncalina foram reunidas. A purificação final foi feita com recristalizações sucessivas em éter etílico.

O isolamento da uncalina a partir da tintura da planta teve como primeira etapa a partição líquido-líquido com éter etílico. O extrato etéreo obtido foi então cromatografado em coluna de sílica como descrito para o resíduo a partir das raízes.

A uncalina isolada foi identificada e teve sua pureza determinada pelos métodos de ressonância nuclear magnética, espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de ultra-violeta e calorimetria exploratória diferencial, segundo as condições descritas a seguir.

- Ressonância magnética nuclear (RMN): equipamento Bruker AVANCE 400 e clorofórmio deuterado (CDCl_3) como solvente;
- Espectrometria de massas (EM): espectrômetro de massas triplo quadrupolo modelo API 3000, com interfaces “electrospray”, da marca Applied Biosystems/MSD/Sciex. Foi utilizada Bomba infusora para microseringa, marca Havard e a amostra foi injetada com $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de uncalina dissolvida em metanol 50% em água (v/v) e 5 mM de formiato de amônio;
- Espectrometria UV-VIS: espectrômetro Shimadzu UV-1601, com uncalina solubilizada em metanol ($1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$). A varredura foi realizada de 200 a 450 nm;

- CLAE-UV: foi utilizado o mesmo equipamento e condições das análises quantitativas das amostras (item 4.3.3.1, pág 42). A uncalina ($500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi analisada pelo método de normalização interna a 330 nm;
- Calorimetria exploratória diferencial (DSC): curvas DSC foram obtidas por meio de célula TA Instruments DSC 60 (Shimadzu), sob as seguintes condições experimentais: atmosfera dinâmica de nitrogênio (100 mL.min^{-1}); razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C.min}^{-1}$ em cápsula de alumínio selada; massa de amostra de, aproximadamente, 3,0 mg e rampa de aquecimento de 40 a $300 \text{ }^\circ\text{C}$. A célula de DSC foi previamente calibrada após a utilização de uma amostra de índio metálico com pureza de 99,99% a partir da $T_{\text{fusão}}$ ($156,4 \text{ }^\circ\text{C}$) e $DH_{\text{fusão}}$ ($28,5 \text{ J.g}^{-1}$) deste material.

4.2 MÉTODO PARA CCD DAS MATÉRIAS-PRIMAS DE *P. sidoides*

O procedimento de CCD seguiu as condições descritas por WAGNER e BLADT (1996) para a detecção de cumarinas:

- cromatoplaça de sílica gel 60 com espessura de 1 mm;
- fase móvel: tolueno : éter (1:1) saturado em ácido acético a 10% em água;
- percurso de corrida: 75 mm;
- técnica: ascensão dimensional;
- amostras:
 - raízes: aplicação de $20 \mu\text{L}$ da solução extraída segundo método cromatográfico (item 4.3.3.2, pág. 42);
 - tintura: aplicação direta de $20 \mu\text{L}$;
- padrões:
 - - uncalina: $10 \mu\text{L}$ da solução a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol;
 - - escopoletina: $10 \mu\text{L}$ da solução a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em metanol;
- revelador: solução etanólica de hidróxido de potássio 10%;
- visualização: luz UV a 365 nm.

4.3 DETERMINAÇÃO DE UNCALINA EM DERIVADOS DE *P. sidoides*

4.3.1 Análise cromatográfica

O desenvolvimento do método, em CLAE, para todos os derivados de *P. sidoides* iniciou-se pelo método descrito por CELEGHINI *et al.* (1999; 2001) para avaliação de cumarina em amostras de guaco. As otimizações incluíram alteração da coluna cromatográfica e fase móvel, em proporção e fluxo. O método final foi escolhido em função do tempo de análise, simetria de pico e fator de encaldamento.

4.3.2 Extração e purificação das amostras

4.3.2.1 Otimização da extração das raízes por planejamento fatorial

A extração da uncalina nas raízes de *P. sidoides* foi otimizada por planejamento fatorial de experimentos, utilizando o módulo “Design of Experiments” do programa MINITAB 15 (Minitab Inc.). Na etapa de triagem, foi utilizado planejamento fatorial completo com 2^5 em duplicata, totalizando 64 experimentos. Foram avaliados os parâmetros de granulometria, massa, solvente, tempo e temperatura de extração, sendo que aqueles que apresentaram maior significância foram selecionados para a etapa de otimização, utilizando o método de *Box-Benhken*. Os resultados obtidos foram utilizados para obtenção dos gráficos de superfície de resposta.

4.3.2.2 Otimização da limpeza da amostra tintura

- Por partição líquido-líquido (LLE)

A purificação foi realizada pela partição líquido-líquido com éter etílico. Foram avaliados o volume de éter necessário, o número de extrações e o tempo de agitação do funil de separação para uma extração de uncalina próxima a 100%.

O resultado foi analisado pela comparação das áreas entre a injeção direta da tintura e a injeção após sua purificação.

- Por extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida foi avaliada nos cartuchos ChromaBond[®] C₁₈ e ChromaBond[®] C₁₈ ec (Macherey-Nagel). Foi estimado o volume máximo de tintura para saturação do cartucho, em um intervalo de 0,5 mL. A purificação da amostra foi avaliada com diferentes proporções de acetonitrila em água e a recuperação, experimentada com metanol e acetonitrila.

4.3.2.3 Purificação da uncalina no xarope

O desenvolvimento do método para purificação do xarope foi realizado após seleção das melhores condições para purificação da tintura por SPE. Assim, foram testados os mesmos parâmetros.

4.3.3 Métodos selecionados para quantificação da uncalina

4.3.3.1 Condições cromatográficas

- Coluna: Phenomenex Luna C18 (150 mm x 4,6 mm x 3 µm);
- Temperatura do compartimento da coluna: 30 °C;
- Fase móvel: Acetonitrila 45% em eluição isocrática;
- Fluxo: 0,75 mL.min⁻¹;
- Detecção: 330 nm.

4.3.3.2 Purificação da uncalina nas raízes

As raízes trituradas (150 mg) com granulometria entre 60 e 45 Mesh, foram diluídas com acetona 50% em água (25 mL) e levadas ao ultra-som a 40 °C, por 30 min. A solução foi filtrada em membrana de poliéster (0,45 µm) para injeção no cromatógrafo.

4.3.3.3 Purificação da uncalina na tintura por partição líquido-líquido (LLE)

A tintura (20 mL) foi extraída com éter etílico (20 mL em 3 extrações vigorosas de 1 min). A fração etérea foi evaporada, retomada em metanol (10 mL) e sonicada por 5 min.

4.3.3.4 Purificação da uncalina na tintura por extração em fase sólida (SPE)

A tintura (2 mL) foi percolada em cartucho ChromaBond[®] C₁₈ ec. A purificação foi realizada com acetonitrila 20% (2 mL) e a recuperação da uncalina retida, alcançada com metanol (5 mL).

4.3.3.5 Purificação da uncalina no xarope, por SPE

O xarope de pelargônio (5 mL) foi percolado em cartucho ChromaBond[®] C₁₈ ec. A purificação foi realizada com acetonitrila 20% (2 mL) e a recuperação da uncalina, com metanol (5 mL).

4.3.4 Avaliação da adequação do sistema

A adequação do sistema foi avaliada pela injeção de uma mesma amostra por seis vezes em uma coluna nova (18000 pratos teóricos segundo metodologia do fornecedor) e em uma coluna antiga (10000 pratos teóricos segundo a mesma metodologia). As áreas obtidas foram submetidas a análise de variância (ANOVA) com execução do teste de Tukey.

4.3.5 Avaliação da estabilidade das soluções de padrão e das soluções amostra

A estabilidade das soluções padrão foi acompanhada nos períodos de 0, 30, 60, 90 e 180 dias. Para tanto, foram observadas as áreas de uma curva

padrão com 5 pontos (12,1 a 121 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de uncalina), armazenadas em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

As soluções de cada amostra (6 replicatas) foram analisadas logo após a extração ou purificação e no transcorrer de 24 horas, armazenas à temperatura ambiente ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

4.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Como descrito no item 3.3 (QUADRO 2, pág. 29), o método analítico pode ser classificado na categoria 1 da RE 899 da ANVISA (2003), para a qual é exigida a avaliação dos seguintes parâmetros: especificidade, linearidade, intervalo de confiança, precisão repetibilidade e intermediária, exatidão e robustez (BRASIL, 2003). Para complementação das metodologias, os limites de detecção e quantificação também foram determinados. A validação foi realizada para as matérias-primas (raízes e tintura de *P. sidoides*) bem como para o xarope.

4.4.1 Especificidade e seletividade

4.4.1.1 Comparação de curvas analíticas

Este teste foi realizado apenas para as validações das matérias-primas (raiz e tintura). O preparo das amostras está descrito no item relativo à exatidão (item 4.4.6, pág. 47). O resultado avalia o paralelismo entre as curvas de padrão e padrão adicionado de amostra, o qual é observado por meio da comparação do coeficiente angular da equação da reta gerada pelas duas curvas.

4.4.1.2 Comparação dos perfis espectrais da uncalina da amostra e do padrão

O perfil espectral da uncalina isolada foi comparado àqueles observados nos picos relativos ao tempo de retenção deste analito nas amostras, com auxílio do detector de arranjo de diodos (DAD).

4.4.1.3 Análise da pureza do pico referente à uncalina, nas amostras

A pureza foi avaliada pelo percentual de similaridade entre vários perfis espectrais selecionados, na extensão do pico cromatográfico, com utilização do detector de arranjo de diodos (DAD). Foram observados os resultados do padrão e das amostras em condições normais e submetidas a hidrólise ácida (0,1 M de HCl) e básica (0,1 M de NaOH), com diminuição de 10 a 15% no teor de uncalina.

4.4.1.4 Análise do placebo

A análise do placebo foi realizada apenas no produto xarope, sendo o conjunto dos excipientes, avaliado nas mesmas condições do método de análise do produto acabado, conforme descrito no item 4.3.3.5 (pág. 43).

4.4.2 Linearidade e intervalo de aplicação

A linearidade para o padrão foi avaliada com 3 curvas em 5 níveis, preparadas e analisadas em dias diferentes, totalizando 15 pontos entre as concentrações de 0,2 a 121,2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de uncalina.

Para a análise das raízes, foram realizadas tomadas de amostras de 120, 135, 150, 165 e 180 mg das raízes trituradas (correspondentes a 80 a 120% da quantidade usualmente efetuada, 150 mg).

Para os dois métodos de análise da tintura, as amostras de 80 e 90% foram preparadas pela diluição da tintura com etanol 11% e, para 110 e 120%, foram adicionados à amostra, quantidade suficiente para 3,0 e 6,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de padrão de uncalina, respectivamente.

Para o xarope, foram preparadas 5 amostras com adição de quantidades proporcionais de tintura para atingir cada uma das 5 concentrações (de 80 a 120%).

Os gráficos da linearidade das amostras foram confeccionados em área obtida no cromatograma (mAU.s) *versus* concentração de uncalina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ da solução injetada), com utilização de Microsoft Excel[®] 2003, que forneceu os resultados de coeficiente de determinação, coeficiente de correlação, coeficiente angular e coeficiente linear e gráfico de resíduos.

O intervalo de aplicação foi determinado pela faixa avaliada nos testes de exatidão, precisão e linearidade, ou seja, de 80 a 120% da concentração esperada para cada amostra.

4.4.3 Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos pela análise de quantidades decrescentes da tintura (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Foram preparadas 6 soluções com concentrações entre $0,081 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, por diluições sucessivas da tintura submetida à purificação por SPE. Cada solução foi injetada 5 vezes para observar a repetibilidade entre as aplicações. O gráfico foi construído em área (mAU.s) *versus* concentração de uncalina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) e a avaliação, realizada pelo método baseado nos parâmetros da curva analítica, segundo as equações descritas por RIBANI *et al.* (EQUAÇÃO 3 e 4) (RIBANI *et al.*, 2004). O resultado encontrado diz respeito aos limites do método cromatográfico, ou seja, à concentração de injeção no equipamento.

A confirmação do limite de quantificação foi realizada por injeções sucessivas de cada amostra em uma concentração próxima à 30 ng.mL^{-1} , pelos procedimentos:

- raízes: uma alíquota de 7,5 mg foi tomada e seguiu o procedimento descrito no item 4.3.3.2 (pág. 42);
- tintura via LLE: a tintura foi diluída com etanol 11% suficiente para perfazer $0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de uncalina;
- tintura via SPE: a tintura foi diluída com etanol 11% para obter $0,075 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de uncalina e esta foi submetida à técnica descrita no item 4.3.3.4 (pág. 43);

- xarope: o xarope foi preparado pela adição de 250 μL de tintura a q.s.p. 100 mL de placebo. Esta solução foi analisado segundo procedimento descrito no item 4.3.3.5 (pág. 43).

Foram preparadas 6 replicatas de cada amostra e/ou método, sendo avaliados o desvio padrão relativo e a recuperação entre elas.

4.4.4 Repetibilidade

Foram realizadas 6 análises de determinação a 100% da concentração de uma mesma amostra, pelo mesmo analista, mesmo equipamento em um curto espaço de tempo. O resultado foi fornecido em desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR).

4.4.5 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi determinada por 6 análises da amostra a 100% da concentração, executadas por um segundo analista, mantendo o mesmo equipamento em um curto espaço de tempo. O resultado foi fornecido como desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR) entre as 12 análises.

4.4.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão à amostra. Para tal, foram tomadas 5 alíquotas de amostra usualmente praticadas nos procedimentos e, em 4 delas, foram adicionadas quantidades crescentes de padrão. Em paralelo, uma curva de calibração foi construída para comparação dos resultados. Os gráficos foram confeccionados em área observada no cromatograma (mAU.s) *versus* concentração de padrão de uncalina presente ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de uncalina). O coeficiente linear (b) da equação da reta da amostra adicionada de padrão foi extrapolado na reta do padrão para definir a concentração real de uncalina presente na amostra analisada (tintura ou raiz).

Para o xarope, o valor verdadeiro considerou a quantidade de tintura adicionada ao preparo bem como o resultado para esta matéria-prima encontrado no método de adição de padrão à amostra.

A partir dos valores verdadeiros encontrado para as raízes, tintura e xarope, foram analisadas as concentrações de 80, 100 e 120% em triplicata, cujo preparo considerou as mesmas condições descritas para teste de linearidade (item 4.4.2, pág. 45). Uma vez ciente da quantidade esperada, pode-se calcular a recuperação dos métodos (EQUAÇÃO 7).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração média experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (7)$$

4.4.7 Robustez

Os parâmetros para avaliação da robustez de todos os procedimentos estão dispostos no QUADRO 5.

MÉTODO	PARÂMETROS	CONDIÇÕES NORMAIS	CONDIÇÕES ALTERADAS	
			INFERIOR	SUPERIOR
Cromatográfico	coluna	Phenomenex Luna C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 3µm)	Agilent Zorbax XDB C ₁₈ (150 mm x 4,6 mm x 3 µm)	
	composição da fase móvel	Acetonitrila 45 %	Acetonitrila 43 %	Acetonitrila 47 %
	fluxo	0,75 mL.min ⁻¹	0,70 mL.min ⁻¹	0,80 mL.min ⁻¹
	temperatura da coluna	30 °C	28 °C	32 °C
extração das raízes	temperatura do banho do ultra-som	40 °C	35 °C	45 °C
extração da tintura por LLE	intensidade de agitação do funil	vigorosa	Lenta	
extração da tintura e xarope por SPE	cartucho C ₁₈	ChromaBond® C ₁₈ ec	ChromaBond®	Bond Elut®

QUADRO 5 – PARÂMETROS AVALIADOS NA ROBUSTEZ

NOTA: ¹ChromaBond® não *end capped*

Como todas as amostras utilizam o mesmo método cromatográfico, os testes de robustez relativos às estas condições foram realizados apenas com uma das

amostras (tintura obtida por SPE). O quadro destaca, ainda, a avaliação das condições de extração das raízes e da possibilidade de agitação lenta do funil de separação para a purificação da tintura por LLE.

As técnicas que utilizaram SPE foram avaliadas quanto à possibilidade do emprego de mais dois cartuchos (ChromaBond® C₁₈ da Macherey-Nagel e Bond Elut® C₁₈ da Varian). Cada alteração foi analisada em triplicata com comparação aos resultados obtidos da triplicata de uma amostra controle.

4.5 ANÁLISE DOS PRODUTOS CONTENDO *P. sidoides*

Foi determinada a quantidade de uncalina presente em 5 lotes de 2 produtos contendo *P. sidoides* comercializados no Brasil. Para a análise, as amostras dos produtos (15 mL) foram extraídas por partição líquido-líquido com éter etílico (3 x 20 mL). A fração etérea evaporada foi retomada em metanol (5 mL) e sonicada por 5 min. As amostras foram injetadas após filtração em membrana de poliéster (0,45 µm).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A revisão da literatura demonstrada neste trabalho possibilitou a apresentação dos efeitos terapêuticos exibidos pelas raízes de *P. sidoides*, permitindo estabelecer sua importância no cenário farmacêutico. A ausência de marcador definido para a espécie dificulta a realização de um controle de qualidade adequado bem como a proposta para o desenvolvimento de novos produtos contendo esta planta. Os estudos apresentados mostraram a correlação da uncalina às ações antimicrobianas e imunomodulatórias, permitindo designá-la como marcador da espécie. O alto custo exigido para o desenvolvimento da uncalina como substância de referência levou à necessidade do seu isolamento, para permitir o estabelecimento do controle de qualidade das raízes, da tintura e de um produto a partir da tintura de *P. sidoides*.

5.1 OBTENÇÃO DE UNCALINA

A utilização de 1 kg das raízes como matéria-prima para o isolamento de uncalina resultou em 10 mg do analito (10% de rendimento sob a quantidade de uncalina doseada nas raízes), enquanto a obtenção desta substância por meio da tintura (1 L) forneceu 20 mg da mesma (67% de rendimento sob a quantidade de uncalina dosada na tintura). Além do rendimento superior, o isolamento a partir da tintura da planta permitiu a obtenção da uncalina em dois dias, enquanto o método utilizando as raízes levou uma semana. Ambas as metodologias apresentaram-se mais simples e rápidas àquelas descritas na literatura, principalmente por não ser necessário o fracionamento prévio com vários solventes (KAYSER; KOLODZIEJ, 1997; LATTÉ *et al.*, 2000; KOLODZIEJ *et al.*, 2003).

Após isolamento, a substância obtida foi identificada e teve sua pureza determinada pelas análises de RMN-¹H, RMN-¹³C, HSQC, HMBC, CLAE/EM, CLAE/UV e DSC, cujos resultados serão demonstrados a seguir.

5.1.1 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros obtidos para a uncalina, neste trabalho, foram semelhantes àqueles demonstrados por WHITE (2006) e previamente citados por KAYSER e KOLODZIEJ (1995). A FIGURA 8 mostra o espectro de hidrogênio apresentado pela uncalina isolada. Para facilitar a visualização, os hidrogênios foram atribuídos no espectro, segundo numeração indicada na FIGURA 7.

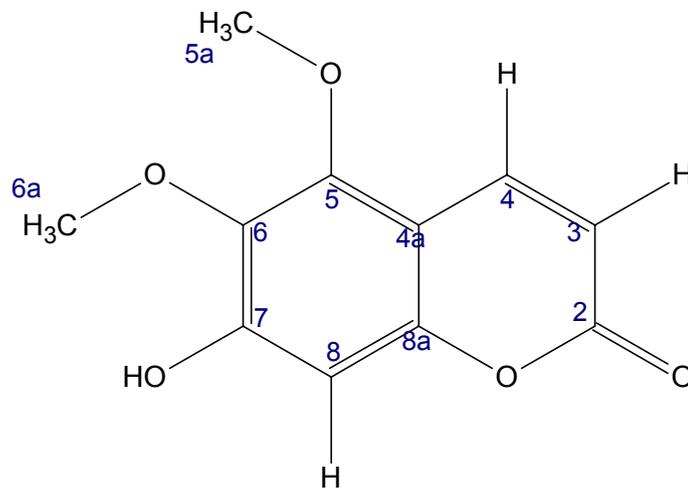


FIGURA 7 – ESTRUTURA DA UNCALINA COM ATRIBUIÇÃO DOS HIDROGÊNIOS

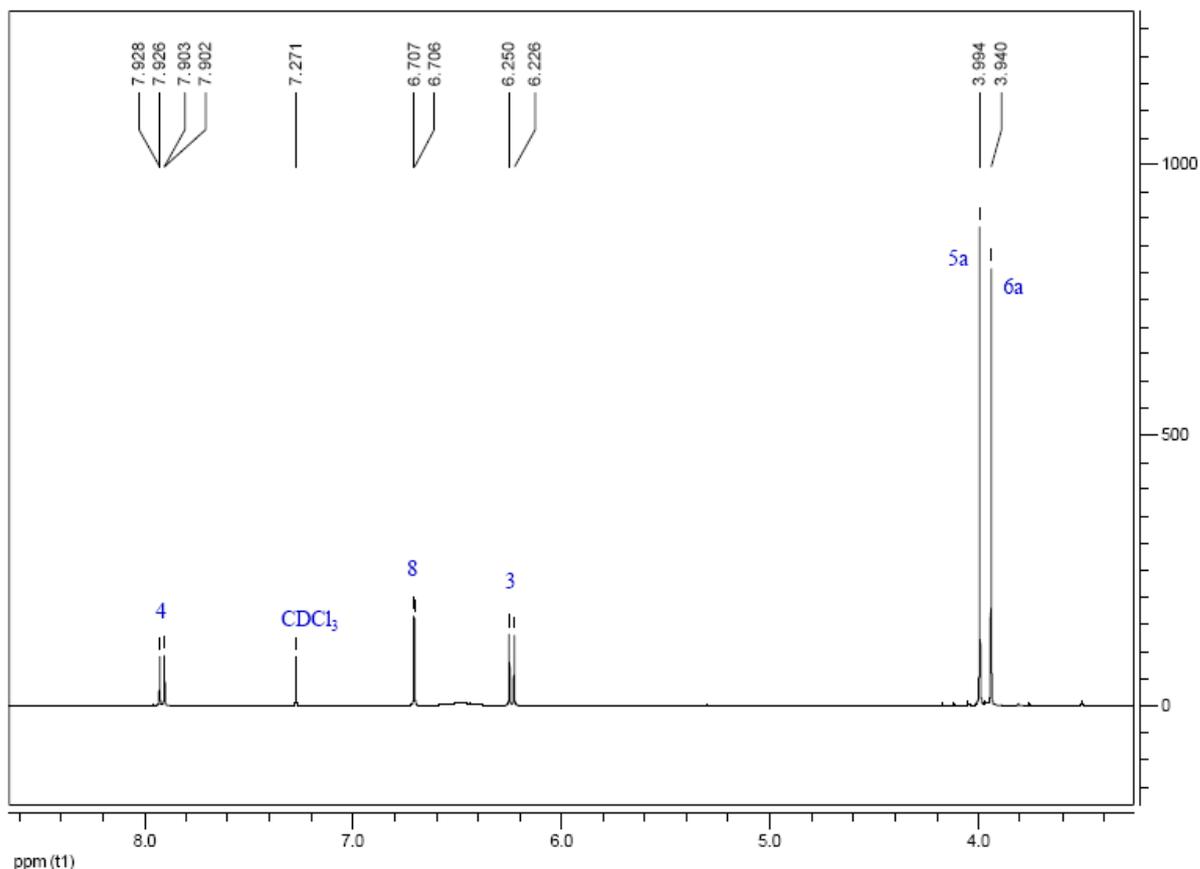


FIGURA 8 – ESPECTRO DE RMN-¹H (400 MHz) EM CDCl₃ DA UNCALINA ISOLADA

Os resultados encontrados por KAYSER e KOLODZIEJ (1995) e WHITE (2006) foram comparados aos sinais obtidos pela uncalina isolada (TABELA 4).

