

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA E BIOQUÍMICA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**LIDIANE SILVA DUTRA**

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA**  
**QUANTIFICAÇÃO DE  $\beta$ -ESCINA EM EXTRATOS DE *AESCULUS***  
***HIPPOCASTANUM* L. (CASTANHA DA ÍNDIA)**

JUIZ DE FORA

2012.

LIDIANE SILVA DUTRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE  $\beta$ -ESCINA EM EXTRATOS DE *AESCULUS*  
*HIPPOCASTANUM L.* (CASTANHA DA ÍNDIA)**

Projeto de Pesquisa aprovado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientadora: Profa. Dra. Magda Narciso Leite

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcos Antônio Fernandes Brandão

JUIZ DE FORA

2012

Dutra, Lidiane Silva.

Desenvolvimento e Validação de Metodologias Analíticas para  
Quantificação de  $\beta$ -escina em extratos de *Aesculus hippocastanum* L.  
(Castanha da Índia) / Lidiane Silva Dutra.

– 2012.

89 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade  
Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. Metodologias analíticas. 2.  $\beta$ -escina . 3. Validação. I. Título.

LIDIANE SILVA DUTRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE  $\beta$ -ESCINA EM EXTRATOS DE *AESCULUS*  
*HIPPOCASTANUM L.* (CASTANHA DA ÍNDIA)**

Dissertação apresentada na Faculdade  
de Farmácia da Universidade Federal de  
Juiz de Fora para obtenção do Título de  
**Mestre** em Ciências Farmacêuticas.

JUIZ DE FORA

2012

LIDIANE SILVA DUTRA

**DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA  
QUANTIFICAÇÃO DE  $\beta$ -ESCINA EM EXTRATOS DE *AESCULUS HIPPOCASTANUM* L.  
(CASTANHA DA ÍNDIA).**

Aprovação em: \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

**Comissão:**

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Magda Narciso Leite (Orientadora)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke (Titular)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Cristina Duarte Vianna Soares (Titular)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira (Co-Orientador)

Assinatura: \_\_\_\_\_

Profa. Dra. Nádia Rezende Barbosa Raposo (Suplente)

Dedico esta dissertação à minha família que sempre esteve ao meu lado fornecendo apoio e amor incondicionais, e especialmente para minha sobrinha Letícia, que carrega consigo todos os sonhos e esperanças do futuro. Amo vocês!

UTOPIA: Ela está no horizonte, acerco-me um passo e ela se afasta dois. Caminho dez passos e o horizonte corre dez passos mais. Por muito que eu caminhe nunca a alcançarei. Para que serve a utopia? Serve para isso. Para nos fazer caminhar.

Eduardo Galeano

## AGRADECIMENTOS

À Deus, que nos concede vida, força e determinação para sempre seguirmos adiante.

À minha mãe, meu pai e minha irmã, que são a base de tudo o que sou. Cada valiosa lição da vida aprendi com os ensinamentos de vocês.

A meu pai, que me olha e segue como a estrela brilhante que é.

À minha mãe por me defender como uma “leoa”, sempre disposta a tudo por mim.

À minha hermanita Herica pelos conselhos, pelo carinho e pelo incentivo. Acho que você é a pessoa que mais acredita em mim. Obrigada pela confiança!

À Letícia, que com seus maravilhosos conselhos sempre me surpreende, diverte e me faz acreditar que o mundo pode ser melhor.

À minha amiga e irmã escolhida Enailly, que apesar de estar fisicamente longe sempre acompanha de perto tudo que faço e torce pelo meu sucesso.

Aos “anjos” dessa jornada: Prof. Marcone, Priscila e Michele. Acreditem, este trabalho não seria o mesmo sem a colaboração de cada um de vocês.

Ao prof. Marcone por me estender a mão no momento que mais precisei. Nunca esquecerei o seu gesto. Acho que você não tem idéia de como foi importante sua presença em meu caminho. Se algum dia precisar, ficarei imensamente honrada em poder ajudar.

À profa. Magda pela paciência e pelos ensinamentos. Aprendi muito com você.

À doce e meiga Priscila, que escutou todos os desabafos, compartilhou as alegrias e sempre esteve ao meu lado quando pedi por ajuda. Espero um dia retribuir o favor.

À Michele, obrigada por toda a ajuda! Apesar de termos nos conhecido a pouco tempo, me identifiquei de imediato com seu jeito alegre e divertido. Espero poder reencontrá-la novamente e desfrutar mais da sua presença.

Ao Fernando, ou Mister Bean para os íntimos (espero que não se zangue). Apesar de ser teimosa com você, sabe que te admiro muito! Adoro sua responsabilidade, seu jeito “certinho” e suas idéias sempre bem delineadas e analíticas. Você já é um grande pesquisador (“Oh, grande mestre guru...”), mas tenho certeza que seu nome ainda brilhará muito mais. Foi uma honra estar ao seu lado.

A todos do laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Farmácia: Aline, você é um amor; Antônio, pelas conversas e discussões sobre matérias e professores; à profa. Fabíola, por suas idéias que sempre somaram nos resultados, e especialmente para Celinha que além de escutar, ajudou com as amostras, reagentes, testes e improvisos dos mais diversos, enfim, sempre presente e altamente prestativa.



A todos do laboratório de Química Analítica e Quimiometria: Patrícia pelos conselhos estatísticos, Rafael pelo cafezinho, Sandro pelas músicas, Renata e Renatinha pela troca de dias nos momentos de urgência, Carina pelas conversas farmacêuticas, Paty pelos vídeos do Chico na hora do café, enfim, à todos vocês: obrigada!

À profa. Nádia, prof. Orlando, prof. José e prof. Ademar por emprestarem equipamentos, solventes e vidrarias quando precisamos.

Aos meus colegas de turma, por termos sobrevivido juntos a todas às adversidades do caminho. Com cada um de vocês aprendi algo valioso.

Ao meu cunhado Sérgio e a Fran pelas caronas.

Ao Laboratório Catedral que nos forneceu o material de trabalho e sempre se prestou a tirar dúvidas quando necessitamos.

Ao Instituto de Química, por me receber de braços abertos!

Finalmente a todos os professores do mestrado em Ciências Farmacêuticas pelo conhecimento compartilhado, e a Universidade Federal de Juiz de Fora pelo apoio e presença.

## Resumo

Todos os povos do mundo fazem uso de plantas medicinais ou de seus derivados, para o tratamento de doenças. Os fitoterápicos são medicamentos obtidos empregando-se, como princípio ativo, exclusivamente matérias-primas vegetais e são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso. No Brasil estes produtos são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e devem apresentar qualidade, segurança e eficácia.

A  $\beta$ -escina é o principal princípio ativo das sementes da Castanha-da-Índia, *Aesculus hippocastanum* (*Hippocastanaceae*) que possui propriedades farmacológicas que produzem respostas significativas nos casos de insuficiência venosa crônica (IVC), hemorróidas e edemas pós-operatórios. Como produto de uso farmacêutico é amplamente utilizada e possui várias apresentações, em diferentes formas farmacêuticas.

A Castanha-da-Índia (*Aesculus hippocastanum* L.) é a segunda espécie vegetal com maior número de derivados registrados como fitoterápicos simples pela ANVISA. A ausência de metodologia analítica para quantificação de  $\beta$ -escina nos extratos fluido, glicólico e seco de Castanha-da-Índia gerou a necessidade de desenvolvimento deste trabalho que teve como objetivos propor e validar métodos analíticos de doseamento para esta substância.

Foram desenvolvidas três metodologias analíticas diferentes utilizando a espectrofotometria Ultravioleta visível, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Eletroforese Capilar. O extrato fluido foi analisado pelas três técnicas validadas. Os métodos foram comparados através do teste t de Student e apresentaram diferenças estatísticas num intervalo de 95% de confiança.

O Intervalo de confiança dos métodos também foi calculado, sendo estes de 0.16 a 0.73; 0.21 a 0.87 e 0.24 a 1.15 respectivamente para CLAE, CE e UV-Vis. O teor declarado pelo fabricante foi de 0.47%, estando este valor contido no intervalo de confiança de todas as metodologias.

Palavras-Chave:  $\beta$ -escina, Validação, Cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, Espectrofotometria UV-Vis.

## Abstract

All people around the world use medicinal plants, or its derivatives, for disease's treatment. The herbal medicines are obtained by using, as an active principle, only raw vegetables and characterized by knowledge of the effectiveness and risks of its use. In Brazil, these products are regulated by the Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) and shall provide criteria for quality, safety and efficacy required.

The  $\beta$ -escin is the major active proved from seeds of Horse-Chestnut, *Aesculus hippocastanum* (Hippocastanaceae) that has pharmacological properties that produce significant responses in cases of chronic venous insufficiency (CVI), hemorrhoids and edema postoperatively. As a product for pharmaceutical use is widely used and has several presentations, on various pharmaceutical forms.

The Horse-Chestnut (*Aesculus hippocastanum* L.) is the second plant species with the highest number of derivatives recorded as simple herbal medicine at ANVISA. The lack of analytical methodology for quantification of  $\beta$ -escin in fluid extracts, glycolic and dry of Horse-Chestnut prompted the need for development of this study whose aim was to develop and validate analytical methods for determination of this substance.

We developed three different analytical methodologies using UV visible spectrophotometer, High Performance Liquid Chromatography and Capillary Electrophoresis. The fluid extract was analyzed by three techniques validated. The methods were compared using Student's t test and showed statistical differences in the 95% confidence.

The confidence interval of the methods was also calculated, which are 0.16 to 0.73, 0.21 to 0.87 and 0:24 to 1:15, respectively, for HPLC, CE and UV-Vis. The amount declared by the manufacturer was 0.47%, while this value in the confidence interval of all methodologies.

Keywords:  $\beta$ -escin, Validation, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis, UV-Vis spectrophotometry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: Análise de Variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CE: eletroforese capilar (capillary electrophoresis)

CGE: eletroforese capilar em gel (capillary gel electrophoresis)

CV: coeficiente de variação

CVI: Insuficiência Venosa Crônica

CZE: eletroforese capilar de zona (capillary zone electrophoresis)

DAD: arranjo de diodos (diodearray detector)

DP: desvio padrão

EOF: fluxo eletrosmótico (electroosmotic flow)

EF: extrato fluido de Castanha da Índia

EG: extrato glicólico de Castanha da Índia

EOF: fluxo eletrosmótico (electroosmotic flow)

ES: extrato seco de Castanha da Índia

FSCE: eletroforese capilar em solução livre (free solution capillary electrophoresis)

GC: cromatografia à gás ( gas chromatography)

Gl: grau de liberdade

HCl: Ácido clorídrico

IC: Intervalo de confiança

LOD: limite de detecção (limit of detection)

LOQ: limite de quantificação (limit of quantification)

MECK: cromatografia eletrocinética micelar (micellar electrokinetic chromatography)

MD: Média

MQ: Média Quadrática

MS: espectrometria de massas (mass spectrometry)

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: carbonato de sódio

NaHCO<sub>3</sub>: bicarbonato de sódio

NaOH: hidróxido de sódio

LIF: fluorescência induzida a laser (laser-induced fluorescence)

SQ: Soma Quadrática

TLC: cromatografia em camada delgada (thin layer chromatography).

UV: ultravioleta

%: percentagem

α : alfa, letra grega

β : beta, letra grega

λ: lambida, letra grega

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
2.1. O uso de plantas medicinais e fitoterápicos. ....	3
2.2. Controle de Qualidade e Validação Analítica .....	5
2.2.1. Validação Analítica .....	5
2.2.2. Qualidade das plantas medicinais e fitoterápicos consumidos no Brasil. ....	6
2.3. Castanha-da-Índia .....	9
2.4. Extratos vegetais.....	15
2.5. Métodos Analíticos utilizados para doseamento .....	18
2.5.1. Espectrofotometria UV-Vis.....	18
2.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência .....	20
2.5.3. Eletroforese Capilar .....	23
2.6. Planejamento Fatorial .....	29
3. OBJETIVO .....	30
3.1. Gerais .....	30
3.2. Específicos .....	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
4.1. Materiais.....	31
4.1.1. Equipamentos e Acessórios.....	31
4.1.2. Reagentes e soluções .....	31
4.2. Desenvolvimento da Metodologia.....	32
4.2.1. Solução Padrão .....	32
4.2.2. Soluções Amostra .....	32
4.2.2.1. Preparo das Soluções Amostras utilizadas na Espectrofotometria UV-Vis.....	32
4.2.2.2. Preparo das Soluções Amostras utilizadas na CLAE .....	34

4.2.2.3. Preparo das Soluções Amostras utilizadas na CE .....	34
4.2.3. Procedimento Analítico.....	35
4.3. Validação da metodologia.....	35
4.3.1. Especificidade e Seletividade.....	35
4.3.2. Linearidade.....	36
4.3.2.1. Linearidade da Amostra .....	37
4.3.3. Limite de detecção (LD) .....	37
4.3.4. Limite de quantificação (LQ).....	37
4.3.5. Precisão .....	38
4.3.6. Exatidão .....	38
4.3.7. Robustez.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1. ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS.....	42
5.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA .....	50
5.3. ELETROFORESE CAPILAR .....	57
6. QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS E COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS .....	69
7. CONCLUSÕES .....	76
8. REFERÊNCIAS.....	77
9. ANEXOS.....	87
9.1. Anexo 1: Certificado do fornecedor (extrato fluido).....	87
9.2. Anexo 2: Certificado do fornecedor (extrato seco).....	88
9.3. Anexo 3: Certificado do fornecedor (extrato glicólico).....	89

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: <i>Aesculus hippocastanum</i> L.....	10
Figura 2: Estrutura molecular da $\beta$ -escina.....	12
Figura 3: Instrumentação básica para eletroforese capilar .....	24
Figura 4: Perfil do tipo de deslocamento e o correspondente efeito no registro .....	26
Figura 5: Gráfico de varredura utilizando o padrão de escina para escolha do comprimento de onda mais adequado .....	42
Figura 6: Varredura espectral para demonstração da especificidade do método espectrofotométrico.....	43
Figura 7: Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta do padrão de $\beta$ -escina obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV.....	44
Figura 8: Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta do extrato fluido obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV .....	45
Figura 9: Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta do extrato glicólico obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV.....	46
Figura 10: Cromatogramas obtidos para verificação da especificidade do método .....	52
Figura 11: Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta do padrão de $\beta$ -escina obtida por CLAE.....	53
Figura 12: Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta do extrato fluido de $\beta$ -escina obtida por CLAE .....	53
Figura 13: Representação da desprotonação ocorrida na molécula de $\beta$ -escina. ....	58
Figura 14: Eletroferogramas referentes à otimização do eletrólito .....	61
Figura 15: Eletroferogramas apresentados para verificação da especificidade e seletividade do método eletroforético .....	63



Figura 16: Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta do padrão de  $\beta$ -escina obtida por CE ..... 64

Figura 17: Eletroferogramas referentes às análises de precisão intermediária do método CE..... 65

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Preparo das soluções dos extratos fluido e glicólico utilizadas no ensaio de exatidão feito por Espectrofotometria UV-Vis .....	39
TABELA 2: Preparo das soluções de extrato fluido utilizadas no ensaio de exatidão feito por CLAE. ....	39
TABELA 3: Preparo das soluções dos extratos fluido glicólico e seco utilizadas no ensaio de exatidão feito por CE .....	40
TABELA 4: Planejamento fatorial $2^2$ com ponto central .....	41
TABELA 5: Planejamento fatorial Box Behnken $3^3$ com ponto central .....	41
TABELA 6: Obtenção da amostra 100% de extrato fluido e glicólico pelo método espectrofotométrico.....	43
TABELA 7: Análise de variância da linearidade do padrão de escina para o método espectrofotométrico.....	45
TABELA 8: Análise de variância da linearidade da amostra de extrato fluido... ..	45
TABELA 9: Análise de variância da linearidade da amostra de extrato glicólico.....	46
TABELA 10: Resultado do ensaio de repetibilidade para os extratos fluido e glicólico... ..	47
TABELA 11: Precisão intermediária para extrato fluido e glicólico com variação de dias e de analistas... ..	47
TABELA 12: Resultado da exatidão utilizando percentual de recuperação da amostra para extrato fluido e glicólico.....	48
TABELA 13: Análise do extrato fluido para verificação da robustez do método utilizando ANOVA.....	48
TABELA 14: Análise do extrato glicólico para verificação da robustez do método utilizando ANOVA.....	49

TABELA 15: Parâmetros utilizados no planejamento fatorial $2^2$ para otimização do método por CLAE ..	50
TABELA 16: Respostas obtidas pelo planejamento fatorial $2^2$ para otimização do método por CLAE ..	50
TABELA 17: Obtenção da amostra 100% de extrato fluido pela CLAE...	51
TABELA 18: Análise de variância da linearidade do padrão de $\beta$ -escina utilizando a CLAE.....	53
TABELA 19: Análise de variância da linearidade do extrato fluido utilizando CLAE... ..	54
TABELA 20: Resultado do ensaio de repetibilidade para o extrato fluido por CLAE .....	54
TABELA 21: Precisão intermediária para padrão e extrato fluido com variação de dias e de analistas.....	55
TABELA 22: Resultado da exatidão utilizando percentual de recuperação da amostra para extrato fluido.....	55
TABELA 23: Planejamento fatorial $2^2$ com ponto central e teores obtidos de $\beta$ -escina para avaliação da robustez do método CLAE .....	56
TABELA 24: Estudo comparativo de solubilidade da $\beta$ -escina, realizado com a substância diluída a 1:10 em cada solvente.....	57
TABELA 25: Fatores analisados no planejamento fatorial $3^2$ para otimização do eletrólito usado na CE.....	59
TABELA 26: Planejamento fatorial $3^2$ para otimização do eletrólito usado na CE.....	59
TABELA 27: Obtenção da amostra 100% de extrato fluido, glicólico e seco utilizado a CE ..	62
TABELA 28: Análise de variância da linearidade do padrão de escina utilizando a CE.....	64
TABELA 29: Resultado do ensaio de repetibilidade para os extratos analisados por CE.....	65
TABELA 30: Precisão intermediária para os extratos com variação de dias e de analistas....	66
TABELA 31: Resultado da exatidão utilizando percentual de recuperação da amostra para extratos analisados.....	67

TABELA 32: Planejamento fatorial Box Behnken $3^3$ com ponto central e teores obtidos de $\beta$ -escina para avaliação da robustez do método CE .....	67
TABELA 33: Teores obtidos de $\beta$ -escina obtido pelas diferentes metodologias propostas ....	69
TABELA 34: Intervalos de confiança obtidos para os métodos propostos utilizando extrato fluido.....	71
TABELA 35: Intervalos de confiança obtidos para os métodos propostos utilizando extrato glicólico.....	72
TABELA 36: Comparação dos métodos desenvolvidos.....	73

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto à própria espécie humana. O conhecimento das plantas fez parte dos primeiros estudos do homem, uma vez que este necessitava coletar raízes, caules, folhas e frutos destinados à alimentação, à caça e à cura de suas moléstias (GOTTLIEB & KAPLAN, 1993).

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade do mundo, contando com um valor aproximado de mais de 20% do número total de espécies do planeta, com um número de 55 mil espécies de plantas superiores descritas, o que corresponde a 22% do total mundial. Esta rica biodiversidade é acompanhada por uma longa aceitação de uso de plantas medicinais e conhecimento tradicional associado (KOROLKOVAS, 1996).

Os componentes da biodiversidade podem fornecer uma ampla gama de produtos de importância econômica. No Brasil o mercado de fitoterápicos produz receitas nos valores de US\$ 160 milhões por ano, com fator de atração e ritmo de crescimento de vendas internas em 15% anuais, contra 4% das vendas referentes a medicamentos sintéticos (CARVALHO et al., 2008).

A Castanha-da-Índia (*Aesculus hippocastanum* L.) é natural dos Bálcãs, região do Cáucaso e do leste asiático, e é hoje encontrada em todo o mundo (SIRTORI, 2001). O rápido crescimento, fácil adaptação da espécie ao solo, clima e altitude; e sua excelente resistência às condições ambientais, ajudaram nesta dispersão (PIO CORREA, 1984).

Há na literatura vários relatos da utilização da espécie na terapêutica (BOMBARDELLI, 1996 & KIM, 2003). Relatos datados do século XVIII demonstram o uso da utilização de Castanha-da-Índia como antifebril. Já em 1960, sua ação antiedematogênica foi relatada por Lorenz & Marek (SIRTORI, 2001). Tradicionalmente, as sementes da Castanha-da-Índia são utilizadas no tratamento de varizes, hemorróidas, flebites, diarreia, febre e hiperplasia prostática (ACCAME, 2001). As propriedades protetoras capilares, antiedematogênica, antiexudativas e vasoprotetoras, foram relatadas após a administração do extrato de *Aesculus hippocastanum* L., sendo que todas elas são dependentes da concentração de  $\beta$ -escina (SIRTORI, 2001).

Assim como qualquer outro medicamento, os fitoterápicos devem oferecer qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. Neste contexto, as lacunas existentes em relação às plantas medicinais, tornam-se um fator limitante para a sua utilização, pois apesar das monografias existentes em

compêndios oficiais, estas ainda carecem de muitas informações, principalmente no que tange ao controle de qualidade das mesmas. Assim, o desenvolvimento de metodologias analíticas se torna primordial neste processo de controle de qualidade de fitoterápicos (TOLEDO, 2003).

A RDC N° 48 de 16 de março de 2004 (ANVISA/MS) aumentou as exigências legais para a fabricação de fitoterápicos, fazendo-se necessário o relatório detalhado de controle de qualidade, incluindo as metodologias analíticas para o registro dos mesmos. Para os fitoterápicos e demais produtos farmacêuticos, os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto, garantindo, assim, a qualidade da constância da ação terapêutica e a segurança de utilização (SIMÕES, 2004).

Existem várias técnicas analíticas disponíveis atualmente, e, a cada dia, elas se tornam mais precisas e confiáveis, justamente para que se possam atender as exigências das normas nacionais e internacionais. Neste contexto a espectroscopia UV-Vis, a eletroforese capilar (CE) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) compõem métodos analíticos amplamente utilizados nas determinações analíticas das mais variadas áreas.

A droga vegetal da espécie *Aesculus hippocastanum* L. possui monografia nas farmacopéias Brasileira, Alemã, Inglesa e Americana. Há relatos na literatura sobre a quantificação de extrato seco de Castanha-da-Índia utilizando espectrofotometria UV-Vis, utilizando o comprimento de onda de 540 nm, mas não utilizando técnicas analíticas de CLAE e Eletroforese Capilar (GUERRA, 2009). Também foi encontrado estudo sobre a qualidade de amostras comerciais de Castanha-da-Índia (BRANDÃO; MARTINS, 2006). Porém, apesar da ampla utilização, não foram encontrados na literatura estudos sobre os extratos fluido e glicólico de Castanha-da-Índia.

É importante que haja um controle de qualidade sobre estes extratos, uma vez que estes são a base para a formulação das mais diversas formas farmacêuticas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. O uso de plantas medicinais e fitoterápicos.

Toda planta que é administrada ao homem ou animal e exerce sobre ele uma ação farmacológica é denominada medicinal. As plantas medicinais sempre foram objeto de estudo na tentativa de descobrir novos tratamentos para as diversas patologias existentes. As plantas facilitaram a existência dos animais e dos homens, devido tanto a grande multiplicidade de espécies vegetais quanto aos produtos elaborados com elas (CUNHA, 2003).

Desde o início dos tempos, indivíduos pertencentes a distintas tribos ou povos descobriram que algumas plantas eram adequadas como integrantes da dieta e outras possuíam propriedades curativas. Este foi o primeiro passo por meio do qual o homem primitivo adquiriu uma série de conhecimentos sobre aquelas espécies vegetais que eram susceptíveis de serem empregadas para fins terapêuticos (CUNHA, 2003; NAVARRO, 2000).

A partir de meados do século XIX, com o início da química orgânica e do desenvolvimento de técnicas de isolamento de substâncias ativas presentes nas plantas, os extratos vegetais, até então utilizados, foram substituídos por fármacos sintéticos fabricados por grandes conglomerados farmacêuticos, que passaram a realizar grandes investimentos em Pesquisa & Desenvolvimento (P&D). O isolamento de morfina à partir da espécie *Papaver somniferum*, em 1803, pelo farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner marcou o início deste processo de extração de princípios ativos de plantas. A partir de então, outras substâncias foram isoladas, como por exemplo, a quinina e a quinidina obtidas de *Cinchona* spp. em 1819, a atropina à partir de *Atropa belladonna* em 1831, e estas passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (SCHULZ, HÄNSEL, TYLLER, 2001; TYLER 1999).

Além disso, a produção de fármacos via síntese química, o crescimento do poder econômico das indústrias farmacêuticas e a ausência de comprovações científicas de eficácia das substâncias de origem vegetal aliado às dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados, impulsionaram a substituição destes por fármacos sintéticos (RATES, 2001). Dessa forma, a maior parte das plantas medicinais empregadas desde a antiguidade entrou na categoria de remédio caseiro, sendo contempladas, na maioria dos casos, como representantes da medicina tradicional.

Assim, após a década de 1960, observou-se um desinteresse da indústria farmacêutica e dos institutos de pesquisa pela busca de novas substâncias de origem vegetal, por se

acreditar que já haviam sido isoladas as principais substâncias ativas das drogas vegetais conhecidas, bem como já haviam sido realizadas todas as possíveis modificações químicas de interesse destas substâncias (SCHENCKEL, GOSMAN, PETROVICK, 2000).

Esta situação permaneceu até os anos 80, quando os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais, permitiram mais rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais, ressurgindo o interesse pela pesquisa destas substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos. A necessidade de encontrar novas moléculas com atividades farmacológicas e com menos efeitos secundários desenvolvidos a partir da investigação da natureza, também foi um motivo a ser considerado. A partir daí, o embasamento científico para emprego terapêutico passou a ser exigido, não só das plantas empregadas na antiguidade, como as outras espécies consideradas até o momento como possíveis fontes de novas moléculas com interesses farmacológicos (SILVA; RITTER, 2002).

A expansão da fitoterapia pode ser atribuída a diversos fatores tais como: os efeitos adversos de fármacos sintéticos, a preferência dos consumidores por tratamentos “naturais”, a validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais, o desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do controle de qualidade, o desenvolvimento de novas formas de preparações e administrações de produtos fitoterápicos, um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados (CAÑIGUERAL et al., 2003; VIEIRA, 2001).

As lacunas existentes em relação às plantas medicinais não estão presentes somente na Farmacopéia Brasileira. Diversos compêndios internacionais como as farmacopéias dos EUA, Inglaterra, Alemanha, França entre outros, apresentam iguais deficiências. As numerosas monografias existentes sobre as plantas medicinais carecem ainda de muitas informações, principalmente em relação ao controle de qualidade das mesmas. Assim, grande parte das plantas nativas brasileiras ainda não tem estudos suficientes para permitir a elaboração de monografias completas e modernas (SIMÕES, SCHENCKEL, 2002).

As exigências de segurança, eficácia e qualidade, estabelecidas pelas agências regulamentadoras de medicamentos, se tornam cada vez mais rígidas. A permanência ou entrada desses produtos no mercado estão relacionadas ao desenvolvimento de estudos científicos objetivando a obtenção de matérias-primas controladas e o desenvolvimento de tecnologias apropriadas para a produção de extratos vegetais e conseqüentemente de seus produtos finais, os fitoterápicos.



## **2.2. Controle de Qualidade e Validação Analítica**

### **2.2.1. Validação Analítica**

O principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). A ANVISA tem como função proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços e participando da construção de seu acesso (CARVALHO et al., 2008). A ANVISA ainda tem o papel de fiscalizar as indústrias produtoras dos medicamentos, podendo retirá-los do mercado caso os mesmos ofereçam risco para a população.

Para que haja a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização dos fitoterápicos e demais produtos farmacêuticos, devem existir métodos analíticos que permitam a avaliação da qualidade do produto (SIMÕES, 2004). Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem ter qualidade, efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. (BRASIL, 2004)

A validação de um método analítico serve para garantir que este gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra testada (LA ROCA et al., 2007). Validar, em análise química, é estar com o objetivo voltado para a confiabilidade analítica do laboratório e do método escolhido ou desenvolvido para se obter o resultado (LEITE, 2002). Existem normas nacionais e internacionais que norteiam as determinações a serem seguidas para que um método seja validado, garantindo assim que os resultados sejam confiáveis e adequados para o uso pretendido. A validação do método de quantificação de ativos em formas farmacêuticas é um item importante para garantir a segurança dos resultados. Vários guias contendo diretrizes sobre validação de procedimentos analíticos estão disponíveis atualmente (BRASIL, 2003; ICH, 2005; INMETRO, 2003 e USP, 2008).

De acordo com esses guias, os principais parâmetros exigidos para avaliação de um método são: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, robustez, limite de quantificação e limite de detecção. O processo de validação de metodologia analítica é uma ferramenta de importância fundamental para o controle de qualidade e farmacovigilância dos produtos farmacêuticos. A validação no Brasil é regulamentada pela resolução RE N° 899, de acordo com a ANVISA (BRASIL, 2003).

