

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

João Henrique Pelissari

Alternativa verde para análise de *Phyllanthus niruri* por CLAE

Bauru
2017

João Henrique Pelissari

Alternativa verde para análise de *Phyllanthus niruri* por CLAE

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Rinaldo

Bauru
2017

Pelissari, João Henrique.

Alternativa verde para análise de *Phyllanthus niruri* por CLAE / João Henrique Pelissari, 2017
42 f. : il.

Orientador: Daniel Rinaldo

Monografia (Graduação)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências, Bauru, 2017

1. *Phyllanthus niruri*. 2. Cromatografia verde. 3. Quimiometria. 4. CLAE-DAD I.
Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências.

João Henrique Pelissari

Alternativa verde para análise de *Phyllanthus niruri* por CLAE

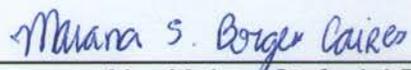
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Licenciatura em Química da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", como requisito para obtenção do título de Licenciado em Química.

Aprovação: 15/02/2017

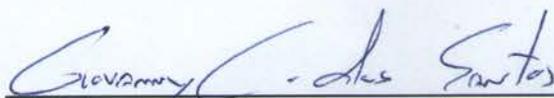
Banca Examinadora



Prof. Dr. Daniel Rinaldo
Faculdade de Ciências – Unesp, Bauru



Ma. Maiara Stefanini Borges Caires
Instituto de Química – Unesp, Araraquara



Me. Giovanny Carvalho dos Santos
Faculdade de Ciências – Unesp, Bauru

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial aos meus pais Cris e
Clério Pelissari, que sempre
estiveram presentes fornecendo
apoio e incentivo em minhas escolhas
e à minha irmã Gabriela.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Cris e Clério, pelo apoio a mim dedicado

A minha avó Eliza e ao meu bisavô Armando Bêgo pelas palavras de motivação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Daniel Rinaldo pelos ensinamentos, paciência e atenção a mim dedicada.

Ao Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes responsável pelo Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru por ter disponibilizado o equipamento de CLAE.

Aos professores Dr. Cristiano Soleo de Funari da Faculdade de Ciências Agrônômicas (UNESP – Botucatu) e ao Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) que muito contribuíram para que essa pesquisa fosse realizada.

À FAPESP pelo apoio financeiro

Aos grandes amigos que tive o prazer de conhecer durante o curso, em especial, Amanda Cosmo, Beatriz Germano, Pâmela de Melo, Vanessa Svizzero e Vanessa Silva, que fizeram parte de uma trajetória inesquecível repleta de momentos de descontração, estudos e, principalmente, experiências.

RESUMO

Em 2009, foi divulgada uma lista contendo 71 espécies medicinais com o intuito de nortear estudos no desenvolvimento de fitoterápicos, a chamada Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (Rennisus). Dentre essas espécies encontra-se a *Phyllanthus niruri* (“quebra-pedra”). Diversos estudos de *P. niruri* relatam importantes ações farmacológicas, bem como estudos químicos que indicam a presença de vários metabólitos secundários. Contudo, nesses trabalhos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada na qual são utilizados solventes tóxicos que podem trazer vários danos a saúde do analista e ao meio ambiente. Diante deste contexto, este trabalho apresenta o desenvolvimento de uma metodologia cromatográfica, que permite a análise do perfil de *P. niruri* por CLAE, utilizando água e etanol como fase móvel (solventes ambientalmente “amigáveis”), realizado por uma estratégia racional e com número de experimentos reduzido. Com a aplicação de um planejamento fatorial fracionário foi possível determinar os parâmetros cromatográficos importantes para a separação dos metabólitos de quebra-pedra por CLAE que foram: porcentagem inicial de etanol e temperatura de análise. Após a identificação dos principais parâmetros foi realizado um Planejamento de Composto Central que possibilitou a obtenção de um modelo matemático que foi capaz de calcular os valores ideais dos parâmetros analisados obtendo um perfil cromatográfico verde com o maior número de picos e com a melhor distribuição possível abordando 6 princípios dos 12 de química verde.

Palavras-chave: *Phyllanthus niruri*, cromatografia verde, quimiometria, CLAE-DAD

ABSTRACT

In 2009, a list containing 71 medicinal species was published with the purpose of guiding studies on the development of herbal medicines, the so-called National List of Medicinal Plants of Interest of SUS (Rennisus). Among these species is *Phyllanthus niruri* ("stone breaker"). Several studies of *P. niruri* report important pharmacological actions, as well as chemical studies that indicate the presence of several secondary metabolites. However, in these works High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is the most used technique in which toxic solvents are used that can cause several damages to the health of the analyst and to the environment. In this context, this work presents the development of a chromatographic methodology, which allows the analysis of the profile of *P. niruri* by HPLC, using water and ethanol as a mobile phase (environmentally "friendly" solvents), carried out by a rational and numerical strategy of reduced experiments. With the application of a fractional factorial design, it was possible to determine the chromatographic parameters important for the separation of stone breaking metabolites by HPLC, which were: initial percentage of ethanol and temperature of analysis. After the identification of the main parameters, a Central Composite Design was carried out, which enabled the obtainment of a mathematical model that was able to calculate the ideal values of the analyzed parameters obtaining a green chromatographic profile with the highest number of peaks and with the best possible distribution addressing 6 principles from the 12 of green chemistry.

Key words: *Phyllanthus niruri*, green chromatography, chemometrics, HPLC-PAD

LISTA DE ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
ACS-GCI	<i>Pharmaceutical Roundtable Solvent Selection Guide</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CaOX	Oxalato de cálcio
CCD	Planejamento de Composto Central (<i>Central Composite Design</i>)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
DAD	Detector de arranjo de fotodiodos (<i>Diode array detector</i>)
EtOH	Etanol
GCFR	<i>Green Chromatographic Fingerprint Response</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
Renibus	Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse do SUS
SUS	Sistema Único de Saúde
TFA	Ácido trifluoroacético (<i>Trifluoroacetic acid</i>)
UV	Ultravioleta

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. <i>Phyllanthus niruri</i>	13
Figura 2. Metabólitos secundários isolados de <i>P. niruri</i> : 1 – corilagina; 2 – rutina; 3 – 3,4,5-tri-hidróxibenzoato de etila.....	14
Figura 3. (A) Perfil cromatográfico da decocção das partes aéreas de <i>P. niruri</i> e (B) espectros UV dos picos identificados no perfil cromatográfico do trabalho de referência (De Souza et al., 2002).....	24
Figura 4. (A) Perfil cromatográfico da reprodução do trabalho de referência de <i>P. niruri</i> [Sistema CLAE; coluna VarianRP C18 (250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm); Solvente A (H ₂ O + 0,1% TFA) e solvente B (ACN:H ₂ O + 0,1% TFA na proporção 50:50, v:v). Gradiente: 22-24% B (7 min), 22-40% B (10 min), 40-100% B (8 min), 100-22% B (15 min). Vazão de 0,6 mL.min ⁻¹ , λ = 275 nm, 30°C]; (B) espectros UV dos picos numerados no cromatograma.....	25
Figura 5. Cromatogramas referentes aos experimentos 1 a 8 da triagem de variáveis por CLAE-DAD.....	28
Figura 6. Cromatogramas referentes aos experimentos 9 a 16 da triagem de variáveis por CLAE-DAD.....	29
Figura 7. Gráfico norma dos valores dos efeitos calculados para a resposta (a) número total de picos e (b) GCFR.....	30
Figura 8. Cromatogramas referentes aos experimentos 1 a 8 do CCD por CLAE-DAD.....	33
Figura 9. Cromatogramas referentes aos experimento 9 a 14 do CCD por CLAE-DAD.....	34
Figura 10. Cromatograma do ponto ótimo da decocção das partes aéreas de <i>P. niruri</i> [Sistema CLAE; coluna XBrigde (150 x 4,60 mm d.i. x 4 µm, Waters®); Solvente A (EtOH) e solvente B (H ₂ O + 0,5% Ac. Acético). Gradiente: 5-14% A (40 min), 14-100% B (5 min). Vazão de 0,6 mL.min ⁻¹ , λ = 275 nm, 40°C].....	35
Figura 11. Espectros UV referentes aos picos majoritários 1 a 8 do perfil cromatográfico ótimo da decocção das partes aéreas de <i>P. niruri</i> por CLAE-DAD.....	36
Figura 12. Espectros UV referentes aos picos majoritários 9 a 14 do perfil cromatográfico ótimo da decocção das partes aéreas de <i>P. niruri</i> por CLAE-DAD.....	37
Figura 13. Estrutura dos principais marcadores (ALBRECHT, 2014) encontrados no perfil cromatográfico verde de <i>P. niruri</i> : (a) ácido gálico, (b) ácido elágico, (c) rutina, (d) quecitrina e (e) corilagina.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos na triagem para desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de <i>P. niruri</i> (fatorial fracionário com 2 níveis e 5 fatores: 2V5-1).....	21
Tabela 2. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos a partir da triagem para o Planejamento de Composto Central.....	22
Tabela 3. Comparação de tempos de retenção dos picos majoritários do trabalho de referência e sua reprodução.....	26
Tabela 4. Planejamento experimental de dois níveis e cinco fatores de um fatorial fracionário 2V5-1 e as respostas obtidas para cada análise.....	27
Tabela 5. Planejamento de Composto Central de 5 níveis e 3 fatores e as respostas obtidas para cada análise.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. Plantas Medicinais.....	12
1.2. Fitoterápicos.....	12
1.3. <i>Phyllanthus niruri</i>	13
1.4. Química Verde.....	15
1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	16
1.6. Quimiometria.....	17
2. OBJETIVO.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1. Revisão da literatura e escolha do trabalho de referência.....	20
3.2. Reagentes Utilizados.....	20
3.3. Análise da decocção das partes aéreas de <i>P. niruri</i> por CLAE-DAD.....	20
3.4. Obtenção do material vegetal.....	21
3.5. Preparação da amostra.....	21
3.6. Planejamentos experimentais.....	21
4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	23
4.1. Escolha do trabalho de referência.....	23
4.2. Reprodução do trabalho de referência.....	23
4.3. Triagem de variáveis utilizando Planejamento Fatorial Fracionário.....	26
4.4. Otimização das condições cromatográficas (Planejamento de Composto Central).....	31
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Plantas Medicinais

A utilização de plantas para o tratamento de enfermidades é tão antiga quanto a existência do homem. Contudo, plantas medicinais perderam força com o avanço da ciência e tecnologia que desenvolveram outros meios de cura como os mais diversos medicamentos industrializados (BADKE et al., 2011).

Entretanto, em países subdesenvolvidos, o principal recurso terapêutico para a cura de enfermidades ainda é o uso de plantas medicinais, pois o acesso aos medicamentos industrializados, bem como seu alto custo tornam-se grandes obstáculos por grande parte da população (FIRMO et al., 2011).

“A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% da população usam recursos de medicinas populares para suprir necessidades de assistência médica privada, podendo girar em torno de 22 bilhões de dólares” (FIRMO et al., 2011, p. 93).

Plantas brasileiras tituladas como medicinais são vendidas em muitos estabelecimentos como farmácias, drogarias, lojas de cultivos, entre outros. No entanto, muitas das propriedades farmacológicas anunciadas não são cientificamente comprovadas podendo levar o indivíduo adquirir plantas com certo teor de toxicidade. Neste contexto, a ciência busca novos meios terapêuticos que possam garantir qualidade e segurança no uso de plantas medicinais através do isolamento de seus metabólitos secundários. Os mesmos são compostos orgânicos que inibem ou ativam alvos moleculares impedindo, por exemplo, a produção de mediadores inflamatórios no organismo (VEIGA Jr. et al., 2005; FIRMO et al., 2011; NOLDIN, 2005).

