

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA
FILHO”**

FACULDADE DE CIÊNCIAS DE BAURU

OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
FINGERPRINTING METABÓLICO DAS FOLHAS DE ALCACHOFRA
POR CLAE-DAD COM APLICAÇÃO DOS PRINCÍPIOS DA QUÍMICA
ANALÍTICA VERDE**

BAURU - SP

2017

OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA
FINGERPRINTING METABÓLICO DAS FOLHAS DE ALCACHOFA
POR CLAE-DAD COM APLICAÇÃO DE PRINCÍPIOS DA QUÍMICA
ANALÍTICA VERDE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para a
obtenção do grau de Licenciatura em
Química pela Faculdade de Ciências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” – Campus de Bauru.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

BAURU - SP

2017

ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO – TCC.

No dia 11 de dezembro de 2017, às 19 horas, a Banca constituída pelos Professores abaixo relacionados, reuniram-se para avaliar o TCC / Monografia Intitulado:

"Desenvolvimento de Método Analítico para Fingerprinting Metabólico das Folhas de Alcachofra por Clae-Dad com Aplicação dos Princípios da Química Analítica Verde".

Daniel Rinaldo

Maiara Stefanini Borges Caires

Laura Teófilo Ferreira

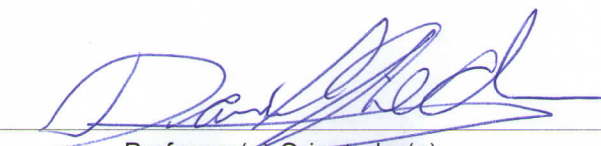
Nome do(a) aluno(a): OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA.

Aberta a sessão pelo presidente (orientador) da mesma, coube ao acadêmico, na forma regimental, expor o tema do TCC, findo o que dentro do tempo regulamentar, foi questionado pelos membros da Banca Examinadora e, em seguida deu as explicações que se faziam necessárias. As notas atribuídas pela Banca Examinadora são as que seguem:

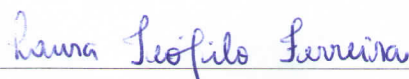
Nome		Notas
Orientador:	Prof. Dr. Daniel Rinaldo	10
Membro 1:	Ma. Maiara Stefanini Borges Caires	10
Membro 2:	Ma. Laura Teófilo Ferreira	10
Média Final		10

Observações da Banca:

Banca Examinadora:


Professor(a) Orientador(a)


Membro 1


Membro 2

Acadêmico: OTÁVIO AGUIAR DE SOUZA

Matrícula: 141021462

Assinatura: 

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Iraci Aguiar, por ter me dado à vida, por também ter exercido o papel de pai, por ter sido um exemplo de honestidade, respeito, amor resistência e coragem, mesmo diante de muitas intempéries, por sempre me apoiado incondicionalmente nos meus sonhos e por ter feito o possível e impossível para que eu ingressasse e permanecesse na universidade. Serei eternamente grato por cada sacrifício que você fez por mim e certamente você tem o maior mérito em absolutamente todas as minhas conquistas atuais e futuras. Tenho um orgulho muito grande de ter tido o privilégio de ser seu filho.

Aos meus avós maternos, Senhorinha e Gerson de Aguiar, por todo o incentivo que deram para mim e meus primos desde pequenos para que nos tornássemos pessoas responsáveis e honestas e sobretudo estudiosas, por mais que tenham sido carentes de uma educação formal. São exemplos de bondade e resiliência para mim.

Aos meus amigos Thiago Henrick e Letícia Alves por terem aparecido em minha vida. Sou muito grato pelos momentos de companheirismo, descontração, pelas risadas, pelas confidências, pelas histórias que tivemos juntos, por serem um refúgio nos tempos difíceis e pelo apoio nas minhas vitórias e derrotas. Ter conhecido vocês tornou-me uma pessoa mais feliz.

Às minhas amigas Ana Laura Queiroz e Fernanda Suguiyama pelas risadas, conversas, conselhos e apoio;

Ao meu professor e orientador, Daniel Rinaldo, por me orientar desde meu primeiro semestre de graduação, por ter me dado a oportunidade de pertencer ao seu grupo de pesquisa, por ter sido uma pessoa imprescindível para minha permanência na universidade e por ter possibilitado eu vivesse experiências únicas na minha vida pessoal e acadêmica. Agradeço pelos ensinamentos, pelo apoio, pela paciência, pelas broncas, por ter acreditado no meu potencial em momentos que nem eu acreditava. Cada uma das incontáveis conversas que tivemos em sua sala contribuíram para que eu melhorasse como aluno e pessoa;

Aos professores Renato Lajarim Carneiro e Cristiano Soleo de Funari pelo auxílio na interpretação dos resultados da pesquisa relacionados aos planejamentos experimentais e à Química Analítica Verde;

À Maiara Stefanini Borges Caires, pelos conselhos relacionados à pesquisa e à vida acadêmica, pela colaboração e pelas risadas;

Ao professor Luiz Carlos Silva por ter permitido a utilização de vários de seus equipamentos e de seu laboratório nas análises iniciais;

Ao professor Valdecir Ximenes por ter permitido a utilização de seu equipamento CLAE para a execução dos experimentos;

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido para realização desta pesquisa.

SÚMULA CURRICULAR

Dados pessoais

Nome: Otávio Aguiar de Souza

Naturalidade: Bauru/SP – Brasil

Nome em citações bibliográficas: SOUZA, O.A.

Endereço profissional

Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências de Bauru.
Avenida Engenheiro Luiz Edmundo Carrijo Coube, Núcleo Residencial Presidente Geisel,
CEP 17033360, Bauru, SP.

Endereço eletrônico: otavio.aguiar.souza@gmail.com

Formação acadêmica/titulação

2014 – 2018

Graduação: Licenciatura em Química

Instituição: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências de Bauru.

Atividades Acadêmicas

03-12/2014: Bolsista de Apoio Acadêmico e Extensão (BAAE I) no projeto “A importância da Química no estudo das plantas medicinais”, sob orientação do Prof. Dr. Daniel Rinaldo.

12/2015-12/2017: Bolsista de Iniciação Científica (FAPESP) no projeto “Desenvolvimento de métodos analíticos visando atender aos princípios da química verde para identificação dos princípios ativos de alcachofra por CLAE-DAD”, sob orientação do Prof. Dr. Daniel Rinaldo.

1º semestre de 2016: Monitoria voluntária na disciplina de Físico Química I para o curso de “Bacharelado em Física de Materiais”, sob orientação do Prof. Adj. Antônio Carlos Dias Ângelo, com carga horária de 104h.

08/2016 – 07/2017: Representante discente suplente no Conselho de Curso.

01/2017 – 12/2017: Representante de classe junto ao Centro Acadêmico da Química (CAQUI) Marie Curie.

09/2017-06/2018: Representante discente suplente no Conselho de Departamento de Química

Produção bibliográfica

Resumos publicados em anais de congressos

1. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L; RINALDO, D. Application of Doehlert Design for optimization of the chromatographic method for green fingerprinting of *Cynara scolymus* L. by HPLC-PAD. In: III Escola de Inverno de Quimiometria (EIQ 2017), 2017, Araraquara. Programação Científica e Livro de Resumos, 2017.
2. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L; RINALDO, D. Desenvolvimento de método analítico verde para obtenção de fingerprinting metabólico das folhas de *Cynara scolymus* por CLAE-DAD utilizando quimiometria. In: XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2017, Bauru. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do XXIX CIC, 2017.
3. VIEIRA, T. H. M.; SOUZA, O. A.; RINALDO, D. Metodologia ambientalmente amigável para *clean-up* das folhas de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*) para análise por CLAE-DAD. In: 1ª fase do XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2017, Bauru. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do XXIX CIC, 2017.
4. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L; RINALDO, D. Metodologia de superfície de resposta para obtenção do *fingerprinting* verde de alcachofra por CLAE-DAD. In: XI Semana da Química (Unesp Bauru) - Química e suas aplicações no mundo atual, 2017, Bauru. Livro de resumos, 2017.
5. VIEIRA, T. H. M.; SOUZA, O. A.; RINALDO, D. Aplicação de princípios da química verde na extração em fase sólida (spe) dos analitos das folhas de *Maytenus ilicifolia*. In: XI Semana da Química (UNESP Bauru) - Química e suas aplicações no mundo atual, 2017, Bauru. Livro de resumos, 2017.
6. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L; RINALDO, D.; VIEIRA, T. H. M. Sustainable and heuristic approach for *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) metabolic fingerprinting by RP-HPLC-PAD: a tradeoff between separation and greenness. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória(ES). Abstracts, 2017.
7. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L; RINALDO, D. Important chromatographic parameters for obtaining the artichoke green chromatographic fingerprinting by hplc-pad with a sustainable clean-up procedure. In: 46th IUPAC World Chemistry Congress, 2017, São Paulo. Anais - IUPAC 2017(Technical Papers), 2017.

8. SOUZA, O. A.; RINALDO, D.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L. Influência de fatores cromatográficos na separação de metabólitos secundários de *Cynara scolymus* ('alcachofra') por CLAE 'verde'. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2016, Bauru. Trabalhos Apresentados na 2ª Fase do XXVIII CIC, 2016.

9. SOUZA, O. A.; RINALDO, D.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L. Influência de fatores cromatográficos na separação de metabólitos secundários de *Cynara scolymus* ('alcachofra') por CLAE 'verde'. In: XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UNESP, 2016, Bauru. Trabalhos Apresentados na 1ª Fase do XXVIII CIC, 2016.

Resumos expandidos publicados em anais de congressos

1. SOUZA, O. A.; RINALDO, D.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L. Determinação de variáveis com efeitos importantes na separação de metabólitos secundários de *Cynara scolymus* (alcachofra) por CLAE-DAD, utilizando conceitos de química verde. In: 56º Congresso Brasileiro de Química, 2016, Belém. CD-ROM do 56º CBQ. Rio de Janeiro: ABQ, 2016.

Apresentação oral em eventos nacionais

1. SOUZA, O. A.; RINALDO, D.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L. Determinação de variáveis com efeitos importantes na separação de metabólitos secundários de *Cynara scolymus* (alcachofra) por CLAE-DAD, utilizando conceitos de química verde. In: 56º Congresso Brasileiro de Química, 2016, Belém. CD-ROM do 56º CBQ. Rio de Janeiro: ABQ, 2016.

Apresentação oral em eventos internacionais

1. SOUZA, O. A.; FUNARI, C.S; CARNEIRO, R.L; RINALDO, D.; VIEIRA, T. H. M. Sustainable and heuristic approach for *Cynara scolymus* L. (Asteraceae) metabolic fingerprinting by RP-HPLC-PAD: a tradeoff between separation and greenness. In: 6th Brazilian Conference on Natural Products, 2017, Vitória(ES). Abstracts, 2017.

Manuscrito submetido (em fase de revisão)

1. SOUZA, O.A.; CARNEIRO, R.L.; VIEIRA, T.H.M.; FUNARI, C.S.; RINALDO, D. Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by means of a green statistically developed HPLC-PAD method. Food Analytical Methods.

Participação em reuniões científicas

1. 14ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia. 2017.
2. 1ª fase do XXIX Congresso de Iniciação Científica da UNESP- Faculdade de Ciências da UNESP (Bauru),2017.
3. 6th Brazilian Conference on Natural Products/ XXXII RESEM – Clube Ítalo Brasileiro(Vitória/ES),2017.
4. III Escola de Inverno em Quimiometria – Instituto de Química da UNESP de Araraquara,2017.
5. IUPAC 2017 - 46th World Chemistry Congress/ IUPAC 49th General Assembly/ 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Hotel WTC Sheraton,São Paulo,2017.
6. XI Semana da Química (Unesp Bauru) - Química e suas aplicações no mundo atual. - Faculdade de Ciências da UNESP (Bauru),2017.
7. XXI Disciplina Intersemestral do G6: Quimiometria. 2017 – Instituto de Química da UNICAMP, Campinas,2017.
8. 1ª fase do XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp - Faculdade de Ciências da UNESP (Bauru),2016.
9. 2ª fase do XXVIII Congresso de Iniciação Científica da Unesp – Obeid Plaza Hotel, Bauru,2016.
10. 56º Congresso Brasileiro de Química Centro de Convenções Hangar, Belém(PA),2016.
11. X Semana da Química - UNESP Bauru - Faculdade de Ciências da UNESP (Bauru),2016.
12. 12ª Semana Nacional de Ciência e Tecnologia - - Faculdade de Ciências da UNESP (Bauru),2015.
13. IX Semana da Química - UNESP Bauru. 2015. (Outra).

Organização de eventos

1. Membro da comissão organizadora da XI Semana da Química (Unesp Bauru) - Química e suas aplicações no mundo atual. 2017.

Prêmios e títulos

2017: Menção honrosa para trabalho intitulado "Metodologia de superfície de resposta para obtenção do *fingerprinting* verde de alcachofra por CLAE-DAD" na XI Semana da Química, Faculdade de Ciências - Unesp (Bauru).

2017: Selected for oral presentation, 6th Brazilian Conference on Natural Products/XXXII RESEM.

2016: Trabalho selecionado para apresentação oral, 56º Congresso Brasileiro de Química.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Alcachofra.....	16
1.2 <i>Fingerprints</i> cromatográficos.....	17
1.3 Planejamento de experimentos.....	18
1.4 Química Analítica Verde.....	19
2 OBJETIVOS.....	21
2.1 Objetivos gerais.....	21
2.2 Objetivos específicos.....	21
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Reagentes utilizados.....	22
3.2 Pesquisa bibliográfica para seleção de método de referência para análise do extrato hidroetanólico das folhas de <i>C. scolymus</i> L.....	22
3.3 Obtenção do material vegetal.....	23
3.4 Preparação do extrato.....	23
3.5 <i>Clean-up</i> do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. scolymus</i>	23
3.6 Análises multivariadas – Planejamento Fatorial Fracionário e Planejamento Doehlert.....	24
3.7 Avaliação dos ajustes dos modelos multivariados e de sua capacidade preditiva e localização da região experimental ótima através da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM).....	25
3.8 Quantificação do impacto ambiental do método otimizado.....	26
3.9 Validação qualitativa do <i>fingerprinting</i> cromatográfico desenvolvido.....	26
3.10 Análises no sistema CLAE-DAD.....	27
4 DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	29
4.1 Rendimento do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. scolymus</i>	29
4.2 Reprodução do método de referência para análise do extrato das folhas de <i>C. scolymus</i>	29
4.3 <i>Clean-up</i> do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>C. scolymus</i> por CLAE-DAD.....	32

4.4 Análises preliminares para avaliação da força de eluição do etanol.....	34
4.5 Triagem de variáveis.....	36
4.6 Análise de Variância (ANOVA) dos modelos empíricos lineares.....	41
4.7 Gráficos de probabilidade normal.....	44
4.8 Planejamento Doehlert.....	47
4.9 Análise dos resíduos matemáticos dos modelos quadráticos.....	55
4.10 Perfil cromatográfico (<i>Fingerprint</i>) do extrato hidroetanólico das folhas de <i>Cynara scolymus</i>	56
4.11 Impacto ambiental e performance cromatográfica do método desenvolvido..	59
4.12 Validação qualitativa do método desenvolvido.....	59
4.12.1 Precisão instrumental.....	60
4.12.2 Repetibilidade.....	60
4.13 Princípios da Química Analítica Verde (GAC) aplicados no desenvolvimento do método.....	60
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
REFERÊNCIAS.....	63
ANEXO.....	68

RESUMO

Cynara scolymus L. é uma espécie vegetal com propriedades farmacológicas importantes na manutenção da saúde humana em razão da multiplicidade de compostos químicos, ou metabólitos secundários, presentes em sua constituição. Para controle de qualidade dessa planta e seus derivados e comprovação de sua autenticidade, a exemplo dos medicamentos fitoterápicos, geralmente são utilizadas abordagens multicomponentes que possibilitam a obtenção de uma impressão digital confiável da espécie para fins regulatórios. Nesse contexto, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a técnica analítica mais empregada e a acetonitrila (MeCN) se notabiliza como solvente mais utilizado no desenvolvimento de tais métodos de análise, o que acarreta em consideráveis impactos ao meio ambiente. Diante desse cenário, esse trabalho teve como objetivo principal o desenvolvimento de um método em CLAE para o extrato hidroetanólico das folhas de alcachofra visando aplicar princípios da Química Analítica Verde, com o uso de etanol (EtOH, uma alternativa mais ambientalmente amigável) como modificador orgânico e a partir de uma perspectiva heurística em razão da complexidade da matriz. Preparou-se por maceração o extrato hidroalcoólico das folhas de alcachofra. Utilizou-se Extração em Fase Sólida (EFS) para desenvolver uma metodologia em *clean-up* envolvendo diferentes proporções de misturas binárias de EtOH/H₂O e, após a elucidação da metodologia mais seletiva para os analitos de interesse, realizou-se uma triagem de cinco variáveis cromatográficas por meio de um Planejamento Fatorial Fracionário de resolução V. As variáveis estatisticamente significativas foram investigadas em um planejamento Doehlert, e as respostas monitoradas foram o número de picos cromatográficos (*n*) e a distribuição destes ao longo do cromatograma (*GCFR*). Modelos quadráticos foram estimados, tiveram o ajuste avaliado e as condições cromatográficas ótimas – 5% de porcentagem inicial de EtOH (solvente B) como solvente orgânico no gradiente e 35°C de temperatura de análise - foram elucidadas através de suas respectivas superfícies de resposta. Experimentos confirmatórios realizados em triplicata comprovaram a otimização e a capacidade preditiva dos modelos. O método desenvolvido teve impacto ambiental menor e melhor performance cromatográfica do que o método de referência. Por fim, o método desenvolvido foi validado qualitativamente e se mostrou aplicável até mesmo a equipamentos CLAE convencionais, desde que em pressões máximas de 15 MPa.

Palavras chave: *Cynara scolymus*. *Fingerprinting* cromatográfico. Planejamento experimental. Química Analítica Verde

ABSTRACT

Cynara scolymus L. is a plant species with important pharmacological properties in the maintenance of human health due to the multiplicity of chemical compounds, or secondary metabolites, present in its constitution. For quality control of this plant and its derivatives and proof of its authenticity, e.g. herbal medicines, multicomponent approaches that allow the obtaining of a reliable fingerprint of the species for regulatory purposes are often used. In this context, High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC) is the most used analytical technique and acetonitrile (MeCN) highlights as the solvent most used in the development of these methods of analysis, which results in considerable environmental impacts. In view of this scenario, this work had as main goal the development of a HPLC method for the hydroethanolic extract of artichoke leaves aiming to apply principles of Green Analytical Chemistry, with the use of ethanol (EtOH, a more environmentally friendly alternative) as organic modifier and from a heuristic perspective due to the complexity of the matrix. The hydroalcoholic extract of the artichoke leaves was prepared by maceration. Solid-Phase Extraction (SPE) was used to develop a clean-up methodology involving different proportions of binary EtOH / H₂O mixtures and, after elucidating the more selective methodology for the analytes of interest, five chromatographic variables were screened by means of a Fractional Factorial Design of resolution V. Statistically significant variables were investigated in a Doehlert design, and the monitored responses were the number of chromatographic peaks (n) and their distribution along the chromatogram ($GCFR$). Quadratic models were estimated, their fit was evaluated and optimal chromatographic conditions - 5% of initial percentage of EtOH (solvent B) as organic solvent in the gradient and 35 ° C of analysis temperature - were elucidated through their respective response surfaces. Confirmatory experiments performed in triplicate confirmed the optimization and predictive capacity of the models. The developed method was environmentally friendlier and with better efficiency in relation to the reference method. Finally, the method was validated qualitatively according to international recommendations and proved to be applicable even with non-state-of-the-art HPLC equipments, at maximum pressures of 15 MPa.

Keywords: *Cynara scolymus*. Chromatographic fingerprinting. Design of Experiments. Green Analytical Chemistry

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
C ₁₈	Fase estacionária de fase reversa do tipo Octadecil silano
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Detector por Arranjo de Fotodiodos
DoE	<i>Design of Experiments</i>
EFS	Extração em Fase Sólida
EtOH	Etanol
fr.	Fração
GAC	<i>Green Analytical Chemistry</i>
GCFR	<i>Green Chromatographic Fingerprinting Response</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
mAU	10 ⁻³ unidades de absorção
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
mV	10 ⁻³ unidades de intensidade
PTFE	Politetrafluoroetileno
R ²	Coeficiente de determinação
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
SQR	Soma quadrática de regressão
SQr	Soma quadrática residual
SQres	Soma quadrática residual
SQT	Soma quadrática total
TFA	Ácido trifluoroacético
tR	Tempo de retenção
Z	Medida de afastamento da média em termos de desvio padrão
UV	Ultravioleta
λ	Comprimento de onda

1 INTRODUÇÃO

1.1 Alcachofra

A alcachofra (*Cynara scolymus* L.) é uma planta perene e herbácea que geralmente atinge de 1 a 1,75 metros de comprimento e pertence à família Asteraceae (também conhecida como Compositae), subdividida em aproximadamente 920 gêneros que abrangem cerca de 19 mil espécies de distintas peculiaridades. É caracterizada por folhas grandes, talos longos com algumas ramificações e um grande e volumoso capítulo floral formado por um receptáculo carnoso e, implantadas sobre cálices com brácteas, há várias flores que aparecem durante o verão e apresentam uma tonalidade que varia de azul a púrpura. A espécie, que deve ser cultivada por volta do outono e inverno e possui um tempo de germinação de 15 dias, tem preferência por solos húmidos, siliciosos, argilosos, profundos, drenados e com pH por volta de 6,5; além de um ambiente rico em umidade, sol e protegido de ventos fortes (ALONSO,1998; CASTRO,1995; NOLDIN et al.,2003; COSTA et al., 2009; SCHÜTZ et al, 2004).

Cultivada principalmente na Europa, onde suas inflorescências imaturas (folhas carnosas e receptáculos) são um ingrediente importante da dieta mediterrânea, a alcachofra é considerada um Patrimônio Cultural Intangível da Humanidade. Também tem sido cultivada há mais de um século na América do Sul, onde sua produção apresenta constante crescimento (LÓPEZ-MOLINA et al., 2005; LUTZ, HENRÍQUEZ, ESCOBAR,2011; UNESCO, 2010; ROMANI et al., 2005). A espécie é reconhecida como um vegetal saudável e nutritivo visto que sua constituição reúne ácidos fenólicos, proteínas, minerais, fibras e fruto-oligossacarídeos. (ROMANI et al., 2005, PANDINO et al., 2010, WU et al., 2013, ZHU, ZHANG, LO, 2004).



Figura 1: *Cynara scolymus* L. (alcachofra)

Fonte: Portal da Revista Globo Rural na internet¹

¹Disponível em: < <http://revistagloborural.globo.com/GloboRural/0,6993,EEC1705452-1641,00.html>>. Acesso em 17 ago. 2017.

Também, os extratos de folhas de alcachofra têm sido usados na medicina popular por séculos, principalmente devido às suas atividades coleréticas, diuréticas e hipocolesterolêmicas ou exercendo papel como suplementação alimentar (BUNDY et al., 2008; FRITSCHÉ et al., 2002; RODRIGUEZ, GIMÉNEZ, VÁSQUEZ, 2002). Consequentemente, uma multiplicidade de preparações farmacêuticas e suplementos alimentares contendo as folhas e flores de alcachofra estão disponíveis no mercado (SCHÜTZ et al., 2006). Esses usos tradicionais têm apoio por investigações científicas ao longo dos anos. Por exemplo, propriedades antimicrobianas, inibição do estresse oxidativo e dispepsia, ação hipoglicêmica e melhora os sistemas gastrointestinal e urinário também são reportados na literatura (SCHÜTZ et al., 2006; ZHU et al., 2004; ZAPOLSKA-DOWNAR et al., 2002; MARAKIS et al., 2002; HOLTSMANN et al., 2003; FANTINI et al., 2011). As atividades biológicas da espécie têm sido associadas com metabólitos secundários tais como ácidos cafeoilquínicos (como o ácido 1,3-Di-O-cafeoilquínico, ou cinarina), flavonoides (como a luteolina-7-rutinosídeo) e lactonas sesquiterpênicas, a exemplo da cinaropicrina (ZHU et al., 2004; BUNDY et al., 2008; NOLDIN et al., 2003; COSTA et al., 2009).

No Brasil, sobretudo devido às suas propriedades farmacológicas e ao uso generalizado como alternativa terapêutica, a alcachofra é uma das 71 plantas medicinais presentes na Relação Nacional das Plantas de Interesse do SUS (Renisus), uma lista divulgada pelo Ministério da Saúde em 2009, cuja finalidade é orientar estudos e pesquisas que subsidiem a elaboração de fitoterápicos de baixo custo, os quais, após receberem aprovação pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), tornem-se disponíveis à população (BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE, 2009).

1.2. Fingerprints cromatográficos

O desenvolvimento de medicamentos seguros e eficazes a partir de plantas é uma tarefa difícil visto que o material vegetal pode ser constituído de múltiplos compostos que interajam de modo sinérgico no que se refere à sua influência nas propriedades globais da espécie (LIANG, XIE, CHAN 2004; LIANG, XIE, CHAU. 2010; QIAN et al., 2007, XIE et al., 2006). Nesse contexto, deve-se priorizar uma abordagem multicomponente para padronização e controle de qualidade de plantas medicinais e seus derivados, bem como o monitoramento de seu processo de extração.

Com o objetivo de atender a tais propósitos, várias agências internacionais, a exemplo da *US Food and Drug Administration* (FDA), *European Medicines Evaluation Agency* (EMA)

e até mesmo a Organização Mundial da Saúde sugerem o desenvolvimento de *fingerprints*, (impressões cromatográficas), estratégias úteis que indicam um padrão distintivo de picos visando a comprovação de autenticidade e a identificação de compostos, os quais apresentam variações relacionadas à sazonalidade, cultivo e secagem do material vegetal, no caso de matrizes complexas como as plantas. Assim, o *fingerprint*, combinado com técnicas adequadas de detecção, pode ser usado para atestar os efeitos terapêuticos originários dos metabólitos secundários da planta (LI et al., 2006; THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS 2001; TISTAERT, DEJAEGER, VANDER HEYDEN, 2011; US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 1991; LIANG, XIE, CHAU, 2010).

De modo pragmático, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), integrada a espectroscopia UV (Ultravioleta) ou MS (Espectrometria de massas), se notabiliza como a técnica analítica mais utilizada para separação, quantificação e identificação de substâncias de interesse para análises multicomponentes ou desenvolvimento de *fingerprints* cromatográficos em razão de suas vantagens como fácil operação, alta resolução, seletividade, sensibilidade, automatização e capacidade de análise de várias substâncias. Entretanto, os pesquisadores geralmente têm usado solventes como acetonitrila (MeCN) em tais estudos, incluindo os de *C. scolymus*. Embora seja dotada de propriedades físico-químicas desejáveis do ponto de vista cromatográfico, como alta miscibilidade em água, baixo comprimento de onda corte, baixa viscosidade e habilidade de solvatar vários compostos, a acetonitrila é tóxica e poluidora, gerando resíduos de alto custo e, por consequência, configurando um cenário contraditório no estudo de plantas medicinais (ALAERTS et al., 2010; NEUE, MÉNDEZ, 2007; TISTAERT, DEJAEGER, VANDER HEYDEN, 2011; WELCH et al., 2010; GABER et al., 2011; HUTCHINSON et al., 2012; HENDERSON et al., 2011; TOBISZEWSKI, NAMIEŚNIK 2017, FUNARI et al., 2014).

