



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA



T/UNICAMP
So89d
BCCL

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO
ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO PFÁFFICO
EM *HEBANTHE ERIANTHA***

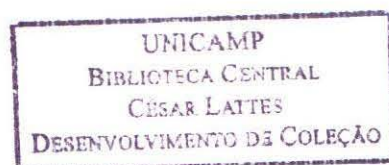
Dissertação de Mestrado apresentada por
Kelly de Paula Souza ao Programa de
Pós-Graduação em Química do Instituto
de Química, Departamento de Química
Analítica, da Universidade Estadual de
Campinas, como parte dos requisitos
para a obtenção do título de Mestre em
Química na área de Química Analítica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Susanne Rath

Coorientadora: Dr^a. Marili Villa Nova Rodrigues

Campinas

2011



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

Unidade BCCL
TI/UNICAMP
Cutter 5089d
V. Ed.
Tombo BC 92377
Proc. 16P-130-11
C. D
Preço 77,00
Data 24/08/11
Cód. tit. 802.802

So89d

Souza, Kelly de Paula.

Desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de ácido pfáffico em *Hebanthe eriantha* / Kelly de Paula Souza. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientadora: Profa. Dra. Susanne Rath.

Coorientadora: Dra. Marili Villa Nova Rodrigues.

Mestrado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. *Hebanthe eriantha*. 2. *Ginseng* brasileiro.
3. Ácido pfáffico. 4. Validação de método analítico.
I. Rath, Susanne. II. Rodrigues, Marili Villa Nova.
III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química. IV. Título.

Título em inglês: Development and validation of analytical method for the determination of pfaffic acid in *Hebanthe eriantha*

Palavras-chaves em inglês: *Hebanthe eriantha*, Brazilian ginseng, Pfaffic acid, HPLC validation

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestre em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora: Profa. Dra. Susanne Rath (orientadora), Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior (IQ-UNICAMP), Prof. Dr. Fernando Batista da Costa (FCFRP-USP)

Data de defesa: 17/02/2011

1195
AUT.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Susanne Rath (Orientadora)

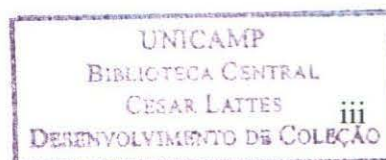
Prof. Dr. Fernando Batista da Costa (FCFRP-USP)

Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior (IQ-UNICAMP)

Este exemplar corresponde à redação final da
Dissertação de Mestrado defendida pela aluna **KELLY
DE PAULA SOUZA**, aprovada pela Comissão Julgadora
em 17 de fevereiro de 2011.

Profa. Dra. Susanne Rath
(Presidente da Banca)

201158810



Dedico este trabalho, especialmente:

Aos meus pais, Antônio Carlos e Solange, que não mediram esforços para fazer a mim e a minhas irmãs felizes.

*Às minhas irmãs, Ingrid e Jéssica,
minhas melhores amigas.*

*Ao Erich,
por me ajudar a concluir mais esta etapa em minha vida e
por estar ao meu lado. Te amo!*

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada. Apenas dê o primeiro passo.”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Susanne Rath, por ter me aceitado como aluna e ter me orientado com tanta paciência, principalmente nos meus momentos de ansiedade ou desânimo. Foi graças à admiração pelo seu trabalho e pela sua didática, que decidi fazer o mestrado na área analítica.

À minha co-orientadora, Dr^a. Marili Villa Nova Rodrigues, pelo acompanhamento durante as atividades no CPQBA-Unicamp e pela contribuição inestimável ao trabalho como um todo.

À Dr^a. Vera Lúcia Garcia Rehder, pelo isolamento do padrão de ácido pífico e agradável convivência, enquanto estive no CPQBA.

À Dr^a. Mary Ann Foglio, pela ajuda na organização de minha viagem a João Pessoa.

À Unicamp, especialmente ao Instituto de Química e ao CPQBA, por toda a infraestrutura disponibilizada para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial a três divisões do CPQBA: à Agrotecnologia, por ter cultivado e coletado as plantas utilizadas nesse trabalho; à Fitoquímica, por ter disponibilizado equipamentos como moinho de facas, estufa de ar circulante e rotaevaporadores; à Química Orgânica e Farmacêutica, por ter disponibilizado o HPLC para análise das amostras e toda a aparelhagem para otimização das condições de extração e hidrólise das amostras.

Às agências de fomento CNPq e FAPESP, pela concessão das bolsas de estudos.

Aos funcionários da CPG, Izabel Calasso, Isabel Filipi, Miguel, e Gabriela, por aguentarem toda a minha "choradeira" no acompanhamento das bolsas, e por me ajudarem tanto.

Ao técnico Ricardo, pela solicitude com que me recebeu no laboratório de cromatografia do IQ e pelas valiosas dicas na utilização do software do cromatógrafo.

Aos professores que gentilmente aceitaram o convite para participação nas bancas de qualificação e defesa desse trabalho: Prof. Dr. Fernando Antônio Santos Coelho, Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus, Prof^a. Dr^a. Carla Beatriz Grespan Bottoli, Prof. Dr. Ivo Milton Raimundo Júnior e Prof. Dr. Fernando Batista da Costa.

Aos colegas de laboratório no IQ: Cyntia, Fernando, Keity, Larissa, Leandro, Leonardo, Lívia, Martins, Orlando, Rafael Porto, Renata, Amanda, Gabriela e Rafael Medeiros. Pela prazerosa convivência e por terem aguentado o cheirão de acetato de etila dos meus experimentos! Um agradecimento especial ao Ricardo, por ter me ajudado a montar o sistema de refluxo e rotaevaporação, à Lais, pela companhia, quando precisei ficar até mais tarde no laboratório e pelas valiosas dicas e, finalmente, à Andreza, a florzinha do laboratório.

Aos colegas de laboratório no CPQBA: Adriana, Adilson, Andreza, Cibele, Geraldo, Juliana, Leopoldo, Letícia, Nayara e Natália pela ajuda na parte experimental e também pelo ótimo convívio. Um agradecimento em especial ao Sinésio, pelas caronas até nossa cidade natal, São João da Boa Vista, e pelas boas conversas durante o trajeto. Os meus pais também agradecem.

Aos funcionários do CPQBA, pela ótima convivência ao longo de quase um ano.

CURRICULUM VITAE

1. Formação Acadêmica

2009-2011 Mestrado em Química Analítica. Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Orientação: Prof^a. Dr^a. Susanne Rath. Bolsista FAPESP.

2003-2007 Graduação em Farmácia-Bioquímica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (FCFRP-USP).

2. Iniciação Científica

2006-2007 Centro de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Orientação: Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana. "Padronização da técnica de RT-PCR em tempo real para diagnóstico da dengue". Bolsista FAPESP.

2004-2006 Laboratório de Físico-Química, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP), sob orientação da Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes. "Isolamento e caracterização do componente ativo da fração II-III do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o sistema complemento". Bolsista FAPESP.

3. Artigos publicados:

SANTOS, H.W.G.; POLONI, T.R.R.S.; SOUZA, K.P.; MULLER, V.D.M., et al. A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection. *Journal of Medical Virology*, 80:1426-1433, 2008.

4. Resumos apresentados em eventos/publicados em anais:

SOUZA, K.P.; REHDER, V.L.G.; MONTANARI JR, I.; FIGUEIRA, G.M.; RODRIGUES, M.V.N. Extração de ácido pífico em *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen. In: XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil (XXI SPMB), João Pessoa-PB, 2010.

RODRIGUES, M.V.N.; SOUZA, K.P.; MONTANARI JR, I.; SANTOS, A.S.; FIGUEIRA, G.M.; REHDER, V.L.G. Saponinas presentes em *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen. In: XXI SPMB, João Pessoa-PB, 2010.

RODRIGUES, M.V.N.; REHDER, V.L.G.; SOUZA, K.P. The robustness evaluation of the HPLC method for assay of the flavonoid in *Psidium guajava* extract. In: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences (7th CIFARP), Ribeirão Preto-SP, 2009.

SOUZA, K.P.; BERTAZZI, D.T.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C. Effect of fraction II-III from *Tityus serrulatus* scorpion venom on lytic activity of the complement system (CS). In: 5th CIFARP, Ribeirão Preto-SP, 2005.

SOUZA, K.P.; BERTAZZI, D.T.; ASSIS-PANDOCHI, A.I.; SAMPAIO, S.V.; ARANTES, E.C. Purificação e caracterização bioquímica parciais do componente da fração II-III do veneno de *Tityus serrulatus* com ação sobre o Sistema Complemento. In: Simpósio de Iniciação Científica da USP (13º SIICUSP), Ribeirão Preto-SP, 2005.

5. Experiência Profissional:

Drogaria Carrefour, Comércio e Indústria LTDA, Campinas-SP, como Farmacêutica Responsável. Nov/2008 a Maio/2009.

Nanocore Biotecnologia S.A., Campinas-SP, como Analista. Dez/2007 a Ago/2008.

Nanocore Biotecnologia S.A., Campinas-SP, estágio sob supervisão da Dr^a. Karla de Melo Lima. Jun/2007 a Nov/2007.

Farmácia Art'Ervas LTDA, São João da Boa Vista-SP, estágio sob supervisão do Dr. Antônio G. R. dos Santos (Farmacêutico Responsável). Jul/2006.

Centro de Química de Proteínas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), estágio sob supervisão do Prof. Dr. Lewis Joel Greene. Maio/2004 a Set/2004.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO PFÁFFICO EM *HEBANTHE ERIANTHA*

A espécie *Hebanthe eriantha* (Amaranthaceae) é conhecida como “ginseng brasileiro”, devido à semelhança de suas raízes com as da espécie *Panax ginseng* (Araliaceae), o “ginseng coreano”. Suas raízes, com atividade antineoplásica comprovada, são constituídas principalmente por saponinas, as quais, submetidas à hidrólise, liberam açúcares e moléculas de ácido pfáffico livre, um triterpeno. O ácido pfáffico é uma opção excelente de marcador químico de *H. eriantha*, porque permite diferenciá-la da espécie *Pfaffia glomerata*, comumente usada como adulterante. O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico para quantificação de ácido pfáffico presente nas raízes de *H. eriantha*. O desenvolvimento do preparo de amostra incluiu a otimização das etapas de extração e hidrólise das saponinas presentes na raiz, respectivamente por análise univariada e planejamento experimental do tipo composto central. O preparo de amostra consistiu na extração das saponinas com etanol 80% (v/v), em duas etapas de 2 h cada, seguida pela hidrólise com HCl 1,8 mol L⁻¹, por 4 h, a 120 °C. A quantificação de ácido pfáffico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência, empregando coluna C18, eluição isocrática, fase móvel composta por ácido fórmico 0,1% (v/v) e metanol (18:82 v/v) e detecção a 205 nm. Para a confirmação de identidade do analito foi empregada a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, e ionização química por pressão atmosférica. O método foi validado e os seguintes parâmetros estabelecidos: linearidade (0,9999), faixa linear (0,04% a 12,8% m/m), precisão intra-(4,8%, n=7) e inter-ensaio (5,2%, n=10), limites de detecção (0,01% m/m) e de quantificação (0,04% m/m). A exatidão foi avaliada por comparação entre dois métodos validados em laboratórios diferentes. O método validado foi aplicado para quantificação de ácido pfáffico em quatro amostras de raízes comerciais.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD FOR THE DETERMINATION OF PFAFFIC ACID IN *HEBANTHE ERIANTHA*

Hebanthe erianthe (Amaranthaceae) is known as “Brazilian ginseng”, due to the similarity of its roots with those of *Panax ginseng* (Araliaceae), the “Korean ginseng”. Its roots, with proved antineoplastic activity, are constituted by saponins, which during hydrolysis, release saccharides and free molecules of pfaffic acid, a nortriterpene. Pfaffic acid is an excellent option for phytochemical marker of *H. erianthe*, because it distinguishes it from *Pfaffia glomerata*, often employed as adulterant. The aim of this work was the development and validation of an analytical method for determination of pfaffic acid in *H. erianthe*. The development of sample preparation included the optimization of the extraction and hydrolysis steps of the saponins root, through univariate analysis and experimental design (central composite), respectively. The sample preparation consisted of extraction of saponins with 80% (v/v) ethanol, in two steps of 2 h, followed by hydrolysis with 1.8 mol L⁻¹ HCl during 4 h, at 120 °C. The pfaffic acid was quantified by high performance liquid chromatography, employing a C18 column, with isocratic elution and mobile phase constituted by a mixture of 0.1% (v/v) formic acid solution and methanol (18:82, v/v). The detection was performed at 205 nm. The identity confirmation of the analyte was carried out using liquid chromatography coupled to mass spectrometry, with atmospheric pressure chemical ionization. The method was validated and the following parameters were established: linearity (0.9999), linear range (0.04% to 12.8% m/m), intra-day precision (4.8%, n=7) and inter-day precision (5.2%, n=10), detection limit (0.01% m/m) and quantification limit (0.04% m/m). The accuracy was evaluated by comparing two methods, validated in two different laboratories. The validated method was applied for the determination of pfaffic acid in four commercial samples of roots.

ÍNDICE GERAL

Descrição	Página
Lista de Abreviaturas e Acrônimos	xxi
Lista de Tabelas	xxv
Lista de Figuras	xxvii
Lista de Anexos	xxxix
1. Introdução	3
1.1. Composição química de <i>H. eriantha</i>	5
1.2. Propriedades farmacológicas de <i>H. eriantha</i>	7
1.3. Da extração à análise quantitativa de saponinas	11
1.3.1. Preparo de amostras a partir das matrizes vegetais	11
1.3.1.1. Métodos convencionais: Soxhlet e Refluxo a quente	12
1.3.1.2. Extração por alta pressão	13
1.3.1.3. Extração assistida por ultrassom	13
1.3.1.4. Extração assistida por micro-ondas	14
1.3.1.5. Extração em fase sólida	15
1.3.1.6. Extração com fluido supercrítico	15
1.3.1.7. Extração por membrana líquida	16
1.3.1.8. Derivatização	16
1.3.2. Análise quantitativa de saponinas	17
1.3.3. Análise das agliconas: novo enfoque	18

1.4. Fitoterapia no Brasil: Situação atual	18
1.5. Comercialização e controle de qualidade da espécie <i>H. eriantha</i>	20
2. Objetivos	25
3. Material e Métodos	29
3.1. Equipamentos	29
3.2. Reagentes Químicos	29
3.3. Coleta, identificação e processamento do material vegetal	30
3.4. Obtenção do padrão analítico de ácido pfáffico	31
3.5. Solução padrão de ácido pfáffico	31
3.6. Desenvolvimento de método analítico para quantificação de ácido pfáffico total	32
3.6.1. Estabelecimento das condições cromatográficas e espectrométricas	32
3.6.2. Estabelecimento das condições de preparo de amostra	32
3.6.2.1. Otimização da hidrólise através de planejamento experimental	33
3.6.2.2. Otimização da extração através de análise univariada	36
3.7. Validação do método analítico	38
3.7.1. Especificidade e Seletividade	39
3.7.2. Linearidade e Intervalo	39
3.7.3. Limites de detecção e de quantificação	39
3.7.4. Precisão	40
3.7.5. Exatidão	40

3.8. Aplicação do método analítico para análise de amostras comerciais	41
3.8.1. Obtenção das amostras comerciais	41
3.8.2. Descrição do método analítico utilizado	41
3.9. Perda por dessecação	42
4. Resultados e Discussão	45
4.1. Processamento do material vegetal	45
4.2. Desenvolvimento de método analítico para quantificação de ácido pífico total	46
4.2.1. Estabelecimento das condições cromatográficas e espectrométricas	46
4.2.2. Estabelecimento das condições de preparo de amostra	55
4.3. Validação do método analítico	63
4.3.1. Conformidade do sistema cromatográfico	64
4.3.2. Linearidade e Intervalo	66
4.3.3. Limites de detecção e de quantificação	68
4.3.4. Precisão	69
4.3.5. Exatidão	71
4.4. Aplicação do método analítico para análise de amostras comerciais	74
5. Conclusões	79
6. Referências Bibliográficas	83
7 Anexos	91

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

α	FATOR DE SEPARAÇÃO
ACN	ACETONITRILA
APCI	IONIZAÇÃO QUÍMICA À PRESSÃO ATMOSFÉRICA, DO INGLÊS <i>"ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION"</i>
A_s	FATOR DE ASSIMETRIA
CPQBA	CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS
DAD	DETECTOR POR ARRANJO DE DIODOS, DO INGLÊS <i>"PHOTODIODE ARRAY DETECTION"</i> ,
DPR	ESTIMATIVA DO DESVIO PADRÃO RELATIVO
EI	IONIZAÇÃO POR IMPACTO DE ELÉTRONS, DO INGLÊS <i>"ELECTRON IMPACT"</i>
ELISA	IMUNOENSAIO ENZIMÁTICO, DO INGLÊS <i>"ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS"</i>
ESI	IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY, DO INGLÊS <i>"ELECTROSPRAY IONIZATION"</i>
GC	CROMATOGRAFIA GASOSA, DO INGLÊS <i>"GAS CHROMATOGRAPHY"</i>
GC-MS	CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A DETECTOR DE MASSAS, DO INGLÊS <i>"GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY"</i>
HPLC	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA, DO INGLÊS <i>"HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY"</i>

HPLC-DAD	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA COM DETECTOR POR ARRANJO DE DIODOS, DO INGLÊS " <i>HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED PHOTODIODE ARRAY DETECTION</i> "
LC-MS/MS	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA COM DETECTOR DE MASSAS EM TANDEM, DO INGLÊS " <i>LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH TANDEM MASS SPECTROMETRY</i> "
LIF	FLUORESCÊNCIA INDUZIDA POR LASER, DO INGLÊS " <i>LASER-INDUCED FLUORESCENCE</i> "
LOD	LIMITE DE DETECÇÃO
LOQ	LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO
MAE	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS, DO INGLÊS " <i>MICROWAVE-ASSISTED EXTRACTION</i> "
MEKC	CROMATOGRAFIA ELETROKINÉTICA MICELAR, DO INGLÊS " <i>MICELLAR ELECTROKINETIC CHROMATOGRAPHY</i> "
MS	ESPECTROMETRIA DE MASSAS, DO INGLÊS " <i>MASS SPECTROMETRY</i> "
m/z	RAZÃO MASSA/CARGA
n	NÚMERO DE REPLICATAS
N	NÚMERO DE PRATOS
N_{eff}	NÚMERO DE PRATOS EFETIVOS
R	COEFICIENTE DE CORRELAÇÃO
RE	RESOLUÇÃO
s	ESTIMATIVA DO DESVIO PADRÃO

S_{comb}	DESVIO PADRÃO COMBINADO
SIM	MONITORAMENTO ÍON-SELETIVO, DO INGLÊS " <i>SELECTED ION MONITORING</i> "
SFE	EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO, DO INGLÊS " <i>SUPERCRITICAL FLUID EXTRACTION</i> "
SPE	EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA, DO INGLÊS " <i>SOLID PHASE EXTRACTION</i> "
UAE	EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM, DO INGLÊS " <i>ULTRASOUND-ASSISTED EXTRACTION</i> "
UPE	EXTRAÇÃO POR ALTA PRESSÃO, DO INGLÊS " <i>ULTRAHIGH PRESSURE EXTRACTION</i> "
US-FDA	DO INGLÊS " <i>UNITED STATES-FOOD AND DRUG ADMINISTRATION</i> "
UV	ULTRAVIOLETA
TF	FATOR DE ALARGAMENTO
TOF	ANALISADOR POR TEMPO DE VÔO, DO INGLÊS " <i>TIME OF FLIGHT</i> "

LISTA DE TABELAS

n°	Descrição	Página
1	Ensaio realizado no planejamento experimental tipo “composto central” 2 ³ (software Statistica, versão 5).	34
2	Ensaio realizado para avaliar a etapa de extração.	37
3	Ensaio realizado com as interfaces ESI e APCI.	52
4	Teores obtidos nos ensaios do planejamento experimental 2 ³ para otimização da hidrólise.	57
5	Análise de variância da resposta (teor de ácido pífico total).	59
6	Teores obtidos nos ensaios para otimização da extração através de análise univariada.	63
7	Parâmetros de conformidade avaliados.	65
8	Teores de ácido pífico obtidos pela análise de amostras de raiz B em diferentes dias.	70
9	Precisões inter e intra-dia.	71
10	Comparação das condições aplicadas em cada método.	72
11	Teores de ácido pífico total obtidos pela análise de amostras de raiz B pelo método 1.	72
12	Comparação entre os resultados obtidos para cada método.	73
13	Teores de ácido pífico total em amostras comerciais de raízes pulverizadas de <i>H. eriantha</i> .	75

LISTA DE FIGURAS

n°	Descrição	Página
1	a) Raiz de <i>Hebanthe eriantha</i> (Amaranthaceae), b) Raízes de <i>Panax ginseng</i> (Araliaceae).	4
2	Estruturas químicas dos principais compostos encontrados nas raízes da espécie <i>H. eriantha</i> .	6
3	Fotos de <i>H. eriantha</i> cultivadas no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP: A) identificação dos canteiros, B) folhas e C) raízes.	30
4	Esquema do sistema de refluxo montado para realização das etapas de extração e hidrólise das amostras.	33
5	Esquema do procedimento realizado para otimização da hidrólise.	36
6	Esquema do experimento realizado para otimização da extração.	38
7	Etapas do processamento das raízes de <i>H. eriantha</i> . A) raízes laterais recém-coletadas, B) fragmentação com tesoura, C) aspecto das raízes após trituração em processador doméstico.	45
8	Cromatograma e espectros de massas obtidos na análise por HPLC-DAD-ESI-MS (modo negativo) de solução padrão de ácido pífico (164 $\mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC: coluna Symmetry (2,1 x 100 mm, 3,5 μm , Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A) e metanol (B); eluição por gradiente: de A:B 35:65 v/v para A:B 20:80 (v/v) de 0 a 5 min, mantendo A:B 20:80 v/v de 5 a 10 min e para A:B 0:100 v/v de 10 a 15 min; vazão: 0,25 mL min^{-1} ; volume de injeção: 20 μL ; λ : 205 nm (DAD). MS: 1,17 kV (capilar), -70 V (cone) e -2 V (extrator), vazão de gás: 450 L h^{-1} , temperatura da sonda: 250 $^{\circ}\text{C}$.	48