A RDC N° 48 de 16 de março de 2004, aumentou as exigências legais para a fabricação de fitoterápicos, fazendo-se necessário o relatório de controle de qualidade, incluindo as metodologias analíticas, para o registro dos mesmos (BRASIL, 2004). Apesar dos esforços existentes para que os produtos ofereçam eficácia, segurança e qualidade aos seus usuários, muitos deles ainda são comercializados fora dos padrões estabelecidos.

A falta de garantia da eficiência terapêutica desejada, a ausência de riscos à saúde do consumidor, a venda de produtos a base de plantas medicinais sem nenhuma comprovação pré-clínica nem clínica de sua eficácia e segurança (YUNES, 2001) e a ausência de farmacovigilância (BRANDÃO et al., 2002), tornam estes produtos potencialmente perigosos, uma vez que, a má qualidade de um produto pode interferir na ação farmacológica preconizada para a espécie, potencializando assim efeitos indesejáveis. Assim, a validação é necessária para que se haja a constância do efeito terapêutico e a segurança e eficácia dos medicamentos fitoterápicos.

### **2.2.2. Qualidade das plantas medicinais e fitoterápicos consumidos no Brasil.**

A qualidade dos produtos à base de plantas medicinais, comercializados no Brasil, é cada vez mais preocupante. Pesquisas científicas demonstram a presença de diversas irregularidades, como falsificações, fraudes, incoerências com o teor apresentado, bulas com falta de informações importantes aos pacientes, entre outras, que comprometem a eficácia e põem em risco a saúde do consumidor.

As indústrias responsáveis pela fabricação desses produtos, em sua grande maioria, são empresas de pequeno porte que funcionam precariamente, sendo esta uma das causas deste problema (ZUCCOLOTTO et al., 1999). A falta de fiscalização efetiva sobre estes produtos também é um fator relevante (BRANDÃO et al., 1998).

Quando comparadas à legislação de medicamentos sintéticos, no que se refere à produção, uso, comercialização e fiscalização de produtos, e a legislação vigente de fitoterápicos, observa-se que esta última se encontra em estágio inicial, o que também contribui para o alargamento do problema (ZUIN et al., 2004). Veiga-Junior e Pinto (2005) enfatizam que as pesquisas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, como também a fiscalização do comércio por parte dos órgãos competentes.

Devido à grande demanda por produtos à base de plantas medicinais, consequência do significativo aumento do interesse do público brasileiro por “terapias naturais”, se faz necessário investigar como esses produtos estão sendo oferecidos ao consumidor, de acordo com a legislação específica e critérios estabelecidos cientificamente.

Pesquisas realizadas com produtos à base de plantas medicinais nos estados do Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Paraná e Maranhão constataram diversas irregularidades como: características organolépticas impróprias para a espécie, contaminação microbiológica, adulterações, informações inadequadas, elevado teor de impurezas, ausência ou baixa concentração dos constituintes ativos, elevado teor de umidade e a presença de resíduos de pesticidas nos produtos.

No Rio Grande do Sul, avaliou-se a qualidade de 42 produtos fitoterápicos à base de *Statice brasiliense* Boiss (7 amostras), *Peumus boldus* Molina (7 amostras), *Centella asiática* (L.) Urban (6 amostras), *Mikania glomerata* Spreng (9 amostras), *Pilocarpus jaborandi* Holmes (7 amostras) e *Valeriana officinalis* L. (6 amostras) comercializados em Porto Alegre, constatou-se que 71,4% não atendiam aos quesitos mínimos de qualidade, sendo os problemas mais frequentes as substituições, contaminações e ausência do constituinte químico principal (ZUCCOLOTTO et al., 1999).

Em Minas Gerais, foram analisadas 27 amostras comerciais de camomila procedentes de farmácias e ervanarias, e uma amostra comercializada na Finlândia (Europa). Constataram que as mesmas apresentavam-se fora dos padrões de qualidade, sendo os principais problemas observados, uma elevada quantidade de matéria estranha e a ausência dos constituintes ativos nas amostras (BRANDÃO et al., 1998). Mais tarde, ao analisarem amostras de chás de boldo (*Peumus boldus* Molina, 17 amostras), camomila (*Chamomilla recutita* L., 16 amostras), cidreira (*Melissa officinalis* L., 4 amostras), capim-santo (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf., 8 amostras) erva doce (*Pimpinella anisum* L., 17 amostras) e hortelã (*Mentha* sp., 10 amostras) comercializadas em Belo Horizonte, averiguaram que embora todas fossem autênticas, apresentavam-se excessivamente dessecadas e sem os aromas característicos (BRANDÃO et al., 2002). Todas as amostras a base de *Peumus boldus* Molina, *Chamomilla recutita* L; *Melissa officinalis* L; e metade das amostras de *Pimpinella anisum* L; não tinham os componentes voláteis e os produtos à base de *Chamomilla recutita* L; *Mentha* sp e *Melissa officinalis* L. apresentavam elevados índices de matéria estranha (BRANDÃO et al., 2002).

Em Juiz de Fora, foram avaliadas amostras de ruibarbo (*Rheum officinalis*, *R. palmatum*, *R. rhaponticum* e *Ferraria cathartica*), quanto ao seu perfil fitoquímico,

identidade e pureza, tendo como resultado duas amostras com contaminação mineral e uma amostra de *Rheum palmatum* adulterada (SOUZA et al. , 2003).

No Paraná, investigou-se a situação de 10 amostras constituídas por folhas de boldo (*Peumus boldus* Molina) comercializadas na região metropolitana de Curitiba, verificando a identidade, pureza, percentual de umidade, teor do constituinte químico principal e óleo essencial. Todas as amostras foram reprovadas por apresentarem elevada quantidade de água e teor de boldina abaixo do recomendado, além de 90% dos produtos apresentarem altos índices de impurezas (BARBOSA et al., 2001).

Em outro estudo foram analisadas oito amostras de camomila comercializadas em farmácias, drogarias e ervanários de Curitiba, onde constatou-se que cinco amostras apresentaram percentuais acima do máximo para matéria estranha e sete possuíam óleo essencial abaixo do recomendado (DUARTE e LIMA, 2003). Em uma análise microbiológica de 72 amostras de plantas medicinais de 27 diferentes espécies provenientes de plantações, que são matéria-prima para produtos comercializados no estado do Paraná, comprovou-se que 79% do total não atendiam aos parâmetros estabelecidos pela OMS, pelo fato de apresentarem contagens de microorganismos aeróbios e de bolores e leveduras elevados (ZARONI et al., 2004).

No Maranhão, foi realizada uma análise qualitativa de plantas comercializadas em cinco mercados públicos, num total de doze bancas, sendo selecionadas 12 espécies: aroeira (*Myracrodunon urundeuva* Allemão), boldo (*Peumus boldus* Molina), cabacinha (*Luffa operculata* Cogn.), capim-santo (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf), carqueja (*Baccharis trimera* Less.), enxuga (*Alternanthera tenella* Colla), jucá (*Caesalpinia ferrea* Mart.), melão de são Caetano (*Momordica charantia* L.), pau-d'arco roxo (*Tabebuia avellanadae* Lor. ex Griseb), romã (*Punica granatum* L.), sene (*Senna alexandrina* Mill) e sucupira (*Bowdichia virgilioides* Kunth). Foram verificadas as identidades das plantas, a pureza física e microbiológica, em que se constatou que 62% das amostras apresentavam valores de umidade acima do recomendado, 86% continham impurezas acima do permitido e 81,5% estavam microbiologicamente contaminadas (AMARAL et al., 2003).

A qualidade da informação contida na bula é outro aspecto importante para a comercialização de fitoterápicos. Bello et al. (2002) averiguando a qualidade das bulas de 65 fitoterápicos a base de maracujá, boldo, alcachofra, guaraná e sene, quanto à presença das frases obrigatórias e informações específicas exigidas pela legislação (RDC N° 60, de 17 de dezembro de 2010 e a portaria 110/97 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária),

constataram que 51% dos produtos não possuíam bula, nenhum apresentou todas as informações exigidas, especialmente sobre reações adversas, contra-indicações e advertências, concluindo que as bulas dos fitoterápicos analisados não seguiam as normas legais, eram incompletas e deficientes de informações, podendo induzir a sérios problemas de saúde.

Portanto, apesar dos avanços na legislação no que se refere aos fitoterápicos, ainda são necessárias medidas como uma maior fiscalização por parte das vigilâncias sanitárias estaduais e municipais para que produtos de baixa qualidade não sejam comercializados, representando deste modo um risco à saúde da população.

### **2.3. Castanha-da-Índia**

*Aesculus hippocastanum* L., popularmente versada como Castanha-da-Índia, foi utilizada primeiramente para tratar afecções pulmonares de cavalos, recebendo assim o nome *hippocastanum*, de origem grega, que significa castanha dos cavalos.

A Castanha-da-Índia (*Aesculus hippocastanum* L.) é natural dos Bálcãs, região do Cáucaso e do leste asiático, é hoje encontrada dispersa em todo o mundo (SIRTORI, 2001). O rápido crescimento, fácil adaptação da espécie ao solo, clima e altitude; e sua excelente resistência as condições ambientais, ajudaram nesta dispersão (PIO CORREA, 1984). É também muito cultivada em parques, jardins e ruas de grandes cidades.

As partes da planta utilizadas na medicina são as sementes e as cascas de galhos jovens. A fruta da Castanha-da-Índia é como uma cápsula pequena, arredondada e espinhosa, cuja casca se torna grossa à medida que ela amadurece. A fruta contém em seu interior de duas a quatro grandes sementes. Estas sementes são arredondadas e lisas, e possuem formato amendoado (SIRTORI, 2001).

A composição química da espécie é variada, encontrando-se: saponinas, flavonóides, taninos, óleos e outros compostos químicos. Um grande número de flavonóides (principalmente derivados de quercetina e do campferol) já foram isolados. A maioria destes compostos também é encontrada nas sementes, porém, também podem ser detectados no pericarpo dos frutos, cascas, brotos e folhas (WILKINSON et al., 1999). Além dos grupos de substâncias já citadas, epicatequinas e traços de proantocianidinas A<sub>2</sub> foram citadas em estudos da Castanha-da-Índia. Estes compostos são encontrados basicamente nas cascas, folhas, brotos e pericarpos de frutos, além do tegumento das sementes (WILKINSON et al., 1999).

As sementes da Castanha-da-Índia contêm componentes descritos como gomas (40–50% do peso), açúcares, proteínas (especificamente as globulinas, hipocastaninas, contendo L-lisina e L-triptofano), gorduras vegetais (em sua maioria ácidos oléico, linoléico, linolênico, esteárico e palmítico) e purinas (adenosina, adenina e guanina) (WILKINSON et al., 1999).

Glicosídeos cumarínicos, incluindo a esculina, escopolina e fraxina, e suas respectivas agliconas, esculetina, escopoletina e fraxetina, também estão presentes nas cascas da Castanha-da-Índia, ao contrário de seus tecidos, onde tais compostos não são encontrados. O flavonóide quercetina e sua respectiva aglicona também são encontrados nas cascas da planta. Outros compostos, incluindo alantoína, esteróis, leucocianidinas, leucodelfinidinas, taninoscatecóis e alcanos, também já têm a sua ocorrência descrita nesta parte da planta (WILKINSON et al., 1999).



Figura 1: *Aesculus hippocastanum* L. ; acima: árvore à esquerda e semente à direita; abaixo: flores à esquerda e folhas à direita.

Fonte: árvore (<http://www.onlinetrees.com.au/p/4081238/aesculus-hippocastanum---horse-chestnut-tree.html>); semente ( <http://enquantoisso.com/castanha-da-india-para-que-serve-e-onde-comprar/>) flores (<http://enquantoisso.com/castanha-da-india-para-que-serve-e-onde-comprar/>); folhas (<http://www.cas.vanderbilt.edu/bioimages/image/a/aehi--1f29702.html> )

Assim como as cascas, as folhas da Castanha-da-Índia possuem glicosídeos cumarínicos, escopolina, fraxina e esculina. Uma quantidade de glicosídeos flavonóides da quercetina (quercetina, rutina, isoquercetina e quercetina-3-arabinosídeo) e os glicosídeos correspondentes do campferol, também foram detectados nos tecidos das folhas da Castanha-da-Índia. Além destes, também foram encontradas quantidades muito pequenas de leucoantocianinas, *cis*, *trans*-poliprenóis, aminoácidos, gorduras vegetais e esteróis (sitosterol, estigmasterol e campesterol) (WILKINSON et al., 1999).

As sementes da Castanha-da-Índia contêm uma mistura de saponinas, de onde dois produtos cristalinos principais podem ser isolados: escina e prosapogenina. As cascas da Castanha-da-Índia, assim como suas sementes, possuem descrita a presença da escina. Vários outros produtos já foram isolados das sementes da planta: bioflavonóides, como, por exemplo, a quercetina e o campferol e seus derivados diglicosídeos, bem como antioxidantes, proantocianidinas e as cumarinas esculina e fraxina. No entanto, todos estes produtos podem ser encontrados em diferentes espécies de plantas.

Há na literatura vários relatos da utilização da espécie na terapêutica (BOMBARDELLI, 1996). Relatos datados do século XVIII demonstram o uso da utilização de Castanha-da-Índia como antifebril. Já em 1960, sua ação antiedematogênica foi relatada por Lorenz & Marek. (SIRTORI, 2001). Tradicionalmente, as sementes da Castanha da Índia são utilizadas no tratamento de varizes, hemorróidas, flebites, diarreia, febre e hiperplasia prostática (ACCAME, 2001).

As propriedades protetoras capilares, antiedematogênica, antiexudativas e vasoprotetoras, foram relatadas após a administração do extrato feito a partir das sementes de *Aesculus hippocastanum* L., sendo que todas elas são dependentes da concentração de  $\beta$ -escina (SIRTORI, 2001).

Assim, na terapêutica, a parte mais utilizada são as sementes que contêm as saponinas triterpênicas (BECKER et al., 2002) que representam o principal grupo de substâncias responsáveis pela ação farmacológica de *Aesculus hippocastanum*.

A escina é uma mistura de saponinas, substâncias de elevado peso molecular, formada por uma parte lipofílica denominada aglicona ou sapogenina e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares (TREASE et al., 1996). É freqüentemente encontrada sob a forma de  $\beta$ -escina, que é praticamente insolúvel em água (MARTINDALE, 2003).

A escina responde pelo total de saponinas presentes nas sementes, na forma de derivados triterpenóides. Já foi estudada a potente ação antiinflamatória da escina isolada, principalmente nos primeiros estágios da inflamação induzida. Modelos experimentais mostram seus efeitos inibitórios da hialuronidase, antiexudativo, bem como sua atividade preventiva no aparecimento de edemas (WOLLINA et al., 2006).

De acordo com a Farmacopeia Alemã (Deutsches Arzneibuch, 2004 a,b), o teor mínimo de saponinas triterpênicas, conhecida como escina, é de 3% nas sementes de Castanha-da-Índia. Os teores de escina nas sementes podem variar de acordo com a espécie, maturidade da semente e estação do ano.

A escina é formada por mistura complexa (figura 2). O conteúdo de escina encontrado nas sementes da Castanha-da-Índia, normalmente está dividido em  $\alpha$ -escina e  $\beta$ -escina, os quais são compostos por mais de 30 derivados triterpênicos da protoescigenina e do barringtogenol C.

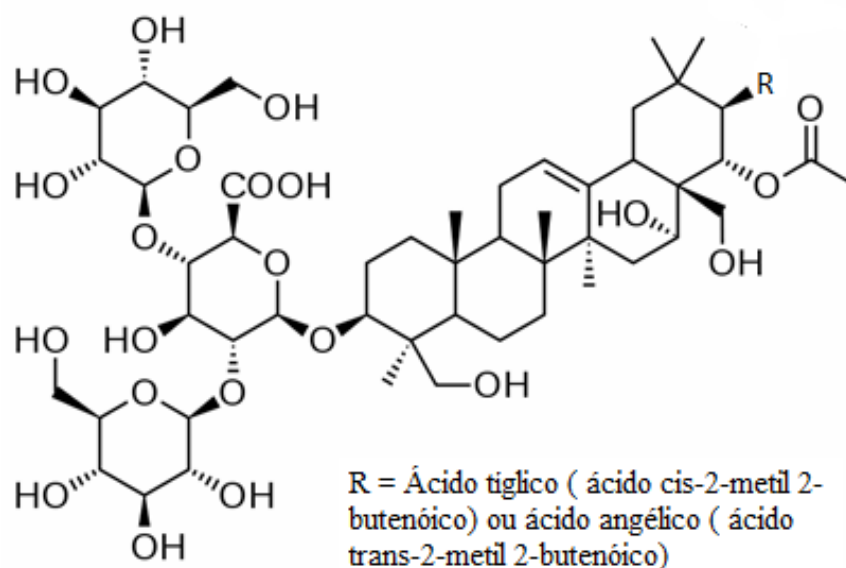


Figura 2: Estrutura molecular da escina

Fonte: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Js4927e/15.html>

Estes compostos são mais comumente encontrados em cotilédones das sementes, chegando a constituir 28% do peso das sementes secas. Porém, outras estruturas da planta também apresentam alguma concentração destes compostos, como tegumento, cascas, brotos, folhas e pericarpo imaturo dos frutos (WILKINSON et. al., 1999).

As duas formas de escina,  $\alpha$  e  $\beta$ , podem ser distinguidas por: solubilidade em meio aquoso, ponto de fusão, índice hemolítico e rotação específica. A forma  $\beta$ -escina, aquecida a



100° C, pode gerar a forma  $\alpha$ -escina. Esta transformação ocorre pela migração do grupo acil que envolve o grupamento hidroxil nas posições C21, C 22 e C28 (SIRTOLI, 2001). Além dos componentes já citados podem ser ainda encontrados nas sementes frescas vitaminas do complexo B como a tiamina (B6) e riboflavina (B2), além da vitamina C. Há também a presença de 50% de amido e 10% de proteínas e carboidratos, como sacarose e glicose. (HUBNER, 1999).

A  $\beta$ -escina tem sido usada na prevenção e tratamento de vários distúrbios vasculares periféricos, demonstrando evidência satisfatória e atividade clínica significativa na Insuficiência Venosa Crônica (IVC), hemorróida e edema pós-operatório (SIRTORI, 2001; MATSUDA et al., 1997; FERRUCCIO et al., 1977). Em estudo controle, a  $\beta$ -escina foi efetiva em terapia de compressão, como terapia alternativa a medicamentos na IVC. Pelo menos três tipos de ação farmacodinâmicas foram atribuídas à  $\beta$ -escina: propriedades anti-edematosas, atividade antiinflamatória e propriedades venotônicas. Todas estas propriedades se devem a um mecanismo molecular identificado como permeabilidade vascular seletiva, que permite uma maior sensibilidade dos canais de cálcio aos íons, resultando em um aumento do tônus venoso e arterial (SIRTORI, 2001).

Outro mecanismo relacionado seria a liberação de prostaglandinas (ARAÚJO, 2003) das veias, antagonistas de 5-HT e histamina. A excelente tolerabilidade da  $\beta$ -escina indica que este tratamento traz benefícios claros a pacientes com condições que resultem em IVC, hemorróidas ou edemas periféricos (SIRTORI, 2001).

A  $\beta$ -escina é um flebotônico fitoterápico tanto por via sistêmica (oral-parenteral) como tópica. Sua ação sobre veias e capilares, diminui a hiper-permeabilidade vascular, melhorando a hemodinâmica, a linfocinese e reduzindo o edema dos membros inferiores em pacientes com varizes ou submetidos à cirurgia.

Atua diminuindo o número e o diâmetro dos poros na parede dos vasos capilares, com ação normalizadora sobre a permeabilidade capilar, inibindo a transudação, o que evita a formação de processos exsudativos; agindo seletivamente sobre os mesmos processos, quando já formados, caracterizando assim, poderosa ação anti-inflamatória e antiedematosa (GUILLAUME et al., 1994). Qualquer lesão no endotélio resulta em ativação da fosfolipase  $A_2$ , responsável pela liberação de precursores dos mediadores inflamatórios, levando à adesão de neutrófilos ao local. A  $\beta$ -escina inibe o aumento da atividade da fosfolipase  $A_2$  nas células endoteliais hipo-oxigenadas bem como a adesão de leucócitos ao endotélio hipo-oxigenado (WETZEL et al., 2002). A  $\beta$ -escina também reduz a atividade das enzimas lisossomais através

da estabilização das membranas dos lisossomas, limitando a liberação destas enzimas, o que permite a estabilização da matriz de proteoglicanos, alterada nos processos varicosos. Através deste mecanismo, o edema é reduzido ao diminuir-se a filtração transcápilar de água e proteínas.

Por outro lado, a  $\beta$ -escina é capaz de melhorar o tônus venoso melhorando o retorno sanguíneo ao coração, efeito que poderia estar relacionado ao aumento da síntese de prostaglandina com a ativação de receptores alfa adrenérgicos (ACCAME, 2001). Sua ação também pode ser notada nas veias do plexo hemorroidário. O mecanismo de ação também é a venoconstrição por redução da permeabilidade capilar.

As hemorróidas são também varizes, porém em localização muito mais delicada e dolorosa que as dos membros inferiores e também podem ser tratadas com a  $\beta$ -escina.

A  $\beta$ -escina também possui mecanismo de ação anti-radical, inibindo peroxidação lipídica *in vitro*. *In vivo*, limita a ação oxidativa de radicais oxigenados livres em células e tecidos (GUILLAUME et al., 1994). Esta ação se deve à inibição do aumento dos níveis séricos de glicose, que provoca uma reação enzimática, glicose-oxidase, que induz edema e inflamação (YOSHIKAWA et al., 1998). Existe ainda a indicação da  $\beta$ -escina em escleroterapia. A escleroterapia continua sendo um procedimento muito realizado pelos cirurgiões vasculares brasileiros. Porém, este procedimento pode acarretar várias complicações: hiperpigmentações, aparecimento de telangiectasias secundárias mais finas que as originais, edema temporário, flebite – tromboflebite, trombose venosa profunda, entre outras.

A  $\beta$ -escina ainda possui a capacidade de diminuir a tensão superficial e formar emulsões O/A, sendo considerada um emulsionante auxiliar (PEKDEMIR et al., 1999). Ela é usada na produção de produtos cosméticos e para cuidados da pele de alta qualidade (COSTANTINI, 1999).

A  $\beta$ -escina age também como antioxidante inibindo a colagenase e a elastase enzimáticas, tornando os tecidos e estruturas de suporte da pele mais saudáveis. Devido a estes mecanismos, a  $\beta$ -escina também pode ser utilizada em formulações cosméticas para celulite (DWECK, 2000).

Até agora não foram elucidados os mecanismos pelos quais a  $\beta$ -escina ajuda na prevenção e diminuição da celulite. Especula-se que o efeito inibitório da  $\beta$ -escina na atividade da elastase e da hialuronidase, se dê através de sistemas enzimáticos envolvidos no retorno dos principais componentes da substância amorfa perivascular (DWECK, 2000).

A  $\beta$ -escina compete por ligação a proteínas plasmáticas, podendo deslocar outros fármacos, resultando em nefro e/ou hepatotoxicidade em pacientes com alterações nestes órgãos. A presença das cumarinas pode potencializar a atividade de anticoagulantes via oral (ACCAME, 2001).

A utilização da  $\beta$ -escina pode ser por via oral, retal, tópica e intravenosa. Usada por via oral, as doses usuais são de 60 mg a 180 mg/dia. Em terapias crônicas mantém-se uma dose de 60 mg/dia. Tópicamente, aplica-se nas regiões afetadas de duas a três vezes ao dia, em soluções de 0,2% a 1% (MARTINDALE, 2003).

O extrato de semente de Castanha-da-Índia é, atualmente, o medicamento mais prescrito na Alemanha para o tratamento da insuficiência venosa crônica e edema.

Devido ao exposto acima, a grande importância e ampla utilização desta espécie e a falta de estudos sobre seus extratos seco, fluido e glicólico, utilizando técnicas analíticas distintas, a mesma foi escolhida para a realização deste estudo.

## **2.4. Extratos vegetais**

Preparações à base de espécies vegetais sempre foram utilizadas pelo homem a fim de sanar seus problemas de saúde. Em meados do século passado, com a ascensão de uma terapêutica centrada na utilização de fármacos sintéticos, o uso de fitoterápicos passou por um declínio. Nas últimas décadas, eles renasceram e, atualmente, são muito utilizados tanto em países em desenvolvimento como em países desenvolvidos (CALIXTO, 2001). Os extratos naturais são mais bem aceitos em relação aos medicamentos sintéticos porque eles são elaborados utilizando fontes naturais, além de possuírem qualidades sensoriais mais próximas às suas matrizes vegetais de origem (MEIRELES, 2003).

Os extratos vegetais são comuns na indústria de perfume, no setor farmacêutico, e no campo do alimento e da nutrição humana. É desta maneira que alguns extratos vegetais, como óleos comestíveis ou industriais, oleoresina, pigmentos e fármacos naturais são obtidos (POIROT et al., 2006).

Os extratos vegetais são preparações líquidas, semi-sólidas ou sólidas, obtidas a partir de espécies vegetais. Estes extratos são obtidos pelo contato da matriz vegetal com diferentes solventes como água ou solventes orgânicos.

A extração é uma operação físico-química de transferência de massa, onde os sólidos solúveis e voláteis podem ser extraídos por manter-se contato entre o solvente e os sólidos (CLARKE, 1985). O rendimento da extração dos compostos da planta é influenciado pelas condições em que o processo de extração é realizado (WONGKITTIPONG et al., 2004). A escolha do solvente, a temperatura de extração e a ação mecânica (agitação e pressão) são importantes. Além disso, a matriz vegetal apresenta uma microestrutura complexa formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros. A extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, o tamanho, localização e a ligação com outros componentes. As características químicas do solvente e a estrutura e composição diversas do produto natural asseguram que cada sistema material-solvente mostra comportamento peculiar, o qual não pode ser previsto facilmente (PINELO et al., 2004).

A escolha do solvente é um fator importante no processo de extração sólido-líquido. Raramente é possível selecionar o solvente ideal, mas algumas características devem ser atentamente analisadas para que o processo seja viável (MOGENSEN, 1982):

- Seletividade: habilidade do solvente para extrair o soluto do material em estudo;
- Viscosidade: alta viscosidade do solvente reduz a taxa de transferência de massa, influenciando o grau e a taxa da extração;
- Densidade: as densidades das duas fases devem ser diferentes para facilitar a separação delas;
- Volatilidade: solventes mais voláteis são mais fáceis de recuperar, diminuindo o custo do processo;
- Ponto de ebulição: fator limitante para a temperatura do processo de extração. Deve-se trabalhar em temperaturas inferiores ao seu ponto de ebulição, para evitar perdas de solvente;
- Inflamabilidade: importante no que diz respeito à segurança;
- Toxicidade: aspecto extremamente importante e pode ser considerado sob três níveis: risco para o operador, risco quando liberado ao meio ambiente e risco para o consumidor;
- Custo: este deve ser analisado para se estimar o custo de operação, mas deve ser feito baseando-se na efetividade do solvente.

Os processos comumente empregados na extração de compostos bioativos de especiarias, sementes oleaginosas e de flores e raízes, são os processos tradicionais como a maceração, onde se faz um contato estático entre o solvente e a matriz vegetal, e a percolação, onde o solvente escoar através de um leito da matriz sólida. Nestes casos o contato é efetuado

em um tempo pré-estabelecido, ao final do qual se obtém o extrato líquido. Em alguns casos o solvente é eliminado parcialmente por evaporação sob vácuo (SHI et al., 2007).

As soluções extrativas mais comumente utilizadas para veicular estes princípios ativos são as tinturas (extratos hidroalcoólicos preparados com uma parte da droga que é extraída com mais de duas partes e menos de dez partes de líquido extrator; normalmente, usa-se a proporção 1:5), preparadas conforme descrito na 2ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010) e extratos glicólicos ou hidroglicólicos (mistura de propilenoglicol e água), os quais não são farmacopêicos.

Esses extratos podem ser veiculados em formas farmacêuticas tópicas, como pomadas, cremes, géis e pastas. Elas se constituem em preparações semi-sólidas, de consistência mole, destinadas ao uso na pele e mucosas para ação local, ou ainda por sua ação emoliente ou protetora. Devem ser plásticas para que modifiquem sua forma com pequeno esforço mecânico e se adaptem ao relevo do local onde são aplicadas (PRISTA et al., 2002).

As formas farmacêuticas sólidas orais são amplamente utilizadas dentro da categoria de medicamentos fitoterápicos, sendo a maior parte administrada sob a forma de comprimidos. Estes apresentam vantagens em relação às outras formas farmacêuticas líquidas: apresentam maior precisão de dose e são bem aceitos pela população.