1.3. Planejamento de experimentos

Métodos cromatográficos para controle de qualidade de uma planta medicinal devem ter seu desenvolvimento conduzido por uma perspectiva heurística em razão da complexidade da matriz, e o uso de planejamento de experimentos (*Design of Experiments*, ou DoE) pode ser proveitoso para se atingir tal objetivo (FUNARI et al., 2014). Em oposição à abordagem univariada (ou ‘tentativa e erro’), DoE é uma abordagem multifatorial que possibilita uma avaliação simultânea, imparcial e sistemática de fatores de interesse no desenvolvimento do método para *fingerprinting*, além da obtenção de máxima informação dos dados experimentais

com um número reduzido de experimentos, economizando tempo e recursos. Além disso, DoE permite que os pesquisadores identifiquem interações entre os fatores investigados e construam superfícies de resposta, úteis para prever condições experimentais consideradas ótimas. (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2010; BREITKREITZ; SOUZA; POPPI, 2014). Por fim, visando responsabilidade do ponto de vista ambiental, a seleção de fatores a serem avaliados, a função e/ou resposta adotada a ser monitorada e até mesmo o planejamento experimental escolhido devem considerar princípios da Química Analítica Verde (*Green Analytical Chemistry* ou GAC; GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013).

1.4. Química Analítica Verde

A Química Analítica Verde (GAC) suscitou a partir da Química Verde em 2000, preocupada principalmente em tornar as práticas laboratoriais mais ambientalmente amigáveis. O aspecto mais desafiador desse âmbito de estudo tem sido alcançar o equilíbrio entre a qualidade das análises químicas e os parâmetros ambientais. Pragmaticamente, alguns dos conceitos e princípios da Química Verde (conforme idealizados por Anastas e Werner, segundo as necessidades da química sintética) não podem ser diretamente aplicados à Química Analítica, a exemplo da ideia de ‘economia de átomos’. Desse modo, esses princípios precisaram ser revisados e reformulados visando uma aplicabilidade mais ampla (NAMIEŚNIK, 2000; ARMENTA; GARRIGUES; DE LA GUARDIA, 2008; KOEL; KALJURAND, 2006; ANASTAS; WARNER, 1998; TOBISZEWSKI; MECHLIŃSKA; NAMIEŚNIK, 2010).

Nesse contexto, os 12 princípios da GAC, idealizados por Gałuszka e colaboradores (2013) são os seguintes:

1. Técnicas analíticas diretas devem ser utilizadas para evitar tratamento de amostra;
2. O tamanho e quantidade das amostras devem ser os mínimos possíveis;
3. Medições *in situ* são priorizadas;
4. Processos e operações analíticas devem ser integrados;
5. Métodos automatizados e miniaturizados são preferíveis;
6. Deve-se evitar derivatização;
7. Geração de uma grande quantidade de resíduos deve ser evitada e um manejo adequado dos mesmos deve ocorrer;
8. Métodos multi-analito ou multiparamétricos são priorizados;

9. O gasto de energia deve ser minimizado;
10. O uso de reagentes oriundos de fontes renováveis é prioritário;
11. Reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
12. A segurança do analista deve aumentar.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O objetivo desse trabalho é desenvolver um método em CLAE-DAD para a obtenção de uma impressão digital cromatográfica representativa do extrato hidroetanólico de *Cynara scolymus* L. com a aplicação de princípios da Química Analítica Verde, de modo que a abordagem utilizada seja heurística, visando confiabilidade analítica com economia de tempo e recursos mesmo diante da complexidade da matriz, e utilizando etanol (EtOH) como solvente orgânico, uma alternativa biodegradável, oriunda de fontes renováveis e com produção abundante na região de Bauru.

2.2 Objetivos específicos

- Reproduzir um trabalho de referência da literatura (com MeCN como solvente na fase móvel) para nortear o desenvolvimento do método com EtOH como solvente orgânico;
- Preparar o extrato hidroetanólico das folhas de *Cynara scolymus*;
- Desenvolver metodologia em *clean-up* utilizando extração em fase sólida (SPE) com misturas binárias de EtOH e H₂O;
- Realizar a triagem de variáveis e a otimização cromatográfica através de planejamentos experimentais e a Metodologia de Superfície de Resposta (RSM);
- Realizar a Análise de Variância (ANOVA) e experimentos confirmatórios para confirmar o ajuste dos modelos multivariados propostos e sua capacidade preditiva;
- Quantificar o impacto ambiental e a performance cromatográfica do método desenvolvido com EtOH, estabelecendo comparações com o método da literatura;
- Validar qualitativamente o *fingerprinting* metabólico segundo recomendações internacionais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes utilizados:

Solventes grau PA: Acetona (Synth[®]), acetato de etila (Synth[®]), ácido acético (Synth[®]) e etanol (EtOH) (Synth[®]);

Solventes grau HPLC: Acetonitrila (MeCN) (TEDIA[®]), metanol (MeOH) (TEDIA[®]), EtOH (TEDIA[®]), água purificada em sistema Milli-Q e ácido trifluoroacético (TFA) (TEDIA[®]).

3.2 Pesquisa bibliográfica para seleção de método de referência para análise do extrato hidroetanólico das folhas de *C.scolymus* L.

Foram realizadas consultas minuciosas de artigos que envolviam métodos de análise de *C. scolymus* por CLAE nas bases de dados: Scielo, *Web of Science*, *Google Scholar*, *SciFinder* e Athena (base de dissertações e teses da UNESP). Com base em critérios cromatográficos como método de análise, fase móvel, fase estacionária, vazão, temperatura, parte da planta usada para extração e número de picos obtidos no cromatograma, foi escolhido como trabalho de referência o dos autores Negro e colaboradores (2012), o qual também apresenta separação e resolução desejáveis e picos com distribuição gaussiana.

Nesse trabalho os autores estudaram as folhas e capítulos de *C. scolymus*. Resumidamente, 0,5 g de cada amostra foram incubadas durante 1 h a 4 °C em 5 mL de acetona: EtOH: MeOH (70:15:15, v/v/v). O sobrenadante foi recolhido e o resíduo foi ressuspendido em 5 mL de acetato de etila e incubado a 4 °C durante 1 h. Os 2 sobrenadantes foram concentrados separadamente até à secura em um evaporador rotativo, ressuspendidos com MeOH e reunidos e alíquotas de 10 µL foram analisadas por CLAE. Nas análises por CLAE foram utilizadas uma coluna analítica de fase reversa Luna C₁₈ (Phenomenex[®], 250 × 4.6 mm, 5 µm, Torrance, Calif., U.S.A.), como fase estacionária, e a fase móvel era composta por ACN: H₂O 95:5 (v/v) + 0,01% de TFA (solvente B) e H₂O + 0,01% de TFA (solvente A). O método de análise do trabalho de referência possui tempo total de 47 minutos, com vazão de 1,0 mL.min⁻¹, cuja programação de eluição é 90: 10 (A: B) em 0 min variando para 50: 50 até 30 min, e variando novamente para 0:100 (A:B) até 30 min, ficando nessa proporção até 47 min. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Beckman-Coulter System Gold[®] (Fullerton, Califórnia, EUA). O cromatograma obtido pelos autores do artigo selecionado apresentou 14 picos (Figura 2).

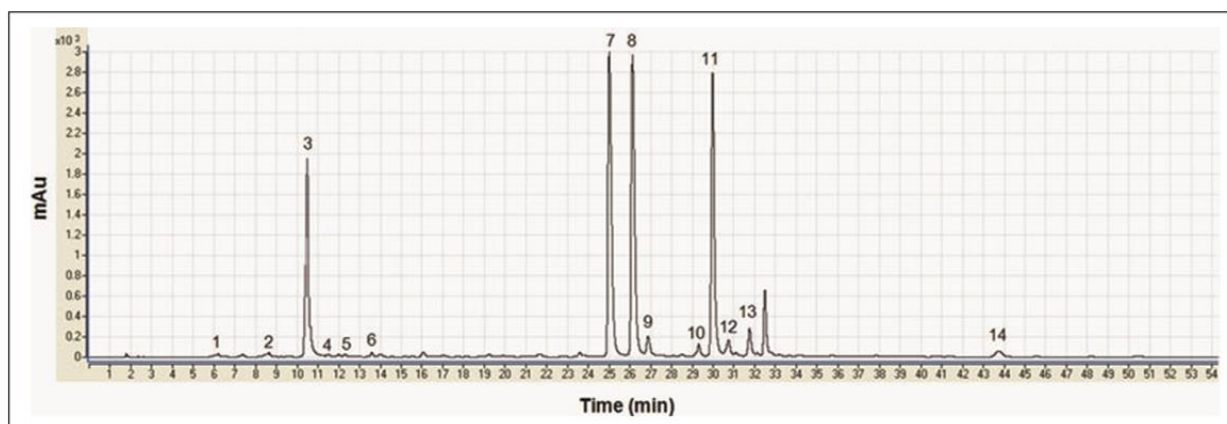


Figura 2: Cromatograma do perfil das folhas de *C. scolymus* do trabalho de referência.

Fonte: Negro et al. (2012)

3.3 Obtenção do material vegetal

As folhas de *C. scolymus* L. foram cedidas pela empresa Centroflora Extratos Vegetais (Lote: 200112.122), sediada na cidade de Botucatu-SP.

3.4 Preparação do extrato

As folhas de *C. scolymus* foram submetidas à moagem em moinho de facas e separadas em partículas de tamanhos entre 250 a 850 μm de acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010). O pó da planta foi macerado: 9,9879 g do pó foram imersos em 100,0 mL da mistura extratora de EtOH/ H₂O (7:3, v/v) na proporção 1:10 (material vegetal/mistura extratora) durante 144 horas. A mistura extratora foi substituída a cada 48 horas. Após a extração, a solução foi colocada em um evaporador rotativo, da marca Buchi®, sob pressão reduzida, em temperatura de 50 °C para eliminação dos solventes, resultando no extrato hidroalcoólico das folhas de *C. scolymus*. O extrato foi transferido para um vidro tarado e deixado em de banho aquecido, da marca Marconi®, a 45°C até completa eliminação de água, resultando em 2,8487 g de massa. O extrato foi armazenado na geladeira a -8 °C para posteriores análises.

3.5 Clean-up do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. scolymus*

Para avaliar a eficiência do *clean-up* aplicando princípios da Química Analítica Verde, foram utilizados os solventes EtOH e H₂O e cartuchos Sep-pak C₁₈ (500mg/3mL, 75 μm , 70 Å, Strata-E, Phenomenex®). Foram avaliadas duas metodologias de *clean-up*: uma aplicando apenas três eluições e outra aplicando apenas uma eluição, sendo que em ambas foram

utilizados aproximadamente 50 mg de extrato. Na primeira metodologia, 50 mg do extrato foram solubilizados em 2 mL de uma mistura de EtOH: H₂O na proporção 1:9 (v/v). A solubilização foi assistida em ultrassom (equipamento Soniclean 2PS Sanders®) durante 30 minutos. O cartucho C₁₈ foi ativado com EtOH, ambientado com 6 mL da fase móvel 1:9 EtOH:H₂O (v/v) e em seguida o sobrenadante da amostra foi aplicado no cartucho. Posteriormente, a amostra no cartucho foi eluída com os solventes EtOH e H₂O em três proporções diferentes e volumes de 2mL: EtOH: H₂O 1:9 (v/v), EtOH: H₂O 1:1 (v/v) e EtOH 100%. As frações obtidas foram denominadas: fr 1:9; fr 1:1 e fr 100% EtOH, respectivamente. Na segunda metodologia, 50 mg do extrato foram solubilizados em 1 mL de uma mistura de EtOH: H₂O na proporção 7:3 (v/v), também com solubilização assistida em ultrassom durante 30 minutos. O cartucho foi ativado com 6 mL de EtOH e o sobrenadante foi aplicado e eluído com a fase móvel EtOH:H₂O 7:3 (v/v), resultando a fração ‘fr 7:3’. Todas as frações foram filtradas em microfiltros de PTFE de poros de 0,45 µm (SimplePure – Allcrom®) e 10 µL de cada uma foram injetadas no sistema CLAE-DAD no método de eluição de Negro et al. (2012), com coluna analítica de fase reversa Luna C₁₈ (Phenomenex® 250 × 4.6 mm d.i., 5 µm, Torrance, Calif., U.S.A.).

3.6 Análises multivariadas – Planejamento Fatorial Fracionário e Planejamento Doehlert

Inicialmente, cinco fatores foram avaliados através de um Planejamento Fatorial Fracionário de resolução cinco ($2v^{5-1}$) para a triagem de variáveis (porcentagem inicial de EtOH no gradiente, porcentagem final de EtOH no gradiente, temperatura de análise, porcentagem de ácido acético na água e vazão), com níveis baseados nos tempos de retenção do primeiro e último picos dos cromatogramas oriundos de análises preliminares, conforme descrito na seção 4.4. Em seguida, os fatores considerados estatisticamente significativos foram identificados visualmente com o auxílio de gráficos normais e foram avaliados através de um planejamento Doehlert, visando a obtenção de um modelo matemático que indicasse as condições cromatográficas ótimas para um *fingerprint* representativo do extrato de alcachofra. Em ambos os planejamentos se injetou 20 µL da fração ‘7:3’ e utilizou-se etanol como solvente orgânico na fase móvel. Duas respostas foram monitoradas: o ‘número de picos’ contidos nos cromatogramas dos ensaios experimentais (n) e a função ‘*Green Chromatographic Fingerprinting Response*’ (GCFR), desenvolvida por Funari e colaboradores (2014) e definida pela equação (1):

$$GCFR = n^x (FP/MP)(n/t) \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde n é o número total de picos no cromatograma, x é um expoente de n (0, 1 ou 2 dependendo da importância ou peso que se deseja dar para o número de picos obtidos), t é o tempo total da corrida cromatográfica, FP é o número de picos na metade do cromatograma com menor número de picos e MP é o número de picos na metade do cromatograma com maior número de picos. A relação (n/t) fornece a eficiência do processo de obtenção de informação química, isto é, a informação adquirida (n) em razão do tempo, além de uma visão geral a respeito do gasto de recursos. Desse modo, é possível obter uma compensação entre a quantidade de picos cromatográficos e sua distribuição homogênea no cromatograma, além do tempo do ensaio experimental, da otimização da extração de informação química das análises e da compatibilidade com o ambiente sustentável e viscoso ocasionado pelo uso de etanol como fase móvel com colunas e equipamentos convencionais (FUNARI et al., 2014).

Após os resultados obtidos, estimou-se os modelos empíricos locais que relacionavam as variáveis significativas às respostas escolhidas por meio do Método dos Mínimos Quadrados, através do qual o quadrado dos resíduos (ou a diferença entre as respostas experimentais e as previstas) seja o menor possível (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2015).

Os coeficientes foram estimados segundo a equação matricial (2):

$$b = (X^t X)^{-1} X^t Y \quad (\text{Eq. 2})$$

Onde b é o vetor contendo os coeficientes de regressão, X é a matriz dos coeficientes de contraste, X^t é a matriz transposta, $(X^t X)^{-1}$ é a matriz resultante do produto entre X^t e X inversa e Y é o vetor contendo as respostas experimentais.

Ambos os planejamentos experimentais foram executados com coluna de fase reversa (C₁₈) XBridge, (150 x 4,60 mm, 4 µm, Waters®, Irlanda) e pré coluna (4 x 3 mm, 5 µm, Phenomenex, U.S.A.).

3.7 Avaliação dos ajustes dos modelos multivariados e de sua capacidade preditiva e localização da região experimental ótima através da Metodologia de Superfície de Resposta (RSM)

Realizou-se a avaliação dos parâmetros dos modelos multivariados através de Análise de Variância (ANOVA) e utilizou-se a Metodologia de Superfície de Resposta visando identificar visualmente condições cromatográficas ótimas para o *fingerprinting* metabólico do

extrato de *C. scolymus*. Todos os cálculos matriciais estatísticos, incluindo os da seção 3.6, foram realizados com o auxílio dos *softwares* LibreOffice 5 (The Document Foundation, EUA), GNU Octave 4.2.1, Matlab 2010a (Mathworks®, EUA) e Microcal Origin 6 (OriginLab®, USA). Em seguida, experimentos confirmatórios (com a injeção de 20 µL da fração 7:3 no sistema CLAE) foram realizados objetivando uma avaliação da otimização de parâmetros cromatográficos e da capacidade preditiva dos modelos empíricos propostos.

3.8 Quantificação do impacto ambiental do método otimizado

Para quantificar o impacto ambiental do método desenvolvido com etanol para impressão digital cromatográfica de alcachofra, empregou-se a métrica *HPLC Environmental Assessment Tool* (HPLC-EAT), dada pela equação (3) e disponível como software livre (GABER et al., 2011). Trata-se de uma ferramenta simples que possibilita a quantificação do impacto ambiental de um método com base nos solventes empregados.

$$HPLC - EAT = S1m1 + H1m1 + E1m1 + S2m2 + H2m2 + E2m2 + \dots + Snmn + Hnmn + Enmn$$

(Eq. 3)

Onde S, H e E são segurança, saúde e fatores ambientais, respectivamente, por n número de solventes com a massa m usados numa corrida cromatográfica específica.

Quanto menor é o valor de HPLC-EAT, mais ambientalmente amigável é o método cromatográfico. No entanto, uma vez que tal métrica não considera a eficiência da separação cromatográfica propriamente dita, aplicou-se uma métrica híbrida que relaciona a resposta GCFR (relacionada com a qualidade da impressão digital cromatográfica) e a métrica HPLC-EAT, de modo que, pragmaticamente, quanto maior a razão entre o valor calculado para a resposta GCFR e a métrica HPLC-EAT, maior é a performance do método que foi desenvolvido, considerando simultaneamente os aspectos separação e sustentabilidade, inclusive permitindo estabelecer comparações entre métodos que possuam objetivos em comum (FUNARI et al., 2014; GABER et al., 2011).

Especificamente, aplicou-se a métrica para quantificar o impacto ambiental entre o método desenvolvido e o método de referência de Negro e colaboradores (2012).

3.9 Validação qualitativa do método desenvolvido para *fingerprinting* cromatográfico

A validação do método otimizado ocorreu de acordo com as recomendações da *International Conference on Harmonisation* (ICH, 2005), o qual se baseia a Agência Nacional

de Vigilância Sanitária (ANVISA), para precisão instrumental e repetibilidade das análises. A qualidade do método foi avaliada considerando o desvio padrão relativo (DPR) envolvendo (i) a área total dos picos do cromatograma e (ii) as razões entre o tempo de retenção de cada pico com área 4% maior da área total do cromatograma e o tempo de retenção para um pico de referência, indicado com um asterisco no *fingerprint* e selecionado pelo formato simétrico e pela elevada resolução em relação ao pico adjacente. A seleção dos parâmetros monitorados baseou-se nos propostos por Funari e colaboradores (2014) para matrizes complexas.

3.10 Análises no sistema CLAE-DAD

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Jasco (bomba PU-2089 Plus, amostrador AS-2055 Plus, forno de coluna CO-2060 Plus), um pré-aquecedor ((Thermo Fischer Scientific®, EUA) e um detector de arranjo de fotodiodos (DAD, Jasco MD-2015 Plus) e um pré. Os dados cromatográficos foram acessados e processados com a utilização dos *softwares* ChromNAV (Jasco[®], Japão) e Openchrom[®] (Lablicate GmbH, Alemanha).

O equipamento utilizado está alocado no Laboratório de Bioquímica e Eletroanalítica da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru, sob responsabilidade do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes.

As seções 3.4 a 3.10 estão resumidas na figura 3.

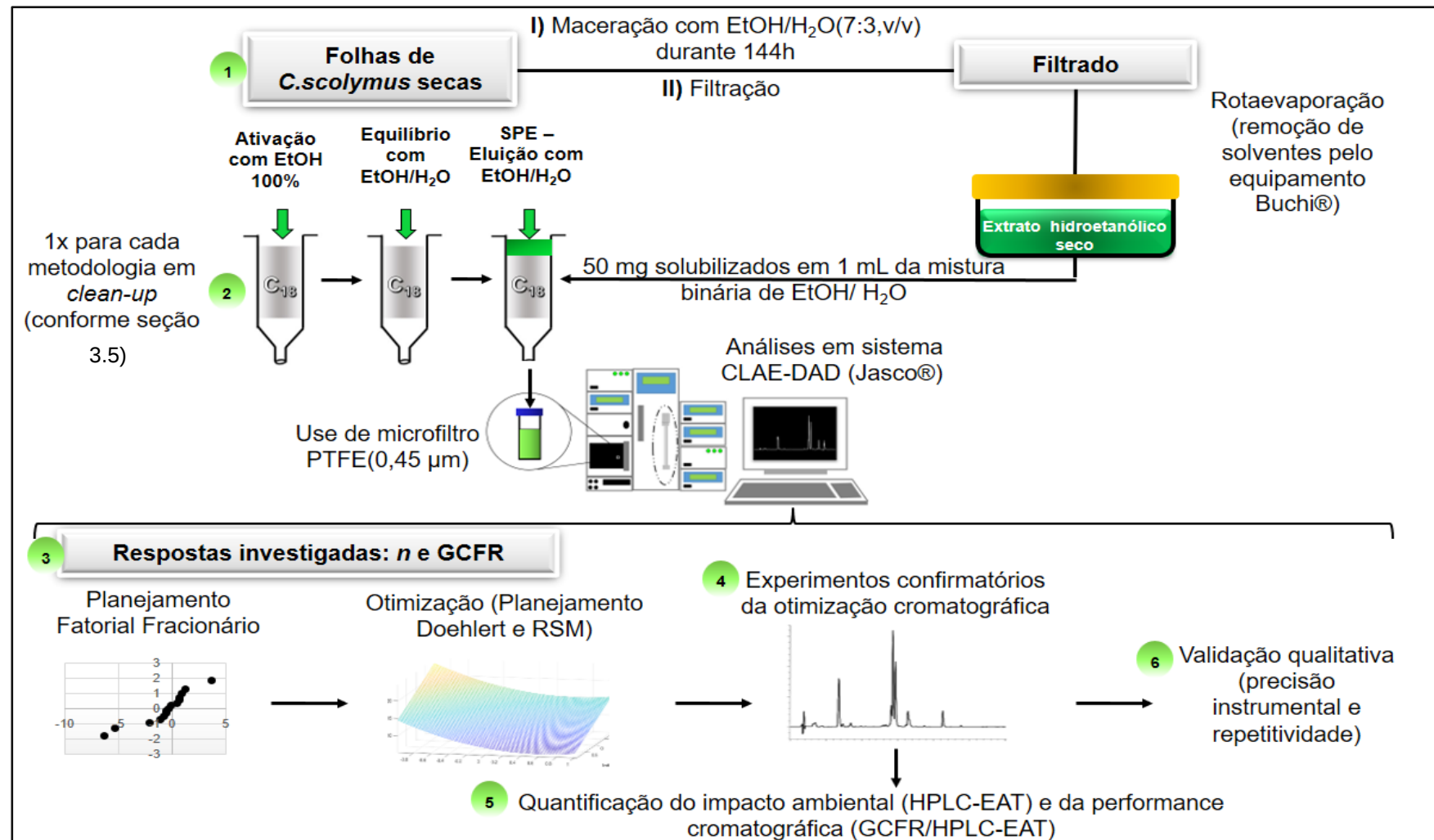


Figura 3: Esquema representativo da metodologia empregada para desenvolvimento e validação do método cromatográfico para *fingerprinting* do extrato de *Cynara scolymus* por CLAE-DAD (autoria própria)

4. Desenvolvimento, Resultados e Discussões

4.1. Rendimento do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. scolymus*

Com a maceração das folhas de *C. scolymus* foi possível obter um rendimento de 28,5% do extrato hidroalcoólico (Quadro 1).

Quadro 1. Rendimento do extrato em relação ao material vegetal coletado.

Folhas moídas	29,3662g
Pó utilizado na extração	9,9879 g
Líquidos extratores	300,0 mL
Extrato	2,8487 g
Rendimento	28,5 %

A proporção dos componentes da mistura binária utilizada na extração (EtOH/H₂O 7:3) considerou a polaridade dos constituintes da matriz, segundo os compostos relatados na literatura presentes nas folhas da espécie (NEGRO et al., 2012).

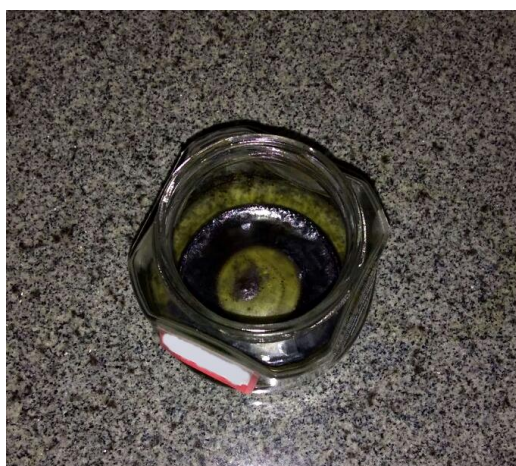


Figura 4: Extrato hidroetanólico das folhas de *Cynara scolymus* em frasco identificado (autoria própria)

4.2. Reprodução do método de referência para análise do extrato das folhas de *C. scolymus*

A reprodução do trabalho de referência foi realizada para verificação de possíveis influências das condições climáticas, reagentes e marca de equipamentos nas análises, as quais de fato ocorreram. Antes de iniciar cada análise, foi realizada uma análise do branco para detectar possíveis contaminantes nos solventes utilizados no preparo das amostras. A solução do branco utilizada foi MeOH grau HPLC, eluído em um cartucho de C₁₈. O branco foi analisado por CLAE-DAD com método de eluição descrito na seção 3.2. No cromatograma obtido (Figura 4) foram observados picos com áreas muito baixas, podendo ser classificados como ruídos em 350 nm, desconsiderando os sinais referentes ao volume morto (tempo morto = 2,6 min). Desse

modo, evidenciou-se a ausência de contaminantes, tanto no MeOH quanto nos solventes utilizados na fase móvel do sistema CLAE.