TABELA 4 - COMPARAÇÃO COM OS SINAIS (PPM) DE RMN-¹H DA LITERATURA

POSIÇÃO	KAYSER E KOLODZIEJ (1995)	WHITE (2006)	UNCALINA
3	6,12 d(9,6)	6,13 d(9,7)	6,23 d(9,7)
4	7,96 d(9,6)	7,97 d(9,7)	7,91 dd(9,6; 0,4)
8	6,59 s	6,59 s	6,71 d(0,4)
5a e 6a	3,86; 4,01 (s cada)	3,86; 4,01 (s cada)	3,94; 3,99 (s cada)

NOTA: Sinais obtidos por KAYSER e KOLODZIEJ (75 MHz, ACETONA-D₆), WHITE (400 MHz, ACETONA-D₆) e da uncalina isolada (400 MHz, CDCl₃); d: dubleto; s: singlete. Em parênteses, constante de acoplamento, J em Hz,.

A tabela explicita pequena divergência dos valores observados pelos autores. A variação no valor do deslocamento é decorrente da utilização de solventes diferentes, uma vez que neste trabalho foi utilizado clorofórmio deuterado

(CDCl₃) enquanto os resultados referenciados foram desenvolvidos com acetona deuterada (acetona-D₆). A disparidade entre a multiplicidade dos sinais de H-3 e H-4 pode ser justificada pela utilização de um equipamento de 400 MHz aliada à alta resolução em que o espectro foi gerado. Estas características permitiram revelar a interação a 6 ligações, com pequena constante de acoplamento ($J = 0,4$ Hz) entre H-3 e H-8. Além desta interação, podemos destacar a constante de acoplamento entre H-3 e H-4 ($J = 9,7$ Hz), já descrita pelos autores (KAYSER; KOLODZIEJ, 1995; WHITE, 2006). Os sinais característicos de hidrogênios de metoxilas (H-5a e H-6a) também foram observados (3,94 e 3,99 ppm)(SILVERSTEIN *et al.*, 2005).

O espectro de RMN-¹³C está demonstrado na FIGURA 9, com atribuição dos carbonos para facilitar a visualização. Os resultados encontrados foram comparados aos sinais publicados por KAYSER e KOLODZIEJ (1995) e WHITE (2006) (TABELA 5).

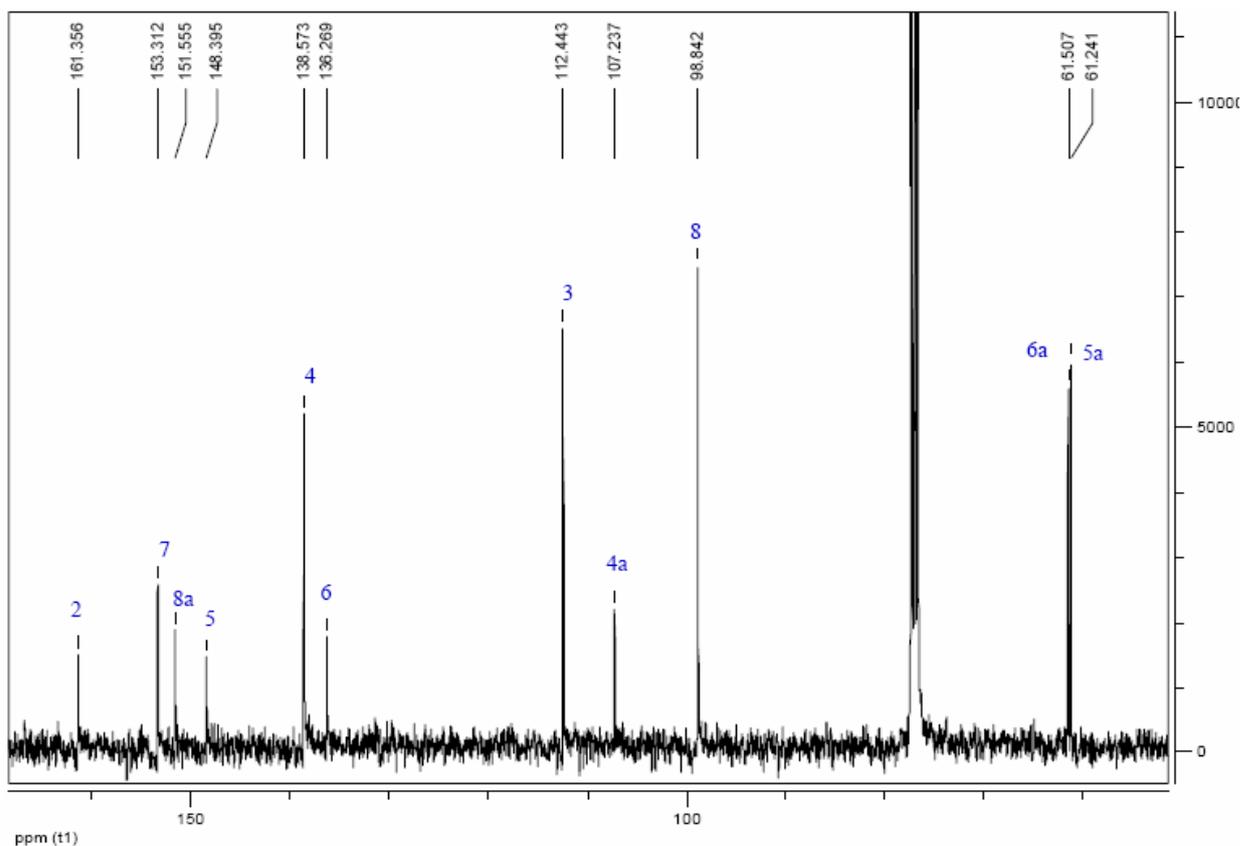


FIGURA 9 – ESPECTRO RMN-¹³C (400 MHz) EM CDCl₃ DA UNCALINA ISOLADA

TABELA 5 – COMPARAÇÃO COM RESULTADOS DE RMN-¹³C DA LITERATURA

POSIÇÃO	KAYSER E KOLODZIEJ (1995)	WHITE (2006)	UNCALINA
2	161,1	162,2	161,4
3	112,2	112,5	112,4
4	139,6	139,6	138,6
4a	107,0	107,3	107,2
5	156,4	155,9	148,4¹
6	138,2	138,1	136,3
7	152,3	152,5	153,3²
8	99,6	99,6	98,8
8a	150,4	150,4	151,6³
5a e 6a	61,2; 62,0	61,3; 62,0	61,5; 61,2

NOTA: Sinais obtidos por KAYSER e KOLODZIEJ (75 MHz, ACETONA-D₆), WHITE (400 MHz, ACETONA-D₆) e da uncalina isolada (400 MHz, CDCl₃). Em destaque os carbonos cuja atribuição proposta foi diferente: ¹carbono atribuído como 8a; ²carbono atribuído como 5; ³carbono atribuído como 7;

Os carbonos que apresentam hidrogênios ligados foram confirmados pela observação do mapa de contorno HSQC (FIGURA 10). As atribuições diferentes àquelas propostas por KAYSER e KOLODZIEJ (1995) e WHITE (2006) foram decorrentes da análise do espectro obtido pelo experimento de HMBC, que será discutido na seqüência (FIGURA 11 e FIGURA 13).

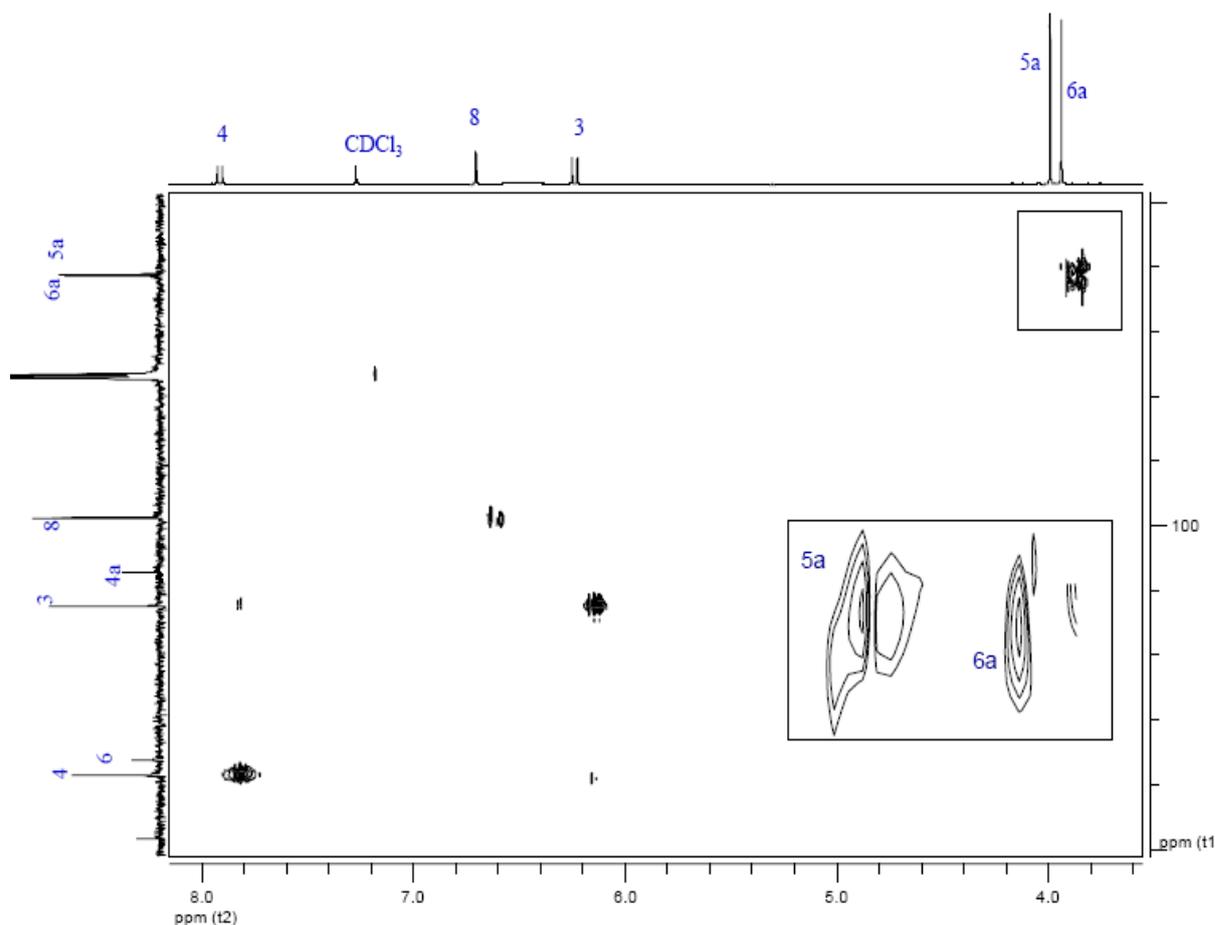


FIGURA 10 – MAPA DE CONTORNO HSQC (400 MHz) EM CDCl_3 DA UNCALINA ISOLADA.

NOTA: $\text{RMN-}^1\text{H}$ (eixo x) *versus* $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (eixo y). Destaque aos sinais produzidos pelas metoxilas

A correlação direta entre carbonos e hidrogênios permite atribuir os carbonos 4, 8, 3, 5a e 6a. A atribuição dos demais carbonos exigiu o experimento HMBC, que permite a visualização entre hidrogênios e carbonos de 2 a 5 ligações, sendo as interações chamadas de J_3 , mais intensas que as demais (FIGURA 11 e FIGURA 13). O sinal atribuído ao C-5 havia sido considerado como C-8a por KAYSER e KOLODZIEJ (1995) e WHITE (2006). Esta correção foi proposta pela observação da correlação entre o hidrogênio da metoxila (3,99 ppm, referente a H-5a) e o carbono em 148,4 ppm (C-5). Outra informação de relevância indica a correlação intensa (3 ligações) do H-4 (7,91 ppm) com o carbono em 151,6 ppm (C-8a), sinal que os autores haviam atribuído ao C-7, disposto a 5 ligações de H-4 (FIGURA 12 e FIGURA 13). A atribuição deste carbono foi possível pela visualização das correlações menos intensas no HMBC, indicativas de hidrogênios e carbonos a 2, 4 ou 5 ligações. A FIGURA 13 destaca o resultado dos hidrogênios 3,

4 e 8. A FIGURA 12, ainda demonstra a correlação de menor intensidade entre todos os hidrogênios e carbonos presentes na estrutura da uncalina.

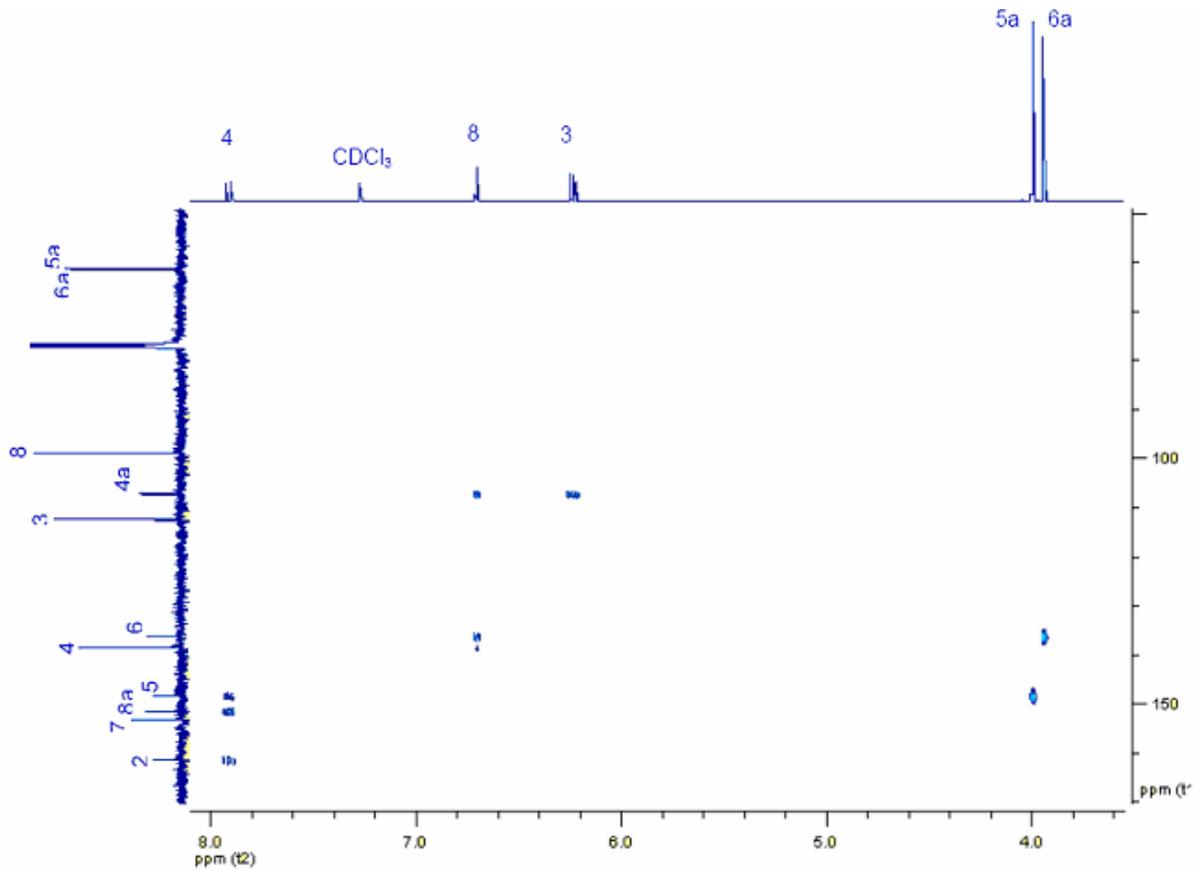


FIGURA 11 – MAPA DE CONTORNO HMBC (400 MHz) UNCALINA ISOLADA

NOTA: RMN-¹H (eixo x) versus RMN-¹³C (eixo y)

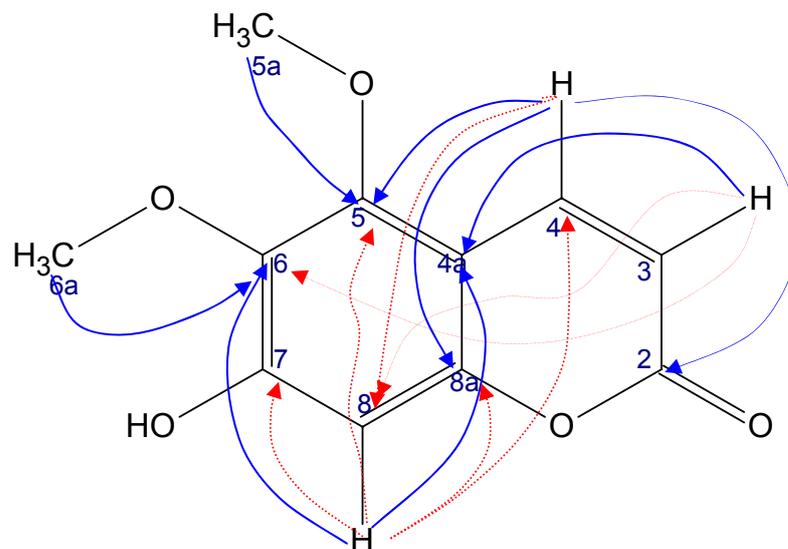


FIGURA 12 – REPRESENTAÇÃO DIAGRAMÁTICA DAS CORRELAÇÕES DA UNCALINA

NOTA: Correlações intensas (azul) e de menor intensidade (vermelho) observadas na FIGURA 13

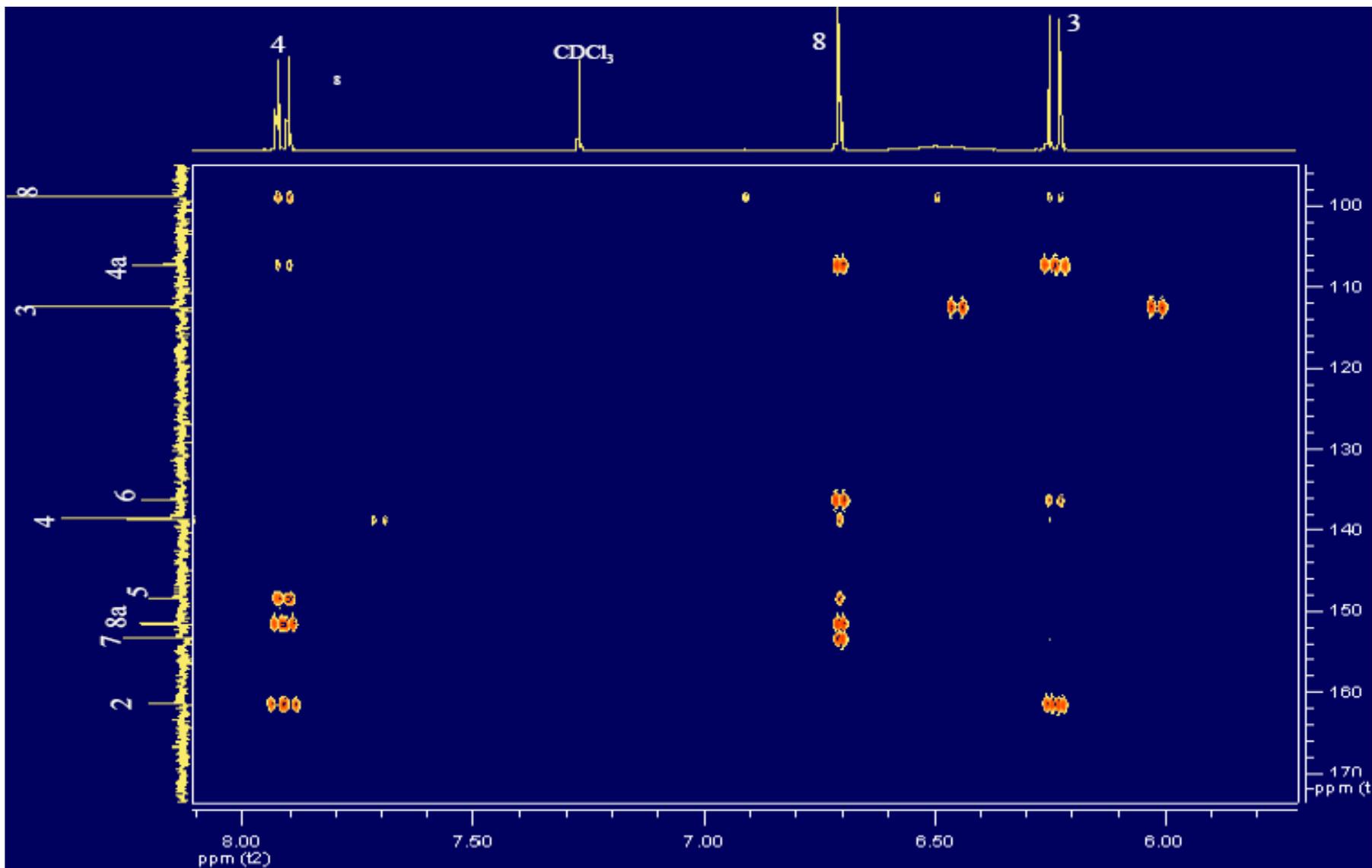


FIGURA 13 – MAPA DE CONTORNO HMBC (400 MHz) DA UNCALINA ISOLADA

NOTA: $\text{RMN-}^1\text{H}$ (eixo x) versus $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ (eixo y). Ampliação da região de 5,50 a 8,00 ppm no eixo de $\text{RMN-}^1\text{H}$ versus 100 a 170 ppm no eixo de $\text{RMN-}^{13}\text{C}$

5.1.2 Espectrometria de massas (EM)

A fórmula molecular da uncalina ($C_{11}H_{10}O_5$) indica uma relação m/z de 222,05 Da, já descrita em literatura (KAYSER; KOLODZIEJ, 1995; WHITE, 2006). Uma vez que o espectro foi obtido em modo positivo, o resultado de $[M + H]^+ = 223,3$ Da corresponde ao valor esperado para este analito. A característica do espectro ainda pode indicar que a substância isolada apresenta alto grau de pureza (FIGURA 14).