Esgotando-se os estudos laboratoriais e comprovando a eficácia de uma planta medicinal, a mesma pode ser comercializada como um medicamento denominado fitoterápico.

1.2. Fitoterápicos

Os medicamentos fitoterápicos, por serem de baixo custo, são utilizados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) e aprovados pela Agência de Vigilância Sanitária (Anvisa). Por isso, são considerados seguros e eficazes para a população.

O Ministério da Saúde divulgou, em 2009, uma lista contendo 71 plantas

medicinais, denominada Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS (Rennisus). A Rennisus contém plantas medicinais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao SUS. A finalidade da lista é orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (BIBLIOTECA..., 2015).

1.3. *Phyllanthus niruri*

Uma das espécies que compõe a Rennisus é a *Phyllanthus niruri*, conhecida popularmente como “quebra-pedra” (Figura 1). Do gênero *Phyllanthus*, a espécie pertence à família Euphorbiaceae. Seu crescimento ocorre principalmente em períodos de muita chuva em qualquer tipo de solo, sendo comum aparecer nas fendas das calçadas, terrenos baldios, quintais e jardins, em todos os estados brasileiros (SPRENGER, 2011; SILVA, 2013). Na medicina popular é utilizada no tratamento de hepatites, diabetes e distúrbios renais, especialmente na eliminação de pedras nos rins (ALBRECHT, 2014).



Figura 1. *Phyllanthus niruri*

Fonte: Enrico Banfi (ACTA PLANTARUM, 2015)

Estudos químicos de diversas partes de *P. niruri*, tais como folhas, caules e raízes, indicaram a presença de mais de 50 metabólitos secundários incluindo lignanas, taninos, terpenos (monoterpenos e triterpenos) e diversas classes de flavonóides e alcalóides, bem como uma quantidade elevada de ácido gálico em suas folhas. Dos estudos realizados na identificação de metabólitos secundários, destaca-se a corilagina, rutina e 3,4,5-tri-hidróxibenzoato de etila (Figura 2, COLOMBO et al., 2008).

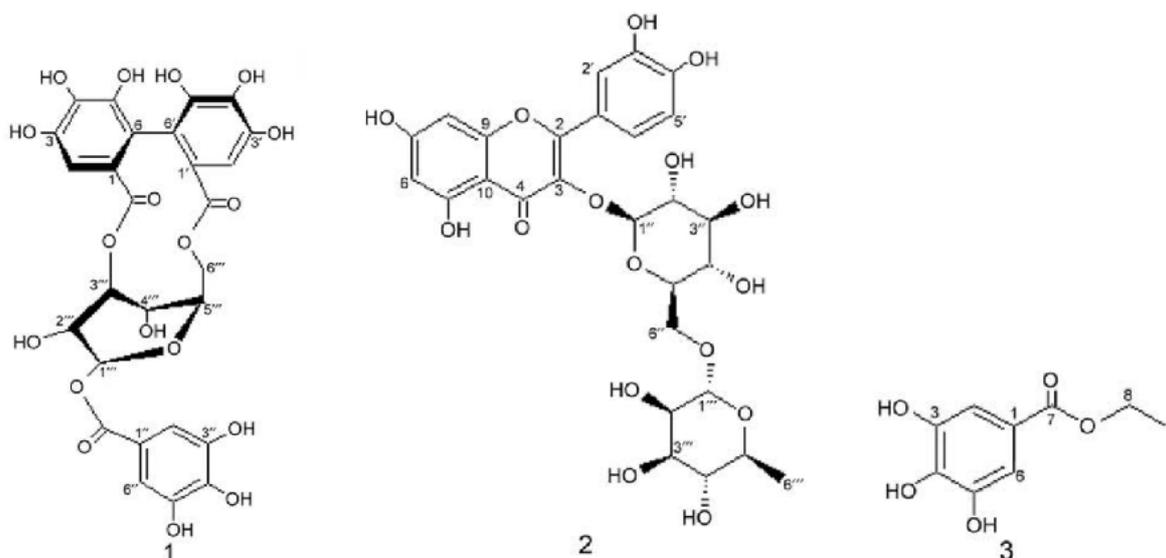


Figura 2. Metabólitos secundários isolados de *P. niruri*: 1 – corilagina; 2 – rutina; 3 – 3,4,5-trihidróxibenzoato de etila.

Fonte: COLOMBO et al., 2008

A composição química do extrato de diferentes partes da planta reflete no efeito farmacológico *in vivo* (CRUCES et al., 2013; SILVA, 2013). Estudos farmacológicos realizados com *P. niruri* indicaram ação anti-inflamatória, antifúngica, antiviral, antibacteriana, antioxidante, hepatoprotetora, hipoglicêmica, hipotensiva, analgésica e antilítogênica. (CRUCES et al., 2013). Dentre os metabólitos secundários identificados, destacam-se o lupeol, um triterpeno, por inibir a citotoxicidade induzida pelo CaOx (responsável pela urolitíase), como também reduzir a deposição de cristais renais e os alcaloides por possuírem ação antiespasmódica (CRUCES et al., 2013).

Com o extrato aquoso da planta, estudos com urina humana e de ratos *in vitro* e *in vivo* foram realizados, dos quais, foram evidenciados uma redução de tamanho e agregação de cristais de CaOx assim como a inibição completa e moderada da xantina oxidase na experimentação *in vitro* e *in vivo*, respectivamente, ressaltando uma ação antihiperuricêmica (CRUCES et al., 2013).

Estudos clínicos realizados em pacientes portadores de cálculos renais evidenciaram uma redução de magnésio na urina e um controle da hipercalcúria, mas os cálculos não sofreram nenhuma alteração apresentando um resultado negativo. Contudo, *P. niruri* não apresentou efeitos prejudiciais aos seres humanos relatando uma ausência de toxicidade tanto aguda como crônica (CRUCES et al., 2013).

É possível observar que *P. niruri* é uma planta medicinal considerada ideal para o

desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos, porém os estudos químicos citados que aplicam cromatografia fazem uso de solventes tóxicos como, por exemplo, acetonitrila e metanol, o que pode ocasionar a geração de grandes quantidades de resíduos, que necessitam de tratamentos de alto custo, além de proporcionar riscos a saúde do analista.

A maioria dos estudos de plantas medicinais tem como principal objetivo a comprovação (ou não) científica dos relatos etnofarmacológicos e, com isso, poder proporcionar alternativas naturais (de baixo custo e sustentáveis) para o tratamento das enfermidades. Nesse sentido, percebe-se uma contradição: estudos que visam alternativas naturais utilizarem solventes/reagentes tóxicos que prejudicam a natureza.

Essa contradição ou preocupação tem levado pesquisadores a desenvolverem novas estratégias para os estudos na área de química de um modo geral, como relata Lenardão e col. (2003):

“No início da década de 90, uma nova tendência na maneira como a questão dos resíduos químicos deve ser tratada começou a tomar forma. Esta nova visão do problema, com a proposição de novas e desafiadoras soluções, considera que, fundamentalmente, é preciso buscar uma alternativa que evite ou minimize a produção de resíduos, em detrimento da preocupação exclusiva com o tratamento do resíduo no fim da linha de produção (“*end of pipe*”). Este novo direcionamento na questão da redução do impacto da atividade química ao ambiente vem sendo chamado de “*green chemistry*”, ou química verde, química limpa, química ambientalmente benigna, ou ainda, química auto sustentável.”

1.4. Química Verde

Também chamada de “química limpa”, a química verde é a ciência que, baseada em 12 princípios básicos, tem a preocupação em desenvolver meios capazes de diminuir os impactos causados ao meio ambiente, reduzindo ou eliminando substâncias tóxicas geradas pelas indústrias ou até mesmo por meios comerciais. Tais princípios são: (PRADO, 2003)

- 1.Prevenir a formação de subprodutos;
- 2.Economia de átomos;
- 3.Sínteses com compostos de menor toxicidade;
- 4.Desenvolvimento de compostos seguros;
- 5.Evitar o uso de solventes e auxiliares;
- 6.Diminuir a energia gasta durante um processo químico;
- 7.Utilização de substancias recicladas;
- 8.Diminuição de derivativos;

9. Uso de catalisadores;
10. Desenvolvimento de compostos para degradação;
11. Controlar a formação de compostos tóxicos para a prevenção da poluição;
12. Uso de substâncias seguras para evitar acidentes tais com explosões e incêndios;

Os estudos de plantas medicinais, de um modo geral, envolve vários procedimentos tais como: coleta do material vegetal, preparação dos extratos, fracionamento dos extratos e identificação dos metabólitos secundários.

Desses procedimentos citados, a extração e fracionamento são os que utilizam maior quantidade de solventes orgânicos. Chemat e col. (2012) descrevem seis princípios para o estudo verde de plantas medicinais:

1. Seleção de recursos vegetais renováveis
2. Uso de compostos de baixa ou nenhuma toxicidade, bem como água ou agrosolventes
3. Redução do consumo de energia fazendo uso de tecnologias alternativas
4. Prevenir a formação de subprodutos e produzir co-produtos
5. Redução de etapas básicas no processo, as chamadas operações unitárias
6. Obtenção de extratos vegetais sem contaminantes, biodegradáveis e não desnaturados.

1.5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

O procedimento de fracionamento é caracterizado pela utilização de técnicas cromatográficas e dentre elas, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) é a de maior destaque.

Considerada uma cromatografia líquida moderna, devido ao uso de colunas mais empacotadas e uma valorização maior da pressão durante a análise, a CLAE faz uso de detectores que permitem uma análise quantitativa da amostra, sendo eles de fluorescência, ultravioleta, arranjos de diodos, entre outros. (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998)

Acetonitrila é de longe o solvente mais utilizado em CLAE por causa de suas características únicas, como a dissolução de uma ampla gama de solutos, baixa acidez,

reatividade química mínima, baixa absorvência na região do ultravioleta e compatibilidade com a espectrometria de massas, contudo, apresenta grande teor de toxicidade.

Portanto, reduzir o consumo ou substituir a acetonitrila é seguramente prioridade na CLAE verde.

Para auxiliar pesquisadores e indústrias a substituir solventes não-verdes ou implementar novos métodos verdes de análises, o *Green Institute* pertencente a *American Chemical Society* e a empresa farmacêutica Pfizer elaboraram listas que classificam os solventes quanto as suas características verdes, sendo essas a “*ACS-GCI - Pharmaceutical Roundtable Solvent Selection Guide*” e a “*Pfizer Medicinal Chemistry – Solvent Selection Guide*”.