LISTA DE FIGURAS

n°	Descrição	Página
9	Cromatograma e espectros de massas obtidos na análise por HPLC-DAD-ESI-MS (modo negativo) do padrão de ácido pífico ($164 \mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC: coluna Symmetry ($2,1 \times 100 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico $0,1 \%$ (A) e acetonitrila (B); eluição por gradiente: de A:B $47:53 \text{ v/v}$ para A:B $35:65 \text{ v/v}$ de 0 a 5 min, mantendo A:B $35:65 \text{ v/v}$ de 5 a 10 min e para A:B $0:100 \text{ v/v}$ de 10 a 15 min; vazão: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ : 205 nm (DAD). MS: 2,00 kV (capilar), -90 V (cone) e -3 V (extrator); vazão de gás: 500 L h^{-1} , temperatura da sonda: 300°C .	49
10	Cromatograma e espectros de massas obtidos na análise por HPLC-DAD-APCI-MS (modo positivo) do padrão de ácido pífico ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC: coluna Symmetry ($4,6 \times 75 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico $0,1 \%$ (A): metanol (B) ($15:85 \text{ v/v}$); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ : 205 nm (DAD). MS: 5 μA (corona), -30 V (cone) e -2 V (extrator), vazão de gás: 450 L h^{-1} , temperatura da sonda: 450°C .	50
11	Cromatograma e espectros de massas obtidos na análise por HPLC-DAD APCI-MS (modo negativo) do padrão de ácido pífico ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC: coluna Symmetry ($4,6 \times 75 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico $0,1 \%$ (A): móvel metanol (B) ($15:85 \text{ v/v}$); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ 205 nm (DAD). MS: 3 μA (corona), -50 V (cone) e -3 V (extrator), vazão de gás: 300 L h^{-1} , temperatura da sonda: 450°C .	51

LISTA DE FIGURAS

n ^o	Descrição	Página
12	Curvas analíticas obtidas por HPLC-DAD-APCI-MS: A) Curva construída a partir da detecção em DAD ($\lambda = 205 \text{ nm}$); B) Curva construída a partir da detecção em MS, modo SIM ($m/z = 439$). Abaixo de cada curva encontra-se o respectivo gráfico de resíduos: C) Gráfico de resíduos da curva A. D) Gráfico de resíduos da curva B.	54
13	Gráfico dos valores observados (experimentais) <i>versus</i> os valores preditos pelo modelo de regressão do Software ($R^2 = 0,97477$).	58
14	Efeito das variáveis tempo e concentração de HCl no teor de ácido pífico total (temperatura de $120 \text{ }^\circ\text{C}$).	60
15	Efeito das variáveis tempo e temperatura no teor de ácido pífico total (concentração de HCl $1,8 \text{ mol L}^{-1}$).	60
16	Cromatograma obtido na análise do padrão de ácido pífico ($83,36 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry ($4,6 \times 75 \text{ mm}$, $3,5 \text{ } \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico $0,1 \text{ } \%$ (A): móvel metanol (B) ($18:82 \text{ v/v}$); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \text{ } \mu\text{L}$, λ : 205 nm (DAD).	64
17	Cromatograma obtido na análise de amostra de raiz B ($53,24 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) em HPLC-DAD. Coluna Symmetry ($4,6 \times 75 \text{ mm}$, $3,5 \text{ } \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico $0,1 \text{ } \%$ (A): móvel metanol (B) ($18:82 \text{ v/v}$); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \text{ } \mu\text{L}$, λ : 205 nm (DAD).	66

LISTA DE FIGURAS

n°	Descrição	Página
18	Curva analítica obtida pela análise em triplicata de 10 soluções de diferentes concentrações de padrão de ácido pífico em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry (4,6 x 75 mm, 3,5 μ m, Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A): móvel metanol (B) (18:82 v/v); eluição isocrática; vazão: 1,00 mL min ⁻¹ ; volume de injeção: 20 μ L, λ : 205 nm (DAD).	67
19	Gráfico de resíduos obtido pela análise em triplicata de diferentes concentrações de padrão de ácido pífico em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry (4,6 x 75 mm, 3,5 μ m, Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A): móvel metanol (B) (18:82 v/v); eluição isocrática; vazão: 1,00 mL min ⁻¹ ; volume de injeção: 20 μ L, λ : 205 nm (DAD).	68
20	Espectro de RMN de H ¹ (250 MHz, CDCl ₃) do padrão de ácido pífico.	91
21	Espectro de RMN de C ¹³ (262,5 MHz, CDCl ₃) do padrão de ácido pífico.	92
22	Espectro de massas (EI ⁺ /TOF) do padrão de ácido pífico	93
23	Ampliação do pico de ácido pífico mostrado no cromatograma da figura 16: análise do padrão 83,36 μ g mL ⁻¹ em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry (4,6 x 75 mm, 3,5 μ m, Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A): móvel metanol (B) (18:82 v/v); eluição isocrática; vazão: 1,00 mL min ⁻¹ ; volume de injeção: 20 μ L; λ : 205 nm (DAD) (h = altura do pico, w _b = largura da base do pico, w _h = largura do pico a meia altura).	96

LISTA DE ANEXOS

nº	Descrição	Página
1	Espectro de RMN H^1 do padrão de ácido pífico	91
2	Espectro de RMN C^{13} do padrão de ácido pífico	92
3	Espectro de massas (EI -TOF) do padrão de ácido pífico	93
4	Teores de ácido pífico total obtidos para otimização da extração (ensaio de 1 a 4)	94
5	Teores de ácido pífico total obtidos para otimização da extração (ensaio de 5 a 8)	95
6	Cálculo dos parâmetros de conformidade	96
7	Áreas obtidas para soluções de diferentes concentrações de ácido pífico	97
8	Teores de água nas raízes coletadas e obtidas comercialmente	98

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das formas mais antigas de prática medicinal da humanidade. Apesar da grande evolução na produção de medicamentos sintéticos ou semissintéticos, o emprego de plantas medicinais vem crescendo mundialmente devido a vários fatores, entre eles a facilidade de obtenção das matérias-primas e produtos, disponibilizados em drogarias, feiras-livres e lojas de suplementos alimentares, e a forte influência da mídia na difusão de informações, errôneas ou não, relacionadas aos seus efeitos terapêuticos (Veiga Júnior *et al.*, 2005; Toledo *et al.*, 2003).

É nesse contexto que se torna mais frequente a utilização de plantas da chamada medicina tradicional chinesa, tais como o ginseng, cujos efeitos adaptogênicos alcançam proporções míticas (Attele *et al.*, 1999).

O termo “ginseng” foi originalmente atribuído às raízes de várias espécies do gênero *Panax* e faz alusão à forma apresentada por elas, semelhante à humana. A espécie *Panax ginseng* (C. A. Meyer, família Araliaceae), conhecida vulgarmente como “ginseng coreano” ou “ginseng asiático”, é o ginseng mais conhecido e consumido no mundo (Jia e Zhao, 2009).

A busca por alternativas nacionais, de menor custo, levou à descoberta no Brasil da espécie *Hebanthe eriantha* (Poir. Pedersen, família Amaranthaceae), chamada de “ginseng brasileiro”, dada a semelhança anatômica entre suas raízes e as do ginseng importado (Vigo *et al.*, 2004) (**Figura 1**). Entretanto, as espécies *P. ginseng* e *H. eriantha* pertencem a famílias diferentes (Araliaceae e Amaranthaceae, respectivamente) e, por isso, possuem características taxonômicas e perfis metabólicos distintos (Oliveira, 1986).

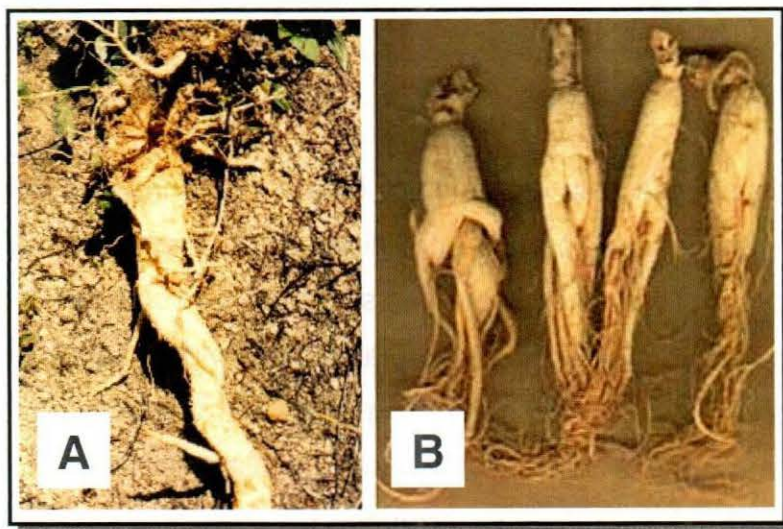


Figura 1. a) Raiz de *Hebanthe eriantha* (Amaranthaceae), b) Raízes de *Panax ginseng* (Araliaceae).

A família Amaranthaceae (Juss. ordem Caryophyllales) possui distribuição tropical e subtropical. Inclui cerca de 170 gêneros e 2000 espécies, sendo que no Brasil ocorrem 20 gêneros nativos com aproximadamente 100 espécies (Marchioretto *et al.*, 2008).

No Brasil existem poucos estudos específicos sobre o gênero *Hebanthe* Mart., visto que foi tratado por muitos anos como uma secção dos gêneros *Gomphrena* L. ou *Pfaffia* Mart. (Marchioretto *et al.*, 2009b). Em 1997, Borsh & Pedersen restauraram o gênero, que compreenderia um total de sete espécies. Marchioretto e colaboradores (2008, 2009a, 2009b), com estudos taxonômicos criteriosos em território brasileiro, reafirmaram a divisão proposta entre os gêneros *Hebanthe* e *Pfaffia* e confirmaram a presença de seis espécies de *Hebanthe* no Brasil: *H. eriantha* (Poir. Pedersen), *H. grandiflora* (Hook. Borsch & Pedersen), *H. occidentalis* (R.E.Fr. Borsch & Pedersen), *H. pulverulenta* (Mart.), *H. reticulata* (Seub. Borsch & Pedersen) e *H. spicata* (Mart.).

A espécie *H. eriantha* passou por uma série de alterações de nomenclatura, as quais podem ser encontradas em Pedersen (2000), com uma lista de sinônimos.

Marchioretto e colaboradores (2009b) propuseram a denominação atual da espécie, com a sinonimização de *Hebanthe eriantha* f. *ovatifolia* (Heimer) em favor de *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen. Embora incorreta, uma nomenclatura antiga, *Pfaffia paniculata* (Mart.) Kuntze, ainda é utilizada por fornecedores, distribuidores, comerciantes em geral, profissionais da saúde, entre outros, quando se referem à planta.

A espécie *H. eriantha* não é exclusiva do território brasileiro. É encontrada em países limítrofes, como Argentina, Paraguai e Peru. Possui ampla distribuição, sendo a única espécie do gênero encontrada em todas as províncias biogeográficas brasileiras (Amazônica, Atlântica, Caatinga, Cerrado e Paranaense), ocorrendo em bordas de rios, orlas de matas e em matas ciliares. Além disso, considerando-se a distribuição de *Hebanthe* no país, *H. eriantha* representa o táxon em comum entre as províncias Amazônica e Caatinga, de baixa similaridade entre si, mostrando que a espécie pode não ser tão seletiva aos fatores climáticos e edáficos (Marchioretto *et al.*, 2008).

Deve ser salientado que, embora possua um hábito diferenciado, seu habitat assemelha-se ao da espécie *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen, pertencente ao gênero *Pfaffia* Mart., *Amaranthaceae* (Marchioretto *et al.*, 2009a). Marchioretto e colaboradores (2009a) confirmaram a ocorrência de 20 espécies de *Pfaffia* no Brasil.

1.1. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE *H. ERIANTHA*

O primeiro trabalho que trata da composição química de *H. eriantha* foi publicado por Takemoto e colaboradores em 1983, os quais isolaram um nortriterpeno denominado ácido pfáffico, a partir do extrato metanólico das raízes da planta ou do produto de hidrólise das saponinas, com um rendimento de 0,006 % (m/m). No ano seguinte, foram isoladas e identificadas seis novas saponinas do ácido pfáffico, as quais foram denominadas pfaffosídeos A-F (Nishimoto *et al.*, 1984;

Nakai *et al.*, 1984) (**Figura 2**). O termo “pfaffosídeos” foi atribuído por alusão ao termo “ginsenosídeos”, normalmente utilizado para designar as saponinas de diversas espécies de ginseng. Além dessas substâncias, os autores identificaram a presença de outra classe de princípios ativos, os fitosteróis (estigmasterol e β -sitosterol), além de glicosídeos derivados dessas substâncias. Alantoína também foi encontrada nas raízes deste vegetal.

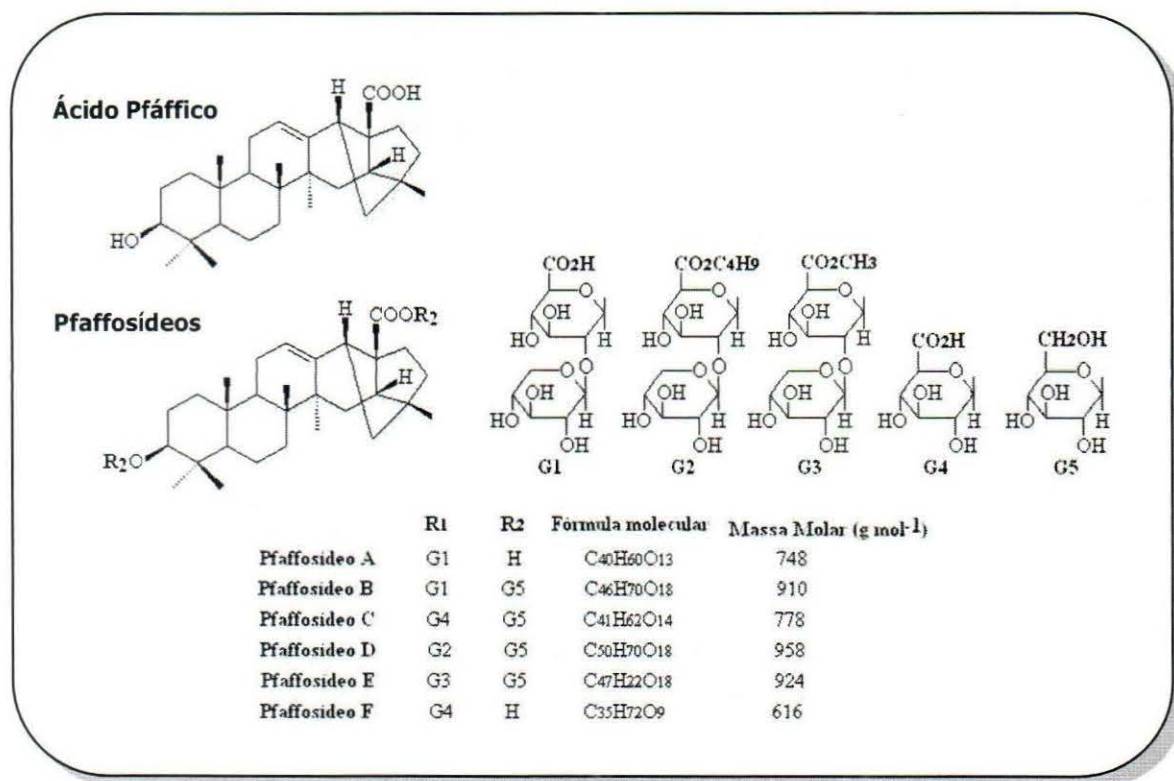


Figura 2. Estruturas químicas dos principais compostos encontrados nas raízes da espécie *H. eriantha*.

As saponinas, principais constituintes da planta, são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos. Esse tipo de estrutura possui uma parte com característica lipofílica (triterpeno ou esteroide) e outra parte hidrofílica (açúcares), o que determina um comportamento anfifílico. São substâncias de elevada massa molar (600 a 2000 g mol⁻¹) e, de modo geral, ocorrem em misturas complexas,

devido à presença concomitante de estruturas com um número variado de açúcares ou, ainda, devido à presença de diversas agliconas. Essas agliconas são liberadas através de reações de hidrólise das saponinas, resultando na formação das moléculas de triterpenos ou esteroides livres e moléculas de açúcar.

Os triterpenos fazem parte de outra classe de metabólitos secundários, os terpenos ou terpenoides. Estes constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo que este termo é empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno. Os triterpenos são caracterizados pela presença de 30 átomos de carbono em sua estrutura (Simões *et al.*, 2001).

Uma grande variabilidade no conteúdo de saponinas é naturalmente observada em todas as espécies de ginseng, devido a vários fatores, entre eles: tipo de solo, condições climáticas, localização geográfica (Jia e Zhao, 2009), idade de coleta das plantas, diferenças genéticas e alterações entre partes de uma mesma planta, incluindo folhas, raízes, raízes laterais, pelos, rizomas e peridermes (Shi et al., 2007). Entretanto, estas fontes de variabilidade podem ser minimizadas com a introdução de boas práticas agrícolas (Jia e Zhao, 2009).

1.2. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS de *H. eriantha*

As raízes pulverizadas da espécie *H. eriantha* e seus extratos são utilizados na medicina popular para diversas finalidades, entre elas: aumento da força e resistência muscular (efeito afrodisíaco), tonificação da pele, aumento do apetite, melhora do sono e da memória, cicatrização de úlceras e feridas, diminuição da queda capilar, hipoglicemiante no diabetes, diminuição dos sintomas em distúrbios como labirintite, reumatismo, atrite e artrose. Na cultura indígena, a espécie é conhecida como “paratudo” (Oliveira, 1986).

Entretanto, entre as propriedades farmacológicas comprovadas cientificamente, foi a atividade antineoplásica que obteve destaque.

O ácido pfáffico apresentou ação inibitória *in vitro* no crescimento de células de melanoma B-16, de carcinoma epitelial Hela S-3 e de carcinoma Lewis de pulmão, mesmo em concentrações muito baixas (Takemoto *et al.*, 1983, Nakai *et al.*, 1984). Os pfaffosídeos A-F também exibiram efeitos no crescimento em cultura de células de melanoma B-16, com exceção do pfaffosídeo B (Nishimoto *et al.*, 1984).

Nagamine e colaboradores (2009) realizaram um estudo com células MCF-7, as mais comumente usadas como modelo de câncer de mama estrógeno-positivo (metastático). O extrato butanólico de raízes de *H. eriantha* mostrou efeito citotóxico sobre as células cultivadas, com degeneração de componentes citoplasmáticos e profundas alterações morfológicas e nucleares. A supressão do crescimento das células em cultura foi evidenciada pela redução da densidade celular de forma dose-dependente.

Os efeitos da planta também foram avaliados no crescimento do tumor de Ehrlich na forma ascítica. Matsuzaki e colaboradores (2003) mostraram que a administração de raiz em pó a ratos por gavagem reduziu o crescimento celular, ao passo que a administração do extrato butanólico também apresentou ação antineoplásica sobre as células transplantadas (Matsuzaki *et al.*, 2006). A administração por gavagem do extrato metanólico aumentou a atividade fagocitária de macrófagos no tumor (Pinello *et al.*, 2006).

Ratos com linfoma tímico tratados com raízes pulverizadas de *H. eriantha* mostraram redução no tumor (Watanabe *et al.*, 2000).

Considerando os estudos em que foram empregados os extratos da raiz, sabe-se que os agentes quimioprotetores são extremamente potentes quando estão presentes em extratos ou misturas, porque exibem respostas múltiplas (Xue *et al.*, 2001; Stoner e Gupta, 2001).

Da Silva e colaboradores (2005) observaram que o tratamento crônico com raízes pulverizadas de *H. eriantha*, administradas a ratos com hepatocarcinogênese através da ração, reduziu a incidência, número e área das lesões pré-neoplásicas, indicando um efeito inibitório nas etapas de promoção e progresso do tumor hepático.

Em trabalho posterior dos mesmos autores, ratos portadores de tumor hepático foram tratados com a raiz pulverizada misturada a ração em diferentes proporções. Os resultados mostraram redução da proliferação celular e aumento da apoptose, além do desenvolvimento de processo inflamatório crônico nos animais tratados com altas concentrações (hepatotoxicidade). Não houve alterações nas junções celulares entre hepatócitos, assim como não foi afetada a expressão protéica das conexinas, indicando que os efeitos quimioprotetores da raiz não estão relacionados à comunicação celular (Da Silva *et al.*, 2010).

Embora abordadas em menor número de trabalhos, foram estudadas outras propriedades farmacológicas, não relacionadas ao efeito antineoplásico.

Ballas (2000), por exemplo, mostrou que hemácias provenientes de pacientes com anemia falciforme, incubadas com *H. eriantha*, tiveram sua deformabilidade aumentada em osmolaridade fisiológica de maneira dose-dependente. Além disso, houve o aumento da concentração intracelular de sódio e do volume corpuscular médio e a diminuição da concentração média de hemoglobina. Estes resultados demonstraram a hidratação das células, a qual pode prevenir os dolorosos episódios de oclusão microvascular que acompanham a doença.

Oshima e Gu (2003) estudaram os efeitos nos níveis de hormônios sexuais em ratos. A administração, por 30 dias, de raiz pulverizada misturada à água dos animais levou ao aumento dos níveis de estradiol-17 β e progesterona nas fêmeas e de testosterona nos machos. Os efeitos foram explicados pela presença de fitosteróis na raiz, que levam à diminuição do colesterol plasmático, com consequente aumento da produção hormonal.

Subiza e colaboradores (1991) relataram a associação do pó de ginseng à asma ocupacional. Um paciente desenvolveu sintomas de asma após exposição à raiz pulverizada de *H. eriantha* durante produção de cápsulas. A hiperreatividade das vias aéreas foi confirmada por mudança brônquica positiva à metacolina. A sensibilidade ao pó foi mostrada pela imediata reatividade ao teste de pele, mudança brônquica positiva (resposta imediata) e pela presença de IgE específica detectada por ELISA em extrato aquoso. Posteriormente, outros estudos confirmaram a ocorrência de asma ocupacional e rinite induzidas pelo pó de ginseng coreano, possivelmente por um mecanismo IgE-mediado (Lee *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2008).

Também as folhas de *H. eriantha* foram estudadas. O extrato etanólico das mesmas, quando administrado a ratos, promoveu efeitos no sistema nervoso central, com diminuição da ansiedade e aumento da atividade locomotora (Fontanive *et al.*, 2010).

Os sintomas de asma e rinite em humanos (Subiza *et al.*, 1991), além da hepatotoxicidade demonstrada em ratos (Da Silva *et al.*, 2010), reforçam que as plantas medicinais e os fitoterápicos devem ser utilizados com cautela, preferencialmente sob prescrição médica, pois podem provocar efeitos adversos, toxicidade e apresentar contraindicações de uso. Além disso, podem ocorrer interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos. Por exemplo, não é recomendada a administração concomitante de fitoterápicos à base de ginseng coreano com hipoglicemiantes (insulina) e contraceptivos orais à base de estrogênios, devido à ação sinérgica da planta, podendo provocar, respectivamente, hipoglicemia grave e sangramento menstrual excessivo ou mastalgia (Alexandre *et al.*, 2008). Considerando que o ginseng brasileiro também possui efeitos hipoglicemiantes e estrogênicos, é importante que a interação da espécie *H. eriantha* com outros fármacos seja investigada.