Os extratos secos são os mais utilizados na composição de formas farmacêuticas sólidas orais. Estes extratos apresentam algumas vantagens dentre as quais incluem: maior estabilidade físico-química e microbiológica, facilidade na padronização, maior concentração de compostos ativos e mais elevada capacidade de transformação em diferentes tipos de formas farmacêuticas sólidas, além da facilidade de manuseio, transporte e armazenamento (ROCHA, et al., 2010; SONAGLIO et al., 2000).

Os diferentes extratos obtidos serão dispostos na sua forma bruta ou modificada, com o incremento de adjuvantes tecnológicos, para serem empregados no desenvolvimento de diferentes formas farmacêuticas.

Como o uso de extratos variados é bem disseminado para a fabricação de diferentes apresentações fitoterápicas, os diversos extratos de *Aesculus hippocastanum* L. foram utilizados no desenvolvimento das metodologias propostas.

## 2.5. Métodos Analíticos utilizados para doseamento

### 2.5.1. Espectrofotometria UV-Vis

A espectrofotometria de absorção visível e ultravioleta é um dos métodos analíticos mais usados nas determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, na identificação do princípio ativo de fármacos.

A espectrofotometria pode ser conceituada como um procedimento analítico através do qual se determina a concentração de espécies químicas mediante a absorção de energia radiante (luz) (GORE, 2000). O princípio da espectrofotometria reside em permitir a incidência da luz em uma molécula, e detectar como a passagem de luz é afetada por esta molécula. A luz apresenta a propriedade de interagir com a matéria, e pode ser vista como uma forma de energia de natureza ondulatória. Esta pode ser caracterizada pelos diversos comprimentos de onda, que podem ser expressos em micrômetros ou nanômetros ( $\mu\text{m}$  ou  $\text{nm}$ ). Parte da energia da luz é absorvida por elétrons da eletrosfera dos átomos constituintes das moléculas, sendo que esta absorção, em cada comprimento de onda, depende da natureza da substância, de sua concentração e da espessura da mesma que é atravessada pela luz.

Em 1852 Beer observou a relação existente entre a transmissão e a concentração do meio onde passa o feixe de luz. Uma certa solução absorve a luz proporcionalmente à concentração molecular do soluto que nela encontra, isto é:

*" A intensidade de um feixe de luz monocromático decresce exponencialmente à medida que a concentração da substância absorvente aumenta aritmeticamente "*.

Matematicamente este conceito pode ser expresso pela equação:

$$I = I_0 \cdot 10^{-kc}$$

em que:  $I$  = Intensidade da luz transmitida

$I_0$  = Intensidade da luz incidente

$k$  = Constante denominada coeficiente de absorção

$c$  = Concentração do meio absorvente

Em 1870, Lambert observou a relação entre a transmissão de luz e a espessura da camada do meio absorvente. Quando um feixe de luz monocromática, atravessava um meio transparente homogêneo, cada camada deste meio absorvia igual a fração de luz que atravessava, independentemente da intensidade da luz que incidia. A partir desta conclusão foi enunciada a seguinte lei:

" A intensidade da luz emitida decresce exponencialmente à medida que a espessura do meio absorvente aumenta aritmeticamente ".

Esta lei pode ser expressa pela seguinte equação:

$$I = I_0 \cdot 10^{-x}$$

em que:  $I$  = Intensidade da luz transmitida

$I_0$  = Intensidade da luz incidente

$x$  = constante denominada **coeficiente de absorção** e que depende do meio absorvente empregado

$l$  = Espessura da cubeta

De um ponto de vista prático, o aspecto mais importante do cálculo quântico é a determinação de quanta luz é absorvida pela amostra. Isto é descrito pela *lei de Beer-Lambert*, que dá a relação entre a intensidade da luz incidindo na solução ( $I_0$ ), e a intensidade da luz saindo da solução ( $I$ ).

$$\text{Log} (I_0 / I) = A = \epsilon cl$$

$A$  = absorvância

$\epsilon$  = absortividade molar

$c$  = concentração do material absorvedor

$l$  = espessura da amostra através da qual a luz passa.

A espectroscopia de absorção molecular é valiosa para a identificação dos grupos funcionais na molécula. Mais importante, entretanto, são as aplicações da espectroscopia de absorção visível/ ultravioleta para a determinação quantitativa de compostos contendo grupos absorventes.

O princípio desta lei é o que fundamenta os aparelhos espectrofotométricos (GORE, 2000). Através do espectrofotômetro é possível comparar a radiação absorvida ou transmitida por uma solução que contém uma quantidade desconhecida de soluto, e uma quantidade conhecida de uma substância de referência.

A técnica espectrofotometria UV-Vis apresenta alguns inconvenientes como: a baixa seletividade; a necessidade de algumas características específicas na estrutura química da amostra para leitura no aparelho; a sobreposição das bandas (*overlapping*) de transição eletrônica ou de transferência de carga em um mesmo solvente, causadas por misturas de componentes; e por último a necessidade de padrões de referência, que fazem com que a sua aplicabilidade não seja maior. Porém, esta técnica também apresenta um conjunto de características favoráveis. Trata-se de uma técnica consolidada, de fácil implementação, baixo custo e sensibilidade compatível com muitas das necessidades que surgem no controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Por se tratar de uma técnica bastante difundida, a qual a maioria dos laboratórios têm acesso e por possuir um baixo custo analítico, escolheu-se fazer a determinação de  $\beta$ -escina por esta técnica. Em revisão da literatura não há relatos do uso de técnicas espectrofotométricas para a quantificação de  $\beta$ -escina em extratos fluido e glicólico de Castanha da Índia.

### **2.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**

Poucos são os métodos de análise química realmente específicos. Até aproximadamente a metade do século XX, as técnicas de separação analítica se restringiam a métodos clássicos como precipitação, destilação e extração. Assim, a etapa crucial nos procedimentos analíticos era a separação do analito de seus potenciais interferentes. Atualmente os procedimentos de separação são amparados por modernas técnicas como a Cromatografia e a Eletroforese. Essas técnicas são principalmente utilizadas para amostras com a presença de multicomponentes ou com a presença de misturas complexas (SKOOG et al., 2002).



A cromatografia pode ser descrita como uma técnica de separação físico-química, no qual os constituintes da amostra a serem separados são particionados entre duas fases, uma estacionária, geralmente de grande área, e a outra, móvel, um fluido insolúvel na fase estacionária, que percola através da primeira. A grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias torna-a uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação. (CIOLA, 1998; SKOOG et al., 2002).

Pode-se definir a técnica a partir da forma física do sistema. A fase estacionária pode ser colocada disposta sobre uma superfície planar ou em um tubo cilíndrico. Baseando-se nesta a cromatografia pode ser subdividida em cromatografia planar ou cromatografia em coluna, respectivamente. Considerando o estado físico da fase móvel, tem-se a cromatografia a líquido, em que a fase móvel é um líquido; a cromatografia gasosa, em que a fase móvel é um gás e a cromatografia supercrítica, na qual se usa como fase móvel um vapor pressurizado em temperatura acima de sua temperatura crítica (SNYDER et al., 1997; SKOOG, 2002).

A separação cromatográfica é o resultado de interações específicas entre as moléculas da amostra e as fases móvel e estacionária. Uma vez que a migração diferencial é dinâmica e depende do equilíbrio de distribuição de cada componente entre a fase móvel e a fase estacionária, a composição de ambas as fases, o fluxo e a temperatura de separação serão as variáveis que afetarão o processo. A mobilidade exibida pelo soluto dar-se-á em função de diferenças na adsorção, partição, solubilidade, pressão de vapor, tamanho da molécula ou densidade de carga iônica (CASS; DEGANI, 2001; USP 2005).

A cromatografia pode ser utilizada para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação, retirando-se as substâncias indesejáveis, e para a separação de componentes de uma mistura.

Esta técnica foi inventada em 1903 pelo botânico russo Mikhail S. Tswett. Inicialmente, ele utilizou a técnica para promover a separação de vários pigmentos de plantas como clorofila e xantofila. Através do escoamento de soluções contendo estes pigmentos em uma coluna de vidro empacotada com carbonato de cálcio finamente dividido, os pigmentos eram separados. A força da gravidade forçava a passagem do solvente, e a medida que os constituintes eram separados, bandas coloridas surgiam na coluna. Isto propiciou a escolha do nome da técnica: *chroma*, que em grego significa cor; e *ghaphein* que também tem sua origem em grego e significa escrever (CIOLA, 1998; SKOOG et al., 2002). Este processo clássico de cromatografia demorava às vezes dias, e sua monitoração era feita através da análise química das frações coletadas ou da simples monitoração visual (CIOLA, 1998).

A produção e uso de fases estacionárias com partículas de diâmetros menores, de 3 a 10  $\mu\text{m}$ , já no final dos anos 60, aumentaram a eficiência da coluna, tornando a técnica mais efetiva. A cromatografia a líquido divide-se em dois grupos: a cromatografia líquida clássica, feita em colunas de vidro, sob pressão atmosférica, e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), em que se usam colunas metálicas e pressões de fase móvel elevadas, obtidas com auxílio de uma bomba de alta pressão (SNYDER et al., 1997). A CLAE envolve um sistema em que a fase estacionária, seja uma superfície sólida, líquida, uma resina de troca iônica ou um polímero poroso, está retida em uma coluna e a fase móvel é forçada através da mesma sob altas pressões. Os três mecanismos mais usados para realizar a CLAE são: por troca iônica, por partição e por adsorção. Os detectores fotométricos UV medem as mudanças na absorção de luz monocromática na região de 190-350 nm e são os mais empregados em CLAE. Este detector mede a absorvância indicando a mudança de concentração ou a massa dos compostos da amostra que estará deixando a coluna cromatográfica (COLLINS, 1995).

Se no passado a cromatografia se servia aos mais variados fins, atualmente seu uso é ainda mais evidente, uma vez que há a necessidade de se caracterizar misturas cada vez mais complexas. E isto só é possível devido ao desenvolvimento de técnicas cromatográficas cada vez mais acuradas e precisas (SKOOG et al., 2002).

A cromatografia líquida de alta eficiência é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação, isto porque esta técnica apresenta alta sensibilidade, adequação a separação de espécies não voláteis ou termicamente instáveis, fácil adaptação para determinações quantitativas acuradas, e, sobretudo, sua ampla aplicabilidade (SKOOG et al., 2002).

Entre as vantagens do emprego da CLAE, podem ser citadas: o alto poder de resolução na separação; alta precisão nas análises quantitativas; boa sensibilidade; alta reprodutibilidade e grande versatilidade, uma vez que pode ser aplicada tanto para compostos orgânicos como inorgânicos. Dentre as limitações da técnica estão o alto custo da instrumentação e o grande volume de fase móvel descartada (AQUINO NETO, 2003).

Por ser uma técnica analítica de alta sensibilidade, optou-se por utilizá-la para a quantificação de  $\beta$ -escina. Em revisão da literatura não há relatos do uso de técnicas cromatográficas para o doseamento de  $\beta$ -escina em extrato seco, fluido e glicólico de Castanha-da-Índia.

### 2.5.3. Eletroforese Capilar

Eletroforese capilar (CE do inglês, *capillary electrophoresis*) é uma técnica analítica de separação baseada nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas em eletrólitos que podem ser aquosos ou orgânicos, no interior de um pequeno capilar, sob a influência de um campo elétrico ou ainda espécies que possam interagir com outras que migram sob um fluxo eletrosmótico (BOONE et al., 1999; SILVA et al., 2007).

A instrumentação simplificada é um aspecto bastante importante da eletroforese capilar, tornando a técnica de fácil implementação. Os componentes instrumentais básicos de um equipamento de eletroforese capilar são esquematizados na Figura 3.

O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (sílica fundida é o material mais comumente empregado), eletrodos (geralmente platina), e um detector apropriado. Uma fonte de alta tensão regulada é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. Essas fontes, em geral, produzem voltagens no intervalo de 0–50 kV e correntes que variam entre 0–200  $\mu$ A. Alguns oferecem a opção de serem operados à voltagem constante e/ou corrente constante (TAVARES, 1996).

A fonte de alta tensão é conectada, através de eletrodos de platina, a dois reservatórios contendo uma solução de um eletrólito conveniente. Tubos capilares de sílica fundida são então preenchidos com a solução, e servem como canal de migração. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios da solução para completar o contato elétrico. (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996).

Os capilares utilizados em CE são normalmente feitos de sílica fundida e suas dimensões típicas variam de 15 a 100  $\mu$ m de diâmetro interno e de 50 a 100 cm de comprimento (TAVARES, 1997). Quanto às características, estes devem ser física e quimicamente resistentes, baratos, transparentes ao UV, ter dimensões internas precisas, alta condutividade térmica, alta constante dielétrica, maleabilidade e não ter tendência a adsorver solutos (TAGLIARO, TURRINA, SMITH, 1996). A utilização do capilar oferece muitas vantagens sobre os outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc.), pois devido a fatores geométricos, a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande, possibilitando a dissipação eficiente do calor gerado pelo efeito Joule, que é o calor gerado em decorrência da passagem de corrente através do meio condutor.

Devido à influência da temperatura sobre a viscosidade das soluções e conseqüentemente sobre a injeção da amostra e sobre o tempo de migração, um fator

importante a ser controlado é a termostatização do capilar. Este controle de temperatura reduz a variabilidade dos tempos de migração e das áreas dos picos e é feito nos equipamentos através do uso de sistema de convecção de ar ou de circulação de líquido refrigerante pelo capilar (MAYER, 2001). Isto diminui o alargamento de bandas que se deve quase que somente à difusão, resultando em uma técnica de alta eficiência, resolução inigualável e tempos de análise apreciavelmente curtos (TAVARES, 1996; LANDERS, 1994).

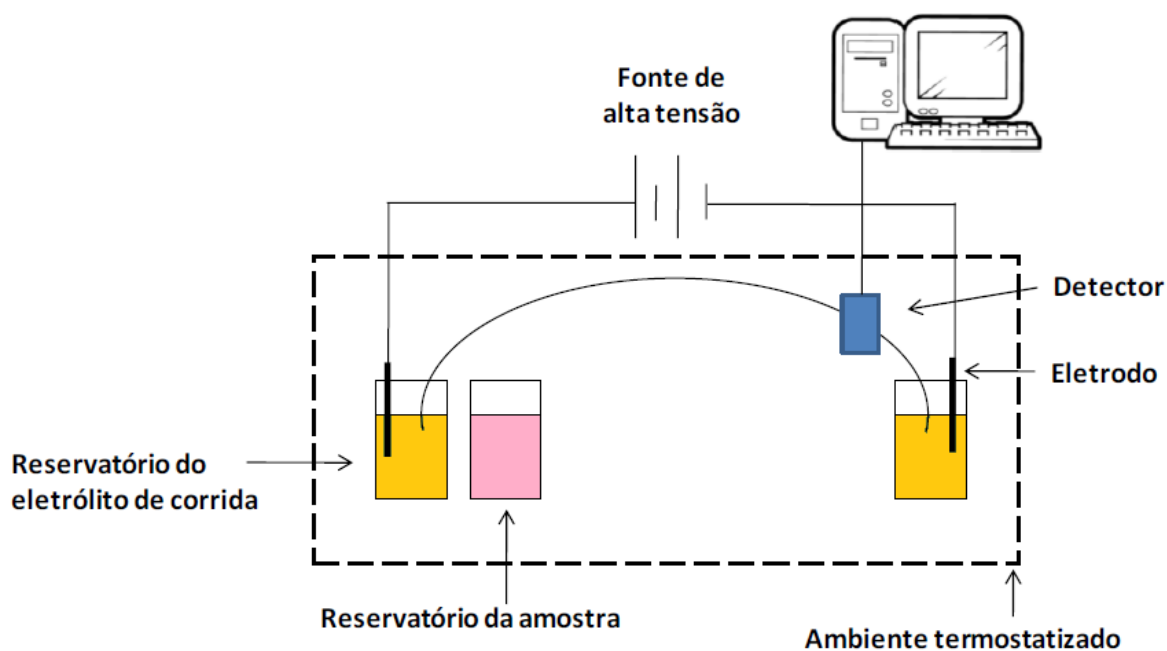


Figura 3: Instrumentação básica para eletroforese capilar.

A utilização de capilares de sílica é também responsável por um importante fenômeno em CE, o fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês *electro osmotic flow*) (TAVARES, 1996). A existência do fluxo se deve à dupla camada elétrica que se desenvolve na interface sílica/solução. Em pH acima de 3, ocorre a dissociação dos grupos silanóis superficiais (Si-OH) que constituem a parede interna do capilar de sílica, conferindo à superfície interna um caráter negativo. Com isso, os cátions do eletrólito tendem a se aproximar da parede e, sob um campo elétrico, são atraídos para o cátodo, e, como estão solvatados arrastam o solvente, proporcionando o “bombeamento” de solução no interior do capilar. Desta forma, a movimentação dos íons dentro do capilar passa a depender não somente da sua própria mobilidade, mas também da mobilidade do EOF. O tempo em que as espécies levam para

passar pelo detector (velocidade aparente) representa a somatória das velocidades efetiva e da velocidade do EOF. O comportamento da migração das espécies é definido pelo pH, tipo do tampão, força iônica, tipo e concentração do solvente orgânico e, adicionalmente, dos equilíbrios químicos estabelecidos, como troca iônica e complexação. A variação do pH, além da influência sobre o EOF, exerce influência na ionização das espécies e, desta forma, favorece a diferenciação das mobilidades efetivas (GUZMAN, 1993).

O EOF é caracterizado por um perfil radial linear de velocidade, o que também contribui para o não alargamento das bandas. Esta peculiaridade distingue eletroforese capilar dos métodos cromatográficos em fase líquida, que apresentam um perfil de velocidade parabólico, característico do fluxo induzido por pressão, conforme demonstrado na Figura 4.

Além disso, o EOF, em geral de grande magnitude, é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector, permitindo assim a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos (BAKER, 1995; WESTON, BROWN, 1997). Dessa forma, como o EOF impulsiona todas as espécies que estão no interior do capilar, a mobilidade eletroforética do analito possui como componentes sua mobilidade efetiva, que é dependente de suas propriedades específicas como carga e tamanho, e a mobilidade do fluxo eletrosmótico. Em condições normais (polaridade normal), o EOF ocorre do ânodo (pólo positivo) para o cátodo (pólo negativo). No entanto, quando desejado, o EOF pode ser reduzido, suprimido ou mesmo ter o sentido invertido. O controle do EOF possibilita melhorar a performance das separações através da modificação das mobilidades aparentes dos analitos. Os métodos de controle mais comumente empregados exploram alterações nas propriedades físico-químicas do eletrólito de corrida, tais como pH, força iônica, viscosidade ou adição de aditivos orgânicos (HARAKUWE, 1999). Também é possível alterar a densidade de carga superficial da coluna através de revestimentos físicos ou métodos de derivatização química (YIU; HORVATH, 2001).

O modo mais comum da técnica de eletroforese é a eletroforese capilar em zona (CZE do inglês, *capillary zone electrophoresis*) ou eletroforese capilar em solução livre (FSCE do inglês, *free solution capillary electrophoresis*), provavelmente em razão da facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais (TAVARES, 1997). Basicamente, a separação ocorre devido à migração diferenciada das espécies, onde, sob a ação de um campo elétrico, cada zona migra com velocidade característica da própria espécie. De uma maneira geral, esse modo é aplicado à separação de espécies iônicas ou facilmente ionizáveis.

A CZE não permite a separação de componentes neutros da amostra, eles simplesmente migram com o fluxo eletrosmótico. Para resolver este problema, a cromatografia eletrocinética micelar (MECK do inglês, *micellar electrokinetic chromatography*) pode ser empregada. Esta técnica é baseada na partição do analito em duas fases, as micelas (agregados de moléculas de surfactante) e solução tampão. As micelas são formadas pela adição de um surfactante ao tampão em uma concentração maior que a concentração micelar crítica. A velocidade de migração dos componentes da amostra é influenciada por seu grau de partição na fase micelar (FRAZIER et. al., 2000).

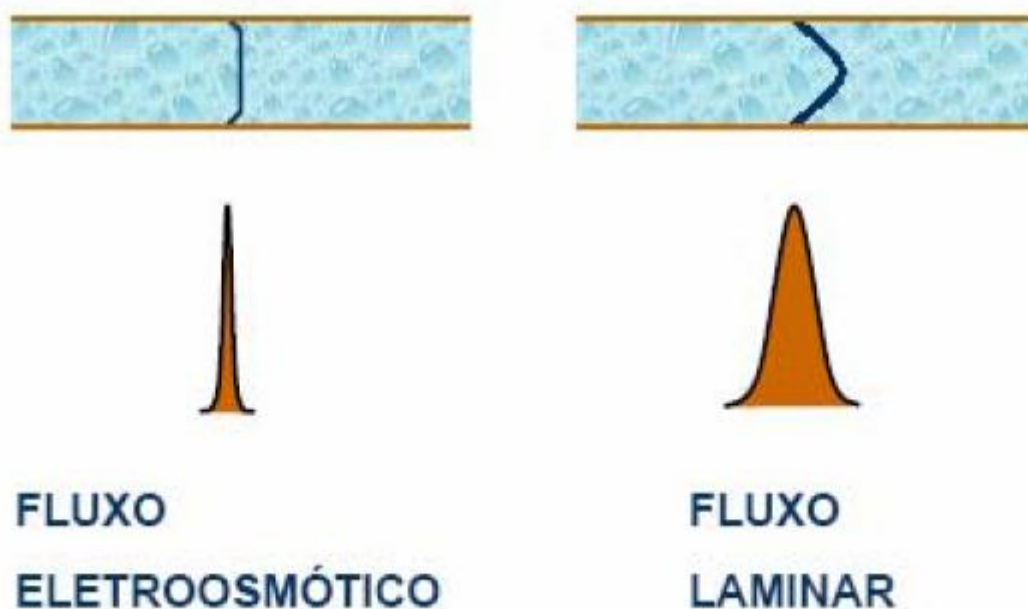


Figura 4: Perfil do tipo de deslocamento e o correspondente efeito no registro. Fluxo induzido por um campo elétrico (eletrosmótico) característico da EC e fluxo induzido por pressão (laminar), característico de CLAE.

A instrumentação usada na MEKC é a mesma empregada na CZE, mas a MEKC é mais versátil, uma vez que diferenças de mobilidade eletroforética podem ser exploradas para separar solutos iônicos, ao mesmo tempo em que diferenças de distribuição entre a fase micelar e o eletrólito podem ser usadas para separar solutos neutros (TAVARES, 1997).

Outras técnicas analíticas de eletromigração em capilares utilizadas para se alcançar a separação de analitos (SILVA et al., 2007) incluem:

- A) Eletroforese Capilar de Afinidade
- B) Eletroforese Capilar de Peneiramento
- C) Eletroforese Capilar em Gel
- D) Focalização Isoelétrica Capilar
- E) Isotacoforese Capilar
- F) Cromatografia Eletrocínética
- G) Cromatografia Eletrocínética Micelar
- H) Cromatografia Eletrocínética em Microemulsão
- I) Eletrocromatografia Capilar

Desde a implementação da técnica de eletroforese capilar, o desenvolvimento de novos sistemas de detecção tem sido uma área de grande interesse (TIMERBAV, 2004; JAGER, TAVARES, 2001; HUANG, 2006). Um detector ideal deve ser versátil; apresentar alta sensibilidade, monitoração contínua dos efluentes, baixo nível de ruídos, vasta linearidade de respostas, linha de base estável, insensibilidade ao fluxo e mudanças de temperatura e resposta a todos os tipos de compostos, mensurando acuradamente um pequeno volume de amostra. De todos os parâmetros ideais descritos, ruído, sensibilidade e linearidade são os requisitos utilizados na descrição da performance do detector (WESTON; BROWN, 1997).

Em geral são empregados os mesmos tipos de detecção utilizados em cromatografia líquida. No entanto, a construção de detectores para CE, seu acoplamento com o capilar e sua manutenção são, todavia, mais trabalhosos que para a cromatografia líquida devido às dimensões reduzidas.

Uma variedade de detectores é usada na eletroforese capilar, incluindo: UV/Vis, fluorescência, condutividade, amperométrico, espectrometria de massas, etc. O detector mais amplamente utilizado é o UV/Vis, destacando-se o com arranjo de diodos (diodearray detector- DAD), que tem a vantagem de detecção simultânea em múltiplos comprimentos de ondas e a habilidade de fornecer dados espectrais.

A vantagem da CE sobre CG, CLAE, cromatografia em camada delgada (TLC do inglês *thin layer chromatography*) e eletroforese capilar em gel (CGE do inglês *capillary gel electrophoresis*) é a aplicabilidade para a separação de uma extensa gama de compostos utilizando o mesmo instrumento e, na maioria dos casos, a mesma coluna de separação, sendo necessária somente a mudança na composição do eletrólito de corrida. Esta versatilidade é uma característica importante e muitas vezes requerida em diversos campos da ciência e que

não é encontrada em nenhuma outra técnica de separação (HADLEY et al., 2000). Adicionalmente, os resíduos gerados, geralmente um tampão aquoso ou, em alguns casos, com uma pequena quantidade de modificador orgânico, são da ordem de poucos mililitros e podem ser descartados sem gerar grande impacto ambiental (TAGLIARO; TURRINA; SMITH, 1996). O mesmo não é válido para CLAE e TLC, em que uma grande quantidade de solventes orgânicos é gerada, ou ainda para GC, em que os compostos voláteis gerados, muitas vezes tóxicos, são liberados para o meio ambiente. O reduzido tempo de análise, o baixo custo dos materiais de consumo, a possibilidade de interface com outros sistemas de detecção e a simplicidade da instrumentação básica são outros atrativos da técnica (FEKETE; SCHMITT-KOPPLIN, 2007).

A maior desvantagem da CE, em geral, é o limite de detecção relativamente alto, conseqüência do limitado volume de amostra analisado e do reduzido comprimento do caminho óptico disponível quando se emprega a detecção no capilar (BONATO, 2003; MALLAMPATI et. al., 2008). Para superar esta limitação e melhorar a detectabilidade, duas estratégias podem ser aplicadas: aumentar a quantidade de analito introduzido no capilar e/ou aumentar a sensibilidade no sítio de detecção (HEMPEL, 2000). Técnicas de detecção alternativas ao UV como a detecção por fluorescência induzida a laser (LIF, do inglês, *laser-induced fluorescence*) e a espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*) podem ser utilizadas para aumentar a detectabilidade no sítio de detecção. Outra abordagem seria aumentar o caminho óptico através do uso de capilares com células de detecção em forma de bulbo ou em forma de z (HEMPEL, 2000). A quantidade de analito introduzido no capilar pode ser concentrada utilizando-se técnicas de pré-concentração *online* tais como o empilhamento da amostra (do inglês, *sample stacking*) ou a injeção por campo amplificado (FASI, do inglês *field-amplified sample injection*) (HEMPEL, 2000).

A eletroforese capilar pode ser considerada um avanço recente entre as técnicas analíticas que tem despertado interesse de diversos grupos de pesquisa em todo mundo, aumentando de forma vertical sua aplicação e utilidade. Atualmente a CE é empregada em diversos campos da ciência, tais como a química analítica, nas áreas forense, clínica, orgânica, dos produtos naturais, na indústria farmacêutica, em separações quirais, biologia molecular, dentre outras áreas. Esta técnica foi escolhida para análise dos extratos fluido, glicólico e seco de Castanha-da-Índia.



## 2.6. Planejamento Fatorial

A maioria dos procedimentos de laboratório, durante ou após seu desenvolvimento, passa por um processo de otimização. Tais processos consistem em melhorar algum tipo de resposta estudando diferentes variáveis que, dentro do sistema, exercem influência sobre dada resposta (BAYNE, RUBIN, 1986). O planejamento fatorial é uma ferramenta estatística que vem sendo muito utilizada na otimização de sistemas, uma vez que este permite determinar a influência de uma ou mais variáveis sobre outra variável de interesse. Além disto, o planejamento fatorial permite a obtenção de resultados que dificilmente seriam alcançados realizando-se experimentos univariados, que provavelmente tomariam muito tempo e resultariam num número muito maior de ensaios para a obtenção de um resultado satisfatório. O planejamento fatorial também oferece uma forma sistemática e organizada para a realização dos experimentos, resultando numa análise mais clara e objetiva por parte do pesquisador (CORNELL, 1990).

Primeiramente em um planejamento fatorial é necessário definir quais são os fatores e as respostas de interesse. Os fatores são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar. Em relação aos fatores é necessário determinar as variáveis de interesse e em seguida em quais níveis estas variáveis serão estudadas, normalmente estas variáveis são utilizadas em dois níveis, o nível mais baixo (-1) e o nível mais alto (+1). Utilizando as variáveis e os níveis escolhidos são realizados experimentos gerados a partir das combinações destas variáveis. Esse tipo de fatorial é conhecido como fatorial completo. Portanto para um planejamento fatorial com  $n$  variáveis e 2 níveis são executados  $2^n$  experimentos. Desta forma é possível avaliar o efeito de cada variável individualmente, bem como o efeito da interação entre elas. Outro tipo de planejamento é o planejamento com ponto central, em que são realizados experimentos no nível 0 da variável, sendo esse o nível intermediário entre as variáveis de nível (+1) e (-1). A adição do ponto central tem por objetivo determinar erros do modelo aplicado (KLEIN, RIVERA, 2000; RODRIGUES, IEMMA, 2005; FERREIRA et. al., 2007).