1.6. Quimiometria

A Quimiometria é definida como sendo uma área da química que possui a finalidade de analisar uma amostra através de medidas de um conjunto de variáveis utilizando conceitos de matemática e estatística. A quimiometria foi originada a partir da necessidade de interpretação e tratamento de uma grande quantidade dados, muitas vezes variados, provenientes de modernos instrumentos de análise. (FERREIRA et al., 1999)

“Ao longo desses anos, nota-se que a otimização das condições experimentais de determinado sistema ou método analítico é conduzida de forma relativamente negligente pelos experimentadores e a tomada de decisões é mais baseada no empirismo do que em fatos concretos que podem ser comprovados e explicados de forma estatística, científica, e, principalmente, química. Esta postura pode levar ao desperdício de recursos financeiros e tempo, e ao estabelecimento de conclusões pouco convincentes.” (PEREIRA FILHO, 2015)

Em muitas análises, diversas variáveis podem influenciar o resultado desejado e para contornar tal problema, uma triagem é realizada com o objetivo de identificar as variáveis que apresentam maior importância, tanto do ponto de vista estatístico como químico. Para tal procedimento faz-se uso de Planejamentos Fatoriais Completos ou Fracionários quando o número de variáveis for menor que 4 ou maior ou igual a 5, respectivamente (PEREIRA FILHO, 2015).

Após a realização dos experimentos de triagem, as variáveis significativas são otimizadas, ou seja, são ajustadas a valores que originarão modelos matemáticos que convergem a resultados satisfatórios no final da análise. Para tal etapa, um dos caminhos

seguidos é a utilização de um Planejamento de Composto Central com um número de variáveis reduzido. (PEREIRA FILHO, 2015)

Neste contexto, o desenvolvimento de metodologias cromatográficas verdes com a utilização de reagentes classificados como ambientalmente amigáveis e a realização de experimentos que utilizam técnicas quimiométricas, que demandam menos experimentos e recursos, satisfazendo os princípios de química verde para o estudo de plantas medicinais ou fitoterápicos, é uma estratégia desejável.

2. OBJETIVO

Desenvolver uma nova metodologia de análise por CLAE-DAD para a obtenção do perfil cromatográfico de *Phyllanthus niruri*, utilizando uma estratégia racional e com número de experimentos reduzido, aplicando os conceitos de química verde.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Revisão da literatura e escolha do trabalho de referência

Foram realizadas consultas minuciosas de artigos científicos que envolviam métodos de análise de *P. niruri* por CLAE nas bases de dados: Scielo, Web of Science, Google Scholar, SciFinder e Athena (base de dissertações e teses da UNESP).

Com critérios que envolvia o perfil obtido por CLAE, o número de picos do cromatograma e a identificação dos marcadores, foi selecionado o trabalho de De Souza e col. (2002) como sendo o de referência, cujo perfil cromatográfico por CLAE está ilustrado na figura 3.

3.2. Reagentes Utilizados

Solventes grau HPLC: EtOH (TEDIA®), acetonitrila (ACN, TEDIA®), água purificada em sistema Milli-Q, ácido trifluoroacético (TFA, TEDIA®) e ácido acético (TEDIA®).

3.3. Análise da decocção das partes aéreas de *P. niruri* por 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), equipado com uma coluna analítica de fase reversa VarianRP C₁₈ (250 x 4,60 mm d.i. x 4 µm), uma pré-coluna de fase reversa Phenomenex® (4 x 3 mm, 5 µm) e um detector de arranjo de fotodiodos (DAD, Jasco MD-2015 Plus), pertencente ao Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Ciências da UNESP de Bauru, sob responsabilidade do Prof. Dr. Valdecir Farias Ximenes.

Para reprodução do método de referência as análises foram realizadas em sistema binário de solventes, sendo solvente A (H₂O + 0,1% TFA) e solvente B (ACN:H₂O + 0,1% TFA na proporção 50:50, v:v). O modo de eluição para a reprodução do método foi gradiente com a seguinte programação de fase móvel: 22-24% B (7 min), 22-40% B (10 min), 40-100% B (8 min), 100-22% B (15 min) com vazão de 0,6 mL.min⁻¹ e temperatura de 30 °C, de acordo com o trabalho realizado por De Souza e colaboradores (2002).

As análises realizadas para o desenvolvimento do método verde (Planejamento Fatorial Fracionário e Planejamento de Composto Central) foram realizadas utilizando uma coluna analítica de fase reversa XBridge (150 x 4,60 mm d.i. x 4 µm, Waters®) acoplada à pré-coluna anteriormente citada utilizando EtOH e H₂O como fase móvel. Foi avaliado também a quantidade de ácido acético em água.

3.4. Obtenção do material vegetal

As partes aéreas de *Phyllanthus niruri* foram cedidas pela empresa Centroflora Extratos Vegetais (Lote: 031115.2654), sediada na cidade de Botucatu-SP.

3.5. Preparação da amostra

A amostra foi preparada de acordo com o protocolo estabelecido pelo trabalho de referência de De Souza e colaboradores (2002).

Resumidamente as partes aéreas de *P. niruri* (obtidas comercialmente) foram submetidas à moagem em moinho de facas e separados em partículas de tamanhos entre 250 a 850 μm ; foi realizada a decocção, ou seja, 5 g do pó foi imerso em 50 mL de H_2O a 80 °C (proporção 1:10 de material vegetal/solvente extrator). Em seguida, a solução foi filtrada, primeiramente, em papel de filtro e, após, em microfiltro de 0,45 μm (PTFE, Allcrom®). Alíquotas de 20 μL foram injetadas no sistema CLAE.

3.6. Planejamentos experimentais

Para a triagem de variáveis um planejamento fatorial fracionário foi realizado utilizando 2 níveis (+1, -1) com 5 fatores (variáveis), $2v^{5-1}$ (Tabela 1).

O Planejamento de Composto Central foi utilizado 5 níveis (-1,68, -1, 0, +1, +1,68) com 3 fatores (variáveis, Tabela 2).

Os cálculos estatísticos foram realizados no *software* gratuito GNU Octave versão 4, sob orientação do Prof. Dr. Renato Lajarim Carneiro da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

Tabela 1. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos na triagem para desenvolvimento do método de eluição verde por CLAE de *P. niruri* (fatorial fracionário com 2 níveis e 5 fatores: $2v^{5-1}$).

Fatores	Níveis	
	-1	+1
X1. % inicial de EtOH	5	20
X2. Tempo de análise (min)	20	40
X3. Temperatura de análise (°C)	35	80
X4. % de ácido acético no solvente A	0	0,5
X5. Vazão da fase móvel ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)	0,6	1,0

Tabela 2. Fatores (variáveis) e níveis estabelecidos a partir da triagem para o Planejamento de Composto Central.

Fatores	Níveis				
	-1	+1	0	-1,68	+1,68
X1. % inicial de EtOH	7	13	10	5	15
X3. Temperatura de análise (°C)	40	70	75	30	80
X6. % final de EtOH	26	44	35	20	50

4. DESENVOLVIMENTO, RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Escolha do trabalho de referência

A revisão bibliográfica realizada (seção 3.1) foi para escolher um trabalho de referência, para comparação, que possuísse um método de análise de *P. niruri* por CLAE com maior número de picos no perfil cromatográfico e com identificação dos marcadores.

Dos trabalhos consultados, o estudo de validação de método de análise cromatográfica realizado por De Souza e colaboradores (2002) satisfaz os quesitos e portanto, foi escolhido como trabalho de referência para nortear o desenvolvimento do método verde.

4.2. Reprodução do trabalho de referência

A reprodução do trabalho de referência teve o objetivo de avaliar a integridade do material vegetal (partes aéreas de *P. niruri*) e observar o comportamento das substâncias, baseado na polaridade e nas condições experimentais disponíveis para o desenvolvimento deste projeto no laboratório de Química Orgânica e Processos da Faculdade de Ciências da Unesp, campus Bauru.

De Souza e colaboradores (2002) injetaram direto a decocção no sistema CLAE-DAD, utilizando um sistema binário de solventes, sendo solvente A (H₂O com 1% ác. fosfórico) e solvente B (ACN:H₂O, 1:1, v/v, com 1% ác. fosfórico). O modo de eluição foi o gradiente com a seguinte programação de fase móvel: 22-24% B (7 min), 22-40% B (10 min), 40-100% B (8 min), 100-22% B (15 min) com vazão de 0,6 mL.min⁻¹ em uma temperatura de 30 °C.

O perfil cromatográfico apresentado possui 11 picos, sendo destacado os três majoritários (Figura 3A): segundo os autores, Pico 1 é correspondente ao Ácido Gálico, Flavonoide (Pico 2) e por comparação de espectros UV com o trabalho de Albrecht (2014), o pico 3 é identificado como o composto Corilagina, considerado um marcador fitoquímico de acordo com Colombo (2008).

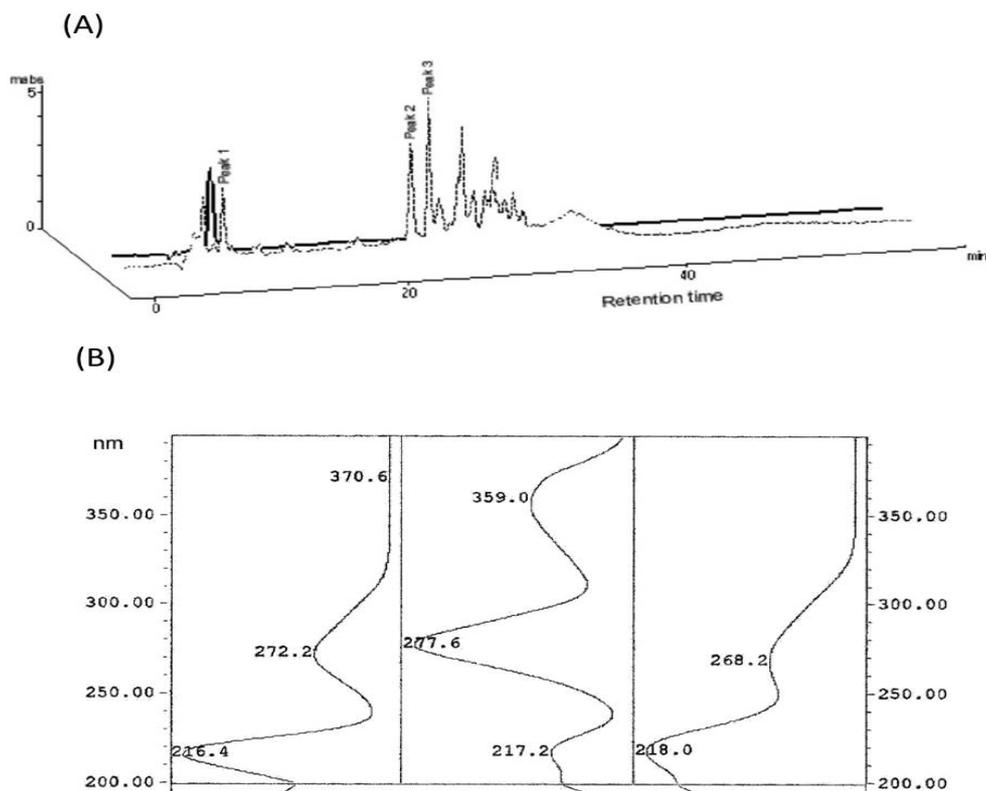
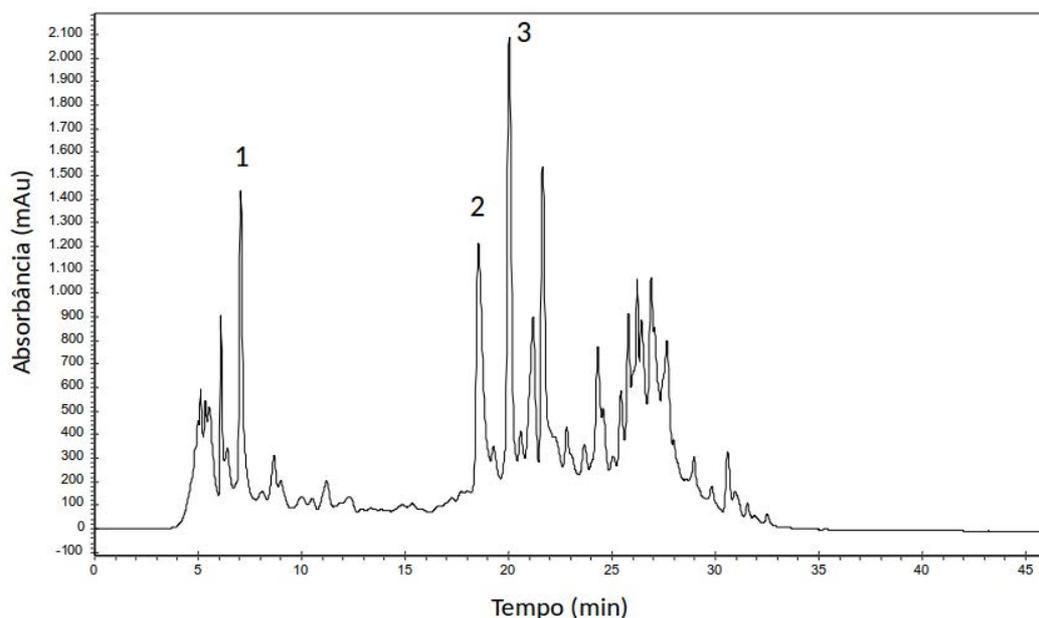


