



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

André Faibicher

Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de metabólitos secundários em extrato de folhas de *Varronia curassavica* Jacq. (erva-baleeira)

Araraquara, SP

2021

André Faibicher

Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de metabólitos secundários em extrato de folhas de *Varronia curassavica* Jacq. (erva-baleeira)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutico(a) Bioquímico(a).

Orientador: Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos

Coorientadora: Ms. Isabela Jacob Moro

Araraquara, SP

2021

F161d Faibicher, André.
Desenvolvimento e validação de método por cromatografia líquida de alta eficiência para determinação de metabólitos secundários em extrato de folhas de *Varronia curassavica* Jacq. (erva-baleeira) / André Faibicher. – Araraquara: [S.n.], 2021.
58 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientador: André Gonzaga dos Santos.
Coorientadora: Isabela Jacob Moro.

1. *Varronia curassavica*. 2. Erva-baleeira. 3. Validação. 4. Cordialina A. 5. Ácido rosmarínico. I. Santos, André Gonzaga dos, orient. II. Moro, Isabela Jacob, coorient. III. Título.

Agradecimentos

À ciência por me dar um propósito de vida e por trazer luz as trevas da ignorância.

À minha família, em especial minha mãe e padrasto, por terem sempre acreditado em mim, me dando as condições para poder estudar e lutado para que eu pudesse seguir os meus sonhos.

Ao meu avô, Jayme, que me trouxe o amor pelo aprendizado e pelo conhecimento, sinto sua falta.

Ao meu orientador, prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, pela oportunidade, apoio, ensinamentos, conversas e principalmente pela amizade.

À minha co-orientadora, Ms. Isabela Jacob Moro, pela paciência ao me ensinar as mais diversas coisas, pela amizade e pelo ombro amigo nos momentos de dificuldade.

À minha namorada, Stephanie, pela compreensão, amor e carinho, você me dá forças quando penso em desistir.

A todos os funcionários e colegas do Laboratório de Farmacognosia, um laboratório ímpar, onde aprendi que a ciência e a humildade podem andar lado a lado.

À educação superior pública, principalmente a UNESP, que me proporcionou experiências e aprendizados essenciais no meu crescimento pessoal e profissional.

RESUMO

Varronia curassavica Jacq., conhecida popularmente como erva-baleeira, é uma espécie de planta originária do Brasil, encontrada principalmente na Floresta Tropical Atlântica. Além de amplamente utilizada na medicina tradicional, está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde, no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira e seu óleo essencial é utilizado no medicamento fitoterápico Acheflan[®], desenvolvido pelo laboratório Aché[®] em parceria com a Universidade Federal de Santa Catarina. A erva-baleeira é conhecida principalmente por sua ação anti-inflamatória e dados recentes da literatura mostraram que esta ação deve estar relacionada à presença de fenilpropanoides, flavonoides e sesquiterpenos em suas folhas. O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento e a validação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta (CLAE-UV) para quantificar metabólitos secundários majoritários em extrato hidroetanólico de folhas da erva-baleeira. O método cromatográfico em modo reverso (C18) foi desenvolvido com base na otimização da fase móvel (metanol e ácido acético 2%), modificando a força de eluição e os tempos de gradiente, resultando em um método com boa resolução para detecção de fenilpropanoides, flavonoides e triterpenos. Os teores encontrados dos padrões ácido rosmarínico e cordialina A foram respectivamente 5,0 e 1,1%. Foram realizados experimentos para estabelecer os parâmetros necessários de validação do método de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), sendo eles linearidade, seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão. O método desenvolvido apresenta seletividade e sensibilidade para ácido rosmarínico e cordialina A e linearidade, precisão e exatidão dentro dos valores estabelecidos pela ANVISA. Sendo assim o mesmo é apto para detecção e quantificação de ácido rosmarínico e cordialina A e também pode servir de base para análises metabolômicas do extrato hidroetanólico de *V. curassavica*.

Palavras-chave: *Varronia curassavica*, erva-baleeira, validação, cordialina A, ácido rosmarínico

ABSTRACT

Varronia curassavica Jacq., popularly known as erva-baleeira, is a plant species from Brazil, found mainly in the Atlantic Rainforest. It is widely used in traditional medicine and it is included in the National List of Medicinal Plants of Interest to the Unified Health System and in the National Form of Herbal Medicines of the Brazilian Pharmacopoeia. Its essential oil is used in the herbal medicine Acheflan[®], developed by Aché Laboratories in partnership with the Federal University of Santa Catarina. Baleeira is known mainly for its anti-inflammatory action and according to recent literature data this action must be related to phenylpropanoids, flavonoids and sesquiterpenes of its leaves. The objective of this work was the development and validation of a method by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) to quantify major secondary metabolites in hydroethanolic extract of erva-baleeira leaves. The reverse phase chromatographic method (C18) was developed based on the optimization of the mobile phase (methanol and acetic acid 2%), varying the elution strength and gradient time, resulting in a method with acceptable resolution for detecting phenylpropanoids, flavonoids and triterpenes. The contents of rosmarinic acid and cordialin A were respectively 5,0 and 1,1%. The experiments were carried out to establish the method validation parameters according to the Brazilian National Health Surveillance Agency (ANVISA), including linearity, selectivity, sensitivity, precision and accuracy. The developed method presents selectivity and sensitivity for rosmarinic acid and cordialin A and linearity, precision and accuracy within the values established by ANVISA. Therefore, it is suitable for detection and quantification of rosmarinic acid and cordialin A and also for metabolomic analyses of *V. curassavica*.

Keywords: *Varronia curassavica*, erva-baleeira, validation, cordialin A, rosmarinic acid

Lista de Figuras

Figura 1. Estruturas químicas de metabólitos secundários identificados em <i>V. curassavica</i>	19
Figura 2. Estruturas químicas de metabólitos secundários do óleo essencial de folhas de <i>V. curassavica</i>	21
Figura 3. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de <i>V. curassavica</i> na condição inicial (Romão, 2016).	29
Figura 4. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de <i>V. curassavica</i> condição 6B.	32
Figura 5. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de <i>V. curassavica</i> na condição 13.	33
Figura 6. Curvas analíticas do ácido rosmarínico e da cordialina A. Dados obtidos em HPLC-PDA/UV.	34
Figura 7. Análise gráfica dos resíduos dos padrões de ácido rosmarínico e cordialina A.	37
Figura 8. Espectro de absorção no UV amostra e padrão Ac Rosmarinico e Cordialina A.	39

Lista de Tabelas

Tabela 1. Condições de fase móvel avaliadas no desenvolvimento do método.....	31
Tabela 2. Resultados do teste de Cochran para avaliação da homocedasticidade para os padrões de cordialina A e ácido rosmarínico.....	35
Tabela 3. Equações de retas gerada pelo programa GraphPad Prisma® após o teste de Cochran apontar heterocedasticidade dos padrões Ácido Rosmarínico e Cordialina A.....	35
Tabela 4. Resultados do teste F da ANOVA, avaliação do coeficiente angular dos padrões Ácido Rosmarínico e Cordialina A.....	36
Tabela 5. Resultados do teste t de Student para avaliação do coeficiente linear para os padrões de ácido rosmarínico e cordialina A.....	36
Tabela 6. Resultados do teste Ryan-Joyner para os padrões de Ácido Rosmarínico e Cordialina A.....	37
Tabela 7. Resultados do teste de Grubss para <i>outliers</i>	38
Tabela 8. Dados sobre exatidão e precisão do método analítico.....	38

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

DAD: Detector de Arranjo de Diodos

DE₅₀: Dose efetiva

DL₅₀: Dose letal

DV: Desvio padrão

EM: Espectrometria de massas

GC: Gas Chromatography

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

MS: Mass Spectrometer

PDA: Photodiode Array Detector

RDC: Resolução da Diretoria Colegiada

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

R_S: Resolução

t_R: Tempo de retenção

UV: Ultravioleta

Sumário

Agradecimentos	3
RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
Lista de Figuras.....	6
Lista de Tabelas	7
Lista de Abreviaturas e Siglas	8
Sumário.....	9
1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	12
3 REVISÃO DA LITERATURA	13
3.1 Botânica e uso tradicional	13
3.2 Atividades farmacológicas	14
3.3 Fitoquímica.....	17
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 Materiais e equipamentos	23
4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico 70% seco de folhas de <i>V. curassavica</i>	24
4.3 Pré-tratamento das amostras e padrões para análise por HPLC-UV.....	24
4.4 Desenvolvimento do método por HPLC-UV	25
4.5 Validação do método.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
5.1 Desenvolvimento do método	29
5.2 Validação do método.....	33
6 CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS	42
Apêndices.....	47
Anexo	57

1 INTRODUÇÃO

Varronia curassavica Jacq., conhecida popularmente como erva-baleeira ou somente baleeira, é utilizada na medicina popular em forma de garrafadas (soluções hidroetanólicas) e infusões preparadas com suas folhas, para tratamento de úlceras, inflamações e infecções (SERTIÉ et al., 1988, 1990, 2005; PINHO et al., 2011; ROLDÃO et al. 2008).

A composição química das plantas está sujeita a variações sazonais, circadianas, ontogenéticas, geográficas, entre outras e estas levam a variações nas concentrações de metabólitos secundários que atuam como princípios ativos em fitoterápicos. (GOBBO-NETO et al., 2007). Como comprovado por Pereira (2017), a erva-baleeira apresenta variabilidade quantitativa de seus compostos não voláteis. Portanto, técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/HPLC), a qual vêm se destacando na química analítica pela capacidade de realizar análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos, pode ser usada para análises quantitativas e qualitativas dos metabólitos secundários (metabolômica) do extrato hidroetanólico de erva-baleeira, inclusive com aplicação também no controle de qualidade das matérias-primas vegetais ao fitoterápico (RIBANI et al., 2004).

Para que um novo método analítico produza resultados confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve passar por um processo de avaliação denominado validação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e sistemas são adequados para o uso desejado. O processo de validação consiste num estudo das características do método, podendo ser avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade e faixa de aplicação, precisão, exatidão, limites de detecção

e quantificação e robustez, além da necessidade da comprovação de estabilidade dos padrões e amostras (RIBANI et al., 2004).

Visto que o extrato da erva-baleeira vem sendo amplamente estudado, tendo grande importância na medicina tradicional, além de ser preparado em farmácias de manipulação e Farmácias Vivas (LADEIRA, 2002), este trabalho tem como intuito o desenvolvimento e a validação de um método de análise do extrato hidroetanólico das folhas da erva-baleeira, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV (HPLC-UV). O método poderá ser usado em futuras análises qualitativas e quantitativas dos metabólitos secundários, com ênfase em triterpenos e compostos fenólicos, do extrato das folhas de erva-baleeira e no controle de qualidade da droga vegetal, extrato e fitoterápico que utilizem o mesmo.

2 OBJETIVOS

Desenvolver e validar um método de análise utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no UV para determinação de metabólitos secundários em extrato hidroetanólico 70% de folhas de *Varronia curassavica* Jacq.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Botânica e uso tradicional

Varronia curassavica Jacq., sinónimas botânicas *Cordia verbenacea* DC., *Cordia salicina* DC, *Cordia curassavica* Jacq., *Lithocardium fresenii* Kuntze, *Lithocardium salicinum* Kuntze, *Lithocardium verbenaceum* Kuntze, conhecida popularmente como baleeira, erva-baleeira, maria-milagrosa, maria-preta, camarinha e camaroneira-do-brejo, trata-se de espécie arbustiva perene, heliófita, com ramos flexíveis e hastes cobertas por casca fibrosa, medindo até 3 m de altura. Pertence à família Boraginaceae que contém cerca de 100 gêneros, com mais de 2.000 espécies largamente distribuídas no território mundial. Suas folhas são firmes, sem brilho de até 10 cm de comprimento e com textura crespa; suas pequenas flores apresentam corolas brancas reunidas em inflorescências escorpioides e vistosas (BARROSO et al., 2002; BAYEUX et al., 2002; LORENZI e MATOS, 2002; MONTANARI et al., 2011).

As folhas são simples, simétricas, de ápice agudo e base decorrente, limbo ovalado a lanceolado, margens irregulares denteadas a onduladas, lâmina foliar hipostomática e venação craspedódroma. A disposição das folhas é alternada e a face adaxial é de um verde mais forte do que a abaxial. Sua epiderme foliar é uniestratificada e apresenta dois tipos de tricomas secretores pedunculados, um deles com cabeça globular e outro reniforme, sendo o globular responsável por produção e armazenamento de componentes do óleo essencial e o reniforme de compostos fenólicos, como flavonoides, de acordo com testes histoquímicos. Estes tricomas podem ser considerados características de distinção de outras espécies do gênero. Possuem também tricomas não-glandulares, um deles possuindo cistólito, responsável pela superfície crespa da folha (VENTRELLA et al., 2008; LEAL-COSTA et al., 2017).

Quanto a distribuição geográfica, é nativa da Mata Atlântica, mas é encontrada em quase todos os países da América do Sul, América Central e México. No Brasil tem distribuição ampla, principalmente nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste, com maior ocorrência em regiões litorâneas como restingas, praias e dunas, porém, exemplares são encontrados no interior dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, região Amazônica, Caatinga de Pernambuco e Pampas do Rio Grande do Sul. Tem preferência por solos pouco férteis e com boa drenagem (CARVALHO JÚNIOR et al., 2004; FERNANDES et al., 2007; MONTANARI et al., 2011; RODAL et al., 2002).

Na medicina tradicional são utilizadas as folhas da planta, na forma de infusão (chá) e garrafada (extrato hidroetanólico). A infusão via oral é utilizada como antirreumático, anti-inflamatório, antiulcerogênico e analgésico; o extrato hidroetanólico por sua vez, é utilizado via tópica em processos inflamatórios locais, para o tratamento de edemas, feridas e lesões (SERTIÉ et al., 2005; LORENZI e MATOS, 2008).

A erva-baleeira está incluída no Formulário Nacional de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira 2ª edição, que orienta a preparação de infusão com 3 g de folhas secas e 150 mL de água e de gel com extrato hidroetanólico 70%, ambas com indicação como anti-inflamatório tópico (BRASIL, 2021). Também está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), lista com 71 espécies vegetais utilizadas nos serviços de saúde municipais e estaduais, visando progredir nas etapas da cadeia produtiva e na geração de produtos de interesse ao SUS (BRASIL, 2009).

3.2 Atividades farmacológicas

O extrato e o óleo essencial de *V. curassavica* tem demonstrado grande potencial anti-inflamatório (SERTIE et al., 1990, 1991, 2005; PASSOS et al., 2006; MEDEIROS et al., 2007; FERNANDES et al., 2007; ROLDÃO et al., 2008).

Sertié et al. (1988; 1991) demonstraram em seus trabalhos o efeito anti-inflamatório do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica*, em modelos experimentais diferentes: edema induzido por óleo de cróton, edema induzido por nistatina, edema induzido por carragenina e granuloma de pellet de algodão. Nos estudos, o extrato hidroetanólico 70% liofilizado demonstrou resultados promissores em ambas vias oral e tópica, mostrando-se tão eficiente quanto os fármacos utilizados como tratamento padrão (ácido acetilsalicílico e fenilbutazona) e apresentando baixa toxicidade, com valor de DL₅₀ (131,6 mg/kg) cem vezes maior que o de DE₅₀ (1,24 mg/kg) e ausência de lesões macroscópicas no estômago, fígado, baço e rins dos ratos testados. Também vale destacar que ao contrário dos anti-inflamatórios não esteroidais, o extrato hidroetanólico 70% das folhas de erva-baleeira mostrou menor potencial de gerar lesões gástricas, inclusive diminuindo sua incidência, como demonstrado por Roldão e colaboradores (2008), que obtiveram resultados positivos com extrato de erva-baleeira como protetor da mucosa gástrica, apresentando também baixa toxicidade.