O planejamento fatorial tem grande aplicação na ciência, na engenharia e, particularmente, na indústria, com o objetivo de otimizar os parâmetros de determinados processos ou até mesmo as propriedades de uma mistura mudando a sua formulação.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1. Gerais

- Desenvolvimento de metodologias analíticas para a quantificação de  $\beta$ -escina de *Aesculus hippocastanum* L. utilizando os extratos (seco, fluido e glicólico) da referida espécie.

#### 3.2. Específicos

- Verificar o teor de  $\beta$ -escina constante nos extratos seco, fluido e glicólico de *Aesculus hippocastanum* L.
- Desenvolver as metodologias analíticas para a quantificação de  $\beta$ -escina em extratos seco, fluido e glicólico utilizando as técnicas de espectrofotometria UV-Vis e/ou CLAE e/ou CE.
- Validar as metodologias analíticas propostas.
- Comparar as metodologias desenvolvidas pelos diferentes instrumentos analíticos: espectrofotometria UV-Vis , CLAE e eletroforese capilar.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1. Materiais

#### 4.1.1. Equipamentos e Acessórios

Ultrapurificador (aquaMAX – Ultra 370 Series, Young Lin Instrument, Coreia); Balança analítica Sartorius, modelo BL 120 S; Rotavapor Buchi R-114; Banho termostatizado Buchi R-114; Agitador Magnético Fisatom 752; filtro membrana Milipore 0,45 µm.

**Espectrofotometria UV-Vis:** Espectrofotômetro Biochrom Libra S12.

**CLAE:** Cromatógrafo líquido de alta eficiência YL 9100, equipado com *software* YL-Clarity, bomba quaternária modelo YL 9110, injetor automático YL 9150, compartimento com forno para coluna YL 9130, e detector UV-Visível com arranjo de fotodiodo (PDA) YL 9196 (Young Lin, Korea); Pré-coluna CN, Phenomenex (Califórnia, EUA); Coluna cromatográfica CN, 5 µm, marca Kromasil (Les Ulis, França), tamanho 250 x 4,6 mm, nº de série E68128, lote 0000008930.

**CE:** Equipamento de eletroforese capilar modelo Agilent CE 7100, equipado com fonte de alta tensão (+- 30 kV), detector por arranjo de diodos (DAD), com controle de temperatura no interior do cartucho por passagem de ar forçado e programa para controle, aquisição e tratamento de dados ChemStation revB.04.03.

#### 4.1.2. Reagentes e soluções

Água ultrapurificada; ácido clorídrico p.a. (Vetec); metanol grau UV/HPLC (Panreac, Vetec); propilenoglicol (Vetec); clorofórmio (Quimex, CRQ, Vetec); propanol (Vetec, Quimex); éter etílico anidro (Cromoline Química Fina, Quimex); ácido acético glacial (Nuclear, Neon, Vetec); ácido sulfúrico p.a. (Quimex); cloreto férrico p.a. (Vetec); carbonato de sódio (Vetec); bicarbonato de sódio (Vetec); Cloreto férrico ácido SR (Vetec); Padrão de β-escina Sigma- Aldrich (Saint Louis US, EUA); extratos fluido, glicólico e seco de *Aesculus hippocastanum* L. (Indústria Farmacêutica Catedral).

## 4.2. Desenvolvimento da Metodologia

### 4.2.1. Solução Padrão

Todas as soluções padrão utilizadas foram feitas utilizando a substância química de referência de  $\beta$ -escina (SQR).

**Espectrofotometria UV-Vis :** A solução foi preparada solubilizando-se 0,0504 g de padrão de  $\beta$ -escina em um b.v. de 100 ml com ácido acético glacial, resultando em uma concentração final de 0,504 g/mL.

**CLAE:** A solução foi obtida pesando-se 0,0100 g de  $\beta$ -escina (SQR) e diluindo-se para um b.v. 50,0 ml de metanol, resultando numa solução estoque de 0,200 mg/mL.

**CE:** A solução foi obtida pesando-se 0,0507 g de padrão de  $\beta$ -escina e dissolvendo-se em um b.v. de 10,0 ml com tampão de carbonato/bicarbonato 25,0 mmol L<sup>-1</sup>, resultando numa solução estoque de 5,07 mg/mL.

### 4.2.2. Soluções Amostra

Todas as soluções amostras preparadas foram feitas utilizando-se os extratos (seco, fluido ou glicólico) de *Aesculus hippocastanum* L. que foram fornecidos gentilmente pela Indústria Farmacêutica Catedral Ltda, cujos laudos são apresentados nos anexos 1, 2 e 3, respectivamente.

#### 4.2.2.1. Preparo das Soluções Amostras utilizadas na Espectrofotometria UV-Vis

**Extrato Fluido:** A solução amostra foi preparada utilizando-se 1,0 ml de extrato fluido de *Aesculus hippocastanum* L. O extrato colocado num balão de 250,0 ml e passou por rotaevaporação sob pressão reduzida até resíduo, mantendo a temperatura do banho a 60° C. O conteúdo do balão foi ressuspensionado em meio ácido com 20,0 ml de HCl 0,1 M e vertido para um funil de separação de 250,0 ml. O balão foi lavado ainda com 3 porções de 5,0 ml de HCl 0,1 M. Seguiu-se a extração da escina adicionando-se uma mistura de 2:5 de propanol/clorofórmio (3 extrações) no funil de separação. Após agitação vigorosa por 2 min e repouso de 5 min, separou-se a fase orgânica da fase aquosa. À fase aquosa remanescente foi adicionada nova porção de líquido extrator e o procedimento foi repetido. Reuniram-se as fases orgânicas, que foram evaporadas até *secura* sob pressão reduzida em um balão de fundo redondo de 500 ml. O resíduo obtido foi lavado com quatro porções de 10 ml de éter etílico, e a solução etérea filtrada. O filtrado foi descartado. Esperou-se até que o éter remanescente do filtro e do recipiente se evaporasse para a continuação do procedimento. Após a eliminação do éter, o filtro e o balão contendo o resíduo foram lavados com ácido acético glacial,

primeiramente com uma porção de 10,0 ml seguida por porções de 5,0 ml até o enchimento do balão volumétrico de 50,0 ml. Seguiu-se então a determinação de escina pela reação de complexação utilizando-se cloreto férrico (Reação de Liebermann).

**Extrato Glicólico:** A solução amostra foi preparada utilizando-se 5,0 ml de extrato glicólico de *Aesculus hippocastanum* L. O extrato foi colocado num béquer de 250,0 mL onde foram adicionados 35,0 ml de HCl 0,1 M. A mistura foi agitada por 15 min utilizando-se um agitador magnético. O conteúdo do béquer foi vertido para um funil de separação de 250,0 mL. Seguiu-se a extração da escina adicionando-se uma mistura de 2:5 de propanol/clorofórmio no funil de separação. Após agitação vigorosa por 2 min e repouso de 5 min, separou-se a fase orgânica da fase aquosa. À fase aquosa remanescente foram adicionadas novas porções de líquido extrator e o procedimento foi repetido por mais duas vezes, completando assim três extrações. Reuniram-se as fases orgânicas, e juntas, as mesmas foram evaporadas sob pressão reduzida até um volume de 15,0 mL em um balão de fundo redondo de 500 mL. A porção de líquido presente no balão foi vertida para um balão volumétrico de 50 mL. O balão contendo o resíduo da solução foi lavado com ácido acético glacial, primeiramente com uma porção de 10,0 mL seguidas por porções de 5,0 mL até completar-se o balão volumétrico de 50,0 mL. Seguiu-se então a determinação de escina pela reação de complexação utilizando-se cloreto férrico (Reação de Liebermann).

**Reação de Liebermann:** Em tubos de ensaio distintos, foram colocados 2,0 ml da solução padrão e 2,0 ml solução amostra, obtida conforme o item 4.2.3. (extrato fluido) e 4.2.4. (extrato glicólico). O branco foi preparado em tubo de ensaio utilizando-se 2,0 mL de ácido acético glacial, ao qual foi adicionaram-se 4,0 mL da solução reagente de cloreto férrico ácido SR, em cada solução, seguidas de homogeneização das mesmas. A solução de cloreto férrico ácido SR foi preparada segundo a Farmacopeia Brasileira 4ª Ed. (2003). Inicialmente as soluções amostra possuíam coloração amarelo claro. Os tubos de ensaio foram aquecidos em banho-maria a 60°C durante 25 min. Após o aquecimento, as soluções desenvolveram uma coloração rosa claro. Houve resfriamento à temperatura ambiente, e a absorvância foi medida através de espectrofotômetro.

#### 4.2.2.2. Preparo das Soluções Amostras utilizadas na CLAE

**Extrato Fluido:** A solução amostra foi preparada utilizando-se 2,0 mL de extrato fluido de *Aesculus hippocastanum* L, que foram transferidos para um béquer onde foram adicionados 20,0 mL de HCL 0,1 M. A mistura foi submetida a agitação por 15 min utilizando-se um agitador magnético. O conteúdo do béquer foi vertido para um funil de separação de 250 mL. Seguiu-se a extração da  $\beta$ -escina adicionando-se 70,0 mL da mistura de 2:5 propanol/clorofórmio. Após agitação vigorosa por 2 min e repouso de 5 min, separou-se a fase orgânica da fase aquosa. À fase aquosa remanescente foi adicionada nova porção de líquido extrator e o procedimento foi repetido por mais duas vezes, completando três extrações. Reuniram-se as fases orgânicas num balão de fundo redondo, e juntas, as mesmas foram rotaevaporadas sob pressão reduzida até resíduo total. O resíduo contido no balão foi então ressuspensionado com metanol, sendo que foram realizadas lavagens sucessivas do balão com posterior transferência das alíquotas para o balão volumétrico de 50,0 mL até seu preenchimento. Realizou-se a filtração das amostras utilizando filtro Milipore 0,45  $\mu$ m antes da injeção destas no aparelho.

#### 4.2.2.3. Preparo das Soluções Amostras utilizadas na CE

Todos os extratos foram filtrados através de filtro Milipore 0,45  $\mu$ m para obter soluções límpidas.

**Extrato Fluido:** A amostra foi preparada diluindo-se o extrato fluido de *Aesculus hippocastanum* L. em tampão de carbonato/bicarbonato 25,0 mmol L<sup>-1</sup> na proporção de 1:10, em balão volumétrico de 1,0 mL. Todas as soluções amostras utilizadas nos ensaios de validação foram feitas seguindo o exposto acima.

**Extrato Glicólico:** A amostra foi preparada diluindo-se o extrato glicólico de *Aesculus hippocastanum* L. em tampão de carbonato/bicarbonato 25,0 mmol L<sup>-1</sup> na proporção de 3:10, em balão volumétrico de 1,0 mL. Todas as soluções amostras utilizadas nos ensaios de validação foram feitas seguindo o exposto acima.

**Extrato Seco:** A amostra foi preparada pesando-se 1,0070 g de extrato seco de *Aesculus hippocastanum* L. e diluindo-se em tampão de carbonato/bicarbonato 25,0 mmol L<sup>-1</sup> para um balão de 10,0 mL, resultando numa solução estoque de concentração 100,70 mg/mL. As amostras utilizadas para nos ensaios de validação foram feitas tomando-se uma alíquota de 50  $\mu$ L da solução estoque e diluindo-se para um balão volumétrico de 1,00 mL, resultando numa solução amostra na concentração de 5035,0  $\mu$ g/mL.

**Solução estoque de tampão:** Solução aquosa contendo 200 mmol L<sup>-1</sup> de tampão de carbonato/bicarbonato que foi utilizada para o preparo dos eletrólitos e nas diluições de amostras e padrão.

#### **4.2.3. Procedimento Analítico**

**Espectrofotometria UV-Vis:** As leituras foram realizadas no comprimento de onda de 240 nm. Antes e entre as leituras, a cubeta foi lavada com água destilada e rinsada com a solução a ser analisada.

**CLAE:** Fase móvel (metanol 100%, pH aparente 6,0); coluna CN 250 x 4,6 mm; fluxo 1 µL/min; Volume de injeção - 20 µL; comprimento de onda de detecção de 210 nm; temperatura 20 °C; tempo de corrida 5 min.

**CE:** O capilar utilizado foi condicionado com solução de NaOH 1,0 mol L<sup>-1</sup> (30 min), água deionizada (5 min) e solução de eletrólito (10 min). Entre corridas, o capilar foi condicionado com solução aquosa de NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup>, água deionizada (2 min) e solução eletrólito (3 min); comprimento de onda de detecção 226 nm; temperatura 20°C; voltagem +20; capilar de 48,5 cm; tempo de corrida de 6 min.

#### **4.3. Validação da metodologia**

Conforme RE N° 899, de 29 de maio de 2003, os principais parâmetros para a validação de metodologia analítica são: linearidade, precisão, exatidão, robustez, especificidade, limite de detecção e limite de quantificação. Assim, estes foram os parâmetros avaliados para os extratos analisados pelas diferentes metodologias propostas.

##### **4.3.1. Especificidade e Seletividade**

O parâmetro de especificidade de um método é a capacidade de avaliar, as substâncias de interesse na presença de compostos que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa (RIBANI et al., 2004). Corresponde ao grau de interferência de espécies, como outro analito, reagentes, impurezas e produtos de degradação, garantindo que o pico de resposta seja exclusivamente de um componente simples (RIBANI et al., 2004; VIEIRA & LICHTIG, 2004). Os ensaios devem ser feitos com o placebo e a amostra, para que se veja que não há interferência do placebo perante o analito de interesse. Como se tratam de extratos

vegetais, onde não há a possibilidade de reprodução da matriz, os ensaios foram feitos com a adição de padrão e com o uso dos líquidos extratores.

**Espectrofotometria UV-Vis:** O ensaio de especificidade foi realizado com o placebo do líquido extrator da amostra. Para o extrato fluido foi utilizado uma solução de etanol/água 70% v/v. Para o extrato glicólico foi utilizado como placebo propilenoglicol.

**CLAE:** A especificidade foi determinada através da comparação entre a amostra, padrão e o solvente utilizado na diluição (metanol). Utilizou-se uma amostra de padrão com concentração de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ; amostra de extrato fluido com concentração de 89,47  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e metanol à 100% na fase móvel.

**CE:** A especificidade foi determinada através da comparação entre as amostras e o padrão. As amostras dos diferentes extratos estavam na concentração 100%. O padrão possuía concentração de 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

#### 4.3.2. Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância dentro de uma determinada faixa de aplicação (GREEN, 1996). Para verificar a linearidade pode-se utilizar o teste de hipótese de linearidade *a priori*, onde compara-se a relação entre  $F_{\text{cal}}$  e  $F_{\alpha}$  (DANZER & CURRIE, 1998). A linearidade também pode ser observada através do coeficiente de correlação (R) que deve ser igual ou maior que 0,990 (ANVISA, 2003). Estes parâmetros foram os avaliados para demonstrar a linearidade dos métodos propostos.

**Espectrofotometria UV-Vis:** A partir da solução padrão (item 4.2.1), retiraram-se alíquotas de 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mL que foram diluídas para balão volumétrico de 10,0 mL resultando nas seguintes concentrações: 50,4; 100,8; 151,2; 201,6; 252,0 e 302,4  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . De cada concentração obtida, foi retirado 2,0 ml e colocado em tubo de ensaio e prosseguiu-se como descrito na reação de Lierbermann, conforme item 4.2.2.1. Este procedimento foi feito em triplicata.

**CLAE:** A partir da solução padrão (item 4.2.1), retiraram-se alíquotas de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 mL que foram diluídas para balão volumétrico de 10,0 mL resultando nas seguintes concentrações: 80,0; 90,0; 100,0; 110,0 e 120,00  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Este procedimento foi feito em triplicata.



**CE:** A partir da solução padrão (item 4.2.1), retiraram-se alíquotas de 20,0; 40,0; 70,0; 100,0; 130,0 e 180,0  $\mu\text{L}$  que foram diluídas para balão volumétrico de 1,0 mL resultando nas seguintes concentrações: 101,4; 202,8; 354,9; 507,0; 659,1 e 907,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Este procedimento foi feito em triplicata.

#### **4.3.2.1. Linearidade da Amostra**

**Espectrofotometria UV-Vis:** A partir de soluções amostras concentradas de 557,52  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato fluido e de 755,84  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de extrato glicólico, retiraram-se alíquotas de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0 e 6,5 mL que foram diluídas para balão volumétrico de 10,0 mL. As amostras resultantes foram de 80, 90, 100, 110, 120 e 130% para avaliar a linearidade dos extratos. O procedimento foi realizado em triplicata.

**CLAE:** A partir de uma solução amostra de extrato fluido concentrada de 19,15  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , retiraram-se alíquotas de 4,0; 4,5; 5,0; 5,5 e 6,0 mL que foram diluídas para balão volumétrico de 10,0 mL, resultando nas seguintes concentrações: 76,6; 86,1; 95,7; 105,3 e 114,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . O procedimento foi realizado em triplicata.

#### **4.3.3. Limite de detecção (LD)**

O limite de detecção é a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, por meio de um dado procedimento experimental. Geralmente, é calculado com base na relação sinal/ruído ou baseado em parâmetros da curva analítica (PASCHOAL et al., 2008). O limite de detecção (LD) foi calculado pela divisão do desvio padrão (DP) do coeficiente linear, obtido com a média das três curvas de calibração, pela média do coeficiente angular (CA) das respectivas curvas, multiplicado por três conforme equação abaixo:

$$\text{LD} = 3 \times \text{DP}/\text{CA}$$

#### **4.3.4. Limite de quantificação (LQ)**

O limite de quantificação representa a menor concentração do analito que pode ser efetivamente determinada num dado procedimento experimental. Os métodos para seu cálculo são semelhantes aos usados para o limite de detecção (RIBANI et al., 2004). O limite de

quantificação (LQ) foi calculado pela divisão do desvio padrão (DP) do coeficiente linear, obtido com a média das três curvas de calibração, pela média do coeficiente angular (CA) das respectivas curvas, multiplicado por dez conforme equação abaixo:

$$LQ = 10 \times DP/CA$$

#### 4.3.5. Precisão

A precisão corresponde à dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, sob condições definidas (RIBANI et. al., 2004). É expressa pelo coeficiente de variação (CV), desta série de ensaios, calculado pela fórmula:

$$CV\% = \frac{\text{desvio padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

Este parâmetro foi avaliado através da repetibilidade e precisão intermediária da amostra. A repetibilidade foi determinada pela análise de seis determinações a 100% da concentração testada. A precisão intermediária foi determinada durante dois dias, por dois analistas diferentes.

**Espectrofotometria UV-Vis:** foram utilizadas amostras de extratos fluido e glicólico à 100%. Os ensaios foram feitos em triplicata.

**CLAE:** foi utilizado o extrato fluido a 100%. Os ensaios foram realizados em sextuplicata.

**CE:** foram utilizados os extratos fluido, glicólico e seco nas concentrações a 100%. Os ensaios foram realizados em sextuplicata.

#### 4.3.6. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre resultados individuais encontrados e um valor aceito como referência, e geralmente é obtida por meio de testes de recuperação (INMETRO, 2003). A exatidão pode ser calculada pela fórmula abaixo:

$$\text{Exatidão} = \frac{(\text{concentração média experimental}) \times 100}{\text{concentração teórica}}$$

A exatidão foi realizada através do percentual de recuperação de uma quantidade conhecida da solução padrão, adicionada à amostra conforme as Tabelas 1, 2 e 3.

**Espectrofotometria UV-Vis:** O ensaio de exatidão foi feito em quintuplicata e foram utilizadas as soluções com as concentrações especificadas na Tabela 1, sendo que as concentrações presentes nas amostras EF, EG representam as concentrações finais das soluções. A solução Padrão apresenta o volume de solução de padrão adicionada às amostras, partindo-se de uma solução estoque de 280,0 µg/mL. A quantidade acrescentada das soluções EF e EG partiram de soluções estoque de 139,38 µg/mL e 188,96 µg/mL, respectivamente.

Tabela 1: Preparo das soluções dos extratos fluido e glicólico utilizadas no ensaio de exatidão feito por Espectrofotometria UV-Vis.

	<b>P (mL)</b>	<b>EF/EG (mL)</b>	<b>EF (µg/mL)</b>	<b>EG(µg/mL)</b>
<b>A</b>	–	5,0	69,69	94,48
<b>R<sub>1</sub></b>	1,0	3,0	69,81	84,67
<b>R<sub>2</sub></b>	2,0	6,0	139,63	169,38
<b>R<sub>3</sub></b>	3,0	6,5	174,60	206,82
<b>P</b>	2,5	–	70,0	70,0

A= soluções amostras de EF e EG; R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> = soluções de recuperação; P = solução padrão.

**CLAE:** O ensaio de exatidão foi feito em triplicata e foram utilizadas as soluções com as concentrações especificadas na Tabela 2. A concentração presente na amostra EF representa a concentração final da solução. A solução P apresenta a concentração de padrão adicionada às amostras. A solução EF acrescentada foi de concentração de 89,47 µg/mL.

Tabela 2: Preparo das soluções de extrato fluido utilizadas no ensaio de exatidão feito por CLAE.

	<b>P (µg/mL)</b>	<b>EF (mL)</b>	<b>EF (µg/mL)</b>
<b>A</b>	-	1,0	89,47
<b>R<sub>1</sub></b>	10,10	1,0	99,57
<b>R<sub>2</sub></b>	20,20	1,0	109,67
<b>R<sub>3</sub></b>	30,30	1,0	119,77

A= soluções amostras de EF; R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> = soluções de recuperação; P = solução padrão

**CE:** O ensaio de exatidão foi feito em triplicata e foram utilizadas as soluções com as concentrações especificadas na Tabela 3. As concentrações presentes nas amostras EF, EG e

ES representam as concentrações finais das soluções. A solução P apresenta a concentração de padrão adicionada às amostras. A quantidade acrescentada das soluções EF, EG e ES partiram de soluções estoque de 536,42 µg/mL; 513,54 µg/mL e 203,36 µg/mL, respectivamente.

Tabela 3: Preparo das soluções dos extratos fluido, glicólico e seco utilizadas no ensaio de exatidão feito por CE.

	<b>P(µg/mL)</b>	<b>EF/EG/ES (mL)</b>	<b>EF(µg/mL)</b>	<b>EG(µg/mL)</b>	<b>ES(µg/mL)</b>
<b>A</b>		1,0	536.42	513.54	203.36
<b>R<sub>1</sub></b>	100	1,0	636.42	613.54	303.36
<b>R<sub>2</sub></b>	150	1,0	686.42	663.54	353.36
<b>R<sub>3</sub></b>	200	1,0	736.42	713.54	403.36

A= soluções amostras de EF, EG e ES; R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> = soluções de recuperação; P = solução padrão.

#### 4.3.7. Robustez

A robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta frente a pequenas variações no sistema e fornece uma indicação de sua confiabilidade. Se pequenas variações nesses parâmetros não provocarem alterações nos resultados que excedam os limites aceitáveis de linearidade, exatidão e precisão, o método é robusto (RIBANI et al., 2004, USP/NF, 2008).

**Espectrofotometria UV-Vis:** A robustez do método foi avaliada através da análise de variação de solventes extratores de diferentes marcas, do espectrofotômetro utilizado para medida das amostras, do comprimento de onda utilizado e a variação do tempo entre o preparo e a leitura da amostra contendo escina. Foram utilizados os comprimentos de onda 539, 540 e 541 nm. O tempo em que as amostras foram medidas foram 0 e 10 para o extrato glicólico e 0, 10 e 20 min para o extrato fluido. Para todos os parâmetros analisados foram utilizadas amostras a 100% da concentração de trabalho de cada extrato e todos os ensaios foram feitos em triplicata para cada nível avaliado.

**CLAE:** A robustez foi realizada para medir a capacidade do método em resistir a pequenas variações dos parâmetros analíticos escolhidos (Tabela de fatores e níveis). Para a robustez,

foi considerado um planejamento  $2^2$  com ponto central, variando fatores como o comprimento de onda utilizado e o fluxo da fase móvel.

Tabela 4: Planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central, utilizado para otimização do método por CLAE.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Comprimento de Onda ( $X_1$ )	208	210	212
Fluxo ( $X_2$ )	0,8	1,0	1,2

**CE:** Alguns parâmetros recomendados para avaliar a robustez em CE são: dimensões do capilar, material do capilar, composição do eletrólito, injeção, voltagem, temperatura, comprimento de onda (US-FDA, 2000). Para a análise da robustez do método foi utilizado um planejamento experimental  $3^3$  Box Behnken variando-se os parâmetros de tempo de injeção, voltagem e temperatura em níveis baixo, médio e alto, conforme a tabela abaixo:

Tabela 5: Planejamento fatorial Box Behnken  $3^3$  com ponto central, utilizado para otimização do método por CE.

Fatores	Níveis		
	-1	0	+1
Tempo de injeção ( $X_1$ )	4	5	6
Voltagem ( $X_2$ )	19	20	21
Temperatura ( $X_3$ )	19	20	21

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS

#### Seleção da Condição Experimental Ótima

Para o estudo espectrofotométrico foi utilizada a solução padrão de escina, obtida conforme item 4.2.1. A varredura foi realizada nos comprimentos de onda de 350 nm–800 nm.

O espectro de  $\beta$ -escina (SQR) utilizado na varredura para a escolha do comprimento de onda mais adequado encontra-se na Figura 5. Pode-se observar que o máximo de absorção se encontra em 540 nm, sendo assim justificada a escolha deste comprimento de onda para as medidas de amostras subsequentes.

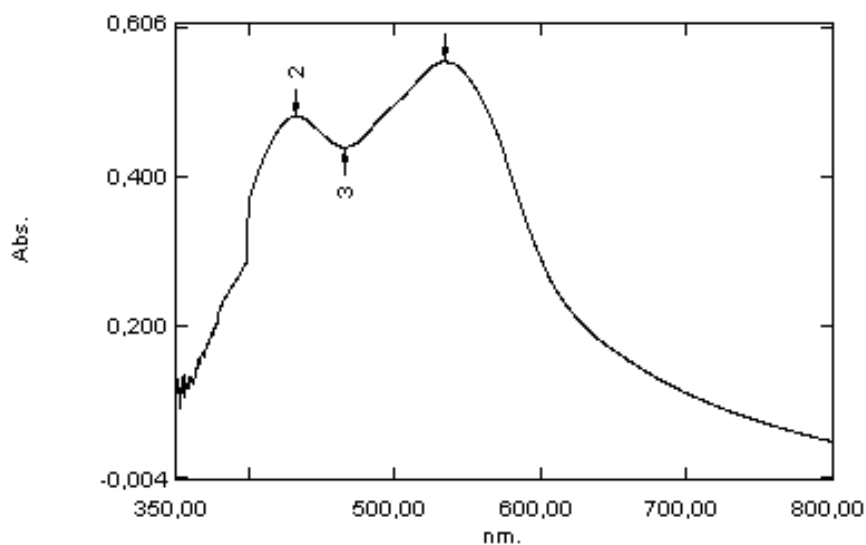


Figura 5: Espectro de varredura utilizando solução padrão de  $\beta$ -escina complexada com cloreto férrico, diluída em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm. Picos de absorvância em 1 e 2.

O teor de  $\beta$ -escina existente nos extratos fluido e glicólico foi determinado através da média de 3 amostras, afim de se estabelecer uma concentração de trabalho (amostra 100%). Os valores de concentração foram encontrados utilizando a equação da curva analítica obtida através do ensaio de linearidade, cujo gráfico está apresentado na Figura 7. Os resultados das determinações seguem na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados das amostras de  $\beta$ -escina utilizando extrato fluido e glicólico para determinação da concentração de trabalho por UV-Vis (amostra complexada com cloreto férrico, diluída em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

Amostra	EF ( $\mu\text{g/ml}$ )	EG ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	140,63	186,88
2	138,13	191,25
3	139,38	188,75
MD	139,38	188,96
DP	1,25	2,19
CV (%)	0,90	1,16

### Especificidade e Seletividade

O perfil espectrofotométrico obtido para as amostras de extratos fluido e glicólico, juntamente com o padrão e os respectivos placebos estão demonstrados na Figura 6. Pode-se observar que não há interferência dos placebos (álcool etílico 70% v/v e propilenoglicol, respectivamente extrato fluido e glicólico) em relação à  $\beta$ -escina. Assim os métodos apresentam-se específicos. As letras A e B presentes na Figura 6 correspondem as varreduras das amostras de extrato glicólico e fluido, respectivamente.