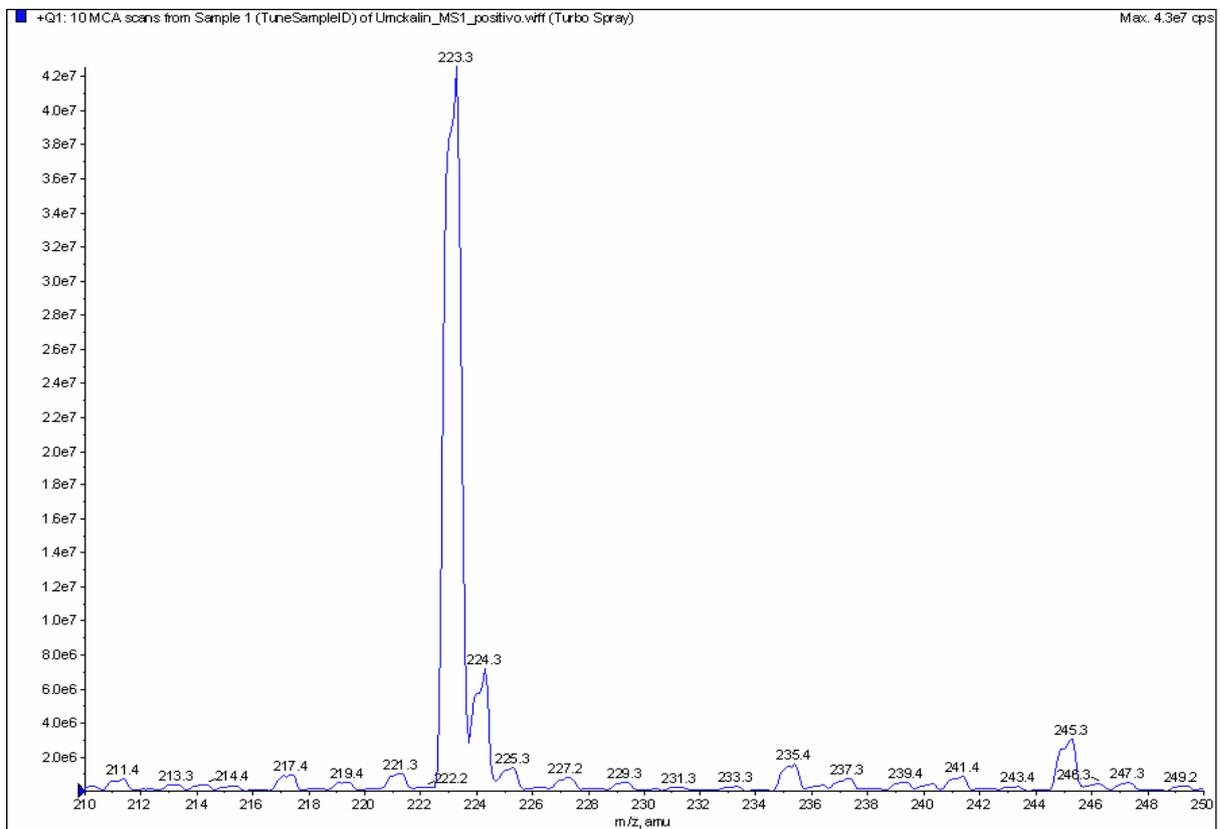


FIGURA 14 – ESPECTRO DE MASSAS (EMS 1) DA UNCALINA

5.1.3 Espectrometria UV-VIS

O perfil espectral apresentado pela uncalina (FIGURA 15) correspondeu a FIGURA 5 (pág. 24), espectro descrito por WHITE (2006). Os comprimentos de onda máximos, de 210 e 329,5 nm também foram condizentes aos descritos na literatura: 210, 328 nm (KAYSER; KOLODZIEJ, 1995) e 206, 330 nm (WHITE, 2006).

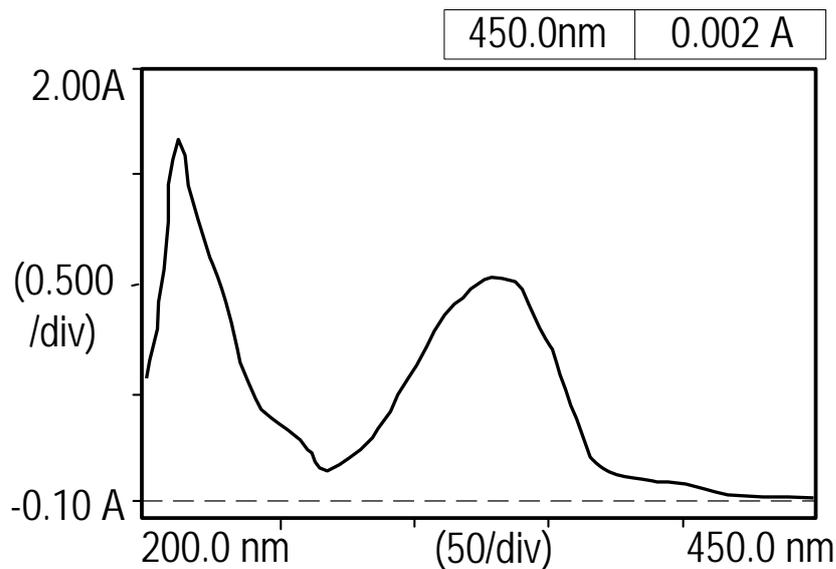


FIGURA 15 – PERFIL ESPECTRAL DA UNCALINA EM METANOL

5.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV)

A pureza cromatográfica da substância isolada foi avaliada pelo método de normalização de áreas a 330 nm. A FIGURA 16 demonstra o aparecimento de apenas um pico em 3,37 min além daquele relativo à uncalina (4,21 min), contendo 0,6188% em relação à área total. Uma corrida paralela do padrão de escopoletina foi realizada e demonstrou o mesmo tempo de retenção e mesmas características espectrais, indicando que a uncalina isolada continha pequena quantidade de escopoletina, substância também presente em *P. sidoides*. A determinação da pureza da uncalina por este método revelou um valor de 99,3812%. Vale ressaltar que este tipo de técnica não avalia a quantidade de água e solventes residuais presentes. A visualização da varredura espectral em 3D demonstrada na

FIGURA 17, permite certificar que não há mais nenhum pico significativo presente na corrida cromatográfica realizada.

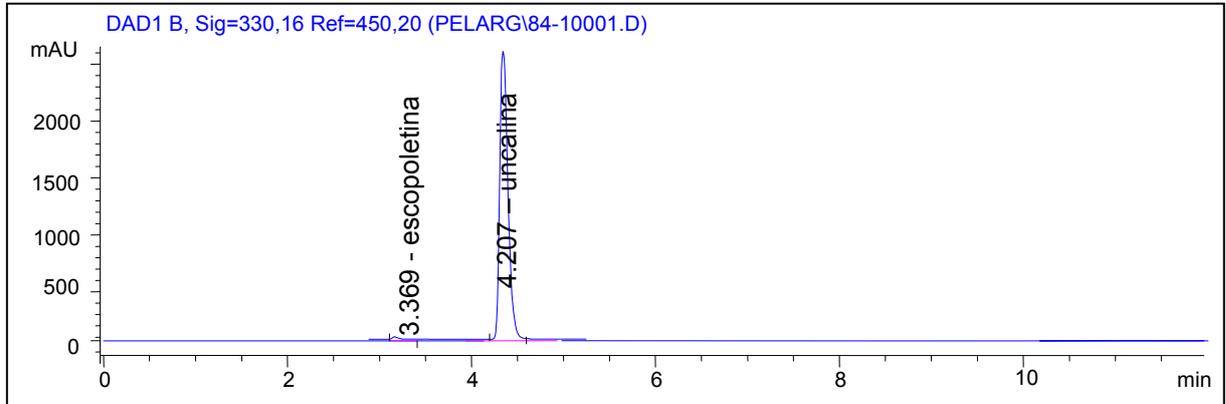


FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DA UNCALINA ISOLADA

NOTA: O pico em 3,369 min (escopoletina) apresentou 140,38 mAU.s de área, correspondendo a 0,6188% do total; enquanto o pico em 4,207 min (uncalina) revelou uma área de 22685,60 mAU.s, 99,38% do total

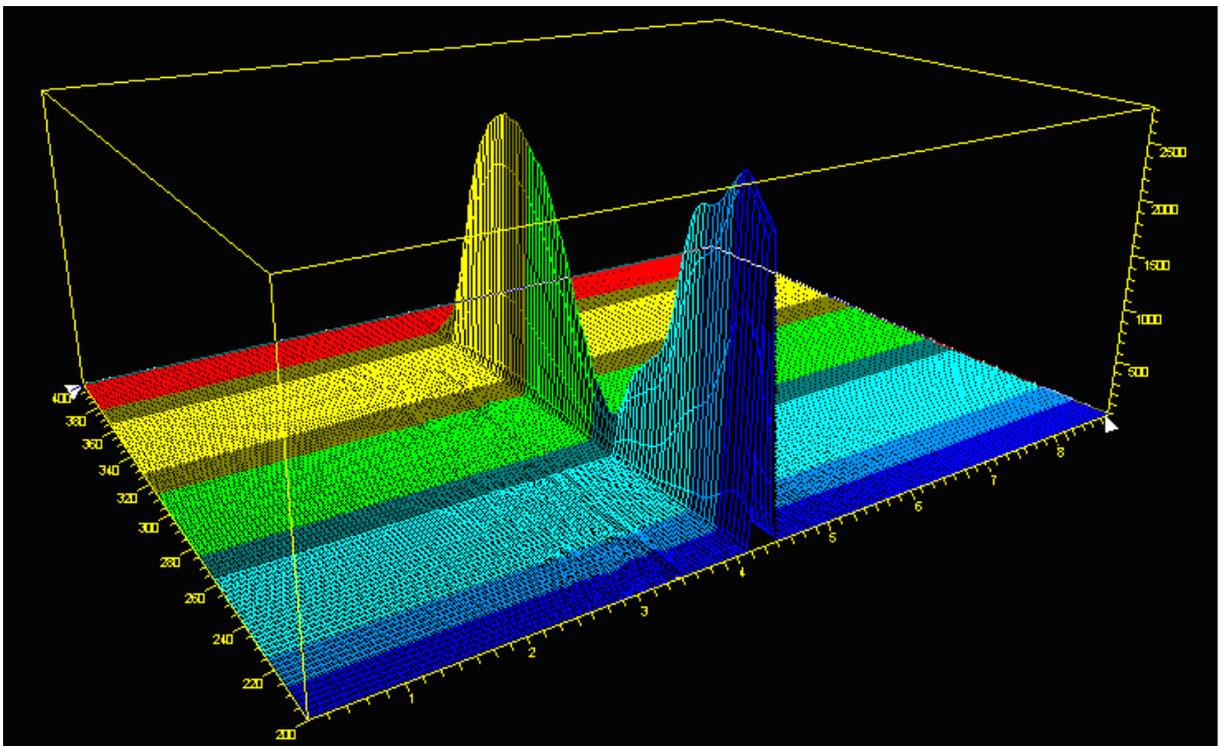


FIGURA 17 – ESPECTRO EM 3D DO CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE UNCALINA

5.1.5 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

A calorimetria exploratória diferencial representa um tipo de análise térmica que pode auxiliar na determinação da pureza de uma amostra. Ela fornece informações detalhadas sobre as propriedades físicas e energéticas da substância, tais como ponto de fusão, pureza, polimorfismo, estabilidade térmica e cinética de decomposição (CLAS *et al.*, 1999; ROY *et al.*, 2002).

A DSC para uncalina isolada mostrou um evento endotérmico em 147,43 °C, referente ao processo de fusão. BLADT (1974), citado por KAYSER e KOLODZIEJ (1995), apresentou os valores de 146 a 147 °C. A análise, ainda, demonstrou uma pureza de 98,71%. Este valor condiz com o resultado apresentado pelo método de CLAE/UV (99,38%), pois, além da escopoletina detectada, a DSC permite a dedução de todas as impurezas que apresentem diferente ponto de fusão, como água e possíveis resíduos de solvente, justificando, assim, a obtenção de um valor inferior.

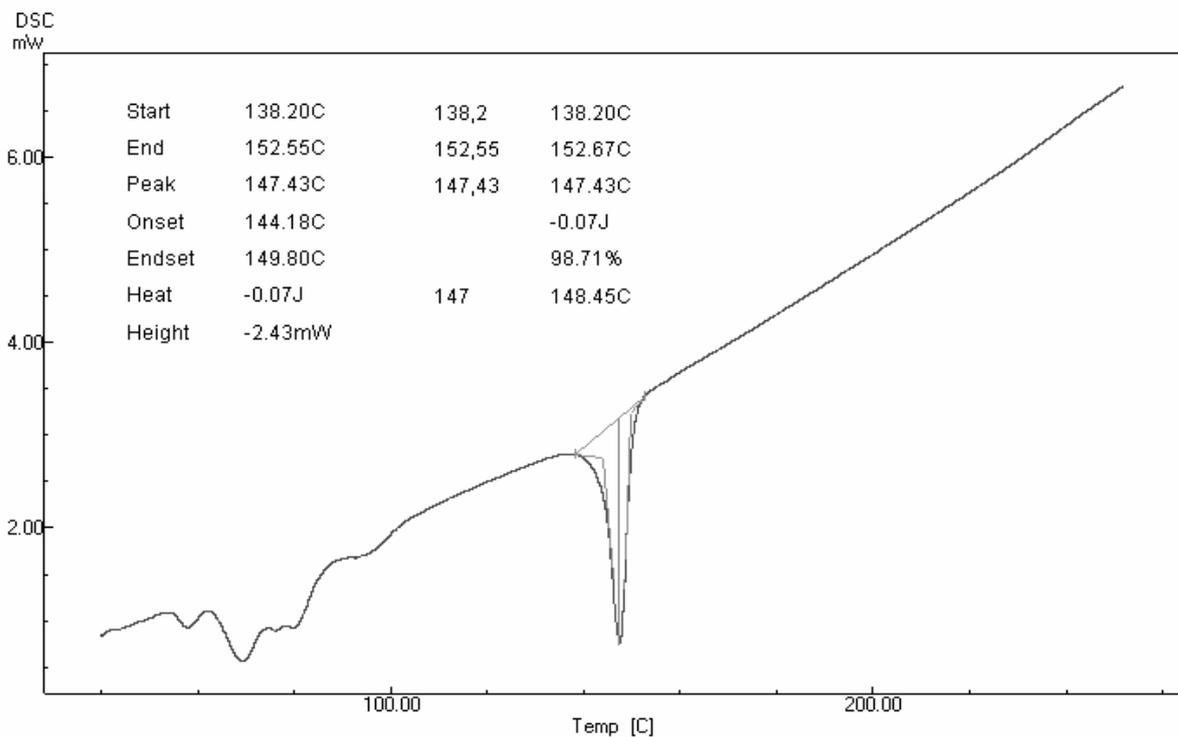


FIGURA 18 – CURVA DE DSC APRESENTADA PELA UNCALINA

5.2 CCD DAS MATÉRIAS-PRIMAS DE *P. sidoides*

A CCD avaliada segundo método descrito por WAGNER e BLADT (1996), resultou no cromatograma da FIGURA 19. A conformidade do método pode ser observada pela aplicação do padrão de escopoletina, uma vez que os autores citam um Rf próximo a 0,3 e pôde ser observado o valor de 0,29. Para o padrão de uncalina, o Rf foi de 0,42 (ponto 4). Como esperado (TABELA 2, página 22), nota-se que tanto a amostra das raízes (ponto 1), quanto a amostra de tintura (ponto 2) apresentam bandas equivalentes a escopoletina e uncalina.

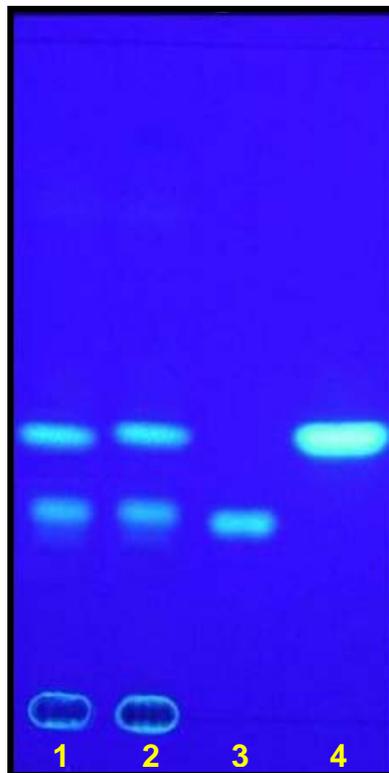


FIGURA 19 – CROMATOPLACA DE CCD DAS AMOSTRAS

LEGENDA: Pontos: (1) raízes, (2) tintura, (3) padrão de escopoletina e (4) padrão de uncalina

5.3 DESENVOLVIMENTO DAS METODOLOGIAS

A análise de uncalina em *P. sidoides*, por CLAE, já foi descrita por WHITE (2006). Entretanto, o método envolvia o uso de ácido trifluoracético na composição da fase móvel, o que se pretendia evitar para preservar a coluna cromatográfica.

Outro método publicado CELEGHINI *et al.* (1999; 2001) descrevem a eluição de cumarina (1,2 benzofenona) com acetonitrila 40% em água em coluna C₁₈ de 250 mm x 4,5 mm x 5 µm (*método 1*).

As variações propostas para o desenvolvimento foram descritas no QUADRO 6. O desenvolvimento do método, em CLAE, para todos os derivados de *P. sidoides* iniciou-se pelo método descrito por CELEGHINI *et al.* (1999; 2001) para avaliação de cumarina em amostras de guaco. Este procedimento propôs as condições descritas no *Método 1*. As otimizações incluíram alteração da coluna cromatográfica e fase móvel, em proporção e fluxo (*Métodos 2, 3 e 4*). Cada método forneceu os resultados cromatográficos de tempo de retenção, simetria de pico e resolução do pico de uncalina e fator de encaldamento, que foram dispostos na TABELA 6.

MÉTODO	PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS		
	COLUNA	FASE MÓVEL Acetonitrila (%) em água;	FLUXO (mL.min ⁻¹)
1 ¹	Agilent Hypersil ODS C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	40	1,00
2	Agilent Hypersil ODS C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	45	1,00
3	Phenomenex Luna C₁₈ (2) (250 mm x 4,6 mm x 5 µm)	45	1,00
4	Phenomenex Luna C ₁₈ (2) (150 mm x 4,6 mm x 3 µm)	45	0,75

QUADRO 6 – PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS PARA O MÉTODO ANALÍTICO

NOTA: Foram destacadas as alterações realizadas em relação ao método anterior. ¹Método descrito por CELEGHINI *et al.* (1999; 2001) com exceção da coluna (citada apenas como Supelco)

TABELA 6 – RESULTADOS CROMATOGRÁFICOS DOS MÉTODOS EM DESENVOLVIMENTO

MÉTODO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	SIMETRIA	RESOLUÇÃO	FATOR DE ENCALDAMENTO
1	6,2	0,72	6,0	1,3
2	5,0	0,69	5,2	2,6
3	5,3	0,75	8,3	1,9
4	4,0	0,93	4,2	1,1

NOTA: Foram destacados os principais resultados otimizados em relação ao método anterior. Os parâmetros de cada método estão descrito no QUADRO 6

O *Método 1* foi baseado nos parâmetros descritos por CELEGHINI *et al.* (1999; 2001). O aumento do componente orgânico do *Método 2* (de 40 para 45 % de acetonitrila) teve como objetivo principal a diminuição do tempo de retenção da uncalina (em 1,2 min), sem perda significativa da resolução.

A alteração da coluna de Agilent Hypersil® para Phenomenex Luna® (*Método 3*) permitiu aumentar a simetria do pico e diminuir o fator de encaldamento, uma vez que esta apresenta um percentual de sílica ligada à fase reversa C₁₈ de 17,5% enquanto a Hypersil® contém, apenas 10%. O aumento desta característica reflete uma eluição mais homogênea pela coluna, resultando em um pico mais simétrico. Além disso, a Hypersil® não é fabricada com sílica ultrapura, o que justificaria a interação da uncalina com possíveis impurezas presentes.

Como já comentado, a simetria do pico foi melhorada, entretanto, ficou aquém do valor descrito como ideal por CIOLA (1998) e SNYDER *et al.* (1998), que destacam o intervalo de 1,0 a 1,05. Na tentativa de adequação da simetria a este valor, foi sugerida a alteração do comprimento da coluna de 250 para 150 mm e do tamanho da partícula de 5 para 3 µm (*Método 4*). Esta alteração permitiu observar um resultado de 0,93 de simetria, valor pertencente ao intervalo descrito como aceitável por CIOLA (1998) (0,8 a 1,20) e por SNYDER *et al.* (1998) (0,9 a 1,1). A alteração da coluna também tornou o fator de encaldamento mais adequado ao valor descrito pela EUROPEAN PHARMACOPOEIA (2006), de 0,8 a 1,2; e ao valor descrito por SHABIR (2003), de máximo 2. Em todos os casos, a resolução do pico de uncalina dos demais sinais do cromatograma foram superiores ao valor mínimo de 1,5, descrito por CIOLA (1998) e SNYDER *et al.* (1998) e, mínimo 2, descrito por SHABIR (2003).

5.3.1 Otimização da extração das raízes de *P. sidoides*

A extração da uncalina das raízes de *P. sidoides* foi desenvolvida utilizando planejamento fatorial de experimentos. Neste procedimento, os parâmetros (fatores) suspeitos de provocar influência no rendimento são examinados simultaneamente, ao invés de forma univariada. Dessa maneira, é possível reduzir o tempo de desenvolvimento e otimização, além de se detectar interações entre os fatores (ZIVANOVIC *et al.*, 2008). O método consiste de duas etapas: triagem e otimização.

Na triagem, utiliza-se um planejamento fatorial de 2 níveis que pode ser representado por 2^n , onde n é o número de fatores em estudo. Os resultados desta etapa indicam quais fatores interferem de maneira significativa no método. Estes fatores serão utilizados para a fase seguinte de otimização, que pode ser realizada por dois modelos diferentes, dos quais, os mais usados em cromatografia e preparação de amostras são planejamento composto central (*central composite design*) e *Box-Behnken*.

A etapa de triagem foi realizada pela avaliação dos 5 parâmetros descritos no QUADRO 7, contemplando um experimento de 2^5 em duplicada, em um total de 64 combinações.

FATOR		A	B
A	Granulometria (Mesh)	10 > x > 24	24 > x > 45
B	Massa (mg)	100	500
C	Solvente	etanol 20%	acetona 20%
D	Tempo de extração (min)	30	60
E	Temperatura (°C)	25	40

QUADRO 7 – FATORES PARA TRIAGEM DA EXTRAÇÃO DAS RAÍZES

Os resultados do gráfico apresentado na FIGURA 20 mostram que todos os parâmetros avaliados interferem na extração da uncalina nas raízes de *P. sidoides*. Dentre eles, destaca-se a influência da granulometria, massa, solvente e temperatura. O tempo de extração, embora tenha mostrado um aumento na extração, foi indicado como o parâmetro de menor impacto. A FIGURA 21 demonstra as influências direta ou inversamente proporcionais aos valores sugeridos.