Passos et al. (2006) obtiveram resultados positivos quanto a ação anti-inflamatória do óleo essencial em diferentes modelos de edema em pata de rato e camundongo, relacionando o efeito anti-edematogênico com a provável interferência de componentes do óleo essencial na produção do fator de necrose tumoral (TNF α). Dados da literatura demonstram que os componentes do óleo essencial α -humuleno e (*E*)-cariofileno, são eficazes na redução de edema, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, a migração de neutrófilos e ainda apresentando redução na

produção de prostaglandina E2, interleucina 1 β (IL-1 β), TNF α , bem como diminuição da expressão induzível de óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase (COX-2), explicitando o potencial anti-inflamatório das substâncias (FERNANDES et al., 2007; MEDEIROS et al., 2007).

Além do efeito anti-inflamatório, estudos demonstram que tanto o extrato quanto o óleo essencial da erva-baleeira, possuem atividade antimicrobiana, em especial contra bactérias Gram-positivas (MATIAS et al., 2010; MICHIELIN et al., 2009; DE CARVALHO JR et al., 2004).

Michielin et al. (2009) avaliaram a atividade antibacteriana de diferentes extratos de folhas de erva-baleeira, obtidos em diferentes condições com três métodos de extração diferentes: extração por fluido supercrítico com variações em pressão e temperatura; extração com aparelho de Soxhlet em diferentes solventes (água, acetona, acetato de etila, diclorometano, hexano e etanol 25, 50 e 100%) e por maceração em etanol, sendo que o extrato etanólico foi seco em rotaevaporador e particionado com água, acetato de etila, hexano e diclorometano. Foi observado que os extratos supercríticos (CO₂) e a fração em acetato de etila do extrato etanólico apresentaram a menor concentração mínima inibitória para as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, considerados fortes inibidores de crescimento destas, e também inibiram moderadamente a bactéria Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa*. Os únicos extratos que apresentaram inibição da bactéria gram-negativa *Escherichia coli* foram os extratos obtidos por Soxhlet. Em outro estudo, Pinho et al. (2011) também observaram inibição do crescimento de *S.aureus* pelo extrato hidroetanólico 50% em concentrações a partir de 500 mg/mL.

Scaderlato et al. (2016) avaliaram a atividade anti-Candida do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V.curassavica* e de suas frações obtidas por extração

líquido-líquido (água, hexano, n-butanol e acetato de etila), os quais foram testados em diferentes espécies do gênero *Candida*: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. O extrato e suas frações em hexano e em acetato de etila apresentaram efeito fungistático nas espécies não-*albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata* e efeito fungicida nas espécies *C. krusei* e *C. tropicalis*.

Outra atividade amplamente estudada, consiste na atividade antioxidante do extrato de *V. curassavica*. Michielin et al. (2011) avaliaram esta atividade utilizando diferentes ensaios, capacidade de inibição do radical DPPH, atividade antioxidante total, eliminação do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e proteção contra peroxidação lipídica (ROO^{\cdot}) *in vitro*. O extrato obtido por soxhlet utilizando etanol a 25% exibiu a maior atividade quanto ao radical DPPH, apresentando $CI_{50} = 27,4$ mg/mL e o extrato por soxhlet utilizando acetato de etila exibiu forte redução da peroxidação lipídica, comparável ao valor da rotina padrão, $CI_{50} = 209$ mg/mL e $CI_{50} = 203$ mg/mL, respectivamente, o que demonstra grande potencial antioxidante dos extratos de erva-baleeira. Romão (2016) também avaliou a atividade antioxidante do extrato hidroetanólico 70% das folhas de *V. curassavica*, que foi capaz de capturar espécies reativas como DPPH $^{\cdot}$, ABTS $^{+\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$, ROO^{\cdot} , HOCl e H_2O_2 , apresentando resultados semelhantes as substâncias antioxidantes padrão como quercetina, ácido ascórbico e trolox. Foi sugerida que esta atividade esteja relacionada a compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato, os quais foram quantificados e apresentaram teor de, respectivamente, 14 e 4% (m/m).

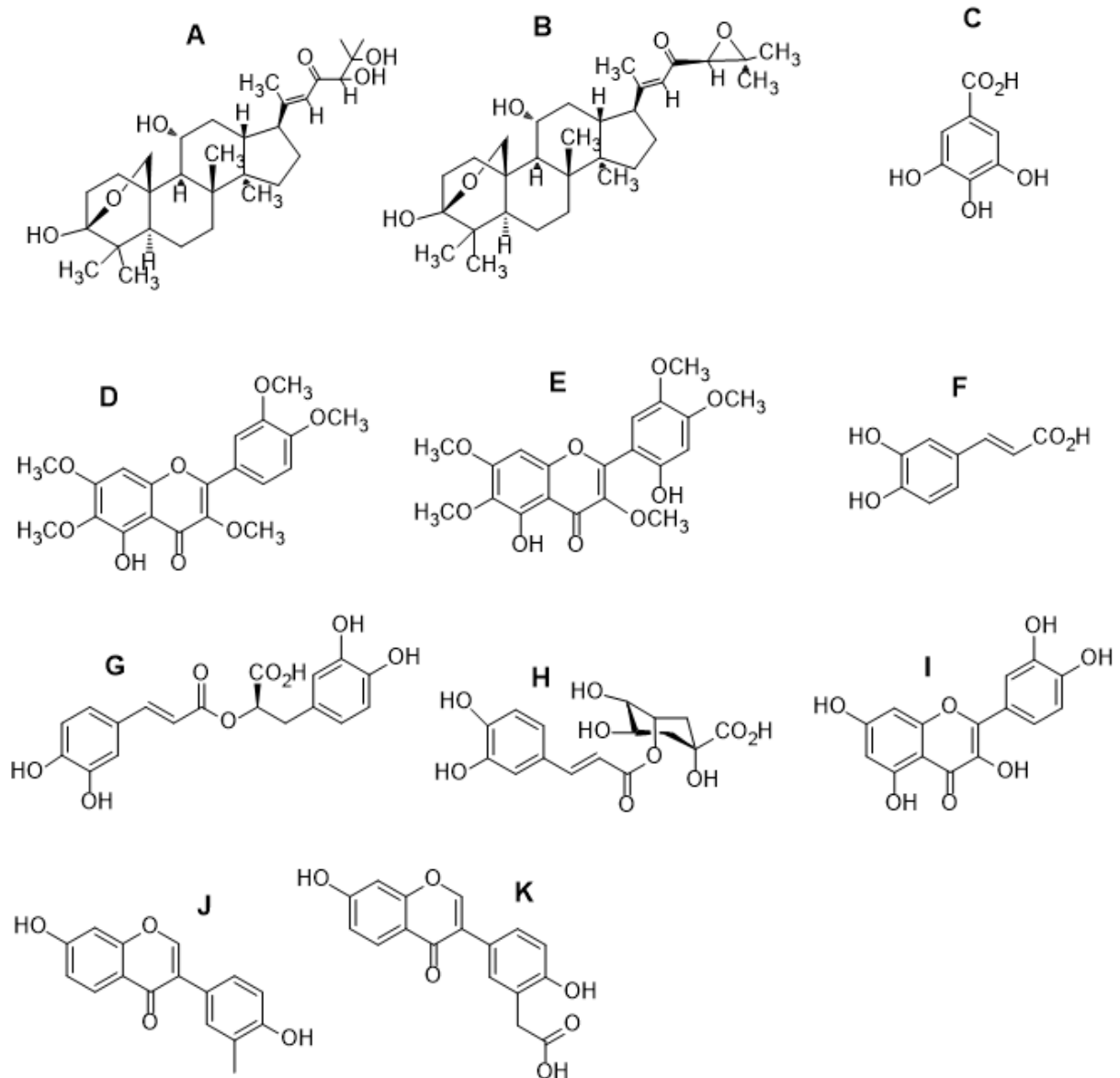
3.3 Fitoquímica

Estudos realizados com folhas de *V. curassavica* apontaram a presença de fenilpropanoides, ácido gálico, flavonoides, xantonas, saponinas, triterpenos, monoterpenos e sesquiterpenos (SERTIE et al., 1990; ROLDÃO et al., 2008; MICHIELIN et al., 2009; AMEIRA et al., 2009; MATIAS et al., 2013; SANTI et al., 2014).

Os componentes do extrato hidroetanólico 70% das folhas de *V. curassavica* são em grande parte metabólitos não voláteis, sendo 3 principais grupos identificados até o momento, flavonoides (por exemplo a artemetina), fenilpropanoides (como os ácidos rosmarínico e cafeico) e triterpenos (como as cordialinas A e B) (AMEIRA et al., 2009; MICHIELIN et al., 2009; MATIAS et al., 2013; SANTI et al., 2014)

Velde et al. (1982) isolaram e identificaram a partir do extrato em acetona das folhas de *V. curassavica* dois triterpenos com esqueleto damarano, os quais receberam os nomes cordialina A e cordialina B; também identificaram as flavonas artemetina (5-hidróxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona) e 5,6'-dihidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona. As estruturas dessas substâncias foram determinadas utilizando espectrometria no infravermelho (IV) e espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN de ^1H e ^{13}C). Ameira et al. (2009), identificaram em extrato metanólico das folhas de *V. curassavica* as isoflavonas 7,4'-diidróxi-5'-carbometóxi isoflavona e 7,4'-dihidroxi-5'-metil isoflavona, determinadas a partir de análises por IV, RMN de ^1H e espectrometria de massas (EM). Outras substâncias isoladas e identificadas a partir das folhas de *V. curassavica* incluem os compostos fenólicos ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido gálico, ácido rosmarínico e quercetina (Figura 1) (SERTIE et al., 1990,1991; MATIAS et al.,2013; SANTI et al., 2014).

Figura 1. Estruturas químicas de metabólitos secundários identificados em *V. curassavica*.



A: cordialina A; B: cordialina B; C: ácido gálico; D: artemetina; E: 5,6'-dihidróxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona; F: ácido caféico; G: ácido rosmarínico; H: ácido clorogênico; I: quercetina; J: 7,4'-diidróxi-5'-metil isoflavona; K: 7,4'-diidróxi-5'-carboximetóxi isoflavona. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

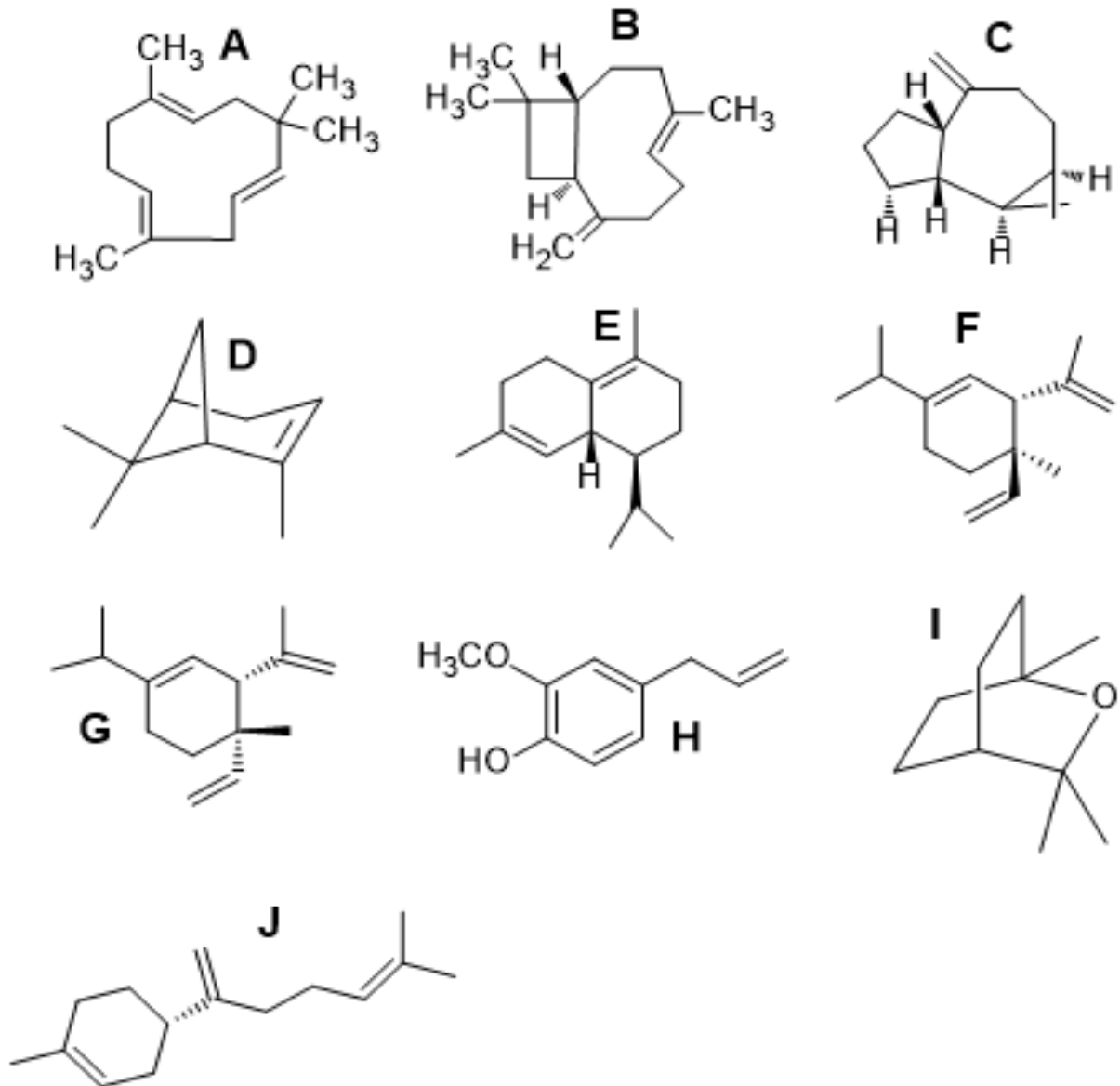
Análises por HPLC-UV e HPLC-MS, realizadas por nosso grupo de pesquisa, do extrato hidroetanólico 70% das folhas de *V. curassavica* (dados não publicados) demonstraram que uma das principais substâncias presentes é o ácido rosmarínico (Figura 1G). Isolado pela primeira vez por Scarpati e Oriente (1958) da espécie vegetal *Rosmarinus officinalis* L., de onde recebeu seu nome, é biossintetizado pela via dos fenilpropanoides a partir da 4-coumaroil-CoA e do ácido 4-hidroxifenil-lático, seguido

de oxidação, originando um éster formado por uma unidade de ácido cafeico ligado ao ácido 3,4-dihidroxifenil-lático (DEWICK, 2009). Sendo uma das substâncias majoritárias no extrato e tendo apresentado inúmeras atividades biológicas como antiviral, antibacteriano, anti-inflamatório e antioxidante, foi escolhido como um dos padrões analisados neste trabalho.

Pereira (2017) avaliou a variabilidade do metabolismo secundário de *V. curassavica*, utilizando o extrato etanólico das partes aéreas de 27 espécimes diferentes, obtendo rendimento do extrato de aproximadamente 5,2%(m/m). Foram analisadas por HPLC-PDA/UV em comprimento de onda de 254nm, as seguintes substâncias: 5,6'-dihidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona, artemetina, cordialina A e (*Z*)-cordialina A (chamada inicialmente de *cis*-cordialina A), as quais foram isoladas e purificadas para serem usadas como padrões cromatográficos. Foram quantificadas 5,6'-diidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona, (*Z*)-cordialina A e cordialina A nos extratos e encontradas as seguintes faixas de concentração: entre 1-8% para cordialina A; 0,5-2,5% para (*Z*)-cordialina A e 1-4% para 5,6'-diidroxi-3,6,7,3',4'-pentametoxiflavona.

