

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Daniele Silva dos Santos**

**Desenvolvimento de Método por CLAE-DAD para Determinação  
de Espilantol em *Spilanthes acmella* (L.) Murray**

**São Cristóvão-SE  
2010**

**Daniele Silva dos Santos**

**Desenvolvimento de Método por CLAE-DAD para  
Determinação de Espilantol em *Spilanthes  
acmella* (L.) Murray**

Dissertação apresentada ao Núcleo  
de Pós-Graduação em Química da  
Universidade Federal de Sergipe  
como requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Química.

**Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira**

**São Cristóvão  
2010**



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

Santos, Daniele Silva dos

S237d Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para  
determinação de espilantol em *Spilanthes acmella* (L.)  
Murray / Daniele Silva dos Santos. – São Cristóvão, 2010.

90 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-  
Graduação em Química, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e  
Pesquisa, Universidade Federal de Sergipe, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira

1. *Spilanthes acmella* – Método analítico. 2. Plantas  
medicinais – América do Sul. 3. Espilantol. I. Título.

CDU543.06

*Este trabalho é dedicado a  
DEUS, pela enorme força  
e a coragem inexplicável  
durante esses dois anos de  
mestrado!*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Paulo Cesar de Lima Nogueira que proporcionou a realização desse trabalho, depositando sua confiança e acreditando em mim, o que me fez acreditar em mim mesma.

À minha querida mãe, Vanuzia, pelo apoio incondicional nos meus estudos.

Ao Prof. Dr. Sandro Navickiene por toda a sua atenção no desenvolvimento do trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lúcia Regina Rocha Martins, de suma importância no desenvolvimento deste trabalho, pelos ensinamentos em CLAE e no processo de validação do método e também pelos conselhos pessoais.

Ao Prof. Dr. Arie Fitzgerald Blank do Departamento de Agronomia da UFS, pela parceria neste projeto.

Ao Prof. Dr. Antônio Gilberto Ferreira do Departamento de Química da UFSCar, pela colaboração e aquisição dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao Prof. Dr. Geraldo Humberto Silva, pela colaboração e ensinamentos.

A Jemmyson Romário de Jesus por sua colaboração e dedicação no desenvolvimento deste projeto.

A Iara Lisboa por sua colaboração e atenção.

Aos meus companheiros de mestrado, Sandra Ribeiro e Wesley Faria pelos momentos compartilhados de alegria, dificuldades e de realizações pessoais. E que possamos compartilhar de mais quatro anos juntos.

Ao mais novo mestrando Alan Diego da C. Santos, pela atenção desde os primeiros dias no laboratório, pela grande amizade e momentos alegres que me proporcionou nesses anos.

À Adriano Aquino, que nunca me deixou na mão, pela colaboração em CLAE e no CG.

À minha amiga Daniela Kubota, pela companhia e ser tão sincera em me aconselhar nos momentos precisos.

Ao CNPq pela concessão das bolsas de DTI-1E (6 meses) e de Apoio Técnico a Pesquisa-1A.

A todos do Grupo LABORGANICS (Laboratório de Pesquisa em Química Orgânica de Sergipe) pela colaboração e companhia.

# SUMÁRIO

	<i>Página</i>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>i</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>v</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>vii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>x</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
1.1 Controle de qualidade de plantas medicinais.....	05
1.2 Melhoramento genético em plantas medicinais.....	06
1.3 Aplicação de técnicas no controle de qualidade de plantas medicinais.....	07
1.3.1 Extração em fase sólida (EFS).....	08
1.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	09
1.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas (CG/EM).....	11
1.3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	12
1.4 Validação de método analítico.....	12
1.5 <i>Spilanthes acmella</i> .....	15
<b>2. Referência Bibliográfica.....</b>	<b>17</b>
2.1 <i>Spilanthes acmella</i> (Jambú).....	17
2.2 Alquilamidas.....	18
2.3 Espilantol .....	20
2.4 Atividades biológicas da <i>S. acmella</i> .....	21

<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>23</b>
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos.....	23
<b>4. Parte Experimental.....</b>	<b>24</b>
4.1 Materiais.....	24
4.2 Reagentes.....	25
4.3 Limpeza de materiais.....	25
4.4 Soluções do padrão espilantol.....	25
4.5 Material vegetal de <i>S. acmella</i> .....	26
4.5.1 Extrato I: extratos metanólicos e hexânicos de <i>S. acmella</i> ....	26
4.5.2 Extrato II: extratos etanólicos de <i>S. acmella</i> oriundas de melhoramento genético.....	28
4.6 Condições da extração em fase sólida.....	29
4.7 Condições cromatográficas.....	30
4.7.1 Condições analíticas.....	30
4.7.2 Condições de isolamento do espilantol.....	31
4.8 Validação do método.....	31
4.8.1 Linearidade.....	31
4.8.2 Limite de Quantificação e Limite de Detecção.....	32
4.8.3 Precisão.....	33
4.8.4 Exatidão.....	34
<b>5. Resultados e Discussão.....</b>	<b>35</b>
5.1 Rendimento dos extratos.....	35
5.1 Procedimentos do tratamento das amostras de <i>Spilanthes acmella</i> por extração em fase sólida.....	37
5.2 Desenvolvimento das condições cromatográficas.....	37
5.3 Seleção do comprimento de onda nas análises cromatográficas....	37

5.4 Análise qualitativa dos perfis cromatográficos de <i>S. acmella</i> .....	44
5.5 Isolamento da amostra padrão: o espilantol.....	46
5.6 Validação do método.....	57
5.6.1 Especificidade.....	57
5.6.2 Linearidade.....	58
5.6.2.1 Curvas de calibração.....	59
5.6.3 Limite e detecção e Limite de quantificação.....	60
5.6.4 Precisão.....	61
5.6.5 Exatidão.....	61
5.7 Aplicação do método.....	63
<b>6. Conclusão.....</b>	<b>62</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>63</b>

## LISTA DE FIGURAS

	<i>Página</i>
<b>Figura 1:</b> Estrutura da Olivacina.....	01
<b>Figura 2:</b> Estrutura do ácido 3-O-β-D-glucopiranosídeo-quinóvio.....	02
<b>Figura 3:</b> Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas.....	02
<b>Figura 4:</b> Estrutura da Lanatosídeo A.....	03
<b>Figura 5:</b> Estrutura Hipericina.....	03
<b>Figura 6:</b> Foto da <i>Spilanthes acmella</i> (L.) Murray.....	17
<b>Figura 7:</b> (2 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> )- <i>N</i> -isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-dienamida.....	19
<b>Figura 8:</b> (7 <i>Z</i> )- <i>N</i> -isobutil-7-trideceno-10,12-dienamida.....	19
<b>Figura 9:</b> (2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> )- <i>N</i> -isobutil-2,6,8-decatrienamida.....	19
<b>Figura 10:</b> (2 <i>E</i> )- <i>N</i> -(2-metilbutil)-2-undeceno-8,10-dienamida.....	19
<b>Figura 11:</b> (2 <i>E</i> , 7 <i>Z</i> )- <i>N</i> -isobutil-2,7-decadienamida.....	19
<b>Figura 12:</b> (2 <i>Z</i> )- <i>N</i> -isobutil-2-noneno-6,8-dienamida.....	20
<b>Figura 13:</b> <i>N</i> - fenetil-2,3-epóxy-6,8-nonadienamida.....	20
<b>Figura 14:</b> (2 <i>E</i> , 4 <i>Z</i> )- <i>N</i> -isobutil-2,4-undecadieno-8,10-dienamida.....	20
<b>Figura 15:</b> (2 <i>E</i> , 4 <i>E</i> , 8 <i>Z</i> , 10 <i>E</i> )- <i>N</i> -isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida..	20
<b>Figura 16:</b> Undeca-2 <i>E</i> , 4 <i>Z</i> , -dieno-8,10-ácido dienóico isobutilamida.....	20
<b>Figura 17:</b> Dodeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> -ácido tetraenóico isobutilamina.....	21

<b>Figura 18:</b> Cromatograma da inflorescência seca de <i>S. acmella</i> obtido por CLAE-DAD. Condições da análise cromatográfica: coluna Phenomenex <sup>®</sup> C <sub>18</sub> 5µm (250 x 4,6 mm); eluição isocrática da fase móvel (método 1, TABELA 6), fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL; detecção a 228 nm, Pico 1: espilantol. Sistema EFS (TABELA 7-procedimento 1).....	38
<b>Figura 19:</b> Cromatogramas dos extratos em hexano de <i>S. acmella</i> : a) caule fresco, b) folha fresca e c) inflorescência fresca. Pico 1-espilantol. EFS e CLAE (TABELA 9), coluna C <sub>18</sub> 5µm (250 x 4,6 mm) da Phenomenex <sup>®</sup> ; fluxo de 1 mL/min; volume de injeção 25 µL.....	39
<b>Figura 20:</b> Cromatogramas dos extratos em metanol de <i>S. acmella</i> : a) caule fresco, b) folha fresca e c) inflorescência fresca. Pico 1-espilantol. EFS e CLAE (TABELA 15); coluna C <sub>18</sub> 5µm (250 x 4,6 mm) da Phenomenex <sup>®</sup> ; fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL, 200 nm...	40
<b>Figura 21:</b> Cromatogramas do extrato em metanol (inflorescência seca). EFS: a) procedimento 2 e b) procedimento 3 (QUADRO 1). CLAE-DAD: método 3 (QUADRO 2); coluna C <sub>18</sub> Phenomenex <sup>®</sup> 5µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL. Pico 1-espilantol, 230 nm.....	41
<b>Figura 22:</b> Cromatograma do extrato em metanol, inflorescência seca (n=6). EFS e CLAE-DAD (TABELA 17), coluna Phenomenex <sup>®</sup> C <sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL. Pico 1-espilantol, 230 nm.....	42
<b>Figura 23:</b> Cromatogramas referentes às análises do espilantol. EFS e CLAE-DAD (TABELA 12); coluna Phenomenex <sup>®</sup> C <sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL. Pico 1- espilantol. a) perfil cromatográfico do padrão (0,1 mg/mL), b) cromatograma de absorção referente ao pico do espilantol (t <sub>R</sub> =5,1), c) espectro UV de absorção da banda cromatográfica do espilantol.....	43

<b>Figura 24:</b> Cromatogramas referentes às análises do espilantol. EFS e CLAE-DAD (TABELA 12); coluna Phenomenex <sup>®</sup> C <sub>18</sub> 5 μm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 μL. Pico 1- espilantol. a) perfil cromatográfico do padrão (0,1 mg/mL), b) cromatograma de absorção referente ao pico do espilantol (t <sub>R</sub> =5,1), c) espectro UV de absorção da banda cromatográfica do espilantol.....	45
<b>Figura 25:</b> Cromatogramas (230 nm) dos extratos etanólicos oriundos de melhoramento genético de <i>S. acmella</i> . EFS e CLAE-DAD (TABELA 17), coluna Phenomenex <sup>®</sup> C <sub>18</sub> 5 μm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 μL. Pico 1- espilantol.....	48
<b>Figura 26:</b> a) Cromatograma (230 nm) do espilantol em CLAE-DAD: sistema gradiente (TABELA 8), coluna C <sub>18</sub> Phenomenex <sup>®</sup> 5 μm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 μL. Pico 1- espilantol tempo de retenção: 5,1 min. b) Espectro do espilantol na região V-Vis.....	49
<b>Figura 27:</b> Cromatogramas analisados em CG-MS: modo de injeção <i>splitless</i> , temperatura do injetor 250 °C, temperatura da coluna 80 °C, gás de arraste Hélio com fluxo de 1,6 mL/min e coluna da Supelco, Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25μm). Modo de ionização por de elétrons a 70 eV. Programação de temperatura para a coluna 80°C - 290°C (razão de 10°C/min), com tempo de análise de 27 min. a- cromatograma do espilantol e b- cromatograma do metanol.....	50
<b>Figura 28:</b> Espectros de massas obtidos no CG-MS: modo de injeção <i>splitless</i> , temperatura do injetor 250 °C, temperatura da coluna 80 °C, gás de arraste Hélio com fluxo de 1,6 mL/min e coluna, Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Modo de ionização impacto de elétrons a 70 eV. Programação de temperatura para a coluna 80°C - 290°C (razão de 10°C/min), com tempo de corrida de 27 min.....	51
<b>Figura 29:</b> Espectro de <sup>13</sup> C-RMN do espilantol (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	52

<b>Figura 30:</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN do espilantol ampliado entre 120-170 ppm (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	52
<b>Figura 31:</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN DEPT 135 do espilantol ampliado entre 17.5-47.5 ppm (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	53
<b>Figura 32:</b> Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN DEPT 135 do espilantol ampliado entre 122-147 ppm (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	53
<b>Figura 33:</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do espilantol (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	54
<b>Figura 34:</b> Espectro de $^1\text{H}$ -RMN do espilantol ampliado 5,33-6,83 ppm (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ).....	54
<b>Figura 35:</b> Cromatogramas dos extratos metanólicos de <i>S. acmella</i> . EFS: e CLAE-DAD (TABELA 17), coluna Phenomenex <sup>®</sup> C <sub>18</sub> 5 $\mu\text{m}$ (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 $\mu\text{L}$ . a) amostra do espilantol e b) amostra do acesso N02, Pico 1- espilantol ( $t_r$ = 5,1 min.), 230 nm .....	55
<b>Figura 36:</b> Curvas analíticas: a) curva por padrão externo, b) curva de adição de padrão e c) comparação entre as duas curvas obtidas por adição de padrão e por padrão externo para o método da quantificação de espilantol em amostras de <i>S. acmella</i> .....	57
<b>Figura 37:</b> Gráfico da análise quantitativa de espilantol nas amostras de <i>S. acmella</i> .....	61
<b>Figura 38:</b> Gráfico da análise quantitativa de espilantol nas amostras de <i>S. acmella</i> .....	62

## LISTA DE TABELAS

	<i>Página</i>
<b>Tabela 1:</b> Quantidade do material vegetal fresco de <i>S. acmella</i> utilizada na maceração em metanol.....	27
<b>Tabela 2:</b> Quantidade do material vegetal fresco de <i>S. acmella</i> utilizada na maceração em hexano.....	27
<b>Tabela 3:</b> Quantidade do material vegetal seco de <i>S. acmella</i> utilizada na maceração em metanol.....	27
<b>Tabela 4:</b> Quantidade do material vegetal acessos fresco de <i>S. acmella</i> utilizada na maceração em metanol.....	28
<b>Tabela 5:</b> Quantidade do material vegetal fresco de <i>S. acmella</i> oriundas de melhoramento genético utilizadas na maceração em etanol.....	29
<b>Tabela 6:</b> Procedimentos em EFS para os extratos de <i>S. acmella</i> ...	29
<b>Tabela 7:</b> Condições cromatográficas (CLAE) em modo isocrático com fluxo de 1 mL/min, coluna LUNA C <sub>18</sub> Phenomenex 5 µm (250 x 4,6 mm) 5 µm, volume de injeção : 25 µL e 230 nm .....	30
<b>Tabela 8:</b> Condições cromatográficas (CLAE) em modo gradiente (A= água, B= metanol) com fluxo de 1 mL/min, coluna LUNA C <sub>18</sub> Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 µm, volume de injeção : 25 µL e 230 nm.....	30
<b>Tabela 9:</b> Rendimento do material vegetal fresco de <i>S. acmella</i> utilizada na maceração em metanol.....	35
<b>Tabela 10:</b> Rendimento do material vegetal fresco de <i>S. acmella</i>	

utilizada na maceração em hexano.....	35
<b>Tabela 11:</b> Rendimento do material vegetal seco de <i>S. acmella</i>	
utilizada na maceração em metanol.....	35
<b>Tabela 12:</b> Rendimento do material vegetal acesso fresco de <i>S. acmella</i> utilizada na maceração em metanol.....	36
<b>Tabela 13:</b> Rendimento do material vegetal fresco de <i>S. acmella</i> oriundas de melhoramento genético utilizadas na maceração em etanol.....	36
<b>Tabela 14:</b> Condições de análise em EFS (procedimento 1) e CLAE-DAD (método 1) .....	37
<b>Tabela 15:</b> Condições das análises em EFS (procedimento 1) e CLAE-DAD (método 2) .....	38
<b>Tabela 16:</b> Condições das análises em EFS (procedimento 2 e 3) e CLAE-DAD (método 3) .....	41
<b>Tabela 17:</b> Condições das análises em EFS (procedimento 3) e CLAE-DAD (método 4) .....	42
<b>Tabela 18.</b> Resultados referentes ao estudo da linearidade tendo como base a concentração de espilantol e a área média obtida nas análises cromatográficas.....	56
<b>Tabela 19:</b> Comparação entre as curvas de calibração, através da quantificação do espilantol na amostra do acesso V03.....	58
<b>Tabela 20:</b> Dados da análise da precisão (repetibilidade).....	59
<b>Tabela 21:</b> Porcentagem de recuperação de espilantol aplicando-se o método analítico.....	60