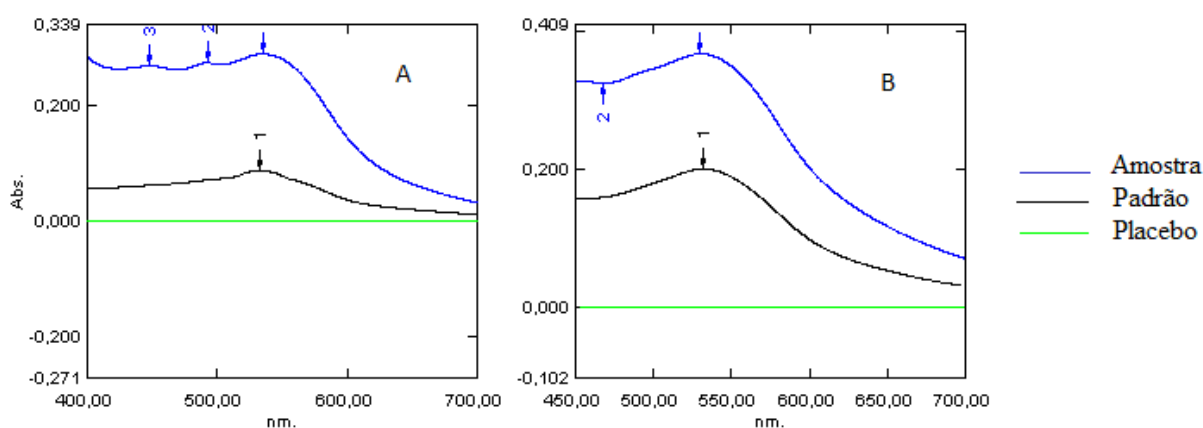


Figura 6: Varredura espectral de amostras de extrato glicólico (A) e fluido (B) de Castanheira-da-Índia para demonstração da especificidade do método espectrofotométrico UV-Vis (amostra complexada com cloreto férrico, diluída em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

## Linearidade e linearidade da amostra

A linearidade do padrão e das amostras foi avaliada através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, observando as três curvas autênticas obtidas de cada extrato e do padrão. Com os dados obtidos foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta tanto para o padrão quanto para as amostras. A curva de calibração do padrão foi utilizada para o cálculo do teor de  $\beta$ -escina nas amostras dos extratos fluido e glicólico. As Figuras 7, 8 e 9 apresentam as retas e suas equações obtidas pela regressão linear. Os valores de coeficiente de correlação (R) estão dentro do preconizado pela ANVISA, que estabelece um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,98 para produtos de origem vegetal (BRASIL, 2004). Foram realizados os testes estatísticos através dos resultados das três curvas de cada extrato e do padrão, demonstrando não haver falta de ajuste do modelo como pode ser observado nas Tabelas 7, 8 e 9. Vale ressaltar que todos os valores F encontrados para as regressões foram significativos, ou seja, os  $F_{cal}$  possuem valores dez vezes maiores que os  $F_{tab(0,05)}$ .

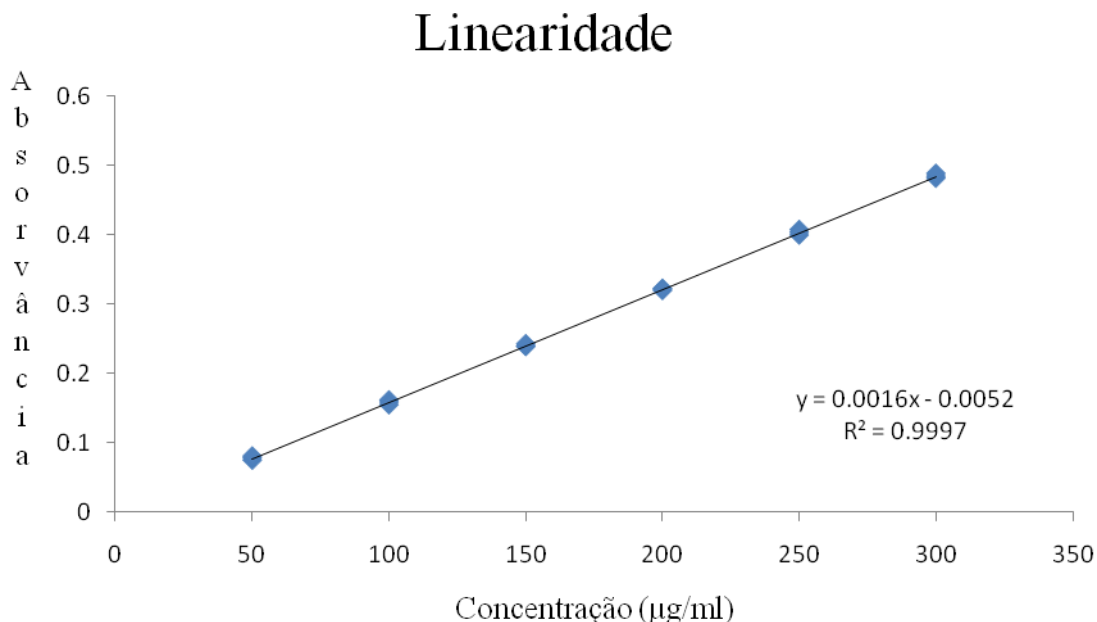


Figura 7: Representação gráfica da curva analítica e sua equação da reta para solução padrão de  $\beta$ -escina obtida pelo método espectrofotométrico UV-Vis (padrão complexado com cloreto férrico, diluído em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).



Tabela 7: Análise de variância da curva analítica da solução padrão de  $\beta$ -escina pelo o método espectrofotométrico UV-Vis (padrão complexado com cloreto férrico, diluído em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

Fonte	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
<b>Regressão</b>	0,349003	1	0,349003	48622,77*	4,49*
<b>Residual</b>	0,000115	16	7,18E-06		
<b>Falta de Ajuste</b>	2,17778E-06	2	5,44E-07	0,06	3,26
<b>Erro Puro</b>	1,13E-04	14	9,38889E-06	Não há falta de ajuste	
<b>Total</b>	0,349118	17			

SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: Média quadrática; \*Regressão estatisticamente significativa.

### Linearidade da amostra EF

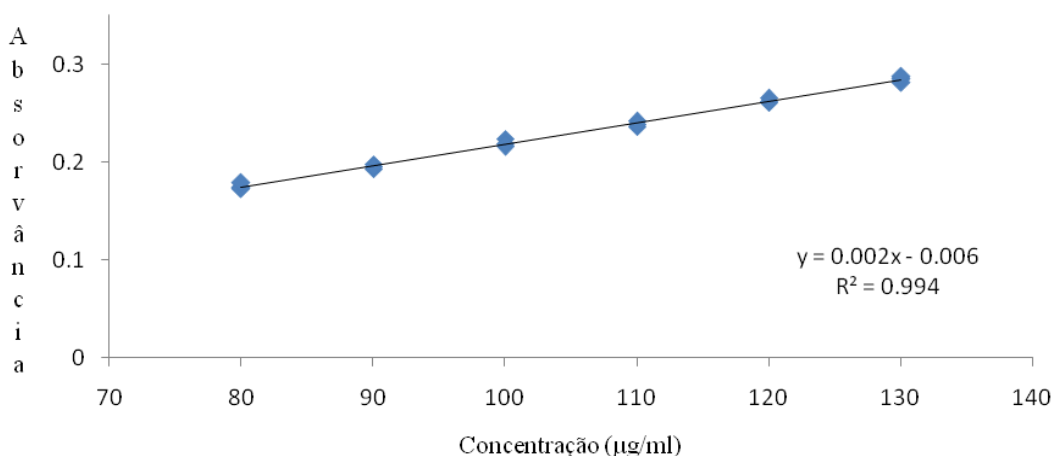


Figura 8: Representação gráfica da curva analítica e sua equação da reta do extrato fluido por meio do método espectrofotométrico UV-Vis (amostra de extrato fluido complexada com cloreto férrico, diluída em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

Tabela 8: Análise de variância da curva analítica da amostra de extrato fluido.

Fonte	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
<b>Regressão</b>	0,025147	1	0,025147	3064*	4,49*
<b>Residual</b>	0,000131	16	8,21E-06		
<b>Falta de Ajuste</b>	1,93143E-05	2	4,82857E-06	0,52	3,26
<b>Erro Puro</b>	0,000112	14	9,33333E-06	Não há falta de ajuste	
<b>Total</b>	0,025278	17			

SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: Média quadrática; \*Regressão estatisticamente significativa.

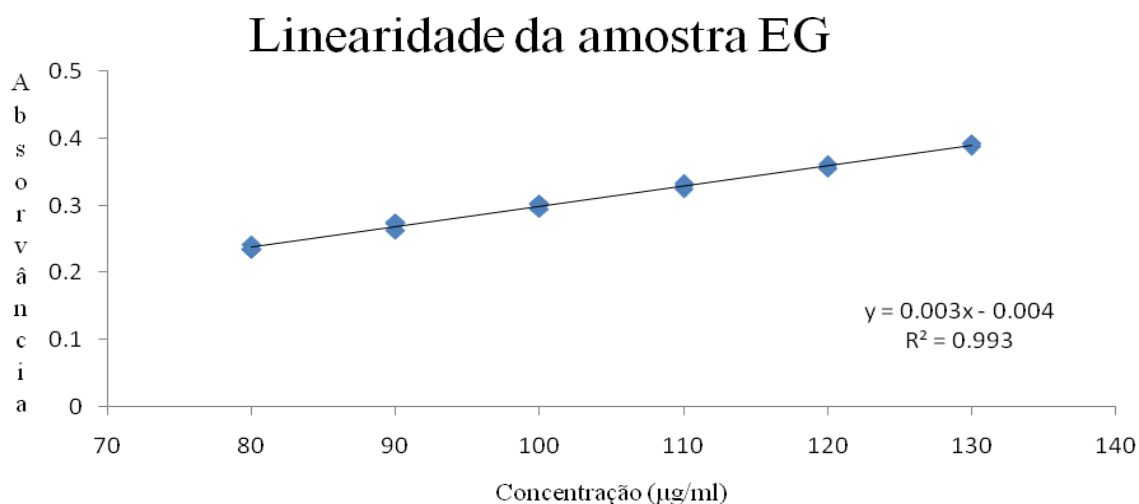


Figura 9: Representação gráfica da curva de calibração e da equação da reta do extrato glicólico obtida pelo método espectrofotométrico na região do UV-Vis (amostra de extrato glicólico complexada com cloreto férrico, diluída em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

Tabela 9: Análise de variância da curva analítica da amostra de extrato glicólico de Castanha-da-Índia.

Fonte	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
<b>Regressão</b>	0,048276	1	0,048276	2622,82*	4,49*
<b>Residual</b>	0,000294	16	1,84E-05		
<b>Falta de Ajuste</b>	3,98286E-05	2	9,95714E-06	0,47	3,26
<b>Erro Puro</b>	0,000254667	14	2,12222E-05	Não há falta de ajuste	
<b>Total</b>	0,04857	17	0,0482944		

SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: Média quadrática; \*Regressão estatisticamente significativa.

#### Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados utilizando as equações presentes nos itens 4.3.3 e 4.3.4. Os valores obtidos para o LD e LQ foram 5,6 µg/ml e 18,75 µg/ml, respectivamente.

#### Precisão

**Repetibilidade e Precisão Intermediária:** Os resultados obtidos com o parâmetro repetibilidade e precisão intermediária para os extratos fluido e glicólico estão apresentados nas Tabelas 10 e 11. Os resultados mostram que os métodos têm repetibilidade e precisão apropriada, uma vez que todos os coeficientes de variação foram menores que 5%. O

coeficiente de variação também foi calculado analisando-se a precisão intra-dias e inter-dias, tendo estes valores satisfatórios.

Tabela 10: Resultados dos ensaios de determinação de  $\beta$ -escina em extratos fluido e glicólico de Castanha-da-Índia para verificação da repetibilidade por espectrofotometria UV-Vis (amostras complexadas com cloreto férrico, diluídas em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

<b>Amostra</b>	<b>Teor EF (%)</b>	<b>Teor EG (%)</b>
<b>1</b>	100,89	100,22
<b>2</b>	99,10	100,88
<b>3</b>	100,00	98,23
<b>4</b>	97,31	101,87
<b>5</b>	96,41	102,53
<b>6</b>	98,65	98,90
<b>MD</b>	98,73	100,44
<b>DP</b>	1,66	1,67
<b>CV(%)</b>	1,69	1,66

Tabela 11: Resultados dos ensaios de determinação de  $\beta$ -escina em extratos fluido e glicólico de Castanha-da-Índia para verificação da precisão intermediária por espectrofotometria UV-Vis (amostras complexadas com cloreto férrico, diluídas em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

	<b>Teor EF (%)</b>				<b>Teor EG (%)</b>			
	<b>Analista 1</b>		<b>Analista 2</b>		<b>Analista 1</b>		<b>Analista 2</b>	
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>
<b>MD</b>	100.00	100.15	98.95	101.05	100.99	100.55	102.65	100.00
<b>DP</b>	0.90	1.81	2.04	1.43	0.83	0.88	1.25	1.16
<b>CV(%)</b>	0.90	1.81	2.02	1.44	0.82	0.87	1.22	1.16
	<b>Intra-dias</b>				<b>Intra-dias</b>			
	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>		<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
<b>MD</b>	99.47		100.59		100.77		101.32	
<b>DP</b>	1.51		1.55		0.80		1.81	
<b>CV(%)</b>	1.52		1.54		0.79		1.78	
	<b>Inter-dias</b>				<b>Inter-dias</b>			
<b>MD</b>	100.03				101.05			
<b>DP</b>	1.57				1.36			
<b>CV(%)</b>	1.57				1.35			

## Exatidão

A exatidão foi demonstrada através do percentual de recuperação pelo método de adição de padrões. Na Tabela 12 estão apresentados os resultados de exatidão, obtidos para o extrato fluido e glicólico de castanha-da-Índia. Os valores encontrados estão compreendidos no intervalo de 97,5% a 102%, não ultrapassando o coeficiente de variação 5%. Isto demonstra que o ensaio para a quantificação de  $\beta$ -escina nos diferentes extratos é exato.

Tabela 12: Resultados de exatidão para extratos fluido e glicólico de Castanha-da-Índia por espectrofotometria UV-Vis (amostras complexadas com cloreto férrico, diluídas em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

	[Teórica] ( $\mu\text{g/mL}$ )	MD	DP	CV(%)	R(%)	RF(%)
<b>P</b>	70.0	70.13	0.93	1.32	100.19	
<b>A<sub>F</sub></b>	69.69	70.25	1.44	2.05	100.80	
<b>R<sub>F1</sub></b>	69.81	68.63	2.09	3.05	98.31	99.54
<b>R<sub>F2</sub></b>	139.63	137.5	2.96	2.16	98.47	
<b>R<sub>F3</sub></b>	174.60	175.63	3.75	2.14	100.59	
<b>A<sub>G</sub></b>	94.48	94.75	2.88	3.04	100.29	
<b>R<sub>G1</sub></b>	84.67	82.88	2.19	2.64	97.88	99.69
<b>R<sub>G2</sub></b>	169.38	172.50	3.28	1.90	101.84	
<b>R<sub>G3</sub></b>	206.82	204.25	2.00	0.98	98.76	

A= soluções amostras de EF e EG; R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> = soluções de recuperação; P = solução padrão RF= Recuperação final calculada pela média das recuperações.

### Robustez

Os métodos se apresentaram robustos frente às variações intencionais de determinados parâmetros. Não foi possível a análise do extrato glicólico com a variação do tempo em 20 minutos após o preparo da amostra, pois os resultados obtidos foram muito discrepantes em relação aos anteriores (utilizando 0 e 10 min). Isto pode ser devido a uma instabilidade química da amostra de extrato glicólico, o que não ocorre com o extrato fluido. Os aparelhos de espectrofotômetro utilizados foram dois aparelhos distintos Biochrom Libra S12. Quanto aos solventes, duas marcas diferentes foram utilizadas: Quimex e Vetec, ambas para os dois solventes extratores: propanol e clorofórmio.

Os dados da análise de variância presentes na Tabelas 13 e 14 confirmam que em um nível de 95% de confiança, as variações feitas nos métodos não apresentaram diferença estatisticamente significativa, uma vez que o  $F_{\text{cal}}$  é menor que o  $F_{\text{tab}}$ , ratificando a robustez do método para os extratos fluido e glicólico.

Tabela 13: Resultados estatísticos (ANOVA) de robustez obtidos para os extrato fluido de Castanha-da-Índia por espectrofotometria UV-Vis (amostras complexadas com cloreto férrico, diluídas em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

		<b>MD</b>	<b>DP</b>	<b>CV(%)</b>	<b>F<sub>cal</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub></b>
<b>Tempo de reação</b>	0	99.10	2.24	2.26		
	10	98.50	1.81	1.84	0.09	5.14
	20	99.10	1.61	1.63		
<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	539	100.22	0.87	0.87		
	540	100.00	1.01	1.01	0.01	5.14
	541	100.46	1.83	1.83		
<b>Aparelho</b>	1	100.00	0.90	0.9		
	2	98.95	2.02	2.05	0.22	7.71
<b>Solvente</b>	1	100.15	1.80	1.81		
	2	101.05	1.44	1.43	0.24	7.71

Tabela 14: Resultados estatísticos (ANOVA) de robustez obtidos para o extrato glicólico de Castanha-da-Índia por espectrofotometria UV-Vis (amostras complexadas com cloreto férrico, diluídas em ácido acético glacial;  $\lambda$ : 540 nm).

		<b>MD</b>	<b>DP</b>	<b>CV(%)</b>	<b>F<sub>cal</sub></b>	<b>F<sub>tab</sub></b>
<b>Tempo de reação</b>	0	100.22	0.66	0.66		
	10	99.37	0.57	0.57	3.37	7.71
<b><math>\lambda</math> (nm)</b>	539	100.22	0.87	0.87		
	540	100.00	1.01	1.01	0.12	5.14
	541	99.82	0.52	0.52		
<b>Aparelho</b>	1	99.67	1.16	1.17	0.12	7.71
	2	99.66	1.34	1.34		
<b>Solvente</b>	1	100.92	0.94	0.93		
	2	100.00	1.16	1.16	2.06	7.71

## 5.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

### Seleção da Condição Experimental Ótima

Durante o desenvolvimento deste método, foram realizadas 32 tentativas de separação do pico de  $\beta$ -escina presentes no padrão e na amostra. Após estas tentativas conseguiu-se a separação do pico de  $\beta$ -escina na amostra, sem a co-eluição do pico do sistema. Realizou-se um planejamento fatorial de  $2^2$  com ponto central para analisar as melhores condições cromatográficas. Abaixo encontram-se as Tabelas 15 e 16 com os parâmetros analisados e as respostas monitoradas:

Tabela 15: Parâmetros utilizados no planejamento fatorial  $2^2$  para otimização do método por CLAE para determinação de  $\beta$ -escina em extrato fluido.

Variáveis	Fatores	Níveis		
		-1	0	+1
X <sub>1</sub>	Temperatura (°C)	20	25	30
X <sub>2</sub>	pH da fase móvel	6,0	6,2	6,4

Tabela 16: Respostas obtidas pelo planejamento fatorial  $2^2$  para otimização do método por CLAE para determinação de  $\beta$ -escina em extrato fluido.

Ensaio	Parâmetros			Y		
	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	(%)	TR	N	S
1	-1	-1	104,39	2,180	2466	1,811
2	1	-1	98,98	2,180	2547	1,806
3	-1	1	96,47	2,197	3069	1,828
4	1	1	99,23	2,183	2926	1,773
5	0	0	101,51	2,143	3142	1,697
6	0	0	97,67	2,133	3113	1,824
7	0	0	101,28	2,167	3463	1,716

TR: tempo de retenção; N.: número de pratos teóricos; S: simetria do pico.

A temperatura e o pH da fase móvel são parâmetros muito importantes nas análises por CLAE. No método em questão, estes parâmetros são os que se apresentaram mais críticos durante a fase de desenvolvimento, por isso eles foram escolhidos para serem usados na

otimização do método. As respostas observadas foram satisfatórias. A simetria deve possuir valor menor do que 2 e a eficiência da coluna, avaliada pelo número de pratos teóricos, deve ter valor acima de 2000. Pela Tabela 16 observou-se que todos os valores referentes à simetria e a eficiência estão dentro dos valores estabelecidos. Os efeitos de cada interação foram calculados matricialmente e de acordo com a estimativa dos erros-padrão e a significância calculada, sendo que nenhum dos parâmetros testados conferem variações significativas nos vetores.

Como o ensaio número 1 forneceu o maior teor, os parâmetros nele descritos foram os escolhidos para a validação do método. Após a escolha do melhor ensaio foram realizadas medidas de três amostras de extrato fluido para que fossem definidas as concentrações de trabalho que seriam usadas nos ensaios posteriores.

Tabela 17: Verificação de  $\beta$ -escina em extrato fluido de Castanha-da-Índia por CLAE para determinação da concentração de trabalho.

<b>Amostra</b>	<b>EF (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
<b>1</b>	89.78
<b>2</b>	89.47
<b>3</b>	89.42
<b>MD</b>	89.47
<b>DP</b>	0.19
<b>CV (%)</b>	0.22

### **Especificidade e Seletividade**

Na Figura 10 estão apresentados mostra os cromatogramas referentes ao solvente utilizado na fase móvel (metanol 100%), à amostra de extrato fluido, ao padrão e à amostra de extrato fluido acrescida de padrão.

Pode-se observar que há um pico do sistema (Figura 10a) e que este não interfere na análise do composto de interesse (Figura 10b). Não há sobreposição de picos do padrão ou da amostra (Figura 10c) em relação ao pico do sistema. Verificou-se na Figura 10b que há sobreposição dos picos co-eluídos da amostra e do padrão, por adição do último, demonstrando que há especificidade no método.

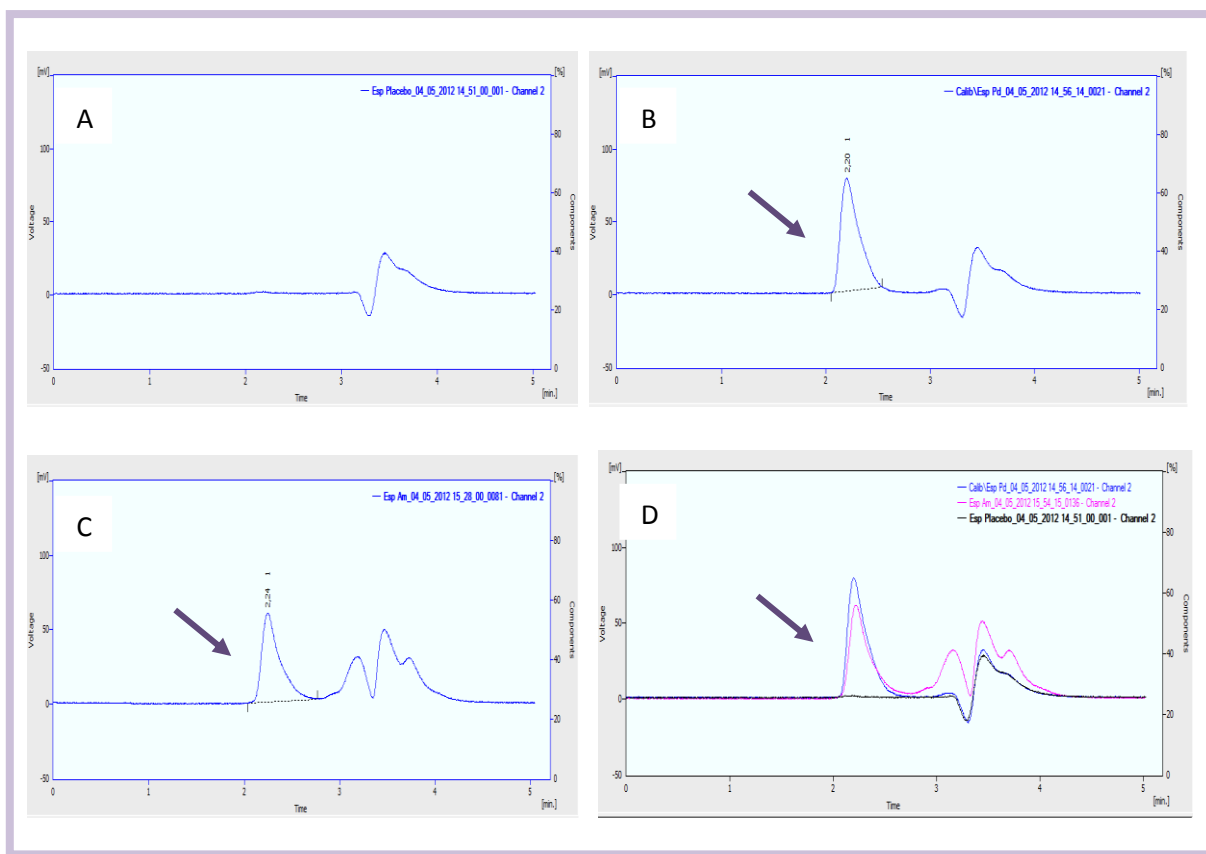


Figura 10: Cromatogramas obtidos para verificação da especificidade do método. A: metanol (100%), pico do sistema; B: padrão de  $\beta$ -escina; C: amostra de extrato fluido acrescido de padrão  $\beta$ -escina; D: amostra de extrato fluido. As setas roxas apresentadas indicam o pico referente à  $\beta$ -escina. (coluna CN 250 x 4,6 mm; fluxo 1  $\mu$ L/min; Volume de injeção - 20  $\mu$ L;  $\lambda$ : 210 nm; temperatura 20  $^{\circ}$ C; tempo de corrida 5 min)

### Linearidade e linearidade da amostra

A linearidade do padrão e da amostra foi avaliada através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, observando as três curvas autênticas obtidas do extrato fluido e do padrão. Com os dados obtidos foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta tanto para o padrão quanto para a amostra. As Figuras 11 e 12 apresentam as curvas e suas equações das retas obtidas pela regressão linear. Os coeficientes de correlação ( $R^2$ ) obtidos são maiores que 0,990 o que é um indicativo de um ajuste adequado dos dados. Foram realizados os testes estatísticos através dos resultados das três curvas de cada extrato e do padrão. Os valores de  $F_{cal}$  obtidos foram 1.80 para o padrão e 2.91 para a amostra de extrato fluido, sendo estes menores que o  $F_{tab(0,05)} = 3.71$ , não evidenciando falta de ajuste nos modelos no intervalo de 95% de confiança. Com base nos resultados de  $R^2$  e  $F_{cal}$ , pode-se concluir que o método apresentou uma relação linear entre a área e a concentração, dentro da faixa de aplicação estudada.



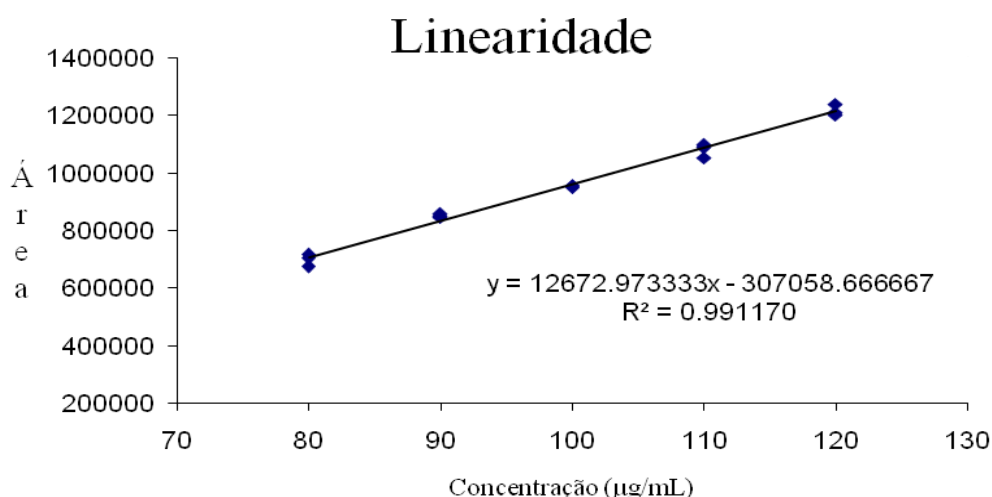


Figura 11: Representação da curva analítica e da equação para solução de padrão de  $\beta$ -escina por CLAE.

Tabela 18: Análise de variância dos dados da curva analítica para solução padrão de  $\beta$ -escina por CLAE.

Fonte	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
<b>Regressão</b>	4.8181E+11	1	4.8181E+11	1459.26*	4,67*
<b>Residual</b>	4.2923E+09	13	3.3018E+08		
<b>Falta de Ajuste</b>	2.7860E+09	3	5.0211E+08	1.80	3,71
<b>Erro Puro</b>	2.7860E+09	10	2.7860E+08	Não há falta de ajuste	
<b>TOTAL</b>	4.8181E+11	14	3.4722E+10		

SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: Média quadrática; \*Regressão estatisticamente significativa.