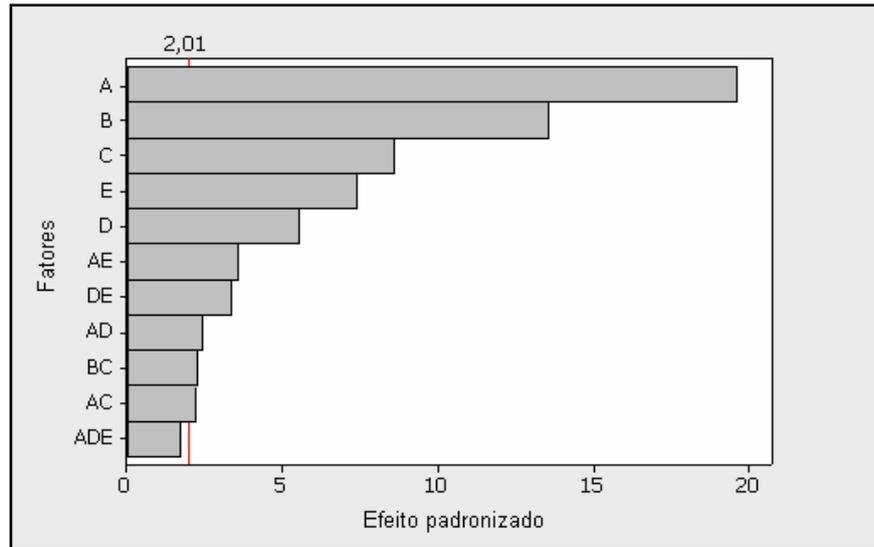


FIGURA 20 – GRÁFICO DE PARETO PARA EFEITOS PADRONIZADOS

LEGENDA: A: granulometria, B: massa, C: solvente, D: tempo, E: temperatura

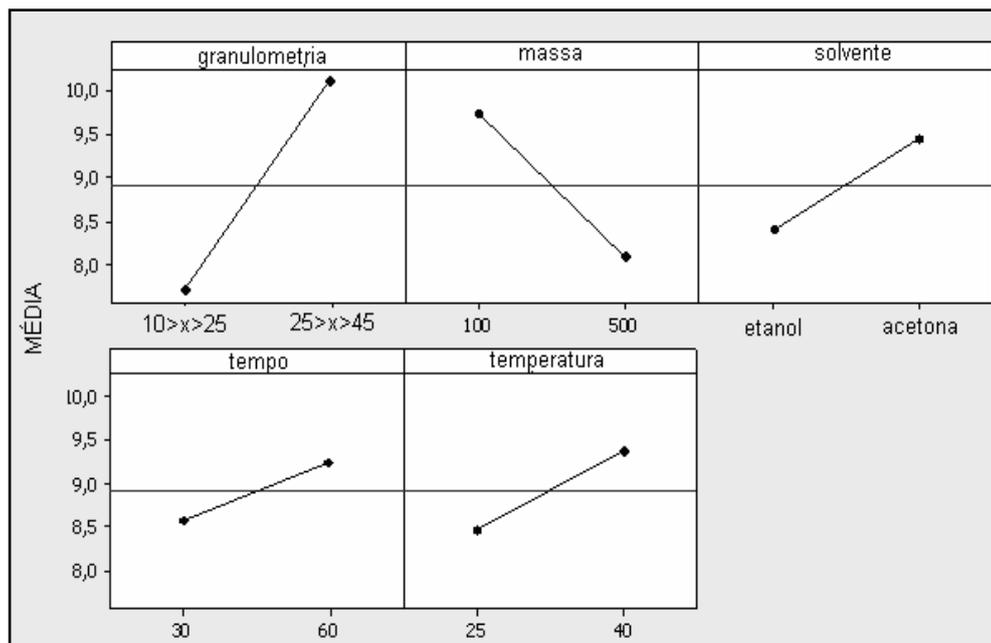


FIGURA 21 – GRÁFICOS COM AS INFLUÊNCIAS DOS PARÂMETROS PARA TRIAGEM

A granulometria figurou-se como o parâmetro mais significativo para a extração das raízes. Dois intervalos de tamanho de partícula foram avaliados, de 710 a 1700 μm ($10 > x > 25$ Mesh) e de 355 a 710 μm ($25 > x > 45$). Nota-se que melhores resultados foram observados em granulometrias menores em função do aumento da área superficial.

A massa de raízes foi o segundo efeito mais relevante, com melhores resultados encontrados em menores massas. Esta constatação permite afirmar que,

nas condições analisadas, uma massa de 500 mg de raízes atinge uma concentração de uncalina e/ou interferentes próxima à saturação do solvente.

Para o solvente de extração, o resultado apresentado pela FIGURA 21 condiz com o efeito constatado por WHITE (2006), que demonstrou que a acetona é capaz de extrair cinco vezes mais uncalina que o etanol. O aquecimento do banho de ultra-som a 40 °C facilitou a extração da uncalina em comparação à temperatura ambiente enquanto o tempo de extração representou o fator de menor impacto, embora o resultado com 60 min tenha sido superior àquele observado com metade do tempo.

A partir destes resultados, a otimização da análise foi avaliada com granulometria inferior, proporções de acetona em água e diferentes massas, mantendo a temperatura do ultra-som em 40 °C (máxima alcançada pelo equipamento utilizado) (QUADRO 8). O tempo (30 min) e número de extrações (apenas 1) foi inicialmente mantido e reavaliados após seleção das melhores condições para os parâmetros otimizados. A otimização foi desenvolvida com o método de *Box-Behnken* e os 3 parâmetros selecionados foram avaliados em 3 níveis.

FATOR		MÍNIMO	MÉDIO	MÁXIMO
A	Granulometria (Mesh)	45 > x > 60	24 > x > 45	10 > x > 24
B	Massa (mg)	25	62,5	100
C	Proporção de acetona em água (%)	20	60	100

QUADRO 8 – FATORES PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DAS RAÍZES

Os resultados obtidos no planejamento foram, então, utilizados para gerar os gráficos de superfícies de respostas. Os gráficos A e B da FIGURA 22 mostram que os melhores resultados figuram-se em granulometrias menores, no intervalo de 250 a 355 μm (60 e 45 Mesh), pela visualização de zona verde escura nos dois gráficos. O gráfico A aponta que, selecionando a granulometria inferior a 45 Mesh, uma concentração de 50% de acetona fornece melhores resultados. Pelo gráfico B, pode-se notar que a granulometria selecionada permite massas entre 40 e 100 mg, sendo selecionado o valor de 60 mg, que apresenta resultados satisfatórios conforme o gráfico C (acetona 50%).

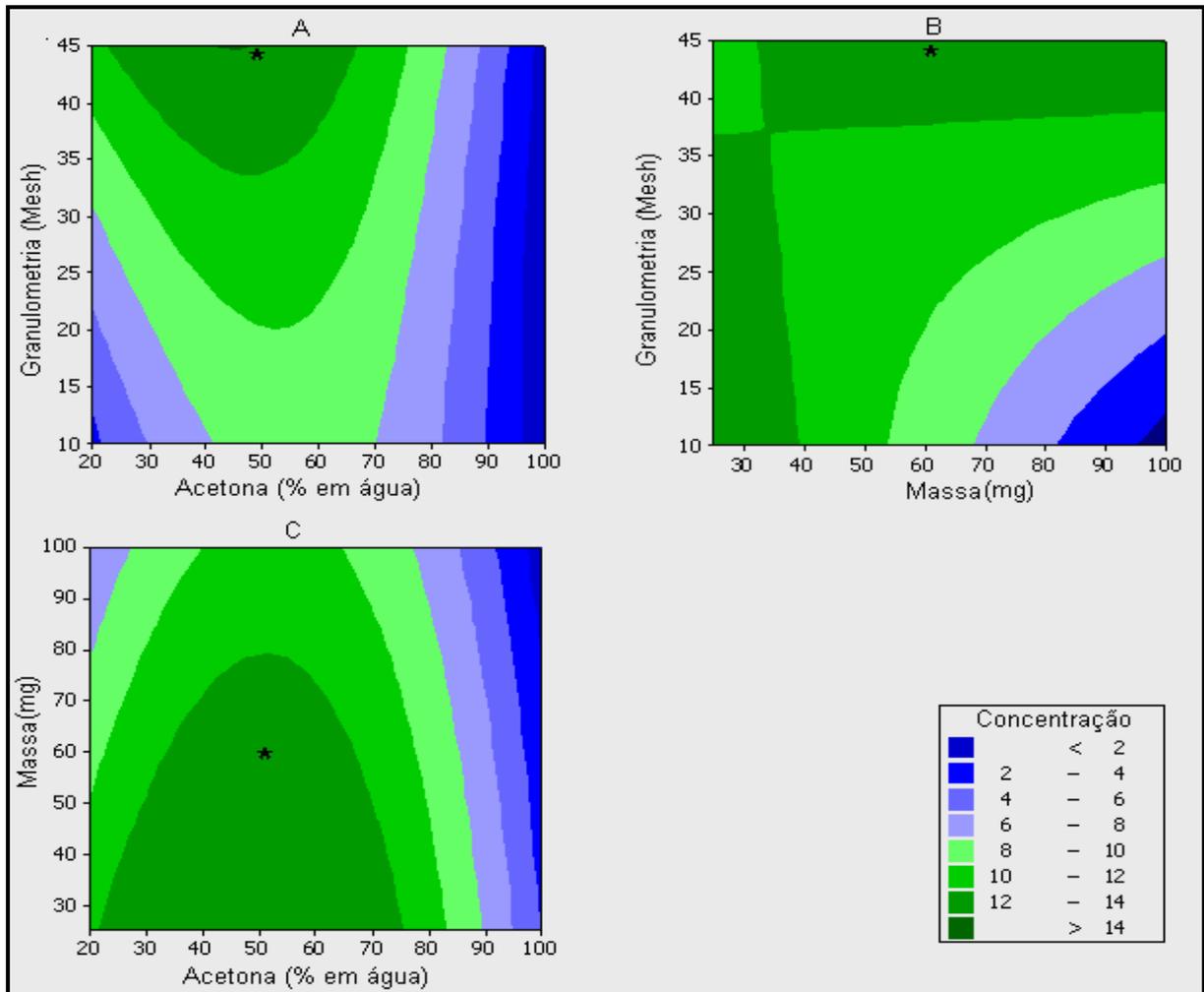


FIGURA 22 – SUPERFÍCIE DE RESPOSTA DA EXTRAÇÃO DAS RAÍZES DE *P. sidoides*

LEGENDA: *valores selecionados para o método

Os testes foram realizados em balão volumétrico de 10 mL para utilização de uma quantidade reduzida de solvente. Porém, para a definição do protocolo, este volume foi aumentado para 25 mL, tomando-se 150 mg ao invés de 60 mg. Assim, aumenta-se a alíquota inicial para diminuir os efeitos de homogeneidade da amostra sem interferir na proporção ótima de massa em relação à quantidade de solvente.

Após os parâmetros otimizados, foi retomada a avaliação do tempo de análise e o número de extrações, lembrando que os testes foram realizados em ultra-som aquecido a 40 °C. A otimização dos parâmetros de massa, solvente e granulometria mostraram que o tempo de 30 min seria suficiente para esgotar a extração da uncalina presente nas raízes. A FIGURA 23 apresenta um exemplo do cromatograma apresentado por esta análise.

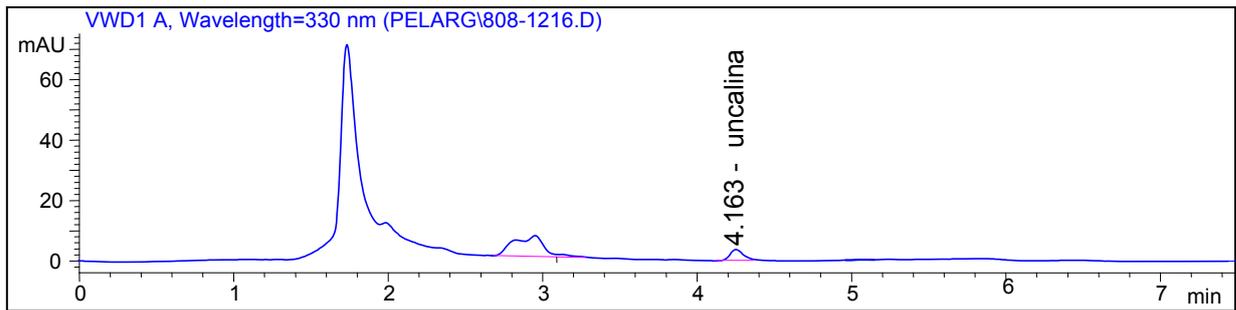


FIGURA 23 – CROMATOGRAMA DAS RAÍZES

5.3.1.1 Otimização da limpeza da amostra de tintura

Para determinação da concentração de uncalina na tintura, foi experimentada a aplicação direta da mesma para avaliar o perfil cromatográfico. Muito embora não houvesse nenhum pico co-eluído no tempo de retenção da uncalina (cerca de 4 min), optou-se por desenvolver procedimentos para a purificação dos demais constituintes químicos, como taninos, eluídos até 2 min, para preservar componentes do sistema cromatográfico, como a coluna, por exemplo.

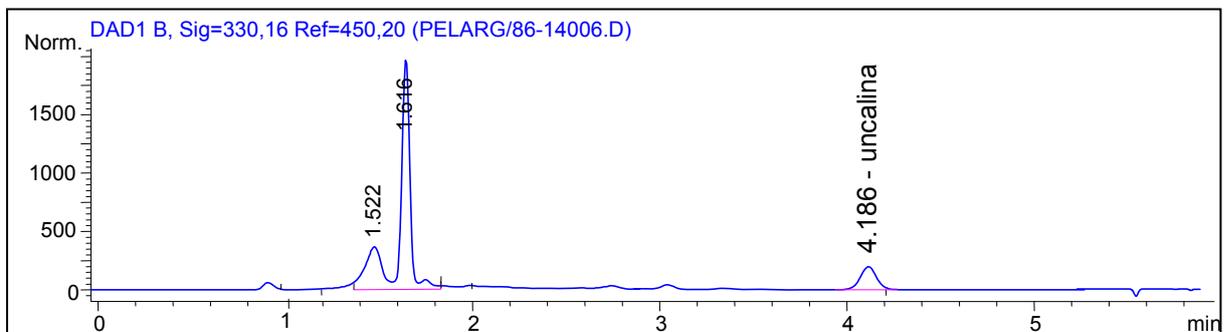


FIGURA 24 – CROMATOGRAMA DA TINTURA COM INJEÇÃO DIRETA (SEM PURIFICAÇÃO)

- Otimização por partição líquido-líquido (LLE)

O éter etílico foi inicialmente selecionado como solvente de extração pelo baixo ponto de ebulição (34,6 °C), o que facilitaria sua remoção (THE MERCK INDEX, 1996). Foi observado que este solvente era capaz de extrair a uncalina com eficiência, sem remover quantidade significativa dos interferentes. Esta constatação

foi possível pela comparação das áreas entre a injeção direta da tintura e a injeção após purificação. Foram testados diferentes volumes de éter etílico, número de extrações e tempo de agitação. Os parâmetros selecionados foram aqueles cuja recuperação de uncalina foi próxima a 100%. A comparação entre a FIGURA 24 e FIGURA 25 demonstra a eficácia da purificação da amostra.

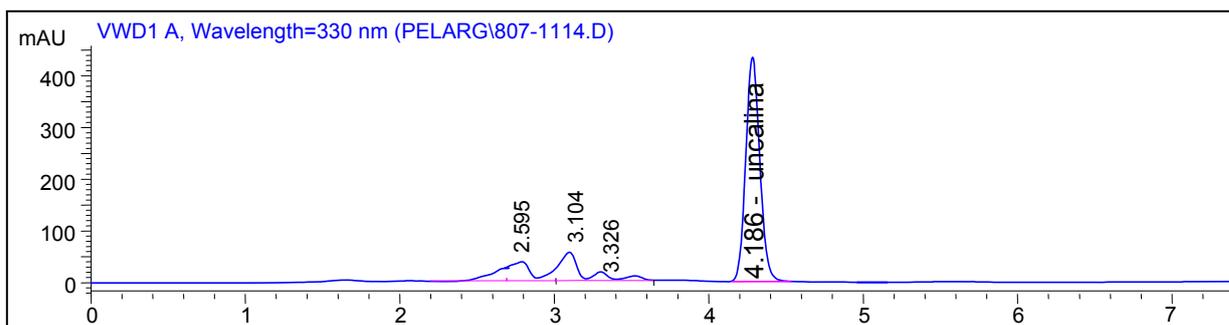


FIGURA 25 – CROMATOGRAMA DA TINTURA EXTRAÍDA POR LLE

- Otimização por extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida foi avaliada nos cartuchos ChromaBond[®] C₁₈ e ChromaBond[®] C₁₈ ec (Macherey-Nagel). Ambos apresentaram a mesma capacidade de retenção da uncalina. O cartucho ec, que representa a opção *end capped*, ou seja, com os grupos silanóis residuais ligados, foi escolhida em função do custo e prazo de entrega. Os cartuchos foram acondicionados com 3 mL de metanol e 3 mL de água ultra-pura, procedimento descrito pelo fabricante.

O volume máximo de tintura para saturação do cartucho foi avaliado em um intervalo de 0,5 mL. Foi observado que o cartucho foi capaz de reter cerca de 75 µg de uncalina, equivalente a 2,5 mL de tintura de pelargônio. Porém, foi necessário estabelecer o volume de 2 mL para permitir a tomada de uma alíquota volumétrica.

A purificação da tintura foi ensaiada com acetonitrila em água, nas proporções de 5, 10, 20 e 30%. A utilização de 5 e 10% exigiram um volume superior a 5 mL para a remoção dos interferentes enquanto 1 mL a 30% provocou a “sangria” da uncalina. Desta maneira, foi estabelecida uma purificação com 2 mL de acetonitrila a 20%, volume adequado para uma prática rápida.

A recuperação da uncalina retida foi avaliada com diferentes volumes de acetonitrila e metanol. O metanol apresentou-se como solvente mais eficiente para a remoção da uncalina do cartucho, sendo necessários, 5 mL para garantir recuperação próxima a 100%. A FIGURA 26 evidencia que o método de purificação por SPE foi satisfatório para a purificação da tintura (vide FIGURA 24).

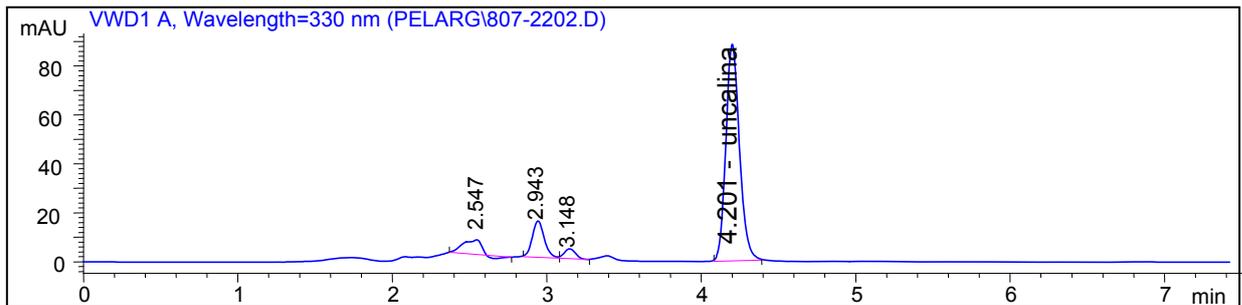


FIGURA 26 – CROMATOGRAMA DA TINTURA EXTRAÍDA POR SPE

5.3.1.2 Otimização da limpeza do xarope por extração em fase sólida (SPE)

O desenvolvimento da purificação do xarope foi realizado após seleção das melhores condições para limpeza da tintura por SPE. Foi observado que o cartucho ChromaBond® C₁₈ ec suportou a retenção de 30 µg uncalina, correspondente a 5 mL de xarope. A redução deste valor em comparação à tintura (75 µg) é decorrente da presença do placebo do xarope, matriz viscosa composta basicamente por xarope de sacarose. A eluição desta mistura mais viscosa aumenta a pressão necessária à eluição, dificultando a adsorção da uncalina. A purificação e a recuperação do analito responderam satisfatoriamente ao método selecionado para tintura (FIGURA 27).

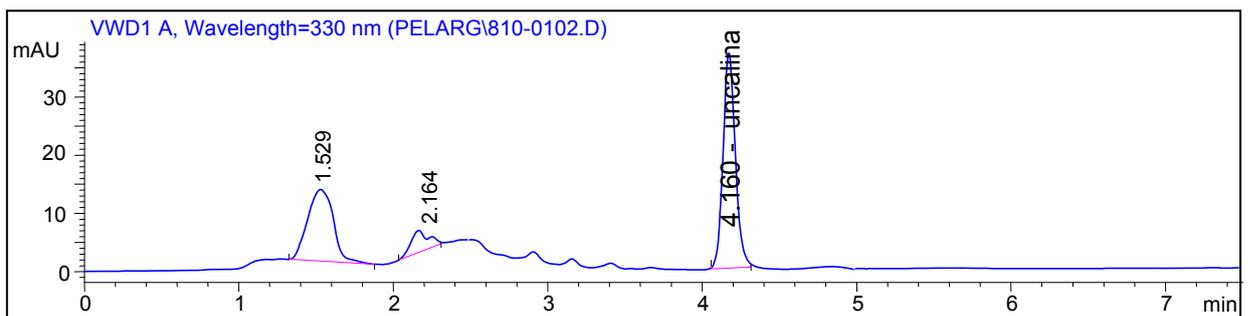


FIGURA 27 – CROMATOGRAMA DO XAROPE APÓS EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

5.3.2 Avaliação da adequação do sistema

A avaliação da adequação do sistema (*system suitability*) pode ser definida como um conjunto de testes para garantir que o equipamento utilizado está apto a gerar resultados de exatidão e precisão aceitáveis. É a verificação da qualidade antes e durante a análise de amostras desconhecidas (RIBANI *et al.*, 2004). Para tanto, é primordial a utilização de um equipamento qualificado. A USP 30 e o FDA apresentam algumas recomendações como resolução superior a 2, fator de alargamento (*tailing factor*) inferior a 2, número de pratos teóricos superior a 2000 e desvio padrão relativo inferior a 1% para 5 ou mais aplicações (FDA, 2001; THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP), 2007).

A conformidade do sistema cromatográfico foi avaliada por 6 injeções sucessivas da mesma amostra em uma coluna nova (18000 pratos teóricos segundo metodologia do fornecedor) e em uma coluna antiga (10000 pratos teóricos segundo a mesma metodologia). A coluna recém aberta forneceu os resultados de tempo de retenção, simetria de pico, resolução e fator de encaldamento descritos no *Método 4*, presente na TABELA 6 (pág. 63). Todos os valores foram adequados aos exigidos pelo FDA e USP 30. A utilização da coluna antiga (com várias injeções já realizadas) forneceu resultados semelhantes para tempo de retenção e resolução, porém, alterou significativamente os valores de simetria de pico (de 0,93 para 0,72) e de fator de encaldamento (de 1,1 para 2,3). O número de pratos teóricos do pico de uncalina também passou de 19500 para 10200, porém, ainda permaneceu acima do valor de 2000, citado pelos compêndios acima descritos. A pressão da coluna também representou um parâmetro significativo, uma vez que alterou de 130 bar (coluna nova) para 290 bar. Em contrapartida, o desvio padrão relativo das 6 injeções para as duas colunas em todas as amostras apresentou resultados de média semelhantes (máximo de 0,8% de variação) e desvio padrão relativo inferior a 1%, valor máximo descrito pela USP 30 e FDA (TABELA 7). As áreas obtidas foram, ainda, submetidas à análise de variância (ANOVA) com execução do teste de Tukey. O resultado demonstrou não haver diferença significativa entre as médias das áreas para todos os métodos.