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CG	Cromatografia a Gás
CG/EM	Cromatografia a Gás acoplada à Espectrometria de Massas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodo
CQB	Controle de Qualidade de Baixa concentração
CQM	Controle de Qualidade de Média concentração
CQA	Controle de Qualidade de Alta concentração
EFS	Extração em Fase Sólida
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
$L_p$	Comprimento da coluna preparativa ou semipreparativa
$L_a$	Comprimento da coluna analítica
LIQ	Limite Inferior de Quantificação
OMS	Organização Mundial de Saúde
ppm	parte por um milhão
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
$R_p$	Diâmetro da coluna preparativa ou semipreparativa

$R_a$	Diâmetro da coluna analítica
S	Fator de escalonamento
$t_r$	Tempo de retenção
$\delta$	Deslocamento químico

## RESUMO

*Spilanthes acmella* (L.) Murray (Asteraceae) é uma planta nativa da América do Sul conhecida popularmente como jambú. Esta planta é usada como condimento em pratos típicos da Região Norte como o tacacá e o pato no tucupi e tem aplicação na medicina tradicional para tratar dor de dente, estomatite e doenças da garganta. Além disso, várias propriedades terapêuticas foram relatadas para *S. acmella* tais como antiviral, antibacteriana, anti-séptica, diurética, antiinflamatória e cicatrizante. Espilantol é o constituinte majoritário das flores desta espécie, o qual está associado a várias atividades biológicas: analgésica, larvicida, inseticida, antimicrobiana, fungicida, etc. Atualmente, extratos de jambú e o espilantol são usados como ingredientes para cosmético antienvhecimento. Diante do exposto, este trabalho relata o desenvolvimento de um método analítico por CLAE-DAD para determinação de espilantol em amostras de *S. acmella*. Neste estudo foram utilizadas amostras dos acessos de *S. acmella* (planta inteira fresca e suas partes: folhas, caules e inflorescências frescas e secas) cultivadas e coletadas no Campus Rural da UFS. As condições de análise utilizando o sistema CLAE-DAD Shimadzu LC 20A Prominence foram: coluna analítica C18 Luna<sup>®</sup> (250 mm x 4,6mm, 5 µm) Phenomenex; eluição gradiente no modo reverso, utilizando como fase móvel MeOH(B): H<sub>2</sub>O(A): 85% (A) por 6 min., 85-100% (A) por 1 min., 100% (A) por 5 min.; 100-85% (A) por 1 min.; 85% (A) por 10 min; vazão 1,0 mL/min; volume de injeção 25 µL e os cromatogramas obtidos em  $\lambda=230$  nm. Espilantol foi usado como padrão de referência ( $t_r=5,1$  min). O método foi validado conforme RE n<sup>o</sup> 899/03 (ANVISA). A linearidade foi determinada pela curva de padrão externo ( $r^2=0,9997$ ) e por adição de padrão ( $r^2=0,9995$ ). O limite de quantificação e de detecção foram 0,7 e 0,1 µg/mL, respectivamente. A repetibilidade apresentou coeficientes de variação (CV%) entre 0,21 a 2,85% e a exatidão, expressa como percentual de recuperação, variou de 100,2 a 103,3%. O método foi aplicado em 41 amostras de *S. acmella* incluindo amostras oriundas de melhoramento genético. As amostras da flores seca e do acesso J-05 apresentaram o maior teor de espilantol (101,2 µg/mL e 120,5 µg/mL, respectivamente). Esse trabalho apresenta uma contribuição ao controle de qualidade de extratos de *S. acmella*.

Palavras-chave: Asteraceae, *Spilanthes acmella*, espilantol, CLAE-DAD.

## ABSTRACT

*Spilanthes Acmella* (L.) Murray (Asteraceae) is native to South America, popularly known as jambu. This plant is used in Northern Region of Brazil as a condiment in typical dishes such as “tacacá” and “pato no tucupi” and has application in traditional medicine to treat toothache, stomatitis and throat diseases. Furthermore, several therapeutic properties have been reported for *S. acmella* such as antiviral, antibacterial, antiseptic, diuretic, anti-inflammatory and healing agent. Spilanthol is the major constituent from flowers of this species, which is associated with several biological activities: analgesic, larvicide, insecticide, antibacterial, antifungal, etc. Currently, extracts of jambu and spilanthol are also used as ingredients for cosmetic anti-aging. Given the above, this work reports the development of a HPLC-DAD method for determination of spilanthol in samples of *S. acmella*. This study used samples from accessions of *S. acmella* (fresh whole plant and its parts: leaves, stems and flowers, fresh and dried) cultivated and collected in the Rural Campus-UFS. The conditions for analysis using HPLC-DAD system Shimadzu LC 20A Prominence were: analytical column Luna® C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm) Phenomenex, gradient elution using as mobile phase MeOH (B): H<sub>2</sub>O (A): 85% (A) for 6 min., 85-100% (A) for 1 min., 100% (A) for 5 min.; 100-85% (A) for 1 min.; 85% (A) for 10 min; flow rate 1.0 mL/min, injection volume 20 µL and the chromatograms obtained at  $\lambda=230$  nm. Spilanthol was used as a reference standard ( $t_r=5.1$  min). The method was validated according to RE 899/03 (ANVISA). Linearity was determined by external standard calibration curve ( $r^2=0.9997$ ) and by the standard addition method ( $r^2=0.9995$ ). The limit of quantification and detection were 0.7 and 0.1 µg/mL, respectively. The repeatability showed coefficients of variation (CV, %) between 0.21 to 2.85% and the accuracy, expressed as a recovery percentage ranged from 100.2 to 103.3%. The method was applied in 41 samples of *S. acmella* including samples from genetic improvement. Samples of dried flowers and accession J-05 had the highest content of spilanthol (101.2 µg/mL and 120.5 µg/mL, respectively). Therefore, this work presents a contribution to the quality control of extracts of *S. acmella*.

Key words: Asteraceae, *Spilanthes acmella*, Spilanthol, HPLC-DAD.

# 1. Introdução

As plantas fazem parte da vida do homem desde seus primórdios como fonte de alimentos, de materiais para vestuário, habitação, utilidades domésticas, defesa e ataque, na produção de meios de transporte, como utensílios para manifestações religiosas e como meio restaurador da saúde. Nos dias atuais representam uma das alternativas entre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de ser uma fonte renovável e, em grande parte, controlável pelo homem.<sup>1</sup>

A Organização Mundial de Saúde (OMS)<sup>2</sup> define planta medicinal como “todo e qualquer vegetal que possui em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos”. Assim, planta medicinal é aquela que contém um ou mais de um princípio ativo, que lhe confere atividade terapêutica.<sup>3</sup>

As plantas medicinais apresentam diversas vias metabólicas secundárias que levam à formação de compostos, cuja distribuição é restrita a algumas famílias, gêneros ou mesmo espécies,<sup>4</sup> como exemplo, os alcalóides indólicos monoterpênicos (1) que são encontrados em espécies das famílias Apocynaceae, Rubiaceae e Loganiaceae e as saponinas triterpênicas (2) que são encontradas principalmente nas famílias Sapindaceae, Hippocastanaceae e Araliaceae<sup>1</sup>.

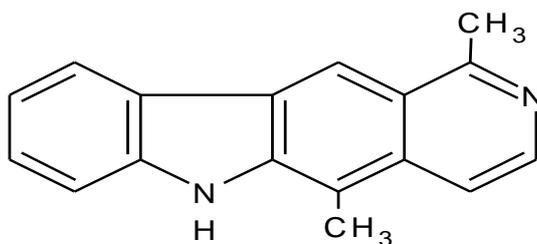


Figura 1: Estrutura da Olivacina

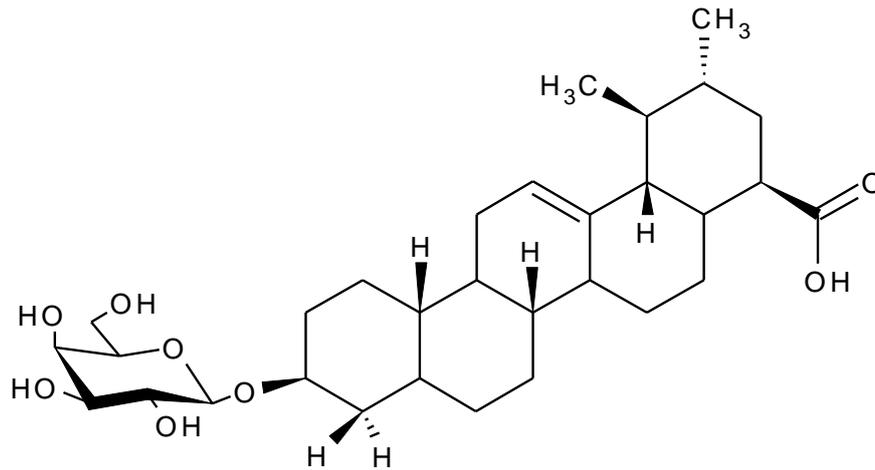


Figura 2: Estrutura do ácido 3-O-β-D-glucopiranosídeo-quinóvio.

O conjunto dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a formação e eliminação desses compostos durante o crescimento da planta, sendo que esse equilíbrio é influenciado por fatores genéticos e ambientais tais como luz, temperatura, tipo de solo, água, além de outras variáveis<sup>5</sup> (FIGURA 3). Esses e outros fatores, tais como coleta, estabilização e estocagem, podem ter grande influência na qualidade da matéria-prima para os diversos usos.<sup>4</sup>

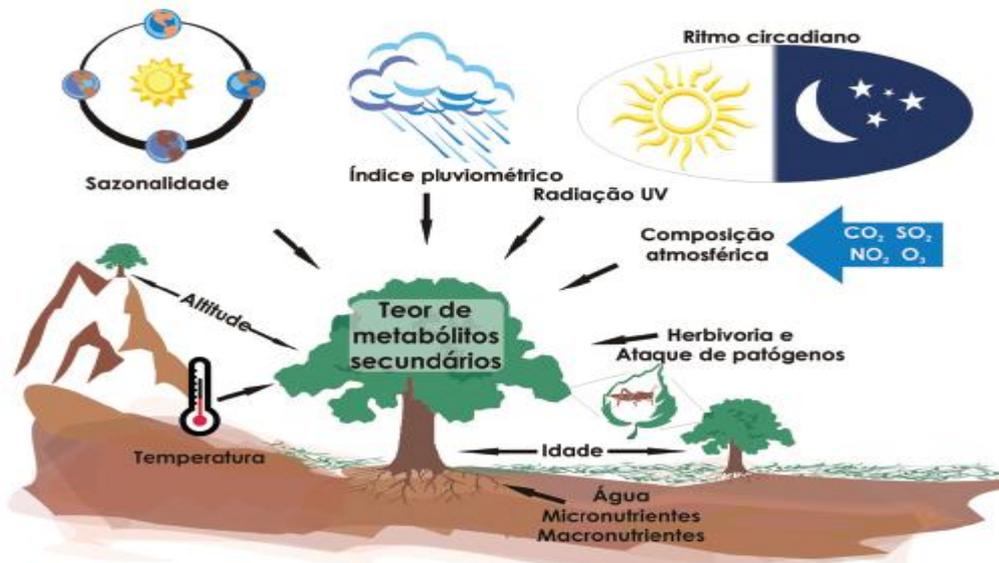


Figura 3: Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em plantas. (Gobbo-Neto et al, 2007)

Como exemplo, podemos citar as folhas de *Digitalis obscura* que apresentam menores concentrações de cardenólídeos, como o lanatosídeo A (4), na primavera e uma fase de rápido acúmulo no verão, seguida por uma fase de decréscimo no outono. Outro caso que pode ser citado é sobre as concentrações de hipericina (5) na erva de São João (*Hypericum perforatum*) utilizada no tratamento de depressões leves a moderadas cuja concentração aumenta de 100 ppm no inverno para mais de 3000 ppm no verão.<sup>4</sup>

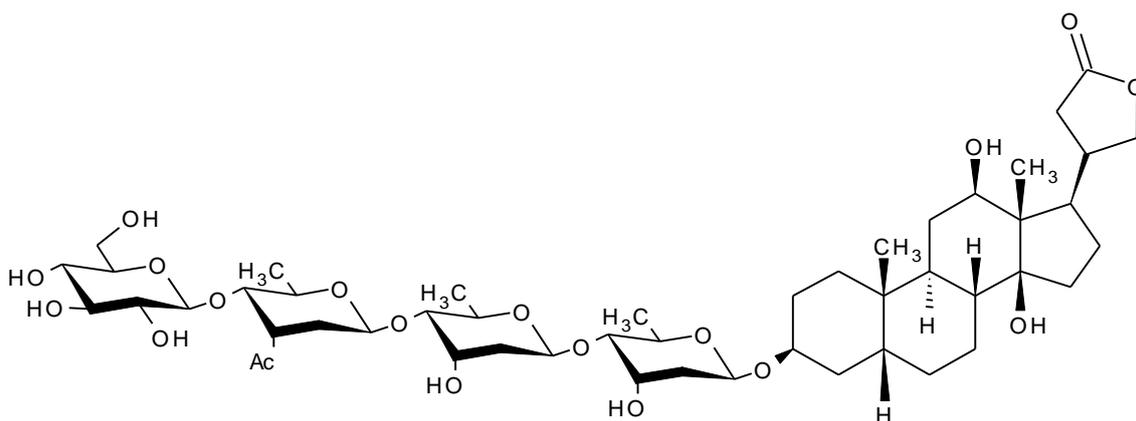


Figura 4: Estrutura da Lanatosídeo A.

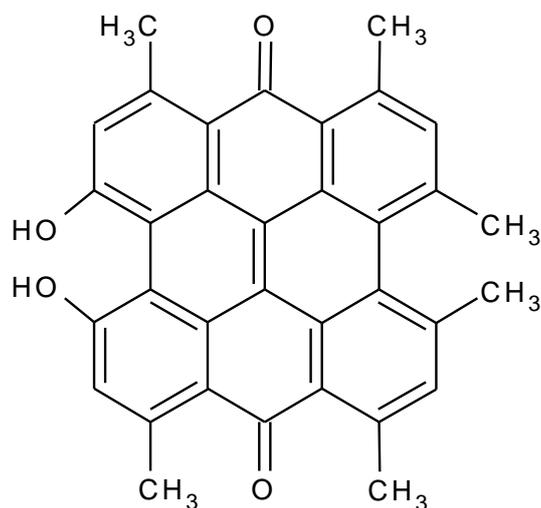


Figura 5: Estrutura da Hipericina.

Atualmente, grande parte da comercialização de plantas medicinais é feita principalmente em feiras livres, onde preparações vegetais não possuem certificado e são produzidas a partir de plantas cultivadas, o que descaracteriza a medicina tradicional que utiliza quase sempre, plantas de flora nativa.<sup>6</sup> No caso da comercialização popular, muitos cuidados são relevantes, tais como identificação correta da planta (identificações errôneas pelo comerciante e/ou pelo fornecedor são comuns), evitar possibilidades de adulteração (em extratos, cápsulas com pó da espécie vegetal), interações entre plantas medicinais, efeitos de superdosagens, reações alérgicas ou tóxicas.<sup>5</sup>

Considerando que 80% da população mundial consomem produtos de origem vegetal<sup>7</sup> e o crescente desenvolvimento de fitoterápicos em nível industrial, a aplicação de normas sobre a sua elaboração faz-se importante. Além disso, a regulamentação e oficialização do desenvolvimento e uso de fitoterápicos contrapõe a crença culturalmente fixada de que “o que é natural não possui efeitos colaterais”<sup>8</sup>. Tal afirmação é enganosa e remete a inúmeros riscos a saúde da população, pois, estudos demonstram que as plantas medicinais possuem efeitos indesejáveis e muitas vezes tóxicos remetendo à conscientização do seu bom uso, seguindo aspectos também legislativos.<sup>9</sup>

A utilização dos princípios ativos ou extratos de plantas não se restringe à área dos fitoterápicos. Atualmente há outros dois setores que apresentam considerável destaque: alimentação e cosmético.<sup>10</sup> Na área da alimentação, estuda-se a utilização das plantas para a saúde humana, de modo a investigar os componentes das plantas e dos alimentos, isolando-se os seus compostos bioativos, que formam um conjunto de substâncias capazes de prevenir e tratar o organismo humano de diversas enfermidades, como: câncer, diabetes e doenças cardiovasculares. Na área dos cosméticos, grandes empresas vêm investindo em produtos como sabonetes, xampus, condicionadores, sais e óleos de banho tendo como matérias-primas ervas vegetais, óleos essenciais, entre outros insumos<sup>11</sup>.