Quanto aos componentes voláteis, o óleo essencial de erva-baleeira é composto principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos (Figura 2). Os principais constituintes do óleo essencial obtido de folhas frescas e determinado por GC-MS foram α -pineno (29,7 %), (*E*)-cariofileno (25,3 %), alloaromadendreno (10,0 %) e α -humuleno (4,6 %) (DE CARVALHO JR. *et al.*, 2004); outras substâncias identificadas foram β -elemeno, δ -elemeno, δ -cadineno, β -bisaboleno, 1,8-cineol e eugenol (SOUZA *et al.*, 2011; MATIAS *et al.*, 2016).

Figura 2. Estruturas químicas de metabólitos secundários do óleo essencial de folhas de *V. curassavica*.



A: α -humuleno; B: (*E*)-cariofileno; C: allo-aromadendreno; D: α -pineno; E: δ -cadineno; F: δ -elemeno; G: β -elemeno; H: eugenol; I: 1,8 cineole; J: β -bisaboleno. **Fonte:** Elaborado pelo autor.

Michielin et al. (2009) analisaram por GC-MS extratos das folhas de *V. curassavica* obtidos por extração em fluido supercrítico usando CO_2 , CO_2 / co-solvente e extratos obtidos por soxhlet, foram encontrados mais de 82 componentes nos extratos, sendo os principais α -curcumeno, calamaneno, aromadendreno, α -sesquifelandreno, espatulenol, α -humuleno, (*E*)-cariofileno, lupeol e artemetina. Vale ressaltar que o GC-MS detecta substâncias voláteis, em geral de baixa polaridade, por isso são

detectados componentes do óleo essencial no extrato, enquanto alguns componentes com maior polaridade como cordialina A e ácido rosmarínico não são detectados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais e equipamentos

Balança analítica: Marte[®], modelo AY220 (Max 220 g. min 0,01 g; d = 0,0001 g).

Cartucho para extração em fase sólida: Agilent SampliQ[®] C18 (15 x 10 mm; 55 µm).

Coluna cromatográfica para HPLC: ACE[®] (C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm)

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 1 (HPLC-UV, Perkin Elmer Flexar[®], modo analítico) bomba binária, degaseificador, injetor manual Rheodyne[®] de 6 pórticos com *loop* de 20, detector UV/VIS de comprimento de onda variável, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Chromera[®] 4.1.0.6386.

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência 2 (HPLC-PDA/UV, Waters Alliance[®], modo analítico): bomba quaternária, degaseificador, injetor automático, detector de arranjo de diodos, programa gerenciador do cromatógrafo e de dados Empower[®] 3.

Filtro de membrana: 0,22 µm, PVDF

Padrão de Ácido Rosmarínico: Toronto Research Chemicals, CAS: 20283-92-5

Padrão de Cordialina A: cordialina A (95,8%) isolada em HPLC-UV em modo preparativo, pela doutoranda Isabela Jacob Moro.

Programa de análise de dados e construção de gráficos: GraphPad Prism[®] 8, Microsoft[®] Excel 2016 e Minitab[®]19.

Solventes:

a) **Água ultrapura:** Merck Millipore[®], obtida em modelo Direct[®] – Q 3 UV.

b) **Solvente grau cromatográfico:** metanol J.T. Baker[®], ácido acético J.T. Baker[®]

Ultrassom: Unique[®], modelo USC – 2800, frequência 40 KHz.

4.2 Obtenção do extrato hidroetanólico 70% seco de folhas de *V. curassavica*

O extrato hidroetanólico 70% obtido por Romão (2016) foi produzido com folhas de *Varronia curassavica* Jacq. (Boraginaceae) coletadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas (UNICAMP), no distrito de Betel, Paulínia-SP (22°47'15.91"S 47°06'42.87"O) em 31 de outubro de 2013, entre as 11 h e 12 h (temperatura 27° C, umidade relativa do ar 65%, nublado); exsiccatas dos exemplares tombadas no Herbário São José do Rio Preto (IBILCE/UNESP) sob o número 31235. O material foi seco em estufa com circulação de ar à 40 °C por 72 horas e fragmentado em moinho de facas. Foi utilizado processo de extração por maceração em 3 etapas (24, 48 e 48 horas) utilizando etanol 70%. A relação droga vegetal/solvente total foi de 1:15 g/ml, sendo 1:5 g/mL em cada etapa. A solução extrativa foi filtrada em papel de filtro, concentrada em rotaevaporador e liofilizada, resultando no extrato hidroetanólico 70% seco.

O presente estudo está cadastrado (Anexo 1) no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético do Ministério do Meio Ambiente sob o número A55E317/2018 (Unesp, 48.031.918/0001-24).

4.3 Pré-tratamento das amostras e padrões para análise por HPLC-UV

A cordialina A (95,8%) utilizada como padrão foi isolada do extrato por técnicas cromatográficas e identificada por espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) e HPLC-MS no trabalho de doutorado de Isabela Jacob Mouro intitulado "Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória de metabolitos secundários de *Cordia verbenacea* A.DC. ", sob orientação

do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos, do mesmo grupo de pesquisa. Também houve a tentativa de isolar, identificar e utilizar um flavonoide como padrão, porém este não obteve pureza suficiente, resultando numa mistura de duas pentametoxiflavonas (identificadas também por RMN e HPLC-MS) e impossibilitando seu uso para fins de quantificação.

O pré-tratamento do extrato consistiu em EFS com sílica de fase reversa (FR), em cartucho Agilent SampliQ® (C-18; 15 x 10 mm, 55 µm), solubilizando cerca de 10 mg do extrato em 1 mL de metanol 95 % e eluídas com 4 mL de metanol 95 %, sob pressão, este processo foi repetido três vezes (massa total de extrato = 33mg) e os filtrados resultantes reunidos. A amostra foi seca em capela sob fluxo de ar e em dessecador com sílica gel sob pressão reduzida, solubilizadas em metanol: água 50:50 (v/v) na concentração de 10 mg/mL e filtradas em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®). Os padrões ácido rosmarínico e cordialina A, além da mistura de pentametoxiflavonas, foram solubilizados na mesma mistura em concentração de 1,0 mg/mL e filtrados em membrana (0,22 µm, PVDF Millipore®) originando a solução matriz, a partir desta foram feitas diluições nas seguintes concentrações: 0,031; 0,072; 0,125; 0,25; 0,5; 0,75 e 1,0 mg/mL.

4.4 Desenvolvimento do método por HPLC-UV

Como ponto de partida foi utilizado o método descrito por Matias et al. (2013) e adaptado por Romão (2016), com as seguintes condições: coluna ACE® C18 (4,6 x 250 mm; 5 µm); fase móvel ácido acético 2% (A) e metanol (B) em modo gradiente: 0-2 min 5 % B, 2-10 min 5-25 % B, 10-20 min 25-40 % B, 20-30 min 40-50 % B, 30-40 min 50-60 % B, 40-50 min 60-70 % B, 50-80 min 70-100 % B; vazão de 1,0 mL/min;

volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda selecionado em 254 nm.

A partir dessas condições cromatográficas, foram avaliadas modificações na fase móvel, incluindo o aumento na força de eluição (ϵ) inicial e alterações no tempo do gradiente, a fim de melhorar a resolução (R_s) do cromatograma, principalmente na parte inicial da análise (primeiros 30 min), onde os picos estavam com baixa R_s .

4.5 Validação do método

No processo de validação parcial foram avaliados os parâmetros: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e limite de quantificação, segundo as normas estabelecidas pela ANVISA por meio da Resolução RDC n. 166/2017 (BRASIL, 2017). Foram utilizados padrões das substâncias majoritárias comercial no caso do ácido rosmarínico e purificada por HPLC-UV preparativa no caso da cordialina A. Para as análises foi utilizado HPLC-PDA/UV da marca Waters Alliance®.

Os perfis cromatográficos obtidos foram tratados matematicamente considerando-se os valores das integrais das áreas dos picos de interesse, para montagem de curvas analíticas (método do padrão externo) com os padrões cromatográficos e posterior quantificação no extrato hidroetanólico 70%.

Seletividade

A seletividade consiste na capacidade do método de diferenciar e quantificar o composto de interesse de outros compostos, sejam eles produtos de degradação, impurezas ou componentes da matriz. Para isso foi realizada a análise do espectro no UV dos picos referentes as substâncias quantificadas.

Linearidade

A linearidade pode ser definida como a capacidade de o método ter proporcionalidade entre as concentrações do analito e a resposta adquirida pelo sistema cromatográfico. Este parâmetro foi avaliado através de curva analítica.

A partir de solução matriz dos padrões de cordialina A e ácido rosmarínico, foram realizadas diluições seriadas no intervalo entre 0,031 e 1,000 mg/mL. Para realizar a curva foram utilizados sete níveis de concentração em triplicata.

As respostas analíticas foram avaliadas graficamente, com a obtenção de uma reta. Como critérios de aceitação foi utilizado coeficiente de correlação da curva acima de 0,99 e exatidão entre 85 e 115%.

Precisão e Exatidão

A precisão verifica a proximidade e a concordância entre as replicatas, enquanto a exatidão verifica a proximidade entre os valores encontrados com a concentração nominal. A precisão foi expressa por meio da repetibilidade e a exatidão pela relação entre a concentração média experimental e sua concentração teórica correspondente. Foram utilizadas 3 concentrações em triplicata: controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle de qualidade alto (CQA), sendo as concentrações respectivamente: 0,031, 0,500 e 1,000 mg/mL. Os valores de precisão devem ter desvio padrão relativo entre 0 e 15% e os de exatidão entre 85 e 115%.

Sensibilidade

A sensibilidade foi determinada a partir do limite de detecção (LD) que equivale a menor quantidade do analito em determinada amostra que pode ser detectada na amostra e do o limite de quantificação (LQ) equivalente a menor quantidade de analito

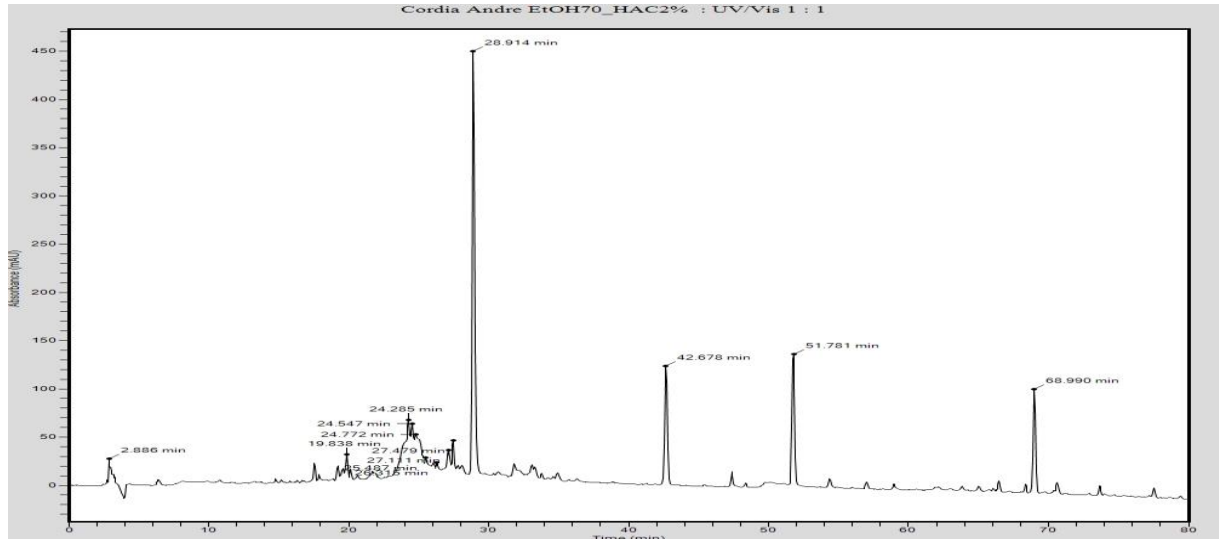
que pode ser quantificada com precisão e exatidão dentro da faixa considerada aceitável. Ambos podem ser determinados pela razão sinal-ruído, que deve ser maior que 2:1 ou matematicamente utilizando parâmetros da curva de calibração (intercepto com eixo x e coeficiente angular).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento do método

Romão (2016) desenvolveu o método cromatográfico usado como ponto de partida deste trabalho (Figura 3), a partir de dados da análise em gradiente exploratório (5-95% metanol em 30 min; C18) e do método desenvolvido por Matias et al. (2013). Foram considerados alguns pontos do método inicial: a) sua boa R_s entre 36-70 min, região que inclui analitos de interesse, flavonoides e triterpenos; b) a baixa R_s entre 18-36min, que teve grande enfoque no processo de otimização do método, já que esta região inclui o ácido rosmarínico e possivelmente outros fenilpropanoides e compostos fenólicos; o longo tempo de análise e a complexidade do gradiente.

Figura 3. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição inicial (Romão, 2016).



Condições cromatográficas: coluna ACE® C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo gradiente: 5% B (0-2 min); 5-25% B (2-10 min); 25-40% B (10-20 min); 40-50% B (20-30 min); 50-60% B (30-40 min); 60-70% B (40-50min); 70-100% B (50-80min); vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda em 254 nm. HPLC-UV PerkinElmer® Flexar. **Fonte:** Dados do autor.

A partir desse método foram testadas outras condições de fase móvel, variando ϵ (%B) e tempo de gradiente (t_G), objetivando uma melhor separação das substâncias

e, portanto, melhor R_s do cromatograma. As análises que mantiveram condições similares a Condição 1 nos últimos 40 min do gradiente segmentado, tiveram o tempo de análise da parte final do método diminuído com objetivo de reduzir o consumo de solvente e tempo de análise total durante o desenvolvimento do método, as condições avaliadas são descritas na tabela 1 e os cromatogramas em anexo.

Tabela 1. Condições de fase móvel avaliadas no desenvolvimento do método.

