



Desenvolvimento e validação de metodologia analítica por CLAE para análise de constituintes das partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides*

Julia A. Santos¹ (IC)*, Thaís M. S. Ferreira¹ (PG), Ludimilla S. Souza¹ (IC), Leandra A. Modesto¹ (IC), Maria Patrícia V. Santos¹ (IC), Leandra A. R. Oliveira¹ (PQ), Joelma A. M. Paula¹ (PQ).

¹ Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas, Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis/GO, Brasil

* juliaalves506@gmail.com

Resumo: *Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae) é conhecida como erva-de-santa-maria, mastruz e mentruço e é empregada como anti-helmíntica, anti-inflamatória e antibacteriana. Este trabalho teve como objetivo identificar e quantificar rutina nas partes aéreas de *C. ambrosioides*, utilizando Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência (CLAE), a fim de contribuir para o controle de qualidade deste material vegetal. As partes aéreas de *C. ambrosioides* foram coletadas em áreas urbanas do Estado de Goiás. Os materiais foram submetidos à secagem a 37°C, pulverizados em moinho de facas e reunidos para constituir um conjunto homogêneo. Para a constituição da amostra foram preparadas soluções extrativas em etanol a 70%(m/m) na proporção droga/solvente 1:10 (g/ml), em banho de ultrassom, durante 30 min, a 40°C. Foram adaptados e testados quatro métodos analíticos por CLAE, a fim de determinar o mais eficiente na separação da rutina. A seletividade e a linearidade do método também foram determinadas. O método analítico que apresentou o melhor perfil de separação da rutina, baseou-se em critérios estabelecidos por Jesus et al. (2017), com adaptações. O método mostrou ser apropriado, simples, adequado, seletivo e linear ($R=0,998$, dados homocedásticos). A rutina foi identificada no tempo de retenção de 39,7 min e seu teor, nas partes aéreas de *C. ambrosioides*, foi de 0,17% ($\pm 0,03$).

Palavras-chave: Erva-de-santa-maria. Método analítico. Controle de qualidade. Rutina.

Introdução

Chenopodium ambrosioides L. (Amaranthaceae) é uma planta originária da América Central e do Sul, ocorre em todos os países temperados, seja na forma silvestre ou cultivada, sendo considerada também uma planta invasora (LORENZI; MATOS, 2002).

A população brasileira utiliza *C. ambrosioides* no tratamento de distúrbios intestinais (CHEVALLIER, 1996), contusões, equimoses (LORENZI; MATOS; 2002), antibacteriana (JESUS et al., 2017), entretanto, é a sua ação anti-helmíntica que a destaca como erva medicinal e como um dos remédios naturais mais utilizados no mundo (SHARMA; BALA; KUMAR, 2012). Por sua importância terapêutica, *C. ambrosioides* integra uma das 71 espécies vegetais da RENISUS (Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS), com interesse em estudos científicos e



tecnológicos referentes à mesma, visando o desenvolvimento de fitoterápicos (BRASIL, 2009).

Para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico ou de um produto de uso tradicional fitoterápico são imprescindíveis as etapas de desenvolvimento e validação de métodos analíticos. Tais etapas são importantes para o controle de qualidade, seja de matéria-prima ou produto acabado (BRASIL, 2104). A validação é exigida para o registro/notificação, é requisito fundamental para a comprovação de produção conforme as Boas Práticas de Fabricação e Controle (BPFC) e também tem como objetivo demonstrar que o método é apropriado para a finalidade pretendida (BRASIL, 2014).

Portanto, o presente estudo visa desenvolver e validar um método analítico para a identificação e quantificação de rotina no extrato etanólico bruto das partes aéreas de *C. ambrosioides*.

Material e Métodos

Neste estudo utilizaram-se as partes aéreas de *C. ambrosioides*, que foram coletadas em casa de vegetação do Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET), na Universidade Estadual de Goiás, no Horto de Plantas Medicinais do Jardim Botânico de Goiânia, cidade de Goiânia, Goiás, além de amostras coletadas em outros locais nas cidades de Anápolis – GO, Itapuranga – GO e Goiânia – GO. Exsicatas foram confeccionadas e depositadas no Herbário da Universidade Estadual de Goiás (registros de 11387-11393). Após a coleta, o material foi submetido à secagem em estufa de circulação de ar a 37 °C ($\pm$ 5 °C) por 48 horas, até atingir umidade entre 8 e 13%. Após a secagem, o material foi pulverizado em moinho de facas e homogeneizado para constituir um lote único de material vegetal.