Figura 3. (A) Perfil cromatográfico da decocção das partes aéreas de *P. niruri* e (B) espectros UV dos picos identificados no perfil cromatográfico do trabalho de referência (De Souza et al., 2002).
 Fonte: De Souza e colaboradores (2002).

Para a reprodução do trabalho de referência foi realizada uma pequena alteração do ácido utilizado, substituindo o ácido fosfórico pelo TFA (seção 3.6), devido falta de disponibilidade em nosso estoque de reagentes. O TFA por ser um ácido mais forte, com pKa igual a 0,23, aproximadamente dez vezes maior que o do ácido fosfórico (pKa1 = 2,12), foi utilizado em uma proporção (0,1 %), dez vezes menor do que a utilizada para o ácido fosfórico (1 %) na fase móvel.

Após a reprodução nas condições experimentais em nosso laboratório, foi possível obter o perfil cromatográfico e os picos foram numerados de acordo com o espectro UV e tempo de retenção relatado no trabalho de referência (Figura 3B, Figura 4A e B).

(A)



(B)

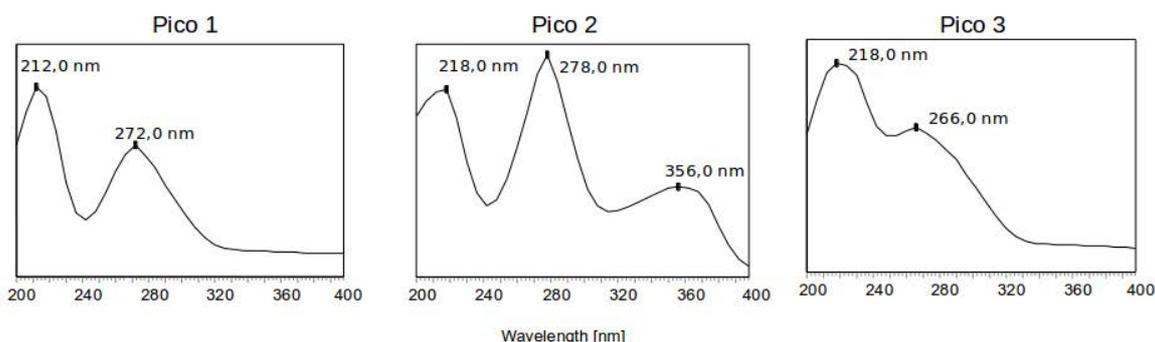


Figura 4. (A) Perfil cromatográfico da reprodução do trabalho de referência de *P. niruri* [Sistema CLAE; coluna VarianRP C18 (250 x 4,60 mm d.i. x 4 μ m); Solvente A (H₂O + 0,1% TFA) e solvente B (ACN:H₂O + 0,1% TFA na proporção 50:50, v:v). Gradiente: 22-24% B (7 min), 22-40% B (10 min), 40-100% B (8 min), 100-22% B (15 min). Vazão de 0,6 mL.min⁻¹, λ = 275 nm, 30°C]; (B) espectros UV dos picos numerados no cromatograma.

Como é possível observar, os picos numerados tiveram uma pequena alteração do tempo de retenção (Tabela 3). Este fato pode estar relacionado com o tipo e medida da coluna C₁₈ utilizada, pois na reprodução foi utilizada uma coluna VarianRP C₁₈ (250 x 4,60 mm d.i. x 4 μ m) e no trabalho de referência De Souza e colaboradores (2002) utilizaram uma coluna Merck LiChrospher RP18 (250 x 4 mm d.i., 5 μ m).

Tabela 3. Comparação de tempos de retenção dos picos majoritários do trabalho de referência e sua reprodução

Picos	Tempo de retenção (min)	
	Trabalho de referência	Reprodução do trabalho de referência
1	6,6	6,8
2	20,2	18,7
3	21,5	20,1

4.3. Triagem de variáveis utilizando Planejamento Fatorial Fracionário

Essa é a primeira etapa para identificar, dentre um número de variáveis, aquela(s) que apresentam maior importância no desenvolvimento de um método. Para isso, os níveis de cada fator (variáveis) foram determinados através da reprodução do trabalho de referência (DE SOUZA et al., 2002), observando o comportamento dos constituintes presentes na decocção baseado na polaridade.

Foram fixados o volume das amostras em 20 μL , a concentração da amostra em 1g.L^{-1} e a porcentagem final de EtOH em 70%, baseados no trabalho de referência (DE SOUZA et al., 2002).

Após o estabelecimento dos fatores e níveis, foi realizado um Planejamento Fatorial Fracionário de 2 níveis e 5 fatores (2^{5-1} , Tabela 1), cujas combinações totalizaram 16 análises por CLAE (Tabela 4).

As respostas utilizadas para determinação da interferência dos fatores avaliados foram: número de picos, e a função-resposta GCFR (*Green Chromatographic Fingerprint Response*, Equação 1), desenvolvida pelo nosso grupo (FUNARI et al., 2014).

$$\text{GCFR} = n^x \left(\frac{FP}{MP} \right) \left(\frac{n}{t} \right)$$

Equação 1. Função-resposta GCFR (*Green Chromatographic Fingerprint Response*).

Na equação, o fator n corresponde ao número total de picos de um determinado cromatograma, x é o expoente da equação ($x=1$ no presente trabalho), t é o tempo total de análise e os fatores FP e MP correspondem aos números de picos na metade do

cromatograma com menos picos e na metade com maior número de picos, respectivamente.

As respostas analisadas tiveram o objetivo de realizar uma leitura qualitativa e quantitativa encontrando uma relação entre o número de picos e a sua distribuição por todo o cromatograma em um determinado intervalo de tempo. É uma abordagem de extrema relevância no desenvolvimento de métodos cromatográficos de extratos de plantas, bem como de outras amostras complexas. Quanto maior o valor obtido de GCFR para uma determinada análise, melhor. O número total de picos e o GCFR de cada análise estão relacionados na Tabela 4, bem como os seus respectivos cromatogramas nas Figuras 5 e 6. A atribuição dos níveis -1 e +1 (baixo e alto, respectivamente) são alternados a cada 1, 2, 4 e 8 experimentos para as análises X1, X2, X3 e X4, respectivamente, ao passo que para a X5 os níveis são obtidos através da combinação das outras variáveis.

Tabela 4. Planejamento experimental de dois níveis e cinco fatores de um fatorial fracionário 2^{5-1} e as respostas obtidas para cada análise.

Experimentos	X1	X2	X3	X4	X5	Respostas	
						Número de picos	GCFR (x=1)
1	-1	-1	-1	-1	+1	18	19,1
2	+1	-1	-1	-1	-1	10	41,7
3	-1	+1	-1	-1	-1	23	40,1
4	+1	+1	-1	-1	+1	10	11,1
5	-1	-1	+1	-1	-1	15	57,7
6	+1	-1	+1	-1	+1	04	5,3
7	-1	+1	+1	-1	+1	14	15,1
8	+1	+1	+1	-1	-1	06	12,0
9	-1	-1	-1	+1	-1	20	35,1
10	+1	-1	-1	+1	+1	09	10,1
11	-1	+1	-1	+1	+1	32	33,0
12	+1	+1	-1	+1	-1	14	54,4
13	-1	-1	+1	+1	+1	15	16,1
14	+1	-1	+1	+1	-1	04	8,9
15	-1	+1	+1	+1	-1	26	54,1
16	+1	+1	+1	+1	+1	03	4,5

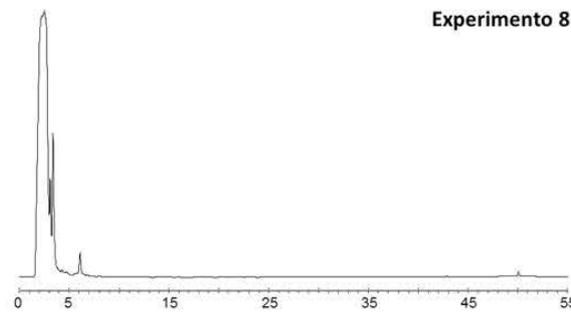
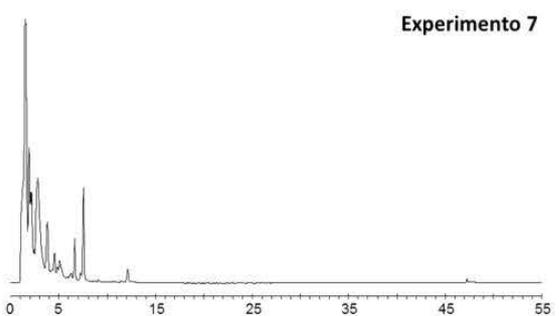
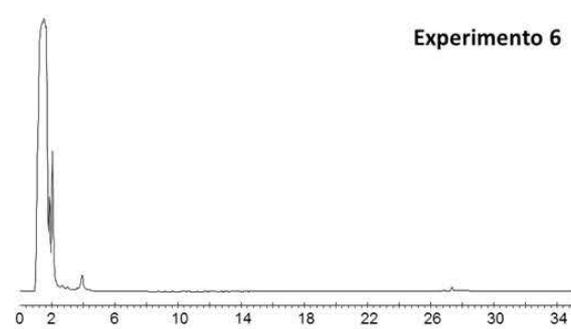
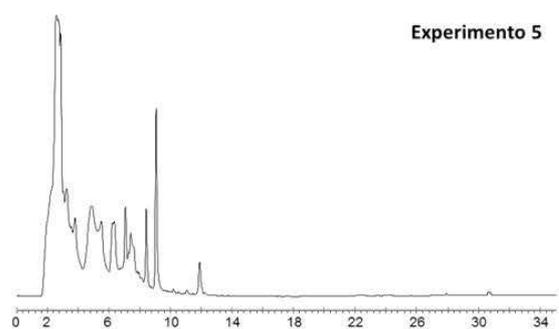
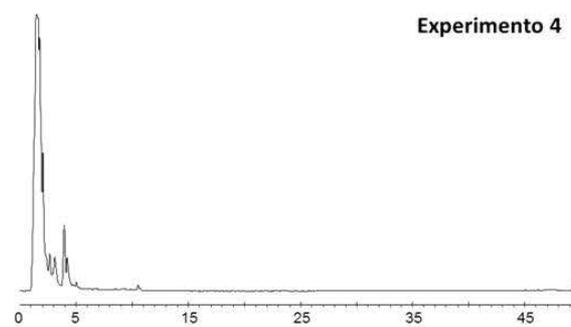
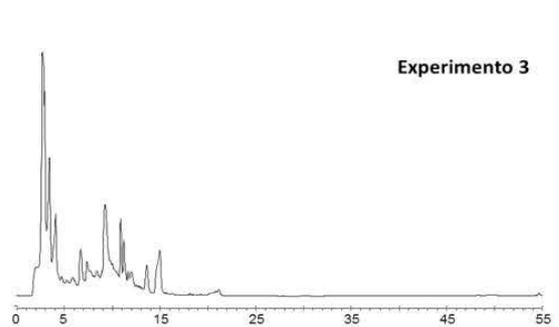
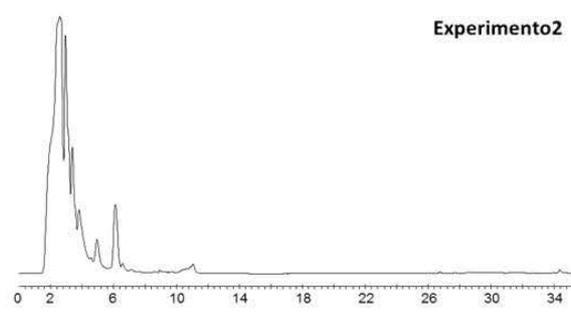
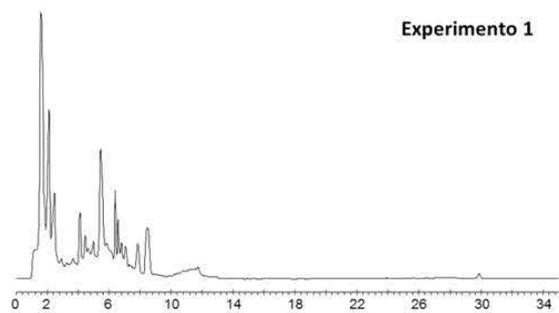