Condição ¹	Fase móvel (Gradiente)	Condição ¹	Fase móvel (Gradiente)
Condição 1	20-40% B (0-10min)	Condição 10	32-47% B (0-20min)
	40-50% B (10-20min)		47-60% B (20-30min)
	50-60% B (20-30min)		60-100% B (30-35min)
	60-70% B (30-40min)		100% B (35-45min)
	70-100% B (40-70min)		
Condição 2	20-50% B (0-20min)	Condição 11	35-45% B (0-20min)
	50-60% B (20-30min)		45-60% B (20-30min)
	60-70% B (30-40min)		60-100% B (30-35min)
	70-100% B (40-70min)		100% B (35-45min)
Condição 3	30-50% B (0-20min)	Condição 12	35-40% B (0-20min)
	50-60% B (20-30min)		40-60% B (20-30min)
	60-70% B (30-40min)		60-100% B (30-35min)
	70-100% B (40-70min)		100% B (35-45min)
Condição 4	35-50% B (0-20min)	Condição 13	35-42% B (0-20min)
	50-60% B (20-30min)		42-60% B (20-30min)
	60-70% B (30-40min)		60-100% B (30-35min)
	70-100% B (40-70min)		100% B (35-45min)
Condição 5	30-55% B (0-20min)	Condição 14	35-42% B (0-25min)
	55-60% B (20-30min)		42-60% B (25-30min)
	60-70% B (30-40min)		60-100% B (30-35min)
	70-100% B (40-70min)		100% B (35-45min)
Condição 6 A	35%B (0-20min)	Condição 15	35-42% B (0-27min)
	35-60% B (20-30min)		42-60% B (27-30min)
	60-70% B (30-40min)		60-100% B (30-35min)
	70-100% B (40-70min)		100% B (35-45min)
Condição 6B	38%B (0-20min)	Condição 16	35-42% B (0-30min)
	38-60% B (20-30min)		42-100% B (30-35min)
	60-100% B (30-35min)		100% B (35-45min)
Condição 6C	40%B (0-20min)	Condição 17	35-40% B (0-25min)
	40-60% B (20-30min)		40-60% B (25-30min)
	60-100% B (30-35min)		60-100% B (30-35min)
	100% B (35-45min)		100% B (35-45min)
Condição 7	30-45% B (0-20min)	Condição 18	35-40% B (0-30min)
	45-60% B (20-30min)		40-100% B (30-35min)
	60-100% B (30-35min)		100% B (35-45min)
	100% B (35-45min)		
Condição 8	32-45% B (0-20min)	Condição 9	30-47% B (0-20min)
	45-60% B (20-30min)		47-60% B (20-30min)
	60-100% B (30-35min)		60-100% B (30-35min)
	100% B (35-45min)		100% B (35-45min)

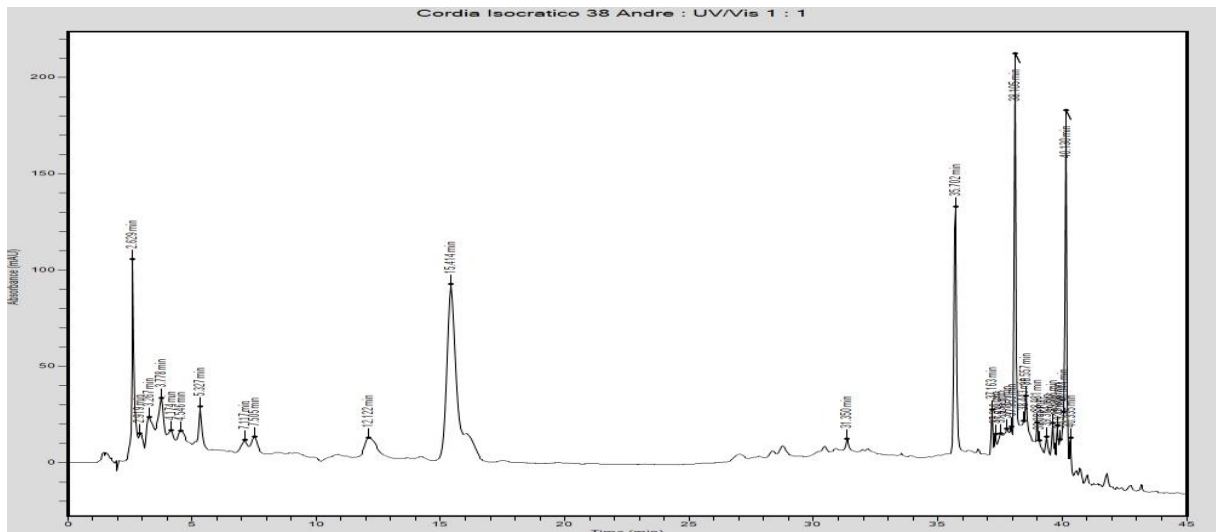
¹Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 (250 x 4,6 mm, 5 µm); fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B); volume de injeção de 20 µL e detector UV/Vis com comprimento de onda em 254 nm. HPLC-UV PerkinElmer[®] Flexar.

Fonte: Dados do autor.

Nos primeiros 10 min da condição inicial (Figura 3) não se observa presença de nenhum pico majoritário; optou-se, portanto, em aumentar a ϵ inicial (%B), assim eliminando a necessidade dos primeiros segmentos de gradiente (0-2min e 2-10min). O que se seguiu foi a variação da ϵ entre 0-30 min visando uma melhor R_s , em especial para o ácido rosmarínico. Quanto aos 40 min finais do método, apesar da boa resolução da condição inicial, optou-se por simplificá-la e diminuir os intervalos sem nenhum pico significativo.

As Condições 6A, 6B e 6C empregaram modo isocrático nos primeiros 20 min, porém não apresentaram resultados satisfatórios, já que considerando análise visual (Figura 4), a largura da banda do pico equivalente ao ácido rosmarínico (15,41 min) indica que podem existir substâncias coeluído, além de outros picos entre 3-8 min terem baixa R_s . Sendo assim, foi decidido testar outro segmento de gradiente neste intervalo (0-20 min) ao invés de condição isocrática (*gradient delay*).

Figura 4. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* condição 6B.



Condições cromatográficas: coluna ACE[®] C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m); fase móvel ácido acético 2 % (A) e metanol (B) em modo isocrático: 38% B (0-20 min); modo gradiente: 38-60% B (20-30 min); 60-100 % B (30-35 min); 100% B (35-40 min).; vazão de 1,0 mL/min; volume de injeção de 20 μ L e detector UV/Vis com comprimento de onda em 254 nm. HPLC-UV PerkinElmer[®] Flexar. **Fonte:** Dados do autor.

A condição que melhor se encaixou nos objetivos deste trabalho foi a Condição 13 (Figura 5). Em relação ao método inicial, foi possível separar as substâncias que coeluiam com o ácido rosmarínico (t_R 18,27 min), simplificar o gradiente, melhorar a R_S da parte inicial (11- 34 min), diminuir os intervalos sem picos e o tempo de análise de 80 min para 70min. Visualmente o método mostrou boa R_S ($\geq 1,25$ ou 1,5) para os analitos de interesse.

Figura 5. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 13.

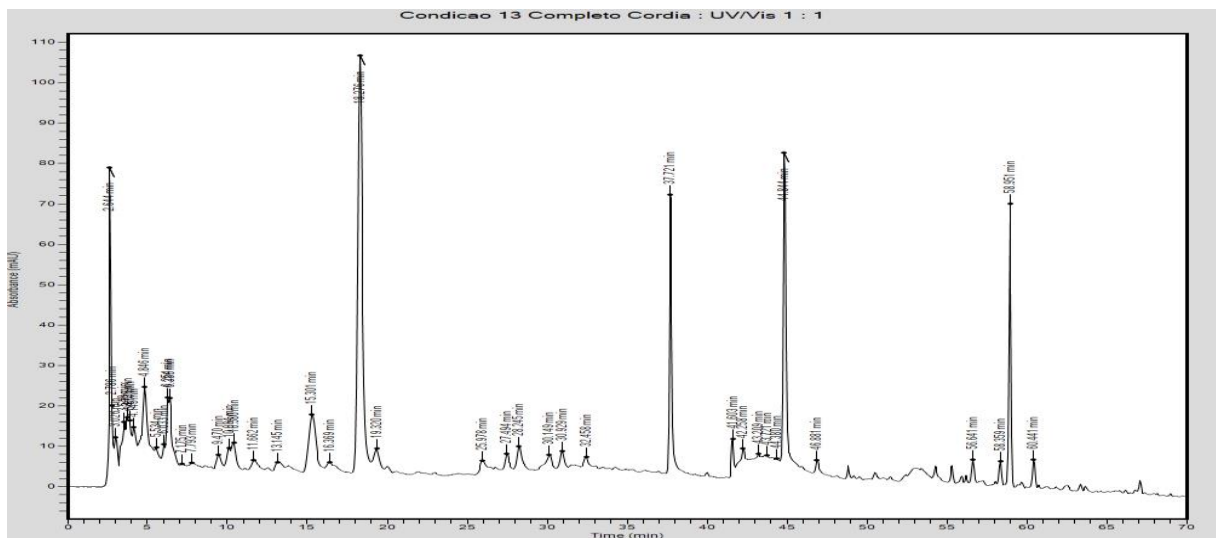
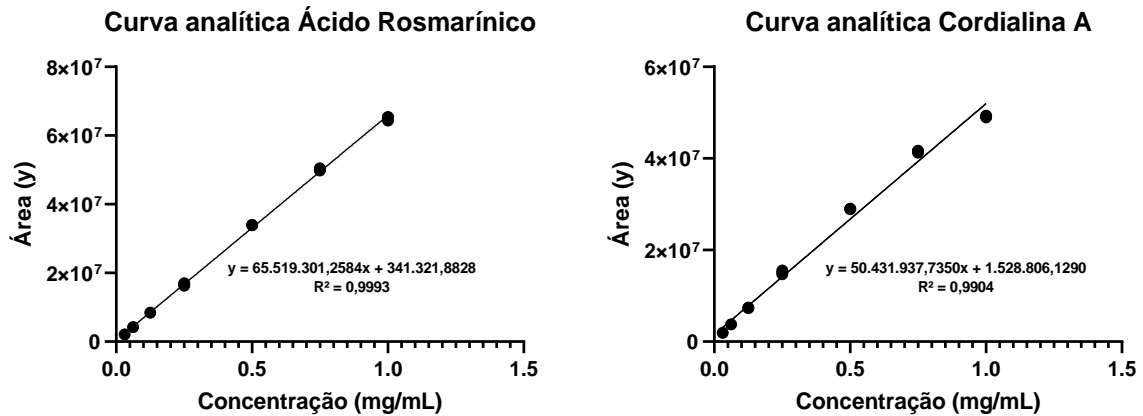


Figura 6. Curvas analíticas do ácido rosmarínico e da cordialina A. Dados obtidos em HPLC-PDA/UV.



Fonte: Dados do autor.

Apesar dos resultados apresentarem relação linear aparente e valores de coeficiente de correlação (r) acima dos valores mínimos aceitos ($r > 0,990$), foi realizada a avaliação das variâncias (teste de hipóteses). A variância dos resultados de y para cada valor de x pode ser constante e os dados considerados homocedásticos ou no caso de alterações de variância, os dados serão considerados heterocedásticos.

Para a estimativa da equação é recomendado o MMQ, o qual pode ter um fator de ponderação caso os dados sejam heterocedásticos ou ser aplicado diretamente se os dados forem homocedásticos. Nos modelos considerados heterocedásticos, o fator de ponderação normaliza a tendência da reta em sua amplitude e gera coeficientes considerados aceitáveis (BRASIL, 2017b).

Para avaliar a homocedasticidade dos dados foi utilizado o Teste de Cochran, o qual testa duas hipóteses: H_0 (variâncias são iguais) e H_1 (pelo menos uma variância é diferente). O valor calculado ($C_{\text{calculado}}$) é comparado a um valor tabelado (C_{tabelado}) de acordo com o número de pontos e réplicas do experimento, ao nível de significância de 5%, caso o valor de $C_{\text{calculado}}$ seja menor do que o valor de C_{tabelado} , os

dados são homocedásticos e é aceita a hipótese de igualdade das variâncias, sendo o valor de $C_{\text{calculado}}$ maior que o de C_{tabelado} , os dados são heterocedásticos e a hipótese de igualdade das variâncias é rejeitada, os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 2. Resultados do teste de Cochran para avaliação da homocedasticidade para os padrões de cordialina A e ácido rosmarínico.

Composto	C_{tabelado}	$C_{\text{calculado}}$	Conclusão
ácido rosmarínico	0,2705	0,6456	Heterocedástico
cordialina A	0,2705	0,5858	Heterocedástico

Fonte: Dados do autor.

De acordo com os resultados, os dados dos dois padrões são heterocedásticos e, portanto, foi utilizado o fator de ponderação $1/y^2$ no programa GraphPad Prism 8[®] que gerou novas equações de reta e novos valores para r (Tabela 4).

Tabela 3. Equações de retas gerada pelo programa GraphPad Prism[®] após o teste de Cochran apontar heterocedasticidade dos padrões Ácido Rosmarínico e Cordialina A.

Padrão	Equação da reta	r
ácido rosmarínico	$y = 66.730.000x + 32.428$	0,9998
cordialina A	$y = 55.397.849x + 264.349$	0,9970

Fonte: Dados do autor

O passo seguinte foi a avaliação do coeficiente angular das equações. Para o coeficiente angular foi utilizado o teste F da Anova no qual são testadas as hipóteses: H_0 (coeficiente angular igual a zero) e H_1 (coeficiente angular diferente de zero). De acordo com os resultados, os valores de F calculado (Tabela 4) são maiores que os valores tabelados para ambos padrões, sendo assim H_0 é rejeitado e os coeficientes podem ser considerados angulares e diferentes de 0 ao nível de significância de 5%.

Tabela 4. Resultados do teste F da ANOVA, avaliação do coeficiente angular dos padrões Ácido Rosmarínico e Cordialina A.

Padrão	F_{tabelado}	F_{calculado}	p-valor
ácido rosmarínico	4,3807	28996,9445	1,02351E-31
cordialina A	4,3807	1963,6724	1,21E-20

Fonte: Dados do autor.

Também deve-se avaliar o coeficiente linear e para isso é recomendado utilizar o teste t de Student, que testa as seguintes hipóteses: H₀ (coeficiente linear igual a zero) e H₁ (coeficiente linear diferente de zero), caso o valor calculado seja inferior ao tabelado e o p-valor superior a 0,05, rejeita-se H₁ comprovando que o coeficiente linear é igual a zero (BRASIL, 2017b).

A partir dos resultados apresentados na tabela 5, pode-se visualizar que o padrão ácido rosmarínico possui coeficiente linear estatisticamente igual a zero, porém o padrão cordialina A, possui valor calculado ligeiramente superior ao valor tabelado e p-valor inferior a 0,05, apresentando assim coeficiente linear diferente de zero. Porém, é possível observar que o valor do coeficiente linear é muito superior ao das concentrações testadas e não há interferência do diluente ou de outras substâncias, como é possível observar nos estudos de seletividade, assim o impacto deste resultado na linearidade do método pode ser desconsiderado.

Tabela 5. Resultados do teste t de Student para avaliação do coeficiente linear para os padrões de ácido rosmarínico e cordialina A.

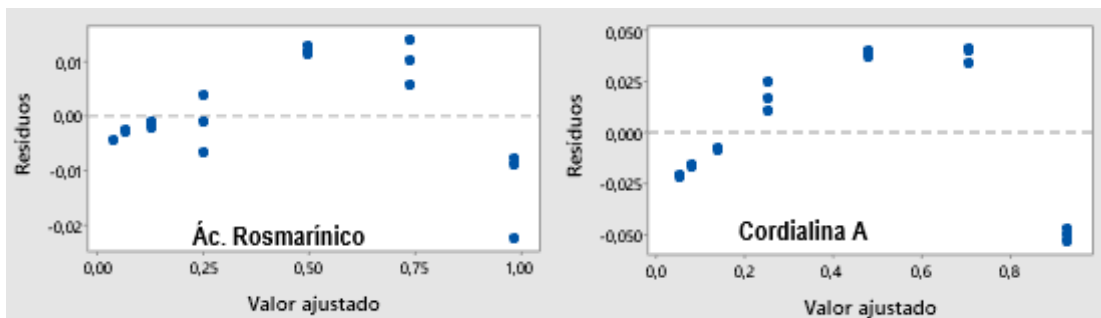
Composto	T_{tabelado}	T_{calculado}	p-valor
ácido rosmarínico	2,093024054	1,542805983	0,139369632
cordialina A	2,093024054	2,135148652	0,045987873

Fonte: Dados do autor.

Resíduo é definido como a diferença entre o valor de y encontrado e o estimado pela equação. A análise de resíduos tem como objetivo avaliar se os resíduos são independentes, tem distribuição normal e, portanto, o erro do modelo deve-se apenas

as variações comuns de análise. Recomenda-se a avaliação de resíduos visual e por testes estatísticos de normalidade. Para avaliação visual utilizou-se o gráfico de dispersão de resíduos (Figura 7), que inclui a distribuição dos resíduos em função da concentração e da resposta, sendo que valores fora da faixa esperada (usualmente entre -2 e 2) são considerados *outliers* (BRASIL, 2017b).