A avaliação de dados cromatográficos como simetria ou alargamento do pico visam prever dificuldades para integração do pico. Porém, pôde-se perceber que,

apesar da diminuição da adequabilidade destes valores, a injeção em uma coluna antiga reproduziu os resultados obtidos em coluna nova além de apresentar repetibilidade entre as injeções, permitindo sua aplicação.

TABELA 7 – ÁREAS DAS INJEÇÕES SUCESSIVAS EM COLUNA NOVA E ANTIGA

INJ.	PO		TINTURA (LLE)		TINTURA (SPE)		XAROPE	
	COLUNA NOVA	COLUNA ANTIGA	COLUNA NOVA	COLUNA ANTIGA	COLUNA NOVA	COLUNA ANTIGA	COLUNA NOVA	COLUNA ANTIGA
1	23,25	22,83	2.866,74	2.848,23	563,53	559,89	262,87	264,68
2	23,07	23,01	2.844,53	2.856,75	560,12	564,26	264,09	262,68
3	23,10	23,03	2.841,96	2.852,37	559,45	564,77	261,92	263,87
4	23,13	22,95	2.851,65	2.802,32	560,76	562,85	261,84	260,46
5	23,12	22,76	2.876,14	2.828,62	565,98	558,06	262,21	262,87
6	23,07	23,01	2.844,53	2.830,54	563,87	564,26	261,78	263,65
MÉDIA	23,12	22,93	2.854,26	2.836,47	562,29	562,35	262,45	263,03
DP	0,06	0,10	12,79	18,55	2,34	2,51	0,82	1,33
DPR (%)	0,27	0,45	0,45	0,65	0,42	0,45	0,31	0,50

NOTA: Inj. (injeção); DP (desvio padrão); DPR (desvio padrão relativo). Em destaque, os valores das médias e desvio padrão relativo

5.3.3 Avaliação da estabilidade das soluções padrão

Os padrões foram avaliados quanto à estabilidade das soluções, armazenadas em freezer a -20 °C. Foram comparadas as triplicatas das áreas obtidas por uma curva de calibração com 5 pontos entre 12,1 e 121 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de uncalina nos tempos de 0, 30, 60, 90 e 180 dias, por análise de variância (teste de Tukey).

Os resultados de coeficiente de correlação (superiores a 0,9999) aliado à análise de variância mostraram que as soluções padrão, armazenadas sob -20 °C, apresentam estabilidade de, pelo menos, 180 dias (FIGURA 28).

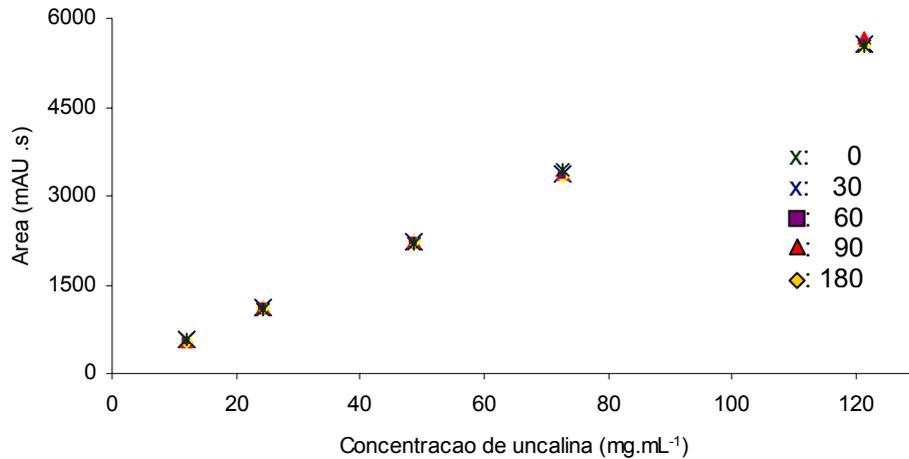


FIGURA 28 – CURVAS DAS SOLUÇÕES PADRÃO ANALISADAS EM 0, 30, 60, 90 E 180 DIAS

LEGENDA: Tempo em dias. Todas as curvas geradas apresentaram r superior a 0,9999

A estabilidade das amostras foi avaliada pela comparação dos resultados logo após a extração e após 24 horas armazenadas a temperatura ambiente (20 °C) (TABELA 8). As áreas obtidas foram comparadas por análise de variância (ANOVA) com execução do teste de Tukey. O resultado demonstrou não haver diferença significativa entre as médias das áreas, permitindo concluir que a amostra pode ficar armazenada por 24 h para injeção posterior.

TABELA 8 – ÁREAS DAS AMOSTRAS APÓS EXTRAÇÃO: TEMPO 0 E 24 HORAS

INJ.	RAÍZES		TINTURA (LLE)		TINTURA (SPE)		XAROPE	
	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h	0 h	24 h
1	22,653	22,789	2.848,23	2.839,71	563,53	563,92	279,47	279,27
2	24,466	23,613	2.752,40	2.755,98	553,24	554,46	276,58	275,97
3	23,100	23,054	2.755,44	2.798,98	552,09	551,98	274,57	274,62
4	22,821	23,019	2.748,99	2.753,87	545,49	534,73	277,74	277,85
5	22,685	22,658	2.793,29	2.789,67	547,36	547,80	277,93	271,87
6	24,236	24,314	2.779,37	2.776,60	547,60	548,36	282,64	282,24
MÉDIA	23,327	23,241	2.779,62	2.785,80	551,55	550,21	278,15	276,97
DP	0,812	0,619	37,84	31,90	6,58	9,57	2,74	3,64
DPR(%)	3,481	2,664	1,36	1,15	1,19	1,74	0,98	1,32

NOTA: Inj. (injeção); DP (desvio padrão); DPR (desvio padrão relativo)

5.4 VALIDAÇÃO DOS MÉTODOS ANALÍTICOS

Os resultados dos métodos validados estão organizados segundo a amostra, ou seja: raízes, tintura (métodos de LLE e SPE) e xarope. Todos os métodos, porém, apresentam as mesmas condições cromatográficas e, por isto, a linearidade para o padrão, o limite de detecção e quantificação e a robustez (parâmetros de cromatografia) serão apresentados em conjunto. Os dados de seletividade por comparação dos perfis espectrais e por análise de pureza de pico também foram reunidos para todos os métodos para permitir a comparação dos resultados de cada amostra e/ou método de extração.

5.4.1 Parâmetros de validação do método cromatográfico

5.4.1.1 Especificidade e seletividade

5.4.1.1.1 Comparação dos perfis espectrais entre amostras e padrão

A comparação de perfis espectrais de um pico determinado é possível pela utilização do detector de arranjo de diodos (DAD). A FIGURA 29 apresenta a comparação entre os perfis espectrais normalizados apresentados pela substância de referência isolada (verde) e as características espectrais do pico da uncalina, observados nas amostras. Nota-se que todos eles apresentaram grande similaridade, o que sugere afirmar que o pico analisado nas amostras é, de fato, uncalina.

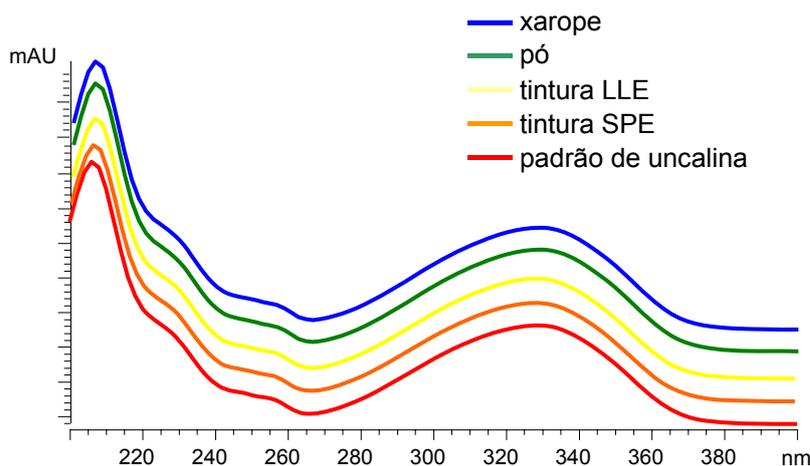


FIGURA 29 – COMPARAÇÃO DE PERFIL ESPECTRAL ENTRE PADRÃO E AMOSTRAS

NOTA: Os perfis espectrais foram normalizados para permitir comparação. As amostras foram diluídas em metanol.

5.4.1.1.2 Análise da pureza de pico da uncalina no padrão e nas amostras

A metodologia foi realizada em um equipamento acoplado a detector de arranjo de diodos (DAD) que permite fornecer o fator de pureza de um pico. Esse termo consiste em um valor calculado pelo software do cromatógrafo (ChemStation) que indica a semelhança entre os perfis espectrais obtidos por um número de pontos selecionados do mesmo pico. Estes espectros são sobrepostos e quanto maior for a similaridade entre eles maior será esse valor, que pode ser expresso em percentual. Um pico com elevado fator de pureza apresenta pouco ruído e conseqüentemente, ausência de impurezas espectrais co-eluídas com o analito de interesse.

Foram observados os resultados de pureza de pico do padrão e das amostras em condições normais e submetidas a hidrólise ácida (0,1 M de HCl) e básica (0,1 M de NaOH), com diminuição de 10 a 15% de uncalina, como proposto por SHABIR (2003) (TABELA 9). HUBER (2001) aponta que, em condições ideais, podem-se encontrar valores de impurezas no pico de 0,05 a 0,1%. Nota-se que todos os valores foram superiores a 99,9%, mesmo nos casos de hidrólise, mostrando que os picos de uncalina do padrão e das amostras não são sobrepostos a interferentes.

TABELA 9 – PUREZAS DO PICO DE UNCALINA NO PADRÃO E NAS AMOSTRAS

AMOSTRA/ MÉTODO	PUREZA DE PICO (%)		
	AMOSTRA NORMAL	AMOSTRA SOB HIDRÓLISE ÁCIDA	AMOSTRA SOB HIDRÓLISE BÁSICA
padrão de uncalina	99,9993	99,9876	99,9184
raízes	99,9397	99,9831	99,9677
tintura via LLE	99,9735	99,9876	99,9184
Tintura via SPE	99,9180	99,9125	99,9644
xarope	99,9967	99,9675	99,9564

5.4.1.2 Linearidade para padrão de uncalina

Primeiramente à avaliação da linearidade para as amostras submetidas ao procedimento completo, foi importante verificar se a injeção de quantidades crescentes de analito apresenta respostas proporcionais. Para esta determinação, foram injetadas 3 curvas de calibração em diferentes dias, com diferentes concentrações, totalizando 15 pontos. O gráfico foi confeccionado em área do pico (mAU.s) *versus* concentração de uncalina ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) (FIGURA 30).

Os pontos apresentaram uma correlação linear, com coeficiente de correlação ($r = 0,9998$) superior ao exigido pelo INMETRO (0,90), pela ANVISA (0,99) e pelo FDA (0,999) (FDA, 2001; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

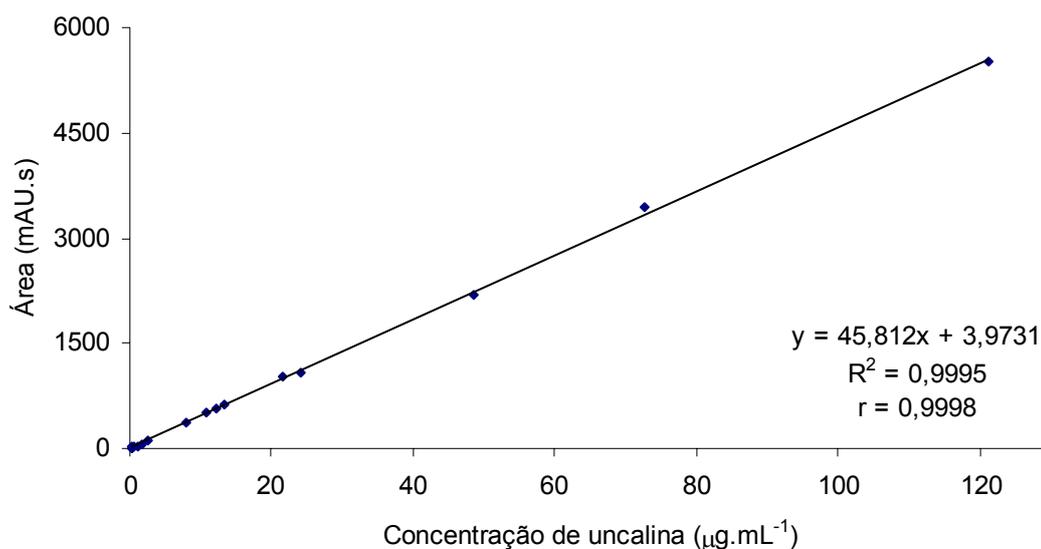


FIGURA 30 – RESULTADO DA LINEARIDADE DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

NOTA: Apresentação da equação da reta; R^2 : coeficiente de determinação; r : coeficiente de correlação

5.4.1.3 Limite de detecção e quantificação

Para obter a equação da reta cujos componentes foram utilizados para a determinação dos limites de detecção e quantificação, foram preparadas 5 soluções entre 0,081 e 1,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Estas soluções foram preparadas, pois, segundo RIBANI *et al.* (2004), o LD e LQ devem ser avaliados pela curva formada por concentrações próximas a estes limites. As áreas observadas pelas 5 injeções de cada ponto foram cruzadas às concentrações para construção do gráfico (FIGURA 31). Os valores de coeficiente angular (a) e coeficiente linear (b) da equação da reta apresentada no gráfico foram utilizados para o cálculo dos limites.

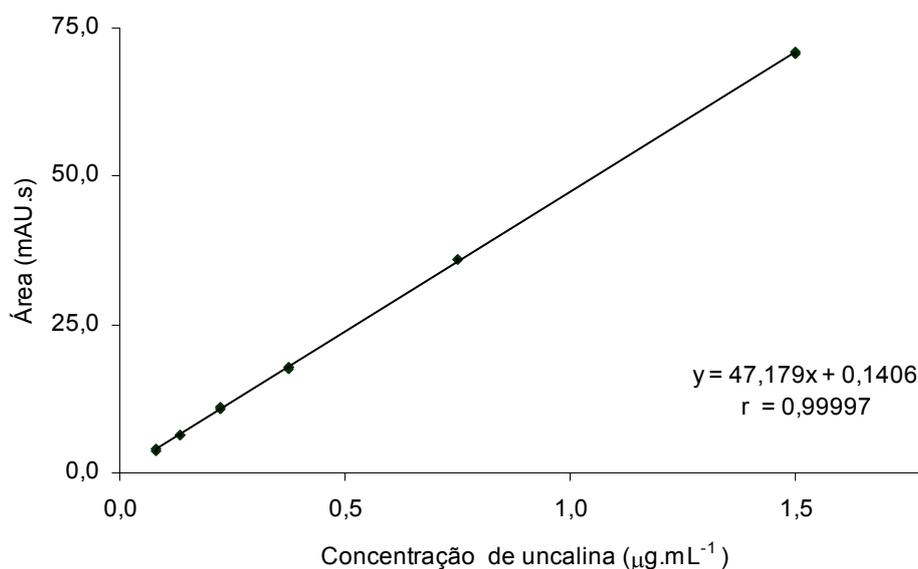


FIGURA 31 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

NOTA: Apresentação da equação da reta; r: coeficiente de correlação. Cada ponto da reta corresponde às 6 injeções realizadas em cada concentração.

RIBANI *et al.* (2004) destacam que o método baseado na curva analítica é estatisticamente mais confiável. A utilização das equações descritas pelos autores mostraram um limite de detecção do método de 9,8 ng.mL^{-1} (EQUAÇÃO 8) e limite de quantificação de 29,8 ng.mL^{-1} (EQUAÇÃO 9).

$$LD = \frac{3,3 \times b}{a} \Rightarrow LD = \frac{3,3 \times 0,1406}{47,179} \Rightarrow LD = 0,0098 \mu\text{g.mL}^{-1} \quad (8)$$

$$LQ = \frac{10 \times b}{a} \Rightarrow LQ = \frac{10 \times 0,1406}{47,179} \Rightarrow LQ = 0,0298 \mu\text{g.mL}^{-1} \quad (9)$$

Onde:

a: inclinação da curva de calibração, ou seja, coeficiente angular (sendo $y = ax + b$);
b: coeficiente linear da equação da reta da curva de calibração.

O limite de quantificação representa a menor concentração em que o analito pode ser determinado com precisão, exatidão e linearidade. A linearidade já foi observada pelo gráfico da FIGURA 31. Para confirmação da precisão e exatidão ao nível do limite de quantificação determinado, cada amostra foi diluída suficientemente para obter cerca de 30 ng.mL^{-1} e, 6 replicatas foram realizadas, submetendo-as a todo processo de extração. Os valores encontrados para área, resultado (ng.mL^{-1}), desvio padrão relativo e recuperação estão dispostos na TABELA 10. Nota-se que os valores de desvio padrão relativo foram inferiores a 3%, enquanto o FDA permite um valor de 20% para injeções próximas ao limite. Para a recuperação, os valores também foram aceitáveis se comparados ao range publicado por HUBER (2003), traduzidos na TABELA 3 (pág. 36). Segundo o autor, para quantificações na ordem de 10 ng.mL^{-1} , a variação da recuperação pode estar no intervalo de 60 a 115%.

TABELA 10 – DADOS PARA AVALIAÇÃO DO LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO

AMOSTRA/ MÉTODO	ÁREA	RESULTADO (ng.mL^{-1})	DPR (%)	RECUPERAÇÃO (%)
RAÍZES	$1,5586 \pm 0,0352$	$0,030 \pm 0,0007$	2,481	100,18
SPE	$1,4780 \pm 0,0367$	$0,028 \pm 0,0008$	2,745	94,49
LLE	$1,3787 \pm 0,0348$	$0,026 \pm 0,0007$	2,810	87,48
XAROPE	$1,4832 \pm 0,0253$	$0,028 \pm 0,0005$	1,889	94,86

5.4.1.4 Robustez para parâmetros cromatográficos

Como já comentado no item 4.4.7 (pág. 48), os parâmetros cromatográficos foram avaliados com triplicatas da amostra da tintura submetida à SPE. Foram comparadas as médias de uma amostra controle com as médias das amostras

submetidas a variações. Os resultados foram avaliados pela aplicação de análise de variância (ANOVA) com execução do teste de Tukey.

O gráfico da FIGURA 32 demonstra que apenas a variação da temperatura não provocou alteração no método. Os parâmetros alterados de coluna, composição e fluxo de fase móvel, que apresentaram resultados significativos, modificaram o tempo de retenção em mais de 7% com relação ao controle, permitindo correlacionar as variações significativas de área quanto à alteração do tempo de retenção do analito.

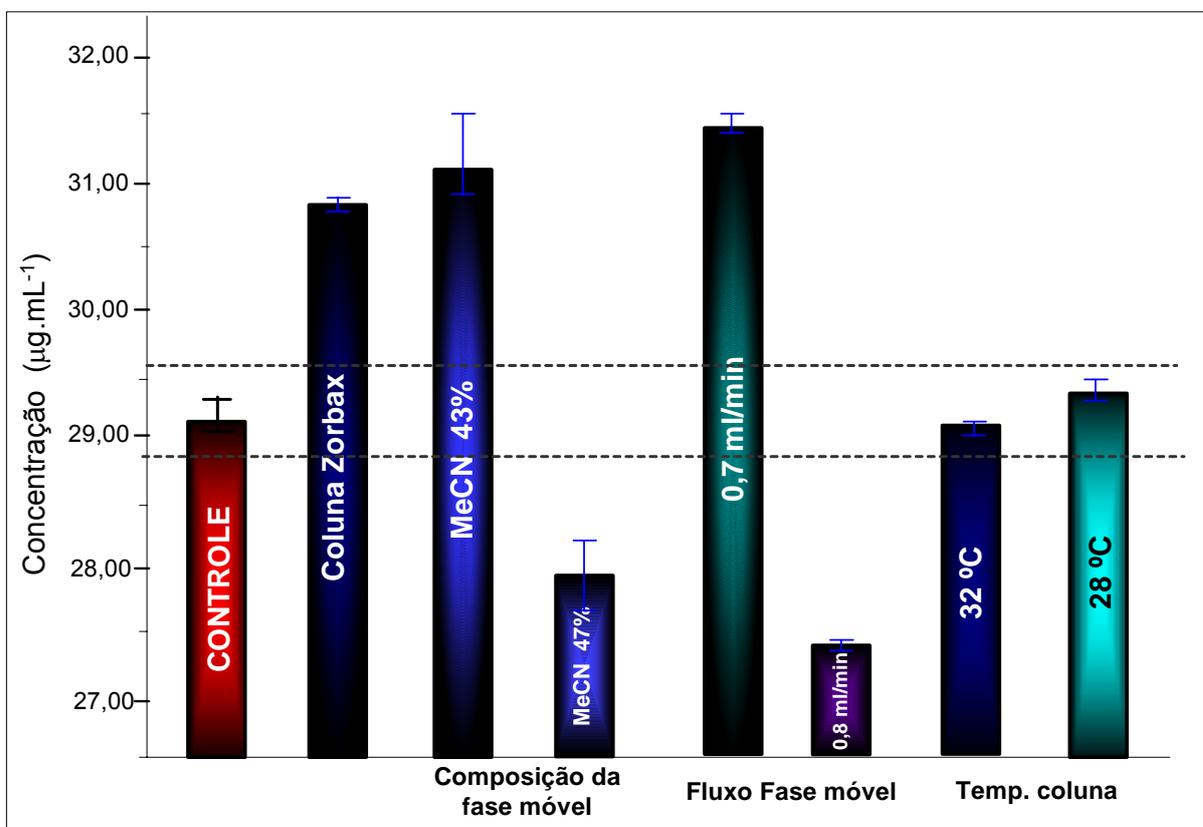


FIGURA 32 – COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DE ANÁLISE DE ROBUSTEZ DO MÉTODO

NOTA: Linhas que delimitam os resultados que apresentaram médias estatisticamente iguais ao controle

Para cada variação testada, um nível do padrão foi injetado e pôde-se perceber que a variação sofrida pela amostra foi proporcional à apresentada pelo padrão. Tal constatação permite inferir que re-injetando a curva de calibração, não mais seria observado diferença no resultado final da amostra. A execução do método por um analista treinado garante não haver alteração da coluna ou mesmo preparo de um novo lote de fase móvel sem que seja re-injetada a curva de

calibração. Além disso, a utilização de um equipamento qualificado permite garantir que o fluxo será constante. Dessa maneira, a diferença nos resultados encontrados na robustez pode ser evitada pelos pré-requisitos básicos para a execução de um método (analista treinado e equipamento qualificado) bem como notados pela variação no tempo de retenção do pico de uncalina.