1.3. DA EXTRAÇÃO À ANÁLISE QUANTITATIVA DE SAPONINAS

Uma variedade de procedimentos de extração, purificação e análise têm sido utilizados para obter e quantificar saponinas a partir de folhas ou, mais comumente, raízes. A maior parte dos procedimentos de extração das saponinas utiliza metanol ou etanol como solventes, tanto puros como em solução aquosa, muitas vezes acompanhados de aquecimento, refluxo ou sonicação. A subsequente purificação pode incluir extração em ponto de nuvem, "*salting out*", clivagem oxidativa seguida de derivatização, extração em fase sólida (SPE, "*solid phase extraction*"), ou adicional extração com uma mistura de éter dietílico e n-butanol. A análise quantitativa emprega frequentemente a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, "*high performance liquid chromatography*"), com detecção por ultravioleta (UV), por arranjo de fotodiodos (DAD, "*photodiode array detection*") ou por espectrometria de massas (MS, "*mass spectrometry*"), embora a espectroscopia de infravermelho (IR), a cromatografia gasosa acoplada com detector de massas (GC-MS, "*gas chromatography-mass spectrometry*") e o imunoenensaio enzimático (ELISA, "*enzyme-linked immunosorbent assays*") também sejam usados (Corbit *et al.*, 2005).

1.3.1. PREPARO DE AMOSTRAS A PARTIR DAS MATRIZES VEGETAIS

As plantas medicinais possuem vários compostos ativos e suas concentrações podem ser influenciadas pela espécie, origem e técnica de processamento. Esta característica cria um grande desafio para o controle de qualidade químico-analítico. Devido às baixas concentrações de princípios ativos e à complexidade das amostras, o preparo de amostra é sempre uma etapa crucial no ensaio e pode impactar as etapas de análise. A similaridade estrutural dos ginsenosídeos traz dificuldade na separação e identificação dos mesmos e o preparo de amostra é frequentemente demorado (Corbit *et al.*, 2005).

1.3.1.1. MÉTODOS CONVENCIONAIS: SOXHLET E REFLUXO A QUENTE

As tecnologias de extração devem ser versáteis, relativamente simples e de baixo custo. Estas características aplicam-se aos procedimentos de extração convencionais, tais como a extração com solvente (Kwon *et al.*, 2003). As técnicas tradicionais de extração por solvente de matérias-primas vegetais são baseadas na escolha correta de solventes e no uso de aquecimento e agitação, para aumento da solubilidade dos componentes e da taxa de transferência de massa (Zhang *et al.*, 2006). Entre os métodos de extração convencionais estão a extração por soxhlet e o refluxo a quente.

A extração por soxhlet envolve o contato sólido-líquido para remoção de um ou mais componentes. A amostra não é colocada em contato direto com o solvente. O solvente, que está em refluxo, é evaporado, percorre uma espécie de sifão até um condensador de bolas resfriado, onde é condensado para, finalmente, entrar em contato com a amostra. A vantagem mais importante é permitir o contato repetitivo da amostra com porções de solvente fresco, prevenindo a saturação do solvente e aumentando a remoção de compostos da matriz (Zhang *et al.*, 2006). Além disso, a amostra não fica em contato com o solvente em refluxo, evitando a degradação dos analitos por excesso de aquecimento. Entretanto, o processo pode demorar até vários dias.

O refluxo a quente é uma extração sólido-líquido, em que o solvente quente carrega por lixiviação os componentes a partir da matriz sólida. Esta técnica permite a extração de sólidos em elevadas temperaturas sem perda do solvente por evaporação. Além disso, por ser a temperatura do sistema mais alta do que o ponto de ebulição do solvente, este excesso de energia na forma de calor pode ajudar a aumentar a cinética de extração do sistema (Zhang *et al.*, 2006).

1.3.1.2. EXTRAÇÃO POR ALTA PRESSÃO

Na técnica de extração por alta pressão (UPE, “*ultrahigh pressure extraction*”), os materiais são primeiramente misturados com solventes à temperatura ambiente. A mistura líquida é então pressurizada entre 100 e 1000 MPa por um certo tempo e depois a pressão é liberada rapidamente. UPE apresenta muitas vantagens, como menor tempo de processamento, maior teor extrativo, baixo consumo de energia, operação à temperatura ambiente e manutenção da estrutura e atividade dos compostos, apesar da aplicação de pressão. Desde que UPE é realizada à temperatura ambiente, os danos térmicos e a perda de componentes voláteis podem ser evitados. Comparativamente à extração supercrítica, os equipamentos de UPE são simples e de menor custo, e vários solventes podem ser usados.

UPE é um método de processamento não-térmico. Quando a pressão é aplicada, a pressão osmótica aumenta e o solvente alcança o interior das células. Nesse processo, o volume de gás existente nas cavidades da matriz diminui e, ao mesmo tempo, as estruturas da célula sofrem algum grau de destruição. Após algum tempo, quando o material intracelular sai com o solvente, os componentes ativos se dissolvem e o equilíbrio pode ser alcançado em curto espaço de tempo. Como a pressão é liberada, a pressão no meio extracelular decresce subitamente, enquanto a pressão intracelular permanece no valor alcançado no equilíbrio, o que aumenta enormemente a velocidade de difusão dos componentes (Zhang *et al.*, 2006).

1.3.1.3. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR ULTRASSOM

A extração assistida por ultrassom (UAE, “*ultrasound-assisted extraction*”) é uma alternativa rápida, eficiente e de baixo custo aos métodos de extração convencionais (Tang *et al.*, 2009). UAE melhora tanto a penetração do solvente nas

matrizes vegetais quanto a liberação do material intracelular, pela ruptura das paredes celulares, principalmente devido aos efeitos mecânicos de cavitação acústica. Estas cavitações produzem microambientes com altas pressões e temperaturas, acelerando a remoção dos analitos a partir das matrizes. Entretanto, é uma técnica de difícil utilização em escala industrial (Zhang *et al.*, 2006).

1.3.1.4. EXTRAÇÃO ASSISTIDA POR MICRO-ONDAS

A técnica de extração assistida por micro-ondas (MAE, “*microwave-assisted extraction*”) combina a aplicação de micro-ondas com a extração tradicional por solvente. A interação direta da radiação com moléculas de água livre presentes nas células pode aquecer a amostra em um tempo bastante curto, acelerando a extração. Esta interação resulta ainda na ruptura celular e liberação dos produtos intracelulares no solvente (Vongsangnak *et al.*, 2004). MAE tem sido amplamente utilizada na extração de compostos voláteis de plantas medicinais (Tang *et al.*, 2009).

A energia de micro-ondas causa migração de íons e rotação de dipolos. Portanto, a técnica depende da presença de moléculas polares ou espécies iônicas, tanto no solvente quanto na matriz a ser extraída (Vongsangnak *et al.*, 2004). Outros parâmetros a serem considerados em MAE são: estado físico da amostra, razão sólido/líquido, tempo de extração, potência e frequência de emissão da radiação empregada (Kwon *et al.*, 2003).

Na extração por MAE, devido ao rápido aquecimento do volume total de solvente, maiores homogeneidade e reprodutibilidade são obtidas. Outras vantagens desse processo sobre os métodos convencionais de extração incluem economia de energia, solvente e geração de menor quantidade de resíduos (Kwon *et al.*, 2003). Entretanto, MAE é essencialmente um processo térmico, possuindo todas as desvantagens inerentes a ele (Zhang *et al.*, 2006).

1.3.1.5. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

A extração em fase sólida (SPE, “*solid phase extraction*”) é uma técnica de preparo de amostra bem estabelecida e amplamente aceita, baseada na sorção em fase sólida. Muitos cartuchos de SPE são rotineiramente usados para limpar e concentrar compostos provenientes de amostras vegetais. Recentemente, alguns novos sorventes estão envolvidos em SPE para aumentar a seletividade e eficiência da técnica (Tang *et al.*, 2009).

1.3.1.6. EXTRAÇÃO COM FLUIDO SUPERCRÍTICO

O uso de fluidos supercríticos como solventes na SFE (“*supercritical fluid extraction*”) é uma alternativa interessante para extração de plantas medicinais. A extração com dióxido de carbono (CO_2) supercrítico em altas temperaturas é uma técnica muito apropriada para obtenção de substâncias termorresistentes. Além disso, os produtos não possuem resíduos de solventes orgânicos, os quais ocorrem nos métodos de extração convencionais. Estes solventes podem ser tóxicos, como no caso de metanol e hexano. A fácil remoção dos solventes do produto final, a alta seletividade e o uso de temperaturas brandas no processo, são os fatores mais atrativos da tecnologia supercrítica.

O CO_2 , até em altas temperaturas, possui limitada habilidade para dissolver moléculas polares, o que pode ser contornado pela adição de compostos polares miscíveis a eles, os quais são chamados de modificadores ou co-solventes (Leal *et al.*, 2010). Os modificadores podem aumentar a solubilidade dos analitos-alvo e interagir com sítios ativos na matriz da amostra, os quais ajudam o CO_2 a extrair o analito eficientemente. Os modificadores mais comumente usados em SFE são metanol e etanol, porque possuem alta polaridade, o que aumenta significativamente

a polaridade do CO₂. O efeito dos modificadores depende do modificador em si, do analito-alvo e da natureza da matriz vegetal (Zhang *et al.*, 2006)

Embora promissora, a extração supercrítica não teve ainda seu uso difundido, devido à relativa alta complexidade de operação e aos altos custos operacionais (Kwon *et al.*, 2003).

1.3.1.7. EXTRAÇÃO POR MEMBRANA LÍQUIDA

Na extração por membrana líquida (LME, “*liquid membrane extraction*”), os analitos são seletivamente enriquecidos a partir da amostra para o interior de uma membrana constituída de líquido orgânico e depois são re-extraídos para o interior de uma fase aceptora. O método de LME tem mostrado alto fator de enriquecimento, alta seletividade e baixo consumo de solvente. Entretanto, a estabilidade da membrana é ainda o maior problema na LME, devido à possibilidade de perda da membrana ou, do solvente durante a extração (Tang *et al.*, 2009).

1.3.1.8. DERIVATIZAÇÃO

É usada para mudar as propriedades de um analito de modo a obter maior sensibilidade na detecção ou melhor separação. Algumas pré-colunas de derivatização foram desenvolvidas para a análise de plantas medicinais usando UV, MS ou detectores por fluorescência. Após a derivatização, maior sensibilidade e melhor seletividade são obtidas, principalmente quando reagentes fluorescentes são usados. Na análise por GC, o objetivo da derivatização é sempre aumentar a volatilidade e a estabilidade dos analitos. Recentemente, técnicas de derivatização em capilares foram desenvolvidas para cromatografia eletrocínética micelar (MEKC,

“micellar electrokinetic chromatography”) com detecção a laser induzida por fluorescência (LIF, *“laser-induced fluorescence”*) (Tang *et al.*, 2009).

1.3.2. ANÁLISE QUANTITATIVA DE SAPONINAS

Entre todas as técnicas clássicas usualmente empregadas na análise fitoquímica, HPLC tem sido a opção de escolha nos últimos 20 anos para a determinação das saponinas de ginseng, chamadas ginsenosídeos. HPLC-UV é a técnica mais comumente usada para a quantificação de ginsenosídeos nas plantas, extratos e produtos comercializados. A escolha desta técnica ocorre principalmente devido à grande disponibilidade de instrumentação de HPLC-UV nos laboratórios analíticos. Entretanto, por causa da baixa absorção dos ginsenosídeos na região UV, a detecção é realizada na região de comprimento de onda entre 200 a 205 nm, produzindo cromatogramas com alto nível de ruído na linha de base e, consequentemente, baixa sensibilidade. Outra limitação do detector por UV é a falta de informação com relação à identidade dos picos cromatográficos, obtida pela injeção de compostos padrão. O uso de LC-MS/MS permite uma identificação *on line* dos ginsenosídeos, produzindo importantes informações estruturais como massa molecular e tipo de grupamento aglicona. Dessa forma, os produtos derivados de ginseng são diferenciados com base na distribuição de ginsenosídeos por aplicação de metodologia LC-MS/MS, a qual também demonstrou ser altamente seletiva e específica para a quantificação dos ginsenosídeos. Entretanto, este método analítico ainda possui alto custo para ser usado em análises de rotina e, por isso, permanece como ferramenta para estudos farmacocinéticos e metabólicos.

A principal desvantagem do uso do HPLC para análises de rotina de ginsenosídeos é o consumo de tempo, tanto no preparo de amostra, quanto no tempo de análise (usualmente mais do que 60 minutos), devido à presença de grande número de constituintes a serem separados (Jia e Zhao, 2009).

Os métodos reportados na literatura usam principalmente colunas C-18, fase móvel composta por água e acetonitrila e eluição por gradiente (Shi *et al.*, 2007).

1.3.3. ANÁLISES DAS AGLICONAS: NOVO ENFOQUE

Um enfoque racional para quantificação e avaliação dos produtos de ginseng parece ser a identificação e quantificação das agliconas após liberação a partir das saponinas. Entretanto, tem sido difícil desenvolver um método adequado para a clivagem das ligações glicosídicas. Entre os métodos disponíveis estão a hidrólise ácida e a clivagem oxidativa alcalina.

A clivagem alcalina consiste no borbulhamento de oxigênio, por 5 min, sobre uma fração butanólica contendo os ginsenosídeos. O tubo contendo esta amostra é então selado e a reação é realizada por 8 h a 90 °C. Dessa forma, o processo de clivagem em si é bastante demorado. Além disso, a clivagem é apenas uma parte do processo de preparo de amostra, que inclui outras etapas: extração da raiz com solvente em duas etapas (uma utilizando sonicação e outra, aquecimento), purificação do extrato em cartucho C-18 e derivatização dos produtos de clivagem por trimetilsililação. A solução final é analisada por GC-MS (Cui, 1995).

Em relação à hidrólise ácida há trabalhos que reportam problemas relacionados à epimerização, ciclização e hidratação dos ginsenosídeos. Entretanto, esta técnica já foi aplicada com sucesso à clivagem das saponinas de *H. eriantha* para a obtenção do ácido pfáffico (Takemoto *et al.*, 1983).

1.4. FITOTERAPIA NO BRASIL: SITUAÇÃO ATUAL

No Brasil, as plantas medicinais da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, difundidas por

usuários ou comerciantes. Assim, a prática da fitoterapia segura encontra uma série de dificuldades, que vão desde a identificação correta do material botânico utilizado à quase inexistência de estudos de segurança, eficácia e qualidade de grande parte das plantas. As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras-livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais.

As matérias-primas mais usadas para a produção de medicamentos fitoterápicos de forma sólida, em farmácias de manipulação, apresentam-se geralmente sob a forma de pó obtido da planta seca ou estabilizada. Tal fato é explicado pelo custo mais baixo para aquisição da droga pulverizada comparado ao extrato seco e, principalmente, ao extrato seco padronizado.

Os pós são obtidos a partir da trituração ou moagem da planta previamente seca ou estabilizada, devendo ser empregadas as partes recomendadas da planta, o que garante a maior concentração de substâncias ativas. Os extratos secos, por sua vez, são preparações obtidas pela eliminação da fase líquida através de operações de secagem, devendo apresentar uma umidade residual máxima de 5 %. Os extratos secos também podem ser padronizados em relação a uma substância, ou grupo de substâncias, que identifique a droga vegetal ou que seja responsável pela ação terapêutica. Aquela empregada apenas para identificação é chamada marcador químico. Por outro lado, a substância responsável pela ação no organismo, a qual, muitas vezes, é ainda capaz de identificar a planta, é denominada marcador farmacológico ou substância ativa.

O emprego de extratos secos padronizados na fabricação de medicamentos fitoterápicos, especialmente pelo setor magistral, é a tendência atual para a garantia do efeito terapêutico desejado, principalmente quando baseado em estudos clínicos devidamente conduzidos (Feltrin e Chorilli, 2010).

1.5. COMERCIALIZAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DA ESPÉCIE *H. ERIANTHA*

Em função das atividades farmacológicas promissoras de *H. eriantha*, associadas com o aumento da popularidade dos produtos comercializados, raízes pertencentes ao gênero *Pfaffia* têm sido comercializadas de maneira indiscriminada como “ginseng brasileiro”, caracterizando situações de adulteração, falsificação e até mesmo fraude.

Vários fatores colaboram para que tais situações ocorram. Primeiramente, como já foi citado, espécies do gênero *Hebanthe* Mart. foram tratadas por muito tempo como pertencentes ao gênero *Pfaffia* Mart. e, ainda hoje, nomenclaturas incorretas estão presentes em rótulos de embalagens de produtos, laudos de fornecedores e prescrições médicas. De fato, a diferenciação botânica entre as espécies é bastante difícil até mesmo para um especialista botânico, ocorrendo apenas através da planta inteira e florida, pois os caracteres anatômicos das partes subterrâneas são muito semelhantes. Outro fator agravante é que algumas espécies partilham de mesmo habitat, como, por exemplo, as espécies *H. eriantha* e *P. glomerata*. Vale ressaltar, entretanto, que estas espécies possuem hábitos diferenciados. Enquanto a espécie *H. eriantha* possui crescimento lento e é de difícil cultivo, a espécie *P. glomerata*, por outro lado, desenvolve-se em campos abertos e bem iluminados, atingindo ponto de coleta em cerca de dois anos de idade (Vigo *et al.*, 2004). Assim, é frequente a venda de *P. glomerata* em associação com *H. eriantha*, ou mesmo a substituição de uma pela outra.

Somam-se a estes fatores, a falta de compostos marcadores e métodos químico-analíticos para identificação das matérias-primas e produtos de *H. eriantha* (Li *et al.*, 2010) e à inexistência de especificações nas farmacopéias vigentes e literaturas oficiais (Vigo *et al.*, 2004).

Considerando que a garantia de qualidade do material vegetal a ser processado é fundamental na preparação de fitoterápicos seguros, um aspecto importante a ser

considerado é o teor da substância ativa e sua pureza (Toledo *et al.*, 2003). Além disso, a eficácia de uma droga em pó não pode ser comparada a do extrato seco padronizado, pois não há padronização da concentração de substâncias essencialmente importantes para a atividade farmacológica.

Justifica-se dessa forma, a necessidade de padronizar extratos secos de plantas medicinais, estabelecendo-se métodos validados para doseamento de compostos marcadores das mesmas. No caso específico da *H. eriantha*, o ácido pífico figura como uma excelente opção de marcador farmacológico, pois além de identificar a espécie, possui intensa atividade farmacológica, podendo ser usado para diferenciá-la da espécie *Pfaffia glomerata*, usualmente utilizada como adulterante.

No Brasil, no caso de metodologia não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA (caso da espécie *H. eriantha*), a normativa RE nº 899, de 29 de maio de 2003, preconiza a validação da metodologia utilizada pelos seguintes parâmetros (Anvisa, 2003): especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento e validação de método analítico para quantificação de ácido pífico total em raízes da espécie *Hebanthe eriantha* (Poir.) Pedersen.

Os objetivos específicos compreenderam:

- ✓ Avaliação do preparo de amostras: desenvolvimento e otimização das etapas de extração e hidrólise das saponinas de amostras de raízes de *H. eriantha*;
- ✓ Desenvolvimento e validação de método cromatográfico para quantificação de ácido pífico total, segundo orientações da RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA;
- ✓ Análise de amostras de raízes de *H. eriantha* disponíveis comercialmente, avaliando-se o teor total de ácido pífico presente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. EQUIPAMENTOS

- ✓ Agitadores magnéticos com aquecimento (Fisher Scientific, modelo Isotemp, EUA e Fisatom, modelo 752 A, Brasil);
- ✓ Balança analítica (Precisa, modelo XT 220 A, Suíça);
- ✓ Estufa (Marconi, modelo MA 033, Brasil);
- ✓ Estufa com circulação forçada de ar (Blue M, EUA);
- ✓ Moinho de facas (Manesco e Ranieri, modelo MMR 320, Brasil);
- ✓ Processador doméstico (Phillips Walita modelo RI 7620, Brasil);
- ✓ Rotaevaporador (Buchi, modelo R II, Suíça);
- ✓ Sistema de cromatografia a líquido Alliance (Waters, EUA), composto por bomba 2695, detector por arranjo de fotodiodos 2996, forno para aquecimento de coluna e software Empower, acoplado a espectrômetro de massas EMD 1000 (analisador hexapolo) e software Acquity.

3.2. REAGENTES QUÍMICOS

- ✓ Acetonitrila (J. T. Baker) grau HPLC;
- ✓ Acetato de etila P.A. (Synth);
- ✓ Ácido clorídrico (HCl) P.A. 37 % (Synth);
- ✓ Ácido fórmico P.A. 85 % (Synth);

- ✓ Álcool etílico (etanol) absoluto P.A. 99,5 % (Synth);
- ✓ Metanol (J. T. Baker) grau HPLC;
- ✓ Óleo de silicone (Chemco) com viscosidade entre 950 a 1050 cST.

3.3. COLETA, IDENTIFICAÇÃO E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As plantas íntegras de *H. eriantha* foram coletadas no Campo Experimental do CPQBA-Unicamp (Paulínia-SP), em abril de 2009. A forma como os canteiros foram identificados, assim como o aspecto das folhas e raízes, são mostrados na **Figura 3**. Após lavagem com água, as raízes foram fragmentadas em pedaços pequenos (cerca de 3 cm) e, a seguir, trituradas em processador doméstico. O material foi disposto em bandejas de alumínio, seco em estufa de ar circulante (40 °C) por dois dias e depois pulverizado em moinho de facas (60 mesh). O material foi armazenado em frascos de plástico e mantido à temperatura ambiente. Nos experimentos foram utilizados três lotes de raízes, identificados como A61, B e C. Cada lote foi cultivado no CPQBA a partir de mudas provenientes de diferentes localidades do país e possivelmente possui características genótípicas diferentes, embora as raízes pertençam à mesma espécie.