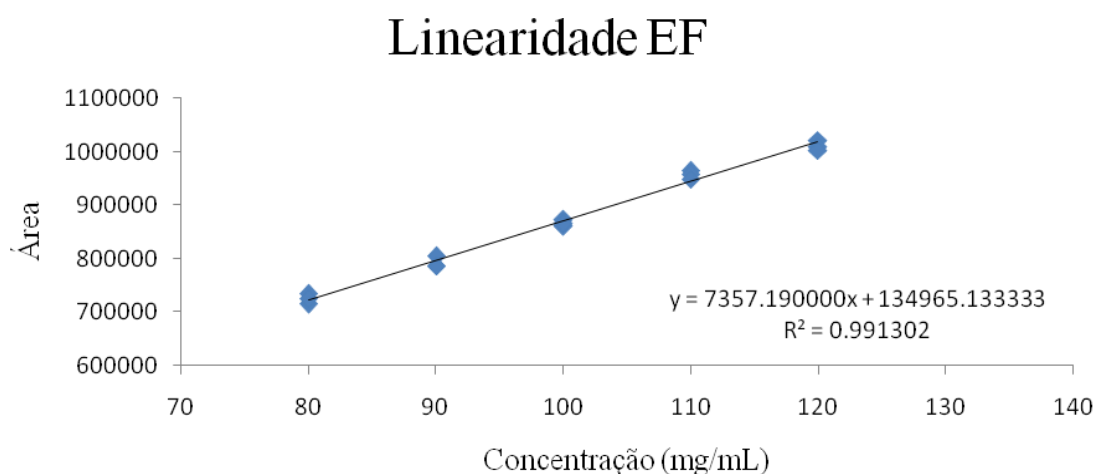


Figura 12: Representação da curva analítica e da equação para solução de extrato fluido de Castanha-da-Índia por CLAE.

Tabela 19: Análise de variância dos dados da curva analítica para solução de extrato fluido de Castanha-da-Índia por CLAE.

Fonte	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
<b>Regressão</b>	1,6238E+11	1	1,6238E+11	1481,65*	4,67*
<b>Residual</b>	1,4248E+09	13	1,0960E+08		
<b>Falta de Ajuste</b>	6,6398E+08	3	2,2133E+08	2,91	3,71
<b>Erro Puro</b>	7,6078E+08	10	7,6078E+07	Não há falta de ajuste	
<b>Total</b>	1,6381E+11	14	1,1701E+10		

SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: Média quadrática; \*Regressão estatisticamente significativa.

### Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme a fórmula presente nos itens 4.3.3. e 4.3.4, obtendo-se os respectivos valores de 5,00 µg/ml e 16,67µg/ml.

### Precisão

**Repetibilidade e Precisão Intermediária:** Os resultados obtidos com o parâmetro repetibilidade e precisão intermediária para o extrato fluido estão apresentados nas Tabelas 20 e 21. Verificou-se que os métodos têm repetibilidade e precisão apropriada, uma vez que todos os coeficientes de variação foram menores que 5%, limite estabelecido pela ANVISA. O coeficiente de variação também foi calculado analisando-se a precisão intra-dias e inter-dias, tendo valores menores que 3%, sendo estes satisfatórios.

Tabela 20: Resultado do ensaio de repetibilidade para o extrato fluido por CLAE.

Amostra	Teor EF (%)
<b>1</b>	101.38
<b>2</b>	99.63
<b>3</b>	99.79
<b>4</b>	100.00
<b>5</b>	100.47
<b>6</b>	101.62
<b>MD</b>	100.24
<b>DP</b>	0.84
<b>CV %</b>	0.84

Tabela 21: Resultados obtidos para verificação da precisão intermediária para o extrato fluido por CLAE com variação de dias e de analistas.

<b>Teor EF (%)</b>				
	<b>Analista 1</b>		<b>Analista 2</b>	
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>
<b>MD</b>	95.92	100.53	100.24	100.88
<b>DP</b>	1.37	1.40	0.84	1.23
<b>CV(%)</b>	1.43	1.39	0.84	1.22
		<b>Intra-dias</b>		
	<b>Dia 1</b>		<b>Dia 2</b>	
<b>MD</b>	98.56		100.34	
<b>DP</b>	2.03		1.01	
<b>CV(%)</b>	2.06		1.01	
		<b>Inter-dias</b>		
<b>MD</b>		100.34		
<b>DP</b>		1.81		
<b>CV(%)</b>		1.81		

### Exatidão

A exatidão foi demonstrada através do percentual de recuperação. Na Tabela 22 apresentam-se os resultados de exatidão obtidos para o extrato fluido, com o valor médio de 98.23%, estando este valor compreendido no intervalo de 98% a 102% recomendado pela legislação (BRASIL, 2003). O método desenvolvido para quantificação de  $\beta$ -escina no extrato fluido por CLAE demonstrou-se exato.

Tabela 22: Resultados obtidos para verificação da exatidão utilizando extrato fluido de Castanha-da-Índia por CLAE.

	<b>A<sub>F</sub></b>	<b>R<sub>F1</sub></b>	<b>R<sub>F2</sub></b>	<b>R<sub>F3</sub></b>
<b>[teórica] (µg/mL)</b>	89.47	99.57	109.67	119.77
<b>MD</b>	90.60	98.50	106.84	117.80
<b>DP</b>	1.55	0.73	0.64	0.32
<b>CV (%)</b>	1.72	0.75	0.60	0.27
<b>R (%)</b>	101.26	98.92	97.42	98.35
<b>RF(%)</b>		98.23		

A= soluções amostras de EF ; R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> = soluções de recuperação. RF= recuperação final obtida através da média das recuperações.

## Robustez

Os dados referentes à robustez do método estão apresentados na Tabela 23. Avaliaram-se, como fatores, a mudança no comprimento de onda e a mudança de fluxo no aparelho. Percebe-se que o menor teor encontrado foi resultante do experimento 1, em que ambos os fatores foram ajustados num nível baixo. Os outros resultados obtidos para os teores encontrados tiveram valor acima de 100%.

Os efeitos de cada interação foram calculados matricialmente de acordo com a estimativa dos erros-padrão e a significância calculada. Nenhum dos parâmetros avaliados produziu variações significativas nos vetores.

Pode-se observar que a simetria se manteve dentro dos limites aceitáveis ( $S < 2$ ), assim como a eficiência ( $N > 2000$ ).

O coeficiente de variação para o teor médio foi 1.55%, considerado satisfatório por apresentar-se menor que 5%. O método foi considerado robusto para os parâmetros avaliados.

Tabela 23: Planejamento fatorial  $2^2$  com ponto central para determinação de  $\beta$ -escina e avaliação da robustez por CLAE.

Ensaio	Parâmetros				
	$X_1$	$X_2$	Teor (%)	N	S
1	-1	-1	98.93	4039	1.604
2	1	-1	100.73	3684	1.725
3	-1	1	103.23	3456	1.829
4	1	1	103.09	3493	1.879
5	0	0	102.36	3397	1.800
6	0	0	102.87	3514	1.780
7	0	0	101.18	3504	1.882
	MD		101.77		
	DP		1.58		
	CV (%)		1.55		

$X_1$ : comprimento de onda;  $X_2$ : fluxo; N.: número de pratos teóricos; S: simetria do pico.

### 5.3. ELETROFORESE CAPILAR

#### Otimização do Sistema de Eletrólito

Para o início de desenvolvimento do método foram feitas pesquisas na literatura onde foram encontradas algumas evidências de solubilidade da  $\beta$ -escina (ARAÚJO, 2008). Na Tabela 24 estão apresentados resultados de solubilidade:

Tabela 24: Estudo comparativo de solubilidade da  $\beta$ -escina, realizado com a substância diluída a 1:10 em cada solvente. Fonte:(ARAÚJO, 2008).

<b><math>\beta</math> escina</b>	<b>Solubilidade</b>
Etanol	+/-
Água	-
Metanol	+/-
Acetona	-
Clorofórmio	+/-
Hexano	+/-
Óleo Oliva	-
Éter	-
Propilenoglicol	-
DMF	+
Glicerina	+/-
Tolueno	+/-
Água pH 3,0	-
Água pH 10,0	+

+ = solúvel; +/- = pouco solúvel; - = insolúvel

Pode-se observar que a  $\beta$ -escina é insolúvel em água, porém esta solubilidade é modificada conforme a variação do pH. A solubilidade é diretamente proporcional a variação do pH, aumentando com o aumento deste, como visto na tabela. A solubilidade da  $\beta$ -escina em pH básico se deve, provavelmente, a uma desprotonação ocorrida na hidroxila ligada ao ácido carboxílico presente na molécula. Isto faz com que a molécula adquira carga negativa e se torne solúvel no referido pH.

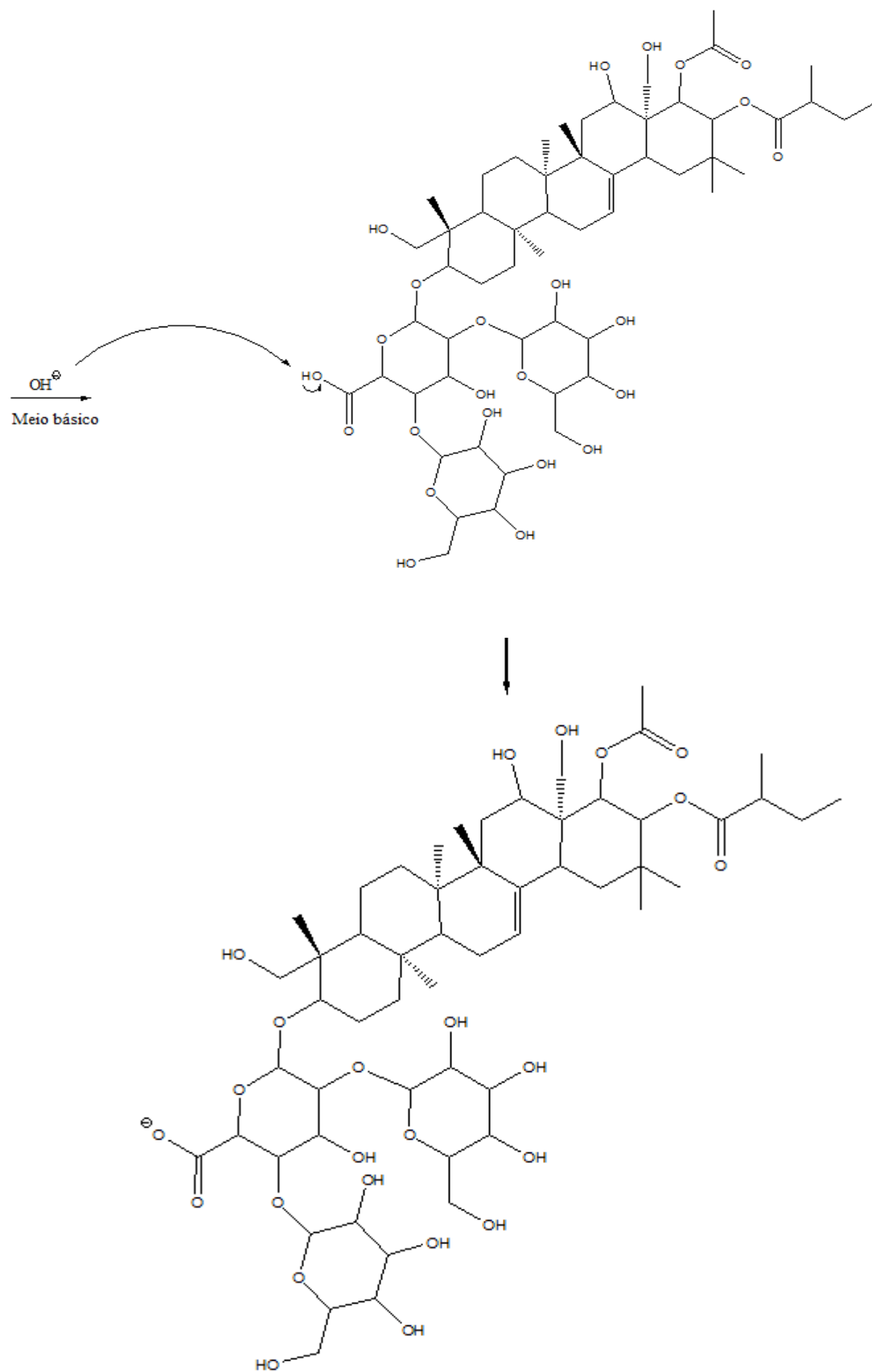


Figura 13: Representação da desprotonação ocorrida na molécula de  $\beta$ -escina em meio alcalino, MM 1101,38 g/mol.

Em eletroforese um dos tampões que oferecem a condição de pH próximo de 10,0 (especificamente pH 10,3 nesta metodologia) é o tampão de  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ . Este tampão foi escolhido para um teste inicial como eletrólito de corrida e de diluição das amostras. A concentração das soluções tampões usadas em eletroforese capilar varia tipicamente entre 5 e 200  $\text{mmol L}^{-1}$ . Deve-se ter cuidado na escolha da concentração do tampão, pois altas concentrações podem comprometer a separação, pelo excesso de calor decorrente do efeito Joule. Já as baixas concentrações podem aumentar a tendência de adsorção de certos solutos na parede do capilar e, portanto, ocasionar alargamento e distorção das bandas. Além disto, em baixas concentrações, o fluxo eletrosmótico pode se tornar errático, o que dificulta a reprodutibilidade dos tempos de migração e conseqüentemente prejudica a identificação precisa dos componentes de interesse (TAVARES, 1996).

Tabela 25: Fatores analisados no planejamento fatorial  $3^2$  para otimização do eletrólito usado em CE.

Variáveis	Fatores	Níveis		
		-1	0	+1
$X_1$	[Tampão] ( $\text{mmol L}^{-1}$ )	25	50	75
$X_2$	[NaOH] ( $\text{mol L}^{-1}$ )	0	0,1	0,2

Tabela 26: Planejamento fatorial  $3^2$  para otimização do eletrólito usado em CE para determinação de  $\beta$ -escina em extratos seco, fluido e glicólico de Castanha-da-Índia.

Ensaio	Parâmetros	
	$X_1$	$X_2$
1	-1	-1
2	0	-1
3	+1	-1
4	-1	0
5	0	0
6	+1	0
7	-1	+1
8	0	+1
9	+1	+1
10	0	0
11	0	0
12	0	0

Foram feitas injeções em diferentes diluições do padrão e das amostras, a fim de obter a melhor diluição para as análises posteriores. O tampão utilizado, a princípio, possuía concentração 50 mmol L<sup>-1</sup>. Percebeu-se que ao longo das análises, um pico do sistema ia se locomovendo através da linha base e às vezes prejudicava a integração do pico de interesse. Então para melhorar o sistema eletrólito, foi realizado um planejamento fatorial 3<sup>2</sup> com ponto central. Por se tratar de uma matriz complexa, considerou-se também o condicionamento do capilar entre as corridas, o que até então não ocorria. Assim, os fatores selecionados foram a concentração do tampão e o condicionamento do capilar com diferentes concentrações de NaOH entre corridas, sendo que o nível mais baixo representado por 0 em X<sub>2</sub> significa que não houve condicionamento. Nas Tabelas 25 e 26 apresentam-se os fatores, níveis e a matriz de planejamento fatorial.

As respostas dos experimentos foram analisadas qualitativamente, pois houve uma tentativa de análise quantitativa que não se mostrou satisfatória. Tentou-se verificar a resposta dos experimentos através de um fator de resposta que era composto pela seguinte fórmula:

$$R = \frac{N \times R_s}{DP_{lb} \times T_m}$$

em que N: Número de pratos teóricos

Rs: Resolução do pico de escina

DP<sub>lb</sub>: desvio padrão da linha base

T<sub>m</sub>: tempo de migração da escina

Este fator de resposta forneceu valores que indicavam experimentos visualmente inferiores como sendo aqueles com maior fator de resposta. Isto fez com que a análise qualitativa fosse escolhida em detrimento da análise quantitativa. Na Figura 14 as setas vermelhas indicam o pico do analito de interesse: a β-escina.

Os experimentos 1, 4 e 7 referem-se a concentração tampão 25 mmol L<sup>-1</sup>, os experimentos 2, 5 e 8 a concentração tampão a 50 mmol L<sup>-1</sup> e os experimentos 3, 6 e 9 a concentração tampão a 75 mmol L<sup>-1</sup>. O experimento 10 corresponde ao ponto central sendo este com concentração de tampão à 50 mmol L<sup>-1</sup>. Os experimentos 11 e 12 possuem eletroferogramas semelhantes ao do experimento 10, por se tratarem das mesmas condições experimentais e por isso não foram expostos.



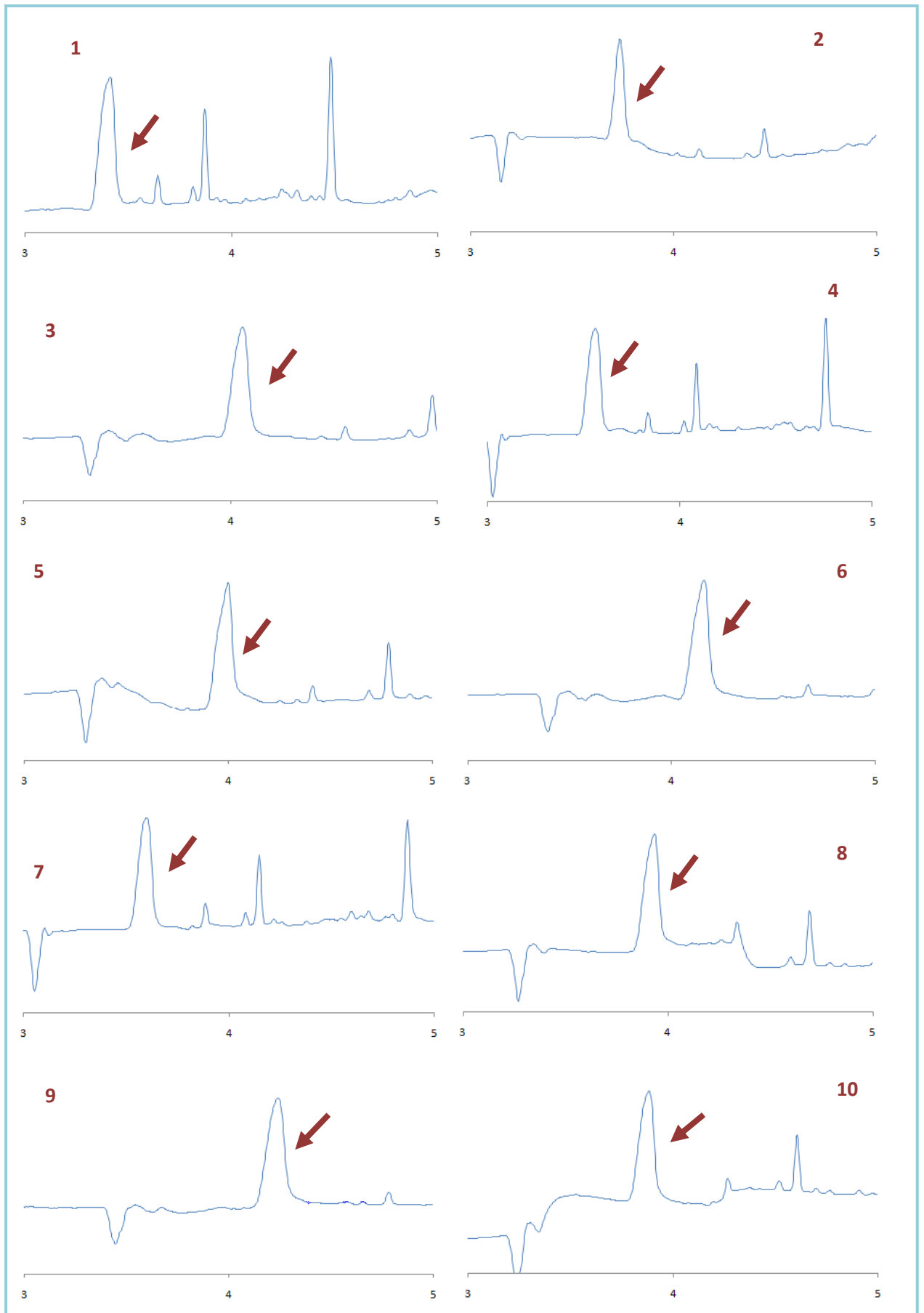


Figura 14: Eletroferogramas referentes à otimização do eletrólito.

Pode-se observar pelos eletroferogramas que há uma relação proporcional entre a concentração do tampão e o tempo de análise e uma relação inversamente proporcional com a largura dos picos. Concentrações maiores do tampão resultam em maior tempo de análise e em um alargamento na largura do pico.

Concentrações menores de tampão resultam em menor tempo de análise e em picos mais finos, com maior resolução.

Já a respeito do condicionamento do capilar entre as corridas, pôde-se observar que há uma relação inversa entre as concentrações de NaOH e o sinal de ruído da linha base. Observa-se que o condicionamento com NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup> entre as corridas fornece linhas bases com menor sinal de ruído.

Deste modo, por meio do experimento 7, utilizando tampão na concentração de 25 mmol L<sup>-1</sup> e condicionamento com NaOH 0,2 mol L<sup>-1</sup>, obteve-se o melhor perfil eletroforético, e por isso esta foi a condição escolhida para as análises subseqüentes utilizadas na validação do método. Após a escolha do eletrólito foram realizadas medidas de três amostras de cada extrato para que fossem definidas as concentrações de trabalho que seriam usadas nos parâmetros de validação.

Tabela 27: Avaliação da concentração de trabalho para os extratos fluido, glicólico e seco utilizando CE.

<b>Amostra</b>	<b>EF (µg/ml)</b>	<b>EG (µg/ml)</b>	<b>ES (µg/ml)</b>
<b>1</b>	542.13	518.58	206.39
<b>2</b>	520.80	514.38	207.67
<b>3</b>	546.32	507.67	196.02
<b>MD</b>	536.42	513.54	203.36
<b>DP</b>	13.69	5.51	6.38
<b>CV (%)</b>	2.55	1.07	3.14

### **Especificidade e Seletividade**

A figura abaixo mostra os eletroferogramas referentes ao padrão de β-escina e as amostra dos extratos à 100%. As setas vermelhas indicam o pico referente à β-escina. Podemos observar que no padrão há somente um pico. Os outros eletroferogramas apresentam vários picos referentes a outros compostos presentes nas amostras. O pico do analito de

interesse possui boa resolução, uma vez que não há co-eluição com nenhum outro componente presente na amostra, demonstrando assim a especificidade do método.

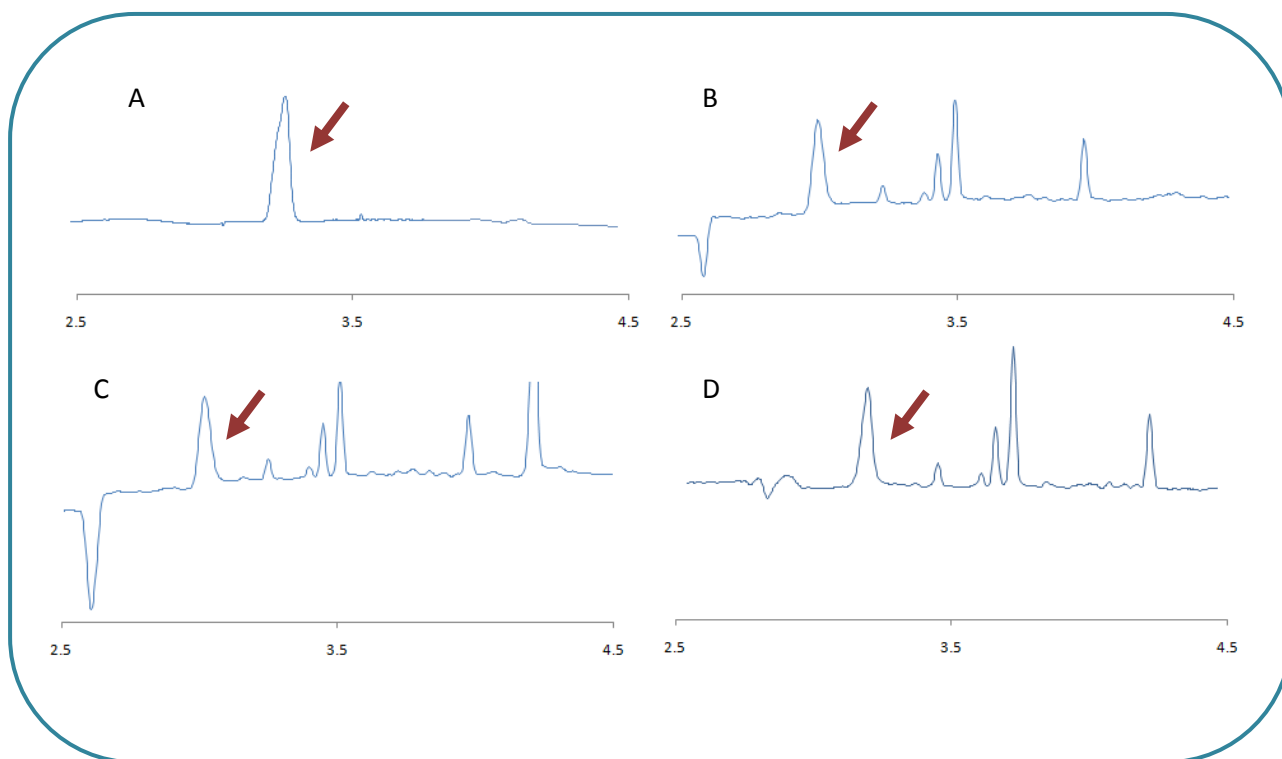


Figura 15: Eletroferogramas apresentados para verificação da especificidade e seletividade do método eletroforético. A: padrão de  $\beta$ -escina; B: amostra de extrato fluido; C: amostra de extrato glicólico; D: amostra de extrato seco (capilar 48,5cm; pressão 13mbar;  $\lambda$ : 226 nm; temperatura 20 °C; tempo de corrida 6 min)

### Linearidade

A linearidade do padrão foi avaliada através da análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados, observando as três curvas autênticas. Com os dados obtidos foram calculados o coeficiente de correlação e a equação da reta. A Figura 16 apresenta curva e sua equação da reta obtida pela regressão linear. O coeficiente de correlação encontrado foi de 0.9983, sendo este valor maior que 0,990 o que é um indicativo de um ajuste adequado dos dados. O teste estatístico apresentou valor de  $F_{\text{cal}} = 2.90$ , menor que o  $F_{\text{tab}} (0,05) = 3.26$ , não evidenciando falta de ajuste no modelo no intervalo de 95% de confiança. Com base nos resultados de  $R^2$  e  $F_{\text{cal}}$ , pode-se concluir que o método apresentou uma relação linear entre a área e a concentração, dentro da faixa de aplicação estudada (101,4 a 907,2  $\mu\text{g/mL}$ ).

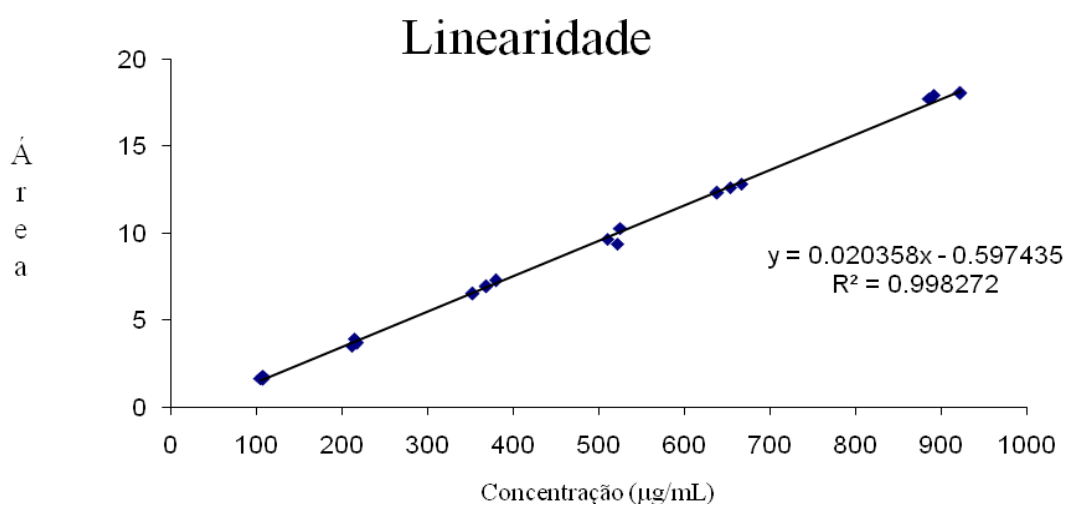


Figura 16: Representação da curva analítica e da equação para solução padrão de  $\beta$ -escina obtida por CE.

Tabela 28: Resultados estatísticos (ANOVA) para curva analítica de solução padrão de  $\beta$ -escina utilizando CE.