5.4.2 Validação da análise das raízes de *P. sidoides*

Os parâmetros avaliados separadamente para a validação das raízes foram: seletividade (método de adição de padrão), linearidade, repetibilidade, precisão intermediária, exatidão e robustez no método de extração.

5.4.2.1 Seletividade (método de adição de padrão)

A seletividade pelo método de adição de padrão foi realizada como descrito para a exatidão (4.4.6, pág. 47). Neste caso, observa-se o paralelismo entre as curvas de padrão e padrão adicionado de amostra. A verificação desta característica foi obtida pela comparação do coeficiente angular (a) das duas retas (FIGURA 35, pág. 86). Observam-se os valores de 40,355 para reta de padrão e 40,812 para a reta de padrão adicionado de amostra. Assim, pode-se dizer que a reta que recebeu a “contaminação” de amostra alterou em 1,01% o coeficiente angular. Se considerarmos que a reta que contém amostra foi submetida a todas as etapas do procedimento, pode-se atribuir o resultado à variabilidade inerente ao método. Desta maneira, pode-se considerar a seletividade do método analítico.

5.4.2.2 Linearidade

A linearidade do método de determinação da uncalina nas raízes foi avaliada pela utilização da amostra. No caso de fitoterápicos, a utilização deste tipo de avaliação reproduz de forma idêntica o ambiente químico da análise, tornando a verificação mais consistente em relação à proporcionalidade da resposta. A demonstração desse teste com a substância de referência seria mais facilmente

obtida uma vez que o analito está ausente de impurezas. As amostras foram preparadas pela pesagem proporcional para obtenção de 5 concentrações de 80 a 120% da quantidade usualmente avaliada no método. Submetendo-se ao mesmo procedimento usual das raízes, as soluções injetadas apresentaram de 0,494 a 0,742 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de uncalina (TABELA 11).

TABELA 11 – CONCENTRAÇÃO DE UNCALINA PARA LINEARIDADE DAS RAÍZES

CONC. (%)	TOMADA DE AMOSTRA (mg)	QUANTIDADE TOMADA (μg de uncalina)	CONCENTRAÇÃO INJETADA ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)
80	120	12,36	0,494
90	135	13,91	0,556
100	150	15,45	0,618
110	165	17,00	0,680
120	180	18,54	0,742

NOTA: Conc.: concentração. Considerando as raízes com 10,3 mg/100 g e a amostra diluída para 25 mL

O gráfico apresentado na FIGURA 33 expõe o valor de 0,9998 para o coeficiente de correlação, resultado superior ao exigido pelo INMETRO (0,90), ANVISA (0,99) e FDA (0,999) (FDA, 2001; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003).

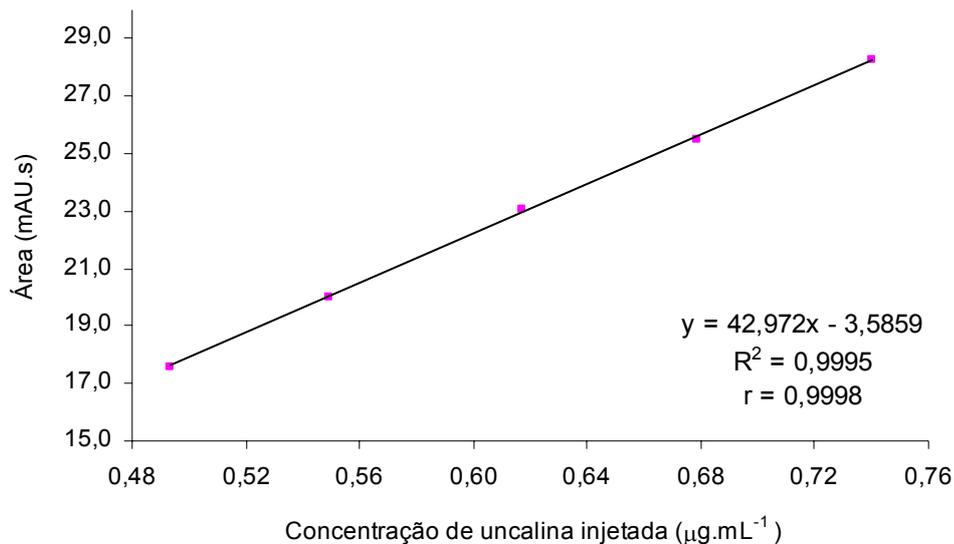


FIGURA 33 – LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DAS RAÍZES

NOTA: Apresentação da equação da reta; R^2 : coeficiente de determinação; r : coeficiente de correlação

A ANVISA ainda recomenda a avaliação dos resíduos obtidos pelos pontos. Este termo consiste na diferença entre a área obtida pelo cromatograma e a área calculada em função da equação da reta. Um gráfico é construído plotando os resíduos calculados *versus* as concentrações das amostras com avaliação da linha de tendência entre os pontos. Uma reta sobre o eixo das abscissas indica que os pontos estão aleatoriamente dispostos enquanto uma inclinação na reta indica a tendência dos resultados em função da concentração. PIMENTEL e NETO (1996) destacam a importância da análise de resíduos. Esta deve dar a impressão de ter sido produzida por uma distribuição normal, com pontos dispostos de forma aleatória, de modo a não indicar que sua variação é constante.

A FIGURA 34 apresenta a disposição aleatória entre os resíduos apresentados pelos dados de linearidade da metodologia para análise das raízes de *P. sidoides*.

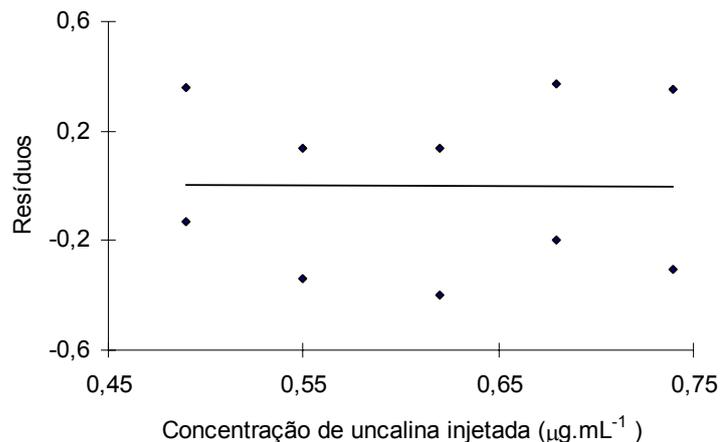


FIGURA 34 – RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE (RAÍZES)

5.4.2.3 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada entre 6 replicatas da amostra a 100%, executadas pelo mesmo analista. O resultado foi fornecido em desvio padrão e desvio padrão relativo (TABELA 12). Pode-se observar um valor de desvio padrão relativo (2,96%) inferior aos 5% preconizados pela ANVISA. Porém, este valor foi superior ao previsto por SHABIR (2003), de 2%. A aplicação deste limite pode ser

discutida no caso da avaliação de uma matéria-prima vegetal contendo baixa quantidade de analito submetida à extração, uma vez que esta concentração pode representar a própria homogeneidade da amostra.

TABELA 12 – REPETIBILIDADE PARA O MÉTODO DE ANÁLISE DAS RAÍZES

REPLICATA	ÁREA	RESULTADO CROMATOGRAMA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de uncalina)	RESULTADO FINAL (mg/100 g de raízes)
1	22,653	0,584	9,73
2	24,466	0,629	10,40
3	23,100	0,595	9,90
4	22,821	0,588	9,81
5	22,685	0,585	9,76
6	24,236	0,623	10,33
Média	N.A.	N.A.	9,99
DP	N.A.	N.A.	0,30
DPR (%)	N.A.	N.A.	2,96

NOTA: DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; N.A.: não aplicável. Resultado final calculado em função da tomada de amostra e das diluições realizadas

5.4.2.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária do método foi avaliada entre 12 replicatas da amostra a 100%, executadas por 2 analistas (A e B), em diferentes dias. A TABELA 13 exibe o valor de 2,23% para desvio padrão relativo, resultado inferior ao máximo permitido pela ANVISA (5%).

TABELA 13 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA O MÉTODO DE ANÁLISE DAS RAÍZES

ANALISTA/ REPLICATA	ÁREA	RESULTADO CROMATOGRAMA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de uncalina)	RESULTADO FINAL (mg/100 g de raízes)
A1	22,653	0,584	9,73
A2	24,466	0,629	10,40
A3	23,100	0,595	9,90
A4	22,821	0,588	9,81
A5	22,685	0,585	9,76
A6	24,236	0,623	10,33
B1	24,665	0,600	9,97
B2	24,070	0,586	9,75
B3	24,537	0,598	9,96
B4	25,479	0,620	10,33
B5	23,977	0,584	9,71
B6	24,512	0,597	9,94
Média	N.A.	N.A.	9,94
DP	N.A.	N.A.	0,22
DPR (%)	N.A.	N.A.	2,23

NOTA: DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; N.A.: não aplicável; resultado final gerado em função da tomada de amostra e das diluições realizadas.

5.4.2.5 Exatidão

As raízes analisadas constituem um exemplo cuja obtenção da matriz sem o analito é impossível. Neste caso, sugere-se o teste de adição de padrão à amostra. Este método consiste na adição de quantidades conhecidas da substância de interesse a quantidades conhecidas de amostra, antes de seu preparo. Foram construídas duas curvas, uma de padrão e outra com o padrão adicionado de quantidades fixas de amostra, como descrito na TABELA 14.

TABELA 14 – QUANTIDADES DE UNCALINA EM ADIÇÃO DE PADRÃO À AMOSTRA (RAÍZES)

NÍVEL	CONCENTRAÇÃO DE UNCALINA	
	SOLUÇÃO PADRÃO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	PADRÃO + AMOSTRA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ¹
1	0,229	0,000
2	0,382	0,142
3	0,637	0,287
4	1,061	0,573
5	1,769	0,717

NOTA: ¹A quantidade de amostra foi aquela usualmente praticada no procedimento. A concentração descrita para padrão + amostra não contempla a quantidade de uncalina da amostra

O gráfico presente na FIGURA 35 apresenta as duas retas obtidas, bem como suas equações e coeficientes de correlação.

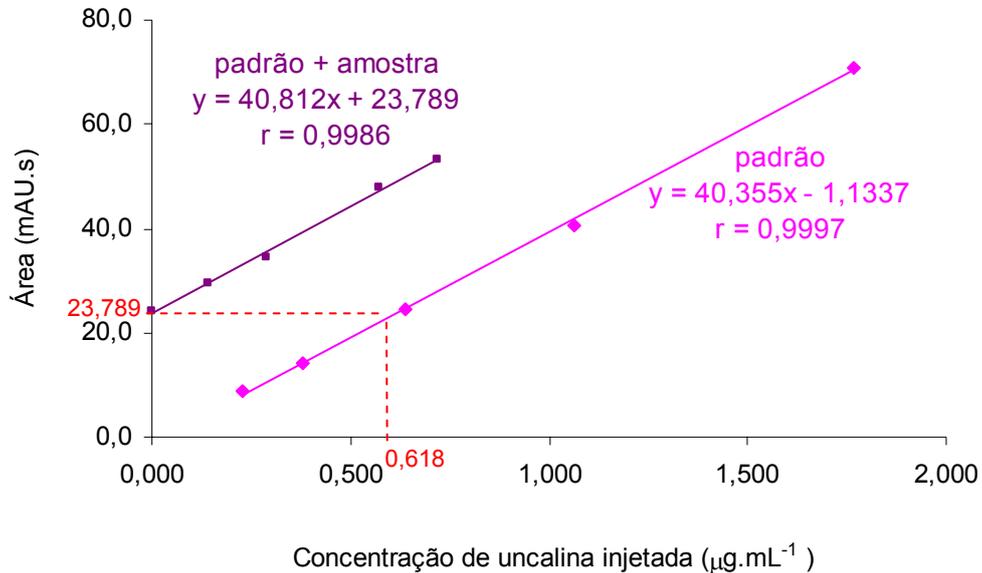


FIGURA 35 – CURVAS PADRÃO E PADRÃO + AMOSTRA PARA ANÁLISE DA RAIZ

NOTA: Apresentação da equação da reta; r: coeficiente de correlação; apresentação da extrapolação da área equivalente ao coeficiente linear da curva de padrão + amostra na reta equivalente ao padrão (linha vermelha pontilhada)

O ponto onde a reta contendo a amostra corta o eixo das abscissas (equivalente ao coeficiente linear da equação) corresponde à área de uncalina presente na amostra. A extrapolação deste ponto na reta de padronização externa define, no eixo das abscissas, a concentração real da substância na amostra analisada. O resultado encontrado segue a unidade da curva de calibração, ou seja, μg de uncalina por mL de solução injetada. Assim, para encontrar o resultado em mg de uncalina em cada 100 g de raízes, as diluições realizadas bem como a alíquota de amostra efetuada na análise devem ser consideradas. A EQUAÇÃO 10 apresenta o cálculo realizado e demonstra que as raízes de *P. sidoides* analisadas possuem um resultado verdadeiro de 10,30 mg de uncalina em cada 100 g de raízes.

$$23,789 = 40,355 x - 1,1337$$

$$x = 0,618 \mu\text{g/mL de solução}$$

$$0,618 \mu\text{g} \times 16,67 = 10,30 \text{ mg/100 g de raízes}$$
(10)

Onde:

equação da reta do padrão: $y = 40,355 x - 1,1337$;

equação da reta do padrão + amostra: $y = 40,812 x + 23,789$;

23,789 : área correspondente à amostra sem adição de padrão;

16,67: valor para correção das diluições e tomada de amostra (150 mg).

Após a verificação do valor verdadeiro nas raízes, foram analisadas as amostras nas concentrações de 80, 100 e 120%, em triplicata, pela tomada de amostra proporcional a estas concentrações, como descrito no item 4.4.6 (pág. 47). O resultado foi fornecido como recuperação em função do valor verdadeiro (TABELA 15). A recuperação do método permaneceu no intervalo de 95,15% e 100,51%. Estes resultados mostram-se adequados segundo o limite previsto por HUBER (2001), que destaca um intervalo permitido de 80 a 110% de recuperação para analitos na ordem de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (TABELA 3, pág. 19).

TABELA 15 – RECUPERAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE DAS RAÍZES

NÍVEL (%)	RESULTADO ESPERADO (mg/100 g)	ÁREA	RESULTADO FINAL (mg/100 g)	RECUPERAÇÃO Média ± DPR (%)
80	8,24	18,1196	7,83	95,15 ± 1,71
		18,3348	7,50	
		17,7873	7,67	
100	10,30	24,0782	10,28	99,91 ± 1,76
		23,6481	10,11	
		24,4874	10,48	
120	12,36	30,1266	12,85	100,51 ± 2,97
		28,5590	12,19	
		28,6453	12,23	

NOTA: DPR: desvio padrão relativo. Destaque ao resultado esperado em função do método de adição de padrão à amostra;

5.4.2.6 Robustez

Para a avaliação da robustez do método de análise das raízes, foram consideradas as temperaturas do banho de ultra-som nas variações de 35 e 45 °C.

As amostras foram analisadas em triplicata e foram comparados a um controle, utilizando análise de variância (ANOVA) com execução do teste de Tukey. Foi observado que as alterações na temperatura do banho não provocaram variação significativa em relação à média do controle.

5.4.3 Validação da análise da tintura por LLE e SPE

Para análise da tintura, tanto o procedimento de extração em fase sólida (SPE) quanto o método de extração por partição líquido-líquido (LLE) foram validados. Os dados destes dois métodos foram analisados em conjunto a fim de permitir comparação.

5.4.3.1 Seletividade (método de adição de padrão)

A concentração dos padrões para construção da curva bem como a quantidade adicionada à amostra estão descritas no item 4.4.6 (pág. 47). O paralelismo entre as retas foi observado pela comparação dos coeficientes angulares entre as curvas de padrão e padrão adicionado de amostra, visualizados nos gráficos da FIGURA 40, para método LLE e, FIGURA 41 para método SPE.

Para o método de extração por LLE, foi encontrado um coeficiente angular de 45,802 para a reta do padrão e de 45,167 (valor 1,39% inferior) para padrão adicionado de amostra. No caso do método de extração via SPE, os resultados foram 48,685 para a reta de padrão e, 48,183 para padrão em presença de amostra, valor 1,03% inferior. Os resultados obtidos pelas duas formas de extração foram semelhantes e suficientes para considerar o paralelismo entre as curvas, confirmando que a matriz da tintura não interfere na análise independente do método de extração.

5.4.3.2 Linearidade

A avaliação da linearidade para análise da tintura tanto para o método de LLE quanto SPE foram realizadas com a amostra, segundo o preparo descrito no

item 4.4.2 (pág. 45). As amostras preparadas foram submetidas aos procedimentos de LLE e SPE, apresentando as concentrações descritas na TABELA 16. Assim como descrito na linearidade para a determinação das raízes, a avaliação da linearidade com utilização da amostra traduz o ambiente químico da análise, tornando a verificação mais confiável.

TABELA 16 – CONCENTRAÇÃO DE UNCALINA PARA LINEARIDADE NA TINTURA

CONC. (%)	LLE/SPE	LLE ¹	SPE ²
	CONC. NA TINTURA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CONC. INJETADA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CONC. INJETADA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
80	24,06	48,11	9,62
90	27,06	54,13	10,83
100	30,07	60,14	12,03
110	33,08	66,15	13,23
120	36,08	72,17	14,43

NOTA: Conc.: concentração; tintura contendo $30,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$; ¹tomada de 20 mL e diluição para 10 mL; ²tomada de 2 mL e diluição para 5 mL

O gráfico da FIGURA 38 revela um coeficiente de correlação de 0,9991, apresentado pelos pontos do método via LLE, enquanto o gráfico da FIGURA 36 expõe este coeficiente para o método via SPE, com um valor de 0,9994. Ambos apresentaram-se superiores ao previsto pelo INMETRO (0,90), ANVISA (0,99) e FDA (0,999) (FDA, 2001; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). Os dois métodos também apresentaram resíduos aleatoriamente dispostos, como discutido por PIMENTEL e NETO (1996), presente no gráfico da FIGURA 37, relativo a LLE e no gráfico da FIGURA 39, referente a SPE. A partir destes testes, pode-se afirmar que as duas formas de extração são capazes de apresentar resultados lineares.

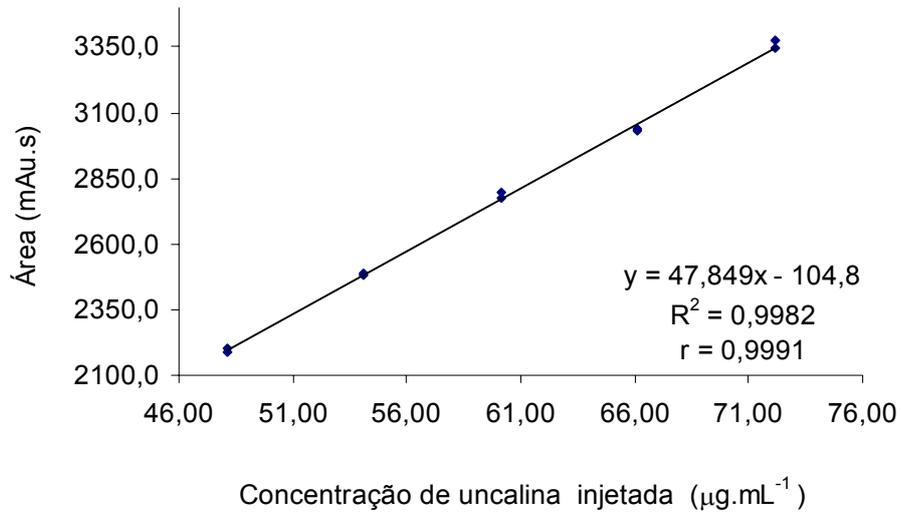


FIGURA 36 – LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DA TINTURA POR LLE

NOTA: Apresentação da equação da reta; R^2 : coeficiente de determinação; r : coeficiente de correlação

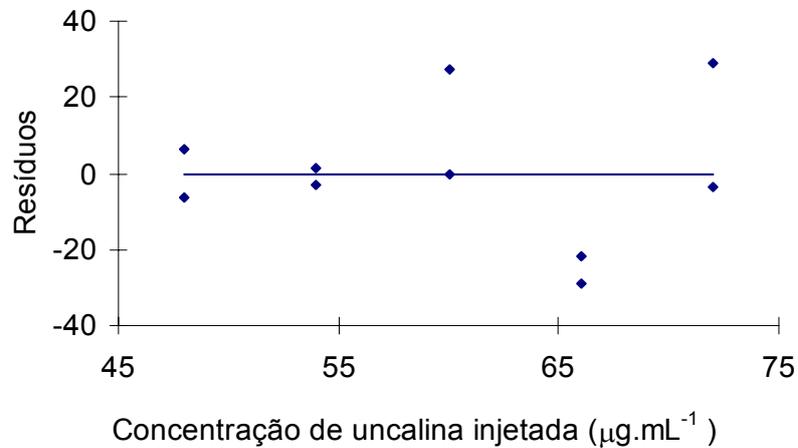


FIGURA 37 – RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE (TINTURA POR LLE)

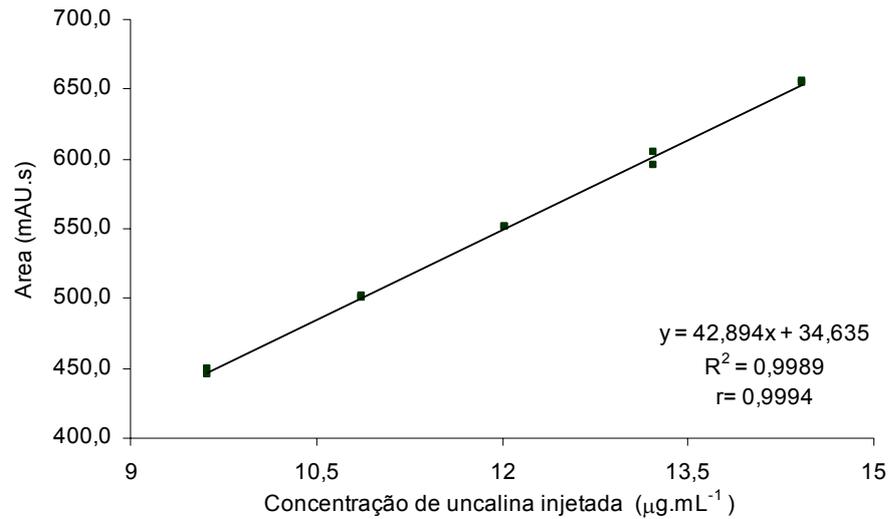


FIGURA 38 – LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DA TINTURA POR SPE

NOTA: Apresentação da equação da reta; R^2 : coeficiente de determinação; r : coeficiente de correlação

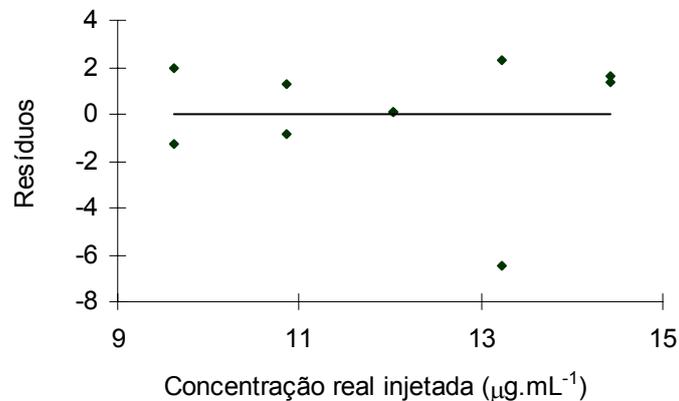


FIGURA 39 – RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE (TINTURA POR SPE)

5.4.3.3 Repetibilidade

A repetibilidade do método foi avaliada entre 6 replicatas da amostra a 100%, executadas pelo mesmo analista. A TABELA 17 demonstra que os resultados de desvio padrão relativo (coeficiente de variação) entre as 6 análises dos dois métodos de extração foram muito semelhantes (1,29% para LLE e 1,17% para SPE).