Figura 5. Cromatogramas referentes aos experimentos 1 a 8 da triagem de variáveis por CLAE-DAD.

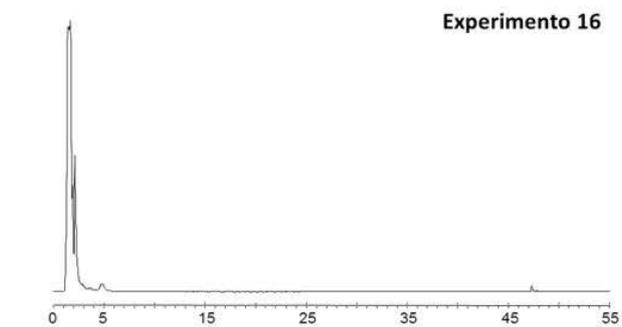
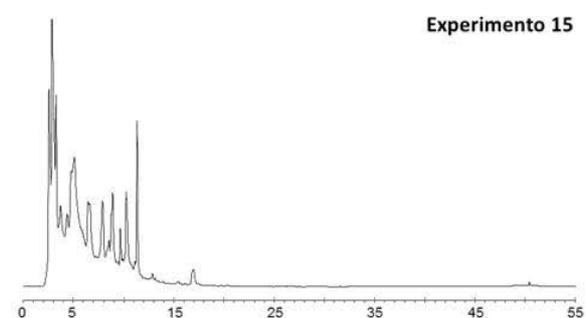
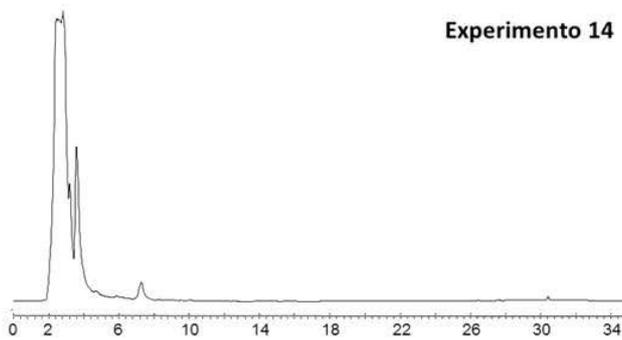
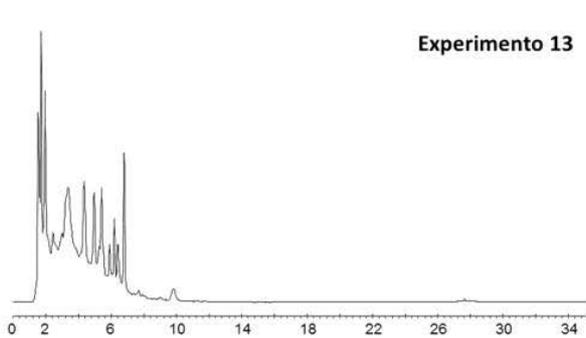
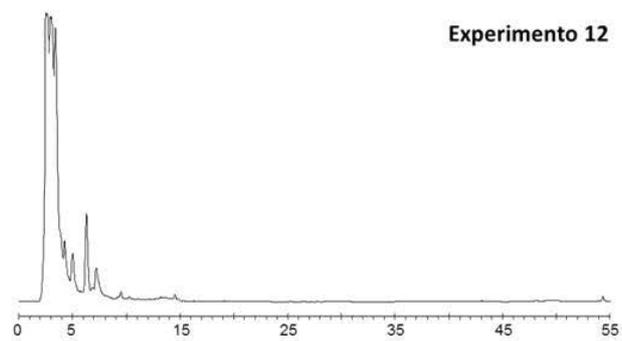
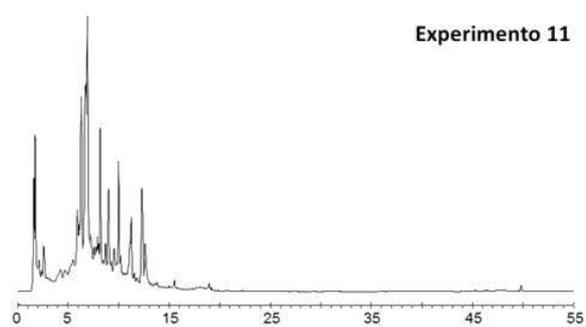
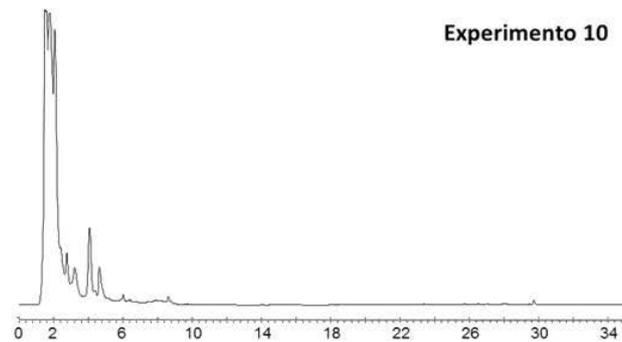
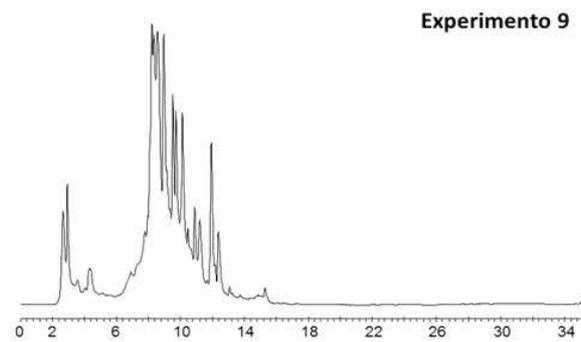


Figura 6. Cromatogramas referentes aos experimentos 9 a 16 da triagem de variáveis por CLAE-DAD.

As duas respostas obtidas na triagem foram utilizadas para calcular os efeitos de cada fator estudado e suas combinações.

Como é possível observar no gráfico normal da resposta número de picos (Figura 7a), os contrastes que apresentaram efeitos significativos foram os referentes aos fatores X1 e X3. No gráfico normal da resposta GCFR (Figura 7b), não apresentou contrastes com efeitos significativos, ou seja, não apresentaram efeitos que diferenciassem do comportamento normal mais do que uma unidade.

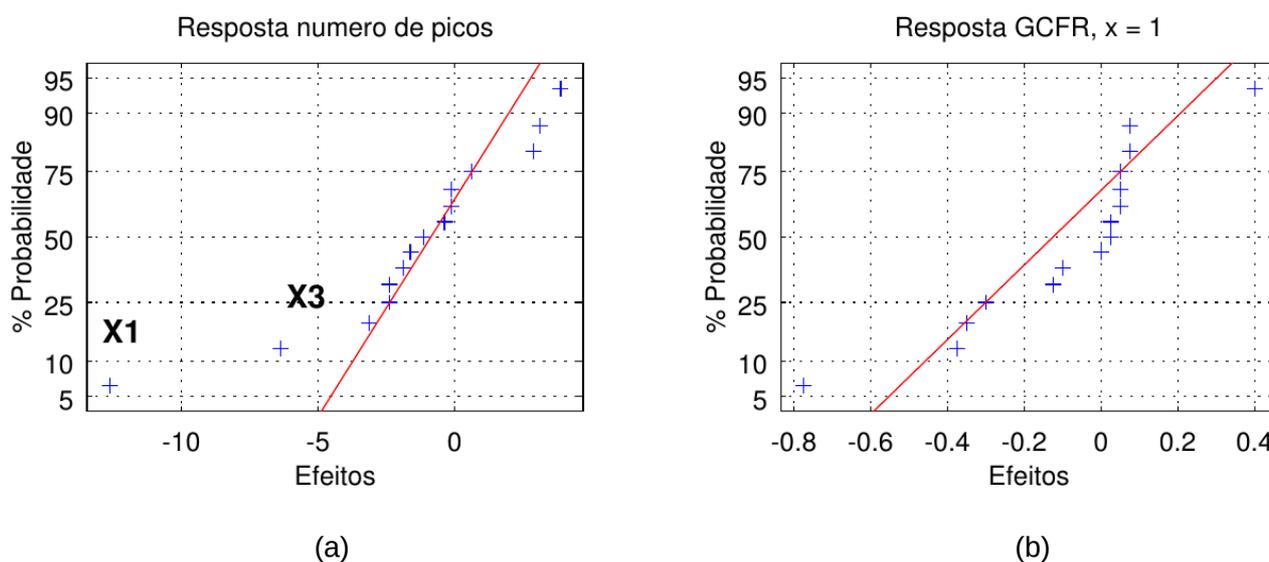


Figura 7. Gráfico norma dos valores dos efeitos calculados para a resposta (a) número total de picos e (b) GCFR.

O fator X1 foi significativo na separação dos metabólitos de *P. niruri*. A porcentagem inicial de EtOH (X1) interferiu diretamente na força de eluição da fase móvel, em teoria, maior proporção de solvente orgânico em fase reversa provoca eluição rápida dos analitos não permitindo estabelecer o equilíbrio de interação com a fase estacionária e fase móvel e, com isso, muitas substâncias coeluem, o que pode ter provocado a diminuição no número de picos no cromatograma.