## 1.1 Controle de qualidade de plantas medicinais

O controle de qualidade é definido como um conjunto de critérios que caracterizam a matéria-prima para o uso ao qual se destina com bases científicas e técnicas. Os produtos de origem vegetal, utilizados em fitoterápicos, cosméticos dentre outros, necessitam do controle de qualidade de suas matérias-primas, ou seja, dos seus extratos vegetais, contribuindo para a sua eficácia, segurança e qualidade.<sup>12</sup>

A falta de padronização das informações referentes à composição dos produtos à base de plantas indica um alto nível de descaso da maioria das indústrias com relação às determinações da ANVISA, o que gera dúvidas sobre a autenticidade das informações contidas nas embalagens,<sup>13</sup> pois sem a padronização dos extratos, o produto perde qualidade e a indústria não pode garantir a eficácia apregoada, já que desconhece a concentração do produto à venda.<sup>14</sup>

Na análise das matérias-primas os problemas mais freqüentes são as adulterações, a não uniformidade da composição química e as contaminações com agentes diversos, oriundos de coletas e/ou armazenamento em locais inadequados, como por exemplo, os vegetais provenientes de regiões onde são aplicados agrotóxicos.<sup>15</sup> O uso de extratos padronizados em grupos específicos de princípios ativos visando garantir a homogeneidade química do produto, pode contribuir para melhoria da qualidade das matérias-primas vegetais. Inicialmente a planta a ser investigada deve ser classificada com muito cuidado para não ser agregada a outras espécies diferentes.<sup>16</sup> Na preparação dos seus extratos, deve estar fresca ou completamente seca, que pode ser procedida logo após a coleta em estufas ou à temperatura ambiente para evitar a proliferação de fungos, para definir com melhor exatidão o rendimento tanto da massa bruta como dos constituintes químicos. Na obtenção dos extratos a escolha do solvente é de fundamental importância para evitar possíveis contaminações sendo que esse mesmo solvente também poderá ser utilizado como eluente em uma separação cromatográfica.<sup>17</sup>

Convencionalmente, um dos primeiros e imprescindíveis passos para o controle de qualidade é a verificação da autenticidade da matéria-prima vegetal, que pode ser feita por meio da identificação botânica e de métodos químicos, baseados na presença de substâncias que possuam relação com a atividade terapêutica e com a identificação das espécies, os chamados marcadores químicos.<sup>18</sup> Esses marcadores são usados como padrões de referência e são quimicamente analisados na identificação e na quantificação dos diferentes tipos de amostras de origem vegetal. Muitas vezes, porém, esses padrões não são disponíveis comercialmente e assim, torna-se necessário utilizar procedimentos de purificação, isolamento e caracterização,<sup>19</sup> isso constitui uma tarefa bastante complexa, tendo em vista que as plantas medicinais reúnem inúmeras substâncias biologicamente ativas. Assim, a qualidade dos extratos vegetais pode ser verificada utilizando-se procedimentos de análises químicas indicados em Farmacopéias Nacionais e Internacionais, e monografias elaboradas por órgãos reconhecidos internacionalmente, como os publicados pela Organização Mundial de Saúde, União Européia, dentre outros.<sup>20</sup>

As informações técnicas disponíveis ainda são insuficientes para a maioria das plantas medicinais, para garantir a necessária qualidade, eficácia e segurança no uso. Contudo, a domesticação, os estudos biotecnológicos e o melhoramento genético podem oferecer vantagens, uma vez que torna possível obter uniformidade e material de qualidade que são fundamentais para a eficácia e segurança.<sup>5</sup>

## **1.2 Melhoramento genético em plantas medicinais**

A identificação de metabólitos vegetais de interesse terapêutico continua sendo uma área de grande importância para a saúde humana. O melhoramento de plantas pode contribuir para o aumento significativo da produção desses metabólitos que normalmente é produzida em baixas quantidades.<sup>1</sup>

Por melhoramento genético de plantas medicinais subentende-se interagir os genótipos da espécie em estudo a fim de obter, em mesmo local de

cultivo, aumento de massa seca e/ou fresca ou, ainda, aumento do teor de princípios ativos em determinado órgão vegetal; de modo que estas características sejam mantidas na geração seguinte, permitindo obter ganhos adicionais nas gerações subseqüentes.<sup>21</sup> Sendo seu objetivo principal a produtividade expressa pelos caracteres quantitativos envolvendo, geralmente, o teor de princípios ativos que são específicos para determinados tipos de plantas. Porém, esse não é um trabalho fácil e um dos principais complicadores desta atividade é a interação genótipo versus ambiente, sendo portanto necessário considerar alguns aspectos como os recursos disponíveis, bem como o conhecimento prévio do sistema reprodutivo e da variabilidade genética das espécies consideradas.<sup>21,22</sup>

As perspectivas do melhoramento genético de plantas medicinais relacionam-se a obtenção de germoplasma competitivo para diversas regiões do país; seleção de cultivares de plantas adaptadas às condições de cultivo; eleição de novas espécies que servirão como fonte de compostos biologicamente ativos, visando atender ao crescente aumento das doenças infecto-contagiosas resistentes a terapêuticas usuais; aprimoramento da produção de fitoterápicos para o mercado interno e externo, a fim de suprir necessidades de consumo, surgindo, como tendência, a substituição da importação pela exportação e independência econômica para o país.<sup>23</sup>

### **1.3 Aplicação de técnicas no controle de qualidade de plantas medicinais**

A exigência cada vez maior na obtenção de produtos de origem vegetal com qualidade requer o emprego de técnicas analíticas seletivas e eficientes, que possibilitem com segurança a identificação e quantificação de diferentes classes de compostos.<sup>24</sup>

A obtenção do perfil metabólico de extratos brutos não é uma tarefa fácil de ser realizada em razão da diversidade de estruturas químicas presentes na plantas.<sup>24</sup> Porém, o avanço tecnológico de técnicas analíticas, sobretudo das técnicas hifenadas, proporciona um papel importante na elucidação de composições químicas complexas dos produtos de origem vegetal, com níveis de sensibilidade e seletividade impensáveis até poucos anos atrás.<sup>25</sup>

A hifenação de um método eficiente de separação com detector espectrométrico constitui a principal ferramenta utilizada no estudo de plantas medicinais, onde a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida ocupam posições de destaque entre os métodos de separação. Para compostos que apresentam grupos cromóforos, o detector de arranjo de diodos (DAD) é normalmente empregado; caso contrário, a detecção é feita pelo detector de massas, por causa do grande número de informações geradas. No estudo de plantas medicinais, na maioria das vezes, torna-se necessário o uso de técnicas complementares para a identificação dos componentes ativos, como a Ressonância magnética nuclear (RMN).<sup>24,25</sup>

### **1.3.1 Extração em Fase Sólida (EFS)**

A Extração em fase sólida é uma das ferramentas mais empregadas para extração e/ou pré-concentração de analitos presentes em matrizes complexas.<sup>26</sup> Apesar do surgimento de técnicas modernas de separação, onde se pode obter alta seletividade e sensibilidade, em termos de detecção, para um dado analito, presente em matrizes complexas o preparo de amostras ainda é necessário sendo a etapa mais problemática da análise.<sup>27</sup>

A aceitação da EFS, frente às outras técnicas de extração como a Extração líquido-líquido, é que além de extrair, concentrar e pré-purificar os analitos, reside no fato de ser uma técnica rápida, consumir menores volumes de solventes e de amostra e ser de fácil mecanização.<sup>26</sup>

Em geral, mais de um tipo de técnica de extração ou concentração pode ser empregada para certa amostra. A escolha do modo de extração a ser utilizada deve levar em conta as seguintes características:<sup>28</sup>

- Ser simples;
- Ser rápida;
- Ter custo baixo;
- Fornecer extratos relativamente livres de interferentes;
- Ter recuperação alta, com boa exatidão e precisão, para os analitos de interesse.

Em geral, o procedimento de EFS contém cinco etapas:<sup>25,26</sup>

- i) ativação do sorvente para deixar os sítios ativos disponíveis;
- ii) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do solvente de eluição com o solvente da amostra;
- iii) introdução da amostra, quando ocorre a retenção do analito e às vezes de alguns interferentes;
- iv) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito;
- v) eluição e coleta do analito.

Essa técnica de extração permite que a análise dos componentes de interesse se torne possível, tendo como meta final a obtenção de uma fração da amostra original enriquecida com o composto de interesse analítico, de forma que se obtenha uma separação cromatográfica livre de interferentes, com detecção adequada e um tempo razoável de análise.<sup>28</sup>

### **1.3.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)**

A CLAE é uma técnica de separação que em menos de trinta anos, passou a ser um dos métodos analíticos mais utilizados para fins qualitativos e quantitativos. As razões para esse crescimento estão relacionados à sua adaptabilidade para determinações quantitativas com boa sensibilidade e a possibilidade de separar espécies não voláteis e termicamente instáveis.<sup>29</sup>

Essa técnica consiste em um método físico-químico de separação, que ocorre através de diferentes interações entre as substâncias presentes em uma mistura e na interface entre dois ambientes químicos imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes.<sup>30</sup>

A CLAE pode ser efetuada mantendo-se a composição da fase móvel constante durante toda a análise cromatográfica, que é denominada modo isocrático. Quando necessária a utilização de solventes de diferentes polaridade e porcentagens destes em misturas, denomina-se como modo por

gradiente, tendo como vantagem análises mais rápidas, melhores separações e maior simetria nos picos, em contraste à eluição isocrática, que pode tomar muito tempo com forma de picos nem sempre adequados.<sup>31</sup>

Essa técnica apresenta diversas vantagens para a quantificação de marcadores químicos tais como: eficiência na separação, alta reprodutibilidade, linearidade, automação e habilidade em analisar vários compostos em um único método.<sup>32,33</sup> Porém para a caracterização e quantificação de marcadores químicos em amostras complexas requer a utilização desta técnica cromatográfica com a detectores apropriados que aumentem consideravelmente a seletividade e a sensibilidade na análise das substâncias de interesse.

Um detector é um transdutor que converte uma mudança de concentração na fase móvel eluente num sinal, que poderá ser registrado por um processador de dados ou por um registrador conveniente. A interpretação desse registro produz dados qualitativos e quantitativos sobre a amostra e seus constituintes.<sup>34</sup> O número de técnicas de detecção empregadas em CLAE é enorme, mas os detectores geralmente utilizados são: de absorção no UV e no visível, de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos.

A utilização de perfis cromatográficos ou “*fingerprints*” são utilizados para análises de extratos vegetais, pois possibilita obter representatividade dos múltiplos compostos químicos presentes na amostra em uma única análise e, desta forma, permite estabelecer um parâmetro comparativo para o reconhecimento de semelhanças e diferenças entre extratos submetidos às mesmas condições de análise.<sup>35</sup> Porém, deve-se considerar que um cromatograma fornece apenas uma peça de informação qualitativa acerca de cada espécie em uma amostra, a saber, seu tempo de retenção ou sua posição sobre a fase após certo período de eluição e não indica o número total dos compostos existentes na amostra.<sup>36</sup> A análise deve ser repetida com outras fases móveis e em outras colunas, a fim de se conseguir o maior número de picos e mesmo assim deve-se tomar cuidado com o detector empregado.<sup>37</sup>

Para análise de perfis cromatográficos, um dos aspectos importantes é a escolha do método de extração e preparo de amostras, uma vez que influenciam sobremaneira na variedade de substâncias que serão analisadas, além de promover a degradação de várias delas.<sup>31</sup> Portanto, faz-se necessário

desenvolver um método adequado, que apresente boa reprodutibilidade e que possa extrair compostos ativos característicos do vegetal.<sup>35</sup>

Para utilização da CLAE, é necessário conhecimento das amostras avaliadas e estudo prévio de todos os mecanismos e fatores que estão relacionados à técnica, pois apesar de os equipamentos cromatográficos serem aparelhos automatizados, o manejo e a padronização para cada amostra é diferente e necessita de experiência.

### **1.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de massas (CG-EM)**

A cromatografia gasosa é utilizada para a separação de compostos voláteis, isto é, os analitos a serem separados devem apresentar uma razoável pressão de vapor à temperatura de separação. Foi à primeira técnica a ser acoplada com o espectrômetro de massas por causa da facilidade do manuseio do efluente gasoso do cromatógrafo.<sup>25</sup> É uma ferramenta muito útil na identificação de compostos de origem vegetal graças à disponibilidade de bibliotecas espectrais, com detector de massas operando sob condições de ionização por elétrons ou por ionização química.<sup>24</sup>

Na ionização por impacto de elétrons, as moléculas da amostra, vindas do sistema cromatográfico, entram na fonte de íons e são ionizadas pela colisão com os elétrons gerados num filamento de tungstênio ou rênio. Essa colisão leva à fragmentação e ionização das moléculas da amostra. Na ionização química, as moléculas do analito são ionizadas indiretamente, através de reações com os íons de um gás reagente (metano, isobutano, amônia ou água). Essa técnica representa uma ionização mais branda, já que a energia envolvida na colisão é pequena.<sup>33</sup>

A técnica de CG-EM é aplicada rotineiramente na caracterização química dos óleos essenciais que possuem um grande número de constituintes e pode assegurar a qualidade e autenticidade deste material.<sup>37</sup> No estudo de plantas medicinais, porém, tem-se restringido, geralmente, à análise de misturas de componentes de baixa polaridade e de baixa massa molecular. Porém, a possibilidade de analisar extratos brutos pode ser extremamente útil para o estudo sistemático de plantas medicinais e outras fontes de amostras

biologicamente ativas, como um método de análise rápida, que pode guiar o trabalho fitoquímico subsequente.<sup>34</sup>

Como resultado, depois de uma etapa de triagem (“screening”), só alguns picos cromatográficos desconhecidos permanecerão dependentes de metodologia analítica clássica (por exemplo, isolamento) para identificação inequívoca. Em certos casos essa abordagem pode ser simplificada pelo isolamento de uma substância chave apenas. Após sua identificação é possível buscar, via espectrometria de massas, a presença de outros membros de sua família estrutural presentes na amostra.<sup>35</sup> A caracterização dessas substâncias correlatas pode ser feita por transformações químicas efetuadas naquela que foi isolada, possibilitando a rápida caracterização dos demais compostos desconhecidos. Essa abordagem é especialmente vantajosa, quando a quantidade dos compostos desconhecidos é insuficiente para permitir o seu isolamento.<sup>36</sup>

#### **1.3.4 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

O uso de alguns detectores, como o espectrofotômetro de massas, podem não ser suficientes para a identificação de alguns compostos presentes nos extratos de plantas, os quais podem ser determinados utilizando a ressonância magnética nuclear. Porém para uma elucidação mais exata de novas moléculas, muitas vezes torna-se necessário o isolamento em CLAE preparativa.<sup>24</sup>

Recentes progressos em gradiente de pulso de campo, a possibilidade de altos campos magnéticos, entre outros, têm re-estimulado o uso desta técnica que teve início no final da década de 70, mas que sem as atuais vantagens não alcançou grandes avanços.<sup>9</sup> Aparelhos de 750 a 800 MHz aliados a novas técnicas de aquisição de dados têm solucionado os problemas de sensibilidade e dependendo da concentração do analito e da sua estrutura, a aquisição de dados pode ser em fluxo contínuo ou com interrupção de fluxo. Esta segunda possibilidade tem auxiliado na obtenção de espectros de boa qualidade.<sup>38</sup> A interpretação de cada um dos espectros de  $^{13}\text{C}$  e  $^1\text{H}$  pode fornecer diferentes informações qualitativas e quantitativas a respeito do

extrato da planta em estudo, tornando possível a descoberta dos seus metabólitos secundários.