Figura 7. Análise gráfica dos resíduos dos padrões de ácido rosmarínico e cordialina A.



Fonte: Dados do autor.

O teste de Ryan-Joyner (RJ) avalia a normalidade da distribuição dos resíduos, as hipóteses testadas são: H0 (resíduos com distribuição normal) e H1 (resíduos com distribuição anormal).

Tabela 6. Resultados do teste Ryan-Joyner para os padrões de Ácido Rosmarínico e Cordialina A.

Padrão	Estatística RJ	P-valor
ácido rosmarínico	0,956	<0,01
cordialina A	0,961	<0,01

Fonte: Dados do autor.

Os valores encontrados mostram que não há distribuição normal em ambos padrões, já que estes possuem p-valor inferior a 0,01, confirmando a heterocedasticidade apontada no teste de Cochran. Para confirmar a presença de *outliers* foi realizado o teste de Grubbs, no qual o valor do resíduo padronizado deve estar dentro da faixa de valores tabelados (Tabela 8).

Tabela 7. Resultados do teste de Grubss para *outliers*.

Padrão	Valor tabelado	Resíduo padronizado
Ácido Rosmarínico	2,58 / -2,58	2,52
Cordialina A	2,58 / -2,58	1,69

Fonte: Dados do autor.

A partir dos resultados foi verificado que não existem *outliers* em nenhuma das curvas, o que confirma a distribuição normal dos resíduos.

Exatidão e Precisão

Foram avaliadas a exatidão e precisão (repetibilidade) utilizando três concentrações diferentes dos padrões de ácido rosmarínico e cordialina A em triplicata; controle de qualidade baixo (CQB), controle de qualidade médio (CQM) e controle de qualidade alto (CQA), sendo as concentrações respectivamente: CQB (0,031 mg/mL), CQM (0,5 mg/mL) e CQA (1,0 mg/mL), todos os resultados (Tabela 8) se apresentaram dentro da faixa considerada aceitável, entre 0 e 15% para precisão e entre 85 e 115% para exatidão (BRASIL, 2017).

Tabela 8. Dados sobre exatidão e precisão do método analítico.

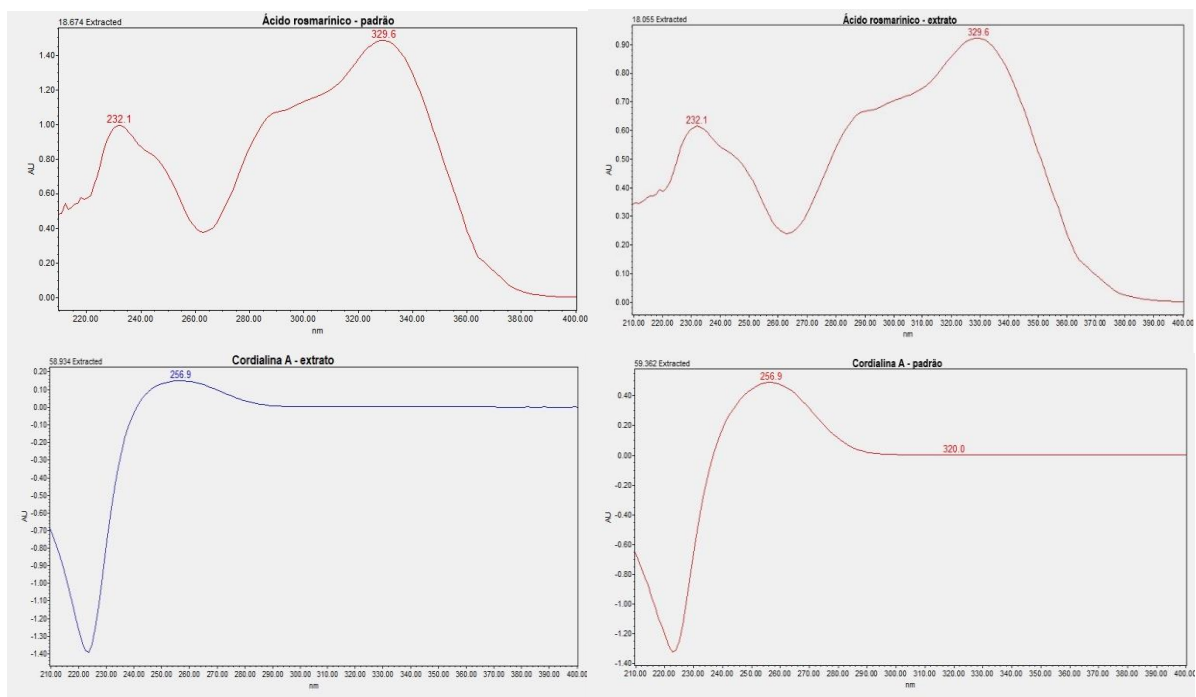
Padrão		CQB (0,031mg/mL)	CQM (0,5 mg/mL)	CQA (1,0 mg/mL)
ácido rosmarínico	Precisão (%)	0,130	0,134	0,692
	Exatidão (%)	99,38	101,57	97,34
cordialina A	Precisão (%)	3,48	0,31	0,29
	Exatidão (%)	97,19	103,45	88,27

Fonte: Dados do autor.

Seletividade

A seletividade do método foi avaliada utilizando detector de arranjo de diodos, no qual é possível observar o espectro de absorção em ultravioleta. Foram comparados os espectros do padrão e da amostra conforme a figura 9.

Figura 8. Espectro de absorção no UV amostra e padrão Ac Rosmarinico e Cordialina A.



Fonte: Dados do autor.

É possível observar grande similaridade entre os espectros da amostra e do padrão, o que nos leva a considerar que se trata da mesma substância.

Sensibilidade

A sensibilidade foi calculada a partir do Limite de Detecção (LD) e do Limite de Quantificação (LQ), sendo que ambos foram determinados matematicamente de acordo com as equações:

Equação 1

$$LD = \frac{3,3 \times \sigma}{S}$$

Equação 2

$$LQ = \frac{10 \times \sigma}{S}$$

Onde:

σ = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y de, no mínimo, três curvas analítica.

S = inclinação da curva analítica

Para o ácido rosmarínico foi encontrado LD = 0,0045mg/mL e LQ = 0,0136 mg/mL, para a cordialina A os valores encontrados foram LD = 0,0019 mg/mL e LQ = 0,0057 mg/mL.

Quantificação de Ácido Rosmarínico e Cordialina A do extrato hidroetanólico

A partir das equações de reta das curvas analíticas geradas pelos padrões de ácido rosmarínico e cordialina A, foi feita análise do extrato hidroetanólico 70% das folhas de *V. curassavica* 10mg/mL em triplicata e foi obtido teor (m/m) de 5,0% com desvio padrão (DV=0,01%) para o ácido rosmarínico e 1,1% (DV=0,06%) para cordialina A.

6 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um novo método para determinação e quantificação de metabólitos secundários em extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica*. O método desenvolvido apresentou boa R_s das substâncias utilizadas como padrão (ácido rosmarínico e cordialina A) e também para flavonoides presentes no extrato, que não foram quantificados por falta de padrão analítico. O método foi validado parcialmente, adaptando o que preconiza a RDC ANVISA nº 166/2017 para melhor se adequar a análise de extratos vegetais, apresentando parâmetros de linearidade, sensibilidade, exatidão e precisão dentro dos valores de referência. Os teores de ácido rosmarínico e cordialina A foram 5,0% (DV=0,01%) e 1,1% (DV=0,06%), respectivamente.

REFERÊNCIAS

ACHÉ. **Aché**, 2015. Apresentação do produto. Disponível em: <http://www.ache.com.br/produtos/ache-sob-prescricao/acheflan-aerossol-388/> ou <http://www.ache.com.br/produtos/ache-sob-prescricao/acheflan-creme-4/>. Acesso em: 14 dez 2019.

AMEIRA, O. A. et al. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 1, p. 7-11, 2009.

BARROSO, I.C.E. et al. O gênero *Cordia* L.: Botânica, química e farmacologia. **Revista Lecta**. v. 20, n. 1, p. 07-14, 2002.

BAYEUX, M.C. et al. Evaluation of the antiedematogenic activity of artemetin isolated from *Cordia curassavica* DC. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1229-1232, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada RDC - Nº 166. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, nº141, de 25 de julho de 2017.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução ANVISA RDC n. 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 10 mar. 2010a. Seção 1, p. 52.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: Anvisa, 2011. 126p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Guia para Tratamento Estatístico da Validação Analítica**. 2017. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2017/publicado-guia-para-tratamento-estatistico-de-validacao-analitica>>

BRASIL. Ministério da saúde. MS elabora relação de plantas medicinais de interesse ao SUS. **RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/noticias-anteriores-agencia-saude/3487-ms-elabora-relacao-de-plantas-mediciniais-de-interesse-ao-sus>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

CARVALHO JÚNIOR, P. M. DE et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 297-301, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. New York – NY/USA: John Wiley and Sons, 2009.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228-236, 2007.

GOBBO-NETO, L. et al. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

LADEIRA, R. S. et al. **Preparação do extrato seco de *Cordia verbenacea***. Monografia (Especialização). Porto Alegre, 2002. Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos, Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, Porto Alegre.

LEAL-COSTA, M. V. et al. Anatomia foliar de *Varronia curassavica* Jacq. (Cordiaceae). **Revista Fitos**, v. 11, n. 1, p. 33-39, 2017.

LIMA, H. R. P. et al. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenoides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LORENZI, H. et al. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2002.

MATIAS, E. F. F. et al. Atividade antibacteriana *In vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, n. 3, p. 294-298, 2010.

MATIAS, E. F. F. et al. Modulation of the norfloxacin resistance in *Staphylococcus aureus* by *Cordia verbenacea* DC. **Indian Journal Of Medical Research**, v. 137, p. 178-182, 2013.

MATIAS, E. F. F. et al. Biological activities and chemical characterization of *Cordia verbenacea* DC. as tool to validate the ethnobiological usage. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

MATIAS, E. F. F. et al. Seasonal variation, chemical composition and biological activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) and the sabinene. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 45-53, 2016.

MATOS, D. O. et al. Determinação de ácido rosmarínico em *Cordia verbenacea* por cromatografia líquida: aplicabilidade em estudo sazonal. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n.4, p. 857-864, 2015.

MEDEIROS, R. et al. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, p. 618-627, 2007.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Cordia verbenacea* extracts obtained by different methods. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 6615-6623, 2009.

MICHIELIN, E. M. Z. et al. Radical-scavenging activity of extracts from *Cordia verbenacea* DC obtained by different methods. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 56, p. 89-96, 2011.

MONTANARI JUNIOR, I et al. **Variabilidade genética em uma população de *Cordia verbenacea* DC. para características agronômicas e fitoquímicas.** Orientador: Norberto da Silva. 2011. Tese (Doutorado em Agronomia/ Horticultura) – Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

OLIVEIRA, A. A. M. et al. Hematological evaluation of the ethanol extract of *Cordia verbenacea* leaves. **Fitoterapia**, v. 65, p. 387–390, 1998.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 323-333, 2006.

PEREIRA, J. A. S. et al. **Avaliação da variabilidade do metabolismo secundário em *Cordia Verbenacea* DC.** Orientador: André dos Santos Gonzaga. 2017. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas/ Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2017.

PETERSEN, M. et al. Rosmarinic acid. **Phytochemistry**, v. 62, n. 2, p. 121–125, 2003.

PINHO, L. et al. Antimicrobial activity of hydroalcoholic extracts from rosemary, peppertree, barbatimão and erva baleeira leaves and from pequi peel meal. **Ciência Rural**, v. 42, n.2, 2012.

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

RODAL, M. J. R et al. Levantamento florístico da floresta serrana da Reserva Biológica de Serra Negra, microrregião de Itaparica, Pernambuco, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16(4), p. 481-500, 2002.

ROLDÃO, E.F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 94-98, 2008.

ROMÃO, G. B. et al. **Estudo *in vitro* da ação de extrato hidroetanólico de *Cordia verbenacea* DC. em espécies reativas de oxigênio de importância biológica.** Orientador: André dos Santos Gonzaga. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2016.

SANTI, M. M. et al. Determinação do perfil fitoquímico de extrato com atividade antioxidante da espécie medicinal *Cordia verbenacea* DC. por HPLC-DAD. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 256-261, 2014.

SCARDELATO, J. A. et al. *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae): quality control parameters, phytochemical screening and evaluation of anti-*Candida* activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, n.4, p.837-843, 2016.

SERTIÉ, J. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*. Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extract of the leaves. **Planta Medica**, Stuttgart, n. 54, v. 1, p. 7-10, 1988.

SERTIÉ, J. A. et al. Antiinflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 56, n. 1, p. 36-40, 1990.

SERTIÉ, J. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* III: oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 239-247, 1991.

SERTIÉ, J. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effect and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, v. 12, p. 338-344, 2005.

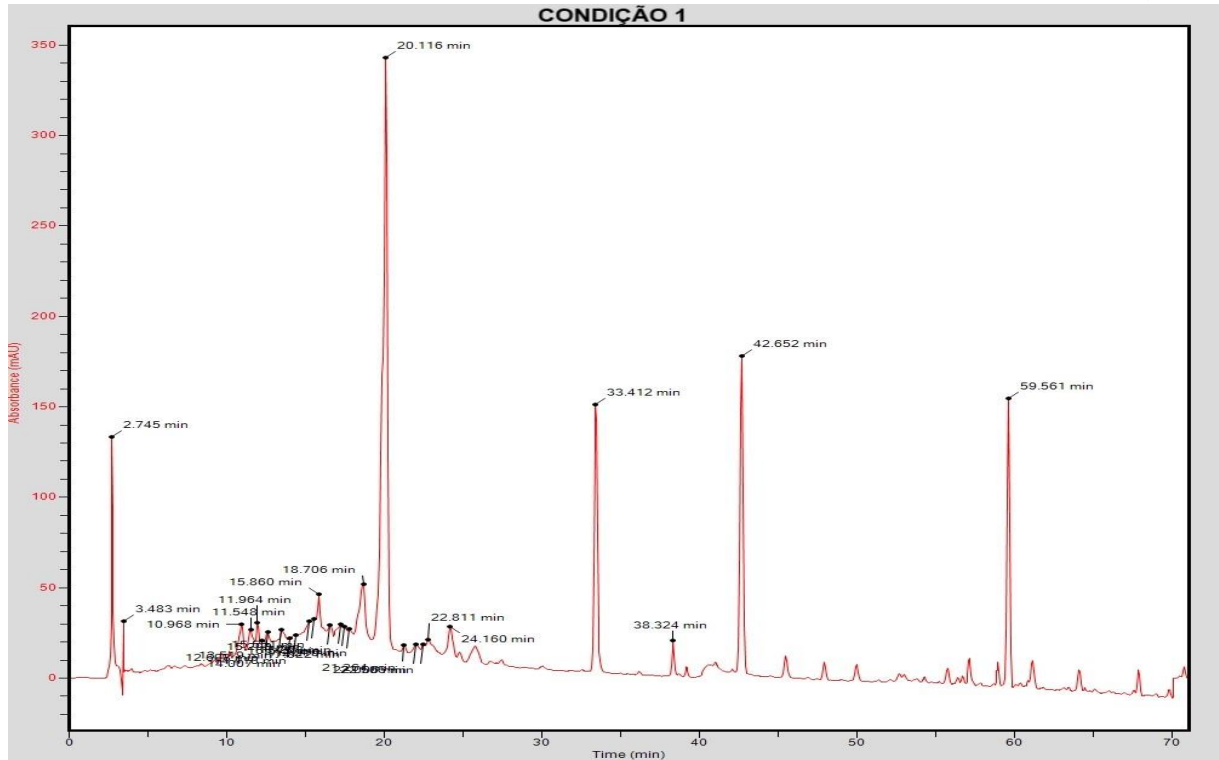
SOUZA, M. F. DE et al. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Biotemas**, v. 24, n. 1, p. 9-14, 2011.