O fator Temperatura (X3) também foi significativo na separação das substâncias quando avaliada a resposta número de picos. Maiores níveis de X3 são melhores, pois afinam os picos e aumentam a eficiência (difusão mais rápida dos analitos, com estabelecimento de um prato teórico mais rapidamente). Porém, a alta temperatura forçou a eluição prematura de alguns compostos, deslocando a maior parte para a primeira metade do cromatograma, prejudicando assim distribuição no cromatograma (resposta

GCFR).

A porcentagem final de EtOH estabelecida pode ter ficado com valor muito alto e com isso, também pode ter provocado a eluição de maior número de compostos na primeira metade do cromatograma, ocasionando assim valores baixos para a resposta GCFR.

Essa distinção não significa que os demais fatores cromatográficos (X2, X4 e X5) sejam descartáveis, mas sim que a variação dos mesmos interferem com menor magnitude na separação dos constituintes químicos da decocção das partes aéreas de *P. niruri*, quando utiliza-se misturas de EtOH e H₂O como fase móvel.

Com isso, um valor para cada um desses três fatores pode ser fixado de maneira que as análises sejam realizadas em um menor tempo e com menor consumo de solventes, convergindo assim com os princípios da química verde.

4.4. Otimização das condições cromatográficas (Planejamento de Composto Central)

Uma vez que as variáveis significantes foram identificadas foi realizado um refinamento das mesmas aplicando um Planejamento de Composto Central (CCD). O CCD é uma alternativa com maior número de níveis utilizando apenas as variáveis relevantes o que requer um número menor de experimentos que tem por objetivo estabelecer um modelo matemático que calcule os valores ótimos dos fatores (variáveis). Esse processo pode ser considerado um procedimento verde no desenvolvimento de métodos cromatográficos, uma vez que diminui o número de experimentos e utiliza EtOH e água como fase móvel.

No CCD foi adicionado mais um fator, o X6 (% final de EtOH), além do X1 e X3, com o objetivo melhorar a distribuição dos picos que eluíram, na maioria das análises da triagem, na primeira metade do cromatograma (Tabela 2). Com isso, o número de análises planejadas para o CCD foi 14 (Tabela 5).

As variáveis que se mostraram estatisticamente irrelevantes na etapa de triagem tiveram os seus valores fixados dentro da faixa investigada: Tempo de análise (X2) em 40 min, porcentagem de ácido acético (X4) em 0,5% e vazão da fase móvel (X5) em 0,6 mL min⁻¹

Tabela 5. Planejamento de Composto Central de 5 níveis e 3 fatores e as respostas obtidas para cada análise.

Experimentos	X1	X3	X6	Respostas	
				Número de picos	GCFR (x=1)
1	-1	-1	-1	41	13,6
2	+1	-1	-1	18	1,6
3	-1	+1	-1	25	2,1
4	+1	+1	-1	12	0,0
5	-1	-1	+1	37	4,1
6	+1	-1	+1	24	1,3
7	-1	+1	+1	30	0,8
8	+1	+1	+1	13	0,0
9	-1,683	0	0	38	4,2
10	+1,683	0	0	12	0,0
11	0	-1,683	0	37	8,0
12	0	+1,683	0	19	0,5
13	0	0	-1,683	24	3,8
14	0	0	+1,683	27	0,0

Como é possível observar nos cromatogramas das análises do CCD (Figuras 8 e 9), as melhores distribuições dos picos foram alcançadas nos experimento 1 e 11, cujo número de picos foi 41 e 37, e o GCFR (x=1) foi 13,6 e 8,0, respectivamente (Tabela 5).

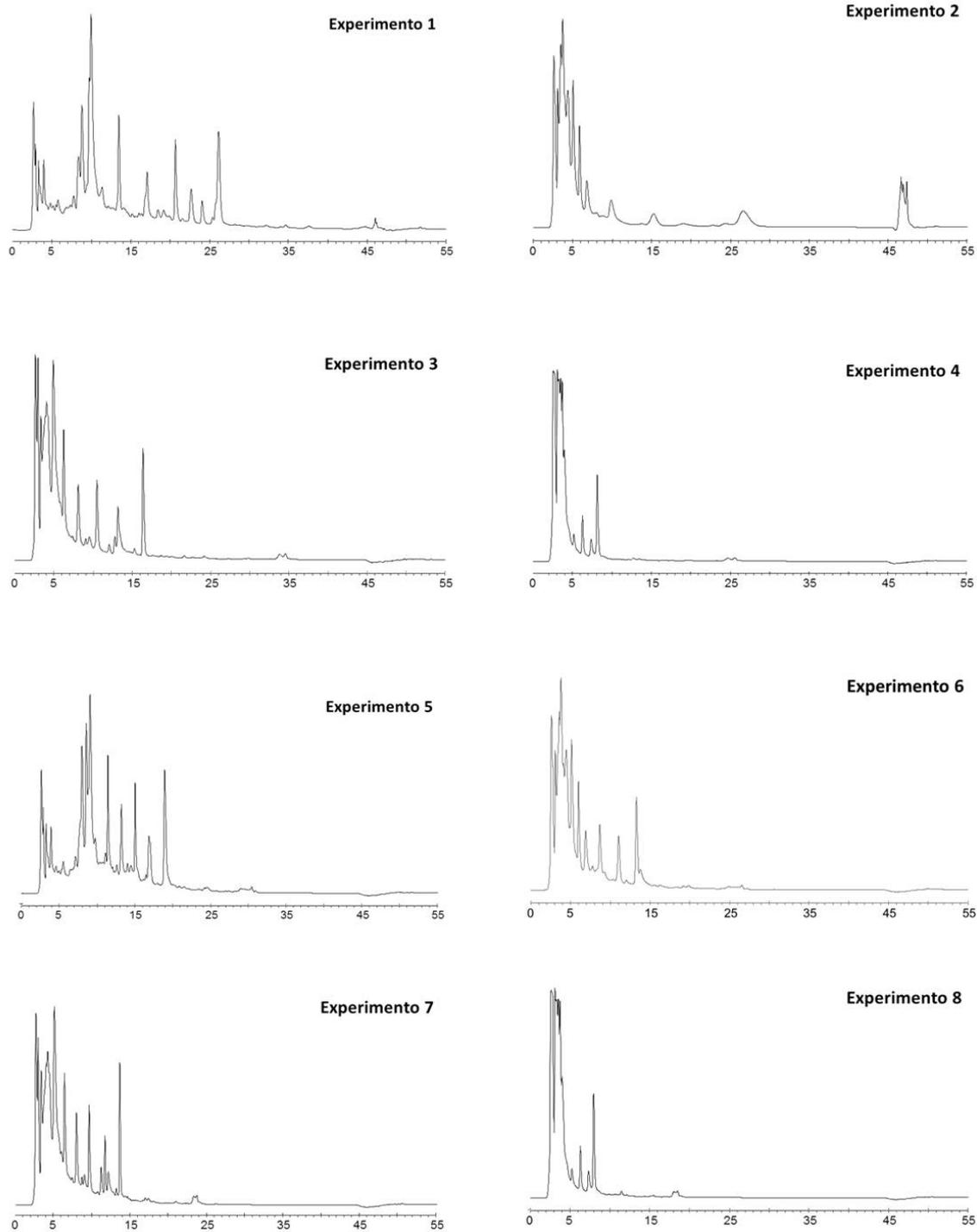


Figura 8. Cromatogramas referentes aos experimentos 1 a 8 do CCD por CLAE-DAD.

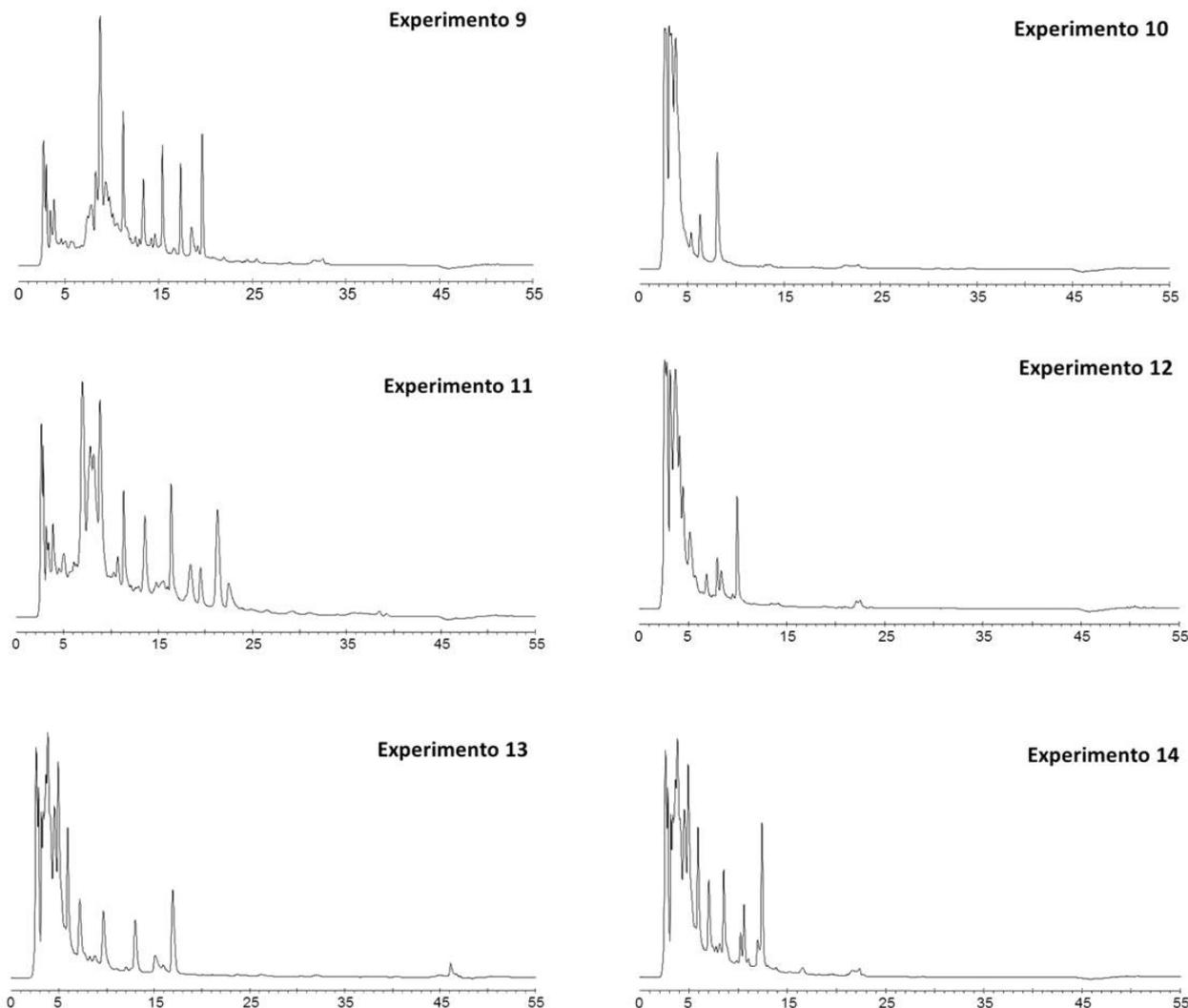


Figura 9. Cromatogramas referentes aos experimento 9 a 14 do CCD por CLAE-DAD.