#### **1.4 Validação de método analítico**

A validação é um processo utilizado para estabelecer a relação quantitativa e qualitativa do biomarcador, em função da substância química e do objetivo selecionado. Uma vez desenvolvido um método de extração e uma análise cromatográfica, é importante fazer a validação para avaliar se os resultados são confiáveis, de forma a poder ser aplicado rotineiramente.<sup>40</sup>

A validação consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados compatíveis com precisão e exatidão considerados satisfatórias. Sendo que um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado.<sup>41</sup>

As agências reguladoras disponibilizam guias para a validação de métodos analíticos, sendo que tais documentos usualmente sugerem as diretrizes a serem seguidas e são, portanto, abertas a interpretações. Se, por um lado, para alguns analistas isto é benéfico, pois possibilita a flexibilização das condições analíticas, para outros, entretanto, tais documentos são vagos, no que se refere à forma como alguns experimentos devem ser conduzidos.<sup>47</sup> A legislação brasileira tem sido melhor definida nos últimos anos, através de resoluções e recomendação descritas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>42</sup> e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO).<sup>43</sup> Apesar da importância da qualidade de matéria-prima vegetal, ainda não existe uma legislação específica para o controle de qualidade dos extratos de plantas. Porém para se fazer o controle de qualidade de um ou mais analito em determinada matriz, pode-se desenvolver um método de validação seguindo os parâmetros descritos na RE 899/03 da ANVISA<sup>42</sup>, já que a própria ANVISA traz orientações de como realizar o controle de qualidade de extratos vegetais e de fitoterápicos baseado nessa resolução. Vários trabalhos na literatura descrevem os parâmetros que devem ser avaliados na validação de um método analítico e há uma concordância em quais parâmetros analíticos devem ser considerados na validação, quais sejam.<sup>41</sup>

- Seletividade/Especificidade;
- Linearidade;
- Precisão;
- Exatidão;
- Limite de quantificação e limite de detecção;
- Eficiência de extração (recuperação);
- Robustez.

A seletividade e especificidade de um método analítico são importantes parâmetros a serem avaliados para garantir que a quantificação do analito de interesse não seja afetada pela presença de outros compostos presentes na matriz.<sup>40</sup> A resposta que um determinado método analítico apresenta para as diversas substâncias presentes em uma amostra é definida como seletividade, enquanto que a especificidade se baseia na habilidade que um determinado método apresenta em responder a uma única substância de interesse dentre outros presentes nas amostras.<sup>41</sup>

A linearidade corresponde ao modelo matemático que estabelece uma relação entre a resposta instrumental (área/altura da banda cromatográfica) e a concentração do analito. Além disso, de acordo com a ANVISA o coeficiente de correlação linear ( $r$ ) deve ser igual ou superior a 0,98.<sup>41</sup> Pode-se optar por diferentes tipos de padronização para a construção da curva analítica, isto é feito de acordo com o tipo de análise e do tratamento utilizado para a amostra. O método de padronização escolhido deve fornecer a melhor exatidão possível, além de um alto nível de precisão.<sup>40,41</sup>

A precisão de um método analítico é a medida dos erros aleatórios e representa a proximidade dos resultados obtidos a partir de medidas independentes de amostras múltiplas de uma amostra homogênea. Deve ser avaliada de três maneiras: repetibilidade (precisão intra-corrída), precisão intermediária (precisão inter-corrída) e reprodutibilidade (precisão inter-laboratorial).<sup>40,41</sup> A repetibilidade do método é verificada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração. Na precisão intermediária da análise é feita em quintuplica

em dias não consecutivos e a precisão inter-laboratorial é realizada por laboratórios e analista diferentes.<sup>41</sup>

A exatidão representa o grau de concordância entre os ensaios dos resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referencia aceito como verdadeiro.<sup>41</sup> Assim como a precisão, a exatidão também é um parâmetro que permite julgar a confiabilidade do método bioanalítico e deve ser investigada após a determinação da seletividade, linearidade e precisão do método.<sup>42</sup>

Os termos limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD) são utilizados para demonstrar a habilidade do método em quantificar/detectar baixas concentrações de um analito.<sup>41</sup>

O LD é definido como a menor concentração de um analito que o método é capaz de diferenciar confiavelmente do ruído de fundo. A ANVISA recomenda que o LD seja 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. O LQ é definido como a menor concentração do analito de interesse em uma amostra, que pode ser quantitativamente determinado com valores aceitáveis de precisão e exatidão.<sup>42</sup>

Por sua vez, a robustez de um método analítico mede sua suscetibilidade frente a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Para examinar as causas de variabilidade dos resultados, vários fatores devem ser avaliados, tais como: pH, força iônica e quantidade do modificador orgânico da fase móvel, diferentes colunas, procedimentos envolvidos no preparo das amostras, etc. Se as alterações das condições de análise produzirem resultados dentro dos limites aceitáveis de seletividade, exatidão e precisão, o método pode ser considerado robusto e tais variações podem ser incorporadas ao procedimento.<sup>42</sup>

### **1.5 *Spilanthes acmella***

Dentre as várias espécies de plantas medicinais, encontra-se a espécie *Spilanthes acmella*, conhecida popularmente como jambú que se destaca por apresentar inúmeras aplicações na área da medicina popular, utilizada no

tratamento de afecções da boca e garganta e como analgésico para dores de dentes. Na área de cosméticos é utilizada em produtos anti-rugas e na alimentação faz parte de pratos típicos da culinária do estado do Pará, como o “tacacá” e o “pato no tucupi”. Estas propriedades são atribuídas à presença de isobutilamidas, principalmente o espilantol.<sup>44-51</sup>

Apesar de sua importância para a indústria em relação à quantidade de espilantol normalmente encontrada nas plantas, as informações presentes na literatura são escassas. Diferenças entre as espécies estudadas, entre os métodos de extração utilizados, bem como a origem da espécie, local de plantio, estágio de crescimento e floração, época da colheita, dentre outros, dificultam estabelecer uma faixa de concentração de espilantol presente na planta. No Brasil, devido ao interesse comercial recente pelo extrato de *S. acmella*, estudos agrônômicos, fitoquímicos e farmacológicos desta espécie avançaram muito, mas estas informações não estão disponíveis na literatura.<sup>52</sup>

Diante do exposto, o presente trabalho contempla o desenvolvimento de um método de análise do teor de espilantol em amostras (acessos e partes da planta fresca e seca) de *S. acmella* por CLAE-DAD visando o melhoramento genético da planta para o aumento de teor do princípio ativo na espécie estudada. O desenvolvimento desse método será útil no controle de qualidade dessa espécie, já que validação de métodos analíticos aplicados ao seu extrato não é encontrada na literatura e desta forma contribuir para o conhecimento desta espécie.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 *Spilanthes acmella* (Jambú)

*Spilanthes acmella* (L.) Murray (FIGURA 6) da família Asteraceae é conhecida no Brasil como jambú.<sup>44</sup> É uma erva típica da região norte do Brasil, onde é utilizada na culinária local em pratos típicos “pato no tucupi” e o “tacacá”,<sup>49-51</sup> É conhecida também pelos nomes de agrião do Pará, agrião bravo, botão de ouro, jambú-assú, abecedária, agrião do Brasil, jabuacú, jaburama.<sup>44</sup>



**Figura 6:** Foto da *Spilanthes acmella* (L.) Murray

É uma espécie encontrada da Amazônica e se multiplica tanto por sementes como por hastes enraizadas. É uma planta herbácea anual, perene de 20 a 30 cm de altura, tem fácil propagação assexuada e fornece 2 a 3 colheitas por ano com produtividade normal de seis a dez maços de 300 a 500 g por cm<sup>2</sup> e canteiro<sup>12</sup>. Apresenta folhas opostas, longo-pecioladas, ovadas, agudas, membranosas. Suas flores são pequenas, verde-claras ou amarelas e dispostas em capítulos globosos terminais ou axiliares com carola curva, pecioladas, pecíolos de 20-60 mm de comprimento, achatados, com sulcos sobre a superfície, ligeiramente alado e pouco piloso. As inflorescências são

isoladas e com capítulos globosos axiliares e terminais pendiculados, juntamente com as folhas apresentam um sabor picante e causam leve formigamento e entorpecimento da língua.<sup>49-52</sup>

A *S. acmella* é muito usada na medicina popular no tratamento de aftas, herpes, afecções da garganta e forte diurético. Também como inseticida, contra o *Aedes aegyptii*<sup>18</sup>, fungos causadores de doenças em humanos e em plantações<sup>19</sup>. Os principais efeitos biológicos observados – atividade anestésica local, aromatizante, inseticida e bactericida – são atribuídos ao espilantol, uma isobutilamida obtida pela primeira vez por Gerber em 1903.<sup>50</sup>

Várias patentes relacionadas à utilização de espilantol ou extrato de *S. acmella* em formulações para higiene oral foram depositadas na década de 80 e 90, sobretudo no Japão. Mas só recentemente a atividade desta espécie nativa da região amazônica despertou o interesse da indústria brasileira, o que motivou o seu cultivo também na região centro sul do país em produção e desenvolvimento de extratos vegetais padronizados, destinados as indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia.<sup>52</sup>

## 2.2 Alquilamidas

As alquilamidas são um grupo de metabólitos secundários encontrados em várias plantas, dentre elas a do gênero *Spilanthes*. É um grupo de compostos constituído pela união de um ácido graxo de comprimento de cadeia média a grande, oito a dezoito carbonos, geralmente alifática, e uma amina.<sup>52</sup>

Vários estudos têm sido realizados para o isolamento e elucidação das alquilamidas presentes nas diversas espécies de *Spilanthes*.<sup>45-47</sup> Porém, em relação à quantidade destas, principalmente do espilantol, as informações presentes na literatura são escassas.

Nakatani e Nagashima,<sup>45</sup> isolaram quatro alquilamidas utilizando a inflorescência de *S. acmella*. Dentre as estruturas foram encontradas a (2*E*,7*Z*)-*N*-isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-dienamida (FIGURA 7), a (7*Z*)-*N*-isobutil-7-trideceno-10,12-dienamida (FIGURA 8), (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida (FIGURA 9) e (2*E*)-*N*-(2-metilbutil)-2-undeceno-8,10-dienamida (FIGURA 10).

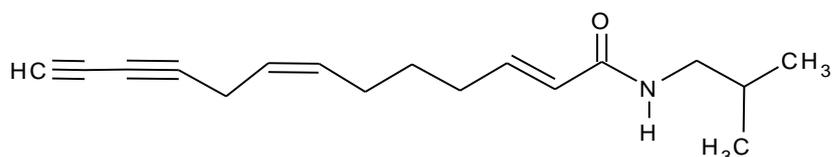


Figura 7: (2E,7Z)-*N*-isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-dienamida

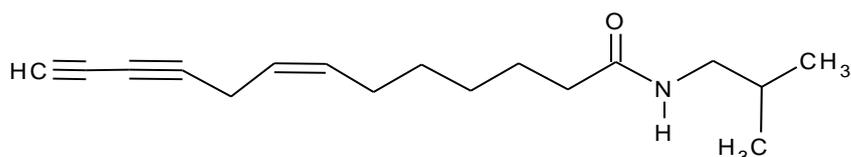


Figura 8: (7Z)-*N*-isobutil-7-trideceno-10,12-dienamida

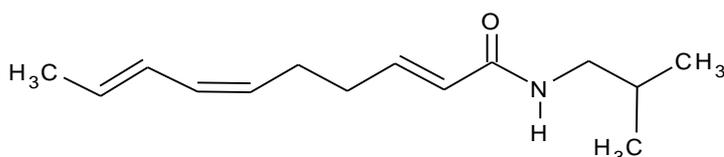


Figura 9: (2E,6Z,8E)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida

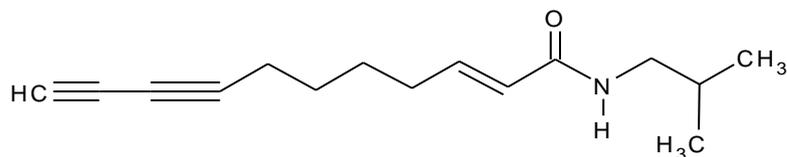


Figura 10: (2E)-*N*-(2-metilbutil)-2-undeceno-8,10-dienamida

Boonem e colaboradores,<sup>53</sup> em um estudo fitoquímico *S. acmella*, utilizando o extrato etanólico, identificou oito alquilamidas dentre eles, o espilantol e a (2E)-*N*-isobutil-2-undeceno-8,10-dienamida (FIGURA 11) a (2Z)-*N*-isobutil-2-noneno-6,8-dienamida (FIGURA 12), e a *N*-fenetil-2,3-epóxy-6,8-nonadienamida (FIGURA 13).

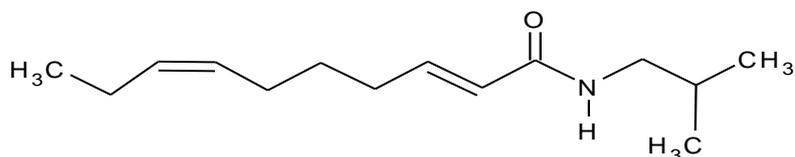


Figura 11: (2E, 7Z)-N-isobutil-2,7-decadienamida

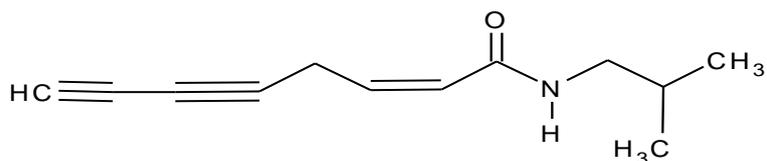


Figura 12: (2Z)-N-isobutil-2-nonena-6,8-dienamida

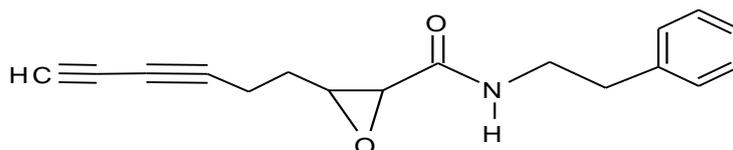


Figura 13: N-fenetil-2,3-epóxy-6,8-nonadienamida

Em 2007, Bae<sup>47</sup> isolou do extrato etanólico do *S. acmella* a (2E,4Z)-N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-dienamida (FIGURA 14) e a (2E,4E,8Z,10E)-N-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida (FIGURA 15) dentre as outras já citadas nos trabalhos de Boonem e colaboradores,<sup>53</sup> e Nakatani e Nagashima.<sup>45</sup>

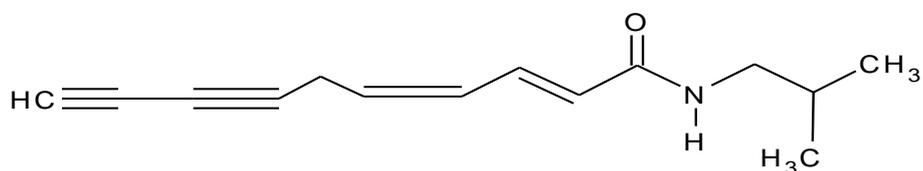


Figura 14: (2E, 4Z)-N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-dienamida

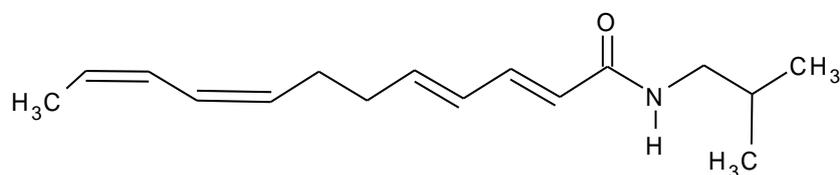


Figura 15: (2E, 4E, 8Z, 10E)-N-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida

Essas alquilamidas têm sido isoladas também de outras espécies de *Spilanthes* como em *S. alba*<sup>54</sup>, *S. ciliata*<sup>55,56</sup> e *S. mauritana*.<sup>57</sup>

### 2.3 Espilantol

O espilantol, [(*N*-2-metilpropil)-2,6,8-decatrienamida ou *N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida)] (FIGURA 9), é uma alquilamida alifática de fórmula molecular C<sub>14</sub>H<sub>23</sub>NO, descrita como um óleo viscoso ardente, de coloração amarelo pálido a amarelo claro, que produz um efeito anestésico e de formigamento sobre a língua.<sup>52</sup> É o maior constituinte encontrado nas espécies *Spilanthes* e apresenta atividade inseticida contra ovos e larvas de *Culex* e mosquitos de *Aedes*. É tradicionalmente usado em tratamento de dores de dente, estomatite, e doenças de pele.<sup>58</sup> Também tem sido muito usado na fabricação de cosméticos, como cremes para higiene pessoal, em produtos anti-rugas e relaxantes musculares.<sup>58</sup>

Delarcina e colaboradores<sup>59</sup> desenvolveram um processo de preparação de extrato de jambú livre de clorofila aplicado em diversas composições cosméticas. Flammer e colaboradores<sup>60</sup> patentearam formulações de produtos de higiene pessoal tais como xampus, sabonetes e cremes contendo espilantol na formulação como princípio ativo potencializando a sensação de refrescância de seus produtos.