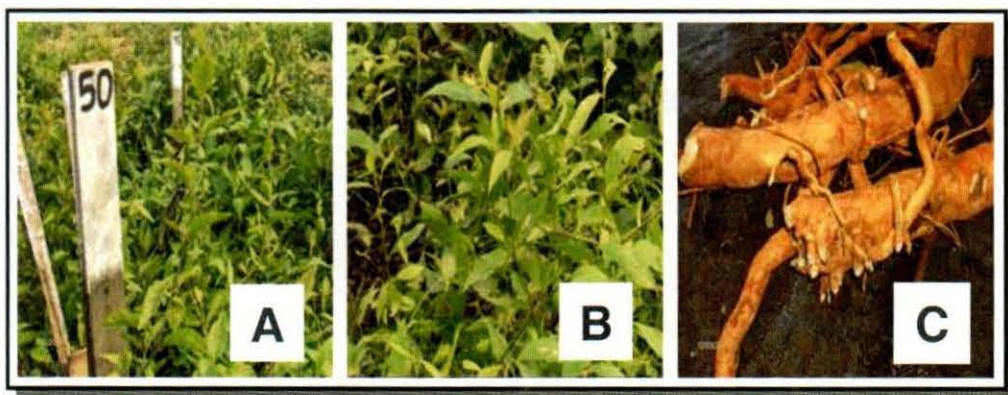


Figura 3. Fotos de *H. eriantha* cultivadas no Campo Experimental do CPQBA-UNICAMP: A) identificação dos canteiros, B) folhas e C) raízes.

3.4. OBTENÇÃO DO PADRÃO ANALÍTICO DE ÁCIDO PFÁFFICO

O padrão de ácido pfáffico foi isolado no CPQBA-Unicamp sob a responsabilidade da Dr^a Vera Lúcia Garcia Rehder. A identidade e pureza do ácido foram confirmadas pela análise de espectros de RMN, infravermelho (IR) e de massas de alta resolução (EI positivo/TOF), assim como pela medida da rotação óptica (α). Os espectros de RMN H^1 , de C^{13} e de EI/TOF são apresentados nos Anexos de 1 a 3. Para a confecção das curvas analíticas utilizadas durante o desenvolvimento e validação do método, foi empregado padrão de ácido pfáffico de pureza 95,5 % (m/m). Os resultados mostrados nesse trabalho foram corrigidos em função desse teor.

3.5. SOLUÇÃO PADRÃO DE ÁCIDO PFÁFFICO

A solução estoque de ácido pfáffico foi preparada através da pesagem de cerca de 10 mg ($\pm 0,01$ mg) do padrão de ácido pfáffico em balão volumétrico de 25 mL. O padrão foi dissolvido com solução de metanol e ácido fórmico 0,1 % (80:20 v/v) e submetido a ultrassom por 5 min. A seguir, o balão foi avolumado com a mesma solução de metanol e ácido fórmico 0,1 % (80:20 v/v). A partir dessa solução estoque foram feitas diluições adequadas para a obtenção das soluções empregadas na confecção da curva analítica.

3.6. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO PFÁFFICO TOTAL

3.6.1. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

Foram utilizadas, de forma alternada, duas fontes de ionização no espectrômetro de massas (ionização por eletrospray, ou ESI, e ionização química a pressão atmosférica, ou APCI) e duas colunas cromatográficas Symmetry C-18 (Waters) de diferentes dimensões (2,1 x 100 mm x 3,5 μ m e 4,6 x 75 mm x 3,5 μ m) no cromatógrafo a líquido. Para validação do método e análise de amostras comerciais foram utilizadas as condições mostradas a seguir. **Cromatógrafo a líquido:** coluna Symmetry C-18 (75 x 4,6 mm, 3,5 μ m), temperatura do forno a 35 °C; solução de ácido fórmico 0,1 % v/v (A) e metanol (B) como eluentes; eluição isocrática a 18 % de A e 82 % de B (v/v); volume de injeção de 20 μ L; leitura a 205 nm; **Espectrômetro de massas:** interface APCI, operando em modo negativo; aplicação de 3 μ A na agulha corona, -50 V no cone e -3 V no extrator; temperaturas de 450 °C na sonda e 120 °C na fonte; vazões de 450 L h⁻¹ para o gás de dessolvatação e de 50 L h⁻¹ para o gás de contrafluxo (cone); detecção por monitoramento íon-seletivo (modo SIM, “*selected ion monitoring*”), com seleção da razão massa/carga (m/z) 439,7.

3.6.2. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DE AMOSTRA

A instrumentação básica utilizada para a realização do preparo das amostras incluiu: chapa de aquecimento, vasilha de vidro termorresistente (tipo “marinex”),

óleo de silicone, termômetro calibrado e condensador de bolas. Para a realização da extração e/ou hidrólise de várias amostras, os condensadores foram ligados em série, conforme mostrado na **Figura 4**.



Figura 4. Esquema do sistema de refluxo montado para realização das etapas de extração e hidrólise das amostras.

3.6.2.1. OTIMIZAÇÃO DA HIDRÓLISE ATRAVÉS DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

Para otimização da hidrólise foi realizado um planejamento experimental do tipo “composto central” 2^3 , com ponto central em triplicata, num total de 17 ensaios, conforme mostrado na **Tabela 1**. Foram avaliados os efeitos de três variáveis no teor de ácido pífico total (% m/m) da raiz de *H. eriantha*: temperatura do banho de silicone (faixa de 90 a 140 °C), tempo de refluxo (faixa de 1,5 a 4,5 h) e concentração de ácido clorídrico (HCl) empregada (faixa de 1 a 2 mol L⁻¹). O software Statistica (versão 5) foi utilizado para confecção da tabela de ensaios a serem realizados, análise de regressão dos resultados e tratamento gráfico dos dados.

Tabela 1 – Ensaios realizados no planejamento experimental tipo “composto central” 2^3 (software Statistica, versão 5).

Ensaios	Variáveis		
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	HCl (mol L ⁻¹)
1	90	1,5	1,0
2	90	1,5	2,0
3	90	4,5	1,0
4	90	4,5	2,0
5	140	1,5	1,0
6	140	1,5	2,0
7	140	4,5	1,0
8	140	4,5	2,0
9	73	3,0	1,5
10	157	3,0	1,5
11	115	0,5	1,5
12	115	5,5	1,5
13	115	3,0	0,7
14	115	3,0	2,3
15 (C)*	115	3,0	1,5
16 (C)*	115	3,0	1,5
17 (C)*	115	3,0	1,5

*C = replicatas do ponto central.

PARTE I. EXTRAÇÃO A QUENTE COM ETANOL

Uma amostra de raiz A61 (10,01 g) foi transferida para um balão de fundo redondo (500 mL) e acrescida de 100 mL de etanol 80 % (v/v). O balão foi então acoplado a um condensador e submetido a aquecimento em banho de óleo de silicone a 100 °C por 2 h (suspensão em refluxo), sob agitação magnética. A temperatura foi constantemente monitorada com termômetro calibrado de forma que a variação fosse de no máximo ± 2 °C. Após resfriamento, o conteúdo do balão foi filtrado à vácuo em funil de placa sinterizada (n° 2). O resíduo de filtração foi transferido para um balão, acrescido de 100 mL de etanol 80 % (v/v) e submetido a refluxo por mais 2 h. Os filtrados foram reunidos e avolumados para 500 mL. O extrato obtido foi transferido para frasco âmbar e armazenado a 4 °C.

PARTE II. HIDRÓLISE ÁCIDA A QUENTE

Cada ensaio do planejamento foi realizado a partir de uma alíquota de 20 mL do extrato etanólico obtido. A alíquota foi transferida para um balão de fundo redondo (100 mL), seca em rotaevaporador, acrescida de 30 mL de HCl na concentração especificada para cada ensaio e, finalmente, submetida a refluxo em banho de óleo de silicone, sob agitação magnética, a uma dada temperatura. Após o tempo de refluxo, o conteúdo do balão foi resfriado e particionado duas vezes com acetato de etila na proporção de 1:1 (v/v). A fase orgânica foi reunida e seca à vácuo em rotaevaporador. O resíduo foi dissolvido com solução de metanol e ácido fórmico 0,1 % (80:20 v/v). A solução resultante foi avolumada (25 mL), diluída (2:10 v/v) e filtrada em membrana de 0,45 μ m, antes da análise em cromatógrafo. O esquema do procedimento é mostrado na **Figura 5**.

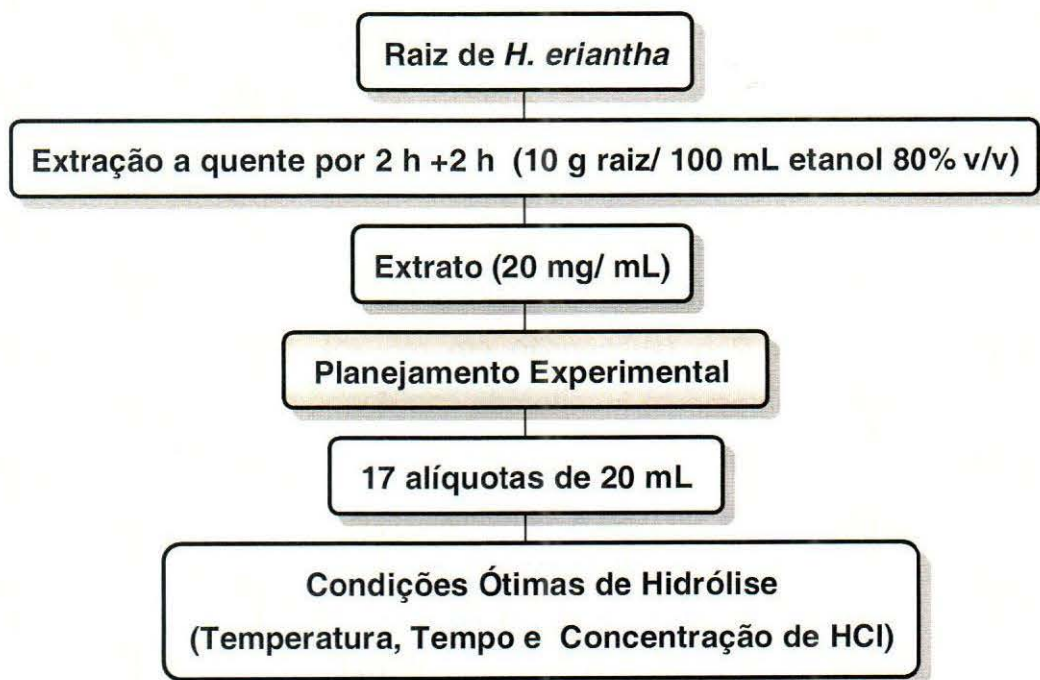


Figura 5. Esquema do procedimento realizado para otimização da hidrólise.

3.6.2.2. OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO ATRAVÉS DE ANÁLISE UNIVARIADA

Uma amostra da raiz A61 (~4 g) foi transferida para um balão de fundo redondo (100 mL) e acrescida de 40 mL de etanol 80 % (v/v). O refluxo foi realizado em banho de óleo de silicone a 100 °C pelo tempo estipulado em cada ensaio (tempo de extração), conforme mostrado na **Tabela 2**. Após resfriamento, o conteúdo do balão foi filtrado à vácuo em um funil de placa sinterizada (n° 2). O resíduo de filtração foi transferido para um balão, acrescido de 40 mL de etanol 80 % (v/v) e submetido a refluxo pelo tempo estipulado para cada ensaio (tempo de re-extração). Os filtrados foram reunidos e avolumados para 200 mL. Do extrato obtido foram retiradas alíquotas de 20 mL para realização da hidrólise. Os ensaios foram seguidos por, no mínimo, triplicata de hidrólise. As condições de hidrólise foram as mesmas para todos os ensaios (temperatura de 120 °C do banho, tempo de 4 h de refluxo e

volume de 30 mL de HCl 1,8 mol L⁻¹). As etapas seguintes, até análise da amostra em cromatógrafo, foram as mesmas que as descritas na Parte II do **item 3.6.2.1**. O esquema do procedimento é mostrado na **Figura 6**.

Tabela 2 – Ensaios realizados para avaliar a etapa de extração.

Ensaios*	Tempo (h)		Massa (mg)
	Extração	Re-Extração	
1a	1	2	399,64
1b	1	2	399,58
2a	2	2	399,61
2b	2	2	399,30
3a	4	2	399,47
3b	4	2	399,68
4	8	2	399,80
5	1	2	399,76
6	2	0	399,70
7	2	0,5	399,31
8	2	1	399,19
9	4	0	399,47

* a e b representam replicatas de extratos.

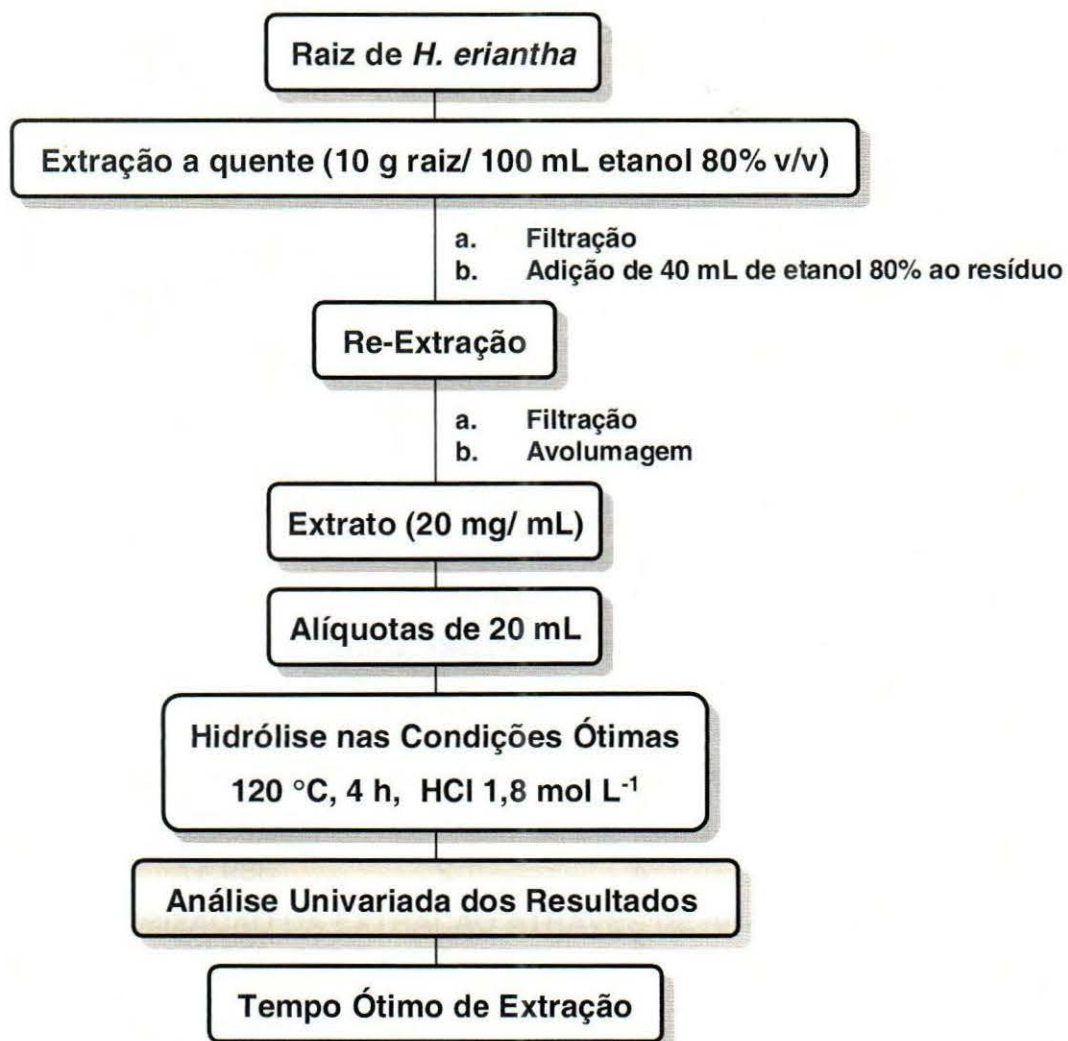


Figura 6. Esquema do experimento realizado para otimização da extração.

3.7. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

A validação do método cromatográfico desenvolvido para quantificação de ácido pífico total foi feita tomando como base as orientações da RE n° 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA, pelos seguintes parâmetros (Anvisa, 2003): especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação e exatidão.

3.7.1. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE

A seletividade do método foi confirmada através da análise por HPLC-DAD-APCI-MS. As condições cromatográficas e espectrométricas de análise foram descritas no **item 3.6.1.**

3.7.2. LINEARIDADE E INTERVALO

A curva analítica foi obtida através da análise em triplicata de 10 soluções de diferentes concentrações de padrão de ácido pífico em solvente: 0,80; 2,02; 4,04; 12,11; 20,18; 40,36; 80,72; 121,08; 201,80 e 282,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A partir da solução estoque de ácido pífico, preparada da forma como descrita no **item 3.5.**, foram feitas diluições com solução de metanol e ácido fórmico 0,1 % (80:20 v/v) para a obtenção das soluções empregadas na confecção da curva analítica.

3.7.3. LIMITES DE DETECÇÃO E DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção (LOD) foi obtido através da relação sinal/ruído igual a 3 para o pico de padrão de ácido pífico. Para tanto, concentrações decrescentes da solução padrão foram injetadas nas condições experimentais estabelecidas. O LOD foi expresso com base na concentração de ácido pífico na amostra. O limite de quantificação (LOQ) foi estabelecido da mesma maneira que o LOD, no entanto, considerando a relação sinal/ruído igual a 10.

3.7.4. PRECISÃO

Dez amostras de raiz B foram pesadas (cerca de 2 g) e submetidas à extração (2 etapas de 2 h cada, 40 mL de etanol 80 % v/v, banho de silicone a 100 °C, refluxo sob agitação magnética). De cada extrato obtido foi retirada uma alíquota de 20 mL, a qual foi seca em rotaevaporador e acrescida de 30 mL HCl 1,8 mol L⁻¹ para realização da hidrólise (4 h totais, banho a 120 °C). Após o tempo de refluxo, o conteúdo do balão foi resfriado e particionado duas vezes com acetato de etila na proporção de 1:1 (v/v). A fase orgânica foi reunida e seca. O resíduo foi dissolvido com solução de metanol e ácido fórmico 0,1 % (80:20 v/v). A solução resultante foi avolumada (25 mL), diluída (3:10 v/v) e filtrada em membrana de 0,22 µm, antes da análise em HPLC-DAD. Para determinação do teor de ácido pífico das amostras foi utilizada a padronização externa.

Sete amostras foram analisadas no dia 1 (precisão intra-dia) e três amostras foram analisadas no dia 2 (precisão inter-dia). As análises foram realizadas pelo mesmo analista, empregando a mesma instrumentação. As precisões foram expressas pelas estimativas dos desvios padrões relativos (DPR).

3.7.5. EXATIDÃO

Sete amostras de raiz C foram pesadas (cerca de 2 g) e submetidas ao mesmo preparo de amostra descrito no **item 3.7.4**. Para determinação do teor de ácido pífico das amostras, foi utilizada a padronização externa.

A média do conjunto de dados obtido foi comparada estatisticamente à média obtida pela análise de sete replicatas desse mesmo lote de raiz no CPQBA-Unicamp, por um método modificado, realizado por outro analista, em instrumentação diferente.

3.8. APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS

3.8.1. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS COMERCIAIS

Amostras de raízes pulverizadas de *H. eriantha* foram adquiridas em lojas de suplementos alimentares, ervanarias e/ou farmácias de manipulação, totalizando 4 distribuidores diferentes, localizados no Estado de São Paulo. As raízes dos distribuidores 1, 2 e 3 foram adquiridas no comércio da cidade de Campinas-SP, nas suas respectivas embalagens e em seus rótulos existiam informações sobre identificação da raiz, localização da empresa, farmacêutico responsável, entre outras. Somente a raiz do distribuidor 4 foi obtida a granel em farmácia de manipulação localizada também em Campinas-SP, juntamente com cópia de laudo fornecido pelo distribuidor. Os quatro distribuidores identificaram a planta como *Pfaffia paniculata*.

3.8.2. DESCRIÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO UTILIZADO

Cada amostra de raiz, adquirida de um distribuidor, foi analisada em triplicata. Cada replicata consistiu na pesagem de cerca de 2 g de raiz, transferência dessa massa para balão de fundo redondo (100 mL), acréscimo de 40 mL de etanol 80 % (v/v) e refluxo em banho de óleo de silicone por 2 h. Após o tempo de refluxo, o conteúdo do balão foi filtrado à vácuo em funil de placa sinterizada n° 2 e o resíduo acrescido de mais 40 mL de etanol 80 % (v/v), para realização de mais uma etapa extrativa por 2 h. Novamente, o conteúdo foi resfriado e filtrado. Os filtrados foram reunidos e avolumados para 200 mL com etanol 80 % (v/v). A seguir, uma alíquota de 20 mL desse extrato hidroalcoólico foi retirada e colocada em novo balão de fundo

redondo, para secagem em rotaevaporador. O resíduo seco foi acrescido de 30 mL de HCl 1,8 mol L⁻¹ e submetido à hidrólise por 4 h em banho de óleo a 120 °C. Após o tempo de hidrólise, o conteúdo do balão foi resfriado e particionado duas vezes com acetato de etila na proporção de 1:1 (v/v). A fase orgânica foi reunida e seca. O resíduo foi dissolvido com solução de metanol e ácido fórmico 0,1 % (80:20 v/v). A solução resultante foi avolumada (25 mL), diluída (3:10 v/v) e filtrada em membrana de 0,22 µm, antes da análise em cromatógrafo. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna Symmetry C-18 (75 x 4,6 mm, 3,5 µm), temperatura do forno a 35 °C; eluentes ácido fórmico 0,1 % v/v (A) e metanol (B), eluição isocrática a 18 % de A e 82 % de B (v/v), volume de injeção de 20 µL, leitura a 205 nm.

3.9. PERDA POR DESSECAÇÃO

O método gravimétrico (dessecação) foi empregado para avaliar a perda de água e voláteis pelas amostras de raízes de *H. eriantha* pulverizadas. Foram submetidas ao procedimento, em triplicata, as amostras pertencentes aos lotes B e C, coletadas no CPQBA-Unicamp, e as amostras comerciais. Para tanto, cerca de 1 g de amostra exatamente pesada foi transferida para pesa-filtro tarado. Para dessecação da amostra, o pesa-filtro foi colocado na estufa por 12 h a 105 °C. Após resfriamento à temperatura ambiente sob vácuo em dessecador, o pesa-filtro contendo a amostra foi pesado. A operação foi repetida até que a diferença entre as massas provenientes de duas pesagens sucessivas fosse no máximo de 5 mg.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

As raízes de *H. eriantha* passaram por algumas etapas desde a coleta até a pulverização, de forma que se obtivesse um material homogêneo. Após a coleta, as raízes foram lavadas, fragmentadas com tesoura de jardim, trituradas em processador doméstico, secas em estufa e, finalmente, pulverizadas em moinho de facas. Esta redução do material anteriormente à pulverização foi necessária, uma vez que ensaios preliminares demonstraram que as raízes tornam-se muito resistentes após a secagem, dificultando a pulverização direta e até provocando danos ao equipamento e à amostra (devido ao aquecimento excessivo do moinho). Na **Figura 7** são mostradas as raízes laterais de *H. eriantha*, relativamente finas e fáceis de serem fragmentadas após a coleta, quando ainda não foram submetidas à secagem.