VELDE, V. V. et al. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions**, v. 1, p. 2697-2700, 1982.

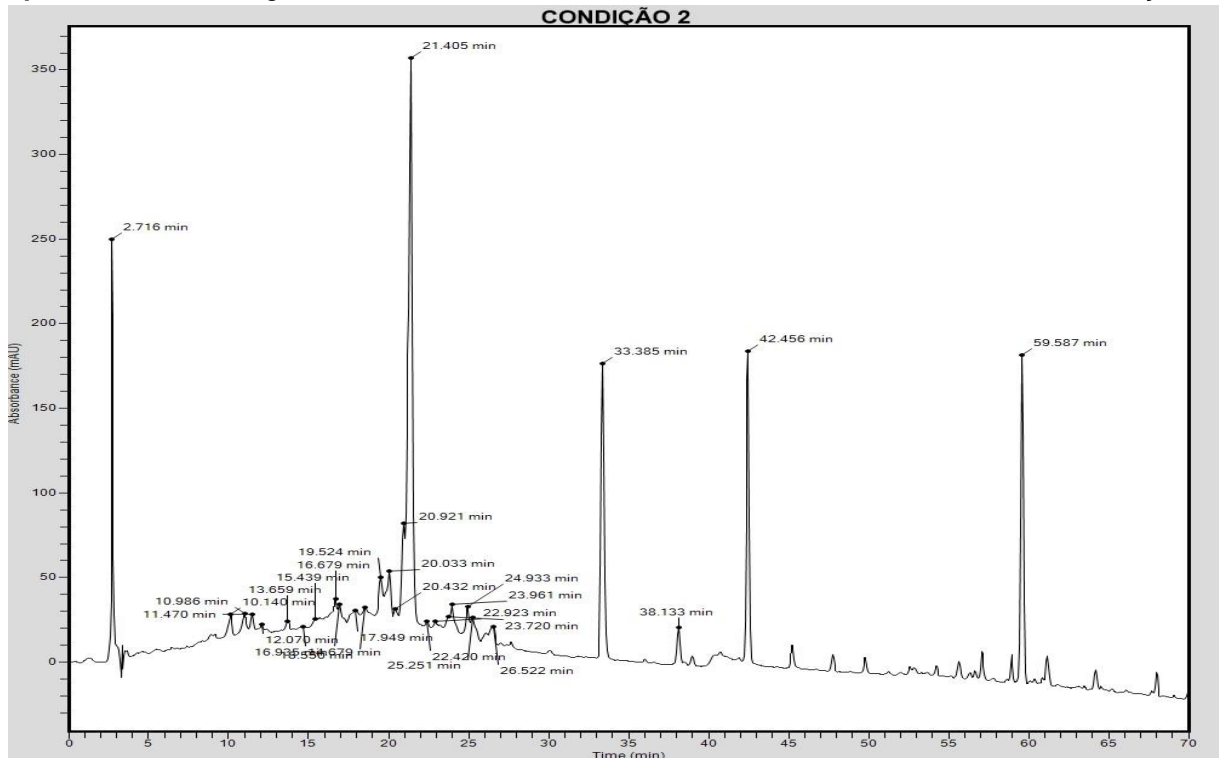
VENTRELLA, M. C. et al. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (Boraginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 31, n. 3, p. 457-467, 2008.

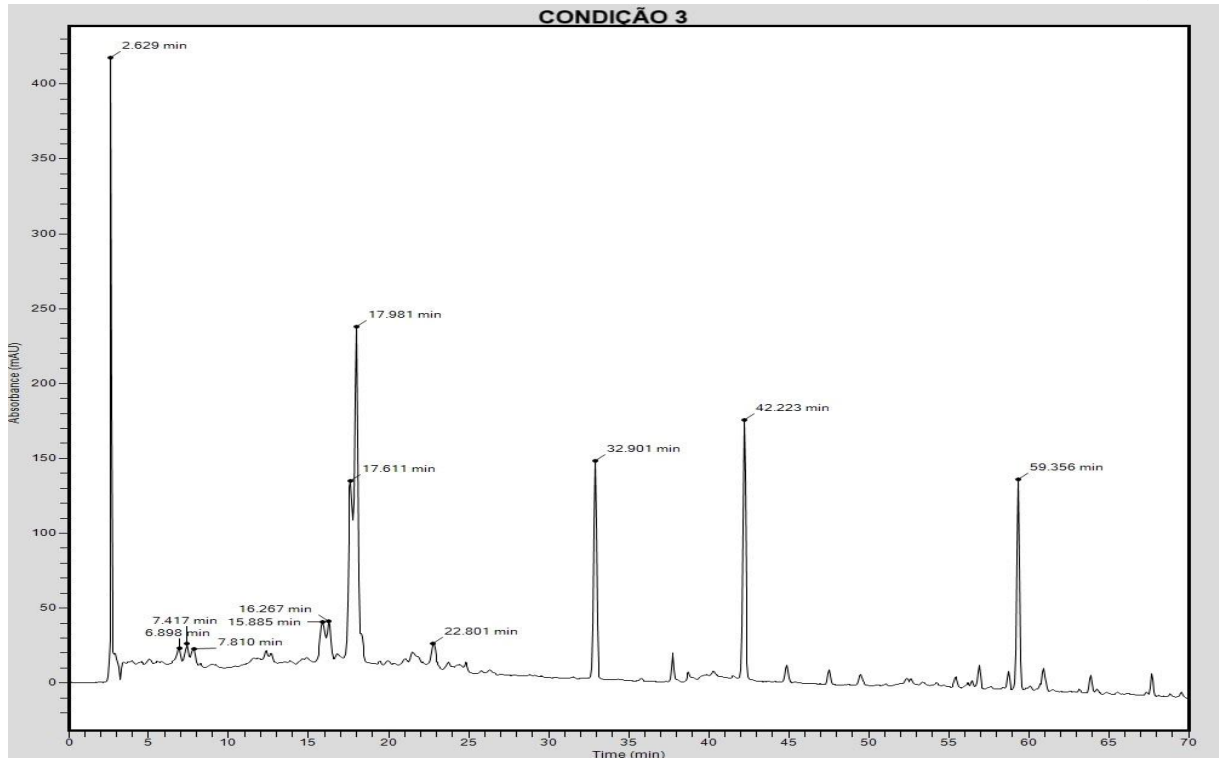
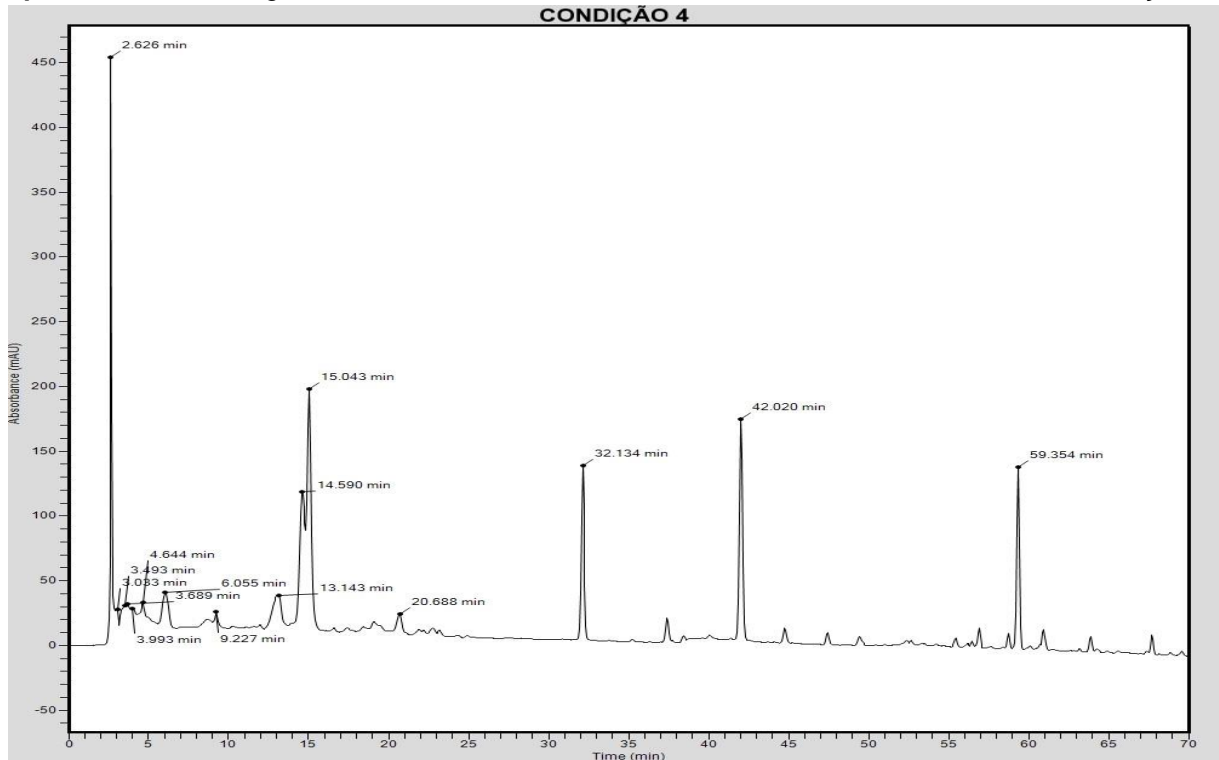
Apêndices

Apêndice 1. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 1.

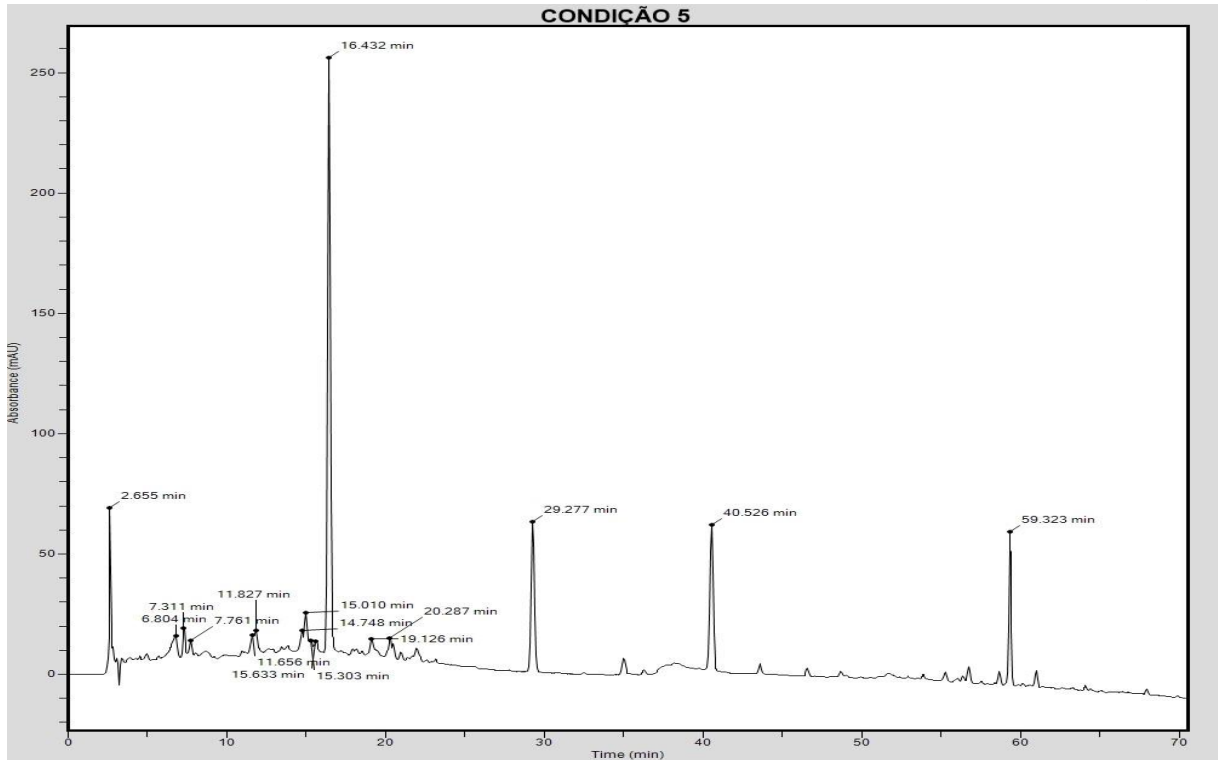


Apêndice 2. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 2.

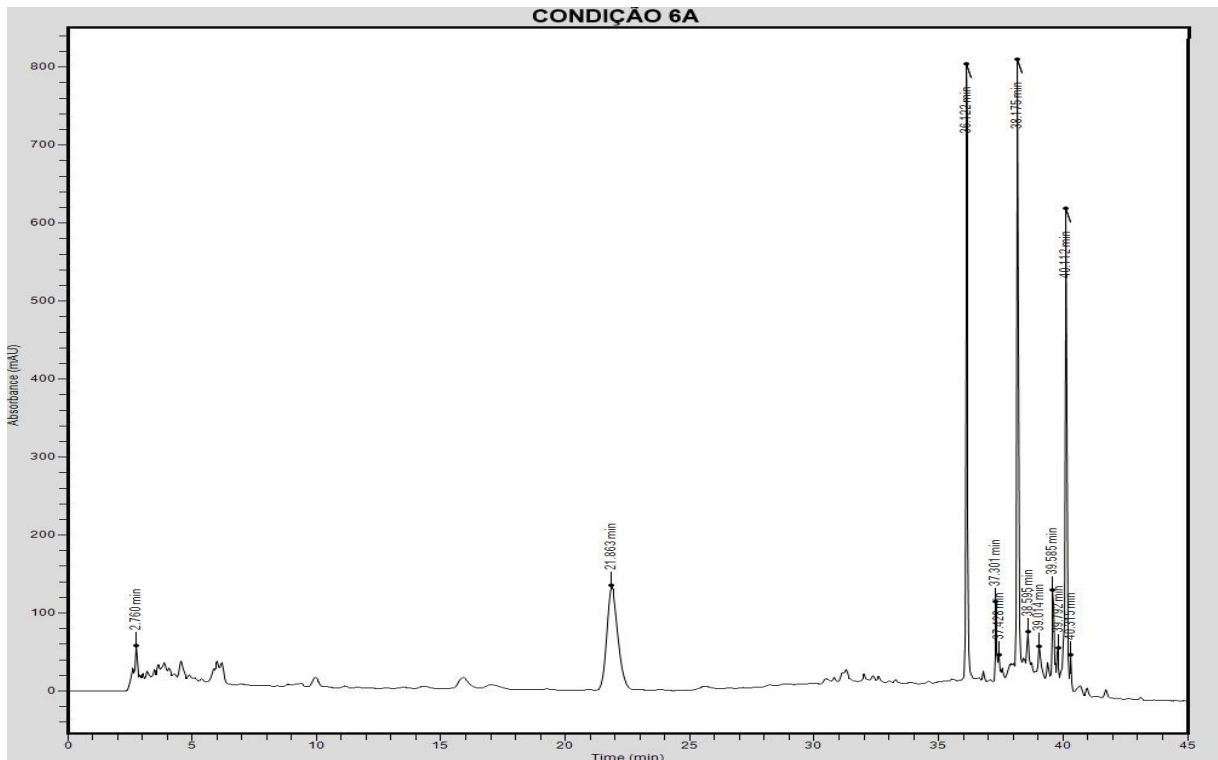


Apêndice 3. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 3.**Apêndice 4.** Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 4.