A partir do conjunto de experimentos realizados com a decocção das partes aéreas de *Phyllanthus niruri* o modelo matemático encontrado foi:

$$y = 2,2 - 1,8x_1 - 2,2x_3 - 1,3 \cdot (-1,5) + 0,7 \cdot x_3^2 + 1,5 \cdot x_1x_3 + 1,3 \cdot (-1,5)x_1 + 1,1 \cdot (-1,5)x_3 - 1,0 \cdot (-1,5)x_1x_3$$

Obs.: valor de $R^2 = 0,94$ e o fator X_6 fixado em $-1,5$, em que R^2 corresponde ao fator de correlação.

A função matemática definida forneceu um método de análise em uma fase móvel composta por EtOH (A) e H₂O + 0,5% Ac. Acético (B) que inicia-se com 5% (A) até 14% (A) terminando com 100% (A) em 45 minutos. Com uma vazão de 0,6 mL min⁻¹ em temperatura de 40°C. Possuindo um GCFR de 18,5, o ponto ótimo apresentou um cromatograma composto por 37 picos, dos quais os majoritários são destacados no

cromatograma e seus espectros UV apresentados (Figuras 10, 11 e 12).

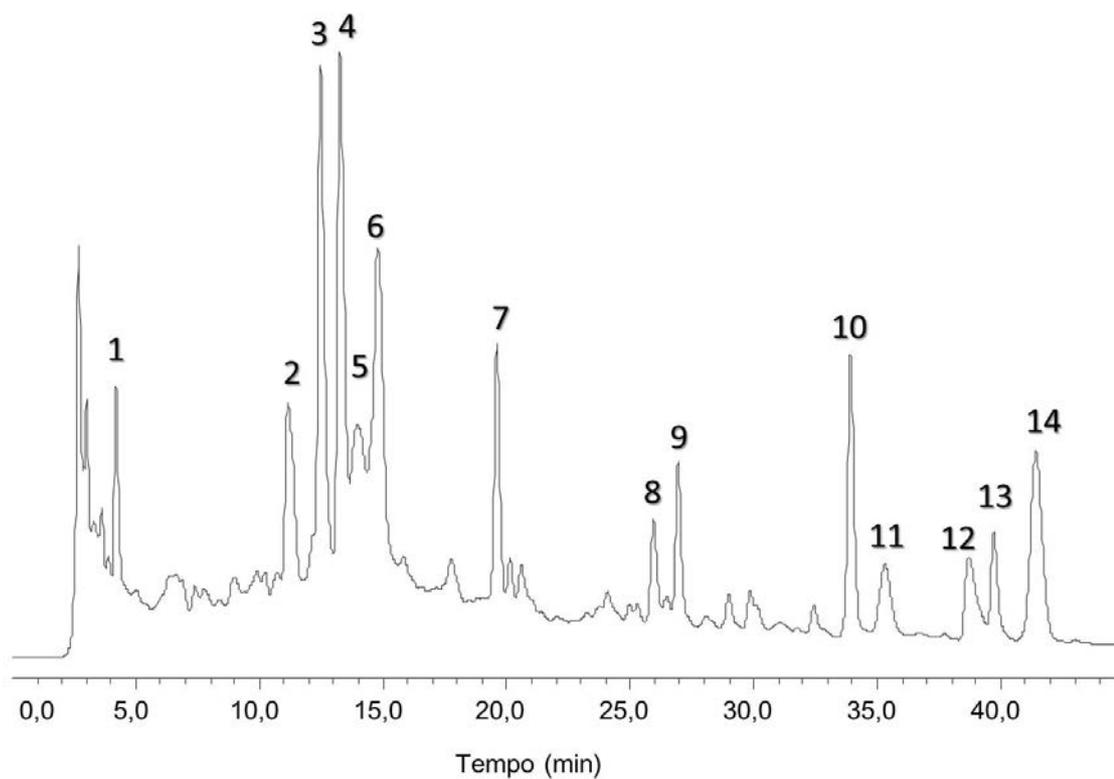


Figura 10. Cromatograma do ponto ótimo da decocção das partes aéreas de *P. niruri* [Sistema CLAE; coluna XBrigde (150 x 4,60 mm d.i. x 4 μ m, Waters®); Solvente A (EtOH) e solvente B (H_2O + 0,5% Ac. Acético). Gradiente: 5-14%% A (40 min), 14-100% B (5 min). Vazão de 0,6 mL.min⁻¹, λ = 275 nm, 40°C].

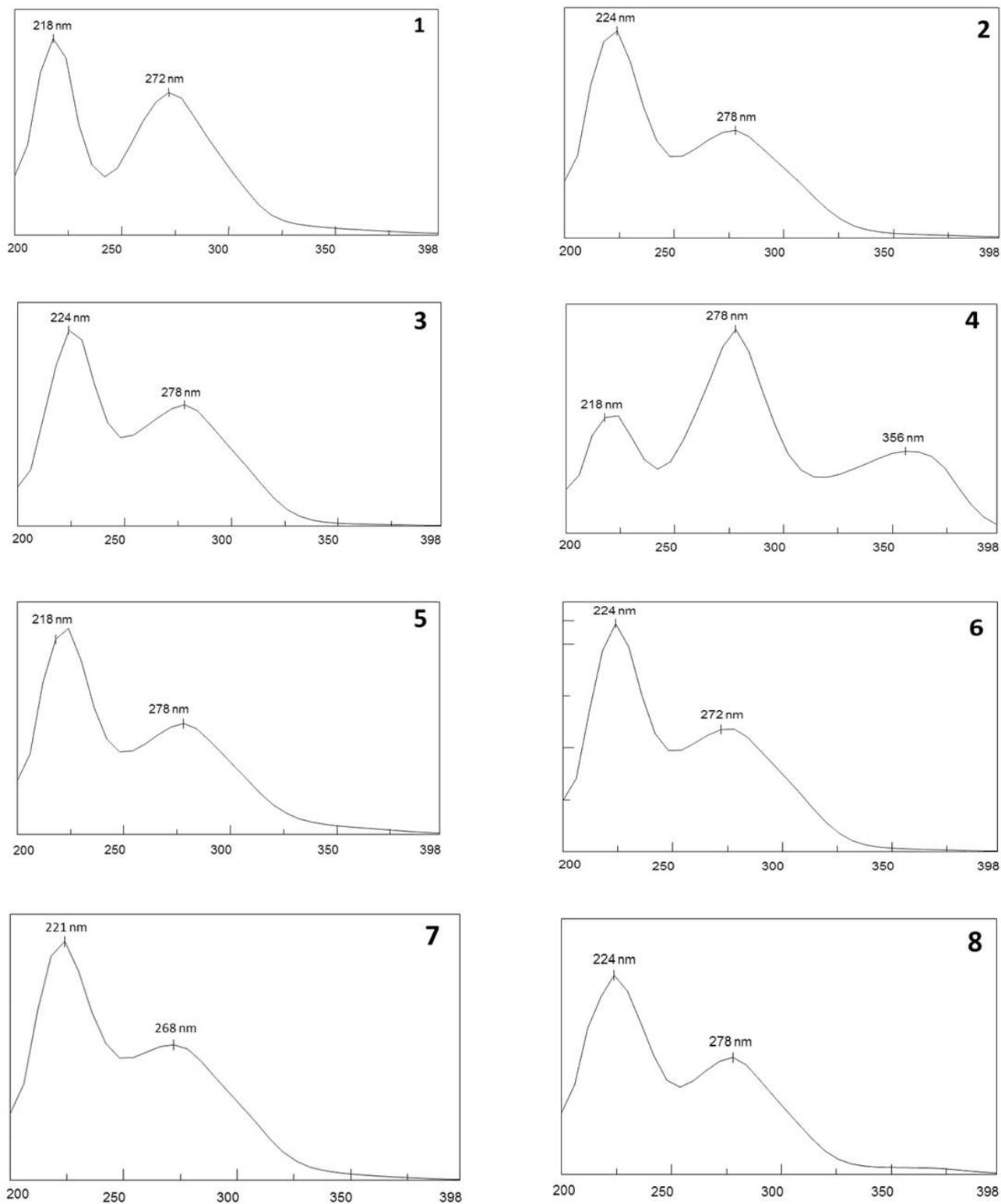


Figura 11. Espectros UV referentes aos picos majoritários 1 a 8 do perfil cromatográfico ótimo da decocção das partes aéreas de *P. niruri* por CLAE-DAD.

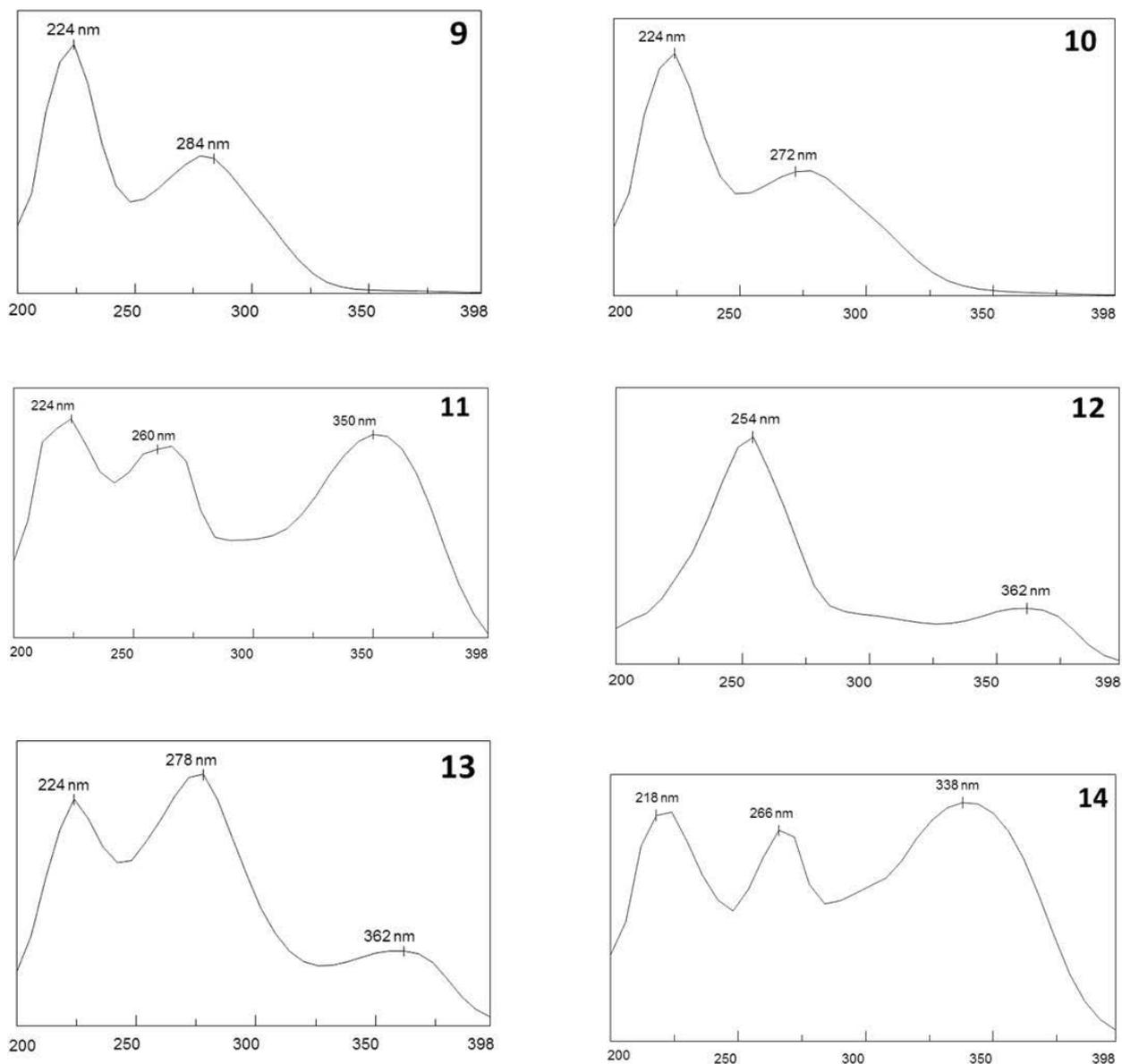


Figura 12. Espectros UV referentes aos picos majoritários 9 a 14 do perfil cromatográfico ótimo da decocção das partes aéreas de *P. niruri* por CLAE-DAD.