Figura 7. Etapas do processamento das raízes de *H. eriantha*. A) raízes laterais recém-coletadas, B) fragmentação com tesoura, C) aspecto das raízes após trituração em processador doméstico.

4.2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDO PFÁFFICO TOTAL

4.2.1. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS E ESPECTROMÉTRICAS

O método selecionado para a quantificação de ácido pfáffico nas raízes foi a cromatografia líquida com dois sistemas de detecção: arranjo de fotodiodos e espectrômetro de massas.

O ácido pfáffico, por apresentar apenas um grupo carbonila e uma ligação isolada com elétrons π em sua estrutura, não apresenta alta absorvância da radiação na região do ultravioleta (UV). Dessa forma, o detector por arranjo de fotodiodos (DAD) não é, a princípio, a opção mais adequada para a detecção de baixas concentrações de ácido pfáffico. Considerando o problema analítico, o espectrômetro de massas (MS) seria a opção mais adequada como sistema de detecção, uma vez que este apresenta boa detectabilidade e alta seletividade quando operado no modo SIM, permitindo a quantificação de picos sobrepostos, a avaliação da pureza do pico e confirmação da presença do analito mediante informação de massa molar (Collins *et al.*, 2006).

Embora o espectrômetro de massas possua todas estas vantagens, o detector DAD também foi empregado, devido ao custo mais baixo e maior facilidade de operação em relação ao espectrômetro de massas e, principalmente, por ser o detector mais utilizado em análises presentes nas farmacopeias e monografias.

Durante as corridas cromatográficas o sinal foi monitorado a 205 nm. Esta é uma região do UV em que a seletividade pode ser prejudicada. Entretanto, considerando que a raiz é uma matriz menos complexa do que outras partes do vegetal, como as folhas (que apresentam grande quantidade de compostos graxos),

foi possível através da otimização das etapas de extração e hidrólise das saponinas, reduzir o número de interferentes, possibilitando a análise nesta região do UV. O emprego do detector de massas teve como principal finalidade a confirmação de identidade.

Para a separação cromatográfica, colunas C-18 Symmetry (Waters) de duas dimensões diferentes foram utilizadas no cromatógrafo. Quando foi empregada a fonte ESI, foi utilizada a coluna de 2,1 x 100 mm e para a fonte APCI, uma coluna de 4,6 x 75 mm. Isto permitiu trabalhar com vazões mais adequadas para os dois tipos de ionização, ou seja, vazões mais baixas para a fonte ESI ($0,25 \text{ mL min}^{-1}$) e vazões mais altas para a fonte APCI ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$).

Na eluição por fase reversa do ácido pfáffico, o uso de um eluente ácido é requerido para fornecer um pico estreito e simétrico obtido pelo deslocamento do equilíbrio para a forma não ionizada do analito, permitindo uma maior interação com a fase estacionária C-18. Como o espectrômetro de massas foi empregado, eluentes voláteis foram requeridos e, dessa forma, optou-se pelo emprego do ácido fórmico.

Primeiramente, soluções padrão de ácido pfáffico foram infundidas no espectrômetro de massas, em modo combinado, para definição dos parâmetros mais adequados de ionização do analito. A seguir, estas soluções padrão foram analisadas no cromatógrafo, sendo o analito detectado em série pelos detectores DAD e MS acoplados.

Inicialmente a fonte ESI foi testada no modo negativo, utilizando como fase móvel solução de ácido fórmico 0,1 % (v/v) e metanol. Foi obtido o sinal em m/z 439 referente à molécula de ácido pfáffico desprotonada $[M-H]^-$, mas o pico não foi simétrico no modo SIM, conforme mostrado na **Figura 8**. No modo positivo, a ionização por ESI não produziu sinal.

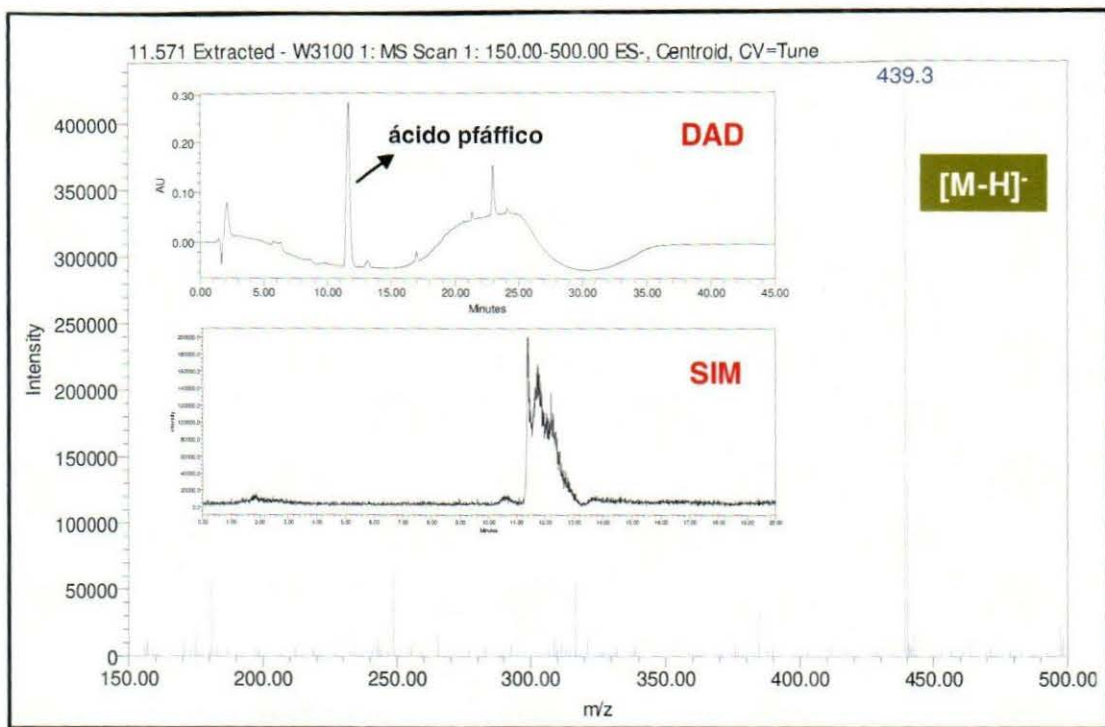


Figura 8. Cromatograma e espectros de massas obtidos na análise por HPLC-DAD-ESI-MS (modo negativo) de solução padrão de ácido pfáffico ($164 \mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC: coluna Symmetry ($2,1 \times 100 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A) e metanol (B); eluição por gradiente: de A:B 35:65 v/v para A:B 20:80 (v/v) de 0 a 5 min, mantendo A:B 20:80 v/v de 5 a 10 min e para A:B 0:100 v/v de 10 a 15 min; vazão: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ : 205 nm (DAD). MS: 1,17 kV (capilar), -70 V (cone) e -2 V (extrator), vazão de gás: 450 L h^{-1} , temperatura da sonda: $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

O solvente metanol foi substituído por acetonitrila (mantendo-se a mesma polaridade da fase móvel), resultando também no íon de m/z 439, correspondente à molécula desprotonada $[\text{M-H}]^{-}$, mas novamente o pico no modo SIM (modo negativo) foi assimétrico, conforme mostrado na **Figura 9**.

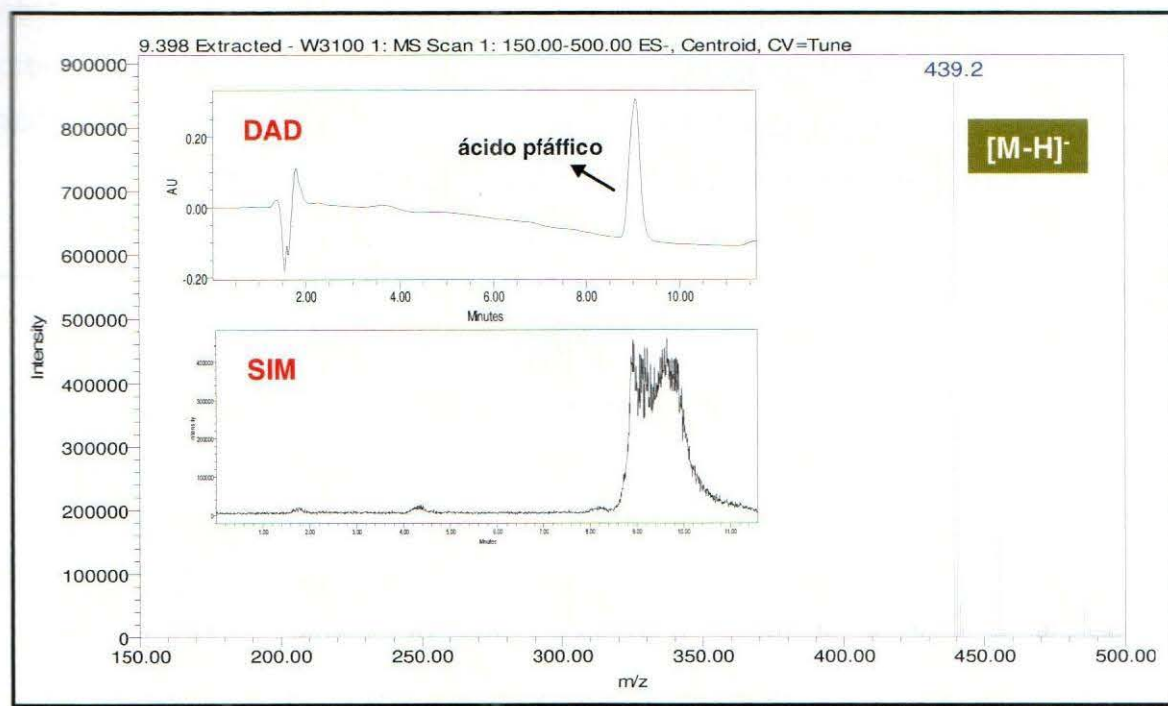


Figura 9. Cromatograma e espectros de massas obtidos na análise por HPLC-DAD-ESI-MS (modo negativo) do padrão de ácido pirúvico ($164 \mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC: coluna Symmetry ($2,1 \times 100 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico $0,1 \%$ (A) e acetonitrila (B); eluição por gradiente: de A:B $47:53 \text{ v/v}$ para A:B $35:65 \text{ v/v}$ de 0 a 5 min, mantendo A:B $35:65 \text{ v/v}$ de 5 a 10 min e para A:B $0:100 \text{ v/v}$ de 10 a 15 min; vazão: $0,25 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ : 205 nm (DAD). MS: $2,00 \text{ kV}$ (capilar), -90 V (cone) e -3 V (extrator); vazão de gás: 500 L h^{-1} , temperatura da sonda: $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

De modo semelhante ao que ocorreu utilizando-se metanol, não houve sinal empregando-se ESI no modo positivo e acetonitrila.

Uma vez que não foi verificada a presença de interferentes nos cromatogramas, foi avaliada a eluição isocrática. Desse modo, foi testada a fonte APCI com eluição isocrática com solução de ácido fórmico $0,1\%$ e metanol, resultando, no modo positivo, no íon de m/z 423 relativo ao composto desidratado $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ e, no modo

negativo, no íon $[M-H]^-$ de m/z 439 (**Figuras 10 e 11**, respectivamente). A perda de água da molécula de ácido pífico pode ser atribuída à presença de uma hidroxila com função álcool, que é desidratada com maior facilidade. Resultados semelhantes foram obtidos quando acetonitrila foi utilizada no lugar de metanol.

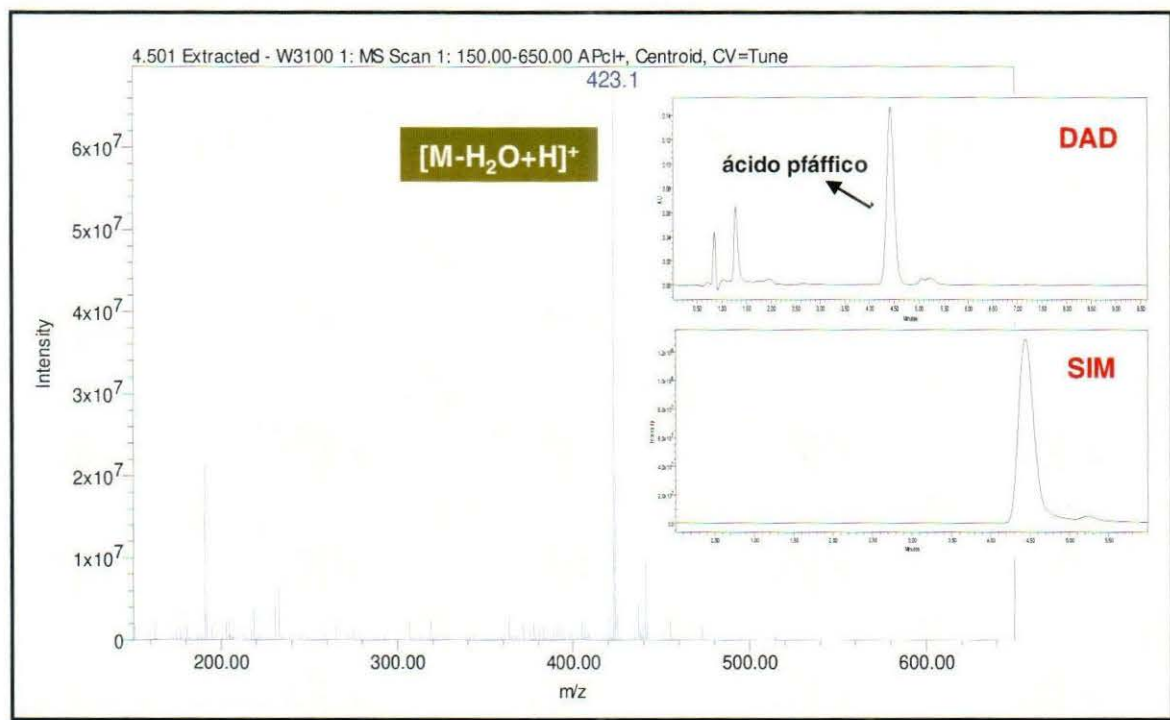


Figura 10. Cromatograma e espectros de massas obtidos na análise por HPLC-DAD-APCI-MS (modo positivo) do padrão de ácido pífico ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC: coluna Symmetry ($4,6 \times 75 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico $0,1 \%$ (A): metanol (B) ($15:85 \text{ v/v}$); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ : 205 nm (DAD). MS: $5 \mu\text{A}$ (corona), -30 V (cone) e -2 V (extrator), vazão de gás: 450 L h^{-1} , temperatura da sonda: $450 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

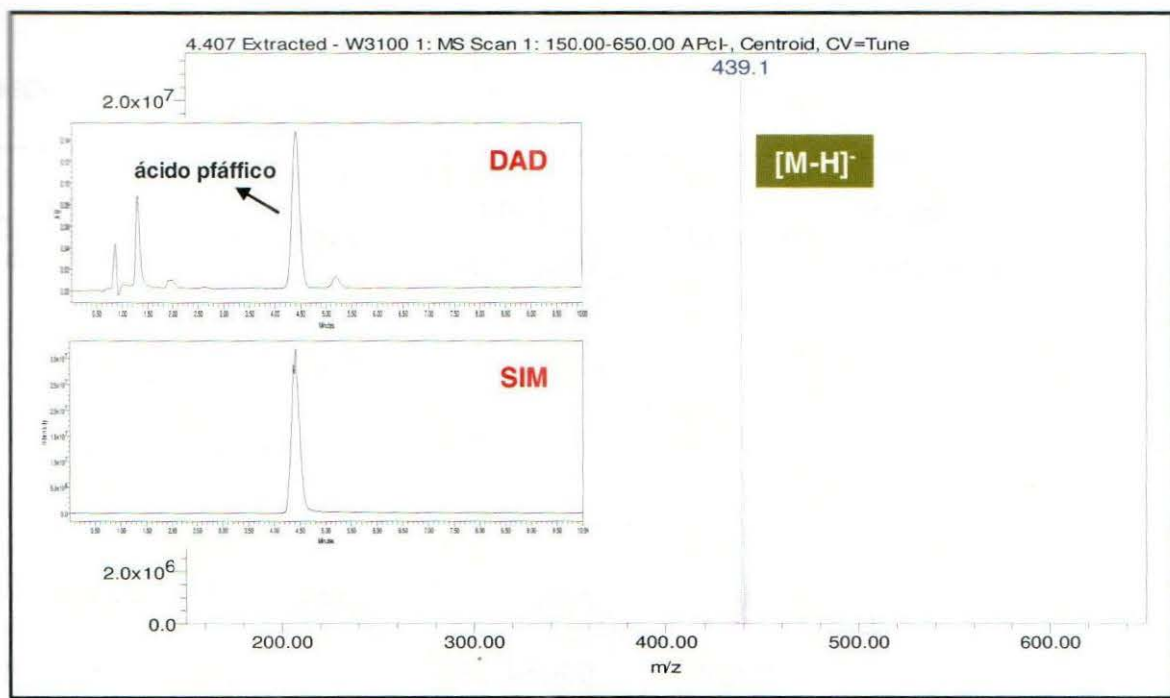


Figura 11. Cromatograma e espectros de massas obtidos na análise por HPLC-DAD APCI-MS (modo negativo) do padrão de ácido pífico ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$). HPLC: coluna Symmetry ($4,6 \times 75 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico $0,1 \%$ (A): móvel metanol (B) ($15:85 \text{ v/v}$); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ 205 nm (DAD). MS: $3 \mu\text{A}$ (corona), -50 V (cone) e -3 V (extrator), vazão de gás: 300 L h^{-1} , temperatura da sonda: $450 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Dessa forma, os resultados obtidos com a fonte APCI, em especial no modo negativo, foram mais satisfatórios do que os obtidos com ESI. O pico do analito foi simétrico e mais intenso quando comparado aos testes em ESI. A **Tabela 3** resume os resultados obtidos com o uso das fontes ESI e APCI.

Tabela 3 – Ensaios realizados com as interfaces ESI e APCI.

	Modo de operação*	Solvente**	Íons detectados	Pico no espectro de MS	Relação sinal /ruído
ESI	+	MeOH	---	---	---
	-	MeOH	$[M-H]^-$ m/z 439	assimétrico	baixa
	+	ACN	---	---	---
	-	ACN	$[M-H]^-$ m/z 439	assimétrico	baixa
APCI	+	MeOH	$[M-H_2O+H]^+$	simétrico	alta
	-	MeOH	$[M-H]^-$ m/z 439	simétrico	alta
	+	ACN	---	simétrico	---
	-	ACN	$[M-H]^-$ m/z 439	simétrico	alta

* o sinal + indica modo de operação positivo da fonte de ionização e o sinal – indica o modo de operação negativo.

** solvente que compõe a fase móvel juntamente a solução de ácido fórmico 0,1 % (v/v).

Dessa forma, foram estabelecidas as condições cromatográficas e espectrométricas de análise do analito:

Cromatógrafo:

- coluna: Symmetry C-18 (75 x 4,6 mm, 3,5 μm);
- temperatura do forno: 35 $^{\circ}\text{C}$;
- eluentes: solução de ácido fórmico 0,1 % v/v (A) e metanol (B);
- eluição isocrática: 18 % de A e 82 % de B;
- volume de injeção: 20 μL
- λ : 205 nm.

Espectrômetro de massas com fonte APCI, operando no modo negativo:

- corona: 3 μA , cone: -50 V, extrator: -3 V;
- temperaturas: sonda: 450 $^{\circ}\text{C}$, fonte: 120 $^{\circ}\text{C}$;
- vazões de gás: dessolvatação 450 L h^{-1} , contrafluxo (cone) 50 L h^{-1} ;
- modo SIM, seleção de m/z 439,7 (casa decimal acertada conforme calibração do equipamento).

A escolha pelo emprego do solvente metanol ocorreu devido ao elevado custo e maior toxicidade da acetonitrila, visto que seus desempenhos analíticos foram equivalentes.

Uma vez otimizadas as condições cromatográficas, foram construídas curvas analíticas por padronização externa, usando os dois detectores (DAD e MS) em série. As curvas analíticas, os respectivos gráficos de resíduos e as equações das retas estão apresentados na **Figura 12**.

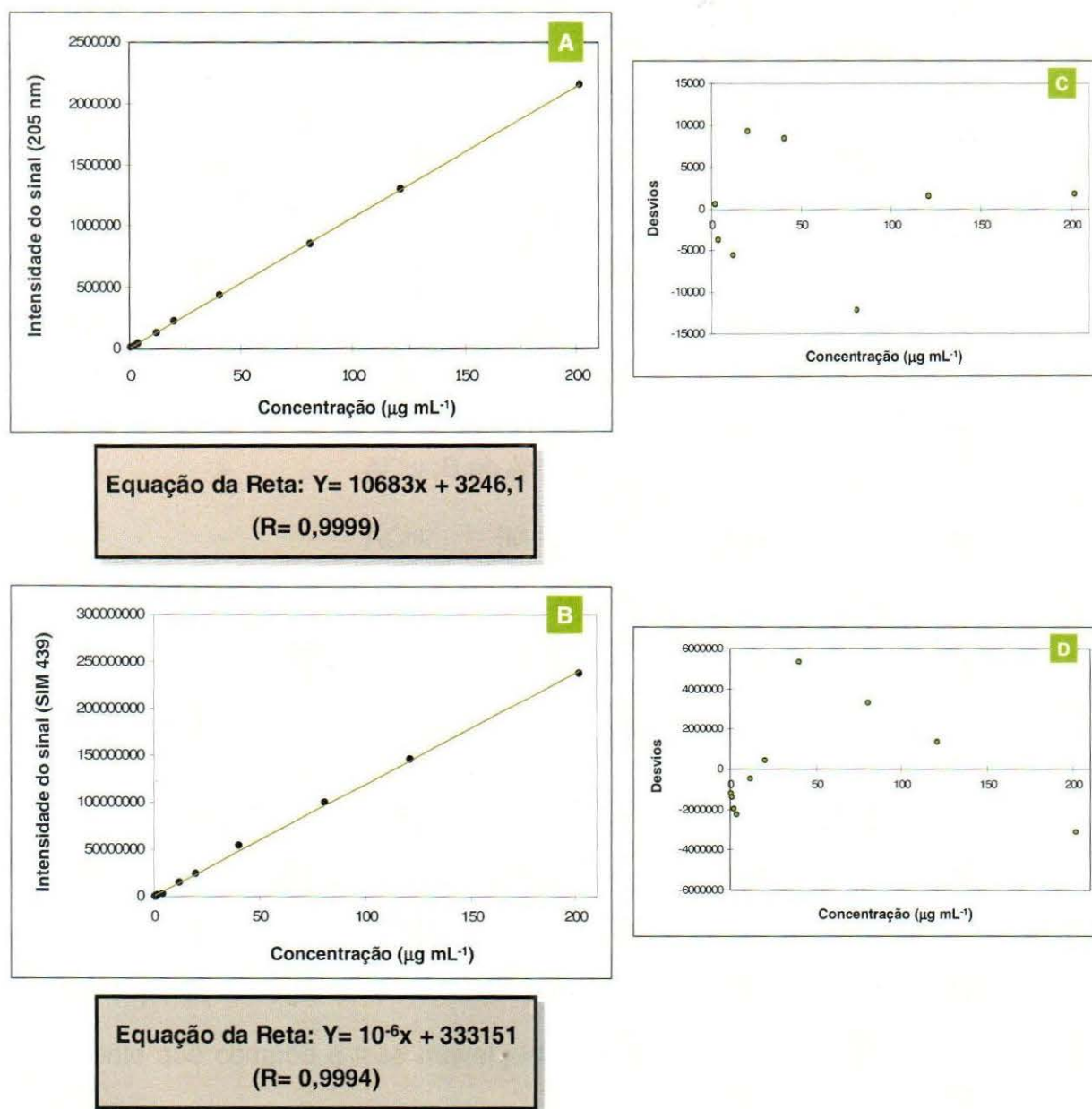


Figura 12. Curvas analíticas obtidas por HPLC-DAD-APCI-MS: A) Curva construída a partir da detecção em DAD ($\lambda = 205 \text{ nm}$); B) Curva construída a partir da detecção em MS, modo SIM ($m/z = 439$). Abaixo de cada curva encontra-se o respectivo gráfico de resíduos: C) Gráfico de resíduos da curva A. D) Gráfico de resíduos da curva B.