#### **2.4 Atividades biológicas da *S. acmella***

A medicina tradicional recomenda suas folhas e flores na elaboração de infusões para o tratamento de anemia, dispepsia, malária, afecções da boca (dor de dente) e da garganta, contra escorbuto e também como antibiótico e anestésico.<sup>53</sup>

Ramsewak e colaboradores<sup>50</sup> avaliaram a atividade do extrato de *Spilanthes acmella* frente a larvas de *Aedes aegyptii* e neonatos de *Helicoverpa zea* (lagarta parasita do milho). O extrato hexânico mostrou maior atividade biológica, sendo que o fracionamento deste extrato resultou em três aminas identificadas como: o espilantol (9), (2*E*, 4*Z*)-*N*-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-dienamida (FIGURA 14) e a (2*E*, 4*E*, 8*Z*, 10*E*)-*N*-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida (FIGURA 15).

Ratnasooriya e colaboradores;<sup>49</sup> avaliaram o efeito diurético do extrato aquoso das flores de *Spilanthes acmella* e relataram uma forte ação diurética mostrada em ensaios com ratos.

Em estudo realizado por Rani e colaboradores<sup>51</sup>; o espilantol foi isolado da inflorescência de *S. acmella* e aplicado em diferentes concentrações a fungos causadores de doenças em humanos como o *Asperigillus flavus* e *A. paraciticu* e fungos causadores de doenças presentes na agricultura, o *Fusarium oxysporium* e *F. moniliformis*, mostrando atividade biológica em várias concentrações de espilantol aplicadas.

As diversas aplicações apresentadas da *S. acmella* e de suas alquilamidas, principalmente o espilantol, justifica a importância do desenvolvimento desse trabalho.

## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo Geral

- Desenvolver e validar um método analítico utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodo (CLAE-DAD), para caracterizar o aspecto qualitativo e quantitativo dos extratos e aplicar na quantificação do espilantol em amostras de *Spilanthes acmella*.

### 3.2 Objetivos Específicos

- Isolar o marcador químico através do extrato bruto de *S. acmella* utilizando cromatografia líquida de alta eficiência e caracterizar sua estrutura através de técnicas espectroscópicas.
- Desenvolver um método de tratamento por extração em fase sólida dos extratos de *S. acmella* para retirada da clorofila e de possíveis impurezas.
- Desenvolver e validar o método em cromatografia líquida de alta eficiência com o detector de arranjo diodo para caracterização química das espécies.
- Aplicar o método analítico na quantificação do espilantol em amostras de *S. acmella* e *S. acmella* oriundas de melhoramento genético.

## 4. Parte Experimental

### 4.1 Materiais

Evaporador rotatório da marca Heidolph<sup>®</sup>, utilizado para concentração dos extratos.

Para a realização das extrações em fase sólida (EFS) foram utilizados cartuchos de fase reversa C<sub>18</sub> de 1,0 mL/100 mg de sorvente da marca JT Baker<sup>®</sup>.

O trabalho foi conduzido em cromatógrafo a líquido Shimadzu (Quioto, Japão), modelo Prominence, composto pelos seguintes módulos: 2 bombas LC-6AD, detector espectrofotômetro com arranjo de diodos (SPD-M20A), autoinjeter (SIL-20A), desgaseificador on-line (DGU-20A<sub>3</sub>), controlador (CBM-20A) e o software LC Solution e temperatura da coluna, ambiente. O sistema de detecção UV-VIS com varredura espectral de 190 a 450 nm, monitorado em 230 nm para detecção do epilantol. Nas análises dos extratos, as análises foram conduzidas utilizando-se uma coluna Luna<sup>®</sup> C<sub>18</sub> Phenomenex, 5 µm (250 x 4,6 mm), com volume de injeção de 25 µL, fluxo de 1 mL/min, utilizando metanol e água como fase móvel. Para as condições de isolamento do epilantol, utilizou-se uma coluna semi-preparativa Luna<sup>®</sup> hexil-phenil, 10 µm (250 x 10000 mm), Phenomenex, volume de injeção de 600 µL, fluxo de 3,5 mL/min

A pureza do padrão isolado foi verificada em CG/EM, Shimadzu QP 5050A (Kyoto, Japão), utilizando: modo de injeção splitless, temperatura do injeter 250 °C, temperatura da coluna 80 °C, gás de arraste hélio com fluxo de 1,6 mL/min e coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Modo de ionização impacto de elétrons a 70 eV. Programação de temperatura para a coluna 80°C - 290°C (razão de 10°C/min), com tempo de corrida de 27 min. As corridas cromatográficas foram gerenciadas pelo software Shimadzu GC Solution<sup>®</sup>.

Os espectros de RMN <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C foram obtidos em um espectrômetro Bruker (Rheinstetten, Alemanha), modelo Avance de 9,4 Tesla, operando a 400

MHz para frequência do hidrogênio e 100 MHz para o carbono, utilizando-se uma sonda de 5 mm BBI e/ou BBO e mantendo-se a temperatura constante de 298 K, durante todos os experimentos. Utilizou-se como referência interna o TMS (tetrametilsilano). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as multiplicidades dos sinais foram indicadas seguindo a convenção: s (simpl eto), d (dubleto), dd (duplo dubleto), t (tripleto), dt (duplo tripleto), m (multiplete). Estes experimentos foram realizados através de colaboração com o Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do DQ/UFSCar através de colaboração com o Prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira.

## 4.2 Reagentes

Os extratos de *S. acmella* foram preparados em metanol, grau p.a (Quimex<sup>®</sup>) e etanol, grau p.a (Quimex<sup>®</sup>).

Na extração em fase sólida e análises cromatográficas foi utilizado metanol grau HPLC da marca (J. T. Baker, USA) e água purificada em sistema Milli-Q (Milipore, São Paulo, Brasil).

O solvente utilizado para dissolução da amostra e obtenção dos espectros em RMN foi clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ )

## 4.3 Limpeza do material

A limpeza das vidrarias utilizadas no trabalho obedeceu aos seguintes passos: enxaguar com água corrente por várias vezes, limpar com detergente, enxaguar novamente com água corrente, deixar os materiais por no mínimo três horas em etanol, enxaguar com água corrente, lavar por duas vezes com água destilada, borrifar com etanol e levar a estufa durante uma hora a 120 °C. O material volumétrico foi seco fora da estufa, em seguida todo o material foi coberto com papel filme e guardado em armário fechado.

## 4.4 Soluções padrão de espilantol

Num balão volumétrico de 10 mL foi preparado uma solução padrão em metanol (solução estoque), utilizando 9,76 mg de espilantol (com pureza de

82,05%), diluídos em 4 mL de metanol (grau HPLC), obtendo-se concentração final de 2000 µg/mL.

As soluções intermediárias foram preparadas por diluição a partir da solução estoque com alíquotas de 10, 110, 210, 310, 410, 510, 610 µL em metanol completando para um balão de 1 mL, obtendo-se concentrações finais de 20, 220, 420, 620, 820, 1020 e 1220 µg/mL.

As soluções de trabalho foram preparadas por diluições a partir de 50 µL de cada solução intermediária, completando-se com metanol para uma solução de 500 µL, obtendo-se concentrações finais de 2, 22, 42, 62, 82, 102 e 122 µg/mL.

Todas as amostras preparadas foram mantidas no freezer, durante o desenvolvimento do trabalho.

#### **4.5 Material vegetal de *S. acmella***

##### **4.5.1 Extrato I: extratos hexânicos e metanólicos e de *S. acmella***

A planta foi cultivada no Campus Rural da Universidade Federal de Sergipe e coletadas no mês de setembro de 2008. Em seguida separadas em partes (folha, caule e inflorescência) e acessos (N01, N02, N03, N07, V03, V04, V05 e V10) e triturados em moinhos de facas da marca MARCONI®. As partes da planta coletada foram divididas em duas, sendo que uma parte manteve-se fresca e outra parte foi seca a temperatura ambiente.

A folha, caule e inflorescência coletadas da planta foram divididas em três partes: a primeira macerada em hexano (TABELA 1), outra parte macerada em metanol (TABELA 2) e outra parte foi seca a temperatura ambiente e em seguida macerada em metanol (TABELA 3). Os acessos coletados foram macerados em metanol (TABELA 4). Em todas as amostras a proporção utilizada na maceração foi de 1:3 (m/v) o qual foi executado em cinco dias, posteriormente foram filtrados por filtração simples. Este procedimento foi feito em triplicata.

O extrato obtido foi concentrado em um balão de fundo redondo com capacidade para 100 mL em evaporador rotatório da marca Heidolph® (Schwabach, Alemanha) a 65°C.

**Tabela 1:** Quantidade do material vegetal fresco de *S. acmella* utilizada na maceração em metanol.

Amostra (metanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)
Caule fresco	71,35	1,41
Folha fresca	83,49	5,73
Inflorescência fresca	88,98	6,94

**Tabela 2:** Quantidade do material vegetal fresco de *S. acmella* utilizada na maceração em hexano.

Amostra (hexano)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)
Caule fresco	169,45	0,166
Folha fresca	161,6	0,574
Inflorescência	55,13	1,425

**Tabela 3:** Quantidade do material vegetal seco de *S. acmella* utilizada na maceração em metanol.

Amostra (metanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)
Caule seco	30	2,14
Folha seca	37,8	3,32
Inflorescência seca	41,3	3,81

**Tabela 4:** Quantidade do material vegetal acesso fresco de *S. acmella* utilizada na maceração em metanol.

<b>Amostra (metanol)</b>	<b>Massa da planta (g)</b>	<b>Massa do extrato (g)</b>
V03	459,04	28,78
V04	387,65	2,22
V05	300,04	7,32
V10	226,62	5,92
N01	435,24	31,43
N02	957,81	12,89
N03	708,77	38,98
N07	299,35	27,05

#### **4.5.2 Extrato II:** extratos etanólicos de *S. acmella* oriundas de melhoramento genético.

O material vegetal de *S. acmella* oriundas de melhoramento genético foram coletadas no mês de abril de 2009. Sendo os acessos: J-03, J-04, J-05, J-06, J-07, J-08, J-09, J-10, J-12, J-13, -14, J-16, J-17, J-19, J-21, J-23, J-25, J-26, J-27, J-28, J-29, J-31, J-33, J-36, J-38, J-40 e J-4X. A maceração foi realizada em etanol, na proporção de 1:6 (m/v).

O extrato obtido foi coletado em um balão de 100 mL e concentrado em evaporador rotatório da marca Heidolph® a 65°C, (TABELA 5).

**Tabela 5:** Quantidade do material vegetal fresco de *S. acmella* oriundas de melhoramento genético utilizadas na maceração em etanol.

Amostra (etanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (% p/p)	Amostra (etanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)
J-03	15	0,801	5,34	J-21	30	1,97
J-04	30	1,05	3,5	J-23	30	1,48
J-05	30	2,21	7,36	J-25	15	0,71
J-06	30	1,74	5,8	J-26	30	1,25
J-07	30	1,38	4,6	J-27	15	0,85
J-08	30	1,81	6,03	J-28	15	0,27
J-09	30	1,51	5,03	J-4X	15	1,03
J-10	30	1,47	4,9	J-30	30	1,02
J-12	15	1,22	8,13	J-31	15	0,81
J-13	30	1,32	4,4	J-33	30	1,24
J-14	15	0,64	4,26	J-36	30	1,41
J-16	30	1,41	4,7	J-38	15	0,74
J-17	30	1,67	5,56	J-40	15	0,58
J-19	15	1,33	8,86			

#### 4.6 Condições da extração em fase sólida

O cartucho, foi condicionado com 1 mL de metanol e água ( em todos os testes) e acoplado a um sistema de vácuo (*manifold*). A TABELA 6 mostra os procedimentos que foram realizados. Após o pré-tratamento a fração da eluição foi acondicionada em um *vial* contendo um *insert* de 300  $\mu$ L e fechado com septo de silicone e tampa de Teflon, e em seguida analisados em CLAE.

**Tabela 6:** Procedimentos em EFS para os extratos de *S. acmella*.

Procedimento	Concentração do extrato (mg/mL)	Volume da amostra de extrato ( $\mu$ L)	Eluição (1 mL)	Limpeza
1	30	300	MeOH/H <sub>2</sub> O (45/55)	MeOH
2	25	200	MeOH/H <sub>2</sub> O (60/40)	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)
3	25	200	MeOH	H <sub>2</sub> O

## 4.7 Condições cromatográficas

### 4.7.1 Condições analíticas

Foram avaliadas quatro condições cromatográficas por CLAE-DAD utilizando as amostras dos extratos de *S. acmella* obtidas no pré-tratamento por EFS. As análises cromatográficas foram realizadas com detecção efetuada a 200, 230, 240 e 254 nm e fluxo de 1 mL/min. A TABELA 7 mostra os procedimentos utilizados em modo isocrático, enquanto a TABELA 8 mostra as condições de análise em modo gradiente.

**Tabela 7:** Condições cromatográficas (CLAE) em modo isocrático com fluxo de 1 mL/min, coluna LUNA C<sub>18</sub> Phenomenex 5 µm (250 x 4,6 mm) 5 µm, volume de injeção : 25 µL e 230 nm.

Método	Proporção da fase móvel	Tempo de análise	Tempo de retenção (min) (banda do espilantol)
1	MeOH/H <sub>2</sub> O (68/32)	15 min	4,9
2	MeOH/H <sub>2</sub> O (75/25)	13 min	4,8
3	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	20 min	9,8

**Tabela 8:** Condições cromatográficas (CLAE) em modo gradiente (A= água, B= metanol) com fluxo de 1 mL/min, coluna LUNA C<sub>18</sub> Phenomenex (250 x 4,6 mm) 5 µm, volume de injeção : 25 µL e 230 nm.

Método	Proporção da fase móvel	Tempo de análise (min)	Tempo de retenção (min) (banda do espilantol)
1	85% (MeOH) – 6 min 85-100% (MeOH) – 1min 100% (MeOH) – 5 min 100-85% (MeOH) – 1min 85% (MeOH) – 10 min	23 min	5,1

#### 4.7.2 Condições de isolamento do marcador químico: espilantol

O extrato da inflorescência seca foi selecionado para o isolamento do espilantol. A amostra foi preparada para uma concentração de 30 mg/mL, em seguida foi processada em EFS, nas seguintes condições: condicionamento com 1 mL de metanol e 1 mL de água, 400 µL da amostra eluída com 500 µL de metanol e a limpeza com 1 mL de água.

O isolamento do espilantol em CLAE-DAD foi realizado a partir de 16 coletas da região central da banda referente à banda do espilantol em um balão de 100 mL. Em seguida, o volume coletado foi concentrado em evaporador rotatório.

O fluxo a ser utilizado nas condições cromatográficas de isolamento foi obtido através da fórmula do escalonamento (EQUAÇÃO 1).<sup>58</sup>

Equação 1:

\_\_\_\_\_

onde:

S = escalonamento

R<sub>p</sub> = diâmetro da coluna preparativa

R<sub>a</sub> = diâmetro da coluna analítica

L<sub>p</sub> = comprimento da coluna preparativa

L<sub>a</sub> = comprimento da coluna analítica

#### 4.8 Validação do método

##### 4.8.1 Linearidade

A linearidade foi avaliada pelos métodos do padrão externo (espilantol) e da adição de padrão através de injeções no cromatógrafo de diferentes concentrações da substância do padrão a ser quantificado (espilantol).