Por comparação dos tempos de retenção e espectros UV dos trabalhos de De Souza e col. (2002) e Albrecht (2014), os marcadores fitoquímicos principais podem ser identificados como: (1) Ácido gálico, (7) corilagina, (11) rutina, (12) ácido elágico e (14) quercitrina (Figura 13).

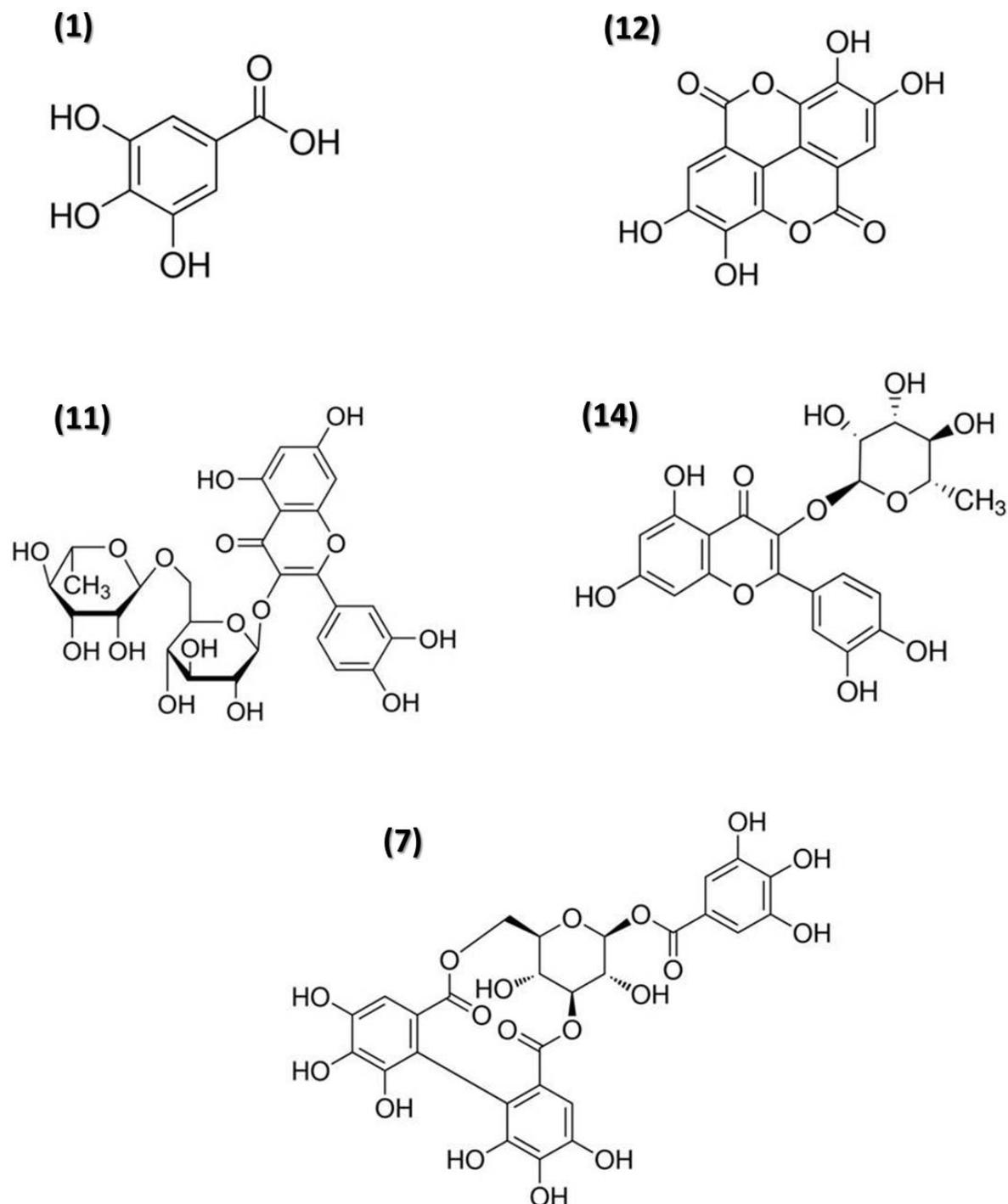


Figura 13. Estrutura dos principais marcadores (ALBRECHT, 2014) encontrados no perfil cromatográfico verde de *P. niruri*: (a) ácido gálico, (b) ácido elágico, (c) rutina, (d) quecitrina e (e) corilagina.

Pela análise dos espectros UV das outras substâncias não consideradas marcadores no perfil verde, os picos 4 e 13 pertencem a classe dos flavonoides (MABRY; MARKHAM; THOMAS, 1970) e os picos 2, 3, 5, 6, 8, 9 e 10 são derivados de Ácido gálico.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho demonstrou, por análises quimiométricas, que é possível desenvolver um perfil cromatográfico de *P. niruri* por CLAE-DAD de uma maneira racional que utiliza menor número de análises do que um desenvolvimento tradicional utilizado por grande parte dos cromatografistas.

Concomitantemente ao desenvolvimento de um perfil cromatográfico que demande um menor tempo, este trabalho utilizou alternativas seguras voltadas desde a saúde do analista até a preservação ambiental. Os conceitos de química verde estiveram presentes do início ao fim do desenvolvimento cromatográfico, desde a preparação da amostra até a obtenção do ponto ótimo.

Dos 12 princípios de Química Verde (PRADO, 2003), seis foram abordados durante o trabalho: Uma quantidade mínima de material vegetal foi utilizada para as análises convergindo com o Princípio 2, foi realizada a substituição de metanol e acetonitrila por etanol e água cujo descarte pode ser feito sem impacto ambiental convergindo com o Princípio 11 e que também está de acordo com Princípio 12 e 10 que estabelece a segurança do analista e o uso de solventes que quando degradados não agredam o meio ambiente, respectivamente. Em nenhum momento durante o desenvolvimento cromatográfico houve geração de resíduos que necessitem de tratamento especial, o que vai de encontro com o Princípio 4 e a diminuição de recursos e tempo converge com o Princípio 6 que diz que o uso de energia deve ser minimizado.

Foi possível, portanto, obter um perfil cromatográfico por CLAE-DAD, como alternativa verde, para análise de extratos polares das partes aéreas de *P. niruri* com identificação inequívoca dos principais marcadores, sendo eles o ácido gálico, corilagina, rutina, ácido elágico e quercitrina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBRECHT, Ingrid. **Identificação de metabólitos secundários em extrato aquoso de *Phyllanthus niruri* L. com ação no processo de formação de cristais de oxalato de cálcio.** 2014. 148 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

BADKE, M.R. et al. **Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular.** Escola Anna Nery, v.15, n.1, p.132-9, 2011

BANFI, Enrico. ***Phyllanthus niruri* L. (Phyllanthaceae) - Mauritius.** Disponível em: <<http://www.actaplantarum.org/floraitaliae/viewtopic.php?t=46318>>. Acesso em: 07 mar. 2016.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de interesse ao SUS.** Brasília: Agência Saúde, 2009. Disponível em:<http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_mediciniais_sus_0603.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2015.

CRUCES, I.L et al . Using medicinal plants in the control of urolithiasis. **Rev. Bras. Plantas Med.**, Botucatu , v. 15,n. 4,supl. 1,p. 780-788,2013. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151605722013000500020&lng=pt&nrm=iso>.Acesso em 23 jul. 2015.

CHEMAT, F.; VIAN, M. A.; CRAVOTTO, G. Green extraction of Natural Products: Concept and principles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 8615-8627, 2012

COLOMBO, Renata et al. **Validated HPLC method for the standardization of *Phyllanthus niruri* (herb and commercial extracts) using corilagin as a phytochemical marker.** Biomed.Chromatogr., [s.l.], v. 23, n. 6, p.573-580, jun. 2009. Wiley-Blackwell.<http://dx.doi.org/10.1002/bmc.1155>. Disponível em: <<http://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1002/bmc.1155>>. Acesso em: 08 mar. 2016.

DEGANI, Ana Luiza G.; CASS, Quezia B.; VIEIRA, Paulo C.. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova**, São Paulo, n. 7, p.21-25, maio 1998.

DE SOUZA et al. **Validation of a LC method for the analysis of phenolic compounds from aqueous extract of *Phyllanthus niruri* aerial parts.** Pharmaceutical And Biomedical Analysis. Porto Alegre, p. 351-356. abr. 2002.

FERREIRA, Márcia M. C. et al. Quimiometria I: Calibração Multivariada, um tutorial. **Química Nova**, [s.i.], v. 22, n. 5, p.724-731, jan. 1999.

FIRMO, W.C.A.; MENEZES, V.J.M.; PASSOS, C.E.C.; DIAS, C.N.; ALVEZ, L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, L.S.G. . **Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais.** 2011. Disponível em:<<http://www.periodicoseletronicos.ufma.br/index.php/cadernosdepesquisa/article/view/>

746/454>. Acesso em: 04 jul. 2015

FUNARI, C. S.; CARNEIRO, R. L.; CAVALHEIRO, A. J.; HILDER, E. F. A trade off between separation, detection and sustainability in liquid chromatographic fingerprinting. **Journal of Chromatography A**, v. 1354, p. 34-42, 2014b

LENARDAO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green chemistry" - os 12 principios da quimica verde e sua insercao nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, p. 123-129, 2003.

MABRY, Tom; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B.. **The Systematic Identification of Flavonoids**. Nova York: Springer-verlag Berlin Heidelberg, 1970.

NOLDIN, Vânia Floriani. **Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de Simaba ferruginea St. Hil. E avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isoladas**. 2005. 91 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Farmaceuticas, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005. Disponível em: <<http://siaibib01.univali.br/pdf/Vania%20Floriani%20Noldin.pdf> >. Acesso em: 04 jul. 2015

PRADO, Alexandre G. S.. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, Brasília, v. 26, n. 5, p.738-744, 31 mar. 2003.

SILVA, Natália Coelho da. **Comparação do perfil de metabólitos secundários em diferentes órgãos de Phyllanthus niruri L. (Euphorbiaceae)**. 2013. 111 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia-bioquímica, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.

SPRENGER, Ricardo de Fontoura. **Caracterização de quatro espécies de quebrapedra utilizando cromatografia liquida de alta eficiência hifenada a espectrometria de massa em múltiplos estágios**. 2011. 139 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M.. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, [s.i], v. 28, n. 3, p.521-528, 28 fev. 2005.