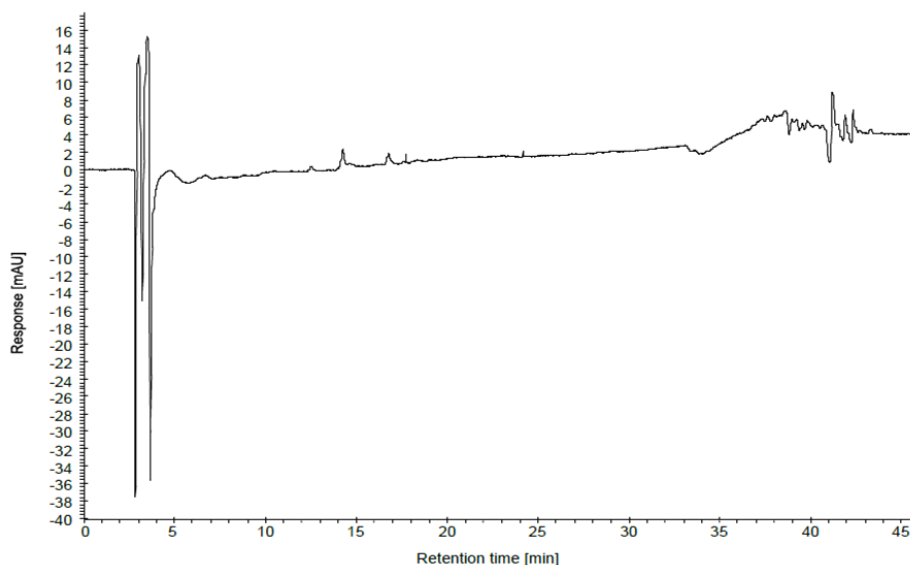


Figura 5: Cromatograma do branco (MeOH 100%). Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.10, método de eluição descrito na seção 3.2; $\lambda = 350$ nm.

Na análise da amostra, obtida pelos procedimentos descritos no trabalho de referência foi possível observar uma diferença significativa no tempo de retenção e na área relativa dos picos quando comparado o cromatograma da espécie analisada neste trabalho (Figura 6, espécie cultivada no Brasil) com o da espécie estudada no trabalho de referência (Figura 2, espécie cultivada na Itália).

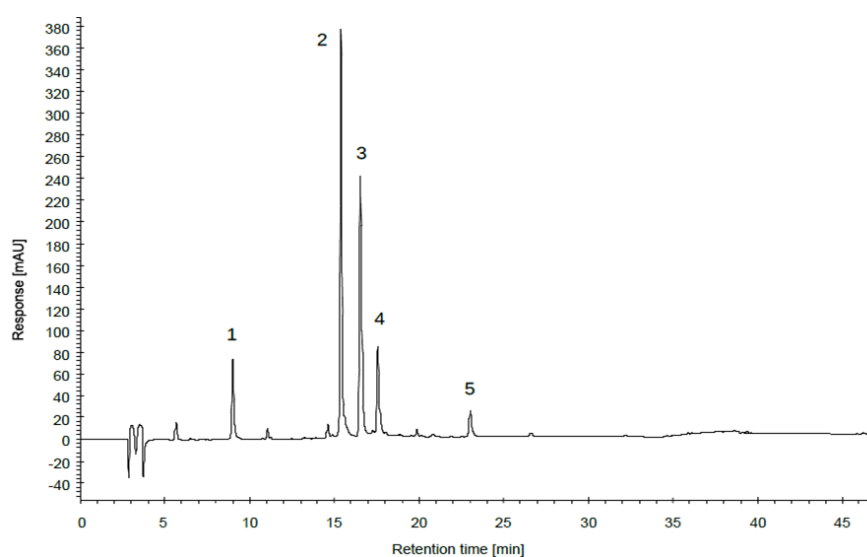


Figura 6: Cromatograma da amostra preparada a partir pó das folhas de *C. scolymus* de acordo com os procedimentos descritos no trabalho de referência (NEGRO et al., 2012). Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.10; método de eluição descrito na seção 3.2, $\lambda = 350$ nm

Pela análise dos espectros UV (Figura 7) e ordem de eluição das substâncias da amostra preparada na reprodução foi possível identificar e relacionar, por comparação com os dados cromatográficos e espectrométricos do trabalho de referência, os picos majoritários no cromatograma, conforme Quadro 2.

Quadro 2. Relação das substâncias identificadas no trabalho de referência com as observadas na análise de reprodução.

Substância	Número do pico no cromatograma da reprodução (Figura 4)	Número do pico no cromatograma do trabalho de referência (NEGRO et al., 2012; Figura 1)
ác. 5-O-cafeoilquínico	1	3
Luteolina-7-O-rutinosídeo	2	7
ác. 1,5-di-O-cafeoilquínico	3	11
Derivado do ácido cafeico	4	12
Luteolina	5	14

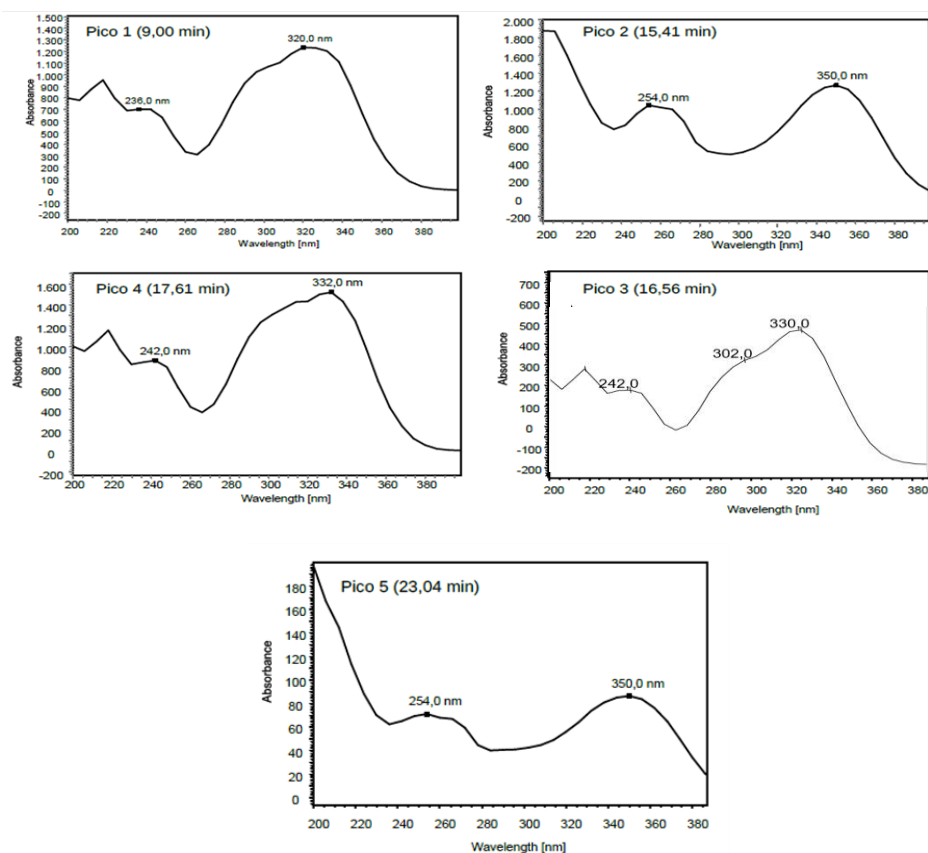


Figura 7: Espectro UV das substâncias numeradas no cromatograma da reprodução

A diferença nos tempos de retenção das substâncias em relação à análise do trabalho de referência pode estar relacionada com a temperatura ambiente, a fabricante dos solventes e equipamentos (sobretudo CLAE, no que se refere ao diâmetro e comprimento de tubulações). Embora não tenha sido informada no trabalho de referência, na reprodução assumiu-se a temperatura de análise como 25 °C. Talvez a temperatura das análises por CLAE do trabalho de referência tenha sido diferente, o que interfere na viscosidade e, portanto, na seletividade dos solventes utilizados na fase móvel. As diferentes origens do material vegetal utilizado nos experimentos comparados também pode ser um fator de influência nas discrepâncias.

4.3 *Clean-up* do extrato hidroalcoólico das folhas de *C. scolymus* por CLAE-DAD

A metodologia de *clean-up* foi desenvolvida para remover compostos de baixa polaridade que podem ficar adsorvidos na coluna de fase reversa do sistema CLAE, prejudicando assim a efetividade na separação das substâncias. A proposta foi o desenvolvimento de um procedimento rápido, simples e isento de solventes tóxicos. Assim, o solvente orgânico escolhido para aumentar a força de eluição da água em fase reversa foi o etanol. Para avaliar a força de eluição da mistura EtOH/H₂O nas análises do extrato das folhas de *C. scolymus* por cartuchos de fase reversa, foi realizado um fracionamento em três proporções diferentes de etanol e H₂O resultando em três frações (fr. 1:9; fr. 1:1 e fr. 100% EtOH), conforme procedimento descrito na seção 3.4. Para identificar as substâncias nas frações eluídas, as mesmas foram analisadas por CLAE-DAD com método de eluição proposto pelo trabalho de referência.

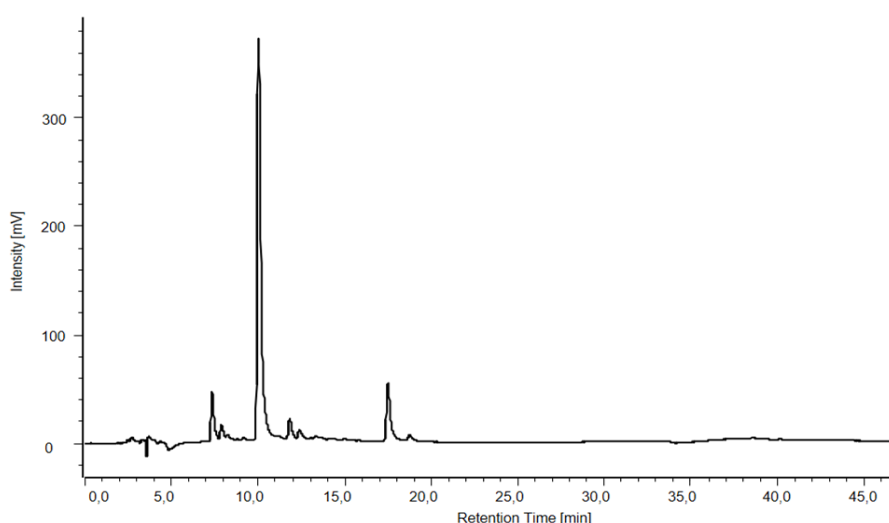


Figura 8: Cromatograma da fração '1:9' preparada a partir do extrato hidroetanólico das folhas de *C. scolymus* de acordo com os procedimentos descritos no trabalho de referência (NEGRO et al., 2012). Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.10; método de eluição descrito na seção 3.2, $\lambda = 350$ nm

A fração '1:9', segundo o cromatograma, contém os analitos mais polares presentes na matriz em relação às outras frações. A fração 1:1 e 100% contém os compostos de polaridade intermediária ou baixa presentes no extrato hidroalcoólico, conforme as figuras 8 e 9. Embora os cromatogramas de ambas as frações tenham diferenças significativas entre si no que se refere às áreas dos picos, são qualitativamente similares, com exceção dos picos com tempos de retenção maiores que 40 minutos presentes no cromatograma da fração 100%, em razão da menor polaridade do eluente, porém com intensidade muito baixa, e com isso não foi possível identificar a classe de metabólitos desses picos com análise dos espectros UV.

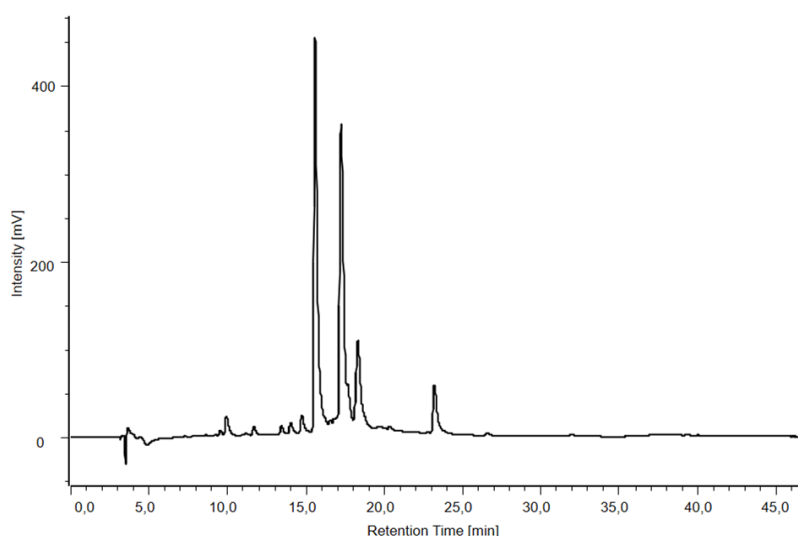


Figura 9: Cromatograma da fração '1:1' preparada a partir do extrato hidroetanólico das folhas de *C. scolymus* de acordo com os procedimentos descritos no trabalho de referência (NEGRO et al., 2012). Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.10; método de eluição descrito na seção 3.2, $\lambda = 350$ nm

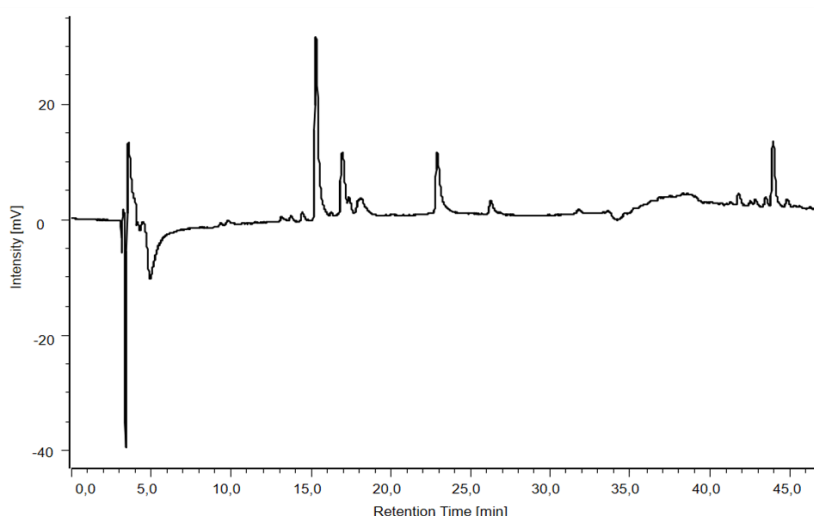


Figura 10: Cromatograma da fração '100%' preparada a partir do extrato hidroetanólico das folhas de *C. scolymus* de acordo com os procedimentos descritos no trabalho de referência (NEGRO et al., 2012). Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.10; método de eluição descrito na seção 3.2, $\lambda = 350$ nm

Posteriormente, a fração 7:3, preparada segundo a metodologia II (conforme descrito na seção 2.4) foi analisada, apresentando maior seletividade para os analitos de interesse. O cromatograma obtido apresentou de modo conjunto os picos de polaridade alta, intermediária e baixa, apresentando um perfil mais similar ao contido no trabalho de Negro et al. (2012).

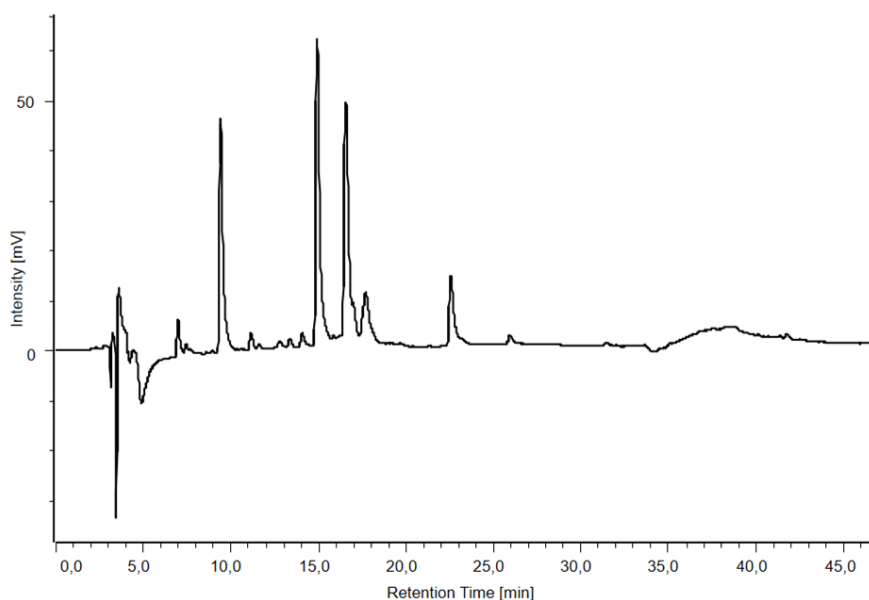


Figura 11: Cromatograma da fração ‘7:3’ preparada a partir do extrato hidroetanólico das folhas de *C. scolymus* de acordo com os procedimentos descritos no trabalho de referência (NEGRO et al., 2012). Sistema CLAE-DAD descrito na seção 3.8; método de eluição descrito na seção 3.2, $\lambda = 350$ nm

Embora as áreas dos picos obtidos no cromatograma dessa fração sejam relativamente diferentes em relação ao trabalho de referência e às frações 1:9 e 1:1, a impressão digital cromatográfica possui fins qualitativos, de modo que tal metodologia foi selecionada para o preparo de amostra nas etapas subsequentes.

4.4. Análises preliminares para avaliação da força de eluição do etanol

Para avaliar a influência da taxa de variação de EtOH (solvente orgânico) na separação dos picos correspondentes aos analitos de *C. scolymus* pela força de eluição, aplicou-se três gradientes com fase móvel composta por sistema solvente binário formado por EtOH (B) e H₂O + 0,5% de ácido acético (A) no sistema CLAE descrito na seção 3.8 e com coluna analítica de fase reversa (C₁₈) XBridge, (150 x 4,60 mm, 4 μ m, Waters®, Irlanda) e pré coluna (4 x 3 mm, 5 μ m, Phenomenex, USA). Os gradientes foram: 1) 95:5 (A:B, v/v) a 0:100 (A:B, v/v); 2) 95:5 (A:B, v/v) a 50:50 (A:B, v/v); 3) 95:5 (A:B, v/v) a 75:25 (A:B, v/v). O tempo, a temperatura e a vazão dos experimentos foram fixados em 30 min, 35°C e 1 mL.min⁻¹, respec-

tivamente. Foram acrescentados, ao fim dos 30 min dos gradientes, 10 minutos de limpeza (100% de B em modo isocrático).

As três análises preliminares (figuras 12,13 e 14) apresentaram um comportamento previsível, com uma melhor separação dos analitos conforme a taxa de variação do etanol se tornava sucessivamente menor do primeiro ao terceiro gradiente.

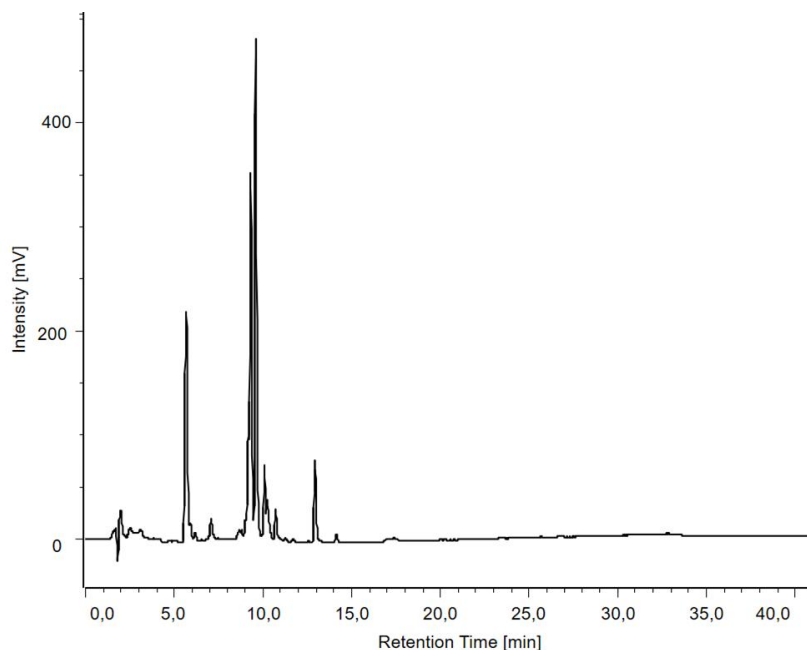


Figura 12: Cromatograma da 'fr. 7:3' das folhas de *C. scolymus*. Gradiente 95:5 (A:B, v/v) a 0:100 (A:B, v/v); 35°C; vazão 1 mL.min⁻¹; λ = 350 nm.

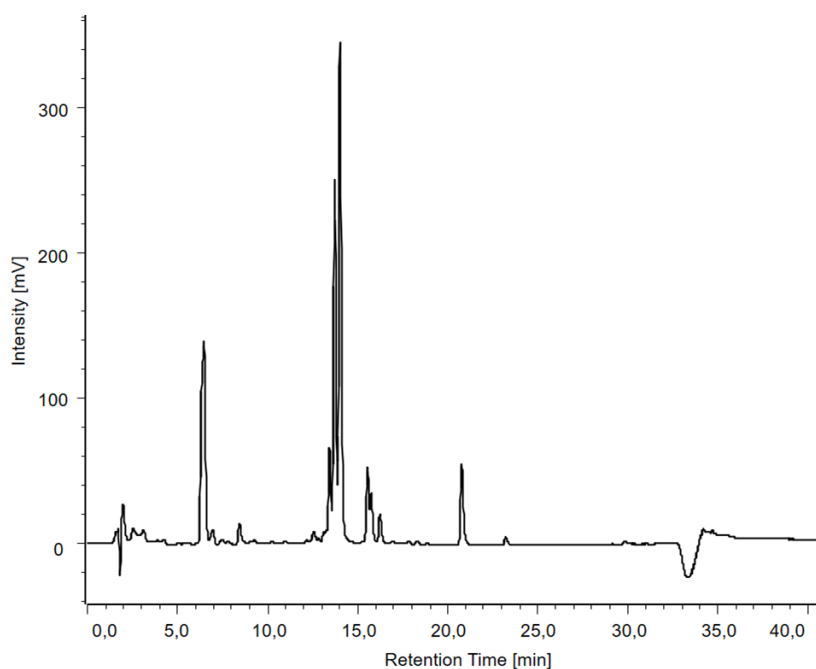


Figura 13: Cromatograma da 'fr. 7:3' das folhas de *C. scolymus*. Gradiente 95:5(A:B, v/v) a 50:50 (A:B, v/v) ; 35°C; vazão 1 mL.min⁻¹; λ = 350 nm

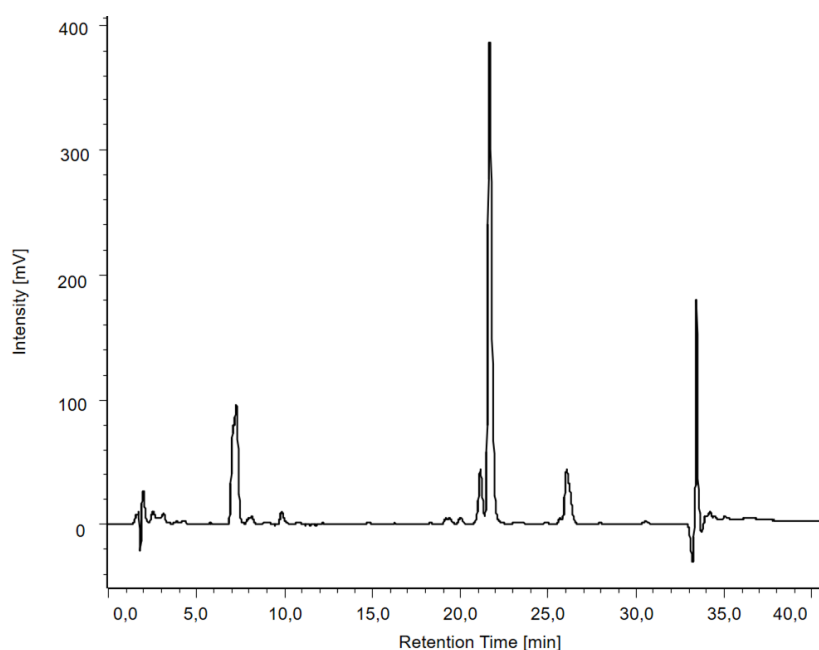


Figura 14: Cromatograma da 'fr. 7:3' das folhas de *C. scolymus*. Gradiente 95:5 (A:B, v/v) a 75:25 (A:B, v/v) ; 35°C; vazão 1 mL.min⁻¹; λ = 350 nm.

Além dos fatores cromatográficos avaliados como variáveis na Tabela 1, os fatores Concentração da amostra e Volume de injeção foram atribuídos os valores de 0,025 g.mL⁻¹ e 20 μ L, respectivamente.

Visando utilizar a menor quantidade possível de energia, foi atribuído o tempo de análise de 30 min para todos os experimentos, levando em consideração a complexidade da amostra.

4.5. Triagem de variáveis

A partir do pressuposto de que em um sistema, diversos fatores (ou variáveis) podem exercer influência em uma determinada resposta, experimentos para triagem são executados com o interesse de se determinar a magnitude da influência dessas variáveis, e, eventualmente, suas interações. A princípio, seleciona-se as variáveis de provável influência (fixando durante todo o tempo as variáveis não escolhidas), verifica-se a viabilidade de seu estudo, avalia-se os custos e o tempo necessários para a execução de metodologia experimental escolhida e, por fim, determina-se qual modalidade de planejamento fatorial será utilizada. Os planejamentos fatoriais podem ser *completos* ou *fracionários*, podem ser executados determinando de modo específico os valores experimentais (ou níveis) utilizados para cada fator de interesse e possuem aplicações distintas. Para estudar o efeito dos fatores sobre uma da resposta, manipulando os

níveis (n) é necessário ter no mínimo dois níveis diferentes. Dessa forma, os planejamentos com dois níveis são os mais simples e empregados com frequência na literatura (TEÓFILO, FERREIRA, 2006; PEREIRA FILHO, 2015)

Um planejamento fatorial completo exige a realização dos experimentos (ou ensaios) em todas as combinações de níveis dos fatores. Nesse contexto, caso haja n_1 níveis do fator 1, n_2 do fator 2, ..., e n_k do fator k, o planejamento terá a forma de um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$, contendo o número mínimo necessário de experimentos. Geralmente, os níveis dos fatores são nomeados pelos sinais (-) para o nível mais baixo e (+) para o nível mais alto, estabelecidos de acordo com os interesses e conhecimentos do pesquisador. O efeito das variáveis e suas interações são calculados com a diferença das médias das respostas no nível alto ($y_{i(+)}$) e as médias das observações no nível mais baixo ($y_{i(-)}$) e o erro experimental pode ser estimado através de experimentos repetidos. No entanto, o planejamento fatorial completo exige um número muito elevado de ensaios experimentais com muitos fatores de estudo envolvidos, e nem sempre os efeitos de altas ordens em tais circunstâncias (como planejamentos com $k > 4$) são relevantes. Assim, em certas situações, pode ser proveitoso a utilização de um planejamento fatorial fracionário para monitoramento de um sistema (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010; PEREIRA FILHO, 2015; TEÓFILO, FERREIRA, 2006).