Os desvios mostrados no eixo y dos gráficos C e D representam as diferenças entre os valores das áreas reais e os valores das áreas teóricas (desvios absolutos).

4.2.2. ESTABELECIMENTO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DA AMOSTRA

O ácido pfáffico pode estar presente nas raízes de *H. eriantha* na forma livre ou glicosilada. Dessa forma, para a obtenção do ácido pfáffico total da raiz é necessário extrair o ácido livre juntamente com as formas glicosiladas (saponinas) e, a seguir, realizar a etapa de hidrólise para “quebra” das saponinas.

Primeiramente, foi empregado um planejamento experimental do tipo “composto central” para o estabelecimento das melhores condições de hidrólise das saponinas.

O uso do planejamento experimental para otimização de processos representa um recurso eficiente, pois reduz significativamente o número de ensaios, identifica as variáveis significativas na resposta, reconhece a existência de interação entre as variáveis (o que não é possível pelo estudo univariado) e permite estabelecer as melhores condições experimentais.

Como o planejamento foi realizado no intuito de otimizar apenas as condições de hidrólise, todos os ensaios partiram de alíquotas de um mesmo extrato inicial. Foram avaliados os efeitos de três variáveis no teor de ácido pfáffico total (% m/m) da raiz de *H. eriantha*: temperatura do banho de silicone (faixa de 90 a 140 °C), tempo de refluxo (faixa de 1,5 a 4,5 h) e concentração de ácido clorídrico (HCl) empregada (faixa de 1,0 a 2,0 mol L⁻¹). A seleção da faixa de valores estudados para cada variável contou com testes preliminares. Valores muito baixos em relação aos limites inferiores da cada faixa levaram a hidrólises incompletas das saponinas da amostra e, conseqüentemente, a baixos teores de ácido pfáffico total. Por outro lado, valores muito altos em relação aos limites superiores de cada faixa promoveram carbonização da amostra e, possivelmente, degradação do ácido

pfáffico liberado, levando novamente a baixos teores. Os testes preliminares foram úteis também na previsão do bom andamento prático-experimental. Por exemplo, no planejamento composto central é sugerida a realização de pelo menos três replicatas do ponto central, que é um ensaio com valores médios das faixas propostas para cada variável. Um grande desvio relativo entre estas replicatas pode indicar erros do analista ao repetir o procedimento ou mesmo que há problemas nos valores médios propostos nas faixas das variáveis. Através dos testes preliminares, foi determinada a temperatura mínima do banho de silicone para que a suspensão ácida entrasse em ebulição: 115 °C. Desse modo, os pontos centrais (como são chamadas as replicatas) deveriam ter no mínimo 115 °C, garantindo uma condição de fácil reprodução e teor adequado de ácido pfáffico.

No caso específico da temperatura, o limite superior da faixa escolhida deve pressupor uma extrapolação pelo Software ao confeccionar a tabela de ensaios (a extrapolação ocorre nas faixas de todas as variáveis estudadas). Assim, os testes preliminares estabeleceram um limite superior de cerca de 150 °C nos ensaios, visto que acima disso há limitações quanto ao aquecimento do óleo de silicone (necessidade de chapas e termômetros especiais) e das amostras (passam a borbulhar excessivamente, subindo pelo condensador).

Os teores de ácido obtidos através do planejamento são mostrados na **Tabela**

4.

Tabela 4 – Teores obtidos nos ensaios do planejamento experimental 2³ para otimização da hidrólise.

Ensaio	Variáveis			Teor de ácido p-fáltico total (% m/m)**
	Temperatura (°C)	Tempo (h)	HCl (mol L ⁻¹)	
1	90	1,5	1,0	0,29
2	90	1,5	2,0	0,91
3	90	4,5	1,0	0,67
4	90	4,5	2,0	1,74
5	140	1,5	1,0	1,10
6	140	1,5	2,0	2,00
7	140	4,5	1,0	1,99
8	140	4,5	2,0	2,34
9	73	3,0	1,5	0,22
10	157	3,0	1,5	2,01
11	115	0,5	1,5	1,34
12	115	5,5	1,5	2,53
13	115	3,0	0,7	1,16
14	115	3,0	2,3	2,07
15 (C)*	115	3,0	1,5	2,28
16 (C)*	115	3,0	1,5	2,38
17 (C)*	115	3,0	1,5	2,43

*C = replicatas do ponto central.

** Teores calculados em base úmida

Os maiores teores de ácido pífico foram obtidos nos pontos centrais.

A análise de regressão realizada através do Software Statistica foi altamente significativo ($p < 0,05$), com um coeficiente de determinação satisfatório ($R^2 = 0,97477$), ou seja, o modelo de regressão teve baixa dispersão dos resultados, conforme mostrado na **Figura 13**.

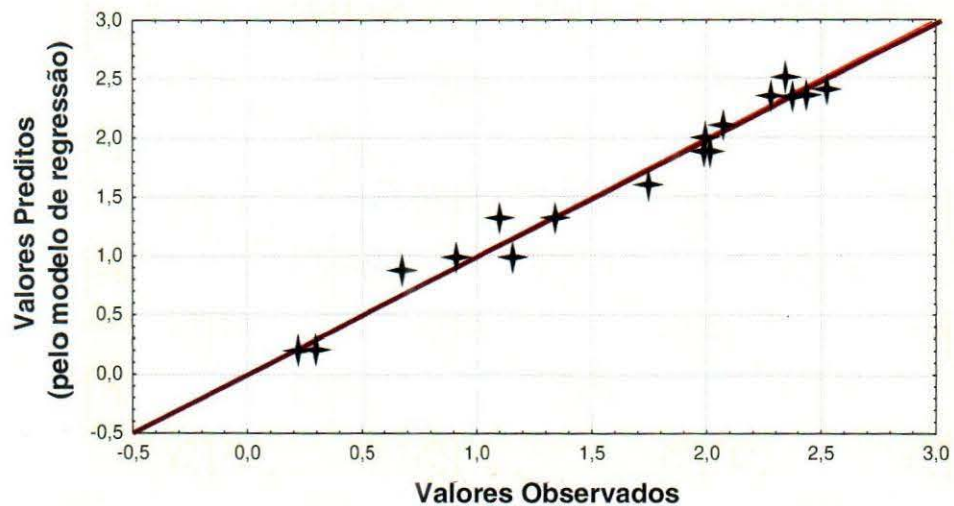


Figura 13. Gráfico dos valores observados (experimentais) *versus* os valores preditos pelo modelo de regressão do Software ($R^2 = 0,97477$).

Os dados da análise de variância foram fornecidos pelo Software Statistica e são mostrados na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Análise de variância da resposta (teor de ácido pífico total).

Fonte de Variação	(SQ) ¹	(gl) ¹	(MQ) ¹	F _{calc} ¹	F _{tab} ¹
Regressão (R) ³	9,125	9	1,014	30,05	3,68
Resíduos (r) ³	0,236	7	0,034	(MQR/MQr)	(F _{9,7})
Falta de Ajuste (faj) ³	0,225	5	0,045	7,70	19,30
Erro Puro (ep) ²	0,012	2	0,006	(MQfaj/MQep)	(F _{5,2})
Total ²	9,362	16			

¹ SQ = Soma Quadrática, gl = Graus de Liberdade, MQ = Média Quadrática, F_{calc} = F calculado, F_{tab} = F tabelado;

² Valores fornecidos pelo Software Statistica;

³ Valores deduzidos a partir da relação: Total = R + r; onde r = faj + ep.

O valor da relação MQR/MQr (30,05) foi maior que o valor de F tabelado (F_{9,7} = 3,68), indicando que a regressão é estatisticamente significativa ao nível de confiança escolhido, nesse caso $p < 0,05$. A relação MQfaj/MQep (7,70) foi menor que o valor de F tabelado (F_{5,2} = 19,30), mostrando não haver falta de ajuste do modelo matemático aos dados experimentais. Dessa forma, as superfícies de resposta puderam ser obtidas e são mostradas nas **Figuras 14 e 15**.

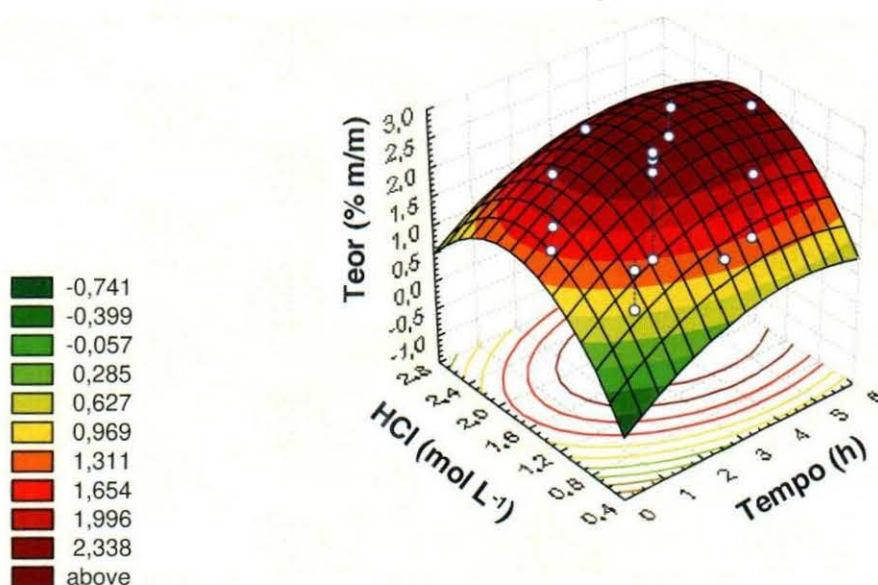


Figura 14. Efeito das variáveis tempo e concentração de HCl no teor de ácido pífico total (temperatura de 120 °C).

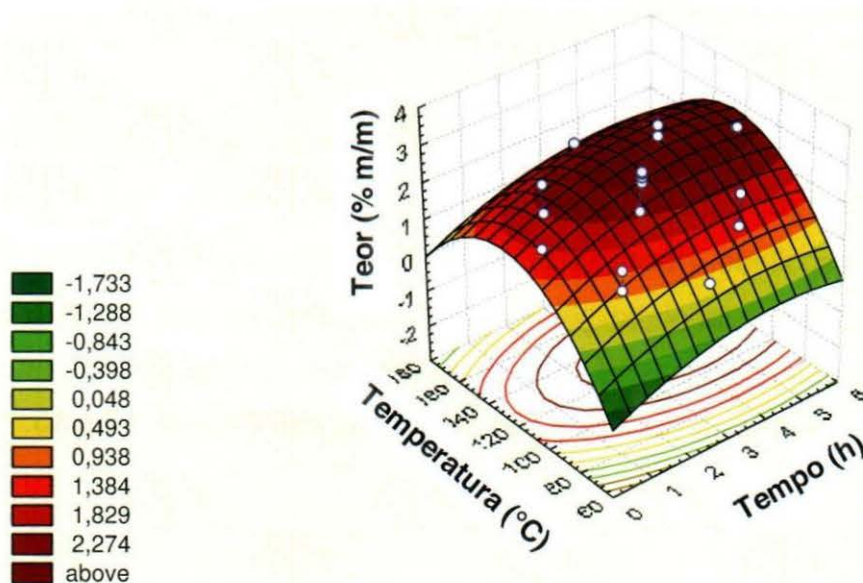


Figura 15. Efeito das variáveis tempo e temperatura no teor de ácido pífico total (concentração de HCl 1,8 mol L⁻¹).

Usando os coeficientes de regressão fornecidos pelo Software, a equação que descreve o modelo de regressão foi determinada:

$$Y = -15,6539 + 0,1991 x_1 + 0,7125 x_2 + 4,7212 x_3 - 0,0008 x_1^2 - 0,0797 x_2^2 - 1,1702 x_3^2 + 0,0001 x_1 x_2 - 0,0044 x_1 x_3 - 0,0167 x_2 x_3$$

Onde: y = teor de ácido pfáffico (% m/m), x_1 = temperatura (do banho), x_2 = tempo (de refluxo) e x_3 = concentração de ácido (HCl)

A derivada da equação permite predizer o teor máximo de ácido pfáffico sob as seguintes condições: temperatura de 120 °C, tempo de 4,36 h e HCl 1,8 mol L⁻¹.

Os coeficientes positivos para x_1 , x_2 e x_3 indicam efeitos lineares no aumento de y. Como x_3 é o coeficiente mais positivo pode-se afirmar que a concentração de HCl é o fator mais importante na etapa de hidrólise, ao passo que a temperatura do banho e o tempo de refluxo possuem efeitos menos significativos no teor de ácido pfáffico.

Partindo-se das condições ótimas de hidrólise encontradas, buscou-se então otimizar a etapa de extração da raiz numa análise univariada. Os teores médios de ácido pfáffico para diferentes tempos de extração e re-extração são mostrados na **Tabela 6**. Os teores de cada replicata são apresentados nos **Anexos 4 e 5**.

Considerando-se os ensaios de 1 a 4, nos quais se manteve fixo em 2 h o tempo de re-extração, a comparação entre as médias mostrou que a extração de 3 h totais (2,8 % m/m) levou a um menor teor de ácido pfáffico em relação às demais extrações. As extrações de 4 h, 6 h e 10 h totais levaram a um mesmo teor médio, respectivamente, 3,4 %, 3,3 % e 3,3 % (m/m) e as diferenças entre eles são devidas apenas a erros aleatórios.

Os ensaios de 5 a 8 mostraram, primeiramente, que a extração não pode ser realizada em etapa única de 4 h (2,9 % m/m), possivelmente pela saturação do

solvente na primeira etapa extrativa, ou seja, é necessária a re-extração com solvente novo. Isso é reforçado pelo resultado do ensaio 5, com extração em etapa única de 2 h (2,1 % m/m). A diminuição do tempo da etapa de re-extração para 30 min (3,5 % m/m) ou 1 h (3,3 % m/m), não modificou significativamente o teor de ácido pífico. Entretanto, devido ao menor número de replicatas realizadas, optou-se pela escolha do tempo de re-extração em 2 h.

Estabeleceu-se assim, as melhores condições de extração e hidrólise da raiz de *H. eriantha*:

Extração: 4 h totais (2 h seguida de re-extração por 2 h), etanol 80% (v/v)

Hidrólise: 4,36 h, 120°C, HCl 1,8 mol L⁻¹

Tabela 6 – Teores obtidos nos ensaios para otimização da extração através de análise univariada.

Ensaio	n*	Tempo de extração (h)	Tempo de re-extração (h)	Teor de ácido pífico total (% m/m)**
1	6	1	2	2,8 ± 0,1
2	6	2	2	3,4 ± 0,1
3	6	4	2	3,3 ± 0,2
4	4	8	2	3,3 ± 0,1
5	3	2	0	2,1 ± 0,2
6	3	2	0,5	3,5 ± 0,3
7	3	2	1	3,3 ± 0,2
8	3	4	0	2,9 ± 0,4

* n = número de replicatas (ensaio de 1 a 4 → 2 extratos hidroalcoólicos por ensaio, seguidos por triplicata de hidrólise; ensaios 3 a 8 → 1 extrato hidroalcoólico por ensaio, seguidos por, no mínimo, triplicata de hidrólise);

** Teores calculados em base úmida e expressos na forma de intervalo de confiança a 95 %, considerando-se a distribuição t de Student.

4.3. VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

No caso de metodologia analítica não descrita em farmacopéias ou formulários oficiais devidamente reconhecidos pela ANVISA (*caso da espécie *H. eriantha**), a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados os seguintes parâmetros: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, precisão, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e robustez (Anvisa, 2003). A finalidade do

método a ser validado é quantificar o ácido pífico em amostras de raízes pulverizadas de *H. eriantha*.

4.3.1. CONFORMIDADE DO SISTEMA

Antes da validação do método, foi avaliada a conformidade do sistema cromatográfico através dos parâmetros indicados na **Tabela 7**. Os cálculos dos parâmetros de conformidade foram realizados considerando-se o pico cromatográfico de padrão de ácido pífico $83,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ mostrado na **Figura 16**. O pico ampliado é mostrado no **Anexo 6**.

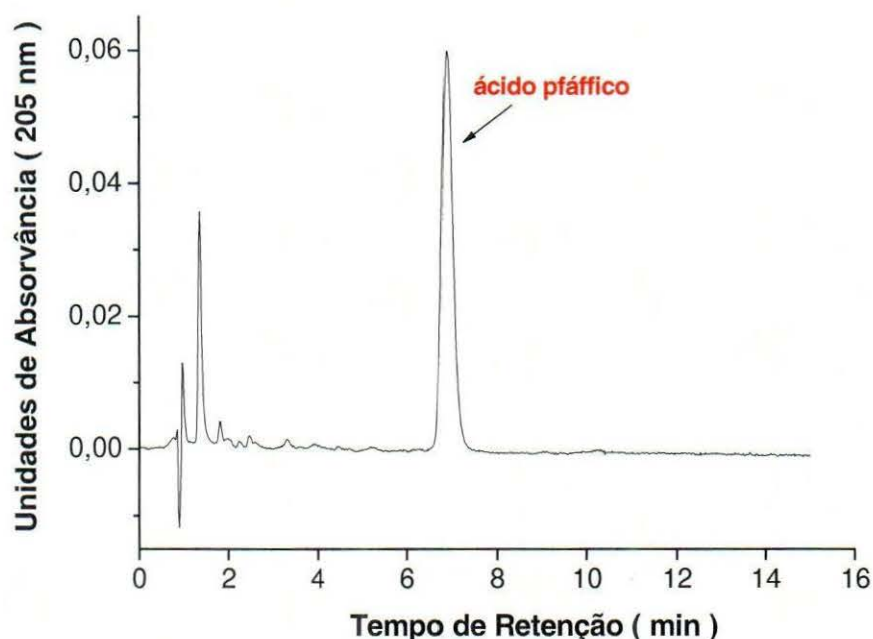


Figura 16. Cromatograma obtido na análise do padrão de ácido pífico ($83,36 \mu\text{g mL}^{-1}$) em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry ($4,6 \times 75 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A): móvel metanol (B) (18:82 v/v); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ : 205 nm (DAD).

Tabela 7– Parâmetros de conformidade avaliados.

PARÂMETRO AVALIADO	VALOR ENCONTRADO	RECOMENDAÇÃO*
Fator de assimetria (As)	1,21	----
Fator de alargamento (TF)	1,11	$TF \leq 2$
Número de pratos (N)	3040	$N > 2000$ para HPLC
Número de pratos efetivos (N_{eff})	2724	---

* De acordo com a US-FDA.

Foram utilizadas as recomendações do guia de validação da FDA, pois a RE 899 da ANVISA não apresenta especificações em relação à conformidade, por considerá-la uma etapa prévia ao processo de validação.

O fator de assimetria, com valor próximo a 1, mostra que o pico é bastante simétrico. Embora haja pequena distorção posterior (cauda), o fator de alargamento também está próximo de 1 e abaixo do valor considerado aceito ($TF \leq 2$).

O número de pratos (N) e o número de pratos efetivos (N_{eff}) foram calculados considerando-se a largura do pico na meia altura e indicam uma separação cromatográfica eficiente. Quando se considera a largura da base do pico, valores um pouco menores são obtidos ($N = 2925$ e $N_{\text{eff}} = 2622$), mas ainda sim dentro das especificações.

Não foram calculados parâmetros relacionados à separação entre picos adjacentes nas amostras analisadas, como o fator de separação (α) e a resolução (R_s), pois a separação entre eles é visualmente completa, conforme mostrado na **Figura 17** e dependerá da matriz da amostra.

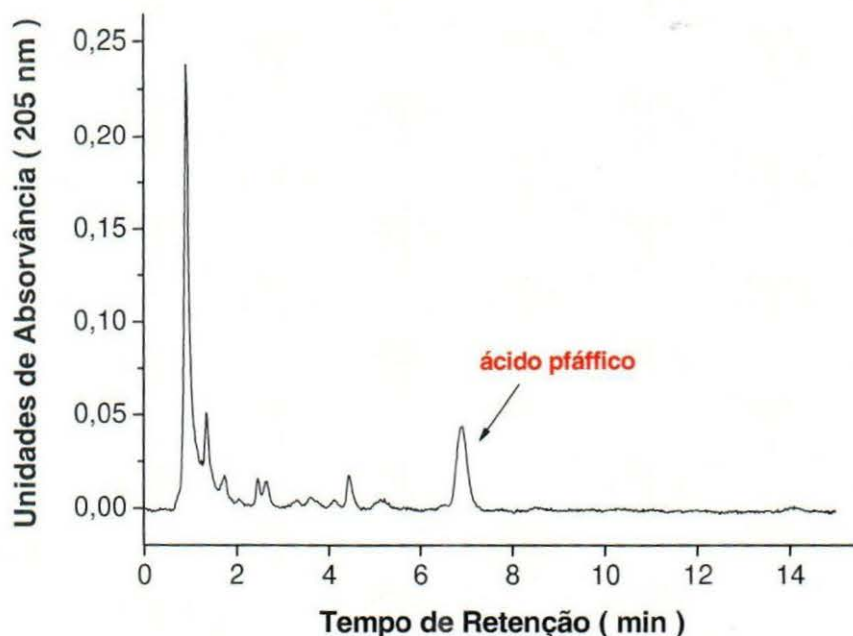


Figura 17. Cromatograma obtido na análise de amostra de raiz B ($53,24 \mu\text{g mL}^{-1}$) em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry ($4,6 \times 75 \text{ mm}$, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A): móvel metanol (B) (18:82 v/v); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ : 205 nm (DAD).