O padrão externo foi avaliado utilizando as soluções de trabalho (2, 22, 42, 62, 82, 102 e 122 µg/mL). Para a adição de padrão, foram utilizados 7 tubos de ensaios sendo colocado em cada tubo 100 µL de cada concentração da solução de trabalho, após evaporação total dessas soluções foi adicionado 500 µL da solução de extrato V03 (25 mg/mL) e misturados usando o Vortex por 1 min, em seguida purificada conforme o procedimento em EFS das amostras dos extratos e analisadas em CLAE-DAD, em triplicata.

Para a linearidade do método foi considerada como faixa linear os pontos cujos valores de  $(S/Q)\%$  estão no intervalo de  $100 \pm 5$ , ou seja, pontos cujas razões sinal/concentração não diferem mais de 5% do coeficiente angular da reta (a). Para verificar se os pontos encontram-se dentro da região linear da curva, foi utilizado o teste da razão entre o sinal (S) e a concentração (Q), como mostra a EQUAÇÃO 2.

Equação 2:

$$\frac{S}{Q} = a \cdot Q + b$$

Onde: b é a interseção da reta no eixo y quando x é igual a zero.

Os valores de S e Q foram obtidos na curva analítica por padronização externa, considerando os parâmetros de área do pico e concentração do analito.

#### **4.8.2 Limite de quantificação e Limite de detecção**

Para a determinação do limite de quantificação foram preparadas cinco soluções do padrão em concentrações diferentes. Inicialmente foi preparada uma solução estoque com concentração de 2 µg/mL. A partir de alíquotas de 900, 750, 500 e 350 µL da solução estoque e completando o volume com metanol para um balão volumétrico de 1 mL, obtendo concentrações finais de 1,8; 1,5; 1,0 e 0,7 µg/mL. Essas cinco concentrações (2, 1,8; 1,5; 1,0 e 0,7 µg/mL) foram utilizadas na construção da curva analítica por padronização externa para determinação do limite de quantificação, EQUAÇÃO 3.

Equação 3:

—

onde:

= desvio padrão

coeficiente angular.

Para a determinação do limite de detecção foram preparadas cinco soluções do padrão em concentrações diferentes. Inicialmente foi preparada uma solução estoque com concentração de 0,5 µg/mL. A partir de alíquotas de 800, 600, 400 e 200 µL da solução estoque e completando o volume com metanol para um balão volumétrico de 1 mL, obtendo concentrações finais de 0,4; 0,3; 0,2 e 0,1 µg/mL. Essas cinco concentrações (0,5; 0,4; 0,3; 0,2 e 0,1 µg/mL) foram utilizadas na construção da curva de padrão externo para determinação do limite de detecção (EQUAÇÃO 4.)

Equação 4:

—

Onde:

= desvio padrão

coeficiente angular

#### **4.8.3 Precisão**

Para a análise da precisão foram preparadas três amostras (em três concentrações diferentes) a partir de alíquotas de 11, 305 e 515 µL da solução estoque, de 2000 µg/mL e completando com metanol para um balão de 1 mL, e obtendo concentrações finais de 22; 620 e 1030 µg/mL. Utilizou-se 100 µL de cada solução e completando-se com metanol para um volume de 1 mL e concentrações finais de 2,2; 62 e 103 µg/mL. Essa análise foi feita em triplicata.

#### 4.8.4 Exatidão

Três amostras (em três concentrações diferentes) foram preparadas a partir da solução estoque de espilantol (2000 µg/mL). As soluções intermediárias foram preparadas por diluição a partir da solução estoque com alíquotas de 10, 310, 510 µL em metanol para 1 mL de solução, completando-se o volume e concentrações finais de 20, 620, 1220 µg/mL. As soluções de trabalho foram preparadas por diluições a partir de 100 µL de cada solução intermediária, completando-se com metanol para uma solução de 1 mL, para concentrações finais de 2, 62 e 122 µg/mL.

Utilizando-se três tubos de ensaio foram adicionados 100 µL das soluções do padrão (2, 62 e 122 µg/mL). Após total evaporação foram adicionados em cada tubo, 500 µL da amostra do extrato V03 (25 mg/mL) e misturados usando o Vortex por 1 min, em seguida tratada conforme o procedimento em EFS (Procedimento experimental 5.5) das amostras dos extratos. A amostra sem adição de padrão (extrato VO3) e cada uma das amostras com padrão adicionado foram analisadas em CLAE-DAD e a recuperação foi expressa em termos de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz, de acordo com a EQUAÇÃO 5.

Equação 5:

---

Onde:

$X_i$  = concentração experimental

$X$  = concentração teórica

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Rendimento dos extratos

**Tabela 9:** Rendimento do material vegetal fresco de *S. acmella* utilizada na maceração em metanol.

Amostra (metanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (% p/p)
Caule fresco	71,35	1,41	1,98
Folha fresca	83,49	5,73	6,86
Inflorescência fresca	88,98	6,94	7,80

**Tabela 10:** Rendimento do material vegetal fresco de *S. acmella* utilizada na maceração em hexano.

Amostra (hexano)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (% p/p)
Caule fresco	169,45	0,166	0,09
Folha fresca	161,6	0,574	0,35
Inflorescência	55,13	1,425	2,58

**Tabela 11:** Rendimento do material vegetal seco de *S. acmella* utilizada na maceração em metanol.

Amostra (metanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (% p/p)
Caule seco	30	2,14	7,13
Folha seca	37,8	3,32	8,78
Inflorescência seca	41,3	3,81	9,22

**Tabela 12:** Rendimento do material vegetal acesso fresco de *S. acmella* utilizada na maceração em metanol.

Amostra (metanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (% p/p)
V03	459,04	28,78	6,26
V04	387,65	2,22	0,58
V05	300,04	7,32	2,43
V10	226,62	5,92	2,61
N01	435,24	31,43	7,22
N02	957,81	12,89	1,34
N03	708,77	38,98	5,49
N07	299,35	27,05	9,03

**Tabela 13:** Rendimento do material vegetal fresco de *S. acmella* oriundas de melhoramento genético utilizadas na maceração em etanol.

Amostra (etanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (% p/p)	Amostra (etanol)	Massa da planta (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (% p/p)
J-03	15	0,801	5,34	J-21	30	1,97	6,56
J-04	30	1,05	3,5	J-23	30	1,48	4,93
J-05	30	2,21	7,36	J-25	15	0,71	4,73
J-06	30	1,74	5,8	J-26	30	1,25	4,16
J-07	30	1,38	4,6	J-27	15	0,85	5,66
J-08	30	1,81	6,03	J-28	15	0,27	1,8
J-09	30	1,51	5,03	J-4X	15	1,03	6,86
J-10	30	1,47	4,9	J-30	30	1,02	3,4
J-12	15	1,22	8,13	J-31	15	0,81	5,4
J-13	30	1,32	4,4	J-33	30	1,24	4,1
J-14	15	0,64	4,26	J-36	30	1,41	4,7
J-16	30	1,41	4,7	J-38	15	0,74	4,9
J-17	30	1,67	5,56	J-40	15	0,58	3,86
J-19	15	1,33	8,86				

## 5.2 Procedimentos no tratamento das amostras de *Spilanthes acmella* por extração em fase sólida

A escolha do tratamento das amostras em EFS reside no fato de que esta técnica permite não só a extração eficiente dos analitos, mas possibilita sua concentração e purificação. Devido à presença da clorofila nos extratos de *S. acmella*, foi necessário realizar um tratamento por EFS nos extratos para análise cromatográfica. Os vários procedimentos (Procedimento Experimental item 5.5-TABELA 6), foram realizados com o objetivo de obter um método de extração que resultasse em uma amostra com menos clorofila e uma maior quantidade do analito de interesse, o espilantol.

## 5.3 Desenvolvimento das condições cromatográficas

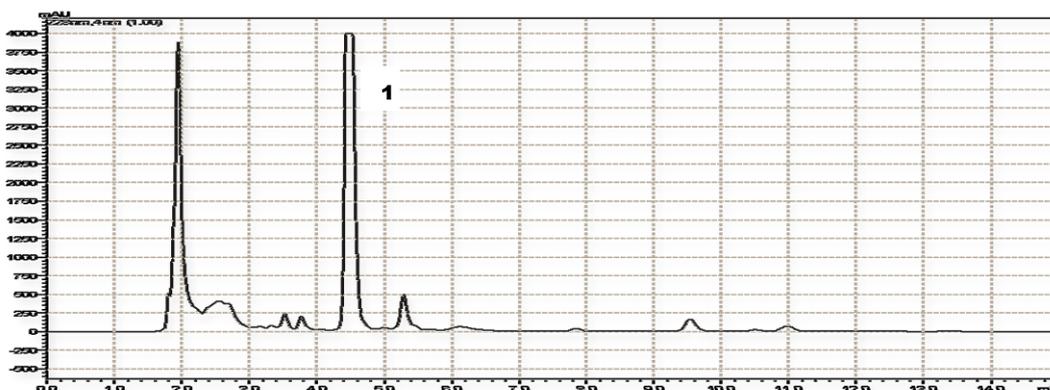
Foram realizadas várias análises em CLAE-DAD, utilizando eluição no modo isocrático (TABELA 7) e em modo gradiente (TABELA 8), Procedimento Experimental item 5.6.1, com o objetivo de obter uma boa separação da banda do analito de interesse dos outros compostos presentes na matriz e um perfil cromatográfico satisfatório para todos os extratos para assim comparar, qualificar e quantificar o espilantol em todas as amostras de *S. acmella*. Esses cromatogramas foram monitorados em quatro comprimentos de onda: 200, 228, 230 e 240 nm.

Inicialmente foram analisadas as amostras obtidas no procedimento 1 (TABELA 6) em EFS e foram analisadas em CLAE-DAD com o método 1 (TABELA 7), como mostra TABELA 14.

**Tabela 14:** Condições de análise em EFS (procedimento 1) e CLAE-DAD (método 1) .

CLAE-DAD (método 3)		EFS (procedimento 1)	
Proporção da fase móvel	MeOH/H <sub>2</sub> O (68/32)	Concentração do extrato (mg/mL)	30
Tempo de análise	15 min	Volume da amostra de extrato (µL)	300
Tempo de retenção (banda do espilantol)	4,3 min	Eluição (1 mL)	MeOH/H <sub>2</sub> O (45/55)
		Limpeza (1 mL)	MeOH

O resultado foi uma boa separação da banda do espilantol. Porém, na análise da inflorescência seca, a banda do espilantol aparece com uma alta concentração levando a uma banda além do limite detectável (FIGURA 18), o que não permite uma quantificação exata do espilantol nessa amostra.



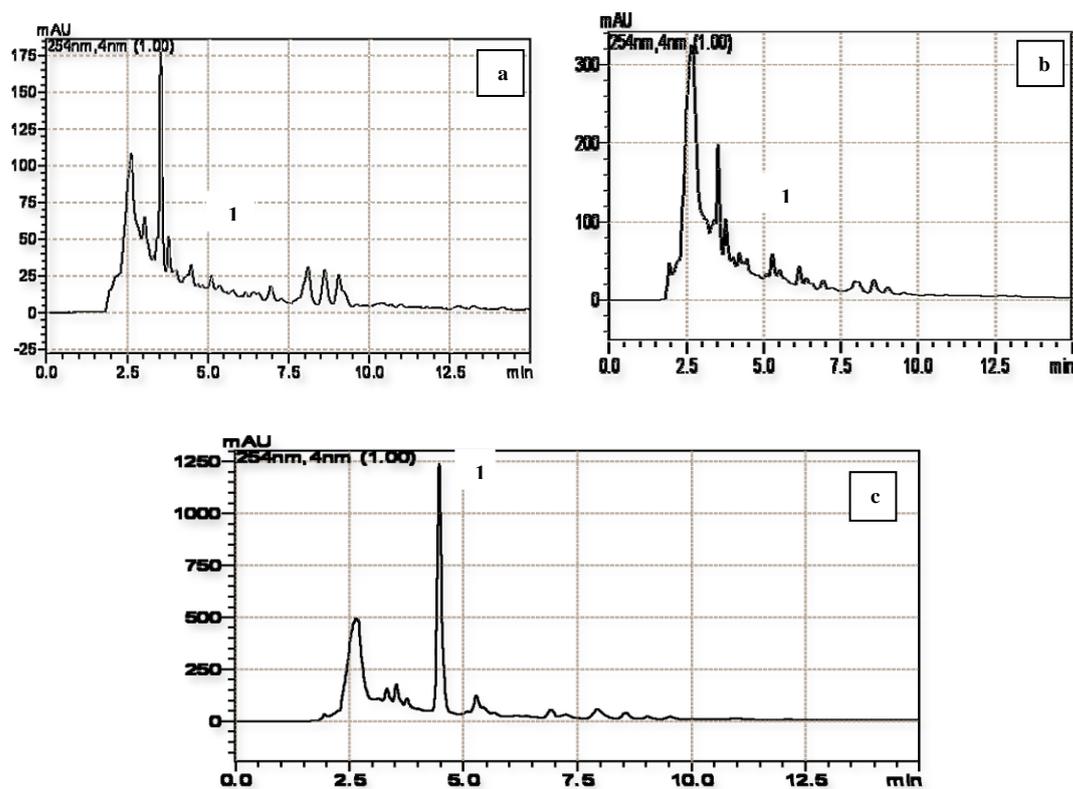
**Figura 18:** Cromatograma da inflorescência seca de *S. acmella* obtido por CLAE-DAD. Condições da análise cromatográfica: coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> 5µm (250 x 4,6 mm); eluição isocrática da fase móvel (método 1, TABELA 6), fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL; detecção a 228 nm, Pico 1: espilantol. Sistema EFS (TABELA 7-procedimento 1).

Partes da planta fresca (folha, caule e inflorescência) foram maceradas em dois solventes com polaridades diferentes, o metanol e hexano, para analisar uma maior eficiência na extração de espilantol durante o processo da maceração. Para análise desses extratos, a EFS foi realizada utilizando o procedimento 1 (TABELA 6) e a análise em CLAE-DAD foi feita em eluição isocrático com método 2 (TABELA 7), como mostra a TABELA 15.

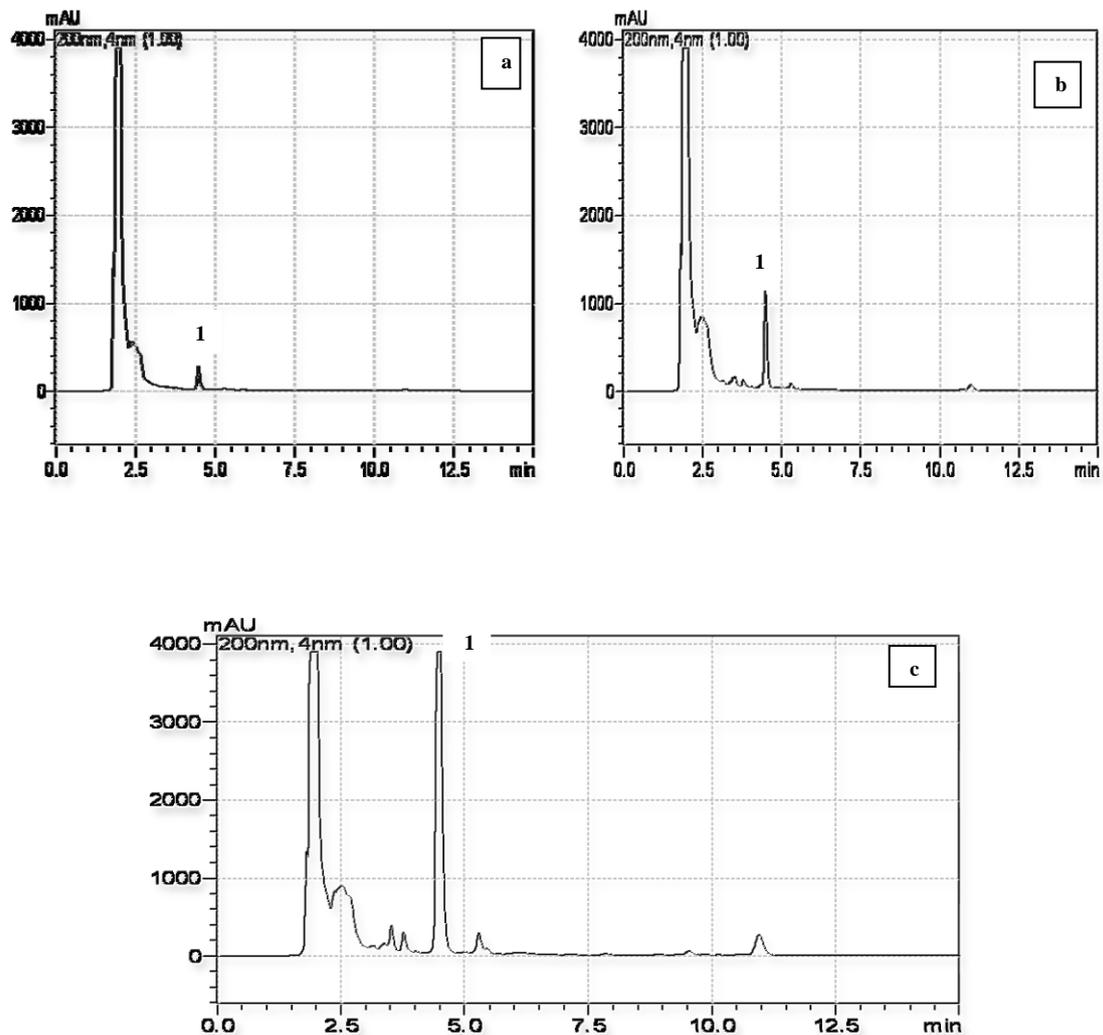
**Tabela 15:** Condições das análises em EFS (procedimento 1) e CLAE-DAD (método 2) .