Fonte	SQ	GL	MQ	F <sub>calculado</sub>	F <sub>tabelado</sub>
<b>Regressão</b>	5.3259E+02	1	5.3259E+02	9242.15*	4.49*
<b>Residual</b>	9.2202E-01	16	5.7626E-02		
<b>Falta de Ajuste</b>	9.9070E-01	4	2.4767E-01	2.90	3.26
<b>Erro Puro</b>	1.0251E+00	12	8.5421E-02	Não há falta de ajuste	
<b>Total</b>	5.3351E+02	17	3.1383E+01		

SQ: Soma quadrática; GL: graus de liberdade; MQ: Média quadrática; \*Regressão estatisticamente significativa

### Limite de detecção e limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados conforme a fórmula presente nos itens 4.3.3. e 4.3.4, obtendo-se os respectivos valores de 11,63 µg/ml e 38,76µg/ml.

### Precisão

**Repetibilidade e Precisão intermediária:** Os resultados obtidos com os parâmetros de repetibilidade e precisão intermediária para os extratos (fluido, glicólico e seco) estão apresentados nas Tabelas 29 e 30, respectivamente. Os coeficientes de variação dos três extratos foram 2.29, 2.39 e 3.35 respectivamente. Estes valores demonstram boa repetibilidade do método, uma vez que os mesmos estão abaixo do valor de 5%. A precisão intermediária também se mostrou adequada obtendo valores para os três extratos dentro do limite estabelecido. A Figura 17 mostra os eletroferogramas obtidos na precisão intermediária

do método. Pode-se observar que os picos (setas alaranjadas) referentes às seis amostras encontram-se sobrepostos, corroborando a precisão do método.

Tabela 29: Resultado do ensaio de repetibilidade para os extratos analisados por CE.

Amostra	Teor EF (%)	Teor EG (%)	Teor ES (%)
1	102.65	103.43	95.16
2	101.07	99.47	96.39
3	105.27	98.86	101.35
4	106.26	99.94	102.73
5	101.85	96.03	94.54
6	106.58	100.10	95.89
MD	103.94	99.64	97.68
DP	2.38	2.38	3.47
CV%	2.29	2.39	3.55

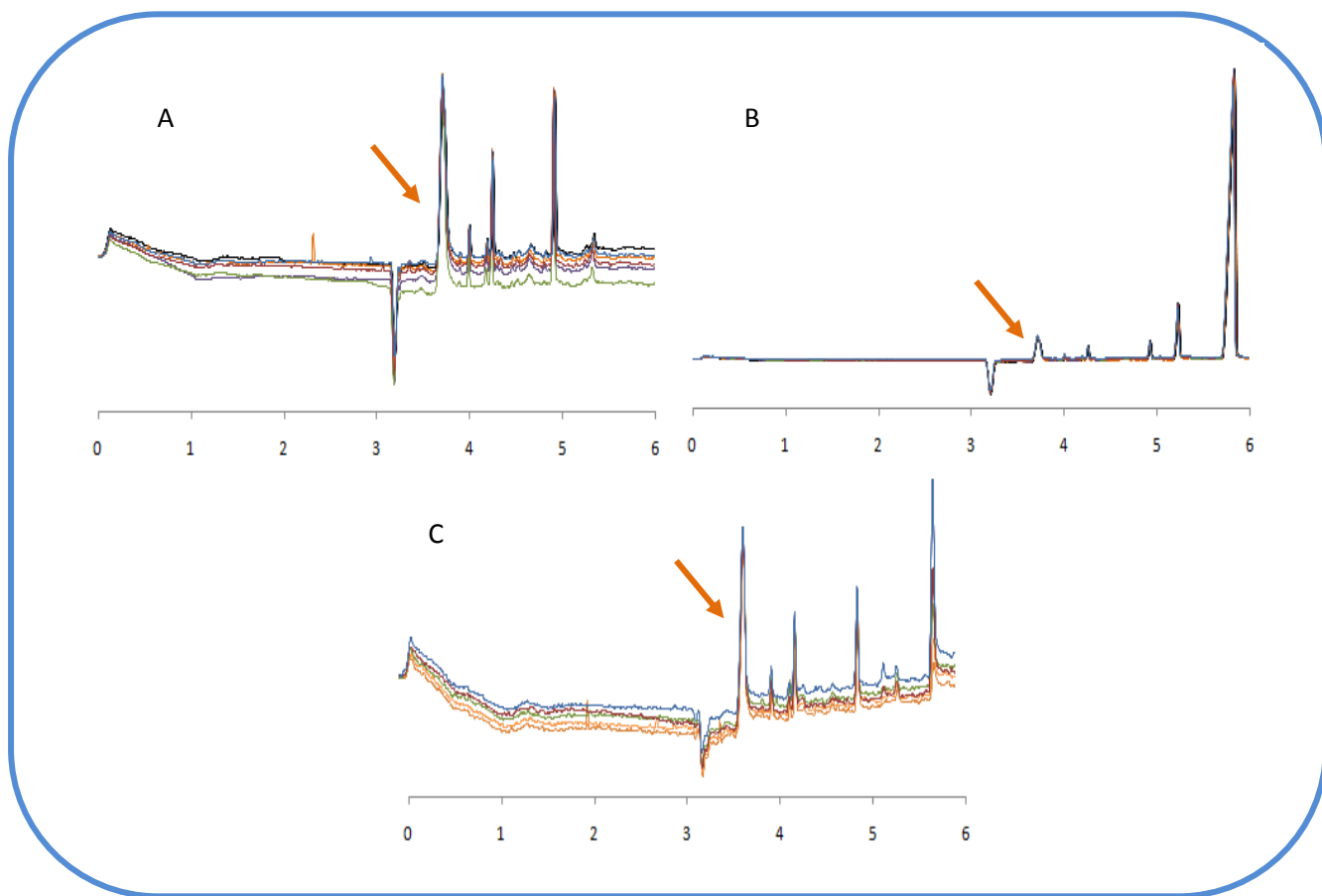


Figura 17: Superposição de eletroferogramas referentes às análises de  $\beta$ -escina para o ensaio de repetibilidade por CE. A: extrato fluido; B: extrato glicólico; C: extrato seco.

Tabela 30: Resultados dos ensaios de determinação de  $\beta$ -escina em extratos seco, fluido e glicólico de Castanha-da-Índia para verificação da precisão intermediária por CE.

<b>Teor EF (%)</b>				<b>Teor EG (%)</b>				<b>Teor ES (%)</b>				
<b>Dia</b>	<b>Analista 1</b>		<b>Analista 2</b>		<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>2</b>								
<b>MD</b>	104.7	97.8	100.6	103.3	99.6	102.2	99.8	97.7	97.3	101.8	100.0	98.7
<b>DP</b>	2.30	3.35	2.54	1.41	2.30	3.67	1.09	2.11	3.70	2.86	0.90	1.07
<b>CV</b>	2.21	3.43	2.53	1.36	2.31	3.59	1.09	2.15	3.80	2.81	0.90	1.08
<b>Intra-dias</b>				<b>Intra-dias</b>				<b>Intra-dias</b>				
<b>Dia</b>	<b>1</b>		<b>2</b>		<b>1</b>		<b>2</b>		<b>1</b>		<b>2</b>	
<b>MD</b>	102.38		100.58		99.70		99.97		98.64		100.32	
<b>DP</b>	3.15		3.90		1.89		3.88		3.15		2.78	
<b>CV</b>	3.07		3.88		1.89		3.88		3.19		2.77	
<b>Inter-dias</b>				<b>Inter-dias</b>				<b>Inter-dias</b>				
<b>MD</b>	101.48			99.83			99.48					
<b>DP</b>	3.59			2.99			3.03					
<b>CV</b>	3.53			2.99			3.05					

### Exatidão

Observa-se pela Tabela 31 que as médias de recuperação para todos os extratos estão contidas no intervalo de 90% a 104%, indicando exatidão satisfatória dos resultados. Dentre os extratos analisado, o extrato glicólico foi o que obteve maior percentual de recuperação por CE. Os valores obtidos para o extrato seco foram os mais próximos de 100%, isto pode ser devido a uma maior estabilidade físico-química deste extrato.

### Robustez

Os dados referentes à robustez do método estão presentes na Tabela 32. Avaliaram-se, como fatores, o tempo de injeção, voltagem e temperatura. O maior teor encontrado para os extrato fluido e seco foram o do experimento 9. Observa-se que os níveis de voltagem e temperatura eram baixos no experimento 9. Para o extrato glicólico o maior teor apresentado foi resultante do experimento 8, onde os níveis de tempo de injeção e temperatura eram altos no experimento 8. Os efeitos de cada interação foram calculados matricialmente de acordo com a estimativa dos erros-padrão e a significância calculada. Nenhuma interação dos parâmetros avaliados produziu variações significativas nos vetores.

Os coeficientes de variação para o teor apresentaram valores de 2.57%, 3.73% e 2.85% para os extratos fluido, glicólico e seco, respectivamente.

Tabela 31: Resultados de exatidão obtidos para os extratos fluido, glicólico e seco analisados.

	[Teórica] (µg/mL)	MD	DP	CV(%)	R(%)	R(%)
<b>A<sub>F</sub></b>	536.42	551.25	4.35	0.79	102.76	
<b>R<sub>F1</sub></b>	636.42	640.33	3.58	0.56	100.62	101.26
<b>R<sub>F2</sub></b>	686.42	687.11	1.89	0.28	100.10	
<b>R<sub>F3</sub></b>	736.42	758.93	2.56	0.34	103.06	
<b>A<sub>G</sub></b>	513.54	525.47	6.94	1.32	102.32	
<b>R<sub>G1</sub></b>	613.54	630.64	3.58	0.57	102.79	103.76
<b>R<sub>G2</sub></b>	663.54	694.60	1.89	0.27	104.68	
<b>R<sub>G3</sub></b>	713.54	740.79	2.56	0.35	103.82	
<b>A<sub>S</sub></b>	203.36	203.79	3.29	1.61	100.21	
<b>R<sub>S1</sub></b>	303.36	300.58	3.58	1.19	99.08	99.62
<b>R<sub>S2</sub></b>	353.36	346.90	1.89	0.55	98.17	
<b>R<sub>S3</sub></b>	403.36	409.88	2.56	0.63	101.62	

A= soluções amostras de EF, EG e ES; R<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>,R<sub>3</sub> = soluções de recuperação. RF= recuperação final obtida através da média das recuperações.

Tabela 32: Planejamento fatorial Box Behnken 3<sup>3</sup> com ponto central e teores obtidos de β-escina para avaliação da robustez do método CE.

Ensaio	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Teor		
				EF (%)	EG (%)	ES (%)
<b>1</b>	-1	-1	0	100.43	101.06	100.70
<b>2</b>	+1	-1	0	99.95	106.77	101.22
<b>3</b>	-1	+1	0	95.85	95.04	100.24
<b>4</b>	+1	+1	0	98.33	98.43	103.81
<b>5</b>	-1	0	-1	96.24	97.16	96.20
<b>6</b>	+1	0	-1	95.87	103.98	98.65
<b>7</b>	-1	0	+1	97.78	96.39	101.72
<b>8</b>	+1	0	+1	102.29	108.47	98.18
<b>9</b>	0	-1	-1	102.37	100.14	104.18
<b>10</b>	0	+1	-1	97.85	101.41	95.73
<b>11</b>	0	-1	+1	103.25	103.78	98.30
<b>12</b>	0	+1	+1	95.31	103.28	95.56
<b>13</b>	0	0	0	98.05	98.98	100.96
<b>14</b>	0	0	0	98.77	101.22	102.06
<b>15</b>	0	0	0	100.43	98.96	103.40
		<b>MD</b>		98.85	101.01	100.06
		<b>DP</b>		2.54	3.76	2.85
		<b>CV (%)</b>		2.57	3.73	2.85

X<sub>1</sub>: tempo de injeção; X<sub>2</sub>: voltagem; X<sub>3</sub>: temperatura.

As análises dos teores dos extratos confirmam que pequenas variações nos parâmetros estudados não interferem significativamente nas respostas monitoradas. Os coeficientes de variação apresentaram-se menores que 5% com relação aos valores referentes aos teores de  $\beta$ -escina encontrados nos extratos. Assim, conclui-se que o método é robusto nos intervalos investigados para os parâmetros avaliados.



## 6. QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS E COMPARAÇÃO DAS METODOLOGIAS ANALÍTICAS

As amostras de todos os extratos foram quantificadas. Os teores encontrados de  $\beta$ -escina utilizando-se as diferentes metodologias propostas encontram-se na tabela 33:

Tabela 33: Teor de  $\beta$ -escina de extratos fluido, glicólico e seco de Castanha-da-Índia, obtidos pelas diferentes metodologias propostas: UV-Vis, CLAE e CE.

Teor médio de $\beta$ -escina (%)			
Extrato	UV-Vis	CLAE	CE
Fluido	0.70	0.45	0.54
Glicólico	0.19	_____	0.17
Seco	_____	_____	4.04

Observa-se que o extrato seco é o que possui o maior teor de  $\beta$ -escina, sendo este praticamente oito vezes maior do que o encontrado no extrato fluido e aproximadamente vinte vezes maior do que o encontrado no extrato glicólico. Isto se deve provavelmente a maior estabilidade físico-química apresentada por extratos secos de um modo geral.

O valor encontrado para o teor de  $\beta$ -escina no extrato seco está de acordo com o laudo do fornecedor, que especifica um intervalo entre 3.0 e 4.5%.

O baixo teor encontrado no extrato glicólico, pode ser justificado devido ao solvente utilizado, pois a mistura propilenoglicol/água, provavelmente tem menor poder de extração quando comparado à mistura etanol/água.

Pode-se observar também que há uma diferença menor entre os valores encontrados para o teor de  $\beta$ -escina referentes às amostras de extrato glicólico, nos métodos UV-Vis e CE, quando comparados aos valores encontrados para as amostras de extrato fluido utilizando as mesmas técnicas analíticas.

Apesar de possuir menor poder de extração, a mistura propilenoglicol/água deve ser mais seletiva para as saponinas triterpênicas, pois os valores encontrados nas duas técnicas analíticas são mais próximos que os encontrados pelas mesmas técnicas analisando o extrato fluido. A mistura etanol/água tem alto poder de extração. A maioria dos metabólitos secundários presentes nos vegetais superiores podem ser extraídos com a mistura etanol/água,

o que implica numa menor seletividade por parte do solvente. Como a Castanha-da-Índia é uma espécie que possui grande variedade de outros componentes químicos como flavonóides, taninos, fenóis, é provável que estes estejam presentes em maior quantidade no extrato fluido, devido ao exposto acima. Assim, no momento de adição do reagente de Lieberman, é possível que estes outros compostos tenham sido complexados, juntamente com a  $\beta$ -escina. Como estão presentes em maior quantidade, houve a maior disparidade entre os valores encontrados pelas técnicas espectrofotométrica e CE para o extratos fluido.

Calculou-se o teor de  $\beta$ -escina pelos diferentes métodos desenvolvidos para a amostra de extrato fluido.

A título de comparação usou-se o extrato fluido, pois este foi o único extrato que foi validado para todos os métodos. Foram usadas doze réplicas autênticas do extrato para cada método proposto. Os teores apresentados na Tabela 33 são referentes à média das doze réplicas.

Primeiramente, foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk que visa reconhecer se a amostra provém de uma população normal. Os valores para  $W_{cal}$  foram 27.22; 33.27 e 12.81; respectivamente para UV-Vis, CLAE e CE. O valor para  $W_{tab(0,05)}$  foi de 0.859, sendo todos os valores encontrados para  $W_{cal}$  maiores que este valor. Logo, todas as metodologias obedecem à uma distribuição normal, uma vez que o valor de  $W_{cal}$  deve ser maior que o valor de  $W_{tab}$ .

As análises estatísticas subsequentes foram feitas com agrupamento de duas metodologias por teste, ficando assim distribuídas: espectrofotometria x CLAE; CE x CLAE e UV-Vis x CE.

A segunda análise estatística foi feita através do teste F. Os valores encontrados para o  $F_{cal}$  foram de 6.78, 4.26, e 6.28 para os conjuntos de dados CE x CLAE, CE x UV-Vis e CLAE x UV-Vis, respectivamente. O valor para o  $F_{tab(0,05)}$  foi de 2.87. Todos os valores de  $F_{cal}$  obtiveram valores maiores que o de  $F_{tab(0,05)}$  indicando que as variâncias eram diferentes.

Adicionalmente, o próximo teste estatístico realizado foi o teste-t de Student presumindo variâncias diferentes. Os valores encontrados para o  $t_{cal}$  foram de 12.49; 19.81 e 57.32 para os conjuntos de dados CE x CLAE, CE x UV-Vis e CLAE x UV-Vis respectivamente e o valor para o  $t_{tab(0,05)}$  foi de 2.201.

Assim, como o valor de  $t_{cal}$  foi maior que o de  $t_{tab(0,05)}$ , há uma indicação de diferença estatística entre os métodos propostos.

O intervalo de confiança a 95% para os métodos propostos também foi calculado, utilizando as mesmas amostras dos testes estatísticos anteriores. O intervalo de confiança é uma amplitude de valores que está associado a um nível de significância para determinado parâmetro populacional. Nele está contido o verdadeiro valor da população. Os valores calculados são demonstrados a seguir:

Tabela 34: Intervalos de confiança obtidos para os métodos propostos para determinação de  $\beta$ -escina em extrato fluido de Castanha-da-Índia para as diferentes metodologias propostas por UV-Vis, CLAE e CE.

	<b>IC<sub>(0.05)</sub></b>	<b>Mínimo</b>	<b>Máximo</b>
<b>UV-Vis</b>	0.46	0.24	1.15
<b>CLAE</b>	0.29	0.16	0.73
<b>CE</b>	0.33	0.21	0.87

Observa-se que os valores para os intervalos de confiança decrescem na seguinte ordem para as técnicas: UV-Vis, CE e CLAE. Estes valores já eram esperados uma vez que a técnica CLAE é a mais sensível e demonstrou ser a mais precisa, pois apresentou os dados mais uniformes e por isso obteve um valor de intervalo de confiança menor. A técnica espectrofotométrica apresenta uma probabilidade de erros experimentais maior obtendo assim um intervalo de confiança igualmente maior.

O laudo fornecido pelo fabricante foi utilizado para se ter um valor de referência da especificação, uma vez que este valor não está presente em nenhum compêndio oficial. Este laudo apresentou um valor declarado de 0.47% de  $\beta$ -escina para o extrato fluido. Pode-se observar que todos os valores apresentados pelas diferentes metodologias contém este valor. De tal modo, todas as metodologias podem ser utilizadas para se fazer a quantificação de  $\beta$ -escina no extrato fluido.

Também foi calculado o teor de  $\beta$ -escina para a amostra de extrato glicólico. Foram comparados os métodos espectrofotométrico e eletroforético utilizando doze réplicas autênticas do extrato para cada método proposto. Os teores apresentados na Tabela 33 são referentes à média das doze réplicas.

Foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, sendo que os valores encontrados para  $W_{cal}$  foram de 50.56 e 114.04; respectivamente para CE e espectrofotometria UV-Vis. O valor para  $W_{tab(0,05)}$  foi de 0.859, sendo todos os valores encontrados para  $W_{cal}$  maiores que este valor. Logo, os resultados obtidos a partir das duas metodologias obedecem à uma distribuição normal, uma vez que o valor de  $W_{cal}$  deve ser maior que o valor de  $W_{tab}$ .

Para comparação dos métodos foi feito o teste F. O valor encontrado para o  $F_{cal}$ , foi de 2.12 e o valor de  $F_{tab(0,05)}$  foi de 2.87. Como o valor de  $F_{cal}$  foi menor que o de  $F_{tab(0,05)}$ , as variâncias foram consideradas iguais.

O teste-t de Student foi realizado subsequentemente. De acordo com o teste F anterior, o teste-t de Student foi realizado presumindo variâncias iguais para as amostras. O valor encontrado para o  $t_{cal}$ , foi de 10.29 e o valor para o  $t_{tab(0,05)}$  foi de 2.201. Como o valor de  $t_{cal}$  foi maior que o de  $t_{tab(0,05)}$ , há uma indicação de diferença estatística entre os métodos espectrofotométrico e eletroforético para a amostra de extrato glicólico.

O intervalo de confiança a 95% também foi calculado. Os valores calculados são demonstrados a seguir:

Tabela 35: Intervalos de confiança obtidos para os métodos propostos para determinação de  $\beta$ -escina em extrato glicólico de Castanha-da-Índia para as diferentes metodologias propostas por UV-Vis e CE.

	$IC_{(0,05)}$	Mínimo	Máximo
<b>Espectrofotometria</b>	0.11	0.08	0.30
<b>CE</b>	0.10	0.07	0.27

Como era esperado a técnica de eletroforese capilar demonstrou ser mais precisa por apresentar um menor intervalo de confiança, apesar de ambas as técnicas possuem resultados muito próximos.

O laudo fornecido pelo fabricante não possuía informação sobre o doseamento de  $\beta$ -escina no extrato glicólico. Assim não houve um valor de referência da especificação para comparação com os intervalos de confiança obtidos.

Os diferentes métodos apresentam vantagens e desvantagens, que foram analisadas e são apresentadas resumidamente na tabela 36.

A espectrofotometria UV-Vis é uma das técnicas mais utilizadas nas determinações analíticas. A técnica é aplicada nas mais diversas áreas, não sendo difícil o acesso ao equipamento, provavelmente por possuir um baixo custo se comparado aos outros aparelhos mais sofisticados usados na química analítica. Esta técnica é também bastante consolidada e tem uso abrangente, sendo estas as maiores vantagens oferecidas pela espectrofotometria Uv-Vis.

O método proposto por esta técnica utiliza uma quantidade elevada de solventes orgânicos como ácido acético glacial, propanol, clorofórmio e éter. O preparo das amostras é

demorado e exige muitas etapas, o que favorece erros experimentais por parte do analista. O tempo de análise é pequeno, mas considerando o tempo total, desde o preparo das amostras até a leitura, este tempo aumenta consideravelmente.

Tabela 36: Comparação dos métodos desenvolvidos para determinação de  $\beta$ -escina em extrato fluido de Castanha-da-Índia para as diferentes metodologias propostas por UV-Vis, CLAE e CE.

<b>UV-Vis</b>	<b>CLAE</b>	<b>CE</b>
Baixo custo	Custo elevado	Custo elevado
Equipamento mais acessível	Equipamento menos acessível	Equipamento menos acessível
Grande quantidade de solventes	Grande quantidade de solventes	Tampão aquoso
Tempo total de análise longo	Tempo total de análise longo	Tempo total de análise curto
Teor $\beta$ -escina 0.70%	Teor $\beta$ -escina 0.45%	Teor $\beta$ -escina 0.54%
LD = 5,6 $\mu\text{g/ml}$	LD = 5,00 $\mu\text{g/ml}$	LD = 11,63 $\mu\text{g/ml}$
LQ = 18,75 $\mu\text{g/ml}$	LQ = 16,67 $\mu\text{g/ml}$	LQ = 38,76 $\mu\text{g/ml}$

Os valores obtidos para os limites de detecção e quantificação se mostraram concordantes com os obtidos pela CLAE. Estes valores foram pequenos, o que é desejável para uma boa técnica analítica.

Apesar de ter fornecido o maior teor de  $\beta$ -escina no extrato fluido, provavelmente isto se deve a uma menor seletividade do método espectrofotométrico. Isto porque a complexação com o cloreto férrico também pode ocorrer com outros componentes presentes na amostra, aumentando assim o valor do teor encontrado. Mas isto não impede o uso da técnica, já que a mesma possuiu intervalo de confiança contendo o valor de referência, assim como as outras técnicas analíticas.

A CLAE tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas dos últimos anos. Diferentes detectores foram acoplados a este equipamento permitindo a separação dos mais diversos analitos e aprimorando ainda mais a técnica. A CLAE está bastante difundida nos meios analíticos, porém devido ao custo de aparelhagem elevado, a técnica não esteja tão presente nos laboratórios analíticos que possuem recursos financeiros limitados. A necessidade de treinamento técnico para utilização do aparelho, também diminui o número de

adeptos desta técnica. As colunas utilizadas no aparelho têm custo elevado, o que conseqüentemente aumenta o custo das análises.

O método proposto para quantificação da  $\beta$ -escina através da CLAE, assim como acontece com a espectrofotometria UV-Vis, utiliza uma grande quantidade de solventes orgânicos. Por se tratar de uma técnica muito sensível, a injeção da amostra sem tratamento não foi possível, pois danificaria a coluna cromatográfica, mesmo com o uso de uma pré-coluna. Além disto, dificilmente se conseguiria uma resolução satisfatória do pico de  $\beta$ -escina no extrato fluido sem um tratamento prévio, pois as diversas substâncias presentes poderiam co-eluir, prejudicando assim a quantificação do analito de interesse, ou gastaria-se um tempo maior para que a otimização do método fosse eficaz. O tempo de análise é curtíssimo, de apenas 2 min. Porém se considerarmos o tempo total, desde a preparação até a injeção da amostra, este tempo tem aumento significativo. O teor de  $\beta$ -escina encontrado foi de 0.44%. Apesar deste valor ter se apresentado inferior aos demais, esta técnica tem grande sensibilidade e é a técnica de referência, de uma maneira geral, para diversos ensaios realizados em controle de qualidade. Os limites de detecção e quantificação forneceram menores valores encontrados dentre as três metodologias propostas.

A CE é uma técnica muito recente na química analítica. A aparelhagem utilizada atualmente surgiu a menos de 30 anos. A capacidade de separação analítica e os novos detectores que estão sendo acoplados ao instrumento, fazem com que esta técnica desperte o interesse dos analistas e se torne continuamente mais desejada e promissora. Entretanto, esta técnica ainda não está muito difundida e o seu equipamento não é usado de maneira corriqueira pelos laboratórios de controle de qualidade.

As análises têm custo maior do que aquelas realizadas por UV-Vis, porém possuem custos menores que as utilizando CLAE, uma vez que o gasto com reagentes e capilares, tende a ser menor do que os gastos com colunas cromatográficas e solventes analíticos de grau cromatográfico.

O método proposto utilizando a CE possui vantagens valiosas quando se referem às soluções utilizadas, pois todas as amostras foram diluídas com tampão aquoso, não utilizando nenhum solvente orgânico. Este procedimento vai ao encontro às novas tendências da química analítica que procuram, reduzir ou eliminar os solventes orgânicos, buscando procedimentos que atendam a chamada “Green Chemistry” ou “Química Verde”.

A química sustentável ou química verde pode ser definida como: “A criação, o desenvolvimento e a aplicação de produtos e processos químicos para reduzir ou eliminar o

uso e a geração de substâncias tóxicas”. Esta proposta requer uma nova conduta química para o aprimoramento dos processos, com o objetivo fundamental da geração cada vez menor de resíduos e efluentes tóxicos, bem como da menor produção de gases indesejáveis ao ambiente. Além dos benefícios ambientais, tal pensamento apresenta também um impacto econômico graças à diminuição de gastos com o armazenamento e tratamento de resíduos, a descontaminação e o pagamento de indenizações (CLARK, 1999; TUNDO et al., 2000).

O preparo das amostras utilizadas no método é muito simples, consistindo em apenas uma diluição em tampão aquoso. O método também possui um excelente tempo de análise de 3 a 4 minutos. O teor encontrado nas amostras foi 0.54% sendo este valor menor do que o encontrado para o método espectrofotométrico, uma vez que este último tem uma seletividade menor e por isso possui valores maiores; e superior à CLAE, o que talvez se deva ao fato de haver alguma pequena perda durante o processo de extração anterior à análise.

Os limites de detecção e quantificação foram os mais altos encontrados utilizando-se as diferentes técnicas. Os valores são o dobro dos encontrados utilizando a CLAE, a metodologia que possuiu menores valores destes limites, no entanto, ainda assim, estes valores são relativamente pequenos, se encontrando na mesma ordem de grandeza de  $10^{-6}$ .

Assim, vê-se que cada técnica oferece um benefício: a espectrofotometria UV-Vis possui o menor custo e maior acesso, a CLAE oferece menores limites de detecção e quantificação com alta sensibilidade e a CE oferece menor quantidade de resíduos e tempo total de análise mais curto.

## 7. CONCLUSÕES

O método para determinação de  $\beta$ -escina nos extratos fluido, glicólico e seco de Castanha-da-Índia foi proposto e validado conforme a resolução 899/2003. As diferentes metodologias analíticas demonstraram ser precisas, lineares, robustas, exatas e seletivas.

Os extratos glicólico e seco, em experimentos futuros, deverão ser submetidos ao doseamento utilizando CLAE para a comparação com o método desenvolvido por CE.

Os métodos propostos apresentaram vantagens e desvantagens, devido tanto a particularidades de cada técnica analítica quanto aos resultados específicos obtidos, no entanto todos apresentam concordância com os dados do fabricante, de tal modo que todos podem ser utilizados.