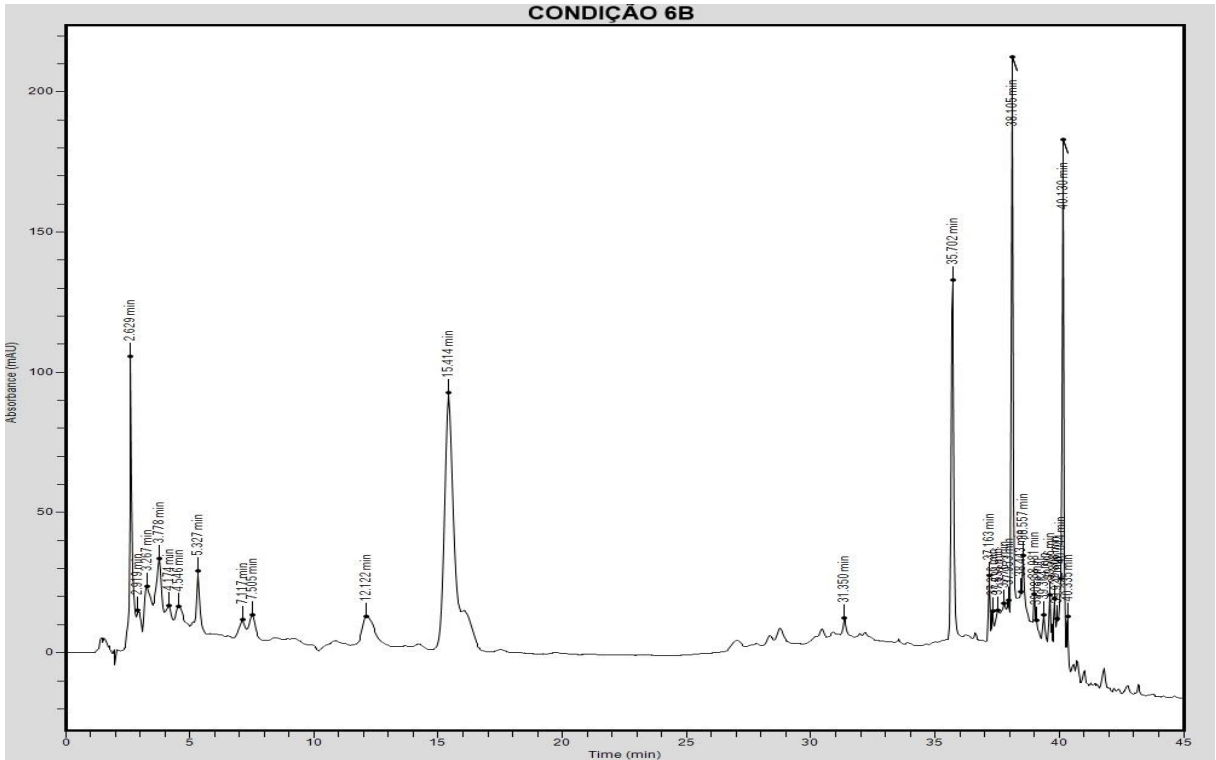
Apêndice 5. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 5.



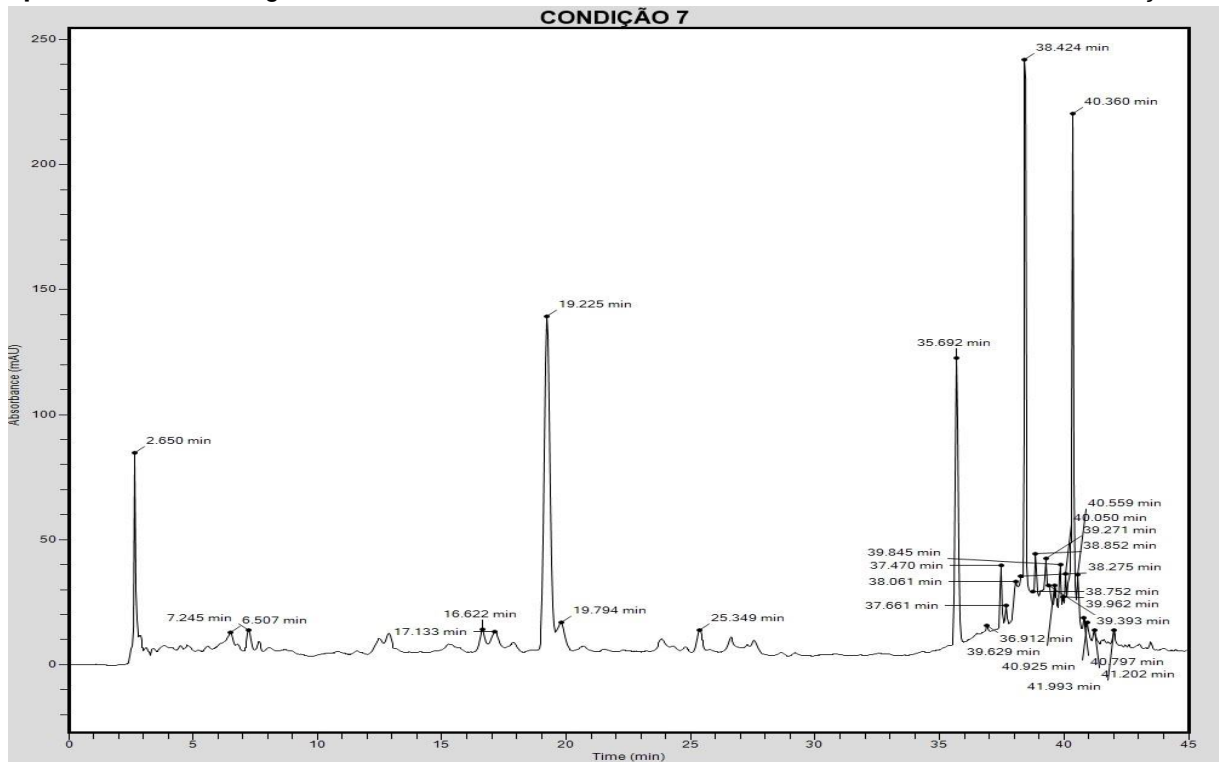
Apêndice 6. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 6A.



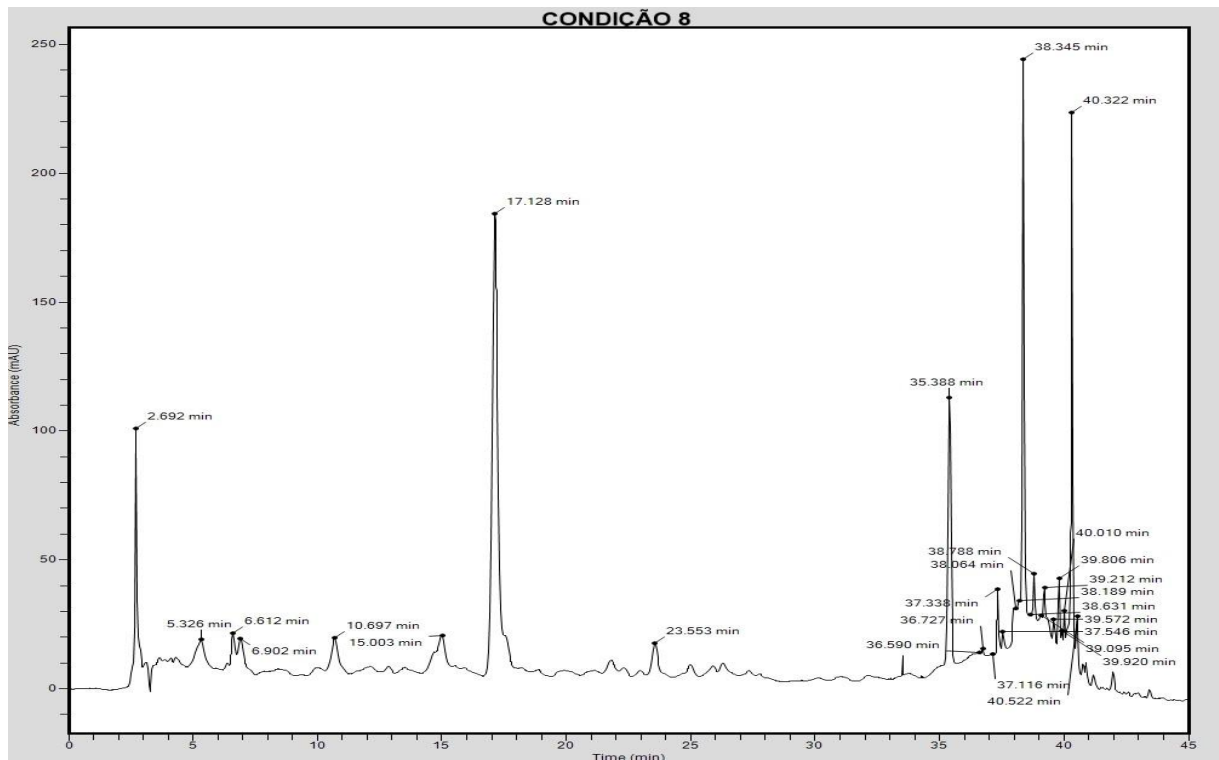
Apêndice 7. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 6B.



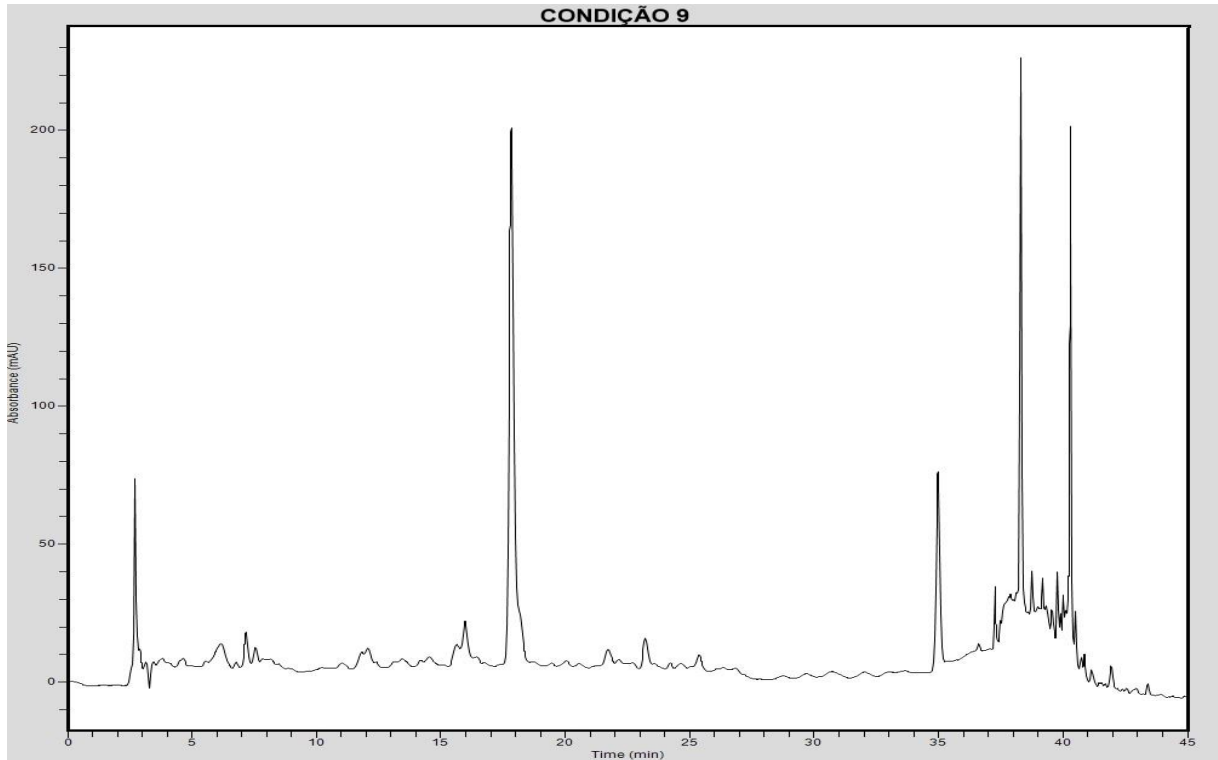
Apêndice 9. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 7.



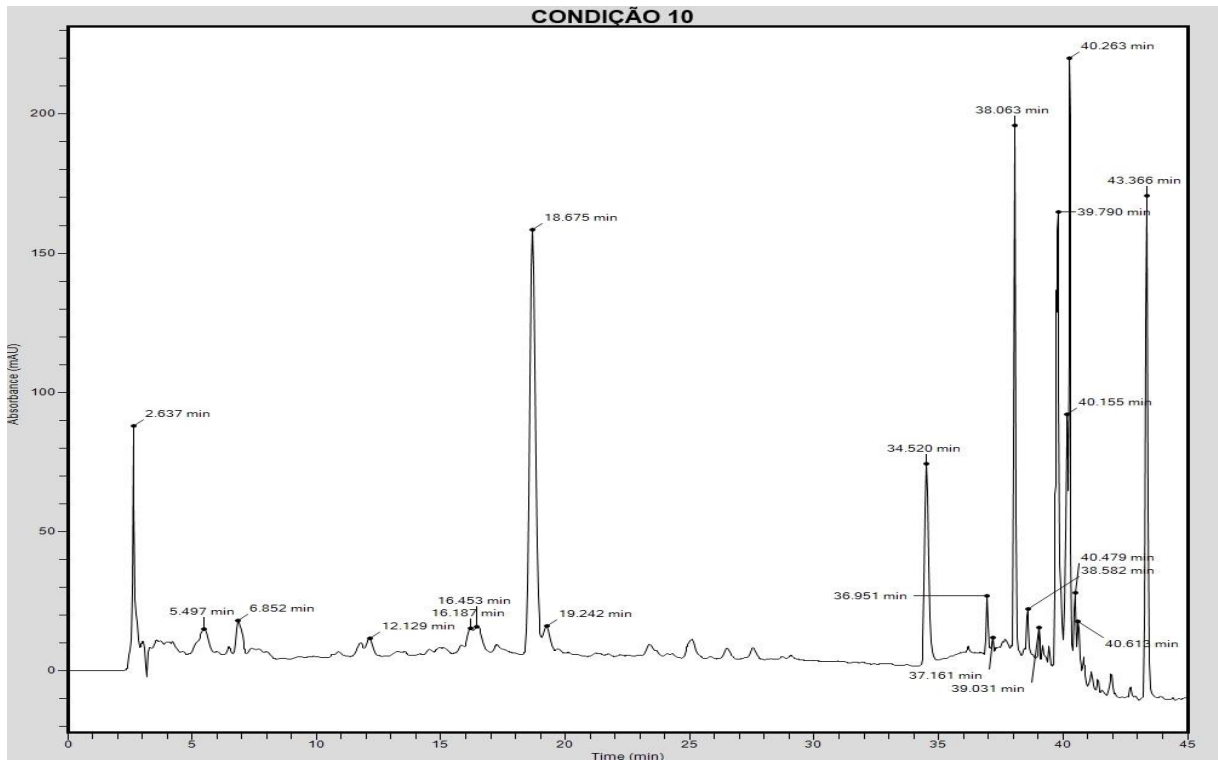
Apêndice 10. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 8.