Planejamentos fatoriais fracionários permitem obter informações úteis a respeito dos efeitos mais importantes (na maioria das vezes, as mesmas obtidas com um planejamento fatorial completo) com um número menor de experimentos. Eles apresentam a estrutura n^{k-b} , onde b é o tamanho da fração do planejamento, a qual possui influência no número de efeitos estimados e no número de ensaios experimentais. Além disso, esse tipo de planejamento precisa de uma seleção rigorosa dos experimentos a serem executados a partir de um fatorial completo objetivando cobrir o máximo volume do domínio experimental e obter, por consequência, conclusões plausíveis com economia de tempo e recursos (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010; PEREIRA FILHO, 2015; TEÓFILO, FERREIRA, 2006).

Apesar de número reduzido de experimentos acarretar em perdas de informações e dificuldades de interpretação em virtude das confusões entre efeitos principais das variáveis e seus efeitos de interação (o que faz com que os efeitos aproximados sejam alternativamente denominados *contrastes*), pode-se resolver esses infortúnios com a realização de experimentos complementares. Além disso, um fator que merece atenção em planejamentos fatoriais fracionários é o conceito de resolução, definida por um número romano e relacionada à ordem com que se desconsidera os efeitos. Com base em um exemplo de planejamento de dois níveis

e cinco fatores, as resoluções geralmente presentes são as seguintes (TEÓFILO, FERREIRA, 2006):

- 1) Resolução III: Confunde efeitos de interação de segunda ordem (dois fatores) mas não confunde efeitos de primeira ordem (efeitos principais) entre si;
- 2) Resolução IV: Não confunde efeitos de primeira ordem entre si e nem com efeitos de interação de segunda ordem, mas confunde efeitos principais com efeitos de interação de terceira ordem (três fatores) e efeitos de interação de segunda ordem se confundem entre si e com outros efeitos;
- 3) Resolução V: Os efeitos de primeira ordem são confundidos com efeitos de interação de quarta ordem (quatro variáveis) e efeitos de segunda ordem são confundidos com efeitos de interação de terceira ordem.

Também, existe a possibilidade de realização de planejamentos fatoriais com *ponto central* (nível zero), no qual se insere um experimento no centro do planejamento e se emprega o valor médio experimental dos níveis, tornando possível quantificar o erro intrínseco e falta de ajuste de um modelo empírico com um número reduzido de réplicas (PEREIRA FILHO, 2015; TEÓFILO, FERREIRA, 2006).

Com base em tais pressupostos, os níveis dos fatores cromatográficos escolhidos para a triagem, baseados em ensaios cromatográficos preliminares, estão dispostos na tabela 1.

Tabela 1: Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos para triagem de variáveis cromatográficas (planejamento fatorial fracionário com 2 níveis e 5 fatores: 2_v^{5-1}).

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
X1. % inicial de EtOH	5	12,5	20
X2. % final de EtOH	25	37,5	50
X3. Temperatura de análise (°C)	35	57,5	80
X4. % ácido acético na água	0	0,25	0,5
X5. Vazão (mL/min)	0,6	0,8	1,0

A matriz de coeficientes de contraste (contendo os níveis codificados de -1 a 1 para tratamento de todas as variáveis com igual relevância e os experimentos realizados) e os valores experimentais dos níveis estão na tabela 2 com as respectivas respostas investigadas (número de picos e GCFR) para o início do desenvolvimento do *fingerprinting* do extrato hidroetanólico das folhas de alcachofra e os cromatogramas relativos aos experimentos estão representados nas figuras 15 e 16 (com exceção dos experimentos no ponto central, apenas realizados para estimar o erro puro dos modelos).

Tabela 2: Fatores e níveis investigados no Planejamento Fatorial Fracionário $2\sqrt{5-1}$ e resultados obtidos

Exp.	Fatores ^a					Termos da resposta GCFR				Resultados ^d	
	X1	X2	X3	X4	X5	FP	MP	FP/MP	n/t	n	GCFR(x=2)
1	-1 (5)	-1 (25)	-1 (35)	-1(0)	1 (1)	3	9	0,33	0,40	12	19,20
2	1 (20)	-1 (25)	-1 (35)	-1 (0)	-1 (0,6)	0	6	0	0,20	6	0
3	-1 (5)	1 (50)	-1 (35)	-1 (0)	-1 (0,6)	6	9	0,67	0,50	15	75,00
4	1 (20)	1 (50)	-1 (35)	-1 (0)	1 (1)	0	7	0	0,23	7	0
5	-1 (5)	-1 (25)	1 (80)	-1 (0)	-1 (0,6)	2	9	0,22	0,37	11	9,86
6	1 (20)	-1 (25)	1 (80)	-1 (0)	1 (1)	0	4	0	0,13	4	0
7	-1 (5)	1 (50)	1 (80)	-1 (0)	1 (1)	0	8	0	0,27	8	0
8	1 (20)	1 (50)	1 (80)	-1 (0)	-1 (0,6)	0	4	0	0,13	4	0
9	-1 (5)	-1 (25)	-1 (35)	1 (0,5)	-1 (0,6)	7	10	0,70	0,57	17	114,64
10	1 (20)	-1 (25)	-1 (35)	1 (0,5)	1 (1)	1	11	0,09	0,40	12	5,24
11	-1 (5)	1 (50)	-1 (35)	1 (0,5)	1 (1)	3	18	0,17	0,70	21	51,45
12	1 (20)	1 (50)	-1 (35)	1 (0,5)	-1 (0,6)	0	13	0	0,43	13	0
13	-1 (5)	-1 (25)	1 (80)	1 (0,5)	1 (1)	1	9	0,11	0,33	10	3,70
14	1 (20)	-1 (25)	1 (80)	1 (0,5)	-1 (0,6)	0	5	0	0,17	5	0
15	-1 (5)	1 (50)	1 (80)	1 (0,5)	-1 (0,6)	0	13	0	0,43	13	0
16	1 (20)	1 (50)	1 (80)	1 (0,5)	1 (1)	0	6	0	0,20	6	0
PC1	0 (12,5)	0 (37,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	0 (0,8)	2	7	0,29	0,30	9	6,94
PC2	0 (12,5)	0 (37,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	0 (0,8)	2	7	0,29	0,30	9	6,94
PC3	0 (12,5)	0 (37,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	0 (0,8)	2	7	0,29	0,30	9	6,94
PC4	0 (12,5)	0 (37,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	0 (0,8)	2	7	0,29	0,30	9	6,94

^a X1 (Porcentagem inicial de EtOH), X2 (IPorcentagem final de EtOH), X3 (Temperatura, °C), X4 (Porcentagem de ácido acético na água), X5 (Vazão, mL/min)

^b Ponto central e replicata correspondente

^c Valores codificados fora dos parênteses e valores experimentais inseridos nos parênteses

^d Dados coletados em 350 nm

Com a matriz dos coeficientes de contraste (níveis codificados dos fatores) e as respostas experimentais, estimou-se modelos de regressão lineares através do Método dos Mínimos Quadrados. Dessa maneira, os modelos de regressão foram estimados (em 95% de confiança) e estão os indicados nas equações (4) e (5).

$$n = 10,000_{(\pm 0,666)} - 3,125_{(\pm 0,744)}x_1 - 2,625_{(\pm 0,744)}x_3 + 1,875_{(\pm 0,744)}x_4 - 3,125_{(\pm 0,744)}x_{34} \quad (\text{Eq. 4})$$

$$GCFR(x = 2) = 15,343_{(\pm 5,846)} - 16,790_{(\pm 6,536)}x_1 - 15,750_{(\pm 6,536)}x_3 - 7,494_{(\pm 6,536)}x_5 + 15,093_{(\pm 6,536)}x_{13} + 8,149_{(\pm 6,536)}x_{15} - 7,379_{(\pm 6,536)}x_{24} + 6,725_{(\pm 6,536)}x_{35} \quad (\text{Eq. 5})$$

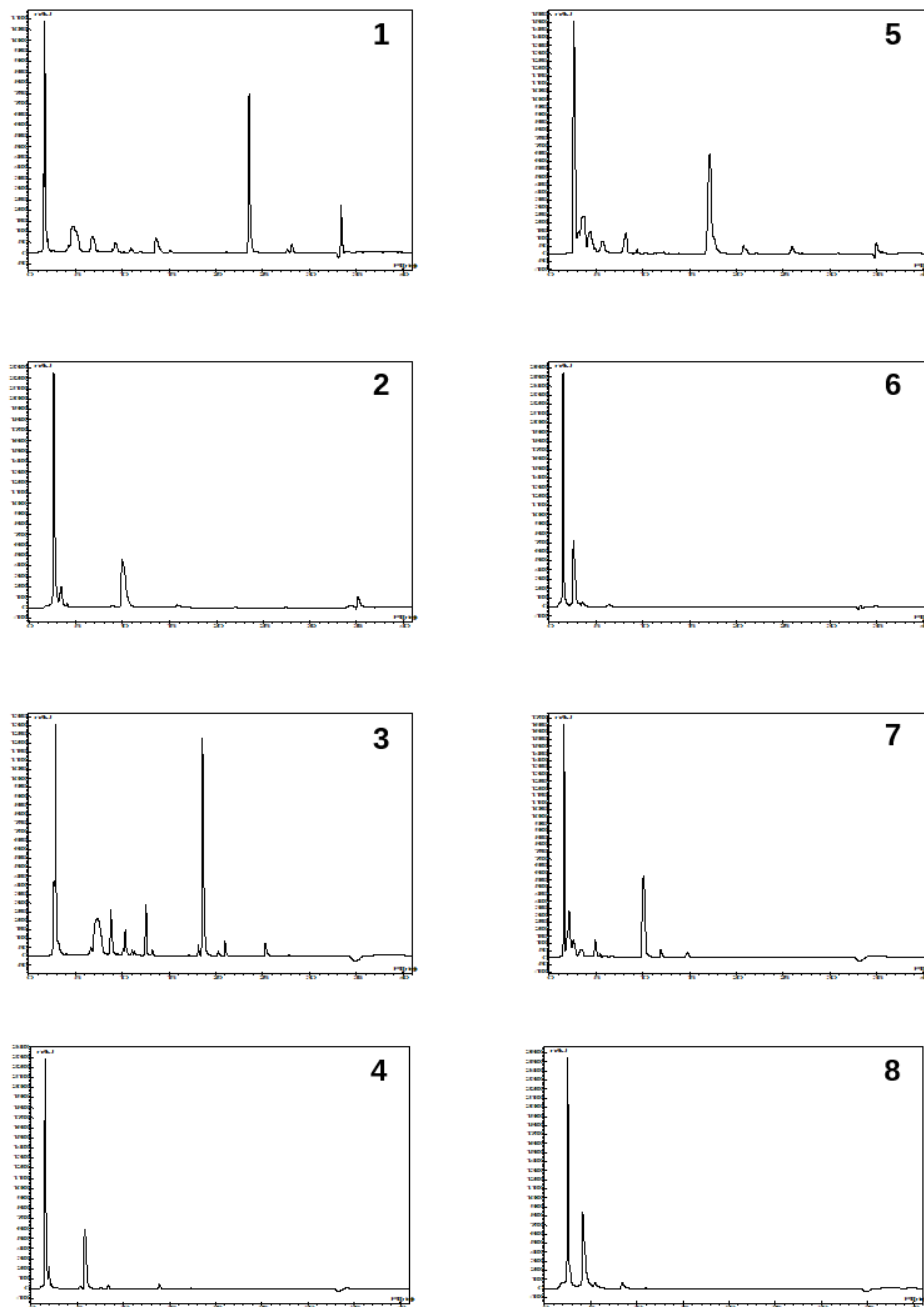


Figura 15: Cromatogramas 1 a 8 da triagem de variáveis

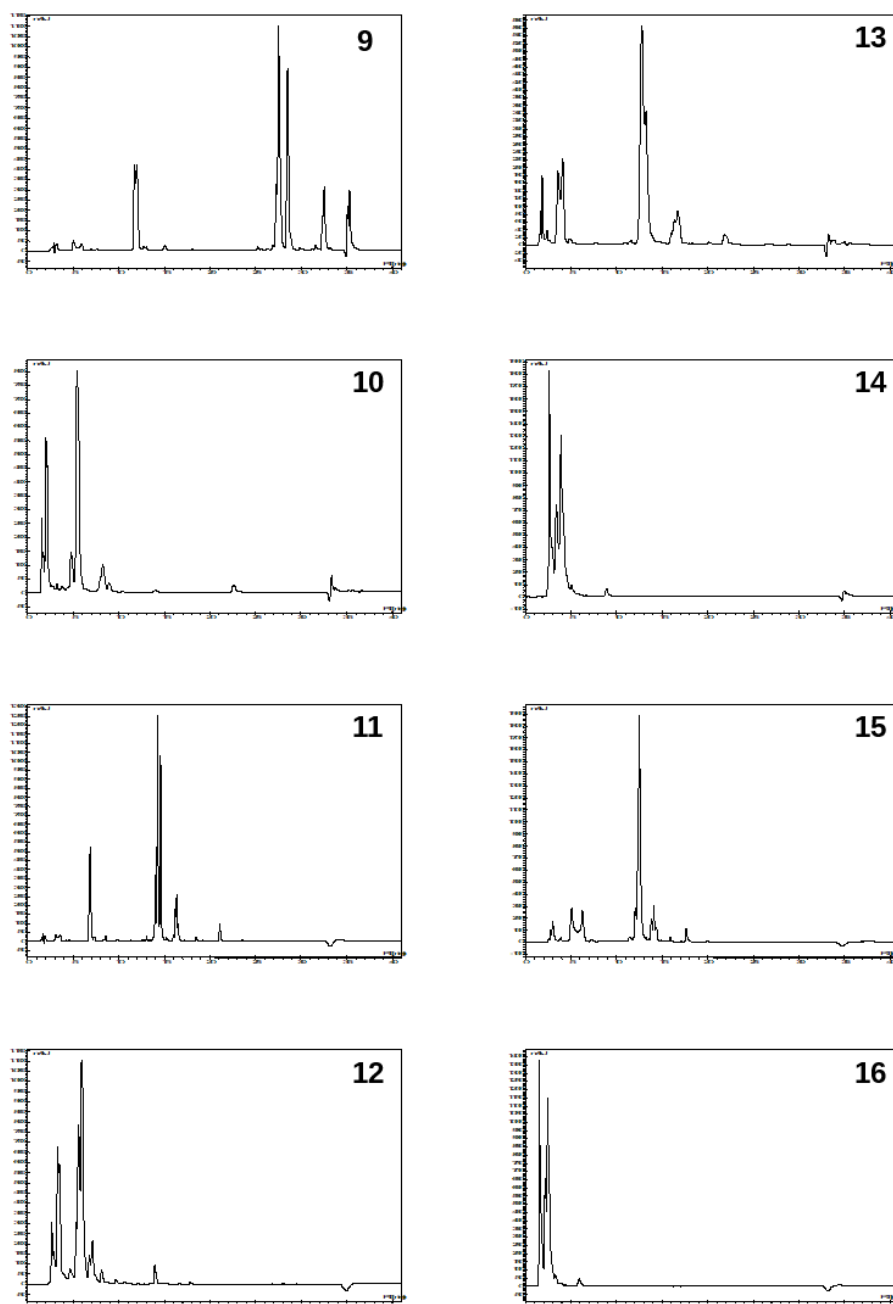


Figura 16: Cromatogramas 9 a 16 da triagem de variáveis

4.6 Análise de Variância (ANOVA) dos modelos empíricos lineares

Os resultados de planejamentos experimentais permitem efetuar uma Análise de Variância (ou ANOVA, acrônimo para *Analysis of Variance*), conforme representada na tabela 3. Tal ferramenta permite a avaliação de vários parâmetros do modelo proposto com o auxílio do Método dos Mínimos Quadrados (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010; BREITKREITZ, SOUZA, POPPI, 2014).

Inicialmente, pode-se citar a Soma Quadrática de regressão (SQR), vinculada os coeficientes de regressão gerados, onde se quantifica a diferença entre os valores previstos pelo modelo e a média das respostas experimentais. A Soma Quadrática dos Resíduos (SQres ou SQR) é proveniente da informação não prevista pelo modelo e se refere a soma do quadrado das diferenças entre os valores experimentais e os previstos. A soma de ambos os parâmetros se iguala à Soma Quadrática Total, ou SQT (PEREIRA FILHO, 2015).

O Erro Puro pode ser quantificado através das réplicas realizadas no planejamento e informa o erro intrínseco experimental. Ao se subtrair o erro puro de SQres, obtêm-se a falta de ajuste, definida como o grau de falta de habilidade do modelo empírico de se ajustar às respostas experimentais (PEREIRA FILHO, 2015).

Tabela 3: Descrição sucinta da Análise de Variância (ANOVA)

Fonte de variação	Soma quadrática (S.Q.)	Graus de liberdade (G.L.)	Legenda
SQR (Soma quadrática de regressão)	$\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p-1	P = número de coeficientes
SQres (Soma quadrática de resíduos)	$\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y})^2$	n-p	n= número de experimentos
SQT (Soma quadrática total)	$\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2$	n-1	m= número de experimentos independentes
Erro puro	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n-m	$\hat{y}_i$ = resposta prevista
Falta de ajuste	$\sum_{i=1}^m \sum_{j=1}^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m-p	$\bar{y}$ = média das respostas experimentais

Para cada um desses parâmetros pode-se relacionar um número de graus de liberdade, definidos como o número de determinações independentes para a elucidação de um valor de interesse. A razão entre a fonte de variação e seus respectivos graus de liberdade informa variâncias, ou médias quadráticas (MQ), as quais podem ser comparadas através de um teste F para a análise da qualidade do modelo proposto. Estabelecendo comparações entre a média quadrática de regressão e a média quadrática residual, para a confiabilidade do modelo é importante que a primeira seja significativamente maior que a segunda, ou que o valor de F calculado seja maior (convencional e idealmente, 10 vezes) que o valor de F crítico, ou tabelado,

tornando as variâncias estatisticamente diferentes (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010; PEREIRA FILHO, 2015).

O segundo teste F a ser realizado compara a Média Quadrática da Falta de Ajuste e a Média Quadrática do Erro Puro. Se a razão entre ambas (F calculado) for menor que F crítico, as médias quadráticas são estatisticamente iguais, indicando que o modelo apresenta ajuste e sua inaptidão em informar as respostas experimentais se confunde com o erro intrínseco das réplicas (PEREIRA FILHO, 2015).

Um outro parâmetro a se avaliar é a quantidade de informação, ou variação total em torno da média, que SQR reúne em razão de SQT, sendo numericamente igual a R^2 (coeficiente de determinação). Desconsiderando o erro puro do de SQR e dividindo o valor obtido por SQT, é possível obter a máxima variação explicável (R^2 máximo), ou máxima quantidade de informação que o modelo é capaz de explicar (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010, PEREIRA FILHO, 2015).

Especificamente no que refere os modelos de regressão para as respostas ‘número de picos’ e ‘GCFR(x=2)’, respectivamente, segundo os testes F ambos apresentaram regressão significativa (Com os valores de F calculado cerca de 14 e 5 vezes maiores que os valores críticos para $F_{4,15}$ e $F_{7,12}$) e presença de ajuste (visto que os valores para F calculado são menores que $F_{4,11}$ e $F_{1,11}$).

Tabela 4: Análise de Variância para o modelo empírico linear estimado para a resposta ‘número de picos’ (n), indicado pela expressão (4)

	ANOVA (n)			Teste F (95%)	
	S.Q.	G.L.	M.Q.	F calculado	F crítico
SQR	338,75	4	84,69	43,43	3,06
SQr	29,25	15	1,95		
SQT	368	19			
E. Puro	23	11	2,09	0,75	3,36
F. Ajuste	6,25	4	1,56		
R² explicado	0,92	R	0,96		
R² explicável	0,94	R máximo	0,97		

Tabela 5: Análise de Variância para o modelo empírico linear estimado para a resposta ‘*Green Chromatographic Fingerprinting Response*’ ($GCFR(x=2)$), indicado pela expressão (5)

	ANOVA ($GCFR(x=2)$)			Teste F (95%)	
	S.Q.	G.L.	M.Q.	F calculado	F crítico
SQR	15678	7	2239,7	15,56	2,91
SQr	1727,5	12	143,96		
SQT	17405	19	916,07		
E. Puro	1374,7	11	124,98	2,82	4,84
F. Ajuste	352,8	1	352,8		
R² explicado	0,90	R	0,95		
R² explicável	0,92	R máximo	0,96		

Entretanto, sabe-se que o planejamento fatorial fracionário é aplicado de modo geral para identificação de variáveis significativas em um sistema de estudo, visto que ele não permite a estimativa da curvatura na superfície de resposta. Nesse contexto, para um estudo mais detalhado das condições experimentais ideais, são necessários planejamentos mais sofisticados e robustos com as variáveis identificadas como importantes na fase de triagem, com mais de dois níveis experimentais, de modo que se modele e desloque o sistema até a sua completa otimização, através de um ajuste fino (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2010; PEREIRA FILHO, 2015).

4.7 Gráficos de probabilidade normal

Para a discriminação visual entre as variáveis importantes e as não importantes nas respostas escolhidas, foram utilizados gráficos normais, cujo funcionamento é baseado na ideia de probabilidade cumulativa. Por exemplo, considerando um valor hipotético x_1 , à área à esquerda desse ponto que corresponde à probabilidade um valor de x ser menor ou igual a x_1 num gráfico de distribuição normal padronizada (onde uma variável aleatória tem média zero e variância um) é a probabilidade cumulativa (ou acumulada).

O gráfico de probabilidade cumulativa numa distribuição normal tem o aspecto de uma sigmoide (uma curva monotonicamente crescente de 0 a 1) numa escala cartesiana comum. Esta sigmoide que pode ser linearizada expandindo simetricamente a escala no eixo das ordenadas em torno do ponto que representa 50% da probabilidade acumulada (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010).

Uma vez que cada um dos 15 contrastes calculados (considerando apenas os principais e os de segunda ordem como relevantes e da resolução V) se relaciona com áreas iguais de uma curva gaussiana, eles foram dispostos em ordem crescente e a área da gaussiana (normalizada

em 1) é dividida por 15, de modo que cada área correspondente a um contraste tenha um valor de 0,067 e cada um deles se relacione com o centro de cada área, como 0,033 e 0,967 para o menor e o maior contraste, respectivamente, por exemplo. A média das áreas calculadas é associada a um valor de Z, múltiplo de valores determinados de desvio padrão (PEREIRA FILHO, 2015)

Ao se linearizar a curva sigmoidal, considerando que os contrastes relacionados às variáveis cromatográficas possuem uma distribuição normal com média zero, pode-se afirmar que os contrastes no centro que se ajustam relativamente bem à reta próximos ao ponto zero do eixo das abscissas não possuem significado físico. Os pontos relativamente distantes da reta fariam parte de outra população e são significativos (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010).

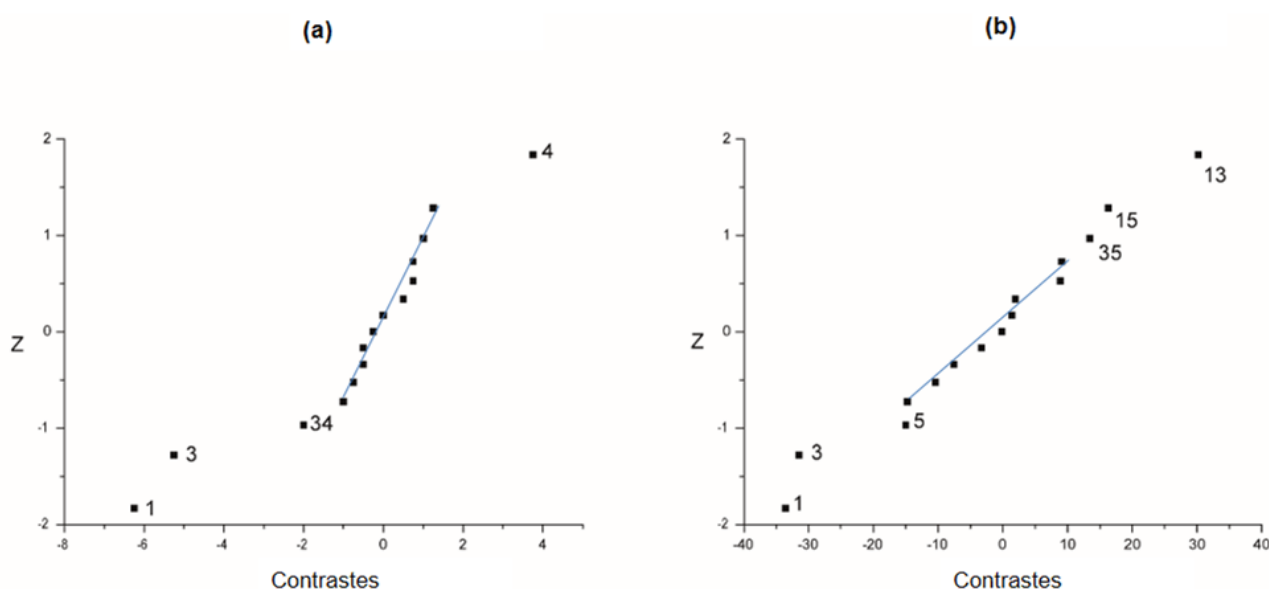


Figura 17: Gráficos de probabilidade normal para os contrastes das variáveis cromatográficas para as respostas (a) ‘número de picos’ e (b) ‘GCFR(x=2)’ obtidos no planejamento fatorial fracionário

Com base nesse pressuposto e com a observação do gráfico normal da resposta número de picos (Figura 17a), os contrastes significativos foram os relativos aos fatores e interação X1, X3, X4 e X34. No gráfico normal da resposta GCFR (Figura 17b), os contrastes que apresentaram efeitos significativos foram os dos fatores e interações X1, X3, X5, X35 e X15 e X13. No caso da resposta GCFR, os cálculos de ANOVA indicaram que contraste relacionado a X24 também foi levemente significativo, mas como essa importância estatística não se configura como real em termos práticos, ele foi mantido pelo rigor matemático nos modelos li-

-neares mas descartado na fase de otimização. Uma vez que há dois intervalos de níveis, os coeficientes dos modelos lineares equivalem a metade dos contrastes, assim como os respectivos intervalos de confiança.

Os gráficos permitiram conjecturas preliminares a partir do comportamento da matriz no sistema cromatográfico com base em Snyder e colaboradores (1997) e sob o ponto de vista empírico. Em ambas as respostas, os fatores X1 e X3 foram os mais significativos na separação dos metabólitos, com contrastes negativos (de maior valor absoluto). A % inicial de EtOH (X1) e a temperatura (X3), ao ser investigadas no nível -1 para o +1, reduziram, em média, 6,25 e 5,25 a quantidade de picos cromatográficos e 33,58 e 31,50 o *score* da função GCFR($x=2$)), respectivamente. Desse modo, infere-se que muito provavelmente os valores ideais para tais variáveis sejam os relacionados aos níveis -1 (como é possível notar nos experimentos 3,9 e 11 do Planejamento Fatorial Fracionário segundo a tabela Z, os quais obtiveram os maiores *scores* para as respostas). Enquanto a mudança de nível -1 para +1 no que se refere à variável X1 interferiu diretamente na força de eluição da fase móvel, para a variável X3 essa mudança ocasionou a eluição prematura dos picos em razão do decréscimo da constante dielétrica da água, o que potencializou a sua interação com analitos apolares e intensificou a força de eluição, o que também justifica a interação sinérgica X13.