4.3.2. LINEARIDADE E INTERVALO

A curva analítica no solvente (mostrada na **Figura 18**) foi obtida através da análise em triplicata de 10 soluções de diferentes concentrações de padrão de ácido pfáffico. As áreas correspondentes a cada concentração são apresentadas no **Anexo 7**. O coeficiente de correlação (r) obtido foi de 0,9999 e atende ao critério mínimo aceitável da RE n° 899 da ANVISA ($r = 0,99$).

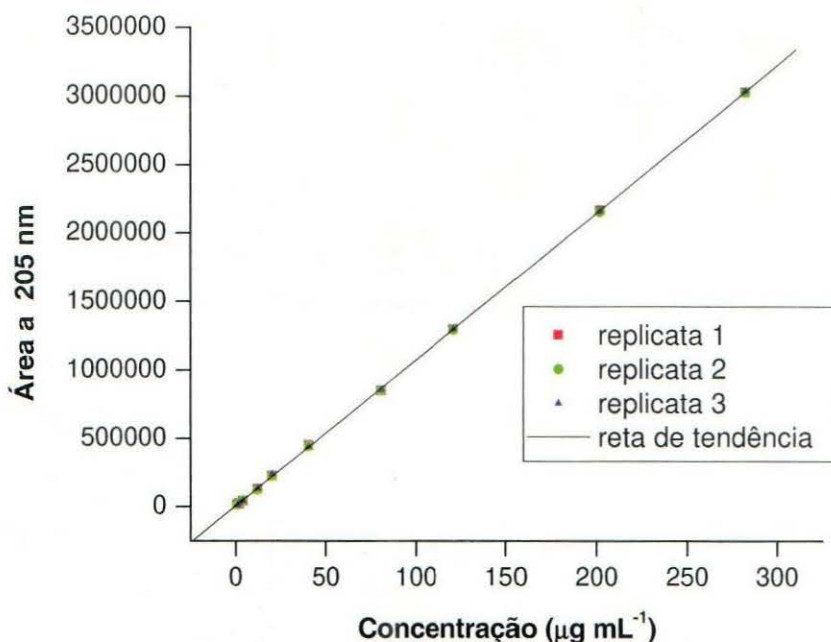


Figura 18. Curva analítica obtida pela análise em triplicata de 10 soluções de diferentes concentrações de padrão de ácido pífico em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry (4,6 x 75 mm, 3,5 µm, Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A): móvel metanol (B) (18:82 v/v); eluição isocrática; vazão: 1,00 mL min⁻¹; volume de injeção: 20 µL, λ: 205 nm (DAD).

O gráfico de resíduos é apresentado na **Figura 19**. Os desvios mostrados no eixo y representam as diferenças entre os valores das áreas reais (obtidos através da leitura em 205 nm, em triplicata, para cada solução de diferente concentração) e os valores das áreas teóricas (calculadas através da equação da reta de tendência: $y = 10713 x + 2166,5$, onde y = área a 205 nm e x = concentração da solução em µg mL⁻¹).

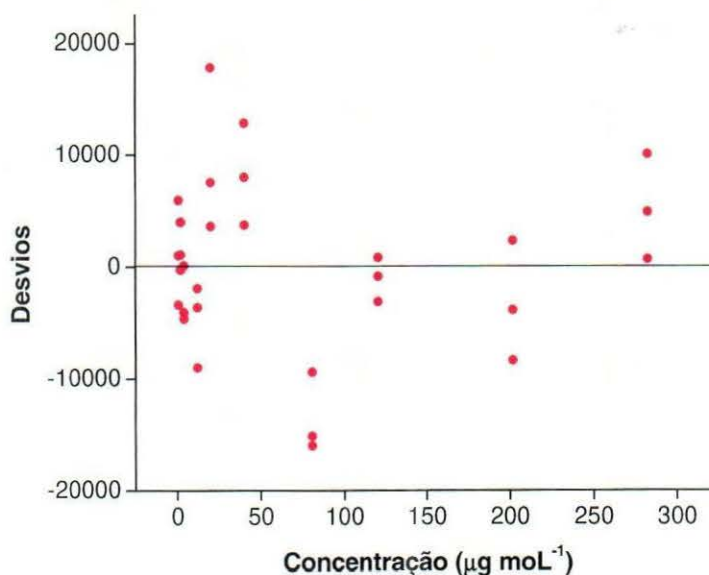


Figura 19. Gráfico de resíduos obtido pela análise em triplicata de diferentes concentrações de padrão de ácido pífico em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry (4,6 x 75 mm, 3,5 μm , Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A): móvel metanol (B) (18:82 v/v); eluição isocrática; vazão: 1,00 mL min⁻¹; volume de injeção: 20 μL , λ : 205 nm (DAD).

O coeficiente de correlação, assim como a distribuição de resíduos, com pontos acima e abaixo da reta, sem tendências, indicam a linearidade no intervalo estudado de 0,80 a 282,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o que corresponde a 0,04 % - 12,8 % (m/m) de ácido pífico na raiz de *H. eriantha*.

4.3.3. LIMITES DE DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO

Foi obtido um limite de detecção (LOD) de 0,01 % (m/m) de ácido pífico e um limite de quantificação (LOQ) de 0,04 % (m/m).

4.3.4. PRECISÃO

Para avaliação da precisão, foi empregada a amostra de raiz B. A precisão intra-dia foi realizada mediante análise do teor de ácido pífico na amostra em septuplicata, no mesmo dia, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. A precisão inter-dia foi realizada pela análise da mesma raiz em um segundo dia, em triplicata, pelo mesmo analista e no mesmo equipamento. Os teores de ácido pífico total obtidos são mostrados na **Tabela 8**, enquanto na **Tabela 9** são apresentadas as precisões inter e intra-dia. Os teores de ácido pífico obtidos nos ensaios de precisão e exatidão, assim como os teores das amostras comerciais, foram calculados em base seca, conforme os resultados do ensaio de dessecação, mostrados no **Anexo 8**.

Tabela 8 – Teores de ácido pífico obtidos pela análise de amostras de raiz B em diferentes dias

	Amostras	Teor de ácido pífico total (% m/m)*
PRIMEIRO DIA	1	2,40
	2	2,27
	3	2,14
	4	2,28
	5	2,12
	6	2,41
	7	2,24
		TEOR MÉDIO = $2,3 \pm 0,1^{**}$
SEGUNDA DIA	1	2,49
	2	2,33
	3	2,54
		TEOR MÉDIO = $2,5 \pm 0,3^{**}$

* Teores calculados em base seca;

**Resultados expressos na forma de intervalo de confiança a 95 %, considerando-se a distribuição t de Student.

Tabela 9 – Precisões inter e intra-dia.

PRECISÃO INTRA-DIA (DPR)*		PRECISÃO INTER-DIA (DPR)*
Primeiro dia (n = 7)	Segundo dia (n = 3)	(n = 10)
4,8 %	4,5 %	5,2 %

* DPR é a estimativa do desvio padrão relativo.

4.3.5. EXATIDÃO

Para avaliação da exatidão, foram analisadas amostras de raiz de lote C por dois métodos (1 e 2), em dois laboratórios diferentes e dois analistas diferentes (ensaio entre laboratórios). O método 1 foi executado conforme descrito no **item 3.7.5.**, sendo que a análise partiu de 2 g da amostra da raiz, com extração em 2 etapas de 2 h cada e hidrólise ácida por 4 h. O método 2 foi executado no CPQBA-Unicamp e consistiu no emprego da técnica convencional de refluxo para extração e hidrólise ácida, apresentando, entretanto, pequenas diferenças: partiu de 100 mg de raiz, com extração em 4 h sem interrupção e hidrólise ácida por 4 h e 20 min. Outra diferença é que o comprimento de onda utilizado para a quantificação do ácido pífico foi de 210 nm, enquanto no método 1 utilizou-se sempre 205 nm. As diferenças entre os métodos são mostradas em resumo na **Tabela 10**. Cada método foi aplicado na análise de 7 replicatas de amostras (um total de 14 análises; 7 replicatas em cada laboratório). Os teores de ácido pífico total obtidos pelo método 1 são mostrados na **Tabela 11**.

Tabela 10 – Comparação das condições aplicadas em cada método.

Condições	Método 1	Método 2
Massa de raiz	2 g	100 mg
Tempo de extração	2 etapas de 2 h	4 h (sem interrupção)
Tempo de hidrólise	4 h	4 h e 20 min
Comprimento de onda para quantificação	205 nm	210 nm

Tabela 11 – Teores de ácido pífico total obtidos pela análise de amostras de raiz B pelo método 1

Amostras	Teor de ácido pífico total (% m/m)*
1	2,57
2	2,68
3	2,67
4	2,55
5	2,58
6	2,50
7	2,47
TEOR MÉDIO = 2,59 ± 0,07 **	

* Teores calculados em base seca;

** Resultado expresso na forma de intervalo de confiança a 95 %, considerando-se a distribuição t de Student.

A comparação dos resultados entre os dois métodos é mostrada na **Tabela 12**, em que são apresentados a média, a estimativa do desvio padrão, e a estimativa do desvio padrão relativo de cada conjunto de dados, calculados para a comparação estatística das médias.

Tabela 12 – Comparação entre os resultados obtidos para cada método.

	Teor de ácido pífico total (% m/m)*	
	Método 1	Método 2
Número de replicatas (n)	7	7
Estimativa do desvio padrão (s)	0,08 % m/m	0,15 % m/m
Intervalo de confiança a 95 %**	2,59 ± 0,07	2,7 ± 0,3
Estimativa do desvio padrão relativo (DPR)	2,7 %	5,5 %

* Teores calculados em base seca;

** Estipulado conforme a distribuição t de Student.

Primeiramente, o teste F de Fisher foi aplicado ($p=0,05$), verificando que os dois métodos apresentam precisões equivalentes: $F_{\text{calculado}} (3,52) < F_{\text{tabelado}} = (F_{6,6} = 3,97)$. A seguir foi realizado o teste estatístico t para comparação entre as médias dos dois métodos. Para aplicação do teste foi necessário conhecer o desvio padrão para o conjunto combinado de amostras ($S_{\text{comb}} = 0,1176 \% \text{ m/m}$):

$$t = (x_1 - x_2) / (S_{\text{comb}} \sqrt{(n_1 + n_2 / n_1 n_2)})$$

Onde: x_1 e x_2 são as médias de cada conjunto de dados e S_{comb} é o desvio padrão combinado do conjunto combinado.

Como $t_{\text{calculado}} (2,07) < t_{\text{tabelado}} (t_{12} = 2,18)$, é possível afirmar, a um nível de significância de 95%, que a diferença entre as médias dos dois conjuntos de dados é resultado apenas de erros aleatórios. Dessa forma, os teores médios de ácido pífico total, fornecidos pelos métodos 1 e 2, não diferem significativamente ($p=0,05$), sugerindo que o método 1, desenvolvido neste trabalho, é exato.

É importante salientar que o método 2 foi desenvolvido no CPQBA a partir do método 1, visando redução da quantidade de amostra e economia no gasto de solvente.

4.4. APLICAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE AMOSTRAS COMERCIAIS

Uma vez validado, o método foi aplicado na análise de amostras comerciais. Para tanto, amostras de quatro diferentes distribuidores foram adquiridas no mercado.

Na **Tabela 13** são mostrados os teores de ácido pífico obtidos para as amostras comerciais, analisadas pelo método validado.

Tabela 13 – Teores de ácido pífico total em amostras comerciais de raízes pulverizadas de *H. eriantha*.

Amostras	Teor de ácido pífico total (% m/m)*
1a	2,25
1b	2,31
1c	2,26
Teor médio (distribuidor 1): $2,27 \pm 0,07^{**}$	
2a	0,14
2b	0,15
2c	0,18
Teor médio (distribuidor 2): $0,16 \pm 0,05^{**}$	
3a	0,14
3b	0,15
3c	0,13
Teor médio (distribuidor 3): $0,14 \pm 0,02^{**}$	
4a	0,25
4b	0,30
4c	0,21
Teor médio (distribuidor 4): $0,25 \pm 0,10$	

* Teores calculados em base seca;

** Resultados expressos na forma de intervalo de confiança de 95 %, considerando-se a distribuição t de Student.

Dos quatros distribuidores, apenas um apresentou teor de ácido pífico (2,27 % m/m) semelhante aos das raízes cultivadas no CPQBA-Unicamp (2,2-2,6 % m/m).

Entretanto, apenas pelo teor de ácido pífico não é possível avaliar se as amostras foram adulteradas ou são falsificadas, visto que seriam necessários outros testes físico-químicos e/ou farmacopeicos. A qualidade do material vegetal é garantida apenas se aspectos botânicos, químicos; farmacológicos e de pureza forem considerados. Por esse motivo, além do teor de substância ativa e intensidade das atividades farmacológica e toxicológica, outros aspectos de qualidade a serem avaliados são a carga microbiana, contaminação química por metais pesados, agrotóxicos, e presença de matéria estranha, como terra, areia, partes de vegetais, insetos e pequenos vertebrados (Toledo *et al.*, 2003).

Considerando que não há descrição da espécie *H. eriantha* nas farmacopeias e monografias vigentes, o desenvolvimento destas monografias é de suma importância para o controle de qualidade de matérias-primas e produtos.

5. CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

A realização deste trabalho levou às seguintes conclusões:

- ✓ O método otimizado para a extração de ácido pífico presente nas raízes de *H. eriantha* foi estabelecido a partir da extração a quente com etanol 80 % (v/v) em duas etapas de 2 h cada, seguida pela hidrólise com HCl 1,8 mol L⁻¹ em banho a 120 °C, por 4 h;
- ✓ O planejamento experimental foi apropriado para estabelecer as condições de hidrólise. Foi verificado que o teor de ácido pífico é principalmente afetado pela concentração de ácido clorídrico empregada no procedimento de hidrólise, embora as variáveis temperatura e tempo também devam ser consideradas;
- ✓ A cromatografia em fase reversa com detecção por UV e empregando uma coluna C-18 e fase móvel composta de solução de ácido fórmico 0,1 % (v/v) e metanol (18:82 v/v) foi adequada para a determinação de ácido pífico em *H. eriantha*. Apesar do baixo comprimento de onda (205 nm) e também da eluição isocrática, não houve presença de interferentes após os processos de extração e hidrólise propostos, ou seja, o método apresentou seletividade adequada;
- ✓ A espectrometria de massas é uma ferramenta adicional para confirmar a presença do analito na amostra, assim como quantificar o mesmo. A ionização do analito por APCI operando no modo negativo apresentou maior eficiência em relação à realizada por ESI;

- ✓ O método foi considerado validado segundo as especificações da RE nº 899 de 29 de maio de 2003 da ANVISA. Os parâmetros estabelecidos foram: seletividade (pureza do pico), linearidade (coeficiente de correlação igual a 0,9999), intervalo (0,04 a 12,8 % m/m de ácido pífico), limite de detecção (0,01 % m/m de ácido pífico), limite de quantificação (0,04 % m/m de ácido pífico), precisão intra-dia (DPR de 4,8 %, n=7), precisão inter-dia (DPR de 5,2 %, n=10). A exatidão foi avaliada pela análise de uma amostra de raiz em dois laboratórios e analistas diferentes;

- ✓ Em relação às raízes comerciais analisadas, obtidas de quatro diferentes distribuidores, foi verificado que o teor de ácido pífico variou de 0,14 a 2,27 % m/m. Os resultados mostram a necessidade do estabelecimento da monografia farmacopeica da planta, além da realização de estudos clínicos que estabeleçam uma faixa exata de concentração do ativo em que os efeitos terapêuticos sejam alcançados. Dessa forma, será possível realizar o adequado controle de qualidade dessas matérias-primas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDRE, R.F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C.M. O. **Interações entre fármacos e medicamentos à base de ginkgo ou ginseng**, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18(1): 117-126, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **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, DF, 02 de junho de 2003.

ATTELE, A.S.; WU, J.A.; YUAN, C.S. **Ginseng pharmacology: multiple constituents and multiple actions**, *Biochemical Pharmacology*, 58(11): 1685-1693, 1999.

BALLAS, S.K. **Hydration of sickle erythrocytes using a herbal extract (*Pfaffia paniculata*) in vitro**. *British Journal of Haematology*, 111(1): 359-362, 2000.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia**. In: JARDIM, I.C.S.F.; COLLINS, C.H.; GUIMARÃES, L.F.L. *Cromatografia líquida de alta eficiência*. 3 ed. Campinas: Editora Unicamp, 2006.

CORBIT, R.M.; FERREIRA, J.F.S.; EBBS, S.D.; MURPHY, L.L. **Simplified extraction of ginsenosides from American ginseng (*Panax quinquefolius* L.) for high-performance liquid chromatography-ultraviolet analysis**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(26): 9867-9873, 2005.

CUI, J.F. **Identification and quantification of ginsenosides in various commercial ginseng preparations**. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 3(2): 77-85, 1995.

DA SILVA, T.C.; DA SILVA, A.P.; AKISUE, G.; AVANZO, J.L.; NAGAMINE, M.K.; FUKUMASU, H.; MATSUZAKI, P.; RASPANTINI, P.C.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. **Inhibitory effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on preneoplastic and neoplastic lesions in a mouse hepatocarcinogenesis model**. *Cancer Letters*, 226(2): 107-113, 2005.

DA SILVA, T.C.; COGLIATI, B.; DA SILVA, A.P.; FUKUMASU, H.; AKISUE, G.; NAGAMINE, M.K.; MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. ***Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) roots decrease proliferation and increase apoptosis but do not affect cell communication in murine hepatocarcinogenesis.** *Experimental and Toxicologic Pathology*, 62(2): 145-155, 2010.

FELTRIN, E.P.; CHORILLI, M. **Extratos secos padronizados: tendência atual em fitoterapia.** *Revista Lusófona de Ciências e Tecnologia da Saúde*, 7(1): 109-115, 2010.

FONTANIVE, T.O.; KOBAYASHI, C.; BONA, L.R.; MASSONI, T.; WEIZENMANN, M.; TASCA, T.; GAMARO, G.D.; MALUF, R.W.; PICOLI, S.U.; ARDENGHI, P.; SUYENAGA, E.S. **Avaliação da atividade farmacológica de *Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze.** *Latin American Journal of Pharmacy*, 29(1): 64-71, 2010.

JIA, L.; ZHAO, Y. **Current evaluation of the millenium phytomedicine-ginseng (I): etymology, pharmacognosy, phytochemistry, market and regulations.** *Current Medicinal Chemistry*, 16(19): 2475-2484, 2009.

KIM, K.M.; KWON, H.S.; JEON, S.G.; PARK, C.H.; SOHN, S.W.; KIM, D.I.; KIM, S.S.; CHANG, Y.S.; KIM, Y.K.; CHO, S.H.; MIN, K.U.; KIM, Y.Y. **Korean ginseng-induced occupational asthma and determination of IgE binding components.** *Journal of Korean Medical Science*, 23(2): 232-235, 2008.

KWON, J.H.; LEE, G.D.; BÉLANGER, J.M.R.; PARÉ, J.R.J. **Effect of ethanol concentration on the efficiency of extraction of ginseng saponins when using a microwave-assisted process (MAPTM).** *International Journal of Food Science and Technology*, 38(5): 615-622, 2003.

LEAL, P.F.; KFOURI, M.B.; ALEXANDRE, F.C.; FAGUNDES, F.H.R.; PRADO, J.M.; TOYAMA, M.H.; MEIRELES, A.A. **Brazilian ginseng extraction via LPSE and SFE: global yields, extraction kinetics, chemical composition and antioxidant activity.** *The Journal of Supercritical Fluids*, 54(1): 38-45, 2010.

LEE, J.Y.; LEE, Y.D.; BAHN, J.W.; PARK, H.S. **A case of occupational asthma and rhinitis caused by Sanyak ad Korean ginseng dusts.** *Allergy*, 61: 392-393, 2006.

LI, J.; JADHAV, A.N.; KHAN, I.A. **Triterpenoids from Brazilian ginseng, *Pfaffia paniculata***. *Planta Médica*, 76(6): 635-639, 2010.

MARCHIORETTO, M.S.; MIOTTO, S.T.S.; SIQUEIRA, J.C. **Padrões de distribuição geográfica dos táxons brasileiros de *Hebanthe* Mart. (Amaranthaceae)**. *Pesquisas-Botânica*, 59:159-70, 2008.

MARCHIORETTO, M.S.; MIOTTO, S.T.S.; SIQUEIRA, J.C. **O gênero *Hebanthe* (Amaranthaceae) no Brasil**. *Rodriguésia*, 60(4): 783-798, 2009a.

MARCHIORETTO, M.S.; MIOTTO, S.T.S.; SIQUEIRA, J.C. **Padrões de distribuição geográfica das espécies brasileiras de *Pfaffia* (Amaranthaceae)**. *Rodriguésia*, 60(3): 667-681, 2009b.

MATSUZAKI, P.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. **Effect of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on the Ehrlich tumor in its ascitic form**. *Life Sciences*, 74(5): 573-579, 2003.

MATSUZAKI, P.; HARAGUCHI, M.; AKISUE, G.; OLORIS, S.C.S.; NAGAMINE, M.K.; DA SILVA, T.C.; SAKAI, M.; FONSECA, E.S.M.; PALERMO-NETO, J.; GÓRNIK, S.L.; DAGLI, M.L.Z. **Antineoplastic effects of butanolic residue of *Pfaffia paniculata***. *Cancer Letters*, 238(1): 85-89, 2006.

NAGAMINE, M.K.; SILVA, T.C.; MATSUZAKI, P.; PINELLO, K.C.; COGLIATI, B.; PIZZO, C.R.; AKISUE, G.; HARAGUCHI, M.; GÓRNIK, S.L.; SINHORINI, I.L.; RAO, K.V.K.; BARBUTO, J.A.M.; DAGLI, M.L.Z. **Cytotoxic effects of butanolic extract from *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on cultured human breast cancer cell line MCF-7**. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 61(1): 75-82, 2009.

NAKAI, S.; TAKAGI, N.; MIICHI, H.; HAYASHI, S.; NISHIMOTO, N.; TAKEMOTO, T.; KIZU, H. ***Pfaffosides*, nortriterpenoid saponins, from *Pfaffia paniculata***. *Phytochemistry*, 23(8): 1703-1705, 1984.

NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; TAKEMOTO, T.; ODASHIMA, S.; KIZU, H.; WADA, Y. ***Pfaffosides* and nortriterpenoid saponins from *Pfaffia paniculata***. *Phytochemistry*, 23(1): 139-142, 1984.

OLIVEIRA, F. ***Pfaffia paniculata* (Martius) Kuntze: o ginseng brasileiro.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 1(1):86-92, 1986.

OSHIMA, M.; GU, Y. ***Pfaffia paniculata*-induced changes in plasma estradiol-17 β , progesterone and testosterone levels in mice.** *Journal of Reproduction and Development*, 49(2):175-180, 2003.

PEDERSEN, T.M. **Studies in South American Amaranthaceae.** V. *Bonplandia*, 10(1-4): 83-112, 2000.

PINELLO, K.C.; FONSECA, E.S.M.; AKISUE, G.; DA SILVA, A.P.; OLORIS, S.C.S.; SAKAI, M.; MATSUZAKI, P.; NAGAMINE, MK; PALERMO-NETO, J.; DAGLI, M.L.Z. **Effects of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) extract on macrophage activity.** *Life Sciences*, 78(12): 1287-1292, 2006.

STONER, G.D.; GUPTA, A. **Etiology and chemoprevention of esophageal squamous cell carcinoma.** *Carcinogenesis*, 22(11): 1737-1746, 2001.

SUBIZA, J.; SUBIZA, J.L.; ESCRIBANO, P.M.; HINOJOSA, M.; GARCIA, R.; JEREZ, M.; SUBIZA, E. **Occupational asthma caused by Brazil ginseng dust.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 88(5): 731-736, 1991.

SHI, W.; WANG, Y.; LI, J., ZHANG, H.; DING, L. **Investigation of ginsenosides in different parts and ages of *Panax ginseng*.** *Food Chemistry*, 102(3): 664-668, 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENCKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento.** In: SCHENCKEL, E.P.; GOSMANN, G.; ATHAIDE, M.L. Saponinas. 3 ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/UFRGS , Editora da UFSC, 2001.

TANG, F.; ZHANG, Q.; NIE, Z.; CHEN, B.O.; YAO, S. **Sample preparation for analyzing traditional Chinese medicines.** *Trends in Analytical Chemistry*, 28(11): 1253-1262, 2009.

TAKEMOTO, T.; NISHIMOTO, N.; NAKAI, S.; TAKAGI, N.; HAYASHI, S.; ODASHIMA, S.; WADA, Y. ***Pfaffic acid*, a novel nortriterpene from *Pfaffia paniculata* Kuntze.** *Tetrahedron Letters*, 24(10): 1057-1060, 1983.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATTA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; Miguel, M.D.; Miguel, O.G.; **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica.** *Revista Lecta Bragança Paulista*, 21 (1/2): 7-13, 2003.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. **Plantas medicinais: cura segura?** *Química Nova*, 28(3): 519-528, 2005.

VIGO, C.L.S.; NARITA, E.; MILANEZE-GUTIERRE, M.A.; MARQUES, L.C. **Caracterização farmacognóstica comparativa de *Pfaffia glomerata* (Spreng.) Pedersen e *Hebanthe paniculata* Martius-Amaranthaceae.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 6(2): 7-19, 2004.

VONGSANGNAK, W.; GUA, J.; CHAUVATCHARIN, S.; ZHONG J.J. **Towards efficient extraction of notoginseng saponins from cultured cells of *Panax notoginseng*.** *Biochemical Engineering Journal*, 18(2): 115-120, 2004.

WATANABE, T.; WATANABE, M.; WATANABE, Y.; HOTTA, C. **Effects of oral administration of *Pfaffia paniculata* (Brazilian ginseng) on incidence of spontaneous leukemia in AKR/J mice.** *Cancer Detection and Prevention*, 24(2):173-178, 2000.

XUE, H.; AZIZ, R.M.; SUN, N.; CASSADY, J.M.; KAMENDULIS, L.M.; XU, Y.; STONER, G.D.; KLAUNIG, J.E. **Inhibition of cellular transformation by berry extracts.** *Carcinogenesis*, 22(2): 351-356, 2001.

ZHANG, S.; CHEN, R.; WU H.; WANG, C. **Ginsenosides extraction from *Panax quinquefolium* L. (American ginseng) root by using ultrahigh pressure.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(1): 57-63, 2006.

7. ANEXOS

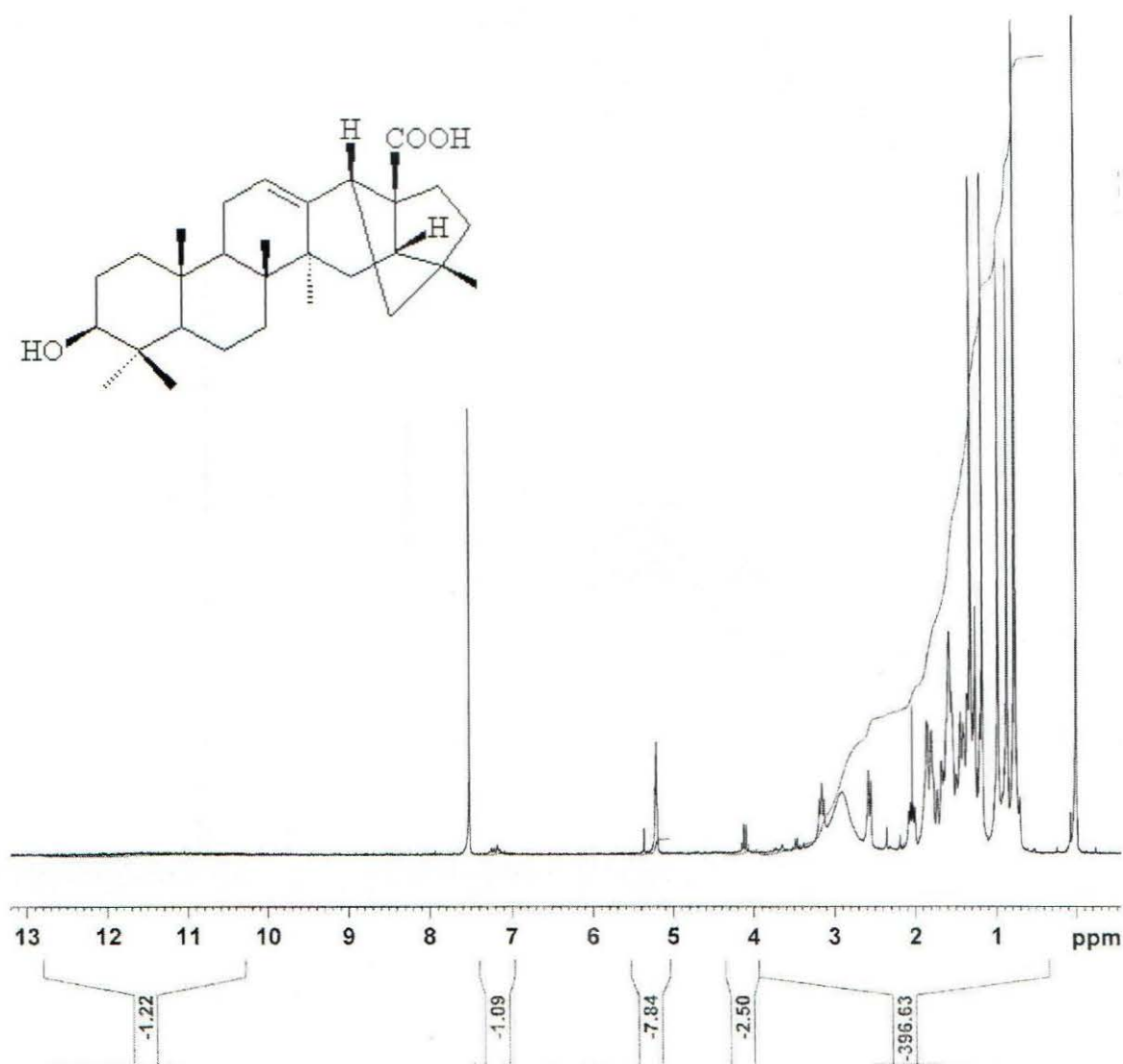
ANEXO 1 – ESPECTRO DE RMN H^1 DO PADRÃO DE ÁCIDO PFÁFFICO

Figura 20. Espectro de RMN de H^1 (250 MHz, $CDCl_3$) do padrão de ácido pfáffico.

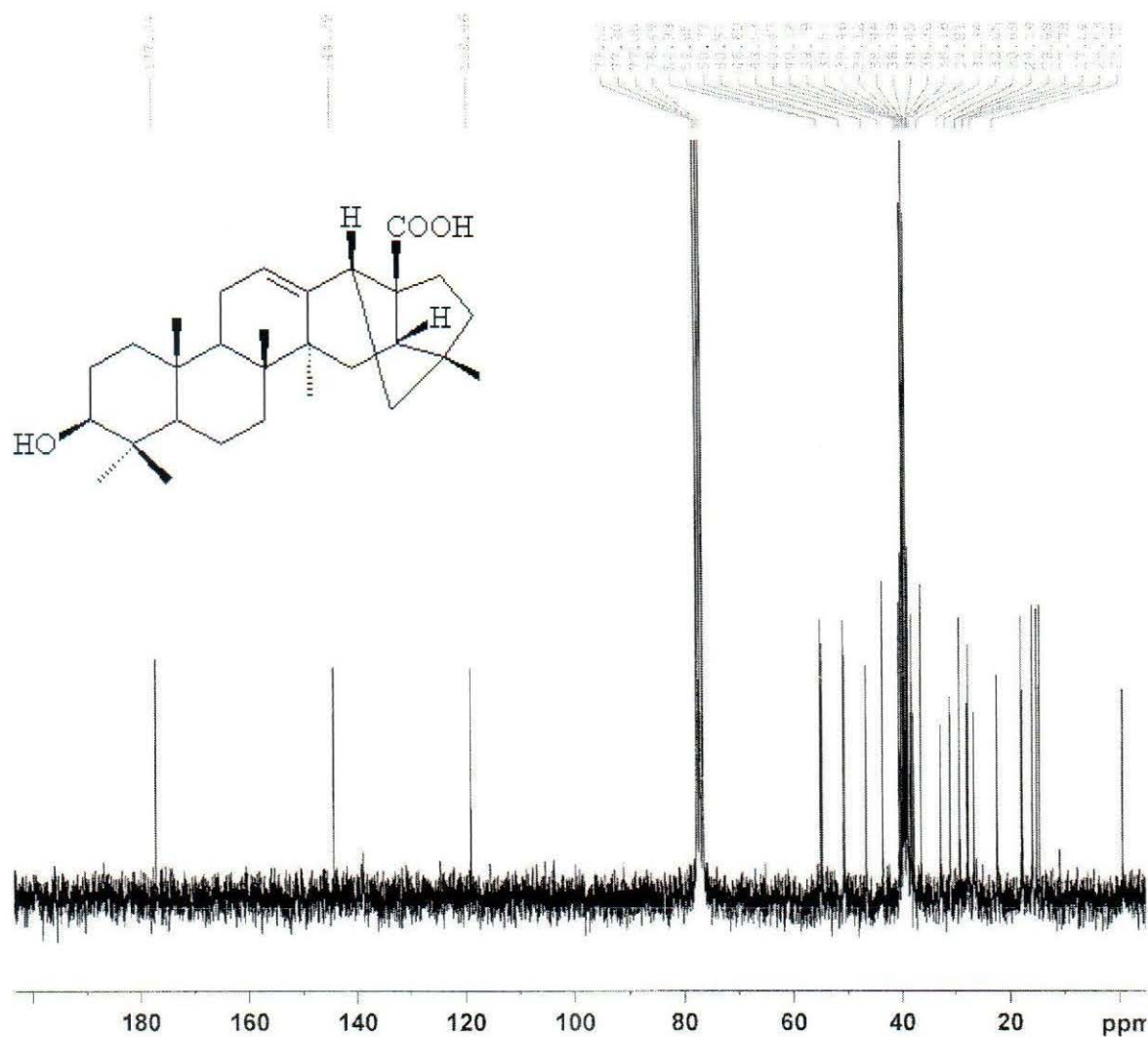
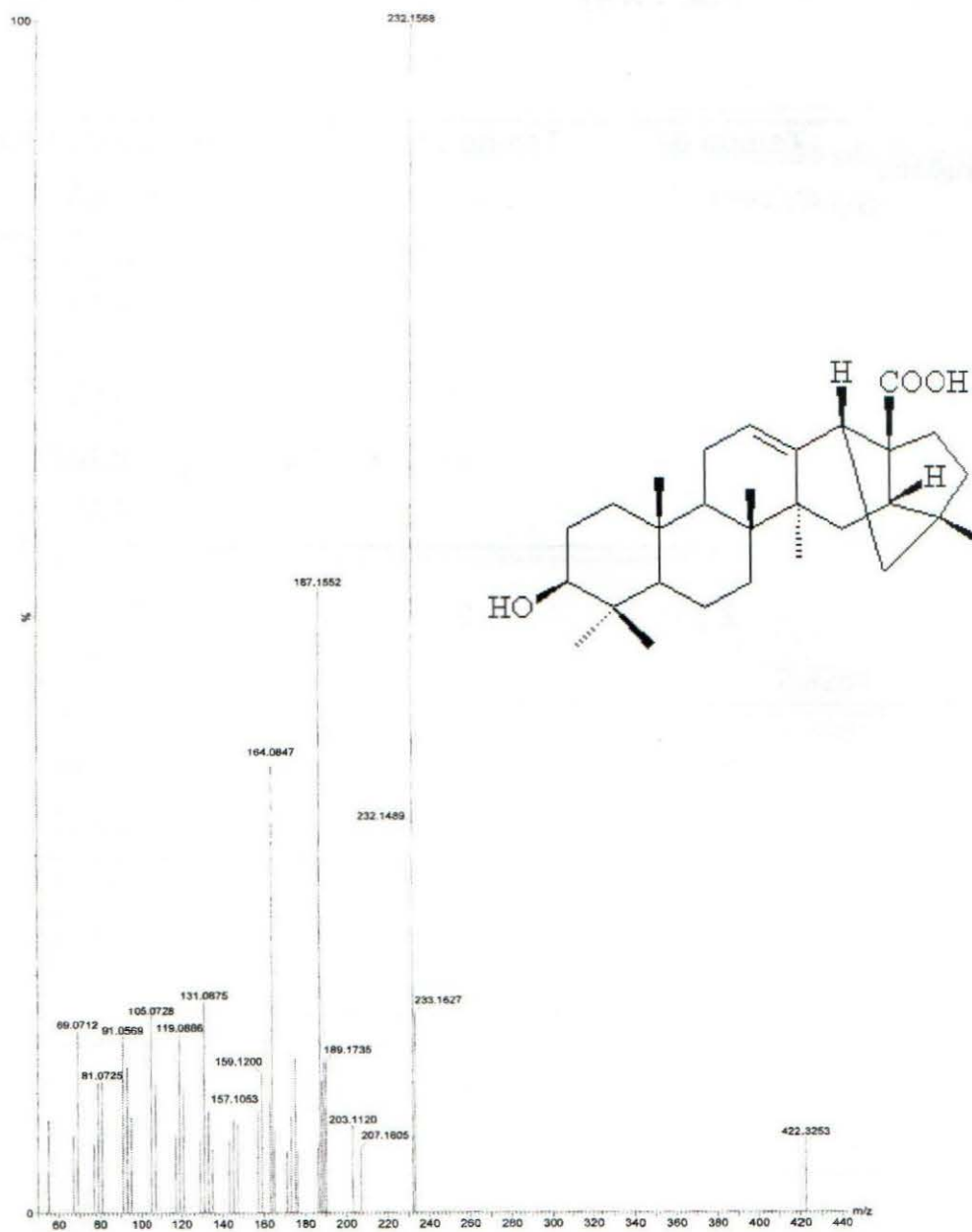
ANEXO 2 – ESPECTRO DE RMN C¹³ DO PADRÃO DE ÁCIDO PFÁFFICO

Figura 21. Espectro de RMN de C¹³ (262,5 MHz, CDCl₃) do padrão de ácido pfáffico.

ANEXO 3 – ESPECTRO DE MASSAS (EI -TOF) DO PADRÃO DE ÁCIDO PFÁFFICO

Figura 22. Espectro de massas (EI^+/TOF) do padrão de ácido pfáffico.

ANEXO 4 – TEORES DE ÁCIDO PFÁFFICO TOTAL OBTIDOS PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO (ENSAIOS DE 1 A 4)

Ensaio	Tempo de extração (h)	Tempo de re-extração (h)	Teor de ácido pfáffico total (% m/m)*
1a	1	2	2,662
			2,739
			2,764
1b	2	2	2,771
			2,786
			2,889
2a	2	2	3,491
			3,373
			3,408
2b	2	2	3,315
			3,512
			3,269
3a	4	2	3,404
			3,410
			3,320
3b	4	2	3,065
			3,109
			3,293
4	8	2	3,246
			3,171
			3,355
			3,284

* Teores calculados em base úmida.

ANEXO 5 – TEORES DE ÁCIDO PFÁFFICO TOTAL OBTIDOS PARA OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO (ENSAIOS DE 5 A 8)

Ensaio	Tempo de extração (h)	Tempo de re-extração (h)	Teor de ácido pfáffico total (% m/m)*
5	1	2	2,1417
			2,0868
			2,1894
6	2	2	3,4235
			3,5154
			3,6216
7	2	2	3,1317
			3,1709
			2,9294
8	2	2	2,8051
			3,0469
			2,8378

* Teores calculados em base úmida.

ANEXO 6 – CÁLCULO DOS PARÂMETROS DE CONFORMIDADE

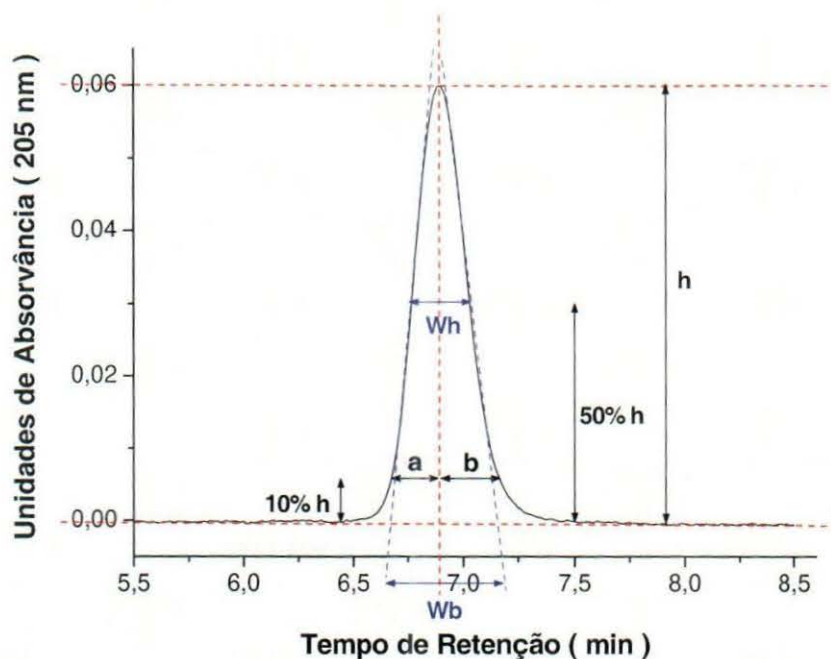


Figura 23. Ampliação do pico de ácido páfíco mostrado no cromatograma da figura 16: análise do padrão $83,36 \mu\text{g mL}^{-1}$ em HPLC-DAD. Coluna: Symmetry (4,6 x 75 mm, $3,5 \mu\text{m}$, Waters); fase móvel: ácido fórmico 0,1 % (A): móvel metanol (B) (18:82 v/v); eluição isocrática; vazão: $1,00 \text{ mL min}^{-1}$; volume de injeção: $20 \mu\text{L}$; λ : 205 nm (DAD) (h = altura do pico, w_b = largura da base do pico, w_h = largura do pico a meia altura).

ANEXO 7 – ÁREAS OBTIDAS PARA SOLUÇÕES DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE ÁCIDO PFÁFFICO

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	Áreas ($\lambda = 205 \text{ nm}$)			DPR**
0,80	16677	11745	7353	4665
2,02	23506	27777	24864	2182
4,04	41320	45527	40765	2604
12,11	128252	122866	129958	3702
20,18	225887	221975	236165	7329
40,36	447402	442554	438310	4549
80,72	850921	851770	857515	3587
121,08	1296194	1296194	1300153	1987
201,80	2166413	2155704	2160201	5377
282,50	3033538	3029304	3038712	4712

* Soluções de ácido pfáffico padrão com concentrações já corrigidas em função do teor do padrão de 95,5 % (m/m);

** DPR é a estimativa do desvio padrão relativo.

ANEXO 8 – TEORES DE ÁGUA NAS RAÍZES COLETADAS E OBTIDAS COMERCIALMENTE

Raízes	Teor de água em % (m/m)
Distribuidor 1	7,4
Distribuidor 2	9,7
Distribuidor 3	9,3
Distribuidor 4	5,9
B (usada na precisão)	7,8
C (usada na exatidão)	8,8



Instituto de Química
Coordenadoria de Pós-Graduação
www.iqm.unicamp.br/cpg
☎ 73020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO – TESE/DISSERTAÇÃO

Fls nº 18
Proc nº 01P-8166-09
Rubrica xl

Eu, Kelly de Paula Souza, nacionalidade: brasileira, estado civil: solteira, profissão: Farmacêutica, residente e domiciliada na rua Alberto de Salvo, nº 510, complemento: casa, bairro: Santa Genebra II, distrito de Barão Geraldo, cidade: Campinas, Estado: SP CEP: 13084-759, portador do documento de identidade RG 32256668-X (SSP-SP), na qualidade de titular dos direitos morais e patrimoniais de autor da OBRA título: Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação de ácido pífico em *Hebanthe eriantha*, dissertação de mestrado, apresentada na Universidade Estadual de Campinas em 17 de fevereiro de 2011.

☒ AUTORIZO, a Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, a reproduzir, disponibilizar na rede mundial de computadores – INTERNET – e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA, a partir da data da homologação.

☐ AUTORIZO, a partir de um ano após a data da homologação, a Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, a reproduzir, disponibilizar na rede mundial de computadores, INTERNET - e permitir a reprodução por meio eletrônico, da OBRA.

Casos excepcionais serão tratados pela CPG.

Campinas, 10 de janeiro de 2011

Assinatura do Aluno: Kelly de Paula Souza
(Kelly de Paula Souza)

Ciente do(a) orientador(a): Susanne Rath
(Profª Dra Susanne Rath)

Importante:

- entregue duas vias assinadas: uma na Biblioteca e outra na CPG.