CLAE-DAD (método 2)		EFS (procedimento 1)	
Proporção da fase móvel	MeOH/H <sub>2</sub> O (75/25)	Concentração do extrato (mg/mL)	30
Tempo de análise	13 min	Volume da amostra de extrato (µL)	300
Tempo de retenção (banda do espilantol)	5,1 min	Eluição (1 mL)	MeOH/H <sub>2</sub> O (45/55)
		Limpeza (1 mL)	MeOH

Na análise dos perfis cromatográficos dos extratos em hexano (FIGURA 19) observa-se que não houve uma separação adequada do analito de interesse, com linha de base alterada e bandas não definidas, além de extrair o espilantol em pouca quantidade. Porém na análise dos perfis cromatográficos dos extratos em metanol (FIGURA 20), o espilantol é extraído em uma maior quantidade, uma linha de base definida e banda cromatográfica definida para o espilantol. Portanto, neste trabalho, optou-se em analisar apenas os extratos em metanol de *S. acmella*.



**Figura 19:** Cromatogramas dos extratos em hexano de *S. acmella*: a) caule fresco, b) folha fresca e c) inflorescência fresca. Pico 1- espilantol. EFS e CLAE (TABELA 9), coluna  $C_{18}$   $5\mu\text{m}$  (250 x 4,6 mm) da Phenomenex<sup>®</sup>; fluxo de 1 mL/min; volume de injeção 25  $\mu\text{L}$ .



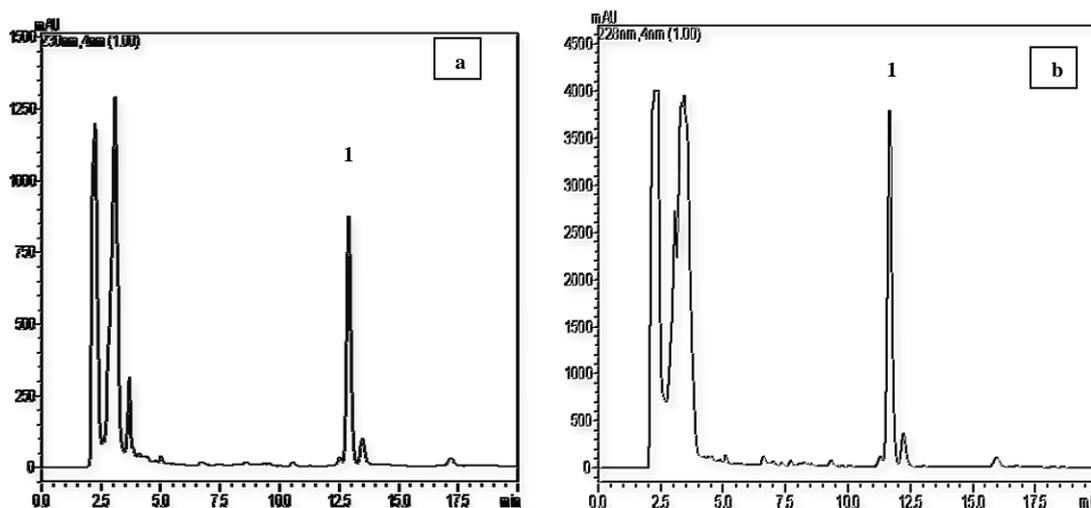
**Figura 20:** Cromatogramas dos extratos em metanol de *S. acmella*: a) caule fresco, b) folha fresca e c) inflorescência fresca. Pico 1- espilantol. EFS e CLAE (TABELA 15); coluna C<sub>18</sub> 5µm (250 x 4,6 mm) da Phenomenex®; fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL, 200 nm.

Após análises dos cromatogramas (FIGURA 20) pôde-se observar que a amostra da inflorescência (FIGURA 20- c) se mostra em alta concentração, sendo necessário desenvolver outro método de extração. Portanto, para a escolha do procedimento de EFS, a amostra do extrato (inflorescência seca) foi preparada nos procedimentos 2 e 3 (TABELA 6) e avaliados em um único método cromatográfico (método 3, TABELA 7), como mostra a TABELA 16.

**Tabela 16:** Condições das análises em EFS (procedimento 2 e 3) e CLAE-DAD (método 3) .

CLAE-DAD (método 3)		EFS (procedimento 2)		EFS (procedimento 3)	
Proporção da fase móvel	MeOH/H <sub>2</sub> O (50/50)	Concentração do extrato (mg/mL)	25	Concentração do extrato (mg/mL)	25
Tempo de análise (min)	20	Volume da amostra de extrato (µL)	200	Volume da amostra de extrato (µL)	200
Tempo de retenção (min) (banda do espilantol)	13	Eluição (1 mL)	MeOH/H <sub>2</sub> O (60/40)	Eluição (1 mL)	MeOH
		Limpeza (1 mL)	MeOH	Limpeza (1 mL)	H <sub>2</sub> O

Ao comparar os perfis cromatográficos dos dois procedimentos (FIGURA 21), observou-se que o procedimento 3 em EFS apresentou uma maior concentração de espilantol. Desta forma, este procedimento foi selecionado para realizar das amostras de *S. acmella*.



**Figura 21:** Cromatogramas do extrato em metanol (inflorescência seca). EFS: a) procedimento 2 e b) procedimento 3 (QUADRO 1). CLAE-DAD: método 3 (QUADRO 2); coluna C<sub>18</sub> Phenomenex® 5µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL. Pico 1- espilantol, 230 nm.

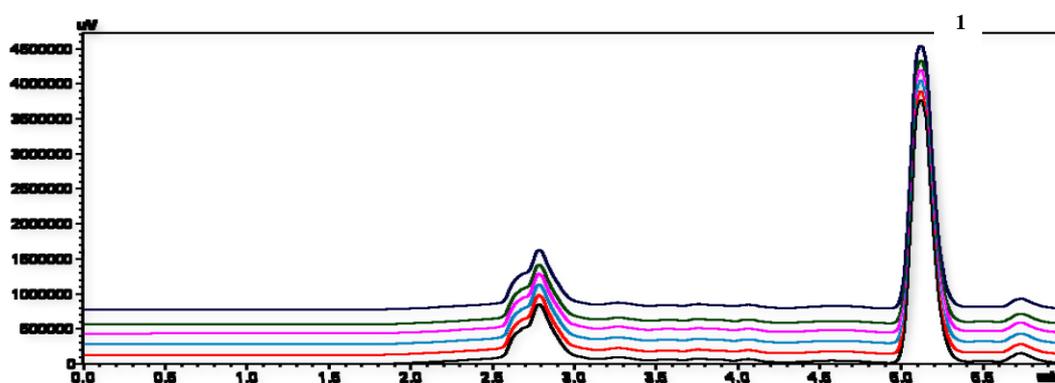
Outro método cromatográfico foi desenvolvido, incluindo um tempo adicional de limpeza para a retirada de possíveis impurezas retidas na coluna.

A FIGURA 22 mostra o cromatograma da análise do extrato da inflorescência utilizando para o EFS o procedimento 3 (TABELA 6) e o sistema gradiente (TABELA 8), como mostrado na TABELA 17.

**Tabela 17:** Condições das análises em EFS (procedimento 3) e CLAE-DAD (método 4) .

CLAE-DAD (método 4)		EFS (procedimento 3)	
Proporção da fase móvel	85% (MeOH) – 6 min 85-100% (MeOH) – 1 min 100% (MeOH) – 5 min 100-85% (MeOH) – 1 min 85% (MeOH) – 10 min	Concentração do extrato (mg/mL)	25
Tempo de análise (min)	23	Volume da amostra de extrato (µL)	200
Tempo de retenção (min) (banda do espilantol)	5,1	Eluição (1 mL)	MeOH
		Limpeza (1 mL)	H <sub>2</sub> O

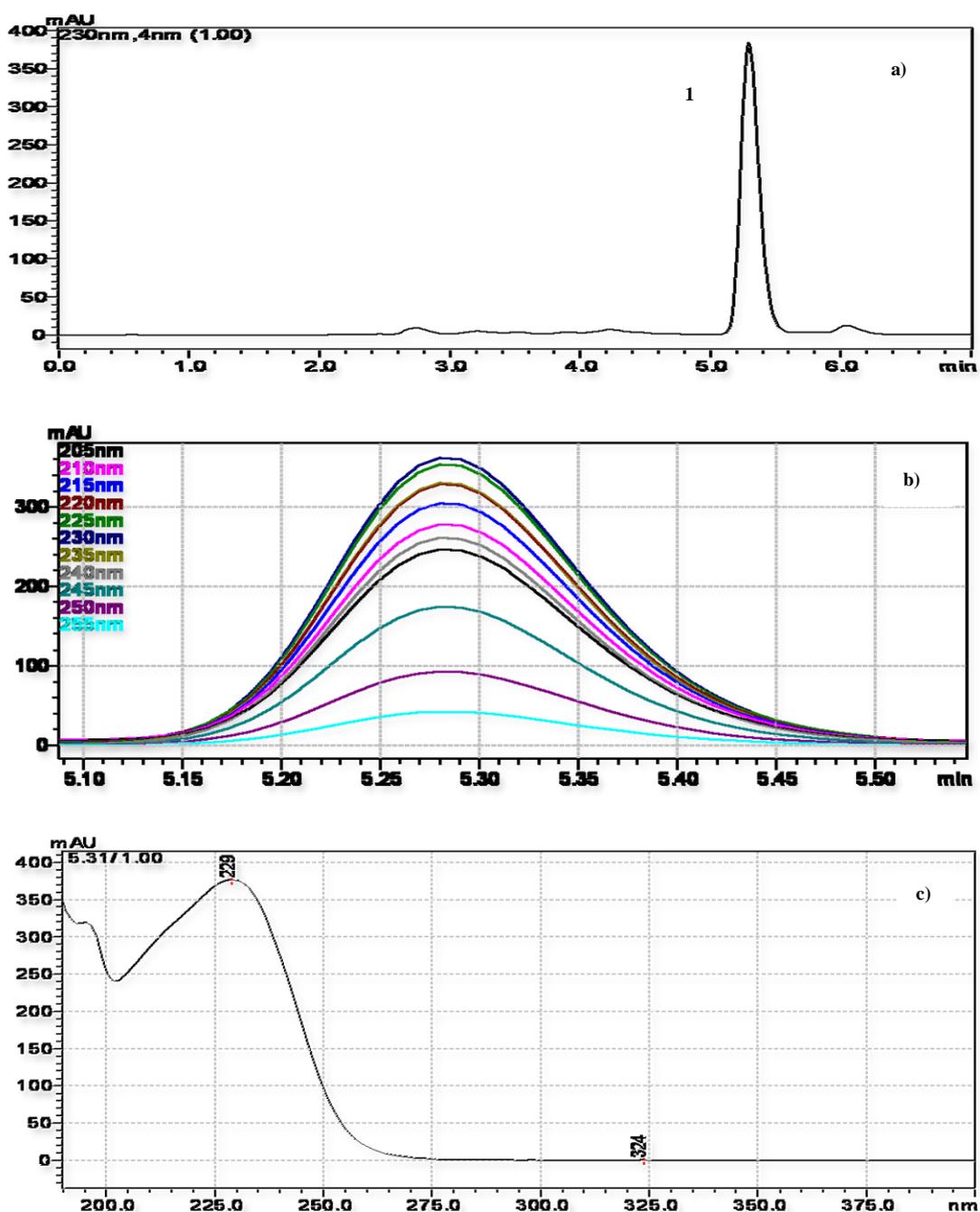
A FIGURA 22 mostra um perfil com linha de base definida e com boa resolução. Esses dois métodos, o de extração e o cromatográfico foram selecionados como padrão para o desenvolvimento do trabalho.



**Figura 22:** Cromatograma do extrato em metanol, inflorescência seca (n=6). EFS e CLAE-DAD (TABELA 17), coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL. Pico 1- espilantol, 230 nm.

#### 5.4 Seleção do comprimento de onda nas análises cromatográficas

Com a obtenção do cromatograma da amostra padrão (FIGURA 23-a), o epilantol, pôde-se obter o espectro de absorção (FIGURA 23-b) em diferentes comprimentos de onda, utilizando o detector espectrofotômetro de arranjo de diodo, sendo que o comprimento de 230 nm foi selecionado por apresentar uma maior absorção do analito de interesse (FIGURA 23-c). Portanto, o comprimento de onda de 230 nm, foi utilizado como comprimento padrão para análise das amostras de extratos de *S. acmella*.



**Figura 23:** Cromatogramas referentes às análises do epilantol. EFS e CLAE-DAD (TABELA 12); coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1

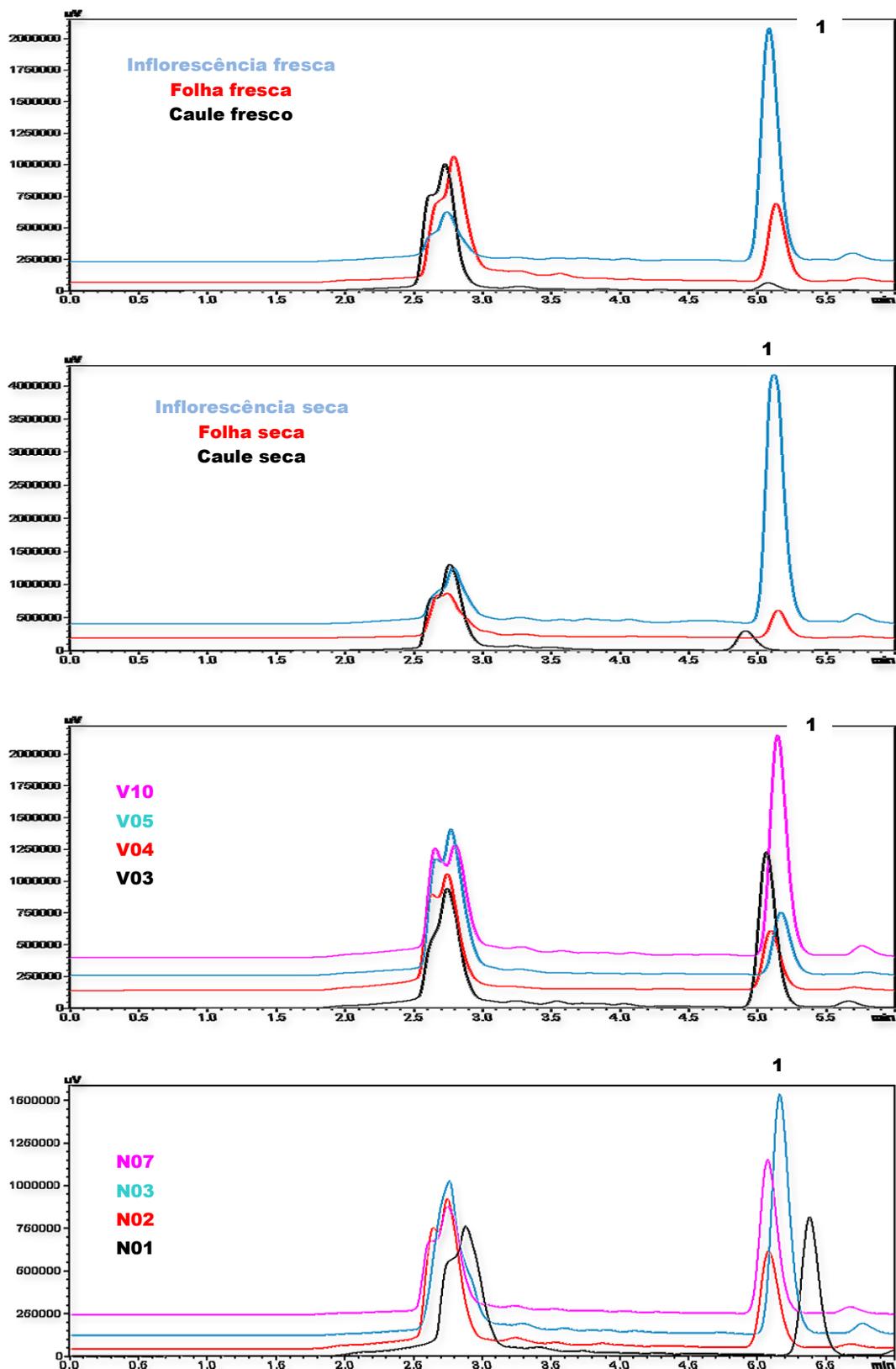
mL/min; volume de injeção 25 µL. Pico 1- espilantol. a) perfil cromatográfico do padrão (0,1 mg/mL), b) cromatograma de absorção referente ao pico do espilantol ( $t_R=5,1$ ), c) espectro UV de absorção da banda cromatográfica do espilantol.