A variável X4 (porcentagem de ácido acético na água) apresentou um contraste positivo, aumentando as respostas *n* e GCFR em, respectivamente, 3,75 e 8,87 unidades. O ácido presente na água pode ter provocado supressão de ionização dos metabólitos de caráter ácido e, portanto, melhorado a resolução dos picos. Em relação ao contraste (de valor -2) relativo à interação antagônica X34 na resposta *n*, o aumento da temperatura (X3) pode ter provocado uma diminuição na ionização do ácido na água (X4), o que consequentemente pode ter suprimido com menor eficiência a ionização das substâncias de caráter ácido e com isso, reduzido o número de picos. A variável X5 apresentou um contraste negativo para a resposta GCFR (-14,75). Maiores valores de vazão podem retardar a difusão do analito, resultar em menos pratos teóricos e influenciar negativamente a separação e distribuição cromatográfica.

Notou-se um contraste positivo de 16,30 para a interação sinérgica X15 apresentou um contraste positivo. Possivelmente, a diminuição da vazão diminuiu a taxa de variação do EtOH, permitindo maior número de equilíbrios das interações das substâncias com a fase estacionária e fase móvel (aumento do número de pratos teóricos), o que proporciona maior eficiência na separação das substâncias e proporciona também, melhor distribuição. A interação sinérgica X35 com contraste positivo (13,45) também se relaciona à quantidade de pratos teóricos.

4.8. Planejamento Doehlert

Em determinadas circunstâncias, o planejamento Doehlert ou matriz Doehlert é uma alternativa útil para planejamentos experimentais de segunda ordem. Seus pontos seriam os vértices de um hexágono oriundos de um simplex regular e, geralmente, número total de experimentos no planejamento correspondem a k^2+k+pc em que: k é o número de fatores e pc é o número de experimentos no ponto central. Ao se analisar as variáveis de interesse em mais níveis em detrimento de outras consideradas menos importantes pelo experimentador é possível descrever um domínio experimental circular para duas variáveis, esférico para três e hiperesférico para quatro. Nesse contexto, acentua-se a uniformidade do espaço (FERREIRA et al., 2004; TEÓFILO, FERREIRA, 2006).

Cada planejamento é definido considerando o número de variáveis e os valores codificados (X_i) da matriz experimental. A relação entre os valores codificados e experimentais é dada pela equação (6):

$$X_i = \left(\frac{Z_i - Z_i^0}{\Delta Z_i} \right) \beta_d \quad (\text{Eq. 6})$$

Onde o termo X_i é o valor codificado para o nível do fator i , Z_i é o seu experimental, ΔZ_i é a distância entre o valor experimental no nível superior ou inferior, β_d é o maior valor limite codificado na matriz para cada fator e Z_i^0 é o valor experimental no ponto central.

Em detrimento de outros planejamentos experimentais de segunda ordem, como o Planejamento Composto Central (CCD) e o planejamento Box-Behnken, o planejamento Doehlert se mostra o mais eficiente, considerando que eficiência nesse contexto signifique a razão entre o número de coeficientes do modelo estimado (p) e a quantidade de experimentos(n). O menor número de experimentos para se chegar à condição ótima ocorre porque o domínio da vizinhança pode ser explorado pelo ajuste de poucos experimentos, utilizando pontos experimentais já realizados. No entanto, essa vantagem apresenta restrições: apesar de não haver divergências significativas em seu uso mesmo que essas matrizes não apresentem ortogonalidade nem rotabilidade, utilizar o planejamento Doehlert com menos de três variáveis pode resultar em falta de ajuste do modelo estimado em razão do número reduzido de ensaios experimentais (FERREIRA et al., 2004; TEÓFILO, FERREIRA, 2006; PEREIRA FILHO, 2015).

Uma vez que quatro variáveis foram as mais importantes, a matriz Doehlert é uma alternativa interessante para o deslocamento do sistema até a região experimental de maior número de picos e melhor distribuição no *fingerprint* metabólico a partir das folhas da planta

de *C. scolymus*. Especificamente, as variáveis consideradas mais importantes (de maiores contrastes, em módulo) foram analisadas em mais níveis para se obter mais informações químicas da matriz. Além disso, embora X5 não tenha indicado um contraste significativo, uma avaliação estatística da análise de variância indicou que essa variável poderia ser relevante para o modelo e foi mantida no planejamento Doehlert. Os resultados obtidos estão indicados na tabela 6.

Tabela 6: Fatores e níveis investigados no Planejamento Doehlert e resultados obtidos

Exp.	Fatores ^a				Termos da resposta GCFR					Resultados ^d	
	X5	X1	X3	X4	FP	MP	FP/MP	n/t	n	GCFR(x=1)	GCFR(x=2)
1	1 (1,0)	0 (12,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	0	9	0	0,30	9	0,00	0,00
2	0,5 (0,9)	0,87 (20,0)	0 (57,5)	0 (0,25)	0	8	0	0,27	8	0,00	0,00
3	0,5 (0,9)	0,29 (15,0)	0,82 (80,0)	0 (0,25)	0	10	0	0,33	10	0,00	0,00
4	0,5 (0,9)	0,29 (15,0)	0,2 (63,1)	0,79 (0,50)	0	10	0	0,33	10	0,00	0,00
5	-1 (0,6)	0 (12,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	2	11	0,18	0,43	13	1,02	13,32
6	-0,5 (0,7)	-0,87 (5,0)	0 (57,5)	0 (0,25)	3	15	0,2	0,6	18	2,16	38,88
7	-0,5 (0,7)	-0,29 (10,0)	-0,82 (35,0)	0 (0,25)	4	14	0,29	0,6	18	3,09	55,54
8	-0,5 (0,7)	-0,29 (10,0)	-0,2 (51,0)	-0,79 (0)	2	13	0,15	0,5	15	1,15	17,31
9	0,5 (0,9)	-0,87 (5,0)	0 (57,5)	0 (0,25)	2	15	0,13	0,57	17	1,28	21,84
10	0,5 (0,9)	-0,29 (10,0)	-0,82 (35,0)	0 (0,25)	4	15	0,27	0,63	19	3,21	60,97
11	0,5 (0,9)	-0,29 (10,0)	-0,2 (51,9)	-0,79 (0)	2	12	0,17	0,47	14	1,09	15,24
12	-0,5 (0,7)	0,87 (20,0)	0 (57,5)	0 (0,25)	0	8	0	0,27	8	0,00	0,00
13	0 (0,8)	0,58 (17,5)	-0,82 (35,0)	0 (0,25)	2	14	0,14	0,53	16	1,22	19,50
14	0 (0,8)	0,58 (17,5)	-0,2(51,9)	-0,79 (0)	0	9	0	0,30	9	0,00	0,00
15	-0,5 (0,7)	0,29 (15,0)	0,82 (80,0)	0 (0,25)	0	11	0	0,37	11	0,00	0,00
16	0 (0,8)	-0,58 (7,5)	0,82 (80,0)	0 (0,25)	1	10	0,10	0,37	11	0,40	4,44
17	0 (0,8)	0 (12,5)	0,61 (74,4)	-0,79 (0)	0	9	0	0,30	9	0,00	0,00
18	-0,5 (0,7)	0,29 (15,0)	0,2 (63,1)	0,79 (0,50)	0	11	0	0,37	11	0,00	0,00
19	0 (0,8)	-0,58 (7,5)	0,2 (63,1)	0,79 (0,50)	2	11	0,18	0,43	13	1,02	13,32
20	0 (0,8)	0 (12,5)	-0,61 (40,6)	0,79 (0,50)	2	12	0,17	0,47	14	1,09	15,24
PC1 ^b	0 (0,8)	0 (12,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	1	10	0,10	0,37	11	0,40	4,44
PC2 ^b	0 (0,8)	0 (12,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	1	9	0,11	0,33	10	0,37	3,70
PC3 ^b	0 (0,8)	0 (12,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	1	10	0,10	0,37	11	0,40	4,44
PC4 ^b	0 (0,8)	0 (12,5)	0 (57,5)	0 (0,25)	1	11	0,09	0,40	12	0,44	5,24

^a X5 (vazão, mL min⁻¹), X1(IPorcentagem inicial de EtOH), X3 (Temperatura, °C), X4 (Porcentagem de ácido acético na água)^b Ponto central e replicata correspondente^c Valores codificados fora dos parênteses e valores experimentais inseridos nos parênteses^d Dados coletados em 350 nm

Os cromatogramas correspondentes a cada experimento (com exceção das replicatas no ponto central, realizadas apenas para estimar o erro dos modelos) estão representados nas figuras 18 a 20.

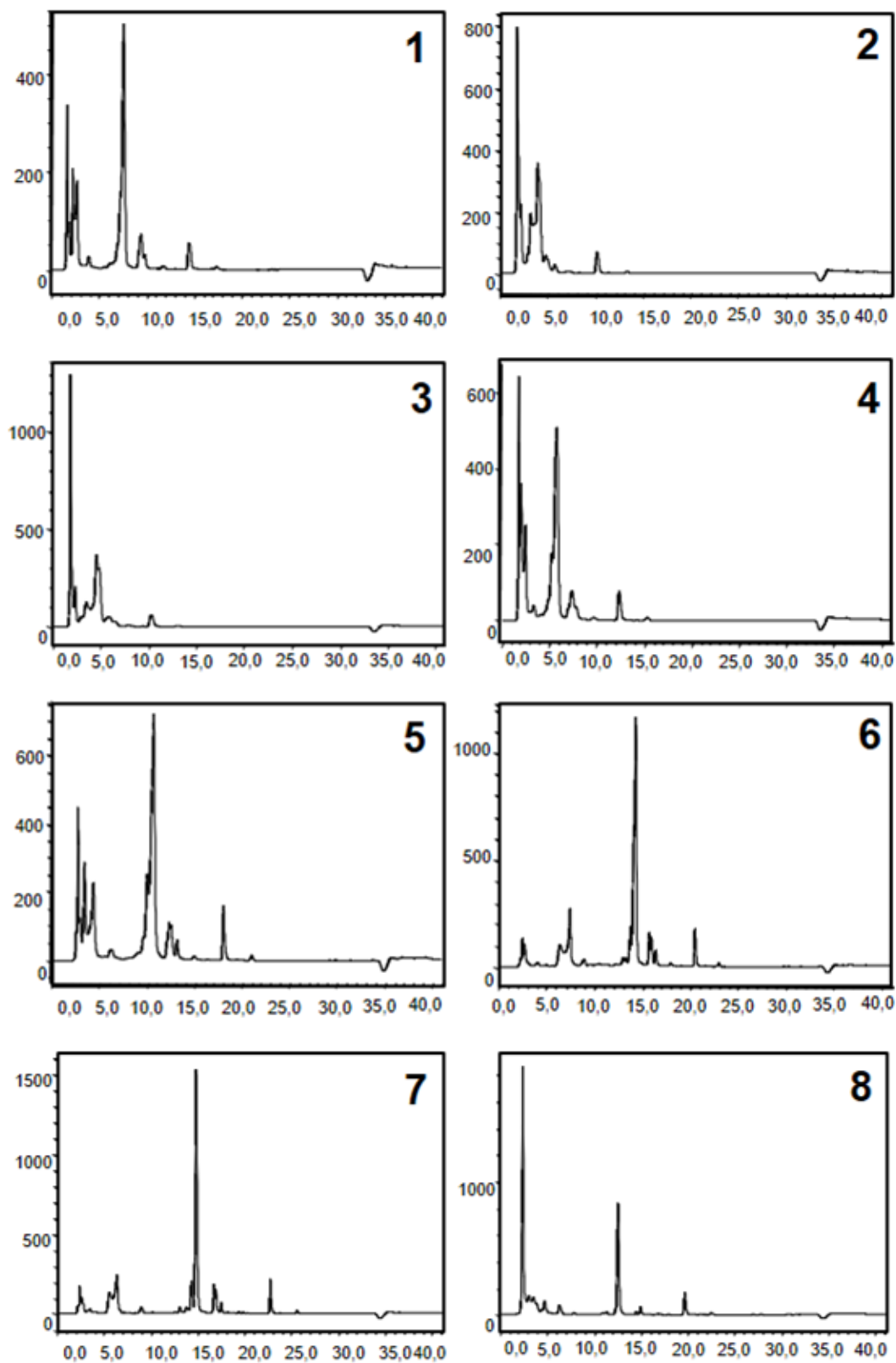


Figura 18: Cromatogramas 1 a 8 do Planejamento Doehlert

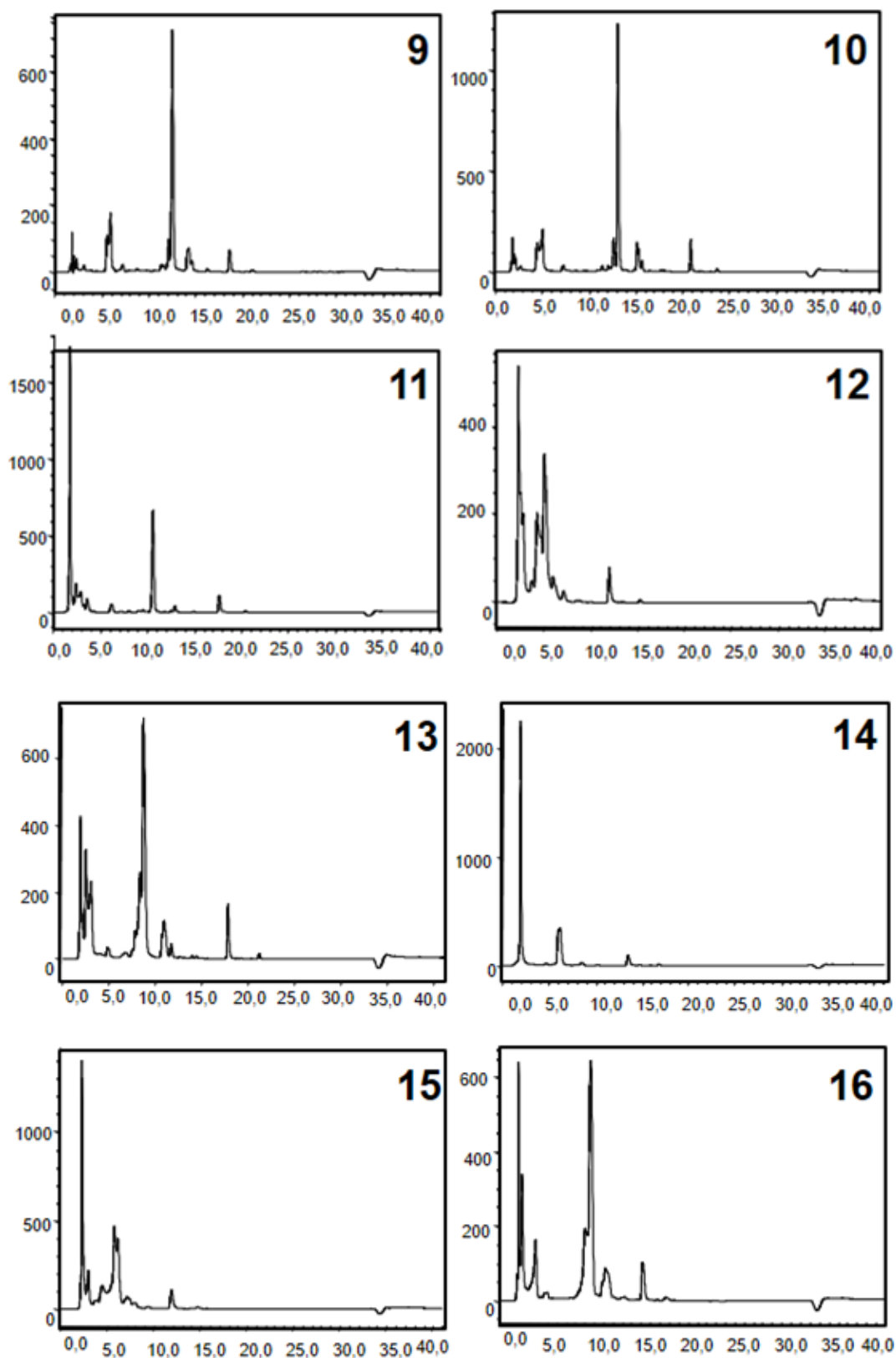


Figura 19: Cromatogramas 9 a 16 do Planejamento Doehlert

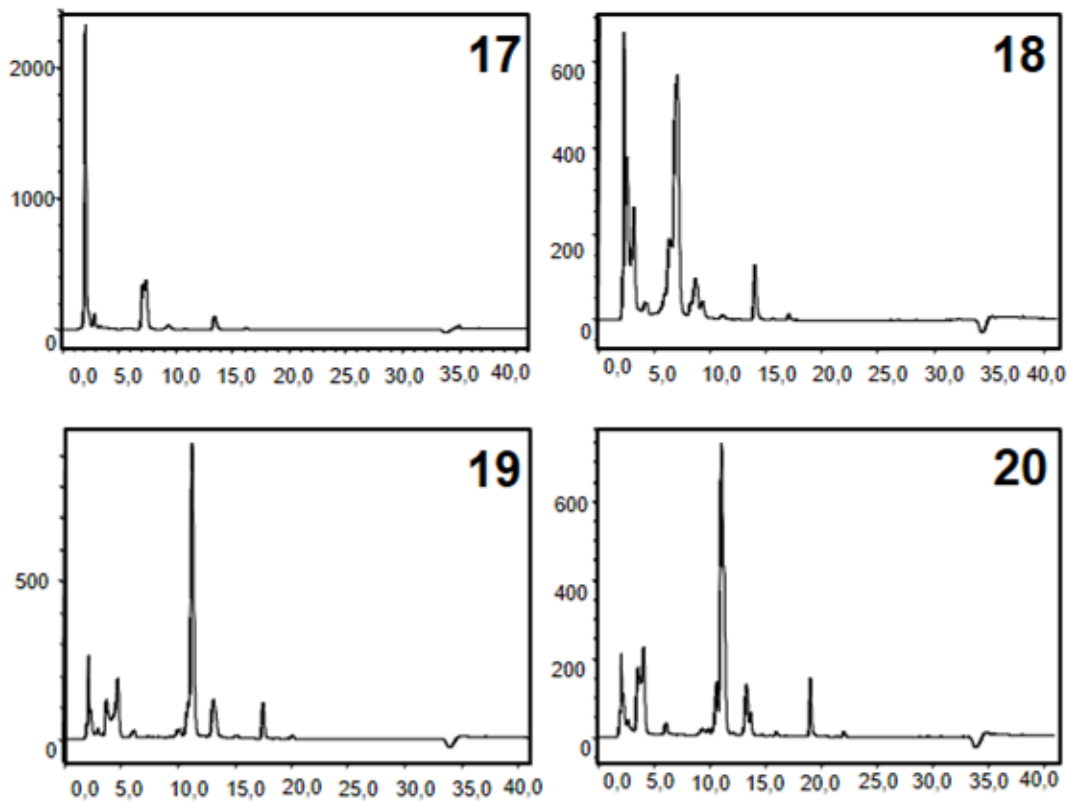


Figura 20: Cromatogramas 17 a 20 do Planejamento Doehlert

Os cromatogramas relativos às réplicas no ponto central, assim como na triagem de variáveis, foram omitidos uma vez que apenas foram úteis para contabilizar o erro puro dos modelos estimados.

A partir dos dados experimentais e das réplicas adicionais no ponto central visando o cálculo dos ajustes, com a utilização do método dos mínimos quadrados, foram estimados modelos multivariados empíricos que relacionavam as variáveis estudadas e as respostas de interesse (equações 7 e 8):

$$n = 11,678_{(\pm 0,746)} - 4,561_{(\pm 1,315)}x_1 - 4,201_{(\pm 1,314)}x_3 + 3,343_{(\pm 2,121)}x_3^2 \quad (\text{Eq. 7})$$

$$GCFR(x = 2) = -18,921_{(\pm 5,650)}x_1 - 24,117_{(\pm 5,646)}x_3 + 21,569_{(\pm 8,058)}x_1^2 + 29,015_{(\pm 7,584)}x_3^2 + 32,265_{(\pm 15,369)}x_{13} \quad (\text{Eq. 8})$$

Nota-se a importância das variáveis X1 e X3 (presentes nos modelos) a partir dos resultados experimentais da tabela 6 e dos modelos estimados, que deixaram claro que a interação sinérgica entre X1 e X3 influenciaram intensamente o número de picos ao longo do cromatograma (segundo termo da resposta GCFR) bem como o número de picos pelo tempo (terceiro termo de GCFR), ao contrário das impressões preliminares obtidas na triagem de variáveis, a qual havia apontado a importância de tal interação apenas para a resposta GCFR.

Os graus de liberdade para o erro puro e a falta de ajuste dos modelos consideraram as réplicas autênticas no ponto central e as obtidas com a eliminação dos coeficientes não significativos (PEREIRA FILHO, 2015).

Tabela 7: Análise de variância (ANOVA) do modelo empírico multivariado para a resposta ‘número de picos’ (n), representado pela expressão (7)

	ANOVA (n)			Teste F (95%)	
	S.Q.	G.L.	M.Q.	F calculado	F crítico
SQR	213,90	3	71,30	35,90	3,10
SQr	39,72	20	1,99		
SQT	253,63	23			
E. Puro	12	10	1,2	2,31	2,98
F. Ajuste	27,72	10	2,772		
R² explicado	0,84	R	0,92		
R² explicável	0,95	R máximo	0,98		

Tabela 8: Análise de variância (ANOVA) do modelo empírico multivariado para a resposta ‘Green Chromatographic Fingerprinting Response’ (GCFR(x=2)), representado pela expressão (8)

	ANOVA (GCFR (x=2))			Teste F (95%)	
	S.Q.	G.L.	M.Q.	F calculado	F crítico
SQR	7095,28	4	1773,82	48,69	2,90
SQr	692,13	19	36,43		
SQT	7787,41	23			
E. Puro	258,41	11	23,49	2,31	2,95
F. Ajuste	433,72	8	54,22		
R² explicado	0,91	R	0,95		
R² explicável	0,97	R máximo	0,98		

Os testes F oriundos da Análise de Variância dos modelos (tabelas 7 e 8) indicaram que os dois modelos apresentam regressão significativa (já que os valores de F calculados para n e GCFR (x=2) são cerca de 12 e 17 vezes maiores que os valores críticos de F ou $F_{3,20}$ e $F_{4,19}$; respectivamente). Além disso, eles apresentaram presença de ajuste (com os valores de F calculados menores que os valores de F críticos). Desse modo, suas capacidades de previsão de

condições experimentais ótimas e descrição do comportamento da resposta escolhida em função das variáveis presentes são confiáveis (BARROS NETO; SCARMÍNIO; BRUNS, 2010).

Os modelos quadráticos empíricos previram uma região experimental ótima em comum (5% para X1 e 35 graus para X3), o que possibilitaria a obtenção de 21 picos cromatográficos e um *score* de 95,09 para GCFR($x=2$), conforme é possível visualizar em suas respectivas superfícies de resposta (Figuras 21 e 22). Os modelos para GCFR($x=1$) – estimados visando uma análise mais detalhada - apresentaram falta de ajuste e foram descartados.

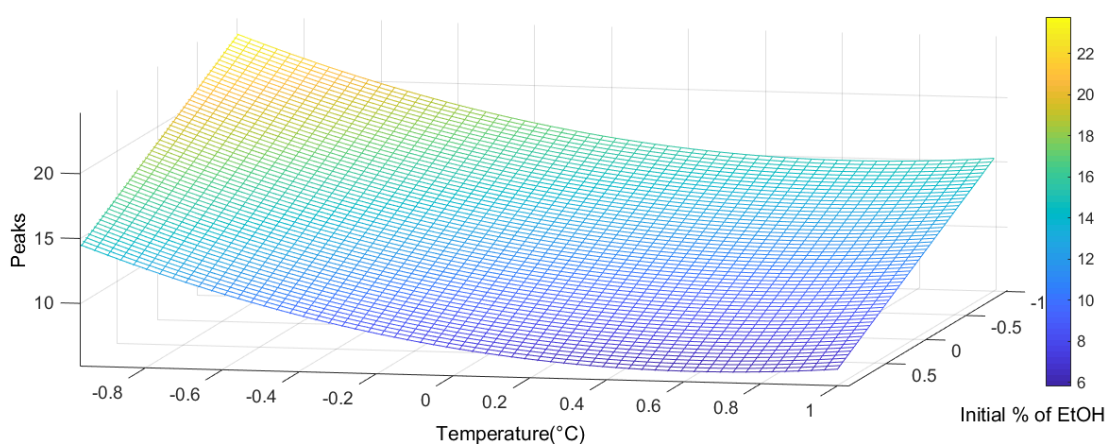


Figura 21: Superfície de resposta para o modelo quadrático multivariado relacionado à resposta número de picos (n) representado pela expressão (7).

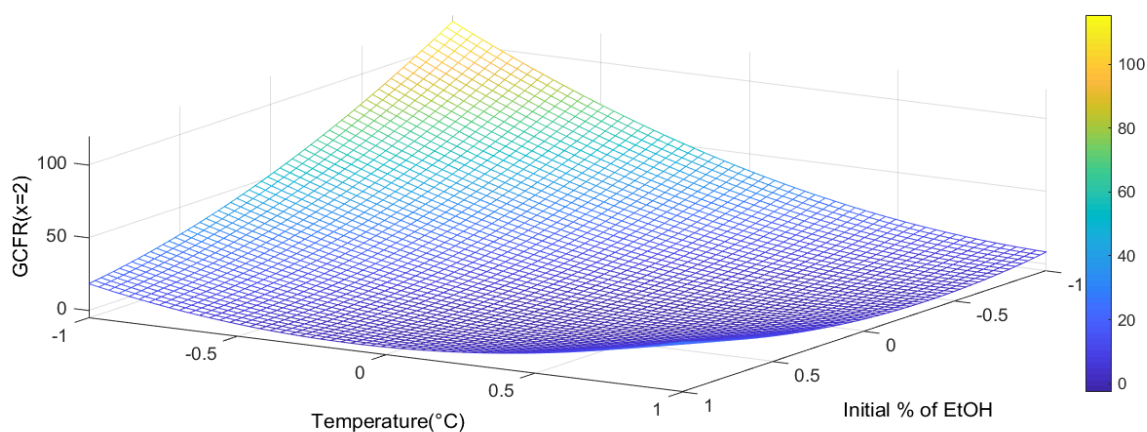


Figura 22: Superfície de resposta para o modelo quadrático multivariado relacionado à resposta ‘Green Chromatographic Fingerprinting Response’ (GCFR($x=2$)) representado pela expressão (8).

