



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E FÍSICA
CURSO SUPERIOR DE BACHARELADO EM QUÍMICA

GIOVANNA DE FÁTIMA ABRANTES OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DE 1,2-BENZOPIRONA EM XAROPES DE GUACO
EMPREGANDO CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

AREIA

2021

GIOVANNA DE FÁTIMA ABRANTES OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DE 1,2-BENZOPIRONA EM XAROPES DE GUACO
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Edilene Dantas Teles Moreira.

AREIA

2021

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

O48d Oliveira, Giovanna de Fátima Abrantes.

Determinação de 1,2-benzopirona em xaropes de guaco empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência / Giovanna de Fátima Abrantes Oliveira. - Areia, 2021. 49 f.

Orientação: Edilene Dantas Teles Moreira.

TCC (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Química. 2. 1,2-benzopirona. 3. HPLC. 4. DAD. 5. Xarope de guaco. I. Moreira, Edilene Dantas Teles. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

CDU 54(02)

GIOVANNA DE FÁTIMA ABRANTES OLIVEIRA

**DETERMINAÇÃO DE 1,2-BENZOPIRONA EM XAROPES DE GUACO
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA**

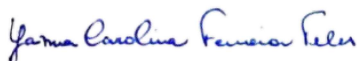
Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Bacharelado em Química da Universidade Federal da Paraíba como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química.

Aprovado em: 02 / 12 / 2021

BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Edilene Dantas Teles Moreira (Orientadora)
Universidade Federal da Paraíba



Profª. Dra. Yanna Carolina Ferreira Teles (Examinadora)
Universidade Federal da Paraíba

Dr. Wellington da Silva Lyra (Examinador)
Universidade Federal da Paraíba

AGRADECIMENTOS

À minha avó Adalgisa, minha mãe Fátima e ao meu pai Jurandi por todo amor, apoio e incentivo e se fizerem a base sólida que firma meus pés neste chão, vocês são meu maior valor e orgulho. Em especial a minha avó, mulher de extrema fibra, que me remete o maior significado de amor e dedicação, obrigado pelo afeto, por ser tão presente e por nunca me deixar hesitar em realizar esse sonho. À Valkyria por toda paz e felicidade que trouxe para minha vida.

À minha família, em especial minhas tias, Valda, Dinha, Rejane e Roberlândia e aos meus primos por dividir a companhia, alegrias e dores nessa etapa final do curso. Ao meu tio Esmael Gadelha (*in memoriam*) pela atenção e cuidado.

À minha orientadora, Dra Edilene Dantas Teles Moreira, a qual tenho uma enorme admiração e respeito. Obrigada pela valorosa orientação, pela sabedoria na tomada de decisões nessa etapa e pela paciência e confiança depositada.

A todos os professores do Departamento de Química e Física do Centro de Ciências Agrárias – UFPB que participaram da minha formação, por todos os conhecimentos e ensinamentos transmitidos. Em especial ao professor Sidney Ramos Santana pela inspiração que és em minha vida e ao professor Péricles de Farias Borges pela confiança. Aos professores do Departamento de Zootecnia pela paciência e atenção, em especial ao professor Marcelo Rodrigues pela orientação durante o estágio curricular não-obrigatório e aos servidores do CCA, Josenildo e Andrea pela compreensão e companhia durante a finalização dessa etapa.

Aos técnicos do Laboratório de Química do CCA/UFPB, Tereziana, Hellane e Deydeby pela disponibilidade em supervisionar os estágios obrigatórios, além do auxílio e prontidão durante as atividades realizadas sejam elas de ensino, pesquisa ou extensão. Foi um privilégio adquirir as competências com profissionais tão formidáveis.

A irmã que a vida escolheu para mim, Dayane, por sempre acreditar no meu potencial, pela lealdade e amizade verdadeira, sincera e que carrega um valor imensurável. Aos demais amigos e ex-colegas do IFPB – Campus Sousa, em especial Andreia pelo apoio e atenção que possibilitaram a conclusão deste trabalho, obrigada.

Ao meu namorado Emmanuel Borges pela paciência infinita, atenção, lealdade e confiança. Obrigada pela persistência, independente da fase em que me encontro. Gratidão por me presentear com uma família de coração em Areia.

Aos meus amigos do CCA, Aiza, Filipe, Jânio e Letícia pela preocupação com minha rotina onusta, pelo apoio em todas as turbulências que tive nessa jornada, pela amizade e por todos os momentos de tristeza e diversas alegrias compartilhados, tenho um carinho enorme por ter vocês em minha vida.

A todos do LAQA que me auxiliaram durante o experimento, em especial à Wellington e à Emanuelle.

RESUMO

A utilização de fitoterápicos no Brasil tem aumentado devido à criação de políticas nacionais de incentivo, além de apresentar grande biodiversidade conferindo condições para o desenvolvimento da cadeia produtiva dos mesmos. Entre os mais diversos medicamentos fitoterápicos mencionados nas normas, a espécie *Mikania glomerata* conhecida popularmente como “guaco” é a que mais apresenta registros entre os comercializados no Brasil, o xarope é bastante utilizado por sua atividade expectorante e broncodilatadora devido a presença de 1,2-benzopirona (cumarina). Entre os métodos empregados para quantificação de cumarinas presentes em fitoterápicos destaca-se a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Diante do exposto este estudo teve como objetivo validar uma metodologia analítica empregando HPLC para quantificação de 1,2-benzopirona em onze amostras de xarope de guaco comercializadas. O preparo das soluções de trabalho foi realizado por diluição na fase móvel com acetonitrila e água (40:60 v/v). As amostras de xarope de guaco foram diluídas com a mesma proporção de acetonitrila e água. Posteriormente, as análises foram realizadas empregando um equipamento para HPLC-DAD avaliando dois comprimentos de onda, 275 nm e 310 nm. Durante a validação do método foi avaliada a seletividade, que demonstrou a ausência de picos interferentes na faixa de estudo. A linearidade foi avaliada e atestado pelos resultados da ANOVA, além de indicar exatidão analítica e a repetibilidade do método. Os limites de detecção e quantificação obtidos a partir dos parâmetros da curva analítica, sendo para LOD 0,0041 e 0,0160 mg.L⁻¹ e LOQ de 0,0124 e 0,0485 mg.L⁻¹ nas faixas 275 e 310 nm respectivamente, sendo valores considerados satisfatórios para os analitos avaliados. Entre as onze amostras avaliadas, duas apresentaram teores de 1,2-benzopirona muito abaixo dos valores mencionados nos rótulos dos xaropes, o que pode ocorrer por diversos fatores associados às várias etapas de produção de um medicamento fitoterápico, método de secagem que alteram a composição química e condições de estocagem. Portanto, a metodologia empregada constitui uma alternativa para quantificação de cumarinas em xaropes de guaco.

Palavras-chave: 1,2-benzopirona; HPLC; DAD; xarope de guaco.

ABSTRACT

The use of herbal medicines in Brazil has increased due to the creation of national incentive policies, in addition to presenting great biodiversity, providing conditions for the development of their production chain. Among the most diverse herbal medicines mentioned in the standards, the *Mikania glomerata* species popularly known as "guaco" is the one with the most records among those marketed in Brazil, the syrup is widely used for its expectorant and bronchodilator activity due to the presence of 1,2-benzopyrone (coumarin). Among the methods used to quantify coumarins present in herbal medicines, High Performance Liquid Chromatography stands out. Given the above, this study aimed to validate an analytical methodology using HPLC for the quantification of 1,2-benzopyrone in eleven commercialized guaco syrup samples. The preparation of working solutions was carried out by diluting the mobile phase with acetonitrile and water (40:60 v/v). The guaco syrup samples were diluted with the same proportion of acetonitrile and water. Subsequently, the analyzes were carried out using an equipment for HPLC-DAD evaluating two wavelengths, 275 nm and 310 nm. During the validation of the method, the selectivity was evaluated, which demonstrated the absence of interfering peaks in the study range. Linearity was evaluated and attested by the ANOVA results, in addition to indicating analytical accuracy and the repeatability of the method. The limits of detection and quantification obtained from the parameters of the analytical curve, being for LOD 0.0041 and 0.0160 mg.L⁻¹ and LOQ of 0.0124 and 0.0485 mg.L⁻¹ in the ranges 275 and 310 nm respectively, being values considered satisfactory for the analyzed analytes. Among the eleven samples evaluated, two had 1,2-benzopyrone levels well below the values mentioned on the syrup labels, which can occur due to several factors associated with the various stages of production of a herbal medicine, drying method that alters the composition chemical and storage conditions. Therefore, the methodology used is an alternative for quantifying coumarins in guaco syrups.

Keywords: 1,2-benzopyrone; HPLC; DAD; guaco syrup.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – <i>Mikania glomerata</i> Spreng.....	19
Figura 2 – Estrutura 1,2-benzopirona obtida empregando o Software ChemSketch.....	20
Figura 3 – Biossíntese da cumarina.....	21
Figura 4 – Fluxograma de diferentes tipos de cromatografia.....	24
Figura 5 – Diagrama ilustrativo dos componentes de um cromatógrafo líquido moderno.....	25
Figura 6 – HPLC Dionex Technologies modelo <i>ultimate</i> 3000 para quantificação de 1,2-benzopirona.....	31
Figura 7 – Cromatogramas registrado com um detector DAD em $\lambda=275$ nm.....	34
Figura 8 – Cromatogramas registrado com um detector DAD em $\lambda=310$ nm.....	35
Figura 9 – Espectro registrado no detector de DAD de 240 a 360 nm.....	35
Figura 10 – Cromatogramas médio dos xaropes de guaco e padrão registrado com um detector DAD (a) $\lambda=275$ nm (b) $\lambda=310$ nm e (c) espectro médio dos xaropes de guaco e padrão no detector de DAD de 240 a 360 nm.....	36
Figura 11 – Curvas analíticas obtidas para cumarina (a) em 275 nm, (b) em 310 nm na faixa de concentração de 0,5 a 8,0 mg L ⁻¹	37
Figura 12 – Gráfico dos resíduos (a) obtida em 275 nm, (b) obtida em 310 nm na faixa de concentração de 0,5 a 8,0 mg L ⁻¹	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – <i>Mikania glomerata</i> Spreng e <i>Mikania laevigata</i> Sch.Bip. ex Baker: Posologias e doses admitidas.....	23
Tabela 2 - Equações das retas ($y = ax + b$), faixa linear dinâmica e coeficientes de determinação linear das curvas analíticas para a cumarina nos comprimentos de onda 275 e 310nm.....	37
Tabela 3 – Coeficientes de variação (Cv) obtidos para avaliação da precisão e exatidão do método HPLC-DAD.....	39
Tabela 4 - Dados obtidos na aplicação da ANOVA aos modelos de calibração da cumarina nos dois comprimentos de onda estudados.....	39
Tabela 5 - Teor de cumarina declarado e determinado em xaropes de guaco utilizando HPLC-DAD.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACN – Acetonitrila

ATP – Adenosina trifosfato

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

LAQA – Laboratório de Automação e Instrumentação em Química Analítica/Quimiometria

C18 – Representação de recheios de coluna com cadeias que possuem 18 carbonos

CCD – Cromatografia em camada delgada

CG – Cromatografia Gasosa

CG-DIC – Cromatografia Gasosa com detector de Ionização de Chama

CGAR – Cromatografia gasosa de Alta Resolução

CP – Cromatografia em papel

CSC – Cromatografia supercrítica

DAD – Detector de arranjo de diodos

FB – Farmacopeia Brasileira

HPLC – High Performance Liquid Chromatography

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

LMR – Limite máximo de resíduos

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOH – Metanol

MFs – Medicamentos fitoterápicos

mL – Mililitro

mg – Miligrama

MS – Espectrometria de massas

NADH – Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídio

NADPH – Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

ODS – Octadecilsilanizada

PTFs – Produtos tradicionais fitoterápicos

SUS – Sistema Único de Saúde

UV-Vis – (Radiação eletromagnética na região do) ultravioleta-visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1 O USO DE FITOTERÁPICOS E SUA REGULAMENTAÇÃO	13
3.2 AS PROPRIEDADES FITOTERÁPICAS DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNEROS <i>MIKANIA</i> UTILIZADAS NO BRASIL	18
3.3 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	24
4. METODOLOGIA	29
4.1 LIMPEZA DE VIDRARIAS.....	29
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E DE TRABALHO	29
4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS	29
4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	30
4.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS NO CROMATÓGRAFO	31
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE 1,2-BENZOPIRONA POR HPLC-DAD	31
4.6.1 Seletividade e Linearidade	32
4.6.2 Precisão e Exatidão	32
4.6.3 Limite de detecção e quantificação	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	34
5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISE	34
5.2 SELETIVIDADE	35
5.3 LINEARIDADE	37
5.4 PRECISÃO E EXATIDÃO.....	38
5.5 LIMITES DE DETECÇÃO E LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO	39
5.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CUMARINA EM AMOSTRAS DE XAROPE DE GUACO	40
6 CONCLUSÕES	42
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Os produtos de origem vegetal constituíram as bases para o tratamento de diversas patologias ao longo dos séculos, pelo conhecimento popular e também devido à utilização de plantas como fonte de novos fármacos. Com o progresso científico e a síntese de novos produtos, a utilização de plantas passou a ser desprezada para fins terapêuticos, entretanto, nunca deixaram de ser empregadas, de modo que, esse conhecimento popular tem perdurado por várias gerações e seus benefícios são cada vez mais reconhecidos (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020).

A fitoterapia, compreendida como o tratamento de patologias através da utilização de plantas como matéria-prima em diversas formulações, é considerada uma das mais antigas práticas da medicina. A efetividade comprovada no tratamento de doenças através de experimentos pré-clínicos e clínicos resultou em um aumento gradativo no consumo de fitoterápicos pela sociedade no decorrer dos últimos anos. No Brasil, os fitoterápicos movimentam anualmente cerca de 400 milhões de dólares, constituindo cerca de 6,7% das vendas do setor de medicamentos (MONTEIRO, BRANDELLI, 2017).

De acordo com Azevedo (2017), fitoterápico é definido como um produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa. Pode ser ainda classificado como simples, quando o ativo é derivado de apenas uma espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal. Não se considera fitoterápico o medicamento que inclua em sua composição substâncias ativas isoladas nem associações destas com extratos vegetais.

Vários fitoterápicos são licenciados no Brasil, totalizando 359 produtos. Muitos inclusive, são comercializados livres de receita e outros sob prescrição médica. A espécie vegetal com maior número de registros é o guaco (*Mikania glomerata* Spreng), com 25 licenças. O guaco é bastante utilizado em forma de xarope para o tratamento de sintomas de bronquite asmática, rouquidão e gripe, seu principal constituinte é a cumarina 1,2-benzopirona, presente em suas folhas e associada à ação farmacológica da espécie por possuir atividade broncodilatadora (CECHINEL FILHO, ZANCHETT, 2020).

O xarope de guaco é comercializado sem restrição de uso, contudo, possui algumas contraindicações em casos de hepatopatias crônicas, hipertensos graves e gravidez, além de algumas precauções como interações com medicamentos anticoagulantes, que causam aumento do fluxo menstrual, vômitos e diarreias em altas doses, além disso, seu uso crônico pode

ocasionar aumento do tempo de protrombina que consiste na inibição da vitamina K (SAAD, 2018).

Em 2018, a ANVISA publicou o Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos, incluindo a Instrução Normativa nº 02, de 13 de maio de 2014 da ANVISA que lista os medicamentos e produtos fitoterápicos de registro simplificado, estabelece que a dose diária de cumarinas deve variar de 0,5 a 5 mg/kg. Entre outras normas como a RDC nº 235, de 20 de junho de 2018 que dispõe sobre alterações e inclusões de controle de qualidade no registro e pós-registro de medicamentos fitoterápicos, a RDC nº 71, de 22 de dezembro de 2019 que estabelece regras para rotulagem de medicamentos, entre outras.

Os métodos quantitativos para determinação de cumarinas em xaropes de guaco são baseados em Cromatografia Gasosa acoplado a um detector por ionização em chamas (CG-DIC) utilizando método simples de extração (ABREU; SANTOS; KAISER, 2007), bem como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) (SANTOS, 2005).

Segundo a Farmacopeia Brasileira, para quantificação de cumarinas deve ser empregado a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a um detector ultravioleta (UV) 275 nm. Algumas metodologias empregam pré-coluna empacotada com sílica octadecilsilanizada (ODS), coluna de 150 mm de comprimento, fluxo da fase móvel 0,5 mL/minuto, sistema isocrático, na qual a fase móvel empregada é composta por uma mistura de água:acetonitrila (55:45 v/v) que consiste em um método preciso e exato para este tipo de determinação. Diante do exposto, o objetivo desse estudo consistiu em quantificar cumarinas em xaropes de guaco comercializados em diferentes estabelecimentos farmacêuticos empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de comprimento de onda variável com arranjo de diodos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o teor de 1,2-benzopirona em xaropes de guaco empregando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de comprimento de onda variável com arranjo de diodos e verificar a conformidade com a legislação vigente.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Utilizar uma metodologia analítica validada, HPLC-DAD, para a quantificação de 1,2-benzopirona em xaropes de guaco.
- ✓ Avaliar as figuras de mérito em termos de linearidade, seletividade, precisão e exatidão.
- ✓ Comparar os resultados obtidos das amostras comerciais com a legislação vigente.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 O USO DE FITOTERÁPICOS E SUA REGULAMENTAÇÃO

As descobertas da medicina e todo desenvolvimento humano foi permeado pela utilização de plantas medicinais para manutenção ou recuperação da saúde, sendo empregadas na cura de doenças e até mesmo na prevenção de certas patologias (MAIOR, 2020). Além disso, o uso de plantas medicinais para fins terapêuticos tornou-se bastante atrativo devido a alguns fatores culturais, entre outros como a crescente consciência ecológica e sustentável, evidências das suas propriedades curativas e até mesmo o fato de que as plantas são economicamente mais acessíveis e grande parte da população mundial não possui acesso a medicamentos (MONTEIRO, BRANDELLI, 2017).

O Brasil é reconhecido mundialmente pela sua grande biodiversidade, destacando-se pela sua flora e fauna, apresentando seu território cinco dos principais biomas: a floresta amazônica, o cerrado, a mata atlântica, o pantanal e a caatinga, possuindo inclusive diversas plantas comprovadamente terapêuticas e várias são aprovadas pelo governo para sua utilização (ESTEVES *et al*, 2020), além de estudos pré-clínicos e clínicos realizados pelas universidades e demais centros de pesquisa (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020). Ademais, a diversidade étnica, cultural e socioeconômica atribui uma forte tradição no uso de plantas medicinais no país.

As plantas medicinais podem ser utilizadas para várias finalidades e de diferentes formas, sendo elas: a) *in natura*, utilizando partes inteiras ou sob forma rasurada como para a preparação de chás, etc.; b) extratos brutos, padronizados ou fluidos; c) frações enriquecidas; d) tinturas; e) comprimidos ou cápsulas, entre outras formas farmacêuticas que, sendo submetidas a processos de extração e purificação com o intuito de isolar as substâncias de interesse são conhecidas como fitofármacos. As plantas medicinais têm tradição e para utilizá-las é necessário conhecê-las e saber como prepará-las adequadamente, de modo que cada parte a ser utilizada pode possuir um grupo de princípio ativo a ser extraído e associado a uma doença que pode ser tratada. Já os medicamentos fitoterápicos são considerados aqueles produtos industrialmente preparados que empregam exclusivamente matérias-primas ativas vegetais (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

A agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão responsável por regulamentar os medicamentos fitoterápicos destinados ao uso humano ou veterinário no Brasil.

De acordo com a ANVISA, planta medicinal é definida por espécie vegetal capaz de tratar ou curar doenças.

Em 2018, a ANVISA publicou o Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos que lista os medicamentos e produtos fitoterápicos de registro simplificado, entre outras normativas que regulamentam esses produtos, incluindo a Resolução da Diretoria Colegiada – RDC n° 26, de 13 de maio de 2014 que dispõe sobre o registro, qualidade e distribuição de medicamentos fitoterápicos. Segundo a Seção III, Art. 3° da RDC, fitoterápico é definido por:

XI - fitoterápico: produto obtido de matéria-prima ativa vegetal, exceto substâncias isoladas, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, incluindo medicamento fitoterápico e produto tradicional fitoterápico, podendo ser simples, quando o ativo é proveniente de uma única espécie vegetal medicinal, ou composto, quando o ativo é proveniente de mais de uma espécie vegetal (BRASIL, 2014, Art. 3).

Os fitoterápicos são, portanto, uma alternativa para a obtenção de medicamentos mais acessíveis em países em desenvolvimento, na qual parte da população não tem acesso a medicamentos sintéticos devido a seu alto custo. Não é considerado fitoterápico, aquele que inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, em sua composição.

Entretanto, algumas desvantagens e problemas relacionados ao uso de fitoterápicos podem ser observados, o principal consiste no uso indiscriminado e irracional, onde existe uma busca por medicamentos menos invasivos e mais naturais, envolvendo um mito de que não ocorra interações com outros medicamentos, eventuais efeitos adversos ou risco de toxicidade. Outros problemas como possíveis reações desagradáveis, em especial, em crianças, idosos e gestantes e demais problemas de saúde podem ser causados por fitoterápicos (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). A venda livre desses medicamentos, sendo dispensada prescrição médica pode contribuir com o uso indevido, entre outros fatores como culturais, a necessidade de capacitação e motivação dos profissionais de saúde para prescrição de medicamentos fitoterápicos, necessidade de fiscalização e intervenção na produção e venda desses produtos, exposição da mídia, etc (ESTEVES; et al, 2020).

Algumas interações entre medicamentos alopáticos (aqueles que apresentam apenas um princípio bioativo) com fitoterápicos foram constatadas, sendo considerada interação quando duas substâncias são absorvidas pelo corpo e seus efeitos são influenciados mutuamente, podendo ser potencializados, reduzidos ou levar a um efeito tóxico induzido. Alguns fitoterápicos como *Aescullus hippocastum* (castanha da Índia), *Carica papaya* (mamão),

Cimicifuga racemosa (black cohosh) e *Peumus boldus* (boldo) aumentam o risco de sangramento quando associados a ácido acetilsalicílico (AAS), dipiridamol, heparina, ticlopidina, clopidogrel, entre outros. Alguns são capazes inclusive de reduzir efeitos de agentes anti-hipertensivos (receptores de angiotensina) como a *Ginkgo biloba* e *Cimicifuga racemosa*. Bem como reduzir efeitos anticoagulantes ou antiplaquetários como o chá-verde e *Plantago ovata* que é empregada para regular o ritmo intestinal (AZEVEDO et al, 2017).

Na saúde pública, o uso de fitoterápicos tem se expandido por meio de políticas nacionais de incentivo como a Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápico (BRASIL, 2016) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (BRASIL, 2015) do Ministério da Saúde, definem todas as diretrizes da fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS). Com o objetivo principal de garantir à população brasileira o acesso seguro e racional de fitoterápicos e a promoção do uso sustentável da biodiversidade e desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional e reduzindo custos em relação aos medicamentos alopáticos.

Segundo Cechinel Filho e Zanchett (2020), os fitoterápicos podem ser divididos em duas categorias: os medicamentos fitoterápicos (MFs) e produtos tradicionais fitoterápicos (PTFs). Nessas categorias não estão incluídos produtos que apresentam na sua composição substâncias ativas isoladas, purificadas, sintéticas ou associações destas com outros extratos, sendo eles vegetais ou de outras fontes. A maioria que é fabricado pela indústria brasileira está embasada no uso popular das plantas medicinais, como foi citado anteriormente e apresentam dezenas de substâncias químicas farmacologicamente ativas.

O uso de fitoterápicos no início dos sintomas pode levar a redução na evolução do quadro, evitando o contágio e apresentação de sintomatologias moderadas (OSHIRO, et al 2016). Os medicamentos fitoterápicos devem ser registrados pela ANVISA antes de serem comercializados, os padrões de identidade e qualidade para algumas bebidas estão dispostos na Instrução Normativa nº 18 de 19 de junho de 2013. Segundo o Art. 1º da IR, a norma não faz distinção de bebidas e bebidas medicamentosas para os padrões de identidade e qualidade para I – Xarope, entre outras preparações. A mesma estabelece a complementação dos padrões de identidade e qualidade de bebidas, na qual o Xarope é considerado como toda bebida definida pelo Art. 26 do Decreto nº 6871 de 2009:

Art. 26. Xarope é o produto não gaseificado, obtido pela dissolução, em água potável, de suco de fruta, polpa ou parte do vegetal e açúcar, em concentração mínima de cinquenta e dois por cento de açúcares, em peso, a vinte graus Celsius (BRASIL, 2009, Art. 26).

Diferentemente dos chás, que são considerados alimentos segundo a legislação brasileira e empregam como produto a droga vegetal sendo suas espécies regulamentadas pela RDC n° 267, de 22 de setembro de 2005, bem como a RDC n° 219, de 22 de dezembro de 2006 que institui as espécies vegetais e partes de espécies vegetais para o preparo de chás (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). Para preparação dessa formulação, plantas frescas ou desidratadas são adicionadas em água quente durante até dez minutos antes de serem ingeridos (AZEVEDO et al, 2017). Não é permitido alegações terapêuticas ou medicamentosas em seu rótulo, é definido como um produto constituído de partes de uma ou mais espécies vegetais fragmentadas ou não (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020). De acordo com a literatura a preparação de chás a partir de plantas medicinais pode ser realizada por infusão, decocção ou maceração em água pelo consumidor, sendo utilizadas várias partes da planta, como folhas, frutos, raízes, talos, flores, casca e ramos. Ou seja, a aplicação apropriada dos princípios ativos exige o preparo adequado da parte a ser utilizada, para cada grupo de princípio ativo a ser extraído e sua respectiva doença a ser tratada. Os princípios ativos fitoterápicos são definidos por:

Substância ou classe de compostos (quimicamente caracterizados), cuja ação farmacológica é conhecida e responsável, total ou parcialmente, pelos efeitos terapêuticos do fitoterápico. É diferente dos medicamentos sintéticos, porque sua ação não se fundamenta em uma substância química isolada e purificada. Na maioria das vezes, a ação é consequente a um conjunto de moléculas (fitocomplexo) que interagem de modo sinérgico para promover a ação terapêutica e, às vezes, de modo antagônico, neutralizando determinados efeitos tóxicos (AZEVEDO et al, 2017, p. 456).

Os vegetais e microrganismos apresentam uma grande atividade celular, o metabolismo primário é responsável por exercer funções essenciais como a de fornecer energia (ATP) e poder redutor (NADH), além da biossíntese de substâncias e da capacidade de produzir e armazenar substâncias que podem ser utilizadas para funções vitais e perpetuação da espécie em seu meio do organismo produtor, essas substâncias possuem bioquímica e metabolismo únicos, ou seja, caracterizam-se como elementos de diferenciação. Esse conjunto metabólico é denominado de metabolismo secundário (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). De acordo com os autores, os metabólitos secundários são moléculas de estrutura complexa e baixo peso molecular, que apresentam baixas concentrações em determinados grupos de plantas.

No passado, os metabólitos secundários foram considerados produtos de excreção do vegetal, no entanto, atualmente se sabe que diversas dessas substâncias estão envolvidas em mecanismos que permitem a adequação do vegetal ao meio e apresentam atividades biológicas marcantes. Assim, despertam grande interesse, não só pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do

meio ambiente, como também por sua imensa atividade farmacológica (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017, p. 45).

Segundo os autores, a presença de metabólitos secundários não se mantém constante, como foi citado anteriormente, são armazenados pelas plantas e podem sofrer influências por diversos fatores como por exemplo, a sazonalidade, a depender do período em que a planta for coletada, visto que, a natureza dos constituintes ativos não é igual durante todo o ano, algumas podem variar inclusive durante o período de coleta (dia/noite). Em um estudo desenvolvido por Passari e colaboradores para avaliar os efeitos de variações sazonais sobre a presença de cumarinas e outros metabólitos da espécie *M. laevigata*, foi observado rendimentos maiores de princípios ativos em coletas de folhas no verão e no inverno para processamento, como o ácido o-cumárico e cumarinas.

O desenvolvimento da planta constitui outro fator de grande importância e pode influenciar na proporção dos metabólitos presentes. O conteúdo de água e fatores fisiológicos como a fotossíntese que pode ser afetada por estresse hídrico levando a mudanças no metabolismo, o aumento de temperatura e a intensidade luz são aspectos que também podem influenciar a concentração de diversas classes desses metabólitos, como alcaloides, flavonoides, glicosídeos cianogênicos, etc (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

A indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética estudou e desenvolveu diversos produtos a partir de substâncias em plantas provenientes do metabolismo secundário como alcaloides, terpenoides e fenilpropanoides. Muitos sabores, odores e coloração dos vegetais são gerados por compostos fenólicos, além disso apresentam grande importância para as plantas por conferirem proteção contra raios UV (MAIOR, 2020).

Os compostos fenólicos são substâncias que possuem pelo menos um anel aromático, em que ao menos um hidrogênio é substituído por um grupo hidroxila, sintetizados a partir de duas rotas metabólicas principais: a via do ácido chiquímico e a via do ácido mevalônico (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017, p. 50).

Após vários estudos foi observado que os vegetais utilizavam rotas biossintéticas elaboradas com elevado gasto energético para sintetizar diferentes compostos que são necessários à sua sobrevivência e preservação como por exemplo, espécies químicas que atuam na defesa do vegetal. Algumas das substâncias mencionadas pelo autor consistem em saponinas, cumarinas, limonoides, entre outras que atuam como desestimulantes de herbívoros (SIMÕES, 2017).

3.2 AS PROPRIEDADES FITOTERÁPICAS DE ESPÉCIES PERTENCENTES AO GÊNEROS *MIKANIA* UTILIZADAS NO BRASIL

O gênero *Mikania* pertencente à família Asteraceae compreende cerca de 450 espécies e apenas no Brasil foram encontradas 203 espécies na qual 142 são empregadas pelos nativos na medicina popular. De acordo com a literatura, a *Mikania guaco* Bonpl era utilizada pelos Maias contra picadas de cobras. O nome “guaco” foi adotado devido a corruptela do nome quíchua, *huaco*, que faz referência ao nome de uma ave após constatarem no século XVIII que essa espécie fazia uso de uma planta como proteção contra o veneno de cobras que eram capturadas para se alimentarem. O guaco passou a ser comercializado para aplicação tópica em 1870 sendo indicado para queimaduras, tumores e contusões dolorosas em geral (SAAD et al, 2018).

Várias espécies do gênero *Mikania* recebem a denominação de “guaco”, como a *Mikania glomerata* e a *Mikania laevigata*, que são amplamente utilizadas pela população e apresentam semelhanças morfoanatômicas sendo comercializadas indistintamente, ambas as espécies são nativas do Brasil (COUTINHO; GONÇALVES; MARCUCCI, 2020). De acordo com os autores, o guaco tem sua distribuição como espécie nativa do sudeste ao sul do Brasil sendo bastante conhecido pelos índios brasileiros que utilizavam a planta para combater veneno de serpentes.

A espécie *Mikania glomerata* (Figura – 1) foi incluída na 1ª Edição da Farmacopeia Brasileira (1929), algumas culturas eram reconhecidas pelas propriedades medicinais das substâncias amargas por estimularem a função digestiva, estas eram conhecidas por “aperitivos” no início do século XX, portanto, a primeira edição da FB, em sua grande parte, estão presentes espécies amargas.

Pela medicina tradicional, os amargos são considerados refrescantes, por isso algumas vezes são úteis em febres e inflamações. As plantas usadas como amargas estimulam diretamente a mucosa do trato gastrointestinal superior e especialmente os receptores para o sabor amargo presentes na língua. Como sua ação se inicia na boca, devem ser degustadas para que estimulem a secreção de saliva e sucos gástricos, promovendo o apetite e facilitando a digestão (SAAD et al, 2018, p. 37).

Figura 1 – *Mikania glomerata*



Fonte: CARVALHO (2019)

Segundo Gasparetto *et al* (2009), a espécie *M. laevigata* teve a monografia incluída na FB em 2005, apesar do reconhecimento das propriedades de suas folhas, outras partes dos produtos comercializados como os caules e até inflorescências. Recentemente, a *M. glomerata* e *M. laevigata* foram incluídas no Formulário de Fitoterápicos da FB instituída pela RDC n° 463 de 2021.

A *Mikania laevigata*, popularmente conhecida por guaco, é uma espécie medicinal conhecida pela sua eficácia broncodilatadora e relaxante da musculatura lisa, além de possuir atividade antimicrobiana, anti-inflamatória, antiúlcera e anticâncer comprovada cientificamente. Na América do Sul, medicamentos fitoterápicos contendo extratos de *M. laevigata* são comercializados com diversas indicações terapêuticas (SIMÕES, 2017). De acordo com Jain e Himanshu (2012) estudos evidenciaram a combinação cumarina/troxeutina como terapia para a proteção das glândulas salivares e mucosas em pacientes em radioterapia, atuando ainda como anticoagulantes.

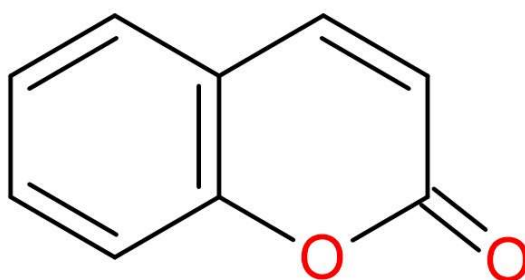
O guaco é indicado como expectorante e broncodilatador, foi constatado que alguns extratos secos de guaco podem interagir sinergicamente *in vitro* com alguns antibióticos como a penicilina, vancomicina, tetraciclina, cloranfenicol e gentamicina (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017).

Diversos estudos evidenciaram a presença de metabólitos secundários de várias classes químicas isolados de seus extratos e identificados. Sendo sua eficácia no tratamento de distúrbios respiratórios associada à presença da cumarina 1,2-benzopirona (Figura 2) (SIMÕES, 2017). A cumarina ocorre em apenas 20% das espécies *Mikania* e sua principal

ocorrência se dá nas espécies *M. laevigata*, *M. glomerata* e *M. micranta* (COUTINHO; GONÇALVES; MARCUCCI, 2020).

Segundo Souza (2005), em 1820 Vogel isolou pela primeira vez que a 1,2-benzopirona da planta *Coumarouna odorata* desde então as cumarinas foram reconhecidas como produtos naturais, sendo mais de 1300 cumarinas identificadas de fontes naturais, pela qual suas propriedades farmacológicas dependem dos padrões de substituição na estrutura base da cumarina 1,2-benzopirona.

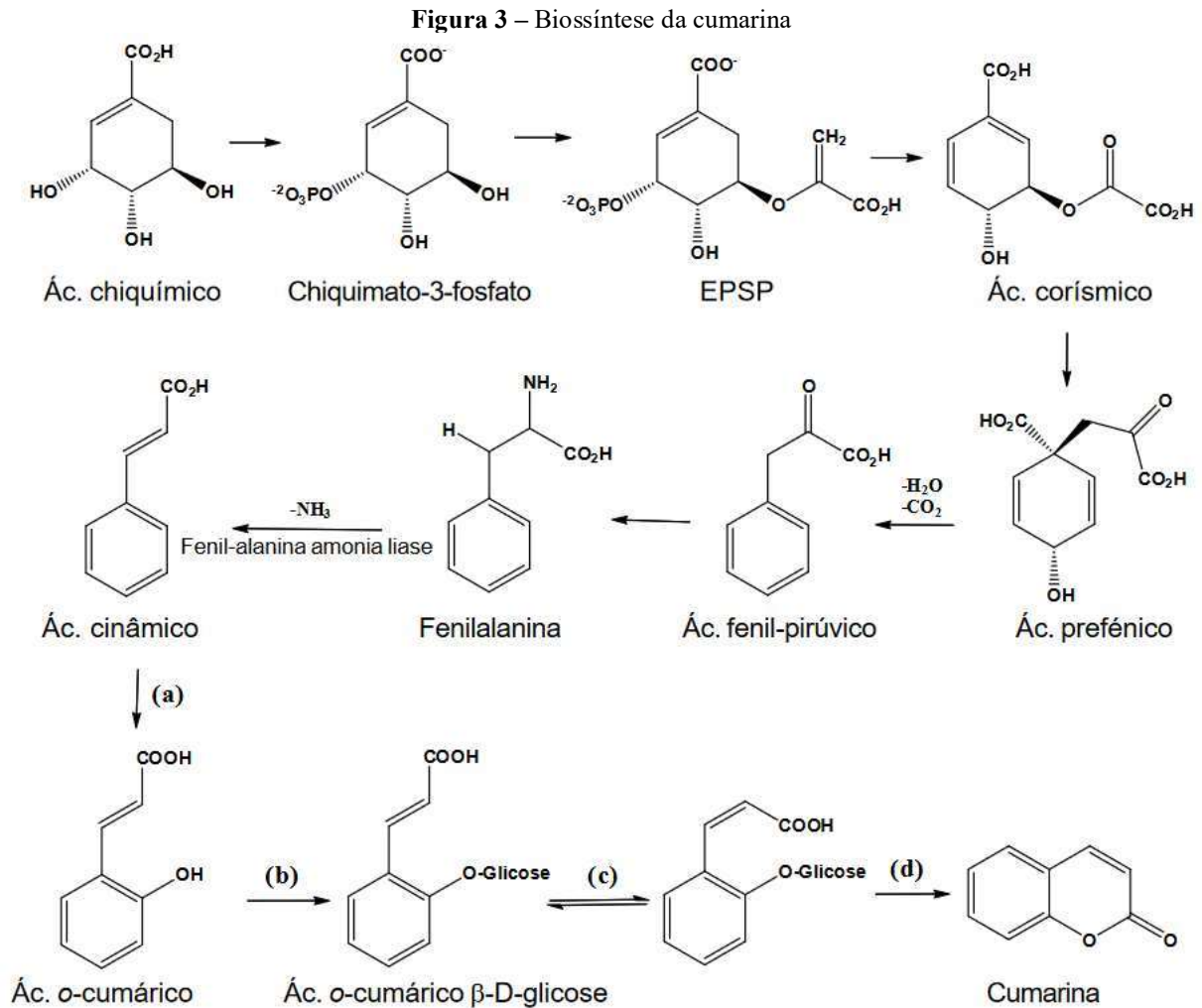
Figura 2 – Estrutura 1,2-benzopirona obtida empregando o Software ChemSketch



Fonte: Autoria própria

As cumarinas são metabólitos secundários biossintetizados a partir do ácido cumárico, um derivado da fenilalanina. Consistem em benzoalfapironas (lactonas do ácido O-hidroxicinâmico) que apresentam um grupamento hidroxila ou metoxila, apresentam odor característico de baunilha e sua produção ocorre através da ação enzimática após a coleta e secagem (ABREU; SANTOS; KAISER, 2007).

A via de biossíntese (Figura – 3) a partir do ácido cinâmico apresenta quatro tipos de reações enzimáticas, sendo elas a hidroxilação aromática, O-metilações, ligações a Coenzima-A e reduções de NADPH. Na qual o ácido o-cumárico é originado a partir da hidroxilação do ácido cinâmico na posição orto da cadeia lateral do anel benzênico. Em seguida, o ácido o-cumárico sofre glicosilação seguido de isomeração *cis/trans*, essencial ao processo de lactonização para formação da 1,2-benzopirona (DIAS, 2015). As cumarinas conferem as plantas efeitos essenciais para a fisiologia de modo que atuam como antioxidante e inibidor enzimático. Além de atuar no controle do crescimento, na respiração, fotossíntese e também na defesa contra infecções (FRANCO et al, 2021).



A cumarina 1,2-benzopirona já foi utilizada para aromatizar inúmeros medicamentos, bem como perfumes, manteigas e até mesmo o tabaco. Muitos produtos de banho, loções corporais, produtos de banho, cremes faciais, fragrâncias em creme, sabonetes, entre outros produtos apresentam cumarinas como fragrância em sua composição (SOUZA, 2005).

Algumas cumarinas tem características antioxidantes apresentando bons resultados contra a doença de chagas. As cumarinas sintéticas derivadas da seselina possuem inclusive atividade potencial contra o HIV (MAIOR, 2020). Entre as rotas metabólicas, a origem dos metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose via dois intermediários principais, sendo o de interesse deste estudo, o do ácido chiquímico – precursor de alcaloides derivados dos aminoácidos aromáticos, fenilpropanoides e cumarinas (SAAD et al, 2018). Além disso, de acordo com os autores:

As cumarinas também inibem a agregação plaquetária, promovem o relaxamento da musculatura lisa e cardíaca, possivelmente devido à inibição das enzimas fosfodiesterases cAMP e GMPC e do influxo do cálcio, como os presentes no gênero

Angelica [*Angelica archangelica* L. e *Angelica sinensis* (Oliv.)]. A atividade broncodilatadora do guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) se deve à presença dessa classe de substâncias que podem atuar por meio da estimulação direta dos canais de cálcio ativados por potássio, assim como alterações na concentração intracelular de cálcio, uma vez que esse íon está diretamente envolvido nas contrações do músculo liso (SAAD, 2018, p. 42).

Entre as patologias tratadas através do uso de plantas medicinais, estão incluídas principalmente aquelas associadas ao sistema respiratório, bastante comuns no cotidiano. As atividades antissépticas, expectorantes, broncodilatadoras e imunomoduladoras estão presentes em diversas espécies. Em situações agudas de rinofaringites, gripes, sinusites, traqueobronquites e laringites, essas plantas de fácil acesso passaram a agregar valor na profilaxia e no tratamento (MAIOR et al, 2020).

O resfriado é uma patologia respiratória causada por agentes como rinovírus, adenovírus e vírus *parainfluenza*, os sintomas consistem em obstrução nasal, coriza com secreção clara, cefaleia, febre baixa e prurido nasal e na garganta. A gripe por sua vez é causada pelo vírus *influenza* e provoca manifestações respiratórias mais intensas levando a um grande mal-estar provocando sintomas como febre alta, sudorese, cefaleia, dor de garganta, tosse, secreção amarelada, entre outras. Algumas plantas são recomendadas para o tratamento, uma das sugestões de formulação consiste em xaropes contendo tintura de guaco, poejo e laranja-da-terra a 5% e de própolis 2%. No caso de asma e rinite que são caracterizadas por processos imunológicos semelhante, resultado da exposição ambiental a alérgeno e irritantes, bem como tendência genética, as manifestações asmáticas podem ser classificadas de acordo com os sintomas que consistem em dispneia, tosse, secreção (clara ou amarelada), pulso (fraco ou forte), face avermelhada, etc. O tratamento da asma consiste no controle dos sintomas e a prevenção de exacerbações, a *Mikania glomerata* (guaco), por sua ação broncodilatadora e anti-inflamatória, ajuda a modular a resposta inflamatória quando as formulações prescritas são administradas diariamente (SAAD et al, 2018). As infecções no trato respiratório podem durar até dez dias e o tratamento é direcionado para amenizar os sintomas (CECHINEL FILHO; ZANCHETT, 2020).

A parte utilizada da *Mikania laevigata* consiste nas folhas, sua origem é do sul e sudeste do Brasil, as propriedades organolépticas são: aromática, tônica e amarga. Contém taninos, óleo essencial com destaque para diterpenos tipo caurano e sesquiterpenos, ácido benzóico, saponinas e cumarinas (1,2-benzopirona) (SAAD et al, 2018).

Além da atividade broncodilatadora, a cumarina e o ácido cumarínico possuem efeito anti-inflamatório em pneumonias alérgicas e atividades antibacterianas e antialérgica devido a seus demais compostos bioativos (ABREU; SANTOS; KAISER, 2007). Em um estudo realizado por Souza (2005), a atividade antibacteriana de cumarinas simples, preniladas e furanocumarinas foi avaliada contra linhagens como *Escherishia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas aeruginosa*, na qual o autor observou atividade da 1,2-benzopirona contra todas as espécies mencionadas, principalmente contra cepas Gram-negativas.

Entre as contraindicações são incluídas em casos hipertensos graves, gravidez e hepatopatias crônicas, além disso possui precauções de modo que pode ocorrer interações com o uso de medicamentos anticoagulantes, levar o aumento do fluxo menstrual e causar vômitos e diarreias em altas doses. O uso crônico pode ainda levar ao aumento do tempo de protrombina por inibição da vitamina k (LUCETTI, 2010). A tabela – 1 apresenta a posologia a partir da *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata*.

Tabela 1 – *Mikania glomerata* e *Mikania laevigata*: Posologias e doses admitidas

Espécie	Fórmula	Modo de uso
<i>Mikania glomerata</i> Spreng	Preparação extemporânea: 0,4 a 0,6 g de folhas + água q.s.p. 150 mL	Tomar 150 mL do decocto, logo após o preparo, duas a três vezes ao dia.
	Tintura: 10 a 20 g de folhas + álcool etílico 70% q.s.p. 100 mL	Tomar 1,0 a 3,0 mL da tintura, diluídos em 50 mL de água, três vezes ao dia.
	Xarope: 10 mL de Tintura de guaco a 20% + Xarope simples q.s.p. 100 mL	Tomar 15 mL do xarope, 3 vezes ao dia
<i>Mikania laevigata</i> Sch.Bip. ex Baker	Preparação extemporânea: 0,4 a 0,6 g de folhas + água q.s.p 150 mL	Tomar 150 mL do decocto, logo após o preparo, duas a três vezes ao dia
	Tintura: 10 a 20 g de folhas + álcool etílico 70% q.s.p. 100 mL	Tomar 1,0 a 3,0 mL da tintura, diluídos em 50 mL de água, três vezes ao dia.
	Xarope: 10 mL de Tintura de guaco a 20% + Xarope simples q.s.p 100 mL	Tomar 15 mL do xarope, 3 vezes ao dia.

Fonte: Adaptado de Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (2021)

É possível observar que para ambas as espécies a fórmula empregada e o modo de uso é o mesmo. Além disso, de acordo com o Formulário de Fitoterápicos da FB (2021), as fórmulas acima mencionadas são contraindicadas durante a gestação, lactação e para menores de 18 anos, devido à falta de dados adequados que comprovem a segurança nessas situações. O uso da

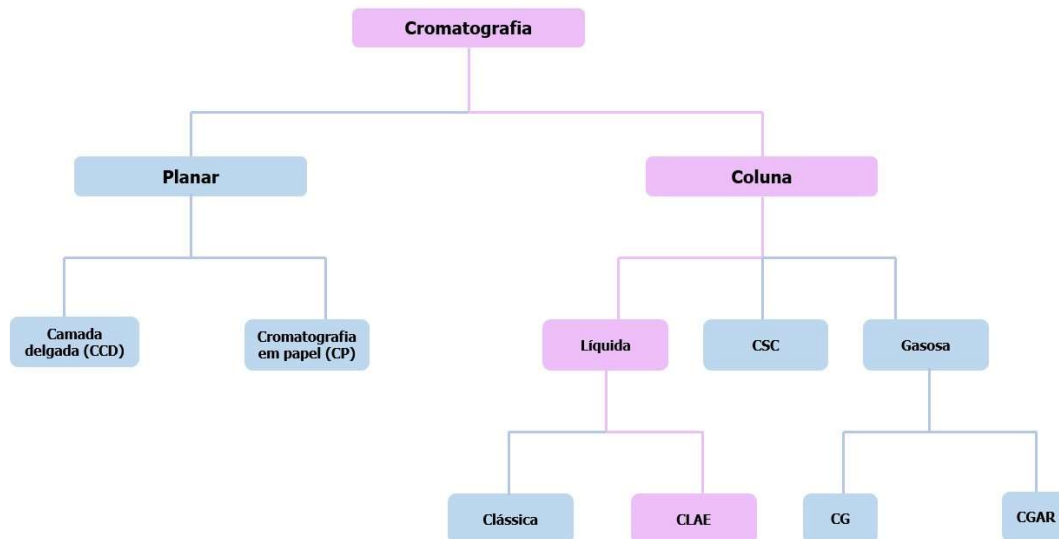
preparação de tintura também é contraindicado para alcoolistas e o xarope é contraindicado para diabéticos em função do teor alcoólico na formulação. O uso contínuo não deve ultrapassar 15 dias.

3.3 A CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

A cromatografia é um método físico-químico bastante utilizado devido à facilidade de separar, identificar e quantificar uma diversidade de espécies químicas, a separação ocorre através da distribuição dos componentes de uma mistura em duas fases, uma fixa e de área superficial denominada de fase estacionária e um fluido que percola através da fase estacionária denominada fase móvel (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Os critérios utilizados para a classificação das técnicas cromatográficas variam de acordo o tipo de estudo, os mais comuns envolvem o mecanismo de separação, a técnica empregada e o tipo de fase móvel utilizada (LANÇAS, 2016). A cromatografia líquida engloba diversas técnicas (Figura 4).

Figura 4 – Fluxograma de diferentes tipos de cromatografia



Fonte: Adaptado MATOS (2015)

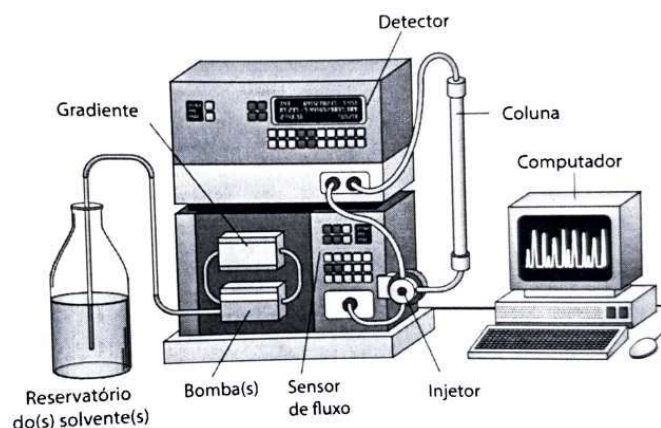
As fases quimicamente ligadas são separadas reagindo-se alguns grupos hidroxílicos que se encontram na superfície do sólido, normalmente a sílica, com grupos alquilas. Na maioria das fases estacionárias, os grupos disponíveis para interação com os compostos da amostra são cadeias longas de alquila, que funcionam como líquido apolar e regiões da superfície sólida com pontos ativos interfaciais. Sendo assim, o mecanismo de separação nessas

fases é uma mistura de partição e adsorção e suas contribuições dependem dos grupos funcionais. Esse tipo de fase é uma forma bastante representativa da cromatografia líquida em coluna (CLFL), sendo também empregada em outras técnicas (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A princípio, dois sistemas diferentes podem ser caracterizados por fases estacionárias (coluna) e móveis (solvente) diferentes: a cromatografia de fase normal utiliza fases estacionárias polares (SiO_2 ou Al_2O_3) e fases móveis apolares (hexano, acetato de etila), ao passo que a cromatografia de fase reversa, do inglês, *reverse phase* (RP), utiliza fases móveis relativamente polares como metanol e água, que são menos tóxicas e de menor custo, além de outras vantagens como rapidez nas análises, vasta aplicação, boa repetitividade de tempos de retenção e equilíbrio rápido da coluna após mudança da fase móvel (CAMPBELL-PLATT, 2015).

A fase móvel desempenha um papel importante, de modo que sua composição é fundamental para o processo de separação, além disso deve ter alta pureza, visto que as impurezas da fase móvel podem ser detectadas nas condições empregadas diminuindo a detectabilidade do detector sob condições isocráticas, causar flutuações grandes na linha de base, aparecimento de picos artefatos em eluição por gradiente e ainda obstruir as conexões capilares do sistema, além disso, é importante que a amostra seja solúvel na fase móvel e não sofra decomposição, para que os componentes não sejam modificados a medida que são transportados através da coluna, quando possível, o solvente da amostra é a própria fase móvel para que não sofra precipitação no injetor ou na coluna (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). Quando a fase móvel está sob pressão, a metodologia é conhecida por cromatografia líquida de ultra eficiência (*high performance liquid chromatography*) (ANDRIOLO, 2019).

Figura 5 – Diagrama ilustrativo dos componentes de um cromatógrafo líquido moderno



Fonte: LANÇAS (2016)

O detector mede de forma contínua a propriedade física ou físico-química da amostra e envia um sinal para registro, geralmente diretamente proporcional à concentração do componente da amostra, esse sinal é gerado assim que o eluente sai da coluna e chega ao detector (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). O tipo de detector usado depende do analito que se pretende investigar. Se o analito absorve luz na região de UV/Vis, um detector UV ou um detector de arranjo de diodo, do inglês, *diode array detector* (DAD) pode ser utilizado (LANÇAS, 2016). O DAD permite identificar espectros das espécies da amostra presentes no eluente com diferentes comprimentos de onda durante a análise.

O DAD apresenta diversas vantagens como a aquisição de espectros tridimensionais, mostrando a absorbância, comprimento de onda e tempo de retenção; é possível obter e armazenar os espectros de absorbância de cada pico durante a corrida; apresenta melhor detectabilidade e é possível eliminar picos interferentes devido a capacidade de selecionar comprimentos de onda de máxima absorbância em cada composto presente; é possível ainda determinar a pureza dos picos (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Os primeiros relatos do acoplamento entre a cromatografia líquida de alta eficiência com a espectrometria de massas foram apresentados do início dos anos 1970. Inicialmente, o foco esteve direcionado no desenvolvimento de interfaces, de modo que o objetivo consistia em solucionar problemas de incompatibilidade entre o sistema líquido da cromatografia com o sistema em alto vácuo do espectrômetro de massas (CASS; CASSIANO, 2015).

Em sistemas cromatográficos, alguns pontos fundamentais devem ser observados, na qual precisa passar pelo processo de validação que deve seguir critérios como a seletividade. Quanto maior a seletividade, maior o potencial de discriminação dos analitos em estudo. A linearidade indica a faixa linear do sistema, onde o sinal do detector deve ser diretamente proporcional à concentração do analito. A exatidão que é determinada mediante os resultados de linearidade, etc (SKOOG, 2014).

Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) são fatores importantes para se determinar em cromatografia, segundo a RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, o limite de detecção é definido como a menor quantidade de um analito presente em uma amostra capaz de ser detectado, contudo nem sempre é possível a quantificação do mesmo sob as condições do método proposto. O limite de quantificação por sua vez, pode ser determinado através da análise de soluções de concentrações conhecidas até um nível menor dos padrões empregados.

Outros fatores devem ser observados ao desenvolver uma metodologia para determinação de analitos em cromatografia, como por exemplo, o tempo de retenção, que é

característico para cada componente analisado e determina com precisão qual espécie está sendo analisada e medida. A validação visa diminuir ou controlar os fatores que levam a imprecisão ou inexatidão de um dado apresentado (LANÇAS, 2016), ela deve ser realizada para assegurar que, nas condições em que será utilizado, forneça os resultados esperados (ANDRIOLO, 2019). Segundo o anexo da Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da ANVISA que publica o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” disposto no Art. 1:

Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (BRASIL, 2003, Art. 1).

A Análise de Variância (ANOVA) constitui uma ferramenta estatística para avaliar as distribuições dos dados sobre a variância. Segundo Vieira (p. 216, 2014) “é o método mais eficiente para o estudo da variação de um sistema de medição”. A partir dela é possível verificar se as amostras exercem algum efeito significativo que leva a sobreposição de componentes aleatórios e conseqüentemente gerando diferenças entre os mesmos.

Além disso, é importante reforçar que o preparo da amostra é considerado uma etapa de extrema importância em Cromatografia, sendo um requisito para aumentar a seletividade e a detectabilidade do método, já que é capaz de eliminar grande parte dos interferentes em amostras e também concentra os analitos em fase líquida ou sólida (MOREAU; SIQUEIRA, 2017).

A espectroscopia no ultravioleta é a principal técnica tanto para a detecção quanto para o monitoramento da pureza de derivados flavônicos durante os processos de isolamento. Possuem espectros de absorção característicos no ultravioleta, determinados pelo núcleo comum da benzopirona, com dois máximos de absorção: um ocorrendo entre 240 e 285 nm (banda II) e outro entre 300 e 400 nm (SIMÕES, 2017, p. 226).

Em um estudo realizado para avaliar os efeitos de polietilenoglicólis no perfil dos extratos de *Mikania glomerata* Spreng, foi observada eficiência na extração na qual o teor da cumarina 1,2-benzopirona foi determinado por HPLC utilizando como fase móvel acetonitrila/água (40:60 v/v), com fluxo 1 mL/min empregando uma coluna C₁₈, a uma temperatura de 18°C e detecção em 274 nm (MEDEIROS; KANIS, 2010). Outro estudo realizado por Baggio (2014) na qual consistiu em avaliar a influência da temperatura no

processo de extração de cumarinas, foi empregada a caracterização dos extratos por HPLC com detector de arranjo de diodos com espectros UV em um intervalo de 230-400 nm. Outros estudos evidenciam o desenvolvimento de métodos cromatográficos empregando HPLC para quantificação de extratos como o Santos (2005), entre outros.

4. METODOLOGIA

4.1 LIMPEZA DE VIDRARIAS

Inicialmente foi realizada a lavagem das vidrarias, na qual foram imersas em uma solução diluída contendo Triton X-100 da Sigma Aldrich, que consiste em um surfactante não iônico. Após esse procedimento, as vidrarias foram lavadas utilizando água deionizada obtida em sistema de purificação de água Mili-Q (Milipore), sendo empregada também na preparação de padrões e amostras, além da corrida cromatográfica. As vidrarias foram submersas em uma solução de lavagem composta de água deionizada/MeOH/ACN 1:1:1 por 24 horas. As vidrarias volumétricas foram secadas a temperatura ambiente e as demais foram secadas na estufa a uma temperatura de 60 °C conforme a disponibilidade do equipamento.

4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÃO E DE TRABALHO

O padrão de alta pureza de 1,2-Benzopirona utilizado foi da marca Sigma-Aldrich e os solventes acetonitrila e metanol foram da marca J.T Baker, todos de grau HPLC. A partir do padrão de alta pureza, foi preparada uma solução padrão estoque de cumarina (1000 mg L^{-1}) a partir da dissolução de uma determinada massa de cumarina em volumes de acetonitrila e água (40:60 v/v). Em seguida, estoques intermediários de 100 e 50 mg L^{-1} foram preparados a partir de diluições em ACN:H₂O (40:60 v/v) da solução estoque que foram posteriormente utilizados para o preparo das soluções padrão de trabalho. O preparo das soluções padrão de trabalho (10 mL) foi realizado por diluição adequada com acetonitrila e água (40:60 v/v) a partir das soluções estoque intermediárias, em sete níveis de concentração variando de 0,5 a 8,0 mg L^{-1} . Todo o conjunto de soluções padrão de trabalho foi preparado em triplicata. Os solventes utilizados na fase móvel foram desgaseificados a 25 °C durante 20 minutos em um banho ultrassônico.

4.3 PREPARO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas onze amostras de xarope de guaco para este estudo as quais possuíam diferentes lotes e fabricantes. As concentrações de cumarina nessas amostras variaram entre 25

e 300 mg L^{-1} . As amostras foram adquiridas em estabelecimentos farmacêuticos nos municípios de João Pessoa – PB e Barreiras – BA. As onze amostras de xarope de guaco foram diluídas com a proporção de acetonitrila e água (mesma fase móvel do método cromatográfico) até que obtivessem uma concentração teórica de 4 mg L^{-1} para a obtenção dos valores de referência. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas empregando um aparelho vórtex da marca Scientific Industries Genie 2, modelo G560. Em seguida, as amostras foram filtradas em um filtro seringa com poro de tamanho de $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ antes de serem injetadas no cromatógrafo com o intuito de evitar a obstrução no sistema cromatográfico. Todas as amostras foram preparadas em triplicata, sendo armazenadas em frasco âmbar e refrigeradas a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento de serem utilizadas.

4.4 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Para a obtenção dos valores de referência das amostras de xarope de guaco foi utilizado um equipamento para HPLC Dionex Technologies modelo *ultimate* 3000, equipado com bomba quaternária, modelo LPG-3400SD, um compartimento de coluna, modelo TCC-3000SD, um detector, modelo DAD – 3000 que opera com arranjo de fotodiodos. Possuindo injetor manual com um volume de injeção (loop) fixo de $20 \text{ }\mu\text{L}$ e uma coluna C_{18} de fase reversa da marca Phenomenex.

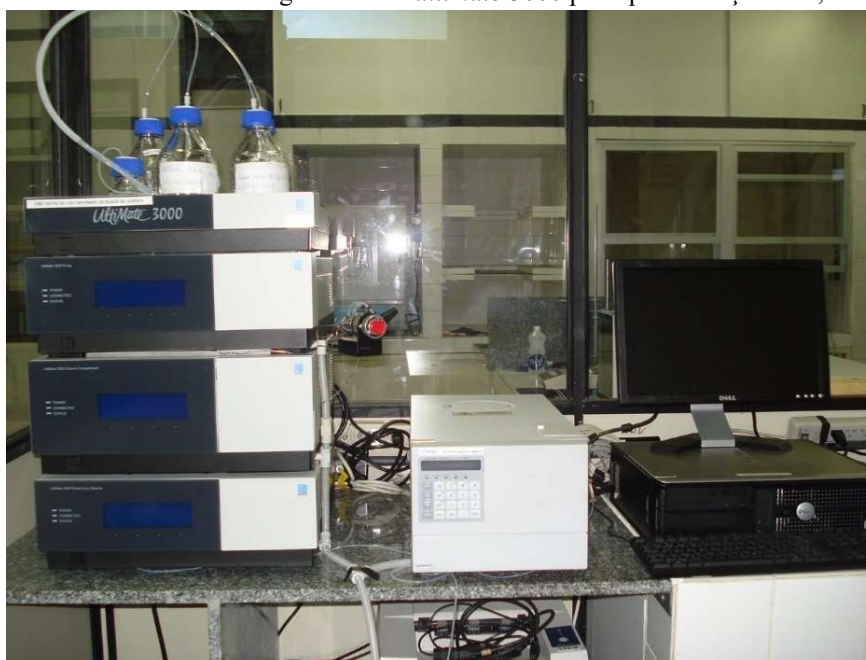
Os parâmetros cromatográficos utilizados foram conduzidos de acordo com a metodologia empregada por Medeiros e Kanis (2010). Na qual consiste em um método HPLC-DAD, o tipo de eluição utilizado foi no modo isocrático, ou seja, a constituição do solvente permaneceu constante durante toda a corrida cromatográfica. A composição da fase móvel utilizada consiste em água/acetonitrila (40:60 v/v) com vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura no forno cromatográfico foi fixada em $30 \text{ }^\circ\text{C}$.

A fase estacionária utilizada consiste em uma coluna C_{18} de fase reversa, empregada para separação de compostos orgânicos, com comprimento de 250 mm , diâmetro interno de $4,60 \text{ mm}$ e tamanho da partícula de $5 \text{ }\mu\text{m}$. A aquisição dos dados foi efetivada através do *software* ChromeleonTM, versão 6.80 (DIONEX CA).

4.5 ANÁLISE DAS AMOSTRAS NO CROMATÓGRAFO

Antes de submeter as amostras à análise por HPLC, as soluções foram filtradas em filtros-seringa de 0,45 μm de porosidade para evitar a obstrução na pré-coluna e coluna cromatográfica. As amostras foram injetadas no equipamento para HPLC Dionex Technologies modelo *ultimate* 3000 equipado com bomba quaternária (Figura 6). O equipamento possui injetor manual com volume de injeção fixo de 20 μL .

Figura 6 – HPLC Dionex Technologies modelo *ultimate* 3000 para quantificação de 1,2-benzopirona



Fonte: Aatoria Própria

As amostras foram armazenadas em frascos âmbar para evitar a possível degradação dos analitos pela luz. De acordo com Czelusniak e colaboradores todas as substâncias produzidas pelas plantas estão envolvidas com a fotossíntese e, portanto, existe uma relação entre a intensidade da luz e a produção de metabólitos secundários. O teor de cumarina apresenta alterações significativas com relação às variações na intensidade da luz.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE 1,2-BENZOPIRONA POR HPLC-DAD

De acordo com a Resolução n° 166, de 24 de julho de 2017 da ANVISA, que determina a publicação do Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, a metodologia será considerada validada, desde que sejam avaliados parâmetros como: Seletividade, linearidade, precisão, sensibilidade (limite de detecção), limite de quantificação e exatidão. As medidas

foram realizadas em triplicatas autênticas tornando possível validar as curvas analíticas por meio da ANOVA e, portanto, verificar a falta de ajuste do modelo e a significância da regressão.

A sensibilidade (LOD) consiste na relação entre o sinal produzido e a quantidade de amostra que gera esse sinal. É medida pelo ângulo de inclinação da tangente à curva analítica, quanto maior o ângulo, maior é a sensibilidade. Explicando o porquê de a mesma quantidade levar a uma resposta maior do detector e conseqüentemente maior área ou altura do pico (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

4.6.1 Seletividade e Linearidade

A seletividade consiste na capacidade que o método tem de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz (SKOOG, 2014). Segundo o autor, alteração na fase móvel, temperatura da coluna e composição da fase estacionária pode levar a variações na seletividade.

Na metodologia empregada utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência, a seletividade foi determinada utilizando soluções padrões de cumarina para a construção de uma curva de calibração nas seguintes concentrações: 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 4,0; 6,0 e 8,0 mg L⁻¹. O mesmo foi realizado para verificar a linearidade da metodologia utilizada empregando padronização externa com os sete níveis de concentração.

A linearidade consiste em um intervalo no qual a resposta do detector é diretamente proporcional (desvio de 5%) à concentração da amostra (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

A curva de calibração de cada componente é determinada através da análise de misturas padrões injetando-se um determinado volume. Em seguida, o mesmo volume da amostra é injetado para a obtenção da concentração do analito através da curva de calibração.

4.6.2 Precisão e Exatidão

De acordo com a RE n° 899 de 2003, a precisão é a avaliação mediante a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Sendo considerados três níveis: baixo, intermediário e alto, dentro da faixa de concentração estudada. Para avaliar a precisão foram utilizadas soluções de cumarina em

concentrações baixa, média e alta (1,0 mg L⁻¹, 4,0 mg L⁻¹ e 8,0 mg L⁻¹ respectivamente. Todas as medidas foram realizadas em triplicata e os resultados são avaliados em termos de coeficiente de variação, dado pela equação a seguir:

$$C_v = \frac{S}{\bar{X}} 100$$

O Coeficiente de variação é baseado na razão entre o desvio padrão (S) e a média aritmética do conjunto de dados (\bar{X}).

A exatidão de um método consiste na proximidade dos resultados obtidos pelo método estudado com relação ao valor verdadeiro. Para avaliar a exatidão, foram utilizadas as soluções nas concentrações mencionadas através da relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração experimental}}{\text{Concentração teórica}} 100$$

4.6.3 Limite de detecção e quantificação

A partir do desvio-padrão das leituras da solução H₂O/ACN na proporção 40:60 (v/v) e a inclinação da reta, os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram estimados. As equações empregadas no cálculo dos LOD e LOQ baseado em parâmetros da curva analítica:

$$LOD = \frac{D_p \times 3}{\beta}$$

$$LOQ = \frac{D_p \times 10}{\beta}$$

Na qual: D_p e β correspondem ao desvio padrão do sinal do branco e a inclinação da curva analítica estimada por regressão linear empregando o método dos mínimos quadrados respectivamente.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

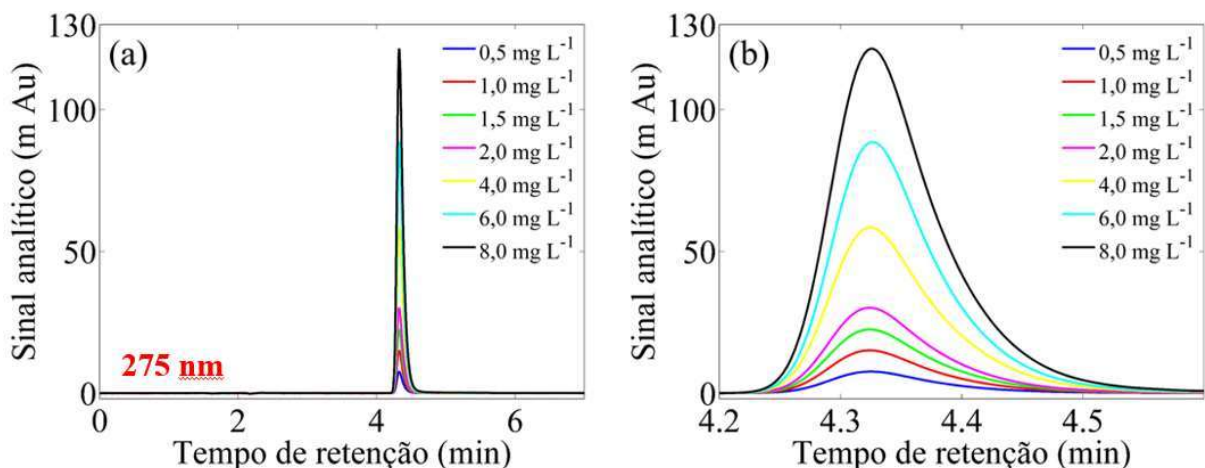
5.1 AVALIAÇÃO DAS CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISE

O mecanismo de separação neste método é baseado nas diferentes solubilidades na fase móvel e na fase estacionária. Não foi realizada etapa de extração, apenas diluição em ACN:H₂O, filtração e injeção direta das amostras no cromatógrafo, o que confere vantagens no método utilizado. Isso porque o xarope é preparado a partir da tintura, onde é empregado etanol, que é responsável pela extração da 1,2-benzopirona na matéria prima vegetal. A fase móvel, portanto, dissolve e amostra sem que ocorra interação química entre elas, sendo ela mais polar que a fase estacionária (C18).

Os cromatogramas dos padrões de 1,2-benzopirona obtidos sob as condições de eluição descritas na metodologia podem ser observadas (Figura 7, 8 e 9). Na Figura 7 os picos cromatográficos da 1,2-benzopirona registrados em 275 nm apresentaram sinal analítico de maior magnitude, sugerindo que esse comprimento de onda é o mais adequado para construção da curva analítica. A posição dos picos no cromatograma é determinada pela velocidade da vazão da fase móvel e pelo fator de retenção.

Contudo, alguns constituintes presentes nos xaropes respondem em 275 nm ou em comprimentos de onda muito próximo. Dessa forma, os cromatogramas dos padrões de cumarina também foram registrados em 310 nm, como apresentado na Figura 8. Na Figura 9 é possível observar os espectros da 1,2-benzopirona nas concentrações utilizadas para construção da curva de calibração em cada um dos sete níveis de concentração.

Figura 7 – Cromatogramas registrado com um detector DAD em $\lambda=275$ nm



Fonte: Autoria própria

Figura 8 – Cromatogramas registrado com um detector DAD em $\lambda=310$ nm.

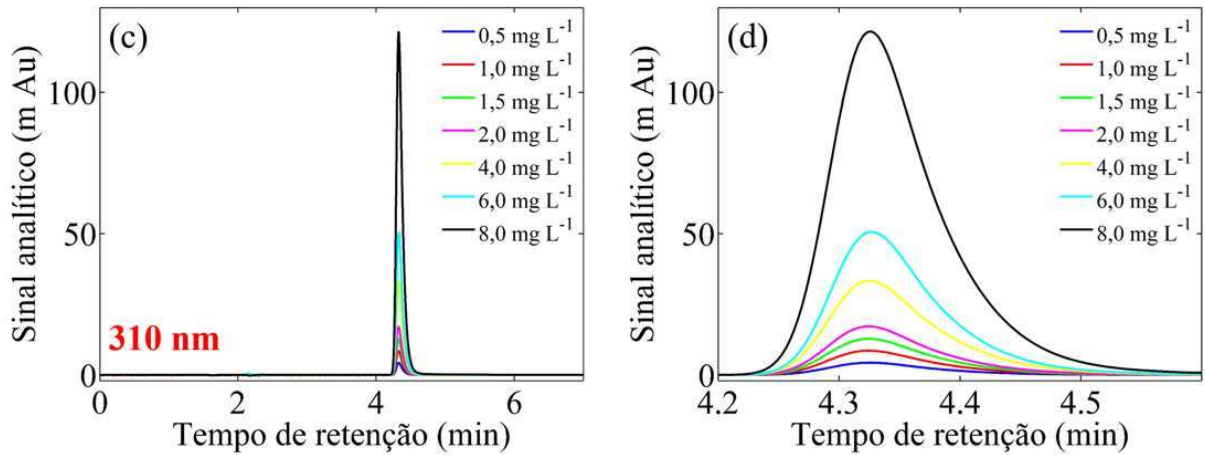
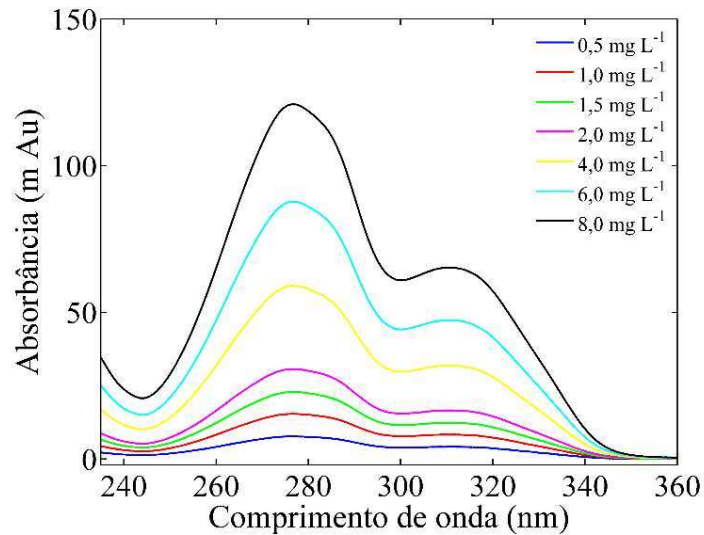


Figura 9 – Espectro registrado no detector de DAD de 240 a 360 nm.



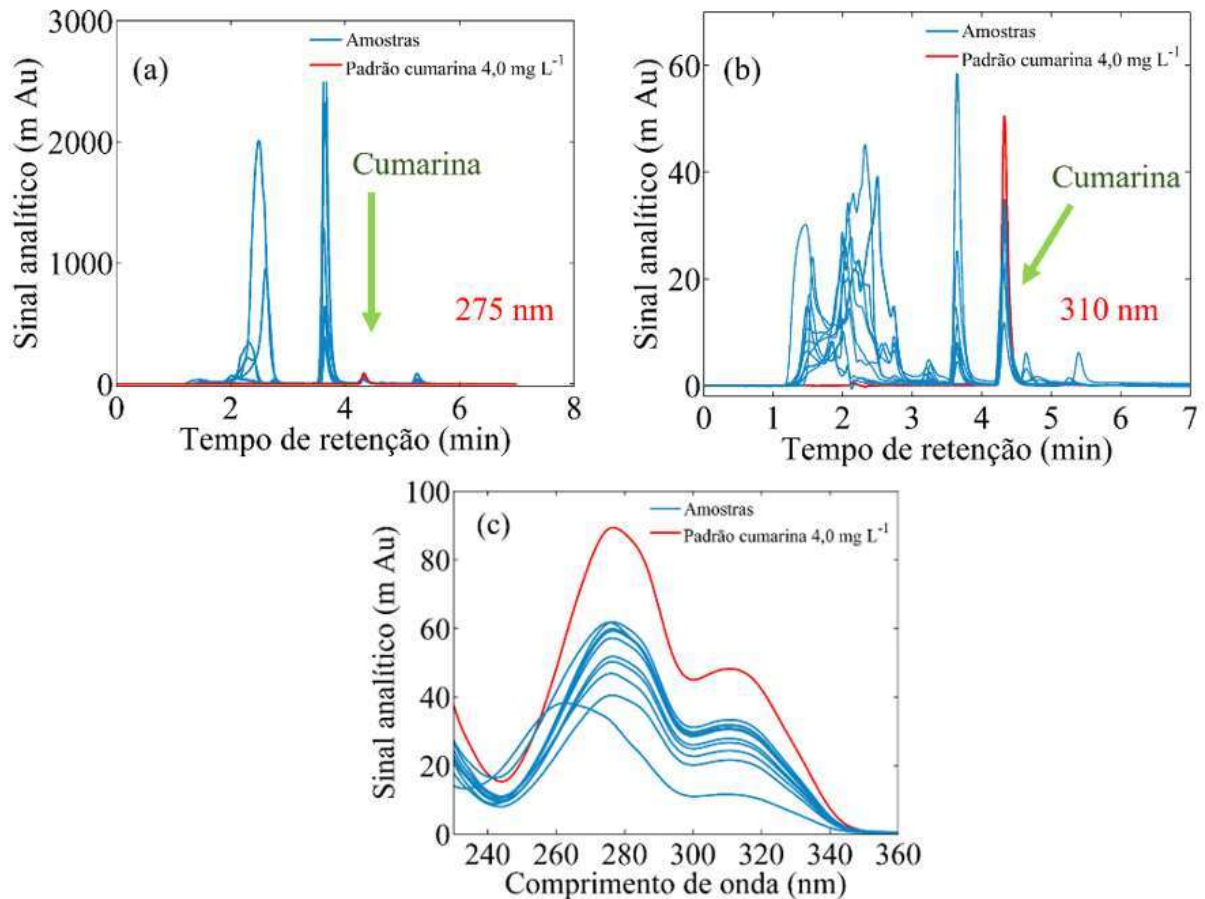
Fonte: Autoria própria

5.2 SELETIVIDADE

O teste de seletividade do método HPLC-DAD pode ser observado nos cromatogramas na Figura 10. Os picos cromatográficos da 1,2-benzopirona apresentaram sinal analítico de maior magnitude em 275 nm, sugerindo que esse comprimento de onda é o mais adequado para construção da curva analítica. Foi possível verificar que os demais constituintes da amostra apresentaram picos com intensidades de sinal bem maiores do que o pico do analito de interesse. Contudo, nos cromatogramas de todas as amostras o pico da 1,2-benzopirona obtido mostrou-se completamente resolvido, simétrico e sem sobreposição.

Nos cromatogramas registrados em 310 nm os picos referentes ao analito são mais intensos (Figura 8), contudo, apresentou baixa resolução com relação aos registrados em 275 nm devido a sobreposição de picos interferentes.

Figura 10 - Cromatogramas médio dos xaropes de guaco e padrão registrado com um detector DAD (a) $\lambda=275$ nm (b) $\lambda=310$ nm e (c) espectro de absorbância médio dos xaropes de guaco e padrão no detector de DAD de 240 a 360 nm.



Fonte: Autoria própria

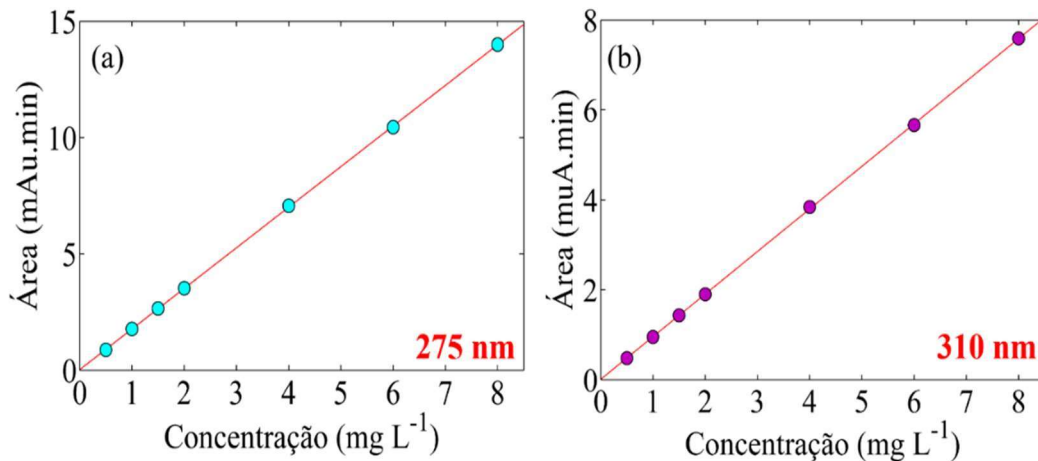
Avaliando os valores das áreas e os tempos de retenção, é possível afirmar que não existe evidências de que os constituintes presentes nos xaropes possam interferir nos picos do analito em ambos os comprimentos de onda utilizados. Ou seja, o método apresentou ótima resolução devido a distância entre os tempos de retenção e a largura da base avaliada.

Para comprovar a seletividade do método desenvolvido, os espectros de absorção molecular dos xaropes foram comparados com os espectros de uma solução padrão, onde foi possível verificar a similaridade entre as bandas de absorção dos xaropes com o espectro da solução padrão.

5.3 LINEARIDADE

A curva analítica para a 1,2-benzopirona foi obtida a partir de modelo de calibração relacionando a concentração dos compostos avaliados e as áreas dos picos cromatográficos. As construções dos modelos de calibração foram realizadas a partir da média das triplicatas autênticas. O comportamento linear entre a concentração de 1,2-benzopirona e as áreas do pico cromatográfico do conjunto de calibração em sete níveis de concentração para os comprimentos de onda 275 e 310 nm, podem ser observados na Figura 11 a seguir.

Figura 11 – Curvas analíticas obtidas para 1,2-benzopirona (a) em 275 nm e (b) em 310 nm, na faixa de concentração de 0,5 a 8,0 mg L⁻¹.



Fonte: Autoria própria

Os modelos lineares do conjunto de calibração foram obtidos empregando a regressão linear por mínimos quadrados usando medidas em triplicatas para cada nível de concentração. As equações das retas, a faixa linear dinâmica e os coeficientes de determinação linear das curvas analíticas da cumarina para os dois comprimentos de onda são apresentados na Tabela 2 a seguir.

Tabela 2 - Equações das retas ($y = ax + b$), faixa linear dinâmica e coeficientes de determinação (R^2) das curvas analíticas para a 1,2-benzopirona nos comprimentos de onda 275 e 310nm.

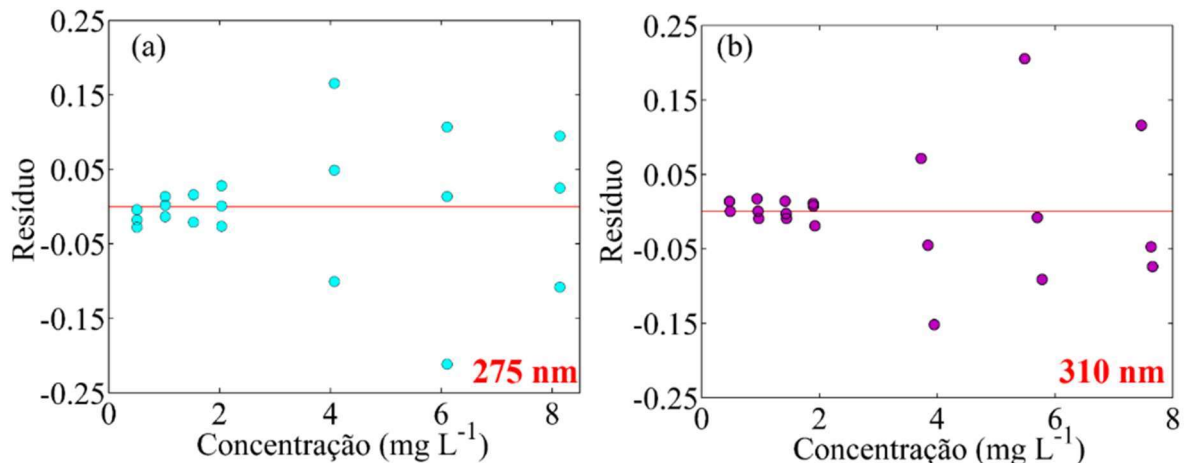
Cumarina	Faixa linear dinâmica (mg L ⁻¹)	Equação	R ²	Nº de pontos	Intervalo de confiança da média
275 nm	0,5 a 8,0	$y = 1.746*x + 0.02431$	0,9998	7	3,2857±0,0047
310 nm	0,5 a 8,0	$y = 0,9462*x + 0,0128$	0.9999	7	3,2857±0,0027

Fonte: Autoria própria

Foi possível observar que os resultados obtidos mostram a linearidade do modelo, sendo considerados satisfatórios. Tal afirmativa, foi corroborada com os valores de coeficiente de determinação que foram superiores a 0,99, em concordância com o preconizado pela ANVISA disposto na RE n° 899, de 29 de maio de 2003.

Os resíduos deixados pelos modelos construídos no comprimento de onda 275 e 310 nm são apresentados na Figura 12. Os gráficos dos resíduos não exibem nenhuma estrutura sistemática que evidencia uma eventual falta de ajuste e corrobora para linearidade dos modelos construídos. Em ambos os gráficos da Figura 12 é possível observar que não há presença de resíduos maiores ou menores que 0.25 e -0.25.

Figura 12 – Gráfico dos resíduos (a) obtido em 275 nm, (b) obtido em 310 nm na faixa de concentração de 0,5 a 8,0 mg L⁻¹.



Fonte: Autoria própria

5.4 PRECISÃO E EXATIDÃO

Para avaliar a precisão foram utilizadas soluções de 1,2-benzopirona em triplicata em concentrações baixa, média e alta (1,0 mg L⁻¹, 4,0 mg L⁻¹ e 8,0 mg L⁻¹) foram obtidos os dados na Tabela 3. Para a metodologia empregada, em termos de precisão, o coeficiente de variação não deve exceder 20%, na faixa admitida os valores não excederam 2%.

A exatidão foi avaliada conforme descrito na seção 4.6.2, as determinações foram realizadas em triplicata, todos os dados apresentaram excelentes valores (Tabela 3) de acordo com Resolução RE n° 116 de 2017 da ANVISA, na qual admite intervalos aceitáveis entre 80 a 120%.

Tabela 3 – Coeficientes de variação (Cv) obtidos para avaliação da precisão e exatidão do método HPLC-DAD

Cumarina	Nível de concentração	Precisão Cv (%)	Exatidão (%)
275 nm	baixa	1,39	98,9
	média	0,98	97,5
	alta	0,48	98,8

Fonte: Autoria própria

5.5 LIMITES DE DETECÇÃO E LIMITES DE QUANTIFICAÇÃO

O limite de detecção e quantificação foram calculados através das equações descritas. Os valores de LOD e LOQ encontrados para 275 e 310 nm foram 0.0124 e 0.0485 mg L⁻¹, respectivamente. Os valores de LOD e LOQ se encontra abaixo do primeiro ponto determinado na curva analítica (Tabela 5). Para avaliar as significâncias da regressão linear ($MQ_{regressão}/MQ_{residual}$) e da falta de ajuste ($MQ_{falta\ de\ ajuste}/MQ_{erro\ puro}$) na qual o modelo não descreve bem os dados. A partir do ponto de distribuição F, apresentadas na Tabela 3. Constatando-se que os modelos apresentam regressão linear significativamente alta, já que o $F_{calculado}$ é maior que F_{tab} , ou seja, a inclinação da reta está associada diretamente à variação da concentração de 1,2-benzopirona.

Tabela 4 - Dados obtidos na aplicação da ANOVA aos modelos de calibração da 1,2-benzopirona nos dois comprimentos de onda estudados.

Cumarina	Significância de R $MQ_{regressão}/MQ_{residual}$ $F_{tab}=4.381$	Falta de Ajuste MQ_{falta} de ajuste/ $MQ_{erro\ puro}$ $F_{tab}=2.958$	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
275 nm	23249,94	0,1984	0,0041	0,0124
310 nm	23698,58	0,26849	0,0160	0,0485
Resultados	Modelos adequados	Modelos adequados		

Fonte: Autoria própria

Foi possível afirmar que os modelos construídos com nível de confiança de 95% são lineares dentro das faixas de concentração aplicadas e possuem regressão linear significativamente elevada. Os dados de LDO e LOQ demonstram que o método é sensível para quantificação de 1,2-benzopirona presente nas amostras.

A partir da aplicação da ANOVA, é possível observar que os resultados obtidos na Tabela 5 corroboram com a validação dos modelos de calibração apresentados para 1,2-benzopirona nos comprimentos de onda 275 e 310 nm.

5.6 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CUMARINA EM AMOSTRAS DE XAROPE DE GUACO

O método desenvolvido foi aplicado para determinar o teor de 1,2-benzopirona em onze amostras de xaropes de guaco comerciais, os teores declarados de cumarina pelos fabricantes bem como os valores de 1,2-benzopirona encontrados, aplicando o referido método estudado podem ser observados na Tabela 5.

Tabela 5 - Teor de 1,2-benzopirona declarado e determinado em xaropes de guaco utilizando HPLC-DAD.

Amostras	Código	Teor declarado (mg L ⁻¹)	Teor obtido por HPLC-DAD (mg L ⁻¹)	
			275 nm	310 nm
1	(1)	88,2	113,1	77,45
2	(5)	88,2	136,50	93,98
3	(8)	62,25	95,49	65,42
4	(9)	25,0	0,58	0,31
5	(11)	25,0	34,42	24,66
6	(13)	300,0	448,46	317,63
7	(17)	83,14	116,16	79,40
8	(28)	35,2	31,61	12,71
9	(31)	35,0	45,31	32,21
10	(35)	80,0	119,91	82,73
11	(44)	35,0	44,84	30,86

Fonte: Autoria própria

A partir dos valores da Tabela – 5 é possível observar que o modelo construído em 275 nm sofre maior influência dos constituintes químicos presentes nos xaropes de guaco estudados, este apresentou valores superiores aos declarados pelos fabricantes dos xaropes, com exceção das amostras 4 e 8. Já o modelo construído em 310 nm apresenta valores de 1,2-benzopirona mais próximos aos declarados pelos fabricantes dos xaropes. Contudo, as amostras 4 e 8 exibiram teores de cumarina muito abaixo dos valores mencionados nos rótulos dos xaropes.

O teor de 1,2-benzopirona abaixo do estimado pelos fabricantes pode estar vinculado a falta de controle de qualidade da matéria prima, das condições de estocagem ou pode estar associado a perda resultante da estabilidade da cumarina e a falta de controle da qualidade do produto final.

No estudo desenvolvido por Radûnz et al (2012) foi verificado que níveis elevados de cumarina podem estar associados ao método de secagem, na qual a ação enzimática incontrolável e o crescimento de microrganismos podem ocorrer depois que as folhas são colhidas, alterando a composição química no tecido.

6 CONCLUSÕES

Os métodos quantitativos para a determinação da cumarina 1,2-benzopirona em xaropes fitoterápicos de guaco e demais produtos que o contém são baseados em grande parte em metodologias que utilizam a Cromatografia. Neste trabalho foi avaliado um método validado que utiliza a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a DAD, o método foi utilizado para quantificação de 1,2-benzopirona em onze amostras de xarope de guaco comercializados nas cidades de João Pessoa – PB e Barreiras – BA. De acordo com o presente estudo, foi possível perceber que o método se mostrou seletivo visto que, não apresentou picos interferentes para o componente nos comprimentos de onda os quais o analito de interesse absorve, 275 e 310 nm.

Entre as onze amostras avaliadas, duas apresentaram teores de 1,2-benzopirona muito abaixo dos valores mencionados nos rótulos dos xaropes, o que pode ocorrer por diversos fatores associados ao controle de qualidade, condições de estocagem como temperatura e umidade. O modelo construído em 275 nm sofre maior influência dos constituintes químicos que formam os xaropes de guaco estudados. Como resultado, na maioria das vezes modelo encontra valores superiores aos declarados pelos fabricantes dos xaropes, com exceção das amostras (9) e (28). Já o modelo construído em 310 nm apresenta valores de cumarina mais próximo aos declarados pelos fabricantes dos xaropes. Contudo, as amostras (9) e (28) exibiram teores de cumarina muito abaixo dos valores mencionados nos rótulos dos xaropes, portanto, é imprescindível o controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos.

Considerando o que foi observado neste trabalho é possível observar que a metodologia empregada constitui uma técnica sensível para quantificação de cumarinas em xaropes de guaco apresentando parâmetros cromatográficos favoráveis devido ao baixo tempo de retenção implicando em um tempo de corrida menor, além do uso de solventes de baixo custo com relação as demais metodologias empregadas que utilizam hexano entre outros solventes. É dispensável a etapa de extração o que torna o método mais rápido reduzindo a possibilidade de erros pelo analista.

Para estudos futuros e propostas futuras propõe-se verificar a presença da 1,2-benzopirona em xaropes em diferentes períodos afim de verificar se as mesmas poderiam apresentar redução dos analitos por perda da estabilidade da cumarina bem como outros fatores relacionados a estocagem. Como o ácido o-cumárico consiste em uma substância precursora da 1,2-benzopirona, seria interessante desenvolver e validar uma metodologia analítica para

avaliar a presença dessa espécie, já que alguns estudos evidenciam um tempo de retenção inferior ao da 1,2-benzopirona, indicando inclusive informações sobre as etapas da biossíntese.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. S; SANTOS, A. R; KAISER, C. R. Coumarin determination in Commercial Extracts of Guaco: A case of study of the Quality Control of Phytotherapics. 2007. **Revista Fitos**. Rio de Janeiro, v. 3, n. 1, p. 60-66, mar. 2007.
- ANDRIOLO, A. **Manual da residência de Medicina Laboratorial**. 1ª Edição. Barueri: Manole, 2019.
- AZEVEDO, M. F. et al. **Guia Prático em Saúde: Medicamentos**. 1a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- BAGGIO, S. O. **Extração de cumarinas de *Pterocaulon balansae* (Asteraceae)**. 2014. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Consolidado de normas de registro e notificação de fitoterápicos**. Brasília: ANVISA, 26 de outubro de 2018.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos**. 2ª ed. Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2021. Aprovado pela Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 463, de 27 de janeiro de 2021.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Instrução normativa nº 02 de 13 de maio de 2014**. Publica a “lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e a lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificados”. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2014.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 14 mai 2014, Seção 1, p. 52-61.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 38, de 18 de junho de 2014**. Dispõe sobre a realização de petições pós-registro de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2014.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 166, de 24 de julho de 2017**. Dispõe sobre a validação de métodos analíticas e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 25 jul 2017, Seção 1, p. 87.
- BRASIL. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução RE nº 899, de 29 de maio de 2003**. Determina a publicação do “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos”, 29 de maio de 2014. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS: atitude de ampliação de acesso**. 2ª ed, Brasília, 2015. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_praticas_integrativas_complementares_2ed.pdf Acesso em 29 out 2021.
- BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos.

Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília, 2016. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapiacos.pdf Acesso em 29 out 2021.

CAMPBELL-PLATT, G. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 1ª ed. São Paulo: Editora Manole, 2015.

CASS, Q; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CECHINEL FILHO, V; ZANCHETT, C. C. C. **Fitoterapia Avançada: Uma abordagem química, biológica e nutricional**. Porto Alegre: Artmed: 2020.

COLLINS, C. H; BRAGA, G. L; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 1ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

COUTINHO, L. A; GONÇALVES, C. P; MARCUCCI, M. C. Composição química, atividade biológica e segurança de uso de plantas do gênero *Mikania*. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 118-144, 2020.

DIAS, A. R. S. V. G. **Cumarinas: origem, distribuição e efeitos tóxicos**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal, 2015.

ESTEVES, C. O. et al. Phytotherapeutic drugs: prevalence, advantages, and disadvantages of use in clinical practice, profile and evaluation of users. 2020. **Revista de Medicina**, São Paulo, v. 99, n. 5, p. 463-472, out. 2020.

FRANCO, D. P. et al. A importância das cumarinas para a química medicinal e o desenvolvimento de compostos bioativos nos últimos anos. **Química Nova**, v. 44, n. 2, p. 180-197, 2021.

GASPARETTO, J. C. et al. *Mikania glomerata* Spreng e *M. laevigata* Sch. Bip. Ex Baker, Asteraceae: estudos agronômicos, genéticos, morfoanatômicos, químicos, farmacológicos, toxicológicos e uso nos programas de fitoterapia do Brasil. 2009. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 627-640, set. 2009.

JAIN, P. K. HIMANSHU, J. Coumarin: Chemical and Pharmacological Profile. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 6, p. 236-240, mai. 2012.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC | CLAE**. 9ª ed. Campinas – SP: Editora Átomo, 2016.

LUCETTI, E. C. P. **Efeitos centrais da cumarina (1,2-benzopirona): Estudo comportamental e neuroquímico em córtex pré-frontal e hipocampo de camundongos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2010.

MAIOR, J. F. A. S. et al. **Farmacognosia aplicada**. Porto Alegre: SAGAH, 2020.

MATOS, S. P. **Técnicas de análise química: métodos instrumentais e clássicos**. 1ª ed. São Paulo: Érika, 2015.

MEDEIROS, J; KANIS, L. A. Avaliação do efeito de polietilenoglicóis no perfil de extratos de *Mikania glomerata* Spreng, Asteraceae, e *Passiflora edulis* Sims, Passifloraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 5, p. 796-802, nov. 2010.

- MONTEIRO, S. C; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos teóricos e aplicações.** Porto Alegre: Artmed, 2017.
- MOREAU, R. L. M; SIQUEIRA, M. E. P. B. **Toxicologia Analítica.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.
- OSHIRO, M. C. et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Revista Vigilância Sanitária em debate**, Rio de Janeiro, v. 4, n. 4, p. 116-122, out. 2016.
- PASSARI, L. M. Z. G. et al. Seasonal changes and solvent effects on fractionated functional food component yields from *Mikania laevigata* leaves. **Food Chemistry**, v. 273, p. 151-158, fev. 2019.
- RADÜNZ, L. L. et al. Rendimento extrativo de cumarina de folhas de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel) submetidas a diferentes temperaturas de secagem. 2012. **Revista Bras. PI. Med.** Botucatu, v. 14, n. 3, p. 453-457, mar. 2012.
- SAAD, G. A, et al. **Fitoterapia Contemporânea: Tradição e Ciência na Prática Clínica.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.
- SANTOS, S. C. **Caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco: *Mikania laevigata* SCHUTZ BIP. EX BAKER E *M. glomerata* SPRENGEL e ação de *M. laevigata* na inflamação alérgica pulmonar.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2005.
- SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento.** Porto Alegre: Artmed, 2017.
- SOUZA, S. M. **Atividade antibacteriana de cumarinas naturais e derivados.** 2005. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.
- VIEIRA, S. **Estatística para a qualidade.** 3ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.
- SKOOG, D. A. et al. **Fundamentos em química analítica.** 9ª ed. São Paulo: Editora Cengage Learning, 2014.