Preparou-se soluções extrativas em etanol a 70%(m/m) na proporção droga:solvente de 1:10 (g/ml) assistidos em equipamento de ultrassom (UNIQUE mod USC – 2800A, frequência 40kHz e potencia 154W) durante 30 minutos, a 40°C. O extrato bruto foi filtrado com papel de filtro, logo após em membrana de fluoreto



polivinilideno (PVDF) 0,45µm e transferido para um vial para respectiva injeção em CLAE.

Foram testados e adaptados quatro métodos analíticos da literatura a fim de determinar qual seria o mais eficiente para identificação e quantificação do marcador químico rutina, e, portanto, o método de escolha para ser validado.

Foi realizada uma validação parcial do método escolhido. Para tanto, foram avaliados os quesitos: adequabilidade do sistema, seletividade e linearidade conforme parâmetros estabelecidos na RDC 166/2017 da Anvisa (Brasil, 2017).

O teor de rutina no material vegetal foi expresso como a média ($\pm$ DP) a partir de três eluições cromatográficas independentes da amostra e calculado conforme a Equação 1. Nesta equação, C é a concentração de rutina na amostra, determinada com o auxílio da equação da reta, gerada da curva de calibração na análise de regressão linear e Ca é a concentração da amostra (matéria-prima vegetal) no extrato, ambas em (µg/mL).