Os DPR dos dois métodos foram inferiores ao valor máximo estabelecido pela ANVISA (5%) e por SHABIR (2%) (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

TABELA 17 – REPETIBILIDADE PARA ANÁLISE DA TINTURA POR SPE E LLE

REPLICATA	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)			EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)		
	ÁREA	RESULTADO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RESULTADO FINAL ¹ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ÁREA	RESULTADO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RESULTADO FINAL ¹ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1	2.848,23	62,04	31,02	547,790	11,84	29,60
2	2.752,40	60,12	30,06	547,780	11,63	29,08
3	2.755,44	60,12	30,06	570,930	11,61	29,03
4	2.748,99	59,92	29,96	561,450	11,47	28,68
5	2.793,29	60,88	30,44	557,830	11,51	28,78
6	2.779,37	60,58	30,29	552,298	11,51	28,78
Média	N.A.	N.A.	30,31	N.A.	N.A.	28,99
DP	N.A.	N.A.	0,39	N.A.	N.A.	0,34
DPR (%)	N.A.	N.A.	1,29	N.A.	N.A.	1,17

NOTA: DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; N.A.: não aplicável. Em destaque, o desvio padrão relativo apresentado para cada método de extração. ¹Resultado final gerado em função das diluições

5.4.3.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pelo desvio padrão relativo observado entre 12 análises executadas por dois analistas diferentes (A e B), em diferentes dias. A TABELA 18 mostra que o DPR das amostras extraídas via LLE (2,91%) foi superior aquele obtido via SPE (1,60%). Esta diferença pode ser justificada, uma vez que a extração líquido-líquido emprega a agitação manual, cuja execução pode variar para cada analista enquanto a prática por SPE sofre etapas mais objetivas. Vale ressaltar que, mesmo com esta diferença, o DPR das amostras de LLE foi inferior aos 5% exigidos pela ANVISA (BRASIL, 2003).

TABELA 18 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA ANÁLISE DA TINTURA POR SPE E LLE

ANALISTA / REPLICATA	EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)			EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)		
	ÁREA	RESULTADO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ injetado)	RESULTADO FINAL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tintura)	ÁREA	RESULTADO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ injetado)	RESULTADO FINAL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de tintura)
A1	2.608,96	57,47	28,74	547,790	11,62	29,05
A2	2.567,31	56,57	28,28	547,780	11,62	29,05
A3	2.718,45	59,85	29,93	570,930	12,10	30,25
A4	2.566,07	56,54	28,27	561,450	11,90	29,75
A5	2.693,65	59,31	29,66	557,830	11,83	29,58
A6	2.654,34	58,46	29,23	552,298	11,72	29,30
B1	2.608,96	57,47	28,74	547,790	11,62	29,05
B2	2.567,31	56,57	28,28	547,780	11,62	29,05
B3	2.718,45	59,85	29,93	570,930	12,10	30,25
B4	2.566,07	56,54	28,27	561,450	11,90	29,75
B5	2.693,65	59,31	29,66	557,830	11,83	29,58
B6	2.654,34	58,46	29,23	552,298	11,72	29,30
Média	N.A.	N.A.	29,66	N.A.	N.A.	29,24
DP	N.A.	N.A.	0,86	N.A.	N.A.	0,47
DPR (%)	N.A.	N.A.	2,91	N.A.	N.A.	1,60

NOTA: DP: desvio padrão; DPR: desvio padrão relativo; N.A.: não aplicável. Resultado final gerado em função das diluições. Em destaque, o desvio padrão relativo apresentado para cada método de extração

5.4.3.5 Exatidão

Assim como as raízes, é impossível obter a matriz da tintura isenta do analito. Dessa forma, deve-se recorrer ao método de adição de padrão. Uma curva padrão foi corrida em concentrações próximas à de leitura da amostra. Em paralelo, 5 alíquotas de amostra foram tomadas e, em quatro delas, adicionadas quantidades crescentes de padrão (TABELA 19). O coeficiente linear das retas das soluções contendo amostra foi extrapolado nas curvas de padrão, a fim de encontrar a concentração verdadeira de uncalina na amostra.

TABELA 19 – QUANTIDADE DE UNCALINA EM ADIÇÃO DE PADRÃO À AMOSTRA - TINTURA

NÍVEL	CONCENTRAÇÃO DE UNCALINA ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (LLE)		EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE)	
	SOLUÇÃO PADRÃO	SOLUÇÃO PADRÃO + AMOSTRA ¹	SOLUÇÃO PADRÃO	SOLUÇÃO PADRÃO + AMOSTRA ¹
1	12,128	0,000	2,628	0,000
2	24,256	5,360	8,046	2,385
3	48,511	13,410	10,728	4,180
4	72,767	26,860	13,410	5,790
5	121,278	40,230	21,460	6,090

NOTA: ¹A quantidade de amostra foi aquela usualmente praticada no procedimento. A concentração descrita para padrão + amostra não contempla a uncalina presente na amostra

O gráfico presente na FIGURA 40 demonstra as curvas de padrão de padrão adicionado de amostra para a extração por partição líquido-líquido. A comparação dos coeficientes angulares já foi realizada no teste de seletividade e comprovou que a matriz da tintura não apresenta interferência na metodologia. Para determinar o valor verdadeiro da tintura, a área correspondente ao coeficiente linear na reta que contém amostra (2753) foi extrapolada à curva padrão (EQUAÇÃO 11), resultando em um valor final de 30,02 μg de uncalina em cada mL de tintura.

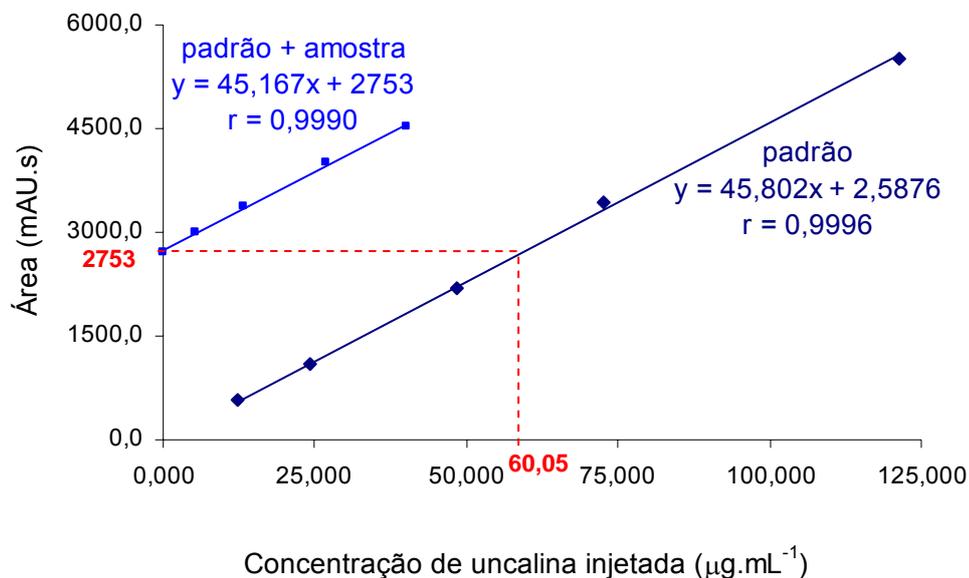


FIGURA 40 – CURVA PADRÃO E PADRÃO + AMOSTRA PARA ANÁLISE DA TINTURA VIA LLE

NOTA: Apresentação da equação da reta; r: coeficiente de correlação; apresentação da extrapolação da área equivalente ao coeficiente linear da curva de padrão + amostra na reta equivalente ao padrão (linha vermelha pontilhada)

$$\begin{aligned}
 2753 &= 45,802 x + 2,5876 \\
 x &= 60,05 \mu\text{g/mL de solução} \\
 60,05 \mu\text{g} \times 0,5 &= 30,02 \mu\text{g/mL de tintura}
 \end{aligned}
 \tag{11}$$

Onde:

equação da reta do padrão: $y = 45,802 x + 2,5876$;
 equação da reta do padrão + amostra: $y = 45,167 x + 2753$;
 2753: área correspondente à amostra sem adição de padrão;
 0,5: valor para correção das diluições e tomada de amostra.

Após a verificação do valor verdadeiro da tintura, foram analisadas 3 amostras, via LLE, nas concentrações de 80, 100 e 120%, em triplicata como descrito no item 4.4.6 (pág 47). O resultado foi fornecido como recuperação em função do valor real anteriormente calculado ($30,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$)(TABELA 20). Nota-se que a recuperação permaneceu no intervalo de 95,09 a 98,9%, valor este adequado segundo dados descritos na TABELA 3 (pág. 36). Nesta tabela, HUBER (2001) destaca que analitos na faixa de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$, como é o caso da tintura, podem apresentar recuperação entre 80 a 110%.

TABELA 20 – RECUPERAÇÃO DA ANÁLISE DA TINTURA VIA LLE

NÍVEL (%)	RESULTADO ESPERADO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ÁREA	RESULTADO FINAL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RECUPERAÇÃO Média \pm DPR (%)
80	24,02	2190,5400	23,63	98,09 \pm 0,39
		2174,6600	23,45	
		2188,2800	23,60	
100	30,02	2728,0400	29,51	98,90 \pm 0,94
		2774,5100	30,02	
		2732,4400	29,55	
120	36,02	3075,9600	34,41	95,09 \pm 0,53
		3167,3800	34,32	
		3142,2600	34,04	

NOTA: DPR: desvio padrão relativo. Destaque aos resultados esperados em função do método de adição de padrão à amostra

A FIGURA 41 evidencia as duas retas obtidas pelo método de extração em fase sólida (SPE). No teste de seletividade, já foi discutido que a matriz não apresenta influência nesta técnica. O coeficiente linear da curva “padrão + amostra”

(566,71) representa área relativa à uncalina na tintura. Este valor foi extrapolado na reta do padrão, resultando no valor de 30,12 μg de uncalina em cada mL de tintura (EQUAÇÃO 12). Nota-se que este valor é muito semelhante ao obtido por LLE (30,02 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$), uma vez que se trata da mesma amostra. A pequena diferença entre eles é decorrente de variações dos métodos, como repetibilidade.

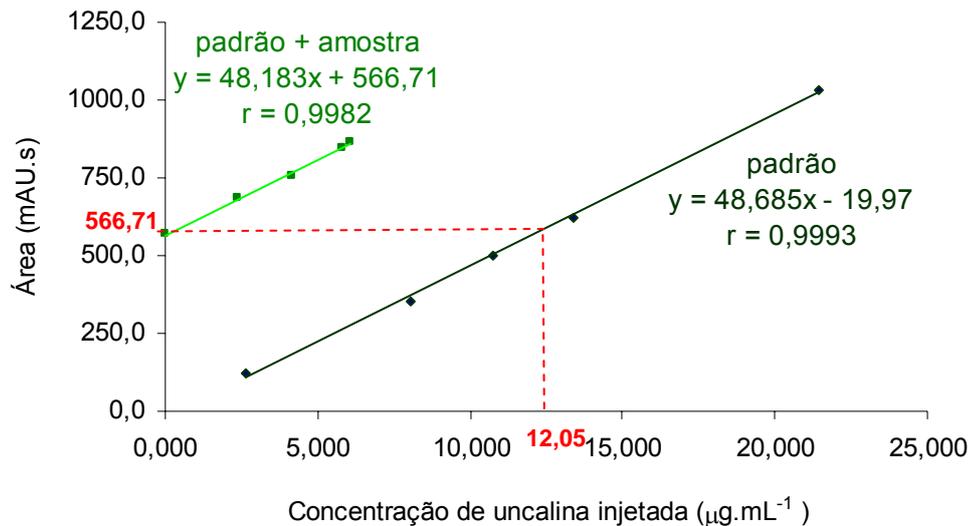


FIGURA 41 – CURVA PADRÃO E PADRÃO + AMOSTRA PARA ANÁLISE DA TINTURA VIA SPE

NOTA: Apresentação da equação da reta; r: coeficiente de correlação; apresentação da extrapolação da área equivalente ao coeficiente linear da curva de padrão + amostra na reta equivalente ao padrão (linha vermelha pontilhada)

$$\begin{aligned}
 566,71 &= 48,685 \cdot x - 19,97 \\
 x &= 12,05 \mu\text{g/mL de solução} \\
 12,05 \cdot 2,5 &= 30,12 \mu\text{g/mL de tintura}
 \end{aligned}
 \tag{12}$$

Onde:

equação da reta do padrão: $y = 48,685 x - 19,97$;
 equação da reta do padrão + amostra: $y = 48,183 x + 566,71$;
 566,71: área correspondente à amostra sem adição de padrão;
 2,5: valor para correção das diluições e tomada de amostra.

A partir da obtenção do valor verdadeiro da tintura, foram analisadas 3 amostras por SPE nas concentrações de 80, 100 e 120%, em triplicata, como descrito no item 4.4.6 (pág. 47). O resultado foi indicado como recuperação em função do valor verdadeiro (30,12 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)(TABELA 21). Nota-se que a recuperação permaneceu no intervalo de 95,12 a 98,15%, valor este adequado segundo dados

descritos na TABELA 3 (pág. 36), em que HUBER (2001) descreve um faixa entre 80 a 110% de recuperação para analitos na ordem de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ na amostra.

TABELA 21 – RECUPERAÇÃO DA ANÁLISE DA TINTURA VIA SPE

NÍVEL DE CONCENTRAÇÃO (%)	RESULTADO ESPERADO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ÁREA	RESULTADO FINAL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RECUPERAÇÃO Média \pm DPR (%)
80	24,10	454,9700	23,95	98,15 \pm 1,10
		446,8400	23,55	
		444,9400	23,45	
		547,3200	29,03	
100	30,12	542,9900	28,55	95,12 \pm 1,12
		539,7800	28,38	
		673,5900	35,35	
120	36,14	670,6300	35,18	97,46 \pm 0,30
		670,4900	35,15	

NOTA: DPR: desvio padrão relativo. Destaque aos resultados esperados em função do método de adição de padrão à amostra

5.4.3.6 Robustez

Para o método de extração em fase sólida, foi avaliada a utilização de mais 2 cartuchos: ChromaBond® (MN) e Bond Elut® (Varian). Para o método de partição líquido-líquido, foi avaliado o resultado frente a uma agitação lenta do funil de separação. As amostras foram analisadas em triplicata e o resultado contemplou a comparação das médias a um controle analisado paralelamente, pela análise de variância (ANOVA) com execução do teste de Turkey. Foi observado que nenhuma alteração proporcionou variação significativa com relação à média de cada controle (FIGURA 42).

Para o método de extração em fase sólida, este resultado reflete uma alternativa segura de cartuchos em casos de ausência do cartucho utilizado na validação (ChromaBond® ec). Com relação ao método de partição líquido-líquido, a verificação da não influência da agitação, permite inferir que a execução da extração por analistas diferentes não traduziria em resultados estatisticamente diferentes.

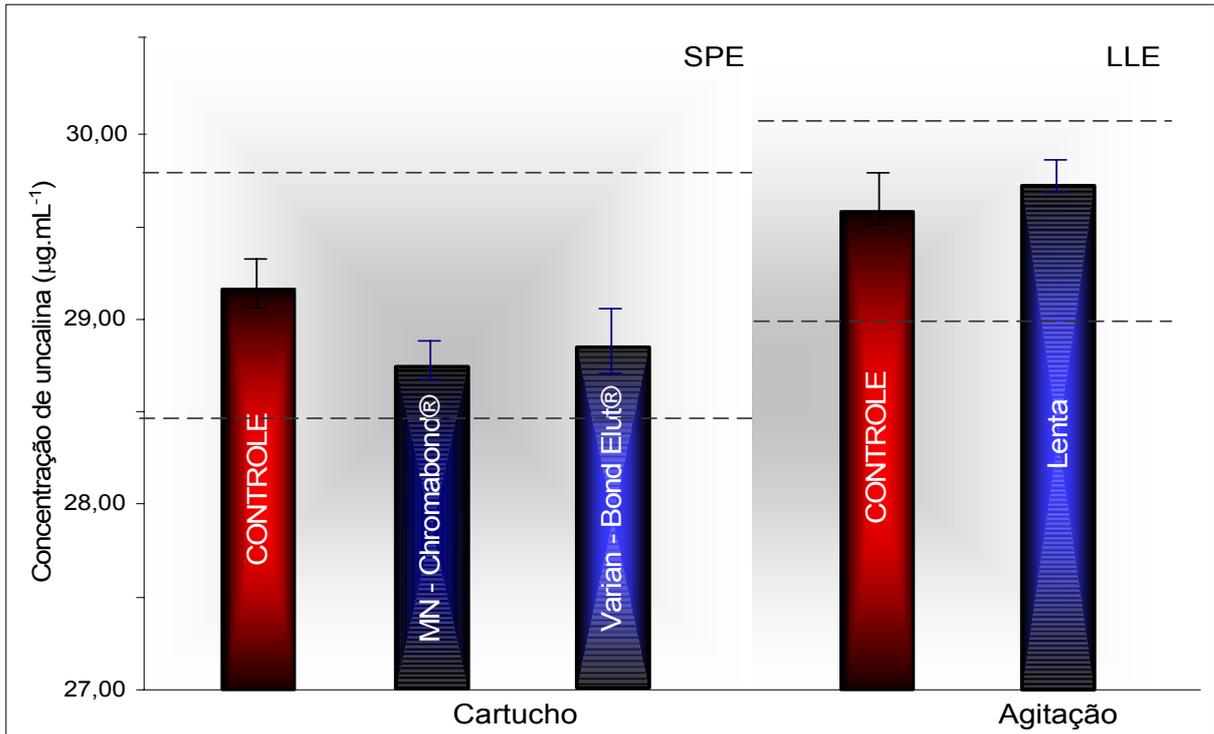


FIGURA 42 – ROBUSTEZ APRESENTADA PELOS MÉTODOS DE ANÁLISE DA TINTURA

NOTA: Linhas que delimitam os resultados que apresentaram médias estatisticamente iguais ao controle. Cada limite corresponde ao valor encontrado no controle (LLE ou SPE)

5.4.4 Validação de determinação de uncalina no xarope

5.4.4.1 Seletividade (análise do placebo)

O xarope figura-se como a única amostra de validação deste trabalho com possibilidade, mesmo que parcial, de separação do analito e placebo. Para esta avaliação, preparou-se uma amostra contendo apenas os excipientes do xarope, na ausência da tintura. O termo parcial foi utilizado uma vez que para a separação do analito é necessário retirar a tintura e, conseqüentemente, todos os seus componentes. Neste caso, porém, considerando a similaridade com a determinação de uncalina na tintura, via SPE, pode-se inferir que a seletividade observada pelo método da tintura garante que a sua matriz não causará interferência na análise do xarope, podendo, assim, para este, utilizar apenas seus excipientes para compor o placebo. O placebo foi analisado (FIGURA 43) e não apresenta pico co-eluído no

mesmo tempo de retenção da uncalina (cerca de 4,0 min). Esta constatação permite afirmar que o placebo do xarope não interfere na análise deste produto.

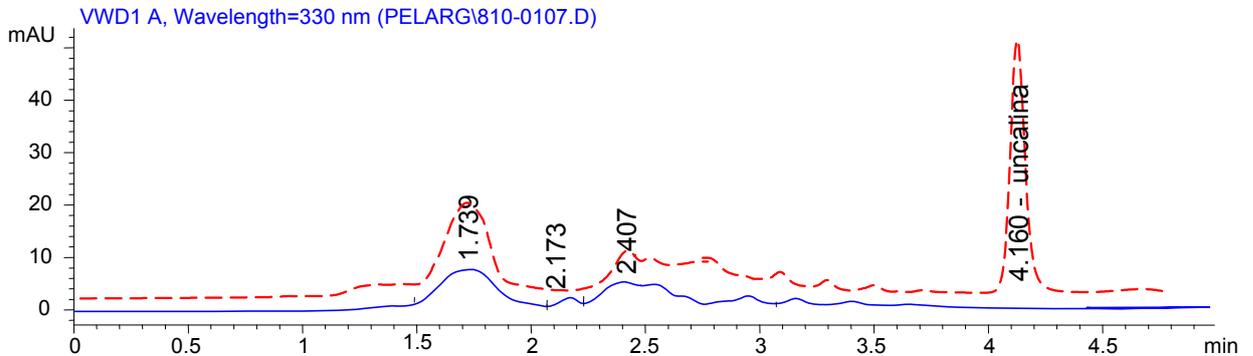


FIGURA 43 – CROMATOGRAMA DO PLACEBO DO XAROPE DE PELARGÔNIO

NOTA: Azul: cromatograma do placebo; vermelho: cromatograma do xarope para comparação

5.4.4.2 Linearidade

A avaliação da linearidade do método de análise do xarope foi realizada com adição de tintura em quantidade proporcional para obtenção de 5 concentrações entre 80 a 120% do valor especificado para o xarope ($6,01 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Como a tomada de amostra é de 5 mL e, após limpeza, este é diluído nos mesmos 5 mL, as soluções injetadas no cromatógrafo continha de 4,81 a $7,22 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de uncalina.

O gráfico disposto na FIGURA 44 demonstra um coeficiente de correlação de 0,9990, adequado aos valores exigidos pelo INMETRO (0,90), ANVISA (0,99) e FDA (0,999)(FDA, 2001; BRASIL, 2003; INMETRO, 2003). O gráfico de resíduos (FIGURA 45) demonstrou não haver tendência entre os pontos. As evidências observadas propõem afirmar a linearidade da metodologia para determinação de uncalina em xarope de pelargônio.