As conjecturas preliminares obtidas na triagem no que se refere à elevada importância das variáveis X1 e X3 em relação às outras estudadas e os níveis ideais (no caso, os menores investigados) para maximização da quantidade de picos e sua distribuição homogênea no cromatogramas foram comprovadas, sobretudo através dos cromatogramas 6 e 10.

Os experimentos confirmatórios da região experimental ótima foram realizados em triplicata. Os valores de porcentagem final de etanol, porcentagem de ácido acético na água e vazão foram fixados, respectivamente, em 50%, 0,5% e 1 mL min⁻¹. Apesar de não serem valores ideais sob o ponto de vista ambiental (0% de ácido e vazão de 0,6 mL min⁻¹ seriam preferíveis), sua escolha ocorreu levando em consideração o formato dos picos (mais simétricos e próximos da distribuição Gaussiana) e melhores resoluções obtidas com esses valores. Desse modo, o método otimizado possui a seguinte condição: 5:95 a 50:50 de EtOH / H₂O + ácido acético (v/v) em 30 min, com temperatura de 35°C e vazão de 1 mL min⁻¹. Com essas condições, o sistema atingiu uma pressão máxima de aproximadamente 15 MPa.

Eventuais diferenças em relação às respostas da triagem podem ser justificadas com o conserto do injetor e instalação de novo software para tratamento de dados no sistema CLAE após a execução do fatorial fracionário, o que pode ter afetado a concentração da amostra, o número de picos e sua distribuição no cromatograma. Como os experimentos do planejamento Doehlert foram feitos no mesmo dia, considera-se as respostas dotadas de confiabilidade para fins de otimização.

4.9 Análise dos resíduos matemáticos dos modelos quadráticos

A otimização também pode ser confirmada através da observação do comportamento dos *resíduos* (diferença entre os valores das respostas experimentais e previstas), visto que os mesmos possuem muitos graus de liberdade. Ao se plotar os gráficos dos valores experimentais *versus* os resíduos para os modelos lineares para as respostas ‘número de picos’ e ‘GCFR(x=2)’, (figuras 23a e 24a) é possível perceber que os resíduos apresentam uma certa tendência, - também conhecida como *heteroscedasticidade* - aumentando de modo relativamente proporcional ao aumento das respostas experimentais. Isso é bem nítido para o gráfico envolvendo a resposta GCFR (x=2). Em contrapartida, no que se refere aos gráficos de resíduos envolvendo os modelos quadráticos para ambas as respostas (figura 23b e 24b), os resíduos apresentam um aspecto mais aleatório ao redor do zero no eixo das ordenadas (sobretudo para a resposta GCFR), e são menores, situação considerada ideal para a confiabilidade de um modelo (BARROS NETO, SCARMÍNIO, BRUNS, 2010; PEREIRA FILHO, 2015).

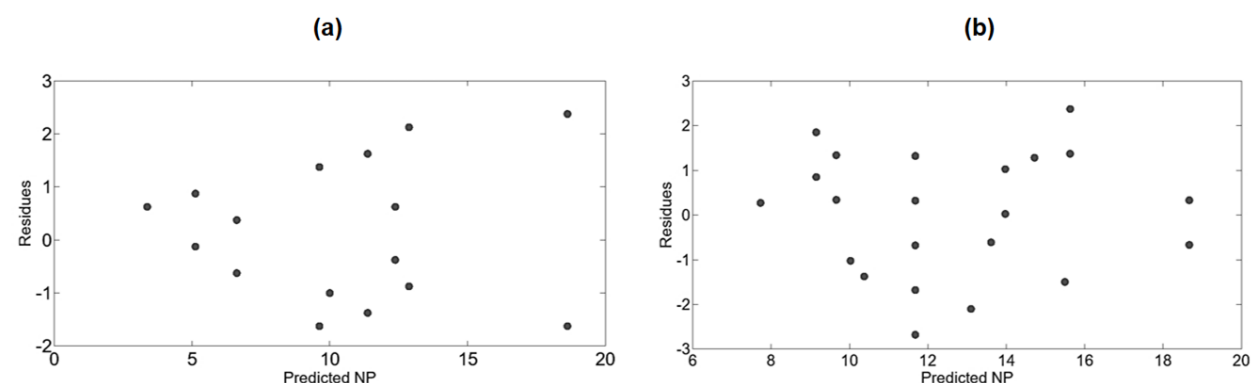


Figura 23: Gráficos de resíduos para o modelo linear para a resposta ‘número de picos’ (a) e para o modelo quadrático para a resposta ‘número de picos’ (b).

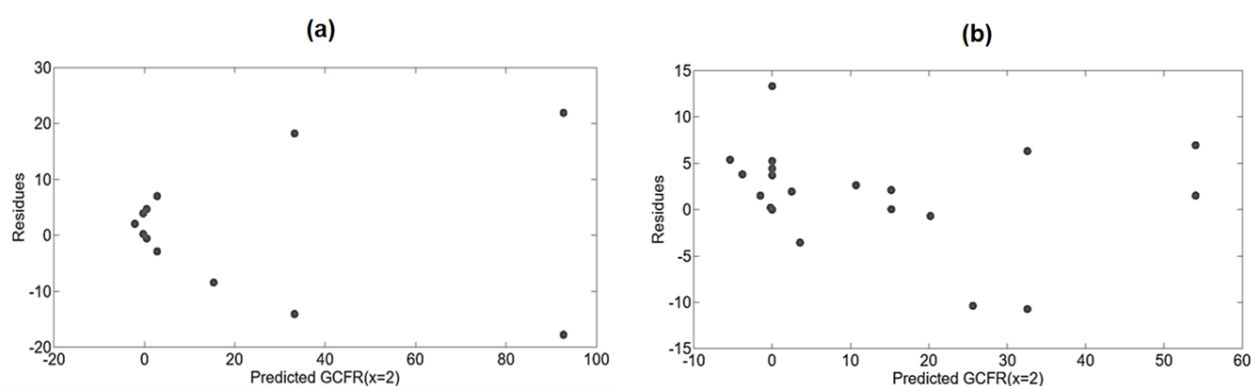


Figura 24: Gráficos de resíduos para o modelo linear para a resposta ‘GCFR(x=2)’ (a) e para o modelo quadrático para a resposta ‘GCFR(x=2)’ (b).

4.10. Perfil cromatográfico (*fingerprint*) do extrato hidroetanólico das folhas de *Cynara scolymus*

Analisando os espectros UV dos picos majoritários do perfil cromatográfico do método desenvolvido (Figura 25) e comparando com os espectros de padrões autênticos analisados nas mesmas condições experimentais (Figura 26) é possível determinar as classes dos metabólitos como sendo derivados do ácido cafeico (picos 1, 2, 4 e 5) e flavonoides, em específico flavonas devido à intensidade da banda I em relação a banda II (picos 3 e 6; MABRY, MARKHAM, THOMAS, 1970). Em virtude do efeito batocrômico provocado pela presença do íon acetato na fase móvel para o método desenvolvido (responsável pela aproximação das bandas I e II), os espectros são oriundos de análises cuja fase móvel continha MeCN e TFA.

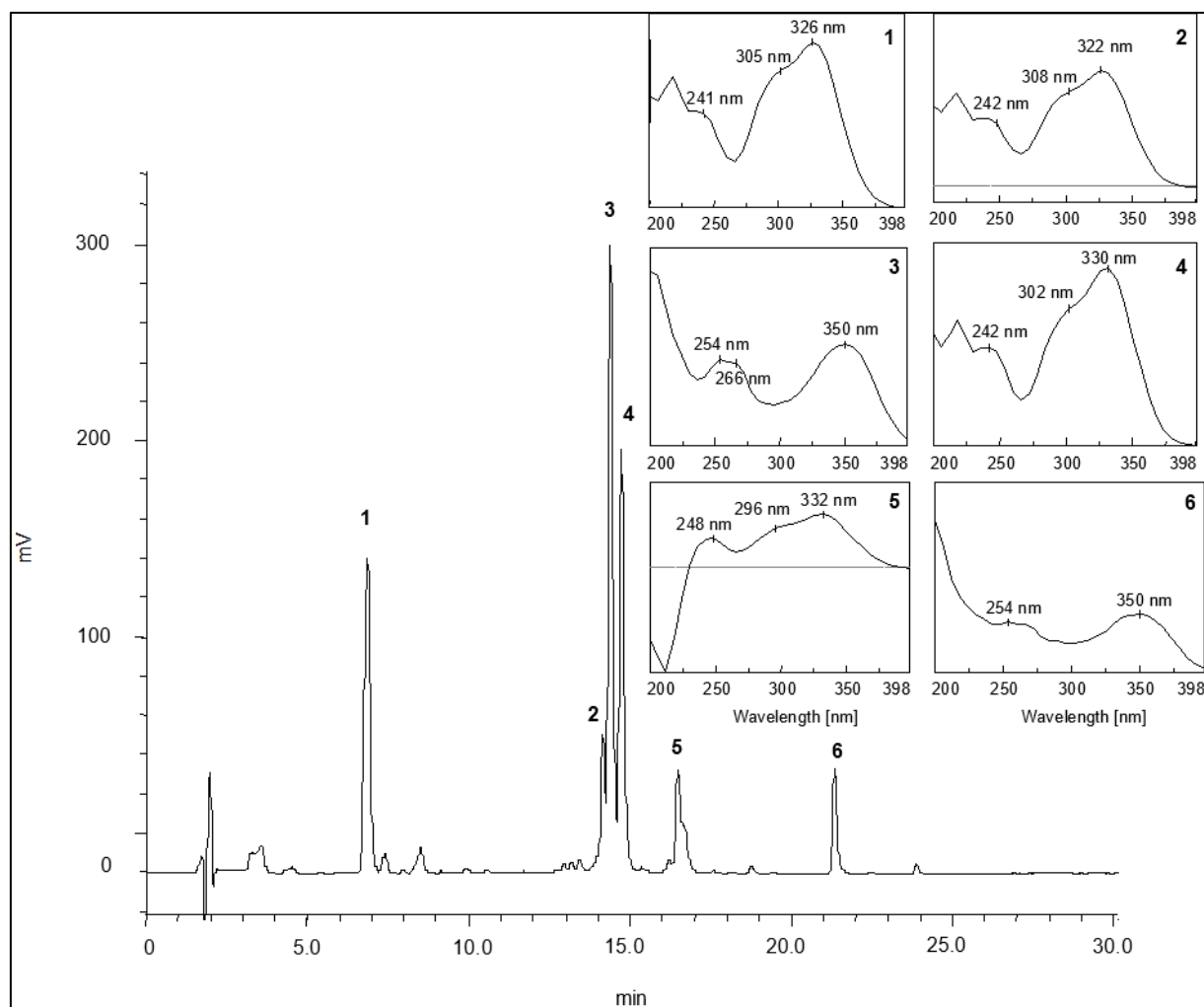


Figura 25: Perfil cromatográfico do extrato hidroetanólico das folhas de *Cynara scolymus* L por CLAE-DAD em $\lambda = 350$ nm. Coluna: XBridge, 150x 4,6 mm. Fases móveis: H₂O + 0.5% ácido acético (A) e EtOH (B) no seguinte gradiente: 5-50% B em 30 min. Vazão: 1 mL min⁻¹. Temperatura de análise: 35 °C; Concentração: 25 mg mL⁻¹; Volume de Injeção: 20 µL. Espectros UV dos picos majoritários estão dispostos no cromatograma.

Ao comparar os espectros UV (máximos de absorção), área relativa dos picos, ordem de eluição e estruturas dos metabólitos identificados no perfil obtido por Negro e colaboradores (2012), foi possível propor a identificação das substâncias de acordo com o Quadro 3.

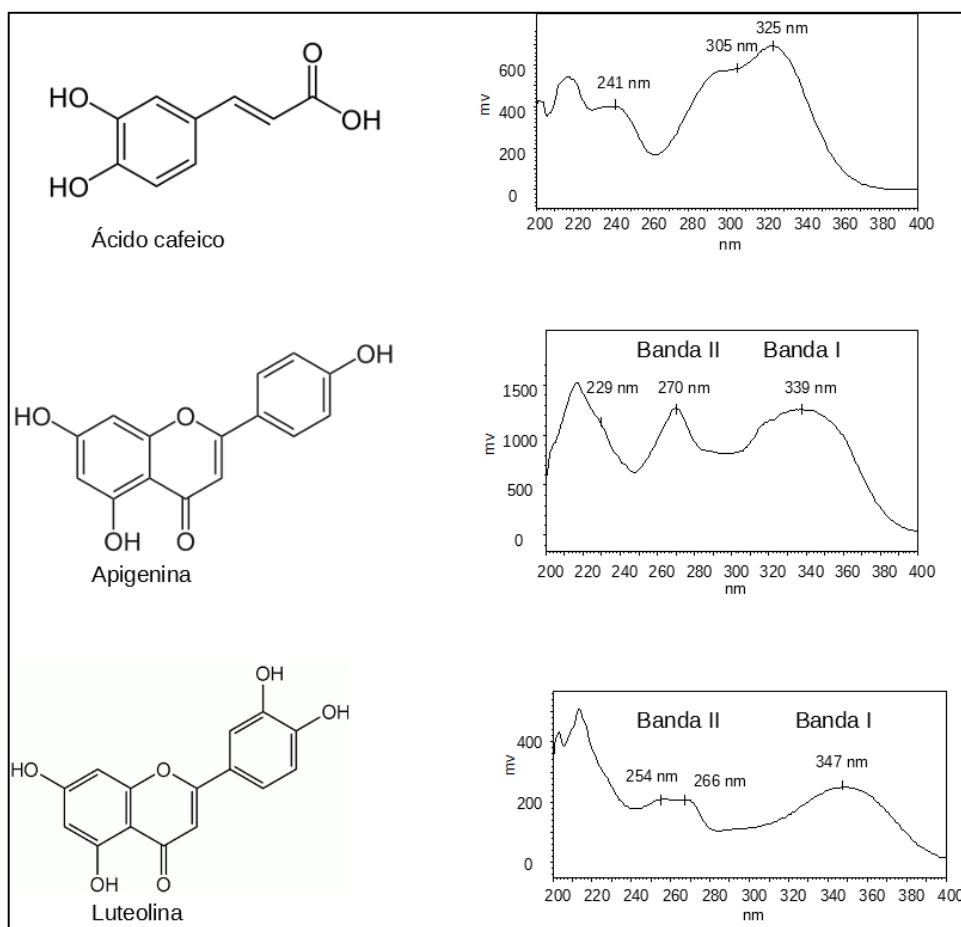


Figura 26: Estruturas e espectros UV de padrões autênticos.

Quadro 3: Picos majoritários no cromatograma do extrato das folhas de alcachofra, tempos de retenção e respectivas identidades químicas dos metabólitos secundários

Nº do pico	Tempo de retenção (tR)	Identidade química
1	6,8 min	Ácido 5- <i>O</i> - cafeoilquínico
2	14,1 min	Ácido 1,3-di- <i>O</i> - cafeoilquínico
3	14,3 min	Luteolina-7- <i>O</i> - rutinosídeo
4	14,7 min	Ácido 1,5-di- <i>O</i> - cafeoilquínico
5	16,4 min	Derivado do ácido cafeico
6	21,7 min	Luteolina

É importante salientar que o método desenvolvido visa obter uma impressão digital cromatográfica *qualitativa* de uma matriz vegetal complexa. Nesse contexto, embora a resolução entre os picos 2, 3 e 4 não seja muito alta ($R_s < 1,5$), um grau de sobreposição ou distribuição não-gaussiana para os picos é permitida se o pesquisador for capaz de identificar de modo bem-sucedido a complexidade química da amostra, lidando com toda a informação

química no cromatograma de modo conjunto (ALAERTS et al., 2010; JI et al., 2005; LIANG, XIE, CHAU, 2010; KLEIN & RIVERA, 2000; GONG et al., 2003).

Com isso, podemos avaliar a seletividade do método utilizando o DAD como satisfatória, pois foi possível obter dos espectros UV de cada pico citado e propor a identificação por comparação com dados de padrões autênticos e informações espectrais apresentadas por Negro e colaboradores (2012).

4.11. Impacto ambiental e performance cromatográfica do método desenvolvido

Especificamente, aplicou-se a métrica HPLC-EAT para quantificar o impacto ambiental entre o método desenvolvido e o método de referência de Negro e colaboradores (2012). Nesse contexto, percebeu-se que enquanto o *score* em HPLC-EAT do método de referência era de 81,0; para o método desenvolvido o *score* era de apenas 19,6; acarretando, portanto, em um impacto ambiental cerca de 4 vezes menor. Isso pode ser explicado principalmente devido aos *scores* do EtOH relativamente favoráveis aos da acetonitrila no que refere aos fatores segurança (S), saúde (H) e impacto ambiental (E) da métrica utilizada: enquanto o etanol é considerado uma alternativa ambientalmente mais amigável para ser utilizada em CLAE devido a sua baixa toxicidade e biodegradabilidade, MeCN é tóxica aos mamíferos e à vida aquática (HUTCHINSON et al., 2012; FRITZ, RUTH, KRAGL, 2009). Somado a tal fato, o método desenvolvido com etanol consumiu 20,5 mL de EtOH, enquanto o método de referência consumiu 23,2 mL de MeCN.

Em seguida, as razões entre a resposta GCFR ($x=2$) e HPLC-EAT também foram calculadas para ambos os métodos, possibilitando um ponto de vista heurístico do processo de separação, visto que considera de modo integrado parâmetros cromatográficos e ambientais (FUNARI et al. 2014). Com a aplicação dessa métrica híbrida, obteve-se o *score* de 4.72 ± 0.20 para o método desenvolvido com etanol e 0.02 ± 0.00 para o método da literatura, confirmando a maior performance do método proposto.

4.12. Validação qualitativa do método desenvolvido

Como o objetivo era avaliar qualitativamente o método, a validação realizada foi para verificar a precisão e repetibilidade do novo método desenvolvido e, para isso, foram utilizadas as recomendações da ICH.

É importante ressaltar que representantes da comunidade científica, das indústrias e agências reguladoras do Brasil (ANVISA), EUA (US-FDA) e Europa (EU) definiram os parâmetros de validação, que posteriormente foram uniformizados pela ICH.

Os valores de desvio padrão relativo no que se refere aos parâmetros avaliados, segundo recomendações da ICH (2005) foram considerados satisfatórios. Os resultados obtidos foram relatados nos parágrafos seguintes.

4.12.1. Precisão instrumental

A precisão instrumental foi avaliada com nove injeções consecutivas da mesma amostra, preparada conforme reportado na metodologia II da seção 3.5 (50 mg de extrato por mL de solução de EtOH/H₂O 7:3, eluídos com a mesma solução em cartucho C₁₈, previamente ativados e equilibrados, e filtração com microfiltro de PTFE, com concentração final de 25 mg mL⁻¹). O desvio padrão relativo (DPR) da área total do cromatograma foi de 3,83%, enquanto o valor máximo do DPR para o tempo de retenção relativo foi de 0,58%.

4.12.2. Repetibilidade

A repetibilidade foi avaliada usando nove injeções consecutivas, variando as concentrações de extrato hidroetanólico nas amostras em níveis (5, 15 e 25 mg mL⁻¹, aproximadamente) e três replicatas para cada concentração. O DPR máximo da área total do cromatograma foi de 2,77%, enquanto o DPR máximo para o tempo de retenção relativo foi de 1,01%.

4.13. Princípios da Química Analítica Verde (GAC) aplicados no desenvolvimento do método

O uso da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e da extração em fase sólida (EFS) no desenvolvimento do método possibilitaram a aplicação do princípio de número cinco da GAC, o qual aconselha os pesquisadores a utilizar metodologias automatizadas e miniaturizadas nos experimentos. A aplicação da CLAE acelerou o desenvolvimento do método e a sua instrumentação automatizada evitou variações nas análises que poderiam comprometer a otimização. Além disso, a aplicação da EFS gerou um volume diminuto de resíduos. Também, em virtude da metodologia empregada e das propriedades físico-químicas dos metabólitos de

interesse, a aplicação de derivatização não foi necessária, o que atende as recomendações do princípio de número 6 da GAC (GAŁUSZKA, MIGASZEWSKI, NAMIEŚNIK, 2013).

No que se refere aos aspectos ambientais, o Planejamento Doehlert é uma das melhores ferramentas para se obter modelos empíricos multivariados, visto que, em comparação com outros planejamentos usualmente utilizados na literatura (Planejamento Composto Central e Box-Behnken), o planejamento Doehlert usa um número reduzido de experimentos (PEREIRA FILHO, 2015). Apesar de isso, em certas circunstâncias, caracterizar uma desvantagem – visto que o número reduzido de experimentos reduz os graus de liberdade dos resíduos – no caso específico do método desenvolvido isso não foi um problema visto que o menor número de graus de liberdade para os resíduos foi 19.

Dessa maneira, a seleção de um planejamento fatorial fracionário seguido de um planejamento Doehlert visando otimização cromatográfica aplica três princípios da Química Analítica Verde (GAC): o princípio 7, que afirma que a geração de uma grande quantidade de resíduos deve ser evitada; o princípio 8, o qual diz que métodos multianalito (o que foi aplicado com as respostas selecionadas para otimização) ou multiparamétricos devem ser selecionados e o princípio 9, com a redução de energia utilizada, segundo Gałuszka e col., 2013 (em comparação com outros planejamentos experimentais).

Por fim, a seleção do etanol como solvente e do ácido acético como modificadores orgânicos ao invés de acetronitrila ou metanol com ácido fórmico ou trifluoroacético está de acordo com outros três princípios da GAC que recomendam que reagentes oriundos de fontes renováveis são preferíveis (princípio 10), reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos (princípio 11) e a segurança do analista aumentada (princípio 12). Portanto, o desenvolvimento do método ambientalmente amigável para a obtenção de uma impressão digital metabólica de alcachofra possibilitou a aplicação de 8 dos 12 princípios da Química Analítica Verde, corroborando a consonância do *fingerprinting* desenvolvido com os aspectos ambientais.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi desenvolvido um método cromatográfico eficiente e ambientalmente amigável para se obter o perfil cromatográfico (impressão digital ou *fingerprint*) do extrato hidroetanólico das folhas de *C. scolymus*. O método foi obtido a partir de uma perspectiva multiparamétrica e heurística, na qual parâmetros de separação e ambientais foram considerados de modo simultâneo. Durante o processo de desenvolvimento do *fingerprinting*, os experimentos foram rigorosamente selecionados e executados com etanol, conhecido por sua baixa toxicidade e biodegradabilidade. Embora EtOH seja mais viscoso que MeCN (solvente empregado no método de referência) o método mostrou-se compatível até mesmo com equipamentos para CLAE comuns e mais eficiente que trabalhos da literatura com os mesmos propósitos, desde que a pressão não exceda 15 MPa e a temperatura de análise seja próxima da temperatura ambiente. Isso indica que a migração de métodos em CLAE poluidores por métodos mais “verdes” não requer grandes modificações na instrumentação em CLAE geralmente empregada, mas requer uma abordagem diferente no desenvolvimento do método, na qual o conceito de “performance cromatográfica” considere a separação cromatográfica em conjunto com aspectos ambientais.

6 REFERÊNCIAS

- ALAERTS, G., DEJAEGHER, B., SMEYERS-VERBEKE, J., VANDER HEYDEN, Y. Recent developments in chromatographic fingerprintings from herbal products: set-up and data analysis. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 13, p. 900–922, 2010.
- ALONSO, J. R. **Tratado de fitomedicina – bases clínicas e farmacológicas**. Isis. Buenos Aires: 1998.
- ANASTAS, P.T., WARNER, J.C. **Green Chemistry: Theory and Practice**, Oxford: Oxford University Press, 1998.
- ARMENTA, S., GARRIGUES, S., de la GUARDIA, M. Green analytical chemistry. **Trends in Analytical Chemistry**, v.27, p. 497-511, 2008.
- BARROS NETO, B., SCARMINIO, I.S., BRUNS, R.E. **Como fazer experimentos: Aplicações na ciência e na indústria**. 4 ed., Porto Alegre: Ed.Bookman, 2010.
- BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de interesse ao SUS**. Brasília: Agência Saúde, 2009. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 13 ago. 2015.
- BREITKREITZ, M. C., SOUZA, A., POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro II com o-fenantrolina. um tutorial, parte III. **Química Nova**, v. 37, p.564-573,2014.
- BUNDY, R., WALKER, A.F., MIDDLETON, R.W., WALLIS, C., SIMPSON, H.C.R. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: A randomized, double blind placebo controlled trial. **Phytomedicine**, v.15, p.668-675,2008.
- CASTRO, L. O. Plantas Medicinais, Condimentares e Aromáticas: Descrição e Cultivo. Ed. Agropecuária, 1995.
- COSTA, R.S., OZELA, E. F., BARBOSA, W. L. R., PEREIRA, N. L., SILVA, J.A.C. Caracterização física, química e físico-química do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.90, n.3, p. 169-174, 2009.
- FANTINI, N., COLOMBO, G., GIORI, A., RIVA, A., MORAZZONI, P., BOMBARDELLI, E., CARAI, M.A.M. Evidence of Glycemia-lowering Effect by a *Cynara scolymus* L. Extract in Normal and Obese Rats. **Phytotherapy Research**, v. 25, p.263-466, 2011.
- FERREIRA, S.L.C., SANTOS, W.N.L., QUINTELLA, C.M., NETO, B.B., BOSQUE-SENDRA, J.M. Doehlert Matrix: a chemometric tool for analytical chemistry. **Talanta**, v.63, p.1061-1067,2004.

FRITSCHÉ, J., BEINDORFF, C.M., DACHTLER, M., ZHANG, H., LAMMERS, J.G. Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. **European Food Research and Technology**, v.215, p.149-157,2002.

FRITZ, R., RUTH, W., KRAGL, U. Assessment of acetone as an alternative to acetonitrile in peptide analysis by liquid chromatography/mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.23, p.2139-2145,2009.

FUNARI, C. S., CARNEIRO, R. L., ANDRADE, A. M., CAVALHEIRO, A. J., HILDER, E. F. Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. **Journal of Separation Science**, v. 37, p. 37-44, 2014.

GABER, Y., TÖRNVALL, U., KUMAR, M.A., AMIN, M.A., HATTI-KAUL, R. HPLC-EAT (Environmental Assessment Tool): A tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. **Green Chemistry**, v.13, p.2021-2025, 2011.

GALUSZKA, A., MIGASZEWSKI, Z., NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **Trends in Analytical Chemistry**, v.50, p.78-84, 2013.

GONG, F., LIANG, Y. Z., XIE, P. S., CHAU, F.T. Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. **Journal of Chromatography A**, v.1002, p. 25-40, 2003.