### **5.5 Análise qualitativa dos perfis cromatográficos dos extratos de *S. acmella***

Um cromatograma fornece apenas uma peça de informação qualitativa acerca de cada espécie em uma amostra, a saber, seu tempo de retenção ou sua posição sobre a fase após certo período de eluição. Deve-se notar que um simples cromatograma não indica o número total dos compostos existentes na amostra. É importante observar que os cromatogramas podem não levar a identificação positiva dos constituintes presentes na amostra, mas fornece evidência segura da ausência de certos compostos.<sup>59</sup>

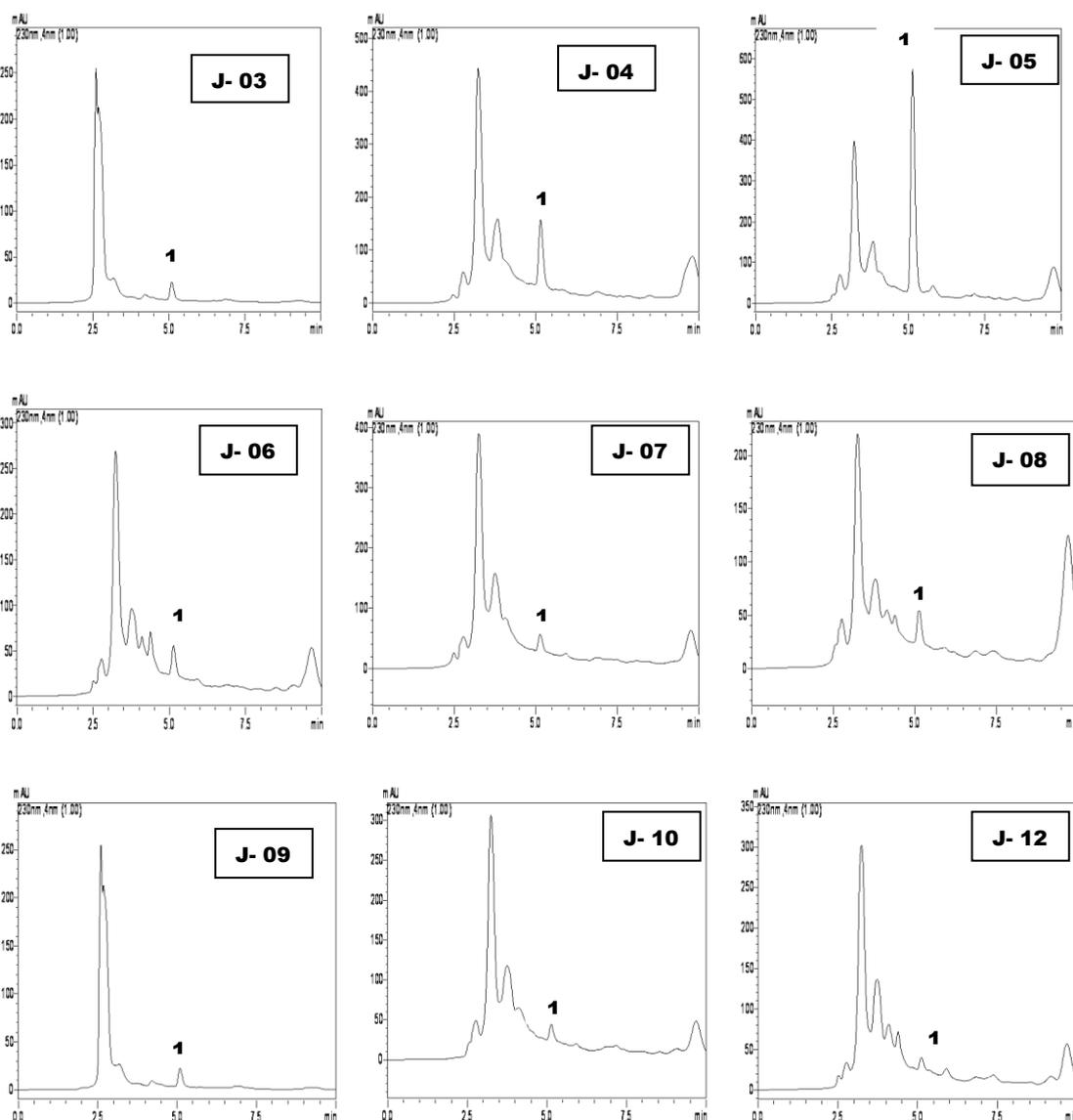
Após a otimização das condições de extração por EFS e cromatográficas em CLAE-DAD, as amostras dos extratos metanólicos e etanólicos foram preparadas minutos antes das injeções no cromatógrafo e através dos perfis cromatográficos obtidos (FIGURA 24 e FIGURA 25) pôde-se fazer uma análise qualitativa das amostras.

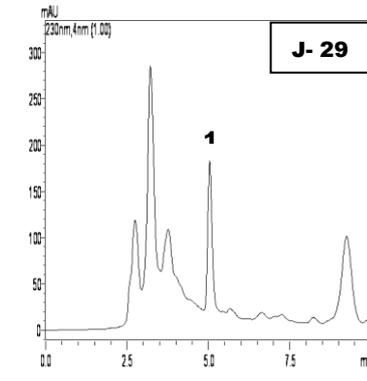
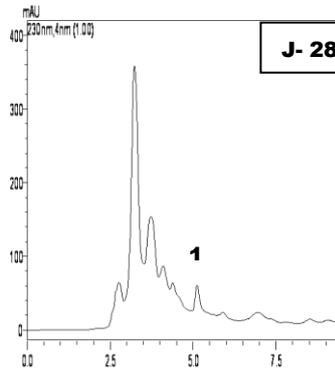
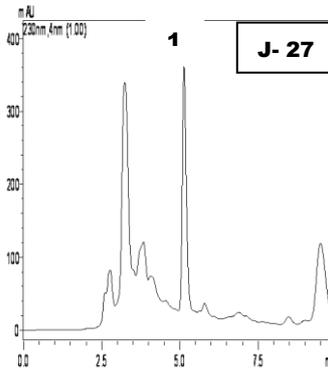
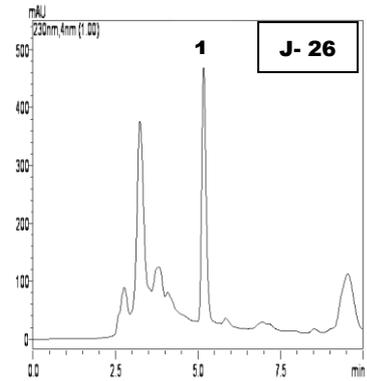
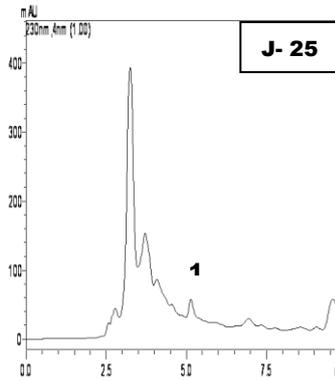
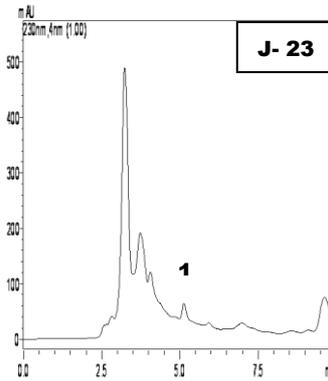
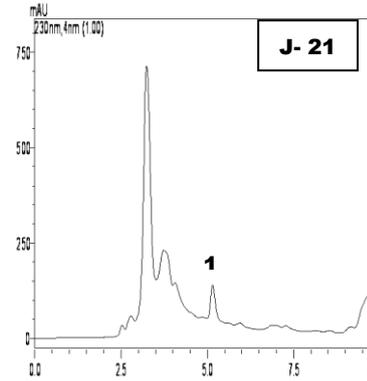
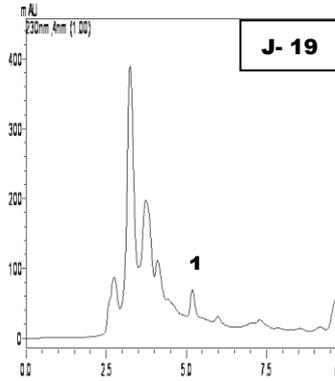
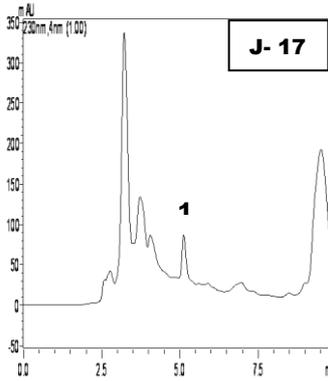
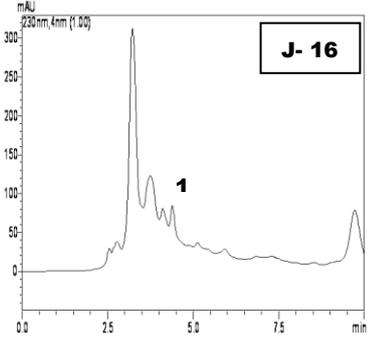
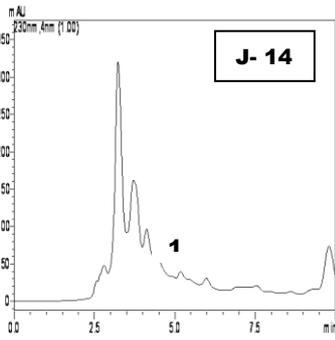
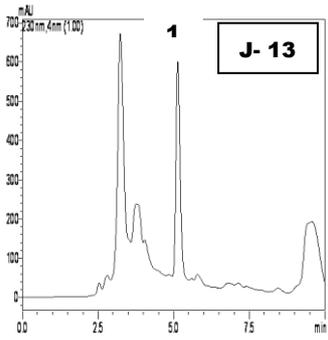
Avaliando-se os perfis cromatográficos mostrados na FIGURA 24, foi observada uma ótima separação para o analito de interesse e um perfil semelhante entre os extratos metanólicos, possibilitando sua comparação qualitativa. Comparando-se valores de absorção nos cromatogramas, dentre todos os extratos, a inflorescência seca apresenta uma maior intensidade do pico do espilantol.

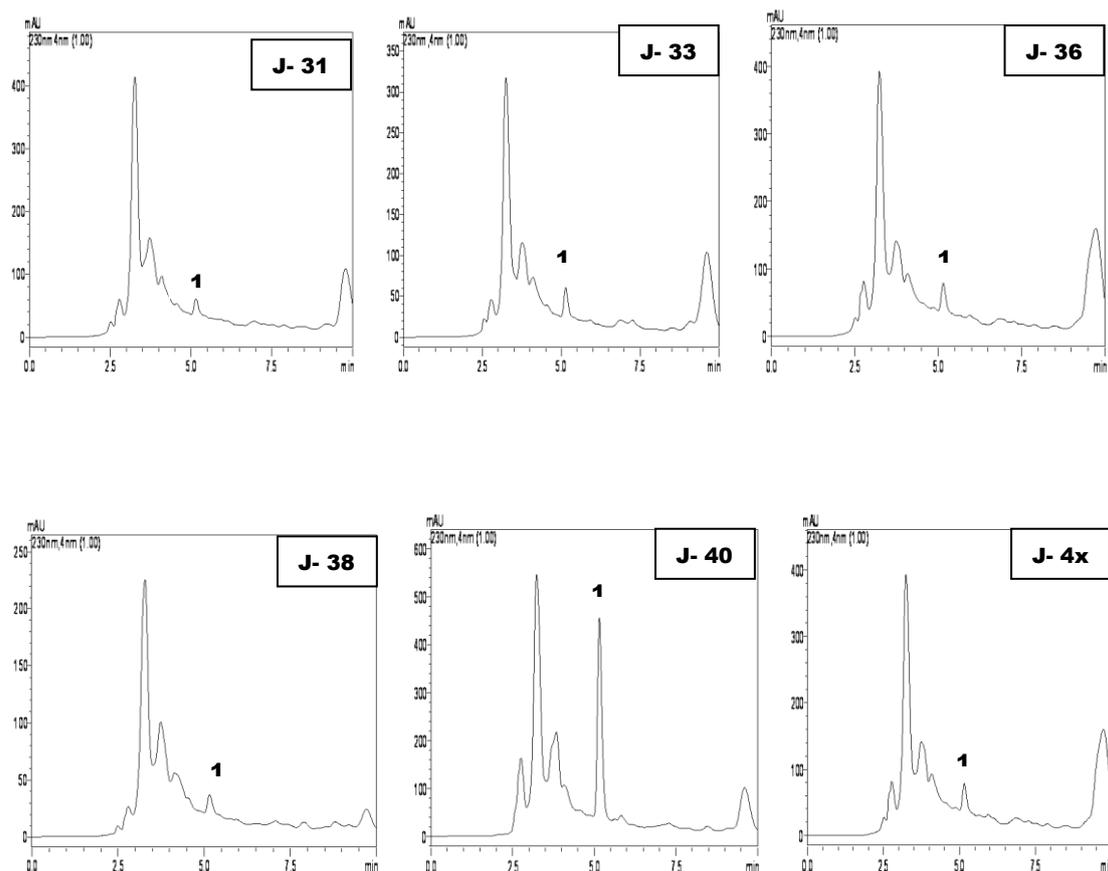


**Figura 24:** Cromatogramas dos extratos metanólicos de *S. acmella*. EFS: e CLAE-DAD (TABELA 17), coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL. Pico 1- espilantol, 230 nm.

Através dos perfis cromatográficos mostrados na FIGURA 25, foi observada uma boa separação para o analito de interesse para alguns extratos, um perfil não semelhante entre todos os extratos etanólicos e uma linha de base não definida, porém possibilitou sua comparação qualitativa. Através dos valores de absorção observados nos cromatogramas, dentre todos os extratos, os acessos J-05 e J-13 apresentam uma intensidade maior do pico do epilantol.







**Figura 25:** Cromatogramas (230 nm) dos extratos etanólicos oriundos de melhoramento genético de *S. acmella*. EFS e CLAE-DAD (TABELA 17), coluna Phenomenex® C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL. Pico 1- epilantol.

## 5.6 Isolamento e caracterização do padrão de epilantol