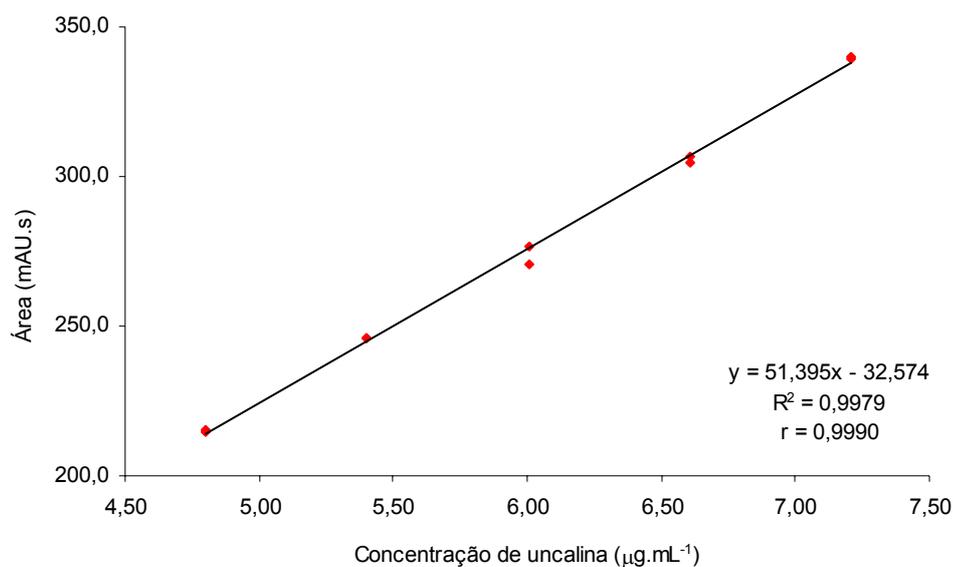


FIGURA 44 – LINEARIDADE DO MÉTODO DE ANÁLISE DO XAROPE

NOTA: Apresentação da equação da reta; R^2 : coeficiente de determinação; r : coeficiente de correlação

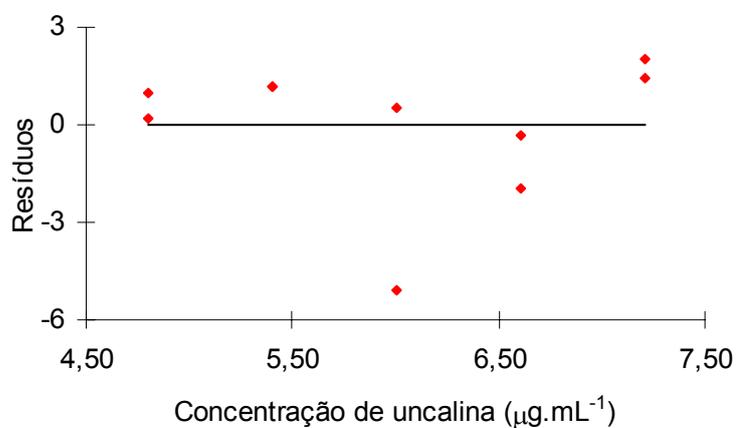


FIGURA 45 – RESÍDUOS OBTIDOS PELOS DADOS DE LINEARIDADE PARA O XAROPE

5.4.4.3 Repetibilidade

A repetibilidade do método, avaliada entre 6 replicatas da amostra a 100%, executadas pelo mesmo analista, apresentou um desvio padrão relativo de 0,95% (TABELA 22). Tal valor mostrou-se inferior ao máximo estabelecido pela ANVISA (5%) e, por SHABIR (2%)(BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

TABELA 22 – REPETIBILIDADE PARA O MÉTODO DE ANÁLISE DO XAROPE

REPLICATA	ÁREA	RESULTADO FINAL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de uncalina aplicada)
1	279,47	5,96
2	276,58	5,90
3	274,57	5,86
4	277,74	5,92
5	277,93	5,93
6	282,64	6,02
Média	N.A.	5,93
Desvio Padrão	N.A.	0,06
DPR (%)	N.A.	0,95

NOTA: DPR: desvio padrão relativo; N.A.: não aplicável. O resultado final é o mesmo aplicado no cromatograma, uma vez que a tomada de amostra possui o mesmo volume da diluição

5.4.4.4 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada por 2 analistas (A e B), em diferentes dias, totalizando 12 análises. A TABELA 23 apresenta o desvio padrão relativo de 2,22%, valor aceito pela ANVISA (5%) (BRASIL, 2003; SHABIR, 2003).

TABELA 23 – PRECISÃO INTERMEDIÁRIA PARA A ANÁLISE DO XAROPE

REPLICATA	ÁREA	RESULTADO FINAL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$ de uncalina)
A1	279,47	5,96
A2	276,58	5,90
A3	274,57	5,86
A4	277,74	5,92
A5	277,93	5,93
A6	282,64	6,02
B1	290,43	6,25
B2	280,67	6,05
B3	280,97	6,06
B4	292,85	6,30
B5	279,12	6,02
B6	279,96	6,04
Média	N.A.	6,03
Desvio Padrão	N.A.	0,13
DPR (%)	N.A.	2,22

NOTA: DPR: desvio padrão relativo; N.A.: não aplicável. O resultado final é o mesmo aplicado no cromatograma, uma vez que a tomada de amostra possui o mesmo volume da diluição

5.4.4.5 Exatidão

O xarope é composto por tintura de pelargônio e excipientes. A exatidão da metodologia de doseamento da tintura permitiu estabelecer o valor verdadeiro para a matéria-prima como $30,02 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o método via SPE e $30,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o método via LLE. Os resultados apresentam cerca de 0,3% de diferença, variação decorrente de precisão dos métodos.

Para avaliação da exatidão do método de análise do xarope, foram preparadas 5 amostras contendo quantidades conhecidas da tintura. Considerando a concentração verdadeira como a média entre os dois resultados ($30,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$), pode-se prever a concentração esperada para o xarope e, assim, calcular sua recuperação.

As amostras foram preparadas tal qual descrito para o teste de linearidade (item 4.4.2, pág 45). A TABELA 24 retrata valores médios entre 97,82 e 102,44%, valores ótimos segundo o intervalo especificado por HUBER (2001), de 80 a 110% para analitos na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (TABELA 3, pág.19).

TABELA 24 – RECUPERAÇÃO DA ANÁLISE DO XAROPE

NÍVEL (%)	RESULTADO ESPERADO ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	ÁREA	RESULTADO FINAL ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	RECUPERAÇÃO Média \pm DPR (%)
80	4,80	217,0225	4,70	97,82 \pm 0,03
		216,9778	4,70	
		216,8835	4,69	
100	6,00	273,9441	5,90	98,03 \pm 0,95
		270,3096	5,82	
		275,4968	5,93	
120	7,20	346,1932	7,42	102,44 \pm 0,52
		342,6348	7,34	
		343,6807	7,37	

NOTA: DPR: desvio padrão relativo. Destaque ao resultado esperado em função do método de adição de padrão à amostra para as duas formas de extração da tintura

5.4.4.6 Robustez

Para o método de extração do xarope, foi avaliada a utilização de mais 2 cartuchos: MN-ChromaBond® e Varian-Bond Elut®. As amostras foram analisadas em triplicata e o resultado contemplou a comparação das médias a um controle analisado paralelamente, pela análise de variância (ANOVA) com execução do teste de Tukey. Foi observado que nenhuma alteração proporcionou variação significativa com relação à média do controle.

5.5 QUANTIFICAÇÃO DE UNCALINA NOS PRODUTOS A BASE DE *P. sidoides*

Foram analisados 5 lotes de duas soluções orais contendo *P. sidoides* comercializados no Brasil. As bulas destes medicamentos informam que os produtos contém 800 mg do extrato padronizado EPs 7630® em cada grama de produto e 825 mg do mesmo extrato em cada mL, ambos contendo glicerol como único excipiente. A bula de um deles ainda descreve a especificação do EPs 7630® como de 0,08 a 0,32% de fenóis totais, metodologia não específica da espécie.

Foi realizado uma triagem inicial que mostrou que as amostras continham cerca de 20 µg.mL⁻¹ em uncalina. Considerando que este extrato padronizado é similar à tintura utilizada neste trabalho e compõe mais de 80% do produto, optou-se por aplicar o método de extração por partição líquido-líquido validado para a tintura.

A diferença de concentração dos produtos e da tintura (30 µg.mL⁻¹) bem como a presença do excipiente glicerol foram avaliadas. Para tanto, a tintura utilizada na validação foi diluída com glicerol o suficiente para perfazer 20 µg.mL⁻¹. A triplicata desta amostra apresentou recuperação suficiente para concluir que a presença do glicerol não interferiu na extração da uncalina. Além disso, uma análise cromatográfica deste excipiente demonstrou não haver pico coeluinto no tempo de retenção da uncalina, cerca de 4,1 min (FIGURA 46). Nota-se ainda, que não houve interferência significativa, que pode ser observada pela altura do sinal apresentado em cerca de 2,2 min, com altura próxima a 3 mAU. Assim, os produtos foram analisados segundo o protocolo definido no item 0 (pág. 49) (TABELA 25).

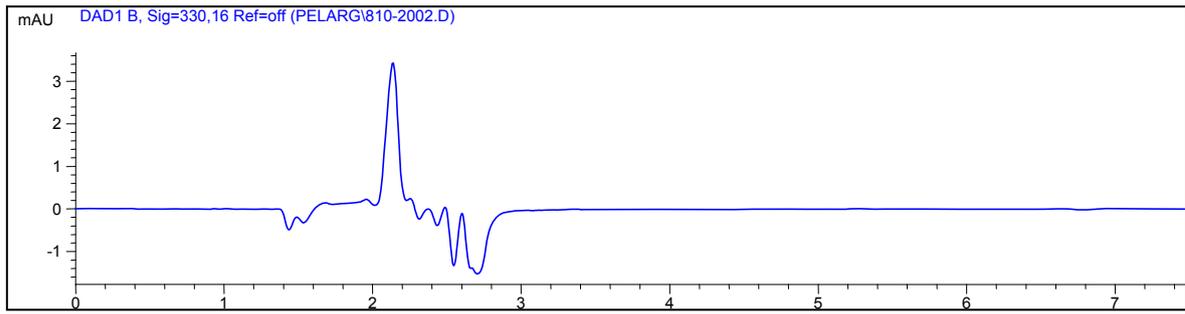


FIGURA 46 – CROMATOGRAMA DE GLICEROL (PLACEBO)

TABELA 25 – UNCALINA NOS PRODUTOS DE *P. sidoides* COMERCIALIZADOS NO BRASIL

PRODUTO	LOTE	UNCALINA ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
1	1	22,380
	2	22,160
	3	21,460
	4	23,920
	5	18,000
2	1	22,860
	2	20,010
	3	19,990
	4	21,170
	5	21,190

6 CONCLUSÃO

O isolamento da uncalina, marcador específico da espécie *Pelargonium sidoides* D.C., sua identificação por ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas e a observação do alto grau de pureza por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (99,38%) e calorimetria exploratória diferencial (98,71%), permitiram a utilização deste analito como substância de referência para o desenvolvimento e a validação das metodologias para controle de qualidade dos derivados desta espécie.

Os métodos analíticos para análise quantitativa das raízes, tintura e um xarope a base da tintura da planta foram validados utilizando-se normas condizentes ao uso pretendido. Todos eles apresentaram resultados de validação apropriados como especificidade e seletividade confiáveis, linearidade com coeficiente de correlação superior a 0,999, exatidão próxima a 100%, precisão inferior a 5%, além de alta sensibilidade, com os limites de detecção, de 8,9 ppb e quantificação, de 29,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os dois métodos validados para *clean up* da tintura (SPE e LLE) apresentaram resultados de validação similares. O método por LLE apresenta um custo inferior e com instrumental mais simples enquanto o método por SPE figura-se como mais rápido e com menor consumo de solventes, reduzindo o impacto ambiental.

O método desenvolvido para a tintura por LLE permitiu, ainda, a análise de dos produtos comercializados no Brasil a base de *P. sidoides*.

O isolamento da uncalina e a validação dos métodos analíticos para as matérias-primas e produto acabado contendo *P. sidoides* permitiram o deferimento do registro do xarope Imunoflan, do Herbarium Laboratório Botânico Ltda, objetivo pelo qual este trabalho foi desenvolvido.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALONSO, J. **Tratado de fitofármacos y nutracéuticos**. 1.ed. Rosario: Corpus Libros, 1998.

BARA, M. T. F. *et al.* Determinação de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.211-215, 2006.

BARROS, C. Validação de métodos analíticos. **Biológico**, v.64, n.2, p.175-177, 2002.

BERBER, A.; DEL-RIO-NAVARRO, B. Compilation and meta-analysis of randomized placebo-controlled clinical trials on the prevention of respiratory tract infections in children using immunostimulants. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.11, n.4, p.235-46, 2001.

BEREZNOY, V. V. *et al.* Efficacy of extract of *Pelargonium sidoides* in children with acute non-group a beta-hemolytic *Streptococcus tonsillopharyngitis*: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Alternative Therapy Health Medicine**, v.9, n.5, p.68-79, 2003.

BLADT, S. Zur chemie der inhaltsstoffe der *Pelargonium reniforme* Curt,-Wurzel (Umckaloabo). Dissertation, Fakultät Chemie/Pharmazie, Maximilian Universität München, Ludwig, 1974. Citado por: KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Highly oxygenated coumarin from *Pelargonium sidoides*. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1181-1185, 1995.

BLADT, S.; WAGNER, H. From the Zulu medicine to the European phytomedicine Umckaloabo. **Phytomedicine**, v.14, n.6, p.2-4, 2007.

BRASIL. Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 02 jun. 2003.

BRASIL. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, 10 mar. 2004.

CARVALHO, A. C. B. *et al.* Situação de registros de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.314-319, 2008.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.12, n.6, p.706-709, 2001.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. 1.ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998.

CLAS, S.-D.; DALTON, C. R.; HANCOCK, B. C. Differential scanning calorimetry: applications in drug development. **Pharmaceutical Science and Tecnology Today**, v.2, n.8, 1999.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. 2.ed. New York: The New York Botanical Garden, 1988.

DOME, V. L.; SCHUSTER, R. Umckaloabo eine phytotherapeutische alternative bei akuter bronchitis im Kindesalter? **Ärztezeitschrift fur Naturheilverfahren**, v.37, n.3, p.216-222, 1996.

DREYER, L. L.; MARAIS, E. M.; VAN DER WALT, J. J. A. A subspecific division of *Pelargonium reniforme* CURT. (Geraniaceae). **South African Journal of Botany**, v.61, p.325-330, 1995.

ERDELMEIER, C.; HAUER, H.; KOCH, E. **Method for producing extracts of *Pelargonium sidoides* and/or *Pelargonium reniforme*, and the use of said extracts**. EP1429795, 23 Jun. 2004, 13 Jun. 2007.

EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods : a laboratory guide to method validation and related topics. Teddington, 1998. Disponível em: <www.eurachem.org/guides/valid.pdf>. Acesso em: 11/07/2007.

EUROPEAN PHARMACOPOEIA. 6.0. ed. Strasbourg: Council of Europe. v. 2, 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Technical review guide : validation of chromatographic methods. Rockville, 2001. Disponível em: www.fda.gov/Cder/guidance/cmc3.pdf. Acesso em: 11 jun 2007.

FRITZ, J. S.; MACKA, M. Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. **Journal of Chromatography A**, v.902, p.137-166, 2000.

GODECKE, T.; KALOGA, M.; KOLODZIEJ, H. A phenol glucoside, uncommon coumarins and flavonoids from *Pelargonium sidoides* DC. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v.60, n.6, p.677-682 2005.

HAIDVOGL, M.; SCHUSTER, R.; HEGER, M. Akute bronchitis im Kindesalter : multizenter-studie zur wirksamkeit und vertraglichkeit des phytotherapeutikums umckaloabo. **Zeitschrift fur Phytotherapie**, v.17, p.300-313, 1996.

HEIL, C.; REITERMANN, U. Atemwegs-und HNO-infektionen : therapeutische erfahrungen mit dem phytotherapeutikum Umckaloabo®. **Therapiewoche Pädiatrie**, v.7, p.523-525, 1994.

HUBER, L. Validation of analytical methods: review and strategy. Oberkirch, 2001. Disponível em: <www.labcomliance.com/documentos/meth_val.pdf>. Acesso em: 12/07/2007.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON THE HARMONIZATION (ICH). **Q2(R1):** Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology. Geneva, 2005. Disponível em: www.bioforum.org.il/Uploads/Editor/karen/q2_r1_step4.pdf. Acesso em: 11/07/2007.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO). **DOQ-CGCRE-008:** Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. Rio de Janeiro, 2003. Disponível em: www.inmetro.gov.br/kits/doqcg008r01.pdf. Acesso em: 11 jun 2007.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Highly oxygenated coumarins from *Pelargonium sidoides*. **Phytochemistry**, v.39, n.5, p.1181-1185, 1995.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H. Antibacterial activity of extracts and constituents of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*. **Planta Medica**, v.63, n.6, p.508-10, 1997.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Immunomodulatory principles of *Pelargonium sidoides*. **Phytotherapy Research**, v.15, n.2, p.122-6, 2001.

KIRK, K. M.; NETO, P. G. G. Vigilância pós-comercialização de *Pelargonium sidoides* no tratamento das tonsilofaringites comunitárias agudas de origem presumidamente viral. **Revista Paranaense de Infectologia**, v.9, n.1, p.15-24, 2007.

KOCH, E.; BIBER, A. Treatment of rats with the *Pelargonium sidoides* extract EPs 7630[®] has no effect on blood coagulation parameters or on the pharmacokinetics of warfarin. **Phytomedicine**, v.14, n.1, p.40-5, 2007.

KOLODZIEJ, H. Traditionally used *Pelargonium* species: chemistry and biological activity of Umckaloabo[®] extracts and their constituents. **Current Topics in Phytochemistry**, v.3, p.77-93, 2000.

KOLODZIEJ, H. *Pelargonium reniforme* and *Pelargonium sidoides*: botany, chemistry and medicinal use. In: LIS-BALCHIN, M. **Geranium and pelargonium: the genera Geranium and Pelargonium**. London ; New York: Taylor & Francis, v.27, 2002. p.262-290.

KOLODZIEJ, H. Fascinating metabolic pools of *Pelargonium sidoides* and *Pelargonium reniforme*, traditional and phytomedicinal sources of the herbal medicine Umckaloabo[®]. **Phytomedicine**, v.14 Suppl 1, p.9-17, 2007.

KOLODZIEJ, H.; KAYSER, O. *Pelargonium sidoides* DC. : neueste erkenntnisse zum verständnis des phytotherapeutikums Umckaloabo[®]. **Zeitschrift fur Phytotherapie**, v.19, p.141-151, 1998.

KOLODZIEJ, H. *et al.* Pharmacological profile of extracts of *Pelargonium sidoides* and their constituents. **Phytomedicine**, v.10, p.18-24, 2003.

KUSTER, R. M.; ROCHA, L. M. Cumarinas, cromonas e xantonas. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre; Florianópolis: Editora da UFRGS; Editora da UFSC, v.5, 2004. p.538-536.

LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. 2. São Carlos: Rima, 2004.

LATTÉ, K. P. *et al.* Unusual coumarin patterns of *Pelargonium* species forming the origin of the traditional herbal medicine umckaloabo. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.55c, p.528-533, 2000.

LIS-BALCHIN, M. *et al.* Antimicrobial activity of *Pelargonium* essential oils added to a quiche filling as a model food system. **Letters in Applied Microbiology**, v.27, n.4, p.207-10, 1998.

MATINVADLELA, S. P. N.; LALL, N.; MEYER, J. J. M. Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of (the roots of) *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts. **South African Journal of Botany**, v.72, p.232-237, 2006.

MATTHYS, H. *et al.* Efficacy and safety of an extract of *Pelargonium sidoides* (EPs 7630) in adults with acute bronchitis. A randomized, doubleblind, placebo controlled trial. **Phytomedicine**, v.10, n.IV, p.7 -17, 2003.

MATTHYS, H.; HEGER, M. Treatment of acute bronchitis with a liquid herbal drug preparation from *Pelargonium sidoides* (EPs 7630): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre study. **Current Medical Research and Opinion**, v.23, n.2, p.323-31, 2007.

THE MERCK INDEX. White House Station: Merck & Co. 12.ed., 1996.

MITCHELL, K. A.; MARKHAM, K. R.; BOASET, M. R. Pigment chemistry and colour of pelargonium flowers. **Phytochemistry**, v.47, n.3, p.355-361, 1998.

MONTGOMERY, D. G. **Design and analysis of experiments**. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 2001.

NETO, B. B.; SCARMINO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 2.ed. Campinas: Editora Unicamp, 2003.

NEUGEBAUER, P. *et al.* A new approach to pharmacological effects on ciliary beat frequency in cell cultures - exemplary measurements under *Pelargonium sidoides* extract (EPs 7630). **Phytomedicine**, v.12, p.46-51, 2005.

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, v.19, n.3, p.268-277, 1996.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, n.5, p.771-780, 2004.

RODRÍGUEZ, I.; LOMPARD, M. P.; CELA, R. Solid-phase extraction of phenols. **Journal of Chromatography A**, v.885, p.291-304, 2000.

ROY, S.; RIGA, A. T.; ALEXANDER, K. S. Experimental design aids the development of a differential scanning calorimetry standard test procedure for pharmaceuticals. **Thermochimica acta**, v.392-393, p.399-404, 2002.

SANTOS, S. C. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* Schultz Bip. Ex Baker e *M. glomerata* na inflamação alérgica pulmonar.** Itajaí, 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Departamento de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopoeia and the International Conference on Harmonization. **Journal of Chromatography A**, v.987, p.57-66, 2003.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds.** 7.ed. New York: John Wiley & Sons, 2005.

SMITH, R. M. Before the injection - modern methods of sample preparation for separation techniques. **Journal of Chromatography A**, v.1000, p.3-27, 2003.

SNYDER, L. R.; GLAJCH, J. L.; KIRKLAND, J. J. **Practical HPLC method development chromatography method development.** 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 1998.

SOARES, L. Como obter resultados confiáveis em cromatografia. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.60, n.1, p.79-84, 2001.

SWARTZ, M. E.; KRULL, I. S. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmaceutical Technology**, v.12, n.2, 1998.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC technical report). **Pure and Applied Chemistry**, v.74, p.835-855, 2002.

THE UNITED STATES PHARMACOPOEIA (USP). 30. ed. Rockville: US Pharmacopeial Convention. v. 3, 2007.

VAN DER WALT, J. J.; VORSTER, P. J. Pelargoniums of Southern Africa. 3.ed. Kirstenbosch: National Botanical Garden. Citado por: MATIVANDLELA, S. P. N.; N., L.; MEYER, J. J. M. Antibacterial, antifungal and antitubercular activity of (the roots of) *Pelargonium reniforme* (CURT) and *Pelargonium sidoides* (DC) (Geraniaceae) root extracts. **South African Journal of Botany**, v. 72, p. 232-237, 2006.

WAGNER, H. *et al.* New coumarin derivatives from roots of *Pelargonium reniforme* Curt. **Tetrahedron Letters**, v.43, p.3807-3808 1974.

WHITE, A. G. **The effect of geography, cultivation and harvest technique on the umkcalin concentration and growth of *Pelargonium sidoides* (GERANIACEAE).** Grahamstown, 2006. Dissertation (Master of science) - Department of science, Rhodes University.

ZIVANOVIC, L. *et al.* Application of experimental design in optimization of solid phase extraction of mycophenolic acid and mycophenolic acid glucuronide from human urine and plasma and SPE-RP-HPLC method validation **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.47, n.3, p.575-585, 2008.