HENDERSON, R.K., JIMÉNEZ-GONZÁLEZ, C., CONSTABLE, D.J.C., ALSTON, S.R., INGLIS, G.G.A., FISHER, G., SHERWOOD, J., BINKS, S.P., CURZONS, A.D. Expanding GSK's solvent selection guide – embedding sustainability into solvent selection starting at medicinal chemistry. **Green Chemistry**, v.13, p.854-862, 2011.

HOLTMANN, G., ADAM, B., HAAG, S., COLLET, W., GRÜNEWALD, E., WINDECK, T. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v.18, p.1099-1105,2003.

HUTCHINSON, J.P., REMENYI, T., NESTERENKO, P., FARRELL, W., GROEBER, E., SZUCS, R., DICINOSKI, G., HADDAD, P.R. Investigation of polar organic solvents compatible with Corona Charged Aerosol Detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography. **Analytica Chimica Acta**, v.750, p.199-206,2012.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1)**, ICH, 2005. Disponível em: <https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2017.

Jl, Y., XU, Q., HU, Y., HEYDEN, Y.V. Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v.1066, p.97-104,2005.

KLEIN, E. J., RIVERA, S. L. J. A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 23, p. 2097–2121, 2000.

KOEL, M., KALJURAND, M. Application of the principles of green chemistry in analytical chemistry, **Pure and Applied Chemistry**, v.78, p.1993-2002,2006.

LI, Y., WU, T., ZHU, J., WAN, L., YU, Q., LI, X., CHENG, Z., GUO, C. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.52, p.597-602,2010.

LIANG, Y., XIE, P., CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v.812, p.53-70,2004.

LIANG, Y., XIE, P., CHAU, F. Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 410–421, 2010.

LÓPEZ-MOLINA, D., NAVARRO-MARTÍNEZ, M.D., MELGAREJO, F.R., HINER, A.N., CHAZARRA, S., RODRÍGUEZ-LÓPEZ, J.N. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Phytochemistry**, v.66, p.1476–1484,2005.

LUTZ, M., HENRÍQUEZ, C., ESCOBAR, M. (2011) Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, p.49-54,2011.

MABRY, T. J., MARKHAN, K. R., THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MARAKIS, G., WALKER, W.A., MIDDLETON, R.W., BOOTH, J.C.L., WRIGHT, J., PIKE, D.J. Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study. **Phytomedicine**, v.9, p.694-699, 2002.

NAMIEŚNIK, J. Trends in environmental analytics and monitoring, **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.30, p. 221-269,2000.

NEGRO, D., MONTESANO, V., GRIECO, S., CRUPI, P., SARLI, G., DE LISI, A., SONNANTE, G. Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. **Journal of Food Science**, v.77, n 2, 2012.

NEUE, U.D., MÉNDEZ, A. Selectivity in reversed-phase separations: General influence of solvent type and mobile phase pH. **Journal of Separation Science**, v.30, p.949-963,2007.

NOLDIN, V.F., CECHINEL FILHO, V., MONACHE, F.D., BENASSI, J.C., CHRISTMANN, I.L., PEDROSA, R.C., YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v.26, n.3, p.331-334, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. (1991). **Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines**. Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58865/1/WHO_TRM_91.4.pdf>. Acesso em: 12 de ago. 2017.

PANDINO, G., LOMBARDO, S., MAUROMICALE, G., WILLIAMSON, G. (2011) Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.24, p.148-153, 2011.

PEREIRA FILHO, E.R. **Planejamento Fatorial em Química: Maximizando a obtenção de resultados**. Coleção Apontamentos, São Carlos: EdUfscar, v.1, 2015.

QIAN, G., WANG, Q., LEUNG, K. S., QIN, Y., ZHAO, Z., JIANG, Z. Quality assessment of Rhizoma et Radix Notopterygii by HPTLC and HPLC fingerprinting and HPLC quantitative analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p. 812-817, 2007.

RODRIGUEZ, T.S., GIMÉNEZ, D.G., VÁSQUEZ, R.P. Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. **Phytomedicine**, v. 9, p.687-693,2002.

ROMANI,A., PINELLI, P., CANTINI, C., CIMATO, A., HEIMLER, D. Characterization of Violetto di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). **Food Chemistry**, v. 95, p.221-225,2006.

SCHÜTZ, K., KAMMERER, D., CARLE, R.,SCHIEBER, A. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara Scolymus* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52,n.13, p. 4090-4096, 2004.

SNYDER, L.R., KIRKLAND, J.J., GLAJCH, J.L. **Practical HPLC Method Development**.New York, Chichester, Weinhein, Brisbane, Singapore, Toronto: John Wiley & Sons, Inc., 1997.

TEÓFILO,R.F., FERREIRA,M.M.C. Quimiometria II: planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Química Nova**, v.29,n.2,p.338-350,2006.

THE EUROPEAN AGENCY FOR THE EVALUATION OF MEDICINAL PRODUCTS. **Note for Guidance on Quality of Herbal Medicinal Products/Traditional Herbal Medicinal Products**. EMEA: London, 2006.

TISTAERT, C., DEJAEGHER, B., VANDER HEYDEN, Y. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprintings.**Analytica Chimica Acta**, v. 690, p. 148–161, 2011.

TOBISZEWSKI, M., MECHLIŃSKA, A., NAMIEŚNIK, J. Green analytical Chemistry – theory and practice, **Chemical Society Reviews**, v.39, p.2869-2878, 2010.

TOBISZEWSKI, M., NAMIESNIK, J. Greener organic solvents in analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**,v.5, p.1-4,2017.

UNITED NATIONS EDUCATIONAL SCIENTIFIC AND CULTURAL ORGANIZATION (UNESCO). **UNESCO Intangible Heritage Lists**. Disponível em: <<https://ich.unesco.org/en/lists>>. Acessado em: 12 ago. 2017.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry Botanical Drug Product**. Rockville: US Department of Health and Human Services, 2004.

WELCH, C.J., WU, N., BIBA, M., HARTMAN, R., BRKOVIC, T., GONG, X., HELMY, R., SCHAFER, W., CUFF, J., PIRZADA, Z., ZHOU, L. Greening analytical chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 7, p.667-680,2010.

WU, J., QIAN, Y., MAO, P., CHEN, L., LU, Y., WANG, H. Separation and identification of phenolic compounds in canned artichoke by LC/DAD/ESI-MS using core-shell C18 column: A comparative study. **Journal of Chromatography B**, v. 927, p.173-180,2013.

XIE, Y., JIANG, Z., ZHOU, H., CAI, X., WONG, Y., LIU, Z., BIAN, Z., XU, H., LIU, L. Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicine preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.43, p.204-212, 2007.

ZAPOLSKA-DOWNAR, D., ZAPOLSKI-DOWNAR, A., NARUSZEWICZ, M., SIENNICKA, A., KRASNODEBSKA, B., KOLODZIEJ, B. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. **Life Sciences**, v.71, p.2897-2908,2002.

ZHU, X., ZHANG, H., LO, R. Phenolic Compounds from the Leaf Extract of Artichoke (*Cynara scolymus* L.) and Their Antimicrobial Activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.7272-7278,2004.

Artigo aceito na revista *Food Analytical Methods*

Fingerprinting *Cynara scolymus* L. (Artichoke) by Means of a Green Statistically Developed HPLC-PAD Method

Otávio Aguiar Souza¹ · Renato Lajarim Carneiro² · Thiago Henrick Martins Vieira¹ · Cristiano Soleo Funari³ · Daniel Rinaldo¹

Received: 27 September 2017 / Accepted: 14 January 2018
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

The process to develop a chromatographic method for fingerprinting complex matrices should be performed through a multiparameter approach that could lead to the desired separation and save environmental resources such as organic solvents and energy. In other words, this process should be pursued by employing an optimized experimental design and having a response function which takes into consideration separation parameters together with environmental parameters. Green Analytical Chemistry principles should be pursued during all steps of the research. This work presents a heuristic approach to develop a high-performance liquid chromatography method for fingerprinting an extract from leaves of *Cynara scolymus* L., a food plant consumed worldwide. A fractional factorial design was used to identify relevant chromatographic variables followed by a comprehensive design for optimization purposes (Doehlert design). A response function called green chromatographic fingerprinting response was employed to obtain a compromise between fingerprint quality and low environmental impact of the method. This optimized approach led to the development of a robust and green method for fingerprinting *C. scolymus* by HPLC-PAD. This method proved to be greener than the reference method reported in literature and compatible even with no state of art HPLC instruments because the system backpressure did not exceed 15 MPa and the column temperature was 35 °C.

Keywords Metabolic fingerprinting · Green analytical chemistry · Experimental design · Doehlert · Optimization · Green liquid chromatography

Introduction

Artichoke (*Cynara scolymus* L.) is an herbaceous plant mainly cultivated in Europe, where its fleshy leaves and receptacle (known as “heads”) are an important ingredient of the Mediterranean diet, and it has been considered as an Intangible Cultural Heritage of Humanity. It also has been cultivated for over a century in South America, where its

production is increasing (López-Molina et al. 2005; Lutz et al. 2011; Unesco 2010; Romani et al. 2006). The artichoke heads (fleshy leaves and receptacle) are consumed fried, boiled, and/or steamed, and used in many recipes due to its pleasant taste. It is a source of proteins, minerals, dietary fibers, and fructo-oligosaccharides, etc. (Romani et al. 2006; Zhu et al. 2004; Pandino et al. 2011; Wu et al. 2013).

Additionally, artichoke leaf extract has been used in folk medicine for centuries, mainly due to its choleretic, diuretic, and hypocholesterolemic activities (Rodriguez et al. 2002; Fritsche et al. 2002; Bundy et al. 2008). These traditional uses have been supported by scientific investigations over the years. Antimicrobial, antioxidant, antiglycemic, and digestive properties etc. have been reported for this plant (Zhu et al. 2004; Zapolska-Downar et al. 2002; Fantini et al. 2011; Marakis et al. 2002; Holtmann et al. 2003). Its pharmacological activities have been associated with compounds such as caffeoylquinic acids (e.g., 1,3-Di-*O*-caffeoylquinic acid, or cynarin), flavonoids (e.g., luteolin-7-rutinoside), and sesquiterpene lactones (e.g., cynaropicrin) (Zhu et al. 2004; Bundy et al. 2008). A variety of pharmaceutical preparations and food

✉ Daniel Rinaldo
danielrinaldo@fc.unesp.br

¹ School of Sciences, São Paulo State University (UNESP), 14-01 Engenheiro Luiz Edmundo Carrijo Coube Ave., Vargem Limpa, Bauru, São Paulo 17033360, Brazil

² Department of Chemistry, Federal University of São Carlos (UFSCar), Washington Luís highway (SP-310 km 235), São Carlos, São Paulo 13565905, Brazil

³ School of Agricultural Sciences, São Paulo State University (UNESP), 1879 Doutor José Barbosa de Barros St., Jardim Paraíso, Botucatu, São Paulo 18610307, Brazil

56 supplements containing artichoke leaves and flowers are of-
 57 fered on the market (Schütz et al. 2006).

58 The development of safe and efficient medicines from
 59 plants is a difficult task because plant materials can have mul-
 60 tiple compounds that can even work synergistically (Liang
 61 et al. 2004; Liang et al. 2010; Qian et al. 2007; Xie et al.
 62 2007). A multicomponent approach should be preferred over
 63 a single component one for standardizing and quality control-
 64 ling a medicinal plant and its derived products. A proper chro-
 65 matographic fingerprint is suggested by agencies such as the
 66 US Food and Drug Administration (FDA), the European
 67 Medicines Evaluation Agency (EMA), and even World
 68 Health Organization for this purpose (Li et al. 2010; The
 69 European Agency for the Evaluation of Medicinal Products
 70 2006; Tistaert et al. 2011; US Food and Drug Administration
 71 2004; World Health Organization 1991).

72 Thus, development of a chromatographic method for qual-
 73 ity control of a medicinal plant should be driven by a heuristic
 74 approach, and design of experiments (DoE) can fit this goal.
 75 As opposed to a univariate (or trial-and-error) proposal, DoE
 76 is a multiparameter approach that performs simultaneous, im-
 77 partial, and systematic evaluation of all factors of interest,
 78 where the number of experiments is minimized while maxi-
 79 mum information is obtained from experimental data, saving
 80 time and resources. DoE allows researchers to identify inter-
 81 actions among the factors and to build useful response sur-
 82 faces to predict the optimal experimental conditions (Myers
 83 et al. 2016; Montgomery 2017). The selection of the factors to
 84 be evaluated, the response function to be monitored, and even
 85 the experimental design itself should consider green analytical
 86 chemistry (GAC) concepts and principles (Gałuszka et al.
 87 2013). In other words, a resource-saving approach should be
 88 pursued from the method development process.

89 This work aimed to offer an efficient, green, and affordable
 90 HPLC-PAD method for fingerprinting extracts of leaves of
 91 *C. scolymus*. For that, (1) a multiparameter and multianalyte
 92 approach was adopted, (2) the design of experiments was
 93 rigorously selected to save energy and solvent during all the
 94 method development process, (3) ethanol was selected as the
 95 organic modifier, (4) standard HPLC conditions were
 96 employed during all method development to be compatible
 97 even with non-state-of-the-art instruments, and (5) the envi-
 98 ronmental performance of the method was compared with a
 99 reference method previously reported.

100 Experimental

101 Chemicals and Reagents

102 EtOH (HPLC grade; Tedia®, USA), ultrapurified water
 103 (Millipore®, USA), and acetic acid (AcOH, AR grade;

Synth®, Brazil) were used as mobile-phase components and
 extraction media in this work.

106 Plant Material

107 Authentic leaves of *C. scolymus* were kindly provided by
 108 Centroflora Group (Lot 200112.122), located at the city of
 109 Botucatu, SP, Brazil.

110 Extraction and Concentration

111 A portion of approximately 10 g of dry *C. scolymus* leaves
 112 was extracted by maceration with three aliquots of 100 mL of
 113 the binary mixture of EtOH/H₂O (7:3, v/v) at 40 °C, with
 114 constant stirring and replacement of the extractive solution
 115 every 48 h, with a total extraction time of 144 h. The fluid
 116 solutions were collected and concentrated at 40 °C by an
 117 R-300 rotary evaporator (Buchi®, Switzerland) to obtain the
 118 dried hydroalcoholic extract of *C. scolymus* leaves.

119 Pre-Treatment Using Solid Phase Extraction (SPE)

120 Samples were treated before injection in the HPLC system by
 121 solid phase extraction (Sep-Pak C₁₈ cartridge, Strata-E,
 122 500 mg/3 mL; Phenomenex®, USA). The stationary phase
 123 was activated with 6 mL of EtOH and equilibrated with
 124 6 mL of EtOH/H₂O (7:3, v/v). The equilibrated stationary
 125 phase was then loaded with 50 mg of the hydroethanolic dry
 126 extract of *C. scolymus* leaves (HECL) and eluted with 2 mL of
 127 the equilibrating solution in order to eliminate chlorophylls
 128 and other low-polarity compounds. This procedure was
 129 adopted because the objective was to obtain a selective finger-
 130 print of the high and middle polarity compounds with
 131 phytotherapeutic properties. The sample at a concentration
 132 of 25 mg mL⁻¹ was filtered through a PTFE filter (0.45 µm,
 133 25 mm; Phenomenex®, USA).

134 High-Performance Liquid Chromatography Analyses

135 HPLC analyses were performed using an HPLC-PAD appara-
 136 tus (Jasco®, Japan), equipped with quaternary pump (model
 137 PU-2089 plus), photodiode array detector (model MD-2010
 138 plus), automatic injector (model AS-2055 plus), and column
 139 oven (model CO-2060 plus). Separations were achieved in a
 140 C₁₈ column (XBridge, 150 × 4.60 mm i.d. × 5 µm; Waters®,
 141 Ireland) coupled to a C₁₈ guard column (4 × 3 mm, 5 µm;
 142 Phenomenex®, USA). The optimized method employed
 143 0.5% acetic acid aqueous solution (A) and EtOH (B) at
 144 1 mL min⁻¹ and 35 °C at the following gradient: 5–50% B
 145 (0–30 min); 50–100% B (30–31 min); 100% B (41 min).
 146 Equilibration of the stationary phase was achieved with 5%
 147 B for 30 min. A 2-µL preheater (Thermo Fischer Scientific®,
 148 USA) was coupled to the pre-column and kept in the column

oven. Injection volume and column equilibration time were fixed at 20 μ L and 30 min, respectively. Chromatographic data were accessed, processed, and handled employing ChromNAV (Jasco®, Japan) and Openchrom® (Lablicate GmbH, Germany) software. Statistical analyses, validation of the empirical models, normal probability, and response surface plots were performed using GNU Octave 4.2.1, Matlab 2010a (Mathworks®, USA), Microcal Origin 6 (OriginLab®, USA), and LibreOffice 5 (The Document Foundation, USA) software.

Multivariate Analyses—Fractional Factorial Design and Doehlert Design

Initially, five chromatographic factors were screened by means of a fractional factorial design ($2v^{5-1}$) (Table 1). Later, the statistically significant factors were inserted in a Doehlert design (Table 2) with the aim of finding a mathematical model that could indicate an optimal point. Two responses were monitored: number of peaks (n) and green chromatographic fingerprinting response (GCFR, Eq. 1).

$$GCFR = n^2(FP/MP)(n/t)$$

where n is the total number of peaks of the chromatogram, t is the total chromatographic run time, FP is the number of peaks in the half-part of the chromatogram with fewer number of peaks, and MP is the number of peaks in the other half-part of the chromatogram with more peaks. The higher the GCFR score, the better by means of global chromatographic optimization. Further information about GCFR is provided elsewhere (Funari et al. 2014; Ji et al. 2005). Although any manifestation with signal/noise (S/N) higher than 3 is considered a peak in HPLC, only those with S/N higher than 100 (Openchrom® software) were taken into consideration for both responses monitored in this work because this ratio allowed UV spectra to be recorded, an important parameter in this work.

Table 1 Factors and levels investigated in Fractional Factorial Design on Screening Variables

Factors	Levels		
	− 1	0	+ 1
X1. Initial % of EtOH	5	12.5	20
X2. Final % of EtOH	25	37.5	50
X3. Temperature of analysis (°C)	35	57.5	80
X4. % acetic acid in H ₂ O	0	0.25	0.5
X5. Flow rate (mL min ^{−1})	0.6	0.8	1.0

Measuring the Environmental Impact of the Optimized Method

A metric called Environmental Assessment Tool (HPLC-EAT, Eq. 2) was employed to estimate the environmental impact of the method compared with other methods described in the literature for similar purposes (Gaber et al. 2011).

$$HPLC-EAT = S1m1 + H1m1 + E1m1 + S2m2 + H2m2 + E2m2 + \dots + Snmn + Hnmn + Enmn$$

where S , H , and E refers to a score attributed to each solvent ($1 - n$) based on the impact on safety, health, and environment, respectively. Each score is multiplied by the mass (m) of the solvent. Detailed information is provided elsewhere (Gaber et al. 2011). The HPLC-EAT final score for a method is easily calculated with free software provided by the authors (Gaber et al. 2011). For this metric, a higher score indicates a high environmental impact; therefore, the lower the score, the better.

Validation of the Optimized Method

The validation of the optimized method followed International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH Harmonised Tripartite Guideline 2005) until repeatability analysis. The monitored parameters were selected based on those proposed by Funari et al. (2014) for complex matrices. Thus, the quality of the method was checked by taking the relative standard deviation (RSD) among (1) the total peak areas of the chromatograms and (2) the ratios between the retention time of any peak with an area >4% of the total peak area and the retention time observed for a reference peak (indicated with an asterisk in Fig. 3).

Results

Screening Variables—Fractional Factorial Design $2v^{5-1}$

According to normal probability plots (Fig. 1), variables X1, X3, and X4 proved to be the most important variables for number of peaks response, whereas the variables X1, X3, and X5 proved to be the most important ones for GCFR response. Although X5 did not present high significance in the normal probability plot for GCFR (Fig. 1b), a statistical evaluation of results (ANOVA) shows that this variable could be influential in the model; therefore, it was kept for the Doehlert

Table 2 Four-factor Doehlert design factors and levels investigated with the following results

Run	Factors ^a				Terms of Eq. 1					Results ^d	
	X5	X1	X3	X4	n^2	FP	MP	FP/MP	n/t	n	GCFR
1	1 (1.0)	0 (12.5)	0 (57.5)	0 (0.25)	81	0	9	0	0.30	9	0.00
2	0.5 (0.9)	0.87 (20.0)	0 (57.5)	0 (0.25)	64	0	8	0	0.27	8	0.00
3	0.5 (0.9)	0.29 (15.0)	0.82 (80.0)	0 (0.25)	100	0	10	0	0.33	10	0.00
4	0.5 (0.9)	0.29 (15.0)	0.2 (63.1)	0.79 (0.50)	100	0	10	0	0.33	10	0.00
5	-1 (0.6)	0 (12.5)	0 (57.5)	0 (0.25)	169	2	11	0.18	0.43	13	13.32
6	-0.5 (0.7)	-0.87 (5.0)	0 (57.5)	0 (0.25)	324	3	15	0.2	0.6	18	38.88
7	-0.5 (0.7)	-0.29 (10.0)	-0.82 (35.0)	0 (0.25)	324	4	14	0.29	0.6	18	55.54
8	-0.5 (0.7)	-0.29 (10.0)	-0.2 (51.0)	-0.79 (0)	225	2	13	0.15	0.5	15	17.31
9	0.5 (0.9)	-0.87 (5.0)	0 (57.5)	0 (0.25)	289	2	15	0.13	0.57	17	21.84
10	0.5 (0.9)	-0.29 (10.0)	-0.82 (35.0)	0 (0.25)	361	4	15	0.27	0.63	19	60.97
11	0.5 (0.9)	-0.29 (10.0)	-0.2 (51.9)	-0.79 (0)	196	2	12	0.17	0.47	14	15.24
12	-0.5 (0.7)	0.87 (20.0)	0 (57.5)	0 (0.25)	64	0	8	0	0.27	8	0.00
13	0 (0.8)	0.58 (17.5)	-0.82 (35.0)	0 (0.25)	256	2	14	0.14	0.53	16	19.50
14	0 (0.8)	0.58 (17.5)	-0.2(51.9)	-0.79 (0)	81	0	9	0	0.30	9	0.00
15	-0.5 (0.7)	0.29 (15.0)	0.82 (80.0)	0 (0.25)	121	0	11	0	0.37	11	0.00
16	0 (0.8)	-0.58 (7.5)	0.82 (80.0)	0 (0.25)	121	1	10	0.10	0.37	11	4.44
17	0 (0.8)	0 (12.5)	0.61 (74.4)	-0.79 (0)	81	0	9	0	0.30	9	0.00
18	-0.5 (0.7)	0.29 (15.0)	0.2 (63.1)	0.79 (0.50)	121	0	11	0	0.37	11	0.00
19	0 (0.8)	-0.58 (7.5)	0.2 (63.1)	0.79 (0.50)	169	2	11	0.18	0.43	13	13.32
20	0 (0.8)	0 (12.5)	-0.61 (40.6)	0.79 (0.50)	196	2	12	0.17	0.47	14	15.24
CP1 ^b	0 (0.8)	0 (12.5)	0 (57.5)	0 (0.25)	121	1	10	0.10	0.37	11	4.44
CP2 ^b	0 (0.8)	0 (12.5)	0 (57.5)	0 (0.25)	100	1	9	0.11	0.33	10	3.70
CP3 ^b	0 (0.8)	0 (12.5)	0 (57.5)	0 (0.25)	121	1	10	0.10	0.37	11	4.44
CP4 ^b	0 (0.8)	0 (12.5)	0 (57.5)	0 (0.25)	144	1	11	0.09	0.40	12	5.24

^a X5, flow rate (mL min⁻¹); X1, initial percentage of EtOH; X3, temperature (°C); X4, percentage of acetic acid on water

^b Central point and correspondent replicate number

^c Codified values are given without brackets and their following experimental values are indicated in brackets

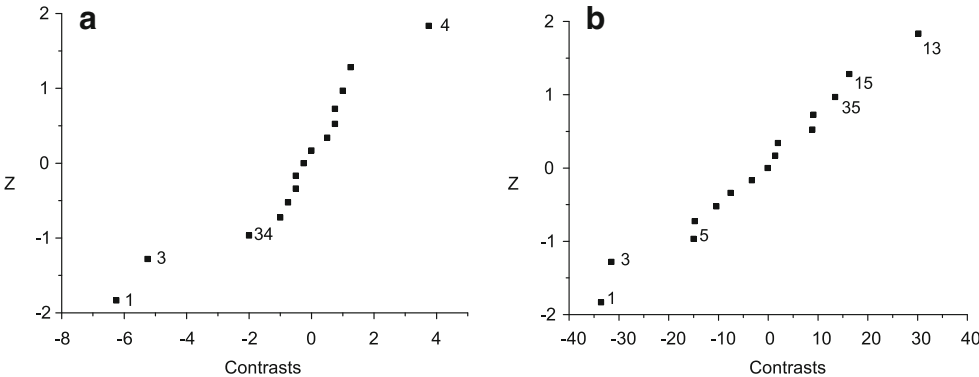
^d Collected at 350 nm

design. Variable X2 does not appear as significant, so it was fixed at 50% of EtOH for the next step. Using these four selected variables, linear models were calculated and the analysis of variance (ANOVA) at 95% of confidence revealed the R^2 value (coefficient of determination) of 0.88 and 93.8% of

explainable variance for number of peaks response and R^2 of 0.90 and 92.1% of explainable variance for GCFR response.

Although the linear models did not find lack of fit, this type of design is employed as an initial step of investigation, as it does not allow evaluation of the curvature of the

Fig. 1 Normal probability plots for contrasts regarding **a** number of peaks and **b** GCFR responses in fractional factorial design



237 response surface. This kind of model is employed mainly
238 to identify the relevant variables.