$$Teor (\%) = \frac{C}{C_a} \times 100 \quad \text{Equação (1)}$$

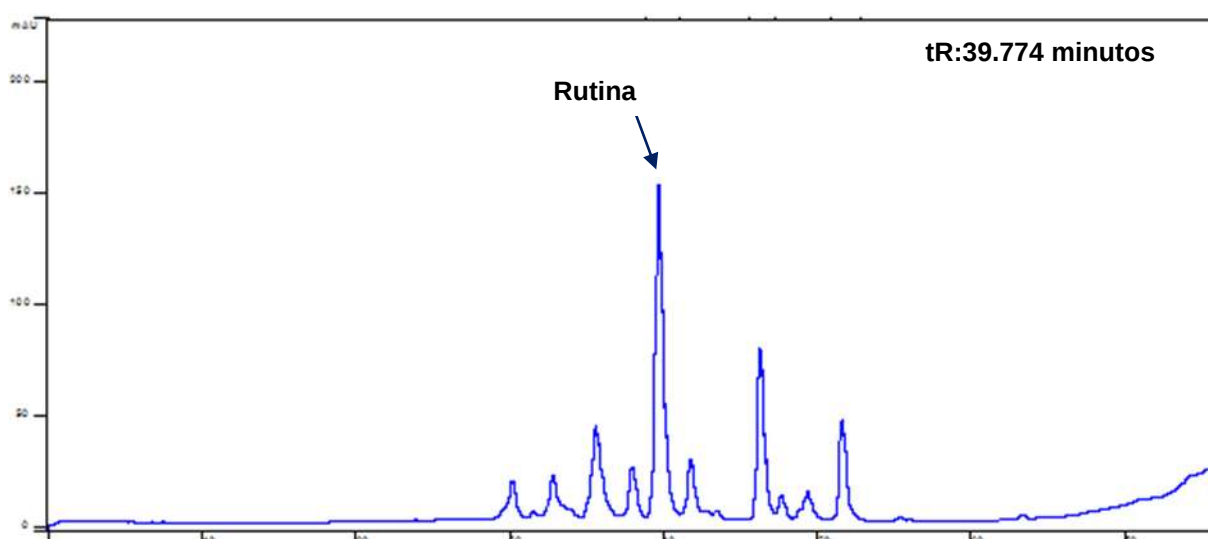
Resultados e Discussão

O método adaptado de Jesus et al. (2017) foi o que apresentou o melhor resultado na separação satisfatória e com um pico mais intenso para a rutina, portanto foi o método de escolha para ser validado (Figura 1). As separações foram realizadas em coluna de fase reversa C-18 Supelco (25cm x 4,6 mm, 5µm). A fase móvel foi constituída por metanol (A) e solução aquosa de ácido acético a 2% (B). A eluição em gradiente consistiu em: 2min com 5% de A e foi gradualmente modificada para obter 25%, 40%, 50%, 60%, 70% e 100% de A em 10, 20, 30, 40, 50 e 70 min, respectivamente. O fluxo foi de 1,0 ml/min, volume de injeção de 20µl e comprimento de onda de 360nm.

O sistema se mostrou adequado, com fator de calda de 1,15 ($\pm$ 0,09), resolução de 2,96 ($\pm$ 0,18), número de pratos teóricos de 35001 ($\pm$ 4,41) e fator de capacidade de 30,76 ($\pm$ 0,08). A seletividade da metodologia foi comprovada mediante a comparação dos cromatogramas do diluente (metanol e solução aquosa

de ácido acético à 2%), da solução do padrão rutina e do extrato etanólico bruto de *Chenopodium ambrosioides*. No teste realizado não foi observado interferência do diluente durante a eluição, não houve detecção de outros componentes e não houve alteração no tempo de retenção do marcador rutina a 360nm.

Figura 1: Perfil cromatográfico por CLAE do método testado e adaptado de Jesus et al.(2017)



Condições cromatográficas: coluna C18(250 x 4,6 mm, 5µm); Eluição gradiente; Fase móvel: metanol (A) e água à ácido acético à 2%; Fluxo de 1,0 mL.min; Comprimento de onda: 360nm; Volume de injeção: 20µL.

Na avaliação da linearidade, a curva de calibração média para rutina foi linear na faixa entre 31 a 1000µg/mL, apresentando equação linear representativa, em que $y = 13572x - 113420$ (N = 6; $r = 0,9981$ e $r^2 = 0,9998$). A RDC nº 166/2017 preconiza que o valor do coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990, desta forma os valores obtidos pelo método atendem esta especificação (Brasil, 2017).

O teor médio de rutina presente no material vegetal constituído pelas partes aéreas de *C.ambrosioides* foi de 0,17 % ($\pm 0,03$).

Considerações Finais

Os resultados demonstraram que o método escolhido e adaptado, por Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência, conseguiu, de maneira satisfatória, realizar a



identificação e a quantificação do marcador rutina na matéria-prima vegetal constituída pelas partes aéreas de *C. ambrosioides*. Com os resultados obtidos na validação parcial, verifica-se que o método é seletivo e linear, conforme parâmetros da RDC nº 166/2017 da ANVISA. Portanto, ele é uma alternativa promissora para o controle de qualidade de matérias primas e outros produtos oriundos das partes aéreas de *C. ambrosioides*, encorajando a condução das demais etapas de validação.

Agradecimentos

À UEG pelas bolsas de Iniciação Tecnológica e Bolsa de Incentivo ao Pesquisador; à CAPES; ao CNPq e à FAPEG pelo apoio financeiro; ao Horto Medicinal do Jardim Botânico de Goiânia e ao Engenheiro Agrônomo Nilton Marciano Junior pela fornecimento de mudas.

Referências

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **RELAÇÃO NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS DE INTERESSE AOS SUS**, 2009.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. IN nº 4 de 18 de junho de 2014. **Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico**.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RDC Nº 166 de 24 de julho de 2017. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências**.

CHEVALLIER, A. **The encyclopedia of medicinal plants**. 2nd ed. New York: ADK Publishing Book, 1996.

JESUS, R.S. et al. In vitro antimicrobial and antimycobacterial activity and HPLC-DAD screening of phenolics from *Chenopodium ambrosioides* L. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 274, p.168, 2017.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. São Paulo: Plantarum, 2002. 512p.

SHARMA, U.; BALA, M.; KUMAR, N. Immunomodulatory active compounds from *Tinospora cordifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.141, p.918-926, 2012.