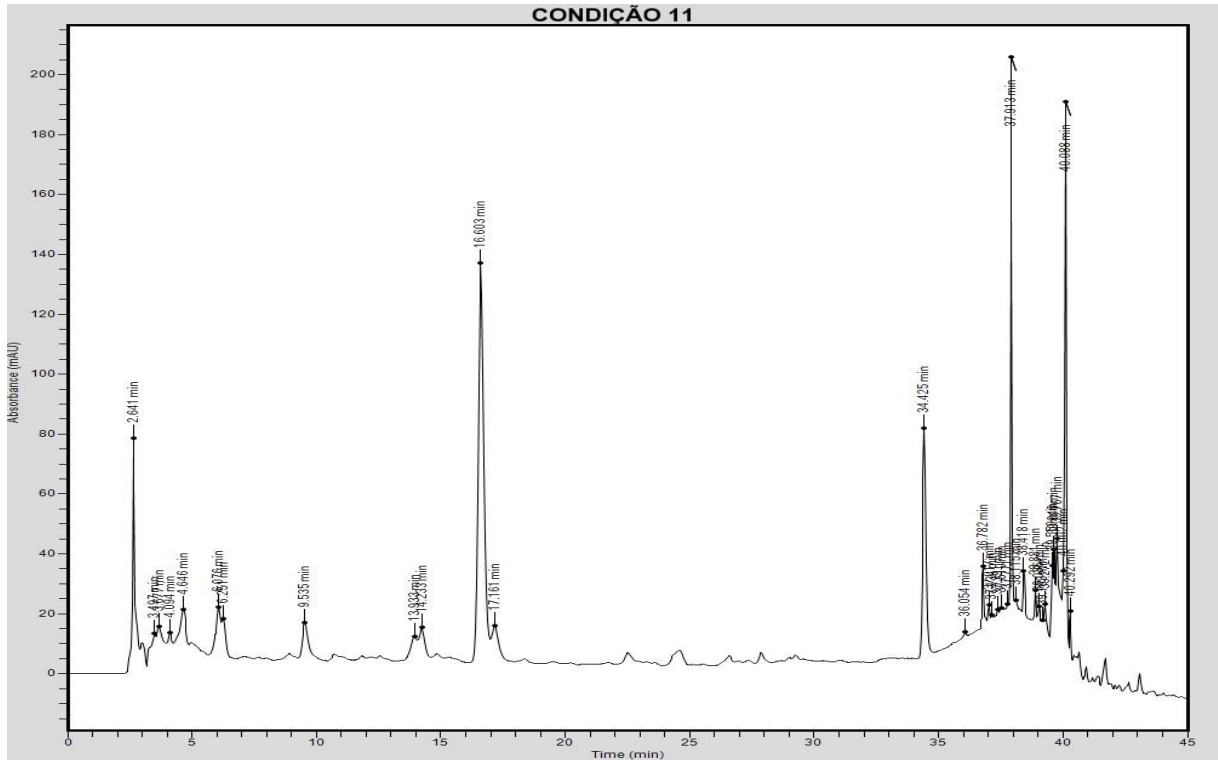
Apêndice 11. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 9.



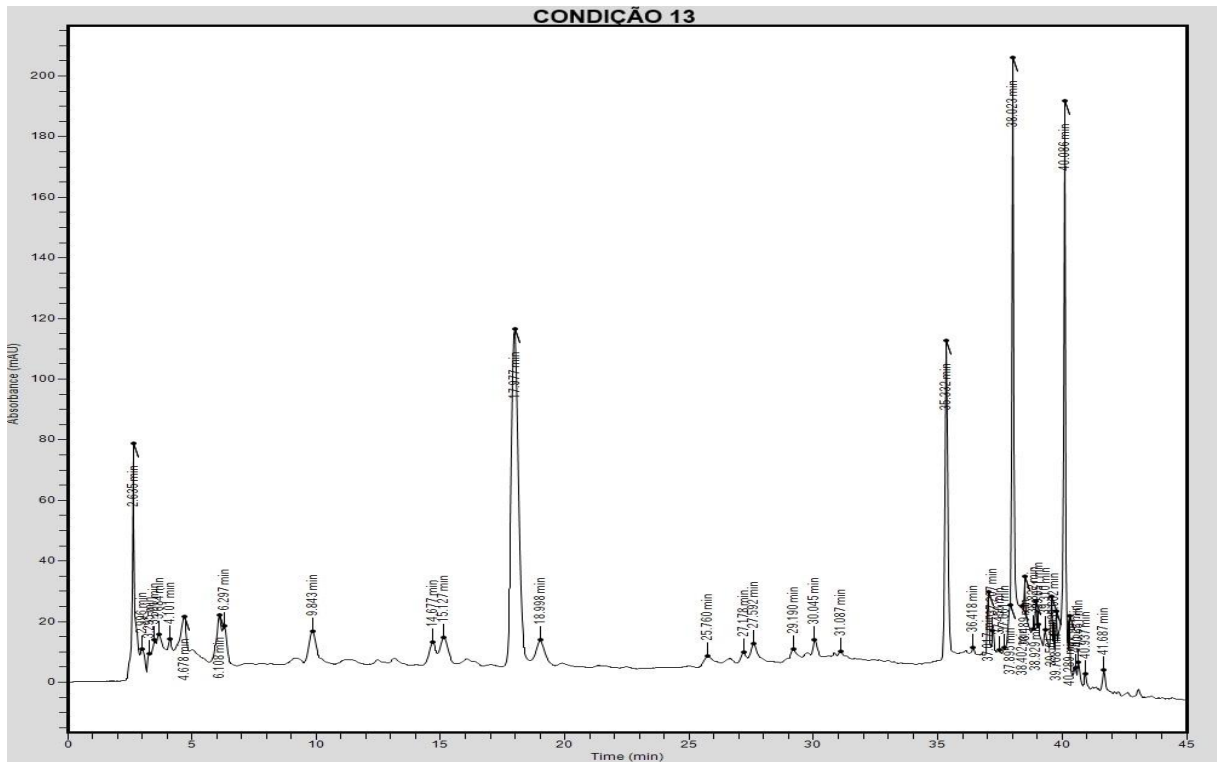
Apêndice 12. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 10.



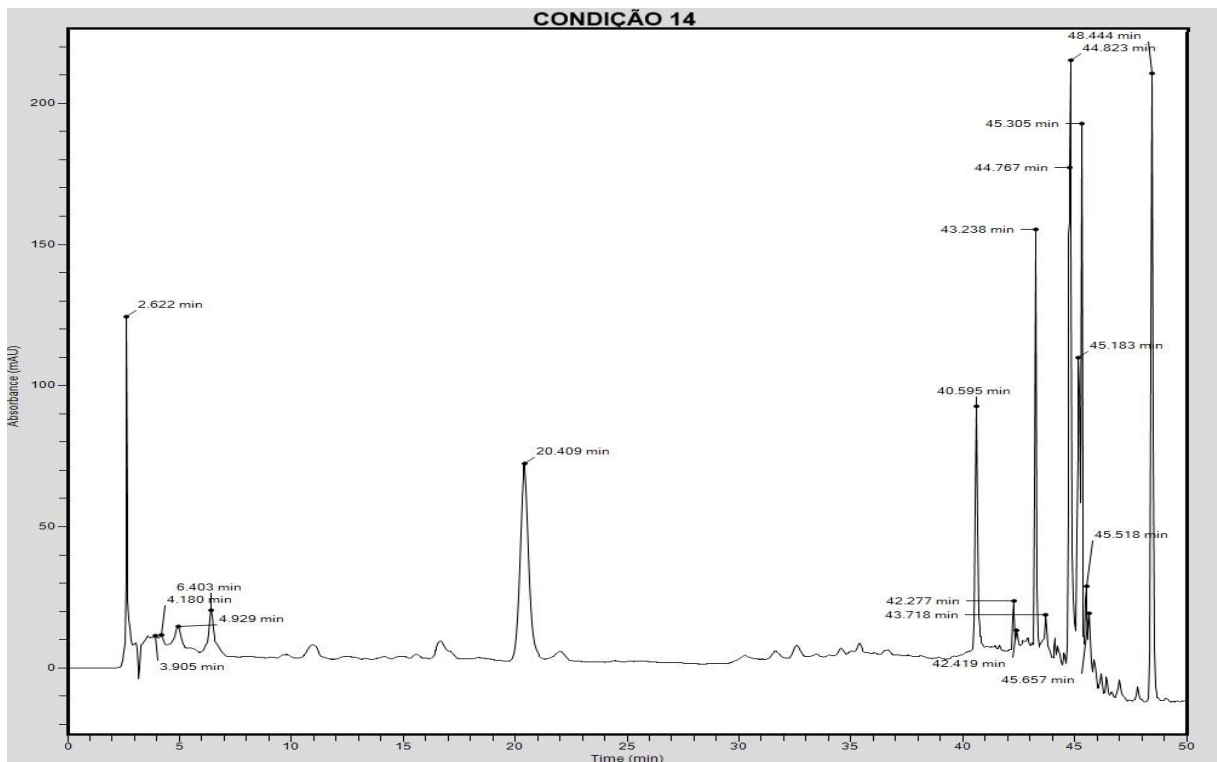
Apêndice 13. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 11.



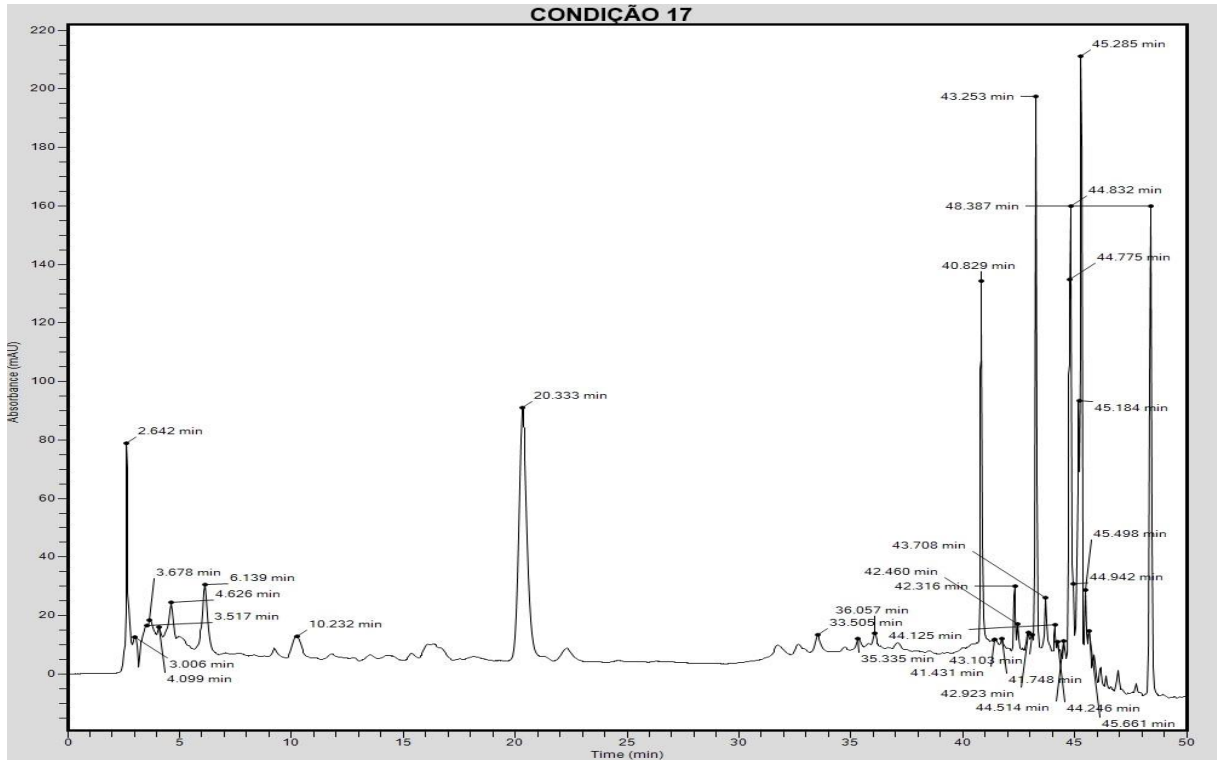
Apêndice 15. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 13.



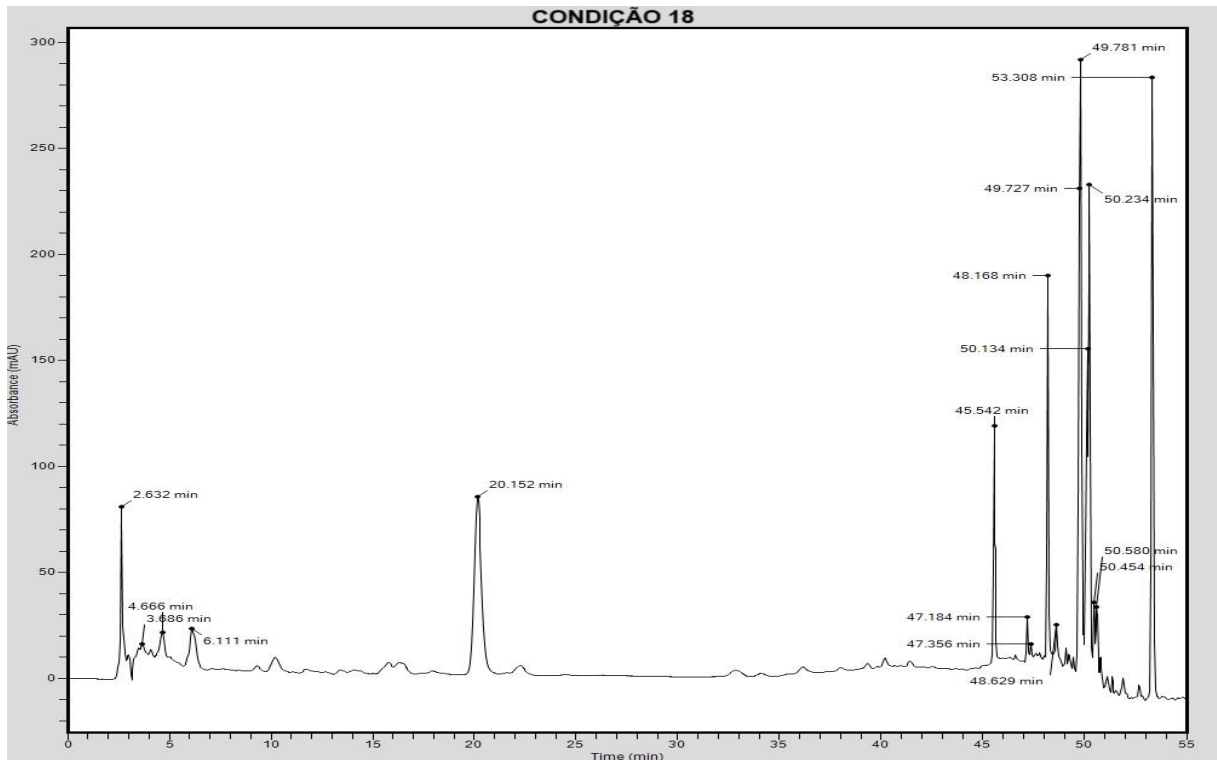
Apêndice 16. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 14.



Apêndice 19. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 17.



Apêndice 20. Cromatograma do extrato hidroetanólico 70% de folhas de *V. curassavica* na condição 18.



Anexo

Anexo 1. Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen).



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão
Cadastro nº A55E317

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A55E317**
 Usuário: **UNESP**
 CPF/CNPJ: **48.031.918/0001-24**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Cordia verbenacea

Título da Atividade: **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antioxidante e anti-inflamatória de metabólitos secundários de Cordia verbenacea A.DC.**

Equipe

André Gonzaga dos Santos	UNESP
Isabela Jacob Moro	UNESP
André Faibicher	UNESP
Winner Duque Rodrigues	UNESP

Data do Cadastro: **09/08/2018 08:05:51**
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 23:38 de 16/03/2021.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**