239 **Optimization of Chromatographic Conditions**
240 **by Doehlert Design**

241 Once the four most relevant variables were determined, a
242 Doehlert design was applied to optimize the chromatographic
243 conditions. The design itself as well as the outputs can be
244 found in Table 2. From this set of experiments, the variables
245 X4 and X5 were revealed to be not significant at 95% of
246 confidence. Thus, the following mathematical models were
247 built as a function of initial percentage of *B* (X1), the temper-
248 ature of the chromatographic run (X3) for number of peaks (*n*,
249 Eq. 3), and green chromatographic fingerprinting response
250 (GCFR, Eq. 4):

253
$$n = 11.68_{(\pm 0.75)} - 4.56_{(\pm 1.31)}x_1 - 4.20_{(\pm 1.31)}x_3$$

254
$$+ 3.34_{(\pm 2.12)}x_3^2 \quad (3)$$

252
$$GCFR = -18.92_{(\pm 5.65)}x_1 - 24.12_{(\pm 5.65)}x_3 + 21.57_{(\pm 8.06)}x_1^2$$

255
$$+ 29.02_{(\pm 7.58)}x_3^2 + 32.27_{(\pm 15.37)}x_{13} \quad (4)$$

256 R^2 and maximum explainable variance for Eq. 3 were 0.84
257 and 95.3% and for Eq. 4 were 0.91 and 96.7%. In addition,
258 experimental *F* values for number of peaks (*n*) model were
259 35.84 (regression/residual) and 2.31 (lack of fit/pure error),
260 with critical values of 3.10 ($F_{3,20,95\%}$) and 2.98 ($F_{10,10,95\%}$),
261 respectively. For GCFR model, experimental *F* values were
262 48.69 (regression/residual) and 2.31 (lack of fit/pure error),
263 whereas critical values were 2.90 ($F_{4,19,95\%}$) and 2.95
264 ($F_{8,11,95\%}$), respectively, considering the degrees of freedom
265 and pure error related to replicates in central point and addi-
266 tional replicates obtained after the elimination of non-
267 significant coefficients (Pereira Filho 2015). These *F* tests
268 showed that the regression is statistically significant because
269 the experimental *F* (regression/residual) is around 12 and 17
270 times the critical value for *n* and GCFR responses, respective-
271 ly. No lack of fit was observed for both models since $F_{\text{values}} <$
272 F_{critical} . Response surfaces were built from the Eqs. 3 and 4
273 (Fig. 2). They predicted a common optimal for number of
274 peaks and GCFR with initial percentage of EtOH (X1) and
275 temperature of analysis (X3) at 5% and 35 °C, respectively.
276 This should lead to 21 peaks and a GCFR score of 95.09.
277 Thus, the whole chromatographic condition tested was 5–
278 50% of EtOH in 30 min, at 1 mL min^{−1} and at 35 °C. The
279 percentage of acetic acid in water was fixed at 0.5% (v/v). This
280 condition was applied in triplicate, and the observed experi-
281 mental values were 19.33 ± 0.58 peaks and a GCFR score of
282 92.53 ± 18.8, which are very close to the predicted values. A
283 representative chromatogram for the optimum point is shown
284 in Fig. 3.

Validation of the Optimized Method

Instrumental Precision

The instrumental precision was evaluated with nine consecu-
tive injections of the same sample at the concentration of
25 mg mL^{−1} and the same vial (ICH Harmonised Tripartite
Guideline 2005). The RSD of the total peak area was 3.83%,
whereas the maximum value for RSD regarding relative re-
tention time was 0.58%.

Repeatability

Repeatability was also determined using nine consecutive in-
jections, varying sample concentrations in three levels and
three replicates for each level. Three samples with three dif-
ferent concentrations of vegetal material (5, 15, and
25 mg mL^{−1}) from HECL were prepared and each one of
those, in three different vials, were injected three times (ICH
Harmonised Tripartite Guideline 2005). The maximum RSD
of the total peak area was 2.77%, whereas the maximum RSD
observed for relative retention time was 1.01%.

Discussion

Fractional factorial design was able to indicate four statistical-
ly relevant variables in a reduced number of experiments. The
Doehlert design led to satisfactory mathematical models for
both responses (number of peaks and GCFR). The common
predicted optimal point was later experimentally confirmed.
The optimal GCFR found increased 52% relative to the best
result obtained for the experiments circumvented in the origi-
nal experimental design (run 10, Table 2). This result con-
firmed the high quality of the mathematical models.

From the original set of experiments (Table 2), it became
clear that the synergistic interaction between X1 and X3
strongly influenced the distribution of the peaks across the
chromatogram (second term of GCFR, Eq. 2) as well as the
number of peaks per time (third term of GCFR, Eq. 2). From
Table 2, the highest values for these terms were obtained when
X1 and X3 were investigated in the lowest levels. The best
scores for both monitored responses (run 10 followed by the
runs 7 and 6, Table 2) were achieved when factors X1 or X3
was investigated at −0.87 and −0.82, respectively, or 5% of
ethanol and 35 °C of oven temperature.

The fingerprint of HECL (Fig. 3) at 350 nm was found to
be dominated by compounds with UV spectra typical of com-
pounds derived from caffeic acid (peaks 1, 2, 4, and 5) and
flavones (peaks 3 and 6), which are classes of substances that
have already been reported for *C. scolymus* (Negro et al.
2012). This was important as the reported pharmacological
activities for this species rely on compounds belonging to

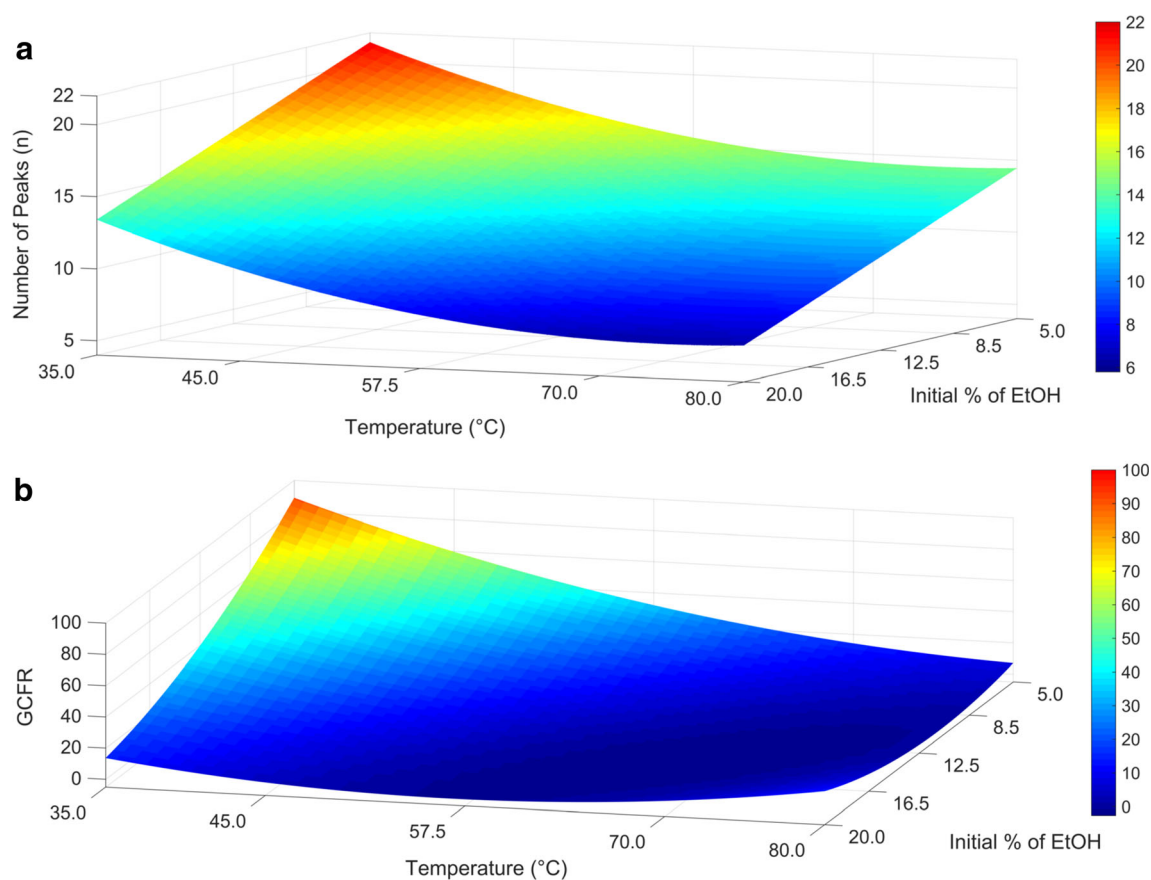


Fig. 2 Response surface plots for **a** number of peaks and **b** GCFR responses at Doehlert design

these classes. With regard to the separation and resolution of the peaks, it is important to emphasize that the developed fingerprint has qualitative purposes. In this way, a degree of overlapping and/or non-Gaussian normal distribution for peaks are accepted if the researcher is able to successfully access the chemical complexity of the sample and handle the related data regarding all detected peaks (Alaerts et al. 2010; Ji et al. 2005; Liang et al. 2010; Klein and Rivera 2000; Gong et al. 2003). In fact, it was possible to obtain a good selectivity, considering that we were able to analyze the UV spectrum of each peak in all samples analyzed in the validation, including in the evaluation of the repeatability parameter, where the sample concentration varied from 5 to 25 mg mL⁻¹ and the chromatographic profile did not present changes. In this context, the minor separation factor and resolutions for the developed fingerprint in relation to the reference method did not damage selectivity.

Regarding environmental aspects, Doehlert design is a type of DoE that is considered one of the best alternatives to obtain mathematical model. The four-factor Doehlert design uses a reduced number of experiments compared to central composite design and Box–Behnken. The disadvantage is that this lower number of experiments decreases the number of degrees of freedom for residuals. However, in our case, this was not a problem since we had at least 19 degrees of freedom for

residuals. Thus, the selection of a fractional factorial design for screening variables and a Doehlert design for optimization purposes are in accordance with three principles of GAC, which state that the generation of a large volume of analytical waste should be avoided (principle 7), that a multianalyte (both response functions employed fit this point) or multiparameter methods are preferred (principle 8), and that the use of energy should be minimized (principle 9).

The selection of ethanol and acetic acid as organic modifiers instead of the widely used acetonitrile and methanol plus formic or trifluoroacetic acid was in accordance with other three principles of green chemistry which state that reagents obtained from renewable sources should be preferred (principle 10), toxic reagents should be eliminated or replaced (principle 11), and that the safety of the operator should be increased (principle 12).

The multivariate quadratic models (Eqs. 3 and 4) indicated that the lowest investigated levels for initial percentage of the organic solvent (X1) and temperature of analysis (X3) should lead to the best chromatographic fingerprint according to both monitored responses. These also fit principles 7 and 9 of GAC mentioned before. The variable X1 presented a high significance for the optimization of the chromatographic separation for both monitored responses because it is directly related to the force of elution of the mobile phase (Snyder et al. 1997). In

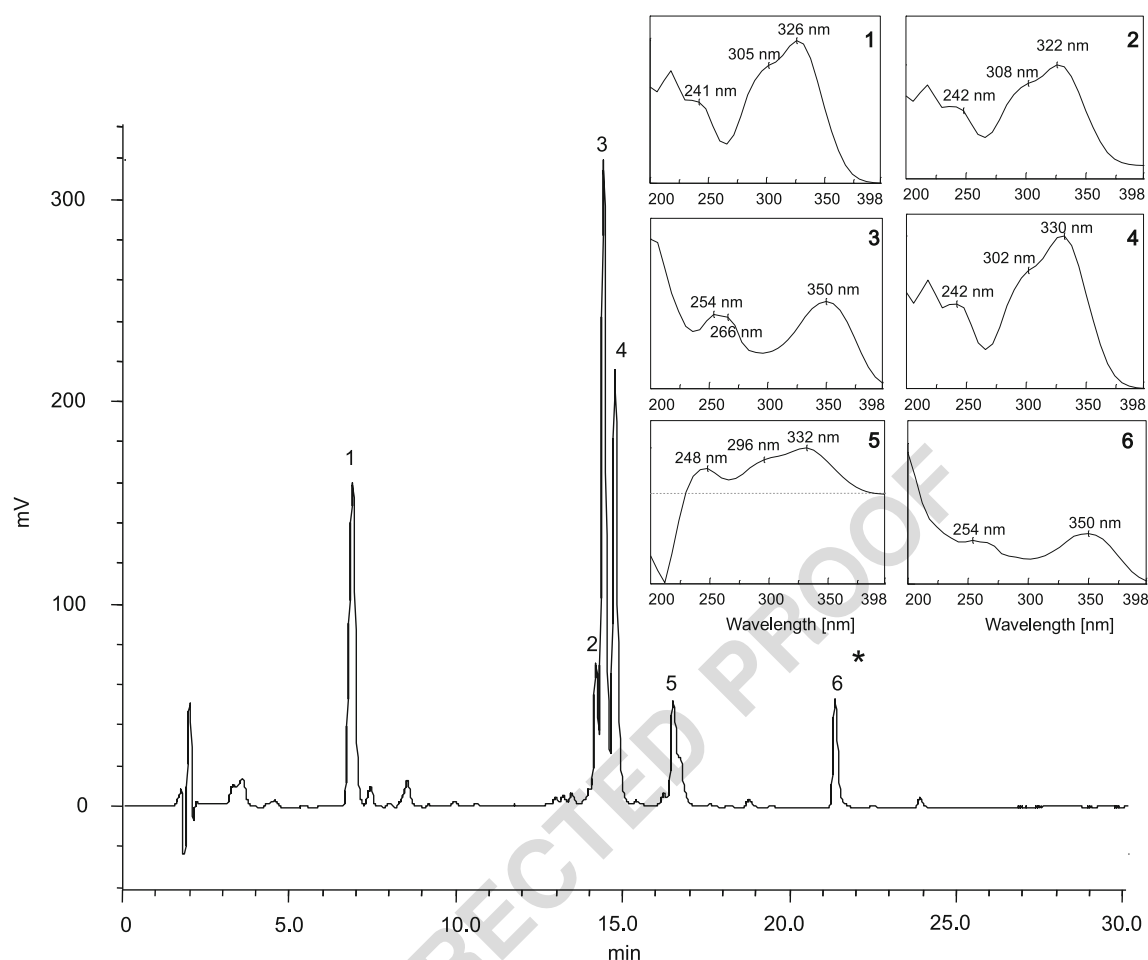


Fig. 3 HPLC-PAD fingerprint of *C. scolymus* (HECL) at $\lambda = 350$ nm. Column: XBridge, 150×4.6 mm. Mobile phases: $\text{H}_2\text{O} + 0.5\%$ acetic acid (A) and EtOH (B) at the following gradient: 0–50% B in 30 min. Flow

rate: 1 mL min^{-1} . Temperature of analysis: 35°C ; injection volume: $20 \mu\text{L}$. UV spectra of the major peaks are provided over the chromatogram

this context, the higher investigated experimental value for X1, the higher is the elutropic force solvent system as mobile phase and the lower the number of peaks and GCFR score. Regarding the variable X3, where higher experimental values are investigated in the runs, there occurs a decrease in viscosity, changes in dielectric constant and pH of the mobile phase, as well as the arrangement of the stationary phase ligands and diffusion of the analytes (Heinisch and Rocca 2009; Dolan 2002; Snyder et al. 1997). As a consequence, a higher dissolution of the analytes in the solvents and lower interaction with the stationary phase (decrease in the amount of analyte equilibria between the mobile and stationary phases) occur, promoting co-elution of the peaks. This phenomenon also decreases the responses n and GCFR.

On the other hand, the levels of variables X4 and X5 were fixed at 0.5% of acetic acid (A) and 1 mL min^{-1} , which were not the best levels from a green chemistry standpoint. From this perspective, 0% acetic acid and 0.6 mL min^{-1} would be preferred, but the decision for 0.5% acetic acid as A and 1 mL min^{-1} was made taking into consideration the improvement of

the peak shapes (avoiding ionization of acidic analytes) and resolutions to values considered satisfactory to UV spectra recording (e.g. run 11 in fractional factorial design and the tested possible optimum points). It is well known that employing an acid in the mobile phase can avoid ionization of acidic analytes, as expected for HECL, and, thus, improve peak shapes and resolution (Snyder et al. 1997).

A simple and freely available tool called HPLC-EAT (Eq. 2) was employed to quantify the environmental impact of the method proposed here for the fingerprint of *C. scolymus* (Gaber et al. 2011) compared to the reference method reported in literature by Negro et al. (2012) for a similar purpose. This method was selected as a reference method among other ones available in the literature because in our opinion it presents the best compound separation, resolution, peak shape, and online UV spectra, employing acetonitrile (MeCN) as the mobile-phase organic modifier, which is the most used organic solvent in HPLC (thus, MeCN can be considered a reference solvent in reverse phase liquid chromatography). In calculation, the pretreatment of the sample was taken into

consideration. The method proposed here and the reference method presented scores of 19.6 and 81.0, respectively, which evidenced the greenness of the method proposed here compared to the reference method. That can be mainly explained by the favorable scores of EtOH when compared with MeCN regarding safety, health, and environmental impacts (Gaber et al. 2011). EtOH is considered a greener alternative to HPLC due to its relatively low toxicity and to its biodegradability. MeCN is strongly undesired from the green analytical chemistry standpoint since it is toxic to mammals and aquatic life (Hutchinson et al. 2012; Fritz et al. 2009). A minor impact on HPLC-EAT scores was due to organic solvent consumption in the methods under comparison. The method proposed here consumed 20.5 mL of EtOH, whereas the reference method consumed 23.2 mL of MeCN.

Later, the ratios between GCFR and HPLC-EAT were also calculated for both methods. This ratio considers parameters of separation given by GCFR with environmental parameters given by HPLC-EAT, thus providing a more heuristic view of the process of separation (Funari et al. 2014). According to this hybrid metric, the higher the score, the better. Therefore, it was applied for both methods under comparison, leading to 4.72 ± 0.20 and 0.02 ± 0.00 for the method proposed here and the reference method, respectively.

Regarding the instrumental precision and repeatability, RSD values compatible with good methods for fingerprinting complex samples were observed (Funari et al. 2014).

Conclusion

This work showed an efficient and less impactful way to obtain a chromatographic fingerprint of a *C. scolymus* leaf extract. This is because the method developed here was obtained from a multiparameter approach and considered separation and environmental parameters at the same time. Throughout the development process, lean experimental designs were selected, as well as a low toxicity and biodegradable organic modifier (ethanol). Although EtOH is more viscous than acetonitrile (the organic solvent employed in the reference method), this showed to be compatible even with non-state-of-the-art instruments since it does not exceed 15 MPa of backpressure and the temperature for analysis is very close to room temperature. It shows that the migration of HPLC methods for greener ones did not require changes in the HPLC instrumentation itself, but it requires a change from a traditional method development approach to a more heuristic one, where the concept of performance considers parameters of separation in conjunction with environmental parameters.

Acknowledgements The authors would like to thank the São Paulo Research Foundation (FAPESP) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support

(grants 15-20639/1, 16/08179-8, and 45398 2014-5). The authors also thank Dr. Valdecir Farias Ximenes of the Department of Chemistry of São Paulo State University for the use of the HPLC-PAD instrument.

Funding This study was funded by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) (grants 15/20639-1, 16/08179-8) and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grant 45398 2014-5).

Compliance with Ethical Standards

Conflict of Interest Otávio Aguiar Souza declares that he has no conflict of interest. Renato Lajarim Carneiro declares that he has no conflict of interest. Thiago Henrick Martins Vieira declares that he has no conflict of interest. Cristiano Soleo Funari declares that he has no conflict of interest. Daniel Rinaldo declares that he has no conflict of interest.

Ethical Approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by any of the authors.

Informed Consent Not applicable.

References

- Alaerts G, Dejaegher B, Smeyers-Verbeke J, Heyden YV (2010) Recent developments in chromatographic fingerprints from herbal products: set-up and data analysis. *Comb Chem High Throughput Screen* 13(7):900–922. <https://doi.org/10.2174/138620710793360284>
- Bundy R, Walker AF, Middleton RW, Wallis C, Simpson HCR (2008) Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine* 15(7):668–675. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.03.001>
- Dolan JW (2002) Temperature selectivity in reversed-phase high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 965(7):195–205. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01321-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01321-8)
- Fantini N, Colombo G, Giori A, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Carai MAM (2011) Evidence of glycemia-lowering effect by a *Cynara scolymus* L. extract in normal and obese rats. *Phytoter Res* 25:463–466. <https://doi.org/10.1002/ptr.3285>
- Fritsche J, Beindorff CM, Dachtler M, Zhang H, Lammers JG (2002) Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *Eur Food Res Technol* 215(7):149–157. <https://doi.org/10.1007/s00217-002-0507-0>
- Fritz R, Ruth W, Kragl U (2009) Assessment of acetone as an alternative to acetonitrile in peptide analysis by liquid chromatography/mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 23(7):2139–2145. <https://doi.org/10.1002/rcm.4122>
- Funari CS, Carneiro RL, Andrade AM, Hilder EF, Cavalheiro AJ (2014) Green chromatographic fingerprinting: an environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. *J Sep Sci* 37(7):37–44. <https://doi.org/10.1002/jssc.201300955>
- Gaber Y, Törnvall U, Kumar MA, Amin MA, Hatti-Kaul R (2011) HPLC-EAT (environmental assessment tool): a tool for profiling safety, health and environmental impacts of liquid chromatography methods. *Green Chem* 13(7):2021–2025. <https://doi.org/10.1039/c0gc00667j>
- Galuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J (2013) The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *Trends. Anal Chem* 50:78–84. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2013.04.010>

- Gong F, Liang YZ, Xie PS, Chau FT (2003) Information theory applied to chromatographic fingerprint of herbal medicine for quality control. *J Chromatogr A* 1002(7):25–40. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(03\)00648-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(03)00648-4)
- Heinisch S, Rocca JL (2009) Sense and nonsense of high-temperature liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1216(7):642–658. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.11.079>
- Holtmann G, Adam B, Haag S, Collet W, Grünewald E, Windeck T (2003) Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther* 18(7):1099–1105. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2003.01767.x>
- Hutchinson JP, Remenyi T, Nesterenko P, Farrell W, Groeber E, Szucs R, Dicinoski G, Haddad PR (2012) Investigation of polar organic solvents compatible with corona charged aerosol detection and their use for the determination of sugars by hydrophilic interaction liquid chromatography. *Anal Chim Acta* 750(7):199–206. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.04.002>
- ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005) Validation of analytical procedures: text and methodology Q2(R1). ICH. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf. Accessed 12 July 2017
- Ji Y, Xu Q, Hu Y, Heyden YV (2005) Development, optimization and validation of a fingerprint of *Ginkgo biloba* extracts by high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 1066(1–2):97–104. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.01.035>
- Klein EJ, Rivera SL (2000) A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 23(14):2097–2121. <https://doi.org/10.1081/JLC-100100475>
- Li Y, Wu T, Zhu J, Wan L, Yu Q, Li X, Cheng Z, Guo C (2010) Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. *J Pharm Biomed Anal* 52(7):597–602. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2010.01.018>
- Liang Y, Xie P, Chan K (2004) Quality control of herbal medicines. *J Chromatogr B* 812(7):53–70. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2004.08.041>
- Liang Y, Xie P, Chau F (2010) Chromatographic fingerprinting and related chemometric techniques for quality control of traditional Chinese medicines. *J Sep Sci* 33(7):410–421. <https://doi.org/10.1002/jssc.200900653>
- López-Molina D, Navarro-Martínez MD, Rojas-Melgarejo F, Hiner ANP, Chazarra S, Rodríguez-López JN (2005) Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry* 66(7):1476–1484. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.04.003>
- Lutz M, Henriquez C, Escobar M (2011) Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J Food Compos Anal* 24(7):49–54. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.06.001>
- Marakis G, Walker AF, Middleton RW, Booth JCL, Wright J, Pike DJ (2002) Artichoke leaf extract reduces mild dyspepsia in an open study. *Phytomedicine* 9(7):694–699. <https://doi.org/10.1078/094471102321621287>
- Montgomery DC (2017) Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Myers RH, Montgomery DC, Anderson-Cook CM (2016) Response surface methodology: process and product optimization using designed experiments. John Wiley & Sons, Inc., New York
- Negro D, Montesano V, Grieco S, Crupi P, Sarli G, Lisi A, Sonnante G (2012) Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *J Food Sci* 77(7):244–252. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02531.x>
- Ni Y, Peng Y, Kokot S (2008) Fingerprinting of complex mixtures with the use of high performance liquid chromatography, inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and chemometrics. *Anal Chim Acta* 616(7):19–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.04.015>
- Pandino G, Lombardo S, Mauromicale G, Williamson G (2011) Profile of polyphenols and phenolic acids in bracts and receptacles of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) germplasm. *J Food Compos Anal* 24(7):148–153. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2010.04.010>
- Pereira Filho ER (2015) Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados. EdUfscar, São Carlos
- Qian G, Wang Q, Leung KS, Qin Y, Zhao Z, Jiang Z (2007) Quality assessment of Rhizoma et radix Notopterygii by HPTLC and HPLC fingerprinting and HPLC quantitative analysis. *J Pharm Biomed Anal* 44(7):812–817. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2007.03.029>
- Rodríguez TS, Giménez DG, Vázquez RP (2002) Choleric activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine* 9(7):687–693. <https://doi.org/10.1078/094471102321621278>
- Romani A, Pinelli P, Cantini C, Cimato A, Heimler D (2006) Characterization of Violette di Toscana, a typical Italian variety of artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Food Chem* 95(7):221–225. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.013>
- Schütz K, Persike M, Carle R, Schieber A (2006) Characterization and quantification of anthocyanins in selected artichoke (*Cynara scolymus* L.) cultivars by HPLC-DAD-ESI-MSⁿ. *Anal Bioanal Chem* 384(7–8):1511–1517. <https://doi.org/10.1007/s00216-006-0316-6>
- Snyder LR, Kirkland JJ, Glajch JL (1997) Practical HPLC method development. John Wiley & Sons, Inc., New York. <https://doi.org/10.1002/9781118592014>
- The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (2006) Note for guidance on quality of herbal medicinal products/traditional herbal medicinal products. EMEA, London
- Tistaert C, Dejaegher B, Heyden YV (2011) Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. *Anal Chim Acta* 690(7):148–161. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.023>
- United Nations Educational Scientific and Cultural Organization (2010) UNESCO Intangible Heritage Lists. <https://ich.unesco.org/en/lists>. Accessed 12 Aug 2017
- US Food and Drug Administration (2004) Guidance for industry botanical drug product. US Department of Health and Human Services, Rockville
- World Health Organization (1991) Guidelines for the Assessment of Herbal Medicines. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/58865/1/WHO_TRM_91.4.pdf. Accessed 12 Aug 2017
- Wu J, Qian Y, Mao P, Chen L, Lu Y, Wang H (2013) Separation and identification of phenolic compounds in canned artichoke by LC/DAD/ESI-MS using core-shell C18 column: a comparative study. *J Chromatogr B* 927(7):173–180. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.11.026>
- Xie Y, Jiang Z, Zhou H, Cai X, Wong Y, Liu Z, Bian Z, Xu H, Liu L (2007) Combinative method using HPLC quantitative and qualitative analyses for quality consistency assessment of a herbal medicine preparation. *J Pharm Biomed Anal* 43(7):204–212. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2006.07.008>
- Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Naruszewicz M, Siennicka A, Krasnodebska B, Kolodziej B (2002) Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *L Sci* 71:2897–2908. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02136-7](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02136-7)
- Zhu X, Zhang H, Lo R (2004) Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem* 52(7):7272–7278. <https://doi.org/10.1021/jf0490192>

AUTHOR QUERIES

AUTHOR PLEASE ANSWER ALL QUERIES.

- Q1. Please check if the affiliations are presented correctly.
- Q2. The citation “López-Molina 2005” has been changed to “López-Molina et al., 2005” to match the author name/date in the reference list. Please check if the change is fine in this occurrence and modify the subsequent occurrences, if necessary.
- Q3. Reference [Ni et al, 2008] was provided in the reference list; however, this was not mentioned or cited in the manuscript. As a rule, all references given in the list of references should be cited in the main body. Please provide its citation in the body text.

UNCORRECTED PROOF