Os métodos desenvolvidos podem ser uma alternativa para o controle de qualidade da  $\beta$ -escina em extratos fluido, glicólico e seco de Castanha-da-Índia em Indústrias Farmacêuticas, uma vez que não há monografias nos compêndios oficiais para sua quantificação.



## 8. REFERÊNCIAS

- ACCAME, M.E.C. Terpenos III: triterpenos y esteróides. **Panorama Actual Del Medicamento**, v.25, n.240, p.124-130, 2001.
- AMARAL, F.M.M.; COUTINHO, D.F.; RIBEIRO, M.N.S. & OLIVEIRA, M.A. Avaliação da qualidade de drogas vegetais comercializadas em São Luís/ Maranhão. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.13, p. 27-30. 2003.
- AQUINO NETO, F.R.; NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 187 p., 2003.
- ARAÚJO, C. B. F.; **Síntese de Derivados Solúveis de  $\beta$  Escina e Algumas Avaliações Físico-Químicas e Biológicas**. p.88, São Paulo, 2008.
- ARAÚJO, M. Farmacoterapia nas doenças vasculares periféricas. In: PITTA, G.B.B.,CASTRO, A.A., BURIHAN, E., eds. **Angiologia e cirurgia vascular: guia ilustrado**. Maceió: UNCISAL/ECMAL & LAVA, 2003. pt.14, cap.73. Disponível em: [http://www.lava.med.br/livro/pdf/marcelo\\_farmacoterapia.PDF](http://www.lava.med.br/livro/pdf/marcelo_farmacoterapia.PDF). Acesso em: 15 junho 2011.
- BAKER D.R., **Capillary electrophoresis**. New York: John Wiley. 1995, 244 p.
- BARBOSA, M.C.S.; BELLETTI, K.M.; CORRÊA, T.F.; SANTOS, C.A. Avaliação da qualidade de folhas de boldo-do-chile (*Peumus boldus* Molina) comercializadas em Curitiba, PR. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 11, n. 1, p. 1-4, 2001.
- BAYNE C.K., RUBIN I.B., **Practical experimental designs and optimization methods for chemists**. Deerfield Beach: VCH Publischer 1986, 205p.
- BECKER, K. et al. The biological action of saponins in animal systems: a review. **Brazilian Journal of Nutrition**, v.88, p.587-605, 2002.
- BELLO, C.M.; MONTANHA, J.A.; SCHENKEL, E.P. Análise das bulas de medicamentos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2002; 12(02):75-83.
- BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P.; GRIFFINI, A. *Aesculus hippocastanum* L. **Fitoterapia**, v.6, p.483-511, 1996.

BONATO, P.S. Recent advances in the determination of enantiomeric drugs and their metabolites in biological fluids by capillary electrophoresis-mediated microanalysis. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 24, p. 4078-4094, 2003.

BOONE, C.M.; WATERVAL, J.C.M.; LINGEMAN, H.; ENSING, K.; UNDERBERG, W.J.M. Capillary electrophoresis as a versatile tool for the bioanalysis of drugs – a review. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 20, p. 831-863, 1999.

BRANDÃO, M. G.; FREIRE, N.; SOARES, C. D. V. Vigilância de fitoterápicos em Minas Gerais. Verificação da qualidade de diferentes amostras comerciais de camomila. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 3, p. 613-616, jul./set. 1998.

BRANDÃO, M.G.L.; ALVES, R.M.S.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, P.; VIEIRA, M.T.; MOREIRA-CAMPOS, L.M. Qualidade de amostras comerciais de chás de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.5, n.1, p.56-59, 2002.

BRASIL, **FARMACOPÉIA BRASILEIRA**. 4 ed. Parte I. São Paulo: Ateneu, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 899 de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 29 mai. 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RDC nº 48 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 16 março 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Proposta de Política de medicina natural e práticas complementares no SUS**. Brasília, 2005. 49 p.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Resolução RE n. 89 – **Lista para registro simplificado de fitoterápicos**. 16 de março de 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, RE nº 60 de 17 de abril de 2010. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 17 abril. 2010.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (Phytotherapeutic Agents). **Brazilian Journal of Medicinal Biology Research**, v.33, n.2, p.179-89, 2000.

CANIGUERAL, S.; VANACLOCHA, B. **Fitoterapia: Vademecum de Prescripció**n. 4. ed., Barcelona: Masson, 2003. 1091p.

CARVALHO, A.B.C. et. al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 18: 314-319, 2008.

CASS, Q.B.; DEGANI, A.L.G. **Desenvolvimento de métodos por HPLC: fundamentos, estratégias e validação**. São Carlos: Ed. UFSCar, 77p, 2001.

CIOLA, R. **Fundamentos de Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho**. 1. ed. São Paulo: Edgard Blücher LTDA, 1998. 178 p.

CLARK, J. H.; **Green Chemistry**. 1999.

CLARKE, N. A. Surface memory effects in liquid crystals: Influence of surface composition. **Physical Review Letter**, v.55, p.292 - 295, 1985.

COLLINS, C.H., BRAGA, G.L., BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos**. Campinas:UNICAMP, p.183-238,1995.

CORNELL J.A., **Experiments with Mixtures: Designs, Models and the Analysis of Mixture Data**. New York, John Wiley & Sons, Inc., 1990.

COSTANTINI, A. Escin in pharmaceutical oral dosage forms: quantitative densitometric HPTLC determination. **Farmaco**, v.54, p.728-732, 1999.

CUNHA, A.P. **Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes activos e fitoterapia**. 2003 Disponível em: <http://www.antoniopcunha.com.sapo.pt> Acesso em: 02 julho 2011.

DANZER, K.; CURRIE, L. A.; Guidelines for calibration in analytical chemistry. Part I. Fundamentals and single component calibration (IUPAC recommendations 1998). **Pure and Applied Chemistry**, England, v.70, n.4, p. 993-1014, april. 1998.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH. Eingestellter Rokastaniensamenrockenextrakt. **Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart**. Govi- Verlag, Pharmazeutischer Verlag Eschborn, 2004 a.

DEUTSCHES ARZNEIBUCH. Rokastaniensamenrockenextrakt. **Deutscher Apotheker-Verlag Stuttgart**. Govi- Verlag, Pharmazeutischer Verlag Eschborn, 2004 b.

DUARTE, M.R.; LIMA, M.P. Análise farmacopéia de amostras de camomila –*Matricaria recutita* L., Asteraceae. **Revista Visão Acadêmica**, v.4, n.2, p. 89-92, 2003.

DWECK, A.C. **Functional botanicals: their chemistry and effects**. In: INTERNATIONAL COSMETIC EXPO™, Miami, 2000. Disponível em: [http://www.dweckdata.com/Published\\_papers/ICE2000.pdf](http://www.dweckdata.com/Published_papers/ICE2000.pdf) Acesso em: 28 agosto, 2011.

FEKETE, A.; SCHMITT-KOPPLIN, P. Capillary Electrophoresis. In: PICÓ, Y. **Food Toxicants Analysis**. Elsevier Inc., cap. 15, p. 561-597, 2007

FERREIRA, S. L. C., BRUNS, R. E., DA SILVA, E. G. P., DOS SANTOS, W. N. L., JARDIM, I. C. S. F., NETO, B. B. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **J Chromatogr A**. 1158, 2- 14, 2007.

FERRUCCIO, B.; OMINI, C.; LONGIAVE, D. The mode of action of aescin and the release of prostaglandins. **Prostaglandins**, v.14, n.2, p.241-249, 1977.

FRAZIER, R. A.; AMES, J. M.; NURSTEN, H. E. **Capillary electrophoresis for food analysis: Method development**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2000.

GORE, M. G. **Spectrophotometry and Spectrofluorimetry: A Practical Approach**. 2ª ed. Oxford: Oxford University Press, 2000. 368 p. I.S.B.N. 0199638128, 9780199638123.

GOTTLIEB, O. R., KAPLAN, M. A. Das plantas medicinais aos fármacos naturais. **Ciência Hoje** v.15, p.51-54, 1993.

GREEN, J. M. A practical guide to analytical method validation. **Analytical Chemistry News & Features**, v. 68, n. 9, p. 305A-309A, 1996.

GUERRA, E. A. **Desenvolvimento e Validação de Metodologia Analítica aplicados à forma farmacêutica sólida de *Aesculus hippocastanum L.*** 82p. Recife, 2009.

GUILLAUME, M.; PADIOLEAU, F. Veinotonic effect, vascular protection, antiinflammatory and free radical scavenging properties of horse chestnut extract. **Arzneimittel Forschung**, v.44, n.1, p.25-35, 1994.

GUZMAN, N. A., **Capillary Electrophoresis Technology**. New York, 1993.

HADLEY, M.; GILGES, M.; SENIOR, J.; SHAH, A.; CAMILLERI, P. Capillary electrophoresis in the pharmaceutical industry: applications in discovery and chemical development. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 745, p. 177-188, 2000.

HARAKUWE, A.H., Haddad, P.R. **Journal of Chromatography A**,v. 834, p.213-233, 1999.

HEMPEL, G. Strategies to improve the sensitivity in capillary electrophoresis for the analysis of drugs in biological fluids. **Electrophoresis**, Weinheim, v. 21, p. 691-698, 2000.

HORVATH, J., Dolnik, V. **Electrophoresis**, v. 22, p. 644-655, 2001.

HUANG, Y.F., et al. **Electrophoresis**, v. 27, p. 3503-3522, 2006.

HUBNER, G.; WRAY, V.; NAHRSTEDT, A. Flavonol oligosaccharides from the seeds of *Aesculus hippocastanum*. **Planta Medica**, v.65, p.636-42, 1999.

ICH Steering Committee. **Validation of analytical procedures: methodology**. In: International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; Geneva; 1996. Incorporated in November 2005. Disponível em URL: <http://www.ich.org>. acesso em: 12 abril de 2011.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos**. p. 1-35, março, 2003.

JAGER, A.V., TAVARES, M.F.M. **Química Nova**, v. 24, p. 363-373, 2001.

JÚNIOR, C.; STREMEL, D. P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, n. 1, p. 29-39, jan./jun. 2004.

KLEIN, E. J., RIVERA, S. L. (2000). A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. **J Liq Chromatogr R T** 23, 2097-2121.

KOROLKOVAS, A. A riqueza potencial de nossa flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, n.1, p.1-7, 1996.

LA ROCA, M.F.; SOARES SOBRINHO, J.L.; NUNES, L.C.C.; ROLIM NETO, P.J. Desenvolvimento e validação de método analítico: passo importante na produção de medicamentos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.88, n.4, p.177-180, 2007.

LANDERS J.P., **Handbook of capillary electrophoresis**. Boca Raton: CRC Press, p. 649, 1994.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4 ed., Campinas: Editora Átomo, 2002, 278 p.

LORENZ, D.; MAREK, M.L. Das therapeutische wirksame Prinzip der Rosskastanie (*Aesculus hippocastanum*). **Arzneimittel Forschung**, v.10, p.263-72, 1960.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-38, 2002.

MALLAMPATI, S.; PAUWELS, J.; HOOGMARTENS, J.; VAN SCHEPDAEL, A. CE in impurity profiling of drugs. **Separation Science and Technology**, Philadelphia, v. 9, p. 259-315, 2008.

MARTINDALE: **Guia Completo de Consulta Fármaco-Terapêutica**. Barcelona: Pharma, 2003. p.1766.

MATSUDA, H.; LI, Y.; MURAKAMI, T.; NINOMIYA, K.; YAMAHARA, J.; YOSHIKAWA, M. Effects of escins Ia, Ib, IIa and IIb from horse chestnut, the seeds of *Aesculus hippocastanum* L., on acute inflammation in animals. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.20, n.10, p.1092–1095, 1997.

MAYER, B.X.; How to increase precision in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 907, p. 21-37, 2001

MEIRELES, M. A. A. Supercritical extraction from solid: process design data (2001–2003). **Current Opinion in Solid State and Materials Science**, v.7, p.321–330, 2003.

MOGENSEN, A. O. Choise of solvent in extraction, In: **AIChEMI modular instructions: Series B, Stagewise and mass transfer operations**. New York: American Institute of Chemical Engineers, 1982. (Extraction and Leaching 3. Module B3.5).

NAVARRO , M. C . Uso racional de las plantas medicinales. **Pharmaceutical Care Espana**. v.2, p.9-19, 2000.

PASCHOAL, J.A.R.; RATH, S.; AIROLDI, F.P.S.; REYES, F.G.R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1190–1198, 2008.

PEKDEMIR, T.; ISHIGAMI, Y.; UCHIYAMA, H. Characterization of aescin as a biosurfactant for environmental remediation. **Journal of Surfactants and Detergents**, v.2, n.3, p.337-341, 1999.

PINELO, M.; RUBILAR, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, J. Extraction of antioxidant phenolics from almond hulls (*Prunus amygdalus*) and pine sawdust (*Pinus pinaster*). **Food Chemistry**, v.85, p.267-273, 2004.

PIO CORREA, M. **Dicionário das Plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas por M. Pio Correa**, v.II, p.150-51, 1984.

POIROT, R.; PRAT, L.; GOURDON, G.; DIARD, C.; AUTRET, J. M. Fast Batch to Continuous Solid-Liquid Extraction from Plants in Continuous Industrial Extractor. **Chemical & Engineering Technology**, v.29, n.1, p.46–51, 2006.

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R. M. R. **Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica**. 6ª Ed. Lisboa: Edição da Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, 786. , 2002.

QUINTELLA, C. M., DAVID, J. M., DE ANDRADE, J. B., BREITKREITZ, M. C., RATES, S.M.K. Plants as source of drugs (Review). **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.; B.G., COLLINS, C.H. ; JARDIM, I. C. S. F.; MELLO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova** v. 27, p. 771-780. 2004.

ROCHA, A. P. T.; CABRAL, S. B.; SILVA, O.S.; ALSINA, O. L. S. Estudo da friabilidade de grânulos de quebra-pedra recobertos em leito de jorro. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 5(2), p. 88-95, 2010.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas, SP: Casa do Pão. 2005.

SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; PETROVICK, P.R. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.M.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2.ed. Florianópolis. UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2000. cap.15, p.291-320.

SCHULZ, V.; HANSEL, R.; TYLER, V.E. **Fitoterapia Racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Sao Paulo: Manole, 2001. 386p.

SHI, J., KASSAMA L.S., KAKUDA, Y. In: **Functional Food Ingredients and Nutraceuticals Processing Technologies**. Ed. Shi, J. Taylor And Francis, CRC Press , Boca Raton, Fl, p. 371, 2007.

SILVA MV, RITTER. Plantas Medicinais e tóxicas da Reserva Biológica do Lami, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia, Rev Bot**, p. 57:61-73, 2002.

SILVA, J.A.F.; COLTRO, W.K.T.; CARRILHO, E.; TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 740-744, 2007

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira demedicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústriacom a academia. **Revista brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 12, n. 1, 2002.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**. 5ª edição. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1102p., 2004.

SIRTORI, C.R. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. **Pharmacology Research**, v.44, n.3, p.183-93, 2001.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**,. 5ª. ed. Porto Alegre: Editora Bookman-SBQ, 2002.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. **Practical HPLC methoddevelopment**.2.e. New York, John Wiley, 765p, 1997.

SONAGLIO, D ; ORTEGA, G. G. ; PETROVICK, P. R. ; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In : SIMÕES et al. **Farmacognosia : da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre : Editora da UFRGS, 2007.

SOUSA, O. V. *et al.* Avaliação da qualidade de matérias-primas de ruibarbo utilizadas em formulações farmacêuticas. **Rev Bras Farmacogn**, v.13, p.30-34. 2003.

TAGLIARO, F.; TURRINA, S.; SMITH, F.P. Capillary electrophoresis: principles and applications in illicit drug analysis. **Forensic Science International**, Irlanda, v. 77, p.211-229, 1996.

TAVARES, M. F. M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p.173-181. 1996.

TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 493-511. 1997.

TIMERBAV, A.R. **Electrophoresis** 2004, 25, 4008-4031.

TOLEDO, A.C.O.; HIRATA, L.L.; BUFFON, M.C.M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; **Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica**. **Revista Lecta, Bragança Paulista**. v. 21 (1/2), p. 7-13, 2003 .

TREASE, G.E.; EVANS, W.C. **Trease and Evans' Pharmacognosy**. 14.ed. London: WB Saunders, 1996. p.293–294.

TUNDO, P.; ANASTAS, P.; BLACK, D. S.; BREEN, J.; COLLINS, T.; MEMOLI, S.; MYIAMOTO, J.; POLYAKOFF, M.; TUMAS, W.; **Pure Appl. Chem.** 2000, 72, 1207.

TYLER, V.E. Phytochemicals: Back to the future. **J. Nat. Prod.**v.62, p. 1589-1592, 1999.

USP 31: United States Pharmacopoeia Convention. **The United States pharmacopoeia**; NF 26: The national formulary. Rockville: Pharmacopeial Convention, 2008. V.3, p.363 - 368.

VIEIRA, E.; LICHTIG, J. Validação de métodos cromatográficos em análises de resíduos de pesticidas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, supl., p. 1-749, 2004.



VIEIRA, R.A. 2001. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. **Revista Saúde e Ambiente** 2(1/2): 57- 64.

WESTON A., BROWN P.R., **HPLC and CE: principles and practice**. San Diego: Academic Press 1997, 280p.

WETZEL, D.; MENKE, W.; DIETER, R.; SMASAL, B.; GIANNETTI, B.; BULITTA, M. Escin/diethylammonium salicylate/heparin combination gels for the topical treatment of acute impact injuries: a randomised, double blind, placebo controlled, multicentre study. **British Journal of Sports Medicine**, v.36, n.3, p.183-188, 2002.

WILKINSON, J.A.; BROWN, A.M.G. Horse chestnut – *Aesculus hippocastanum*: potential applications in cosmetic skin-care products. **International Journal of Cosmetic Science**, v.21, p.437–447, 1999.

WOLLINA, U.; ABDEL-NASER, M.B.; MANI, R. A Review of the microcirculation in skin in patients with chronic venous insufficiency: the problem and the evidence available for therapeutic options. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v.5, n.3, p.169-180, 2006.

WONGKITTIPONG, R.; PRAT, L.; DAMRONGLERD, S.; GOURDON, C. Solid-liquid extraction of andrographolide from plants-experimental study, kinetic reaction and model. **Separation and Purification Technology**, v.40, p.147-154, 2004.

YIU, C.Y. **Electrophoresis** 2001, 22, 612-628.

YOSHIKAWA, M. et al. Stomachic principles in ginger. III. An anti-ulcer principle, 6- gingesulfonic acid, and three monoacyl digalactosylglycerols, gingerglycolipids A, B and C, from *Zingiberis Rhizoma* originating in Taiwan. **Chinese Pharmacological Bulletin** (Tokyo), v. 42, n. 6, p. 1226-1230, 1994.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a Ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapeco: Argos, 2001. 523p.

YUNES, R.A.; CECHINEL-FILHO,V. **Breve análise histórica da Química de Plantas Medicinais: Sua importância na atual concepção de fármaco segundo os paradigmas Ocidental e Oriental**: In: R. A. Yunes, J. B. Calixto, *Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna*. Chapecó-SC, Argus, 2001, 523 p.


ZARONI, M.; PONTAROLO, R.; ABRAHÃO, W. S. M.; FÁVERO, M. L. D.; CORREIA JÚNIOR, C.; STREMEL, D. P. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Rev. Bras. Farmacognosia.**, v. 14, n. 1, p. 29-39, jan./jun. 2004.

ZUCCOLOTO, T.; APEL, M.; RATES, S.M.K. Avaliação da qualidade de produtos fitoterápicos comercializados em Porto Alegre-RS. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.58, p.25-31, 1999.

ZUIN, V.G.; YARIWAKE, J.H.; BICCHI, C. Avaliação da qualidade de drogas vegetais a base de *Passiflora* spp. Comercializadas no Brasil: presença de resíduos de pesticidas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.2, p. 60-66, 2004.

## 9. ANEXOS

### 9.1. Anexo 1: Laudo do fornecedor extrato fluido

		<b>INDÚSTRIA FARMACÊUTICA CATEDRAL LTDA</b> <b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>		Página: 1 / 1
<b>Dados</b>				
Nome Comum		Nome Científico		
CASTANHA DA ÍNDIA (HIDROALCOOLICO) 5 L		AESCULUS HIPPOCASTANUM		
Família Botânica		Parte Utilizada		
HIPPOCASTANACEAE		SEMENTE		
Forma Farmacêutica		Data de Fabricação	Data de Validade	
EXT. HIDRAOLCOOLICO		09/2010	09/2012	
Lote	Relação Droga/Extrato	Irradiação		
090171				NÃO
Análise	Especificação	Resultado		
<b>FÍSICO-QUÍMICO</b>				
(1) COR	Castanho a amarelado	Castanho claro		
(1) ODOR	Aromatico	Aromatico		
(2) ALCALOIDES	Positivo	Positivo		
(2) POLIFENÓIS	Positivo	Positivo		
(2) FLAVONOIDES	Positivo	Positivo		
(2) SAPONINAS	Positivo	Positivo		
(3) PH	Entre 5,0 e 7,0	6,19		
(4) RESÍDUO SECO	Maximo 6,0%	2,83%		
(3) DENSIDADE	Entre 0,906 e 0,948g/mL	0,907g/mL		
(1) TEOR ALCOOLICO	Entre 50 e 60°GL	60°GL		
(5) DOSEAMENTO DE ESCINA	-	0,47%		
<b>MICROBIOLÓGICO</b>				
(3) BACTERIAS	Maximo 1000 UFC/mL	10 UFC/mL		
(3) FUNGOS	Maximo 100 UFC/mL	<10 UFC/mL		
(3) SALMONELLA SP	Ausente em 10mL	De acordo		
(3) ESCHERICHIA COLI	Ausente em 1mL	De acordo		
(3) STAPHYLOCOCCUS AUREUS	Ausente em 1mL	De acordo		
(3) PSEUDOMONAS AERUGINOSA	Ausente em 1mL	De acordo		
<b>Referência Bibliográfica</b>				
(1) - Metodologia Interna (2) - Cecilia Bellve Alice [ et al. ]. Plantas Medicinais de Uso Popular: Atlas Farmacognóstico - Canoas: Ed. Da ULBRA, 1995. (3) - FARMACOPÉIA brasileira, 4. ed. Parte 1. São Paulo: Ateneu, 1988. (4) - BRITISH Pharmacopoeia 2007 (5) - Farmacopéia brasileira, 4. Ed. quinto fascículo (adaptação)				
Observações:				
<b>RESULTADO: APROVADO</b>				
<b>DATA DE APROVAÇÃO: 08/10/2010</b>				
É aceitável uma sedimentação leve dos extratos vegetais durante repouso, desde que sua composição não mude significativamente. Fonte: British Pharmacopoeia 2007.				
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: Ao abrigo da luz e em temperatura entre 15 e 30 °C.				



Luciana Souza Campos  
Controle de Qualidade Físico-Químico



Dayane Silva Castro  
Controle de Qualidade Microbiológico



João Paulo Borges Lisboa  
Responsável Técnico  
16345

RUA HUM - Nº: 288, B: NOVA PAMPULHA  
VESPASIANO, MG - CEP: 33200-000 - TEL: 31 3629 2000 EMAIL: CATEDRAL@GOLD.COM.BR

## 9.2. Anexo 2: Laudo do fornecedor extrato seco



### INDÚSTRIA FARMACÊUTICA CATEDRAL LTDA.

#### CERTIFICADO DE ANALISE

#### DADOS DO EXTRATO

NOME COMUM: Castanha da Índia  
NOME CIENTÍFICO: *Aesculus hippocastanum*  
PARTE USADA/FORMA: semente/extrato seco  
LOTE: D1603709  
DATA FABRICAÇÃO: out/2009  
DATA VALIDADE: out/2011  
DATA DE EMISSÃO DO LAUDO: out/2010  
IRRADIAÇÃO: Não Realizado

ANÁLISE	CONTROLE FÍSICO-QUÍMICO ESPECIFICAÇÃO	RESULTADO
ASPECTO	pó fino e higroscópico	de acordo
COR	bege a bege claro	bege claro
ODOR	aromático	aromático
ELEMENTOS ESTRANHOS	ausentes	de acordo
PH (SOLUÇÃO 10% EM ÁGUA)	entre 3,5 e 5,5*	5,11
UMIDADE	máximo 6,0%*	5,55
CINZAS TOTAIS	máximo 5,0%*	0,46%
DOSEAMENTO DE ESCINA	entre 3,0% e 4,5%*	3,84%
DENSIDADE	entre 0,2 g/mL e 0,3 g/mL*	0,260 g/mL

	CONTROLE MICROBIOLÓGICO	
BACTÉRIAS	máximo 500UFC/mL	não realizado
FUNGOS	máximo 100UFC/mL	não realizado
<i>Escherichia coli</i>	ausente em 1mL	não realizado
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ausente em 1mL	não realizado
<i>Staphylococcus aureus</i>	ausente em 1mL	não realizado

\* Método analítico em processo de validação, passível de mudanças na especificação.

#### REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA:

Plantas medicinais de uso popular: Atlas Farmacognóstico/Cecilia Ballvé Alice - Ed. ÚLBRA 1995  
USP XXIV NF 19 - 2000 The United States Pharmacopeial Convention, Inc.  
Farmacopéia Brasileira - 4ª edição

RESULTADO: Aprovado.

DATA DE APROVAÇÃO: 20/10/10

"Extratos vegetais podem, durante o armazenamento, produzir uma sedimentação leve, a qual é aceitável desde que a composição química do extrato não mude significativamente" British Pharmacopoeia 3<sup>rd</sup> Edition  
CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: Ao abrigo da luz e em temperatura variável entre 15 e 30°C.

RUA HUM, 288 - BAIRRO NOVA PAMPULHA - CEP 33200-000 - VESPASIANO - MG  
TELEFAX: (31) 3621-6446 - E-mail: [catedral@gold.com.br](mailto:catedral@gold.com.br)  
[www.laboratoriocatedral.com.br](http://www.laboratoriocatedral.com.br)

### 9.3. Anexo 3: Laudo do fornecedor extrato glicólico

SPSPharma® - SPSInformática Ltda - 55(31) 3292-4848

	<b>INDÚSTRIA FARMACÉUTICA CATEDRAL LTDA</b> <b>CERTIFICADO DE ANÁLISE</b>	Página: 1/1

<b>Dados</b>		
Nome Comum	Nome Científico	
CASTANHA DA INDIA (GLICOLICO) 5 L	AESCULUS HIPPOCASTANUM	
Família Botânica	Parte Utilizada	
HIPPOCASTANACEAE	SEMENTE	
Forma Farmacéutica	Data de Fabricação	Data de Validade
EXTRATO GLICOLICO	06/2010	06/2012
Lote	Relação Droga/Extrato	Irradiação
060158		NÃO

Análise	Especificação	Resultado
<b>FÍSICO-QUÍMICO</b>		
(1) COR	Amarelo claro a castanho	Castanho claro
(1) ODOR	Aromatico	Aromatico
(2) ALCALOIDES	Positivo	Positivo
(2) POLIFENÓIS	Positivo	Positivo
(2) FLAVONOIDES	Positivo	Positivo
(2) SAPONINAS	Positivo	Positivo
(3) PH	Entre 5,0 e 7,0	5,42
(4) RESÍDUO SECO	Máximo 5,0%	1,37%
(3) DENSIDADE	Entre 0,930 e 1,050g/mL	0,970g/mL
<b>MICROBIOLÓGICO</b>		
(3) BACTERIAS	Máximo 500 UFC/mL	<10 UFC/mL
(3) FUNGOS	Máximo 100 UFC/mL	<10 UFC/mL
(3) ESCHERICHIA COLI	Ausente em 1mL	De acordo
(3) STAPHYLOCOCCUS AUREUS	Ausente em 1mL	De acordo
(3) PSEUDOMONAS AERUGINOSA	Ausente em 1mL	De acordo

#### Referência Bibliográfica

- (1)-Metodologia Interna
- (2)-Cecilia Balivo Alice [ et al. ]. Plantas Medicinais de Uso Popular: Atlas Farmacognóstico - Campos: Rd. De UBERA, 1995.
- (3)-FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. Parte I. São Paulo: Arteneu, 1986.
- (4)-BRITISH Pharmacopoeia 2007

Observações: .

**RESULTADO: APROVADO**

**DATA DE APROVAÇÃO: 13/07/2010**

É aceitável uma sedimentação leve dos extratos vegetais durante repouso, desde que sua composição não mude significativamente.  
Fonte: British Pharmacopoeia 2007.

CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO: Ao abrigo da luz e em temperatura entre 15 e 35 °C.

*Henrique Rodrigues Santos*

Henrique Rodrigues Santos  
Físico-Químico  
CRQ 02414172

*Dayane Silva Castro*

Dayane Silva Castro  
Controle de Qualidade Físico Químico  
CRQ 02414795

*Larissa Medeiros da Mata*

Larissa Medeiros da Mata  
Garanta de Qualidade  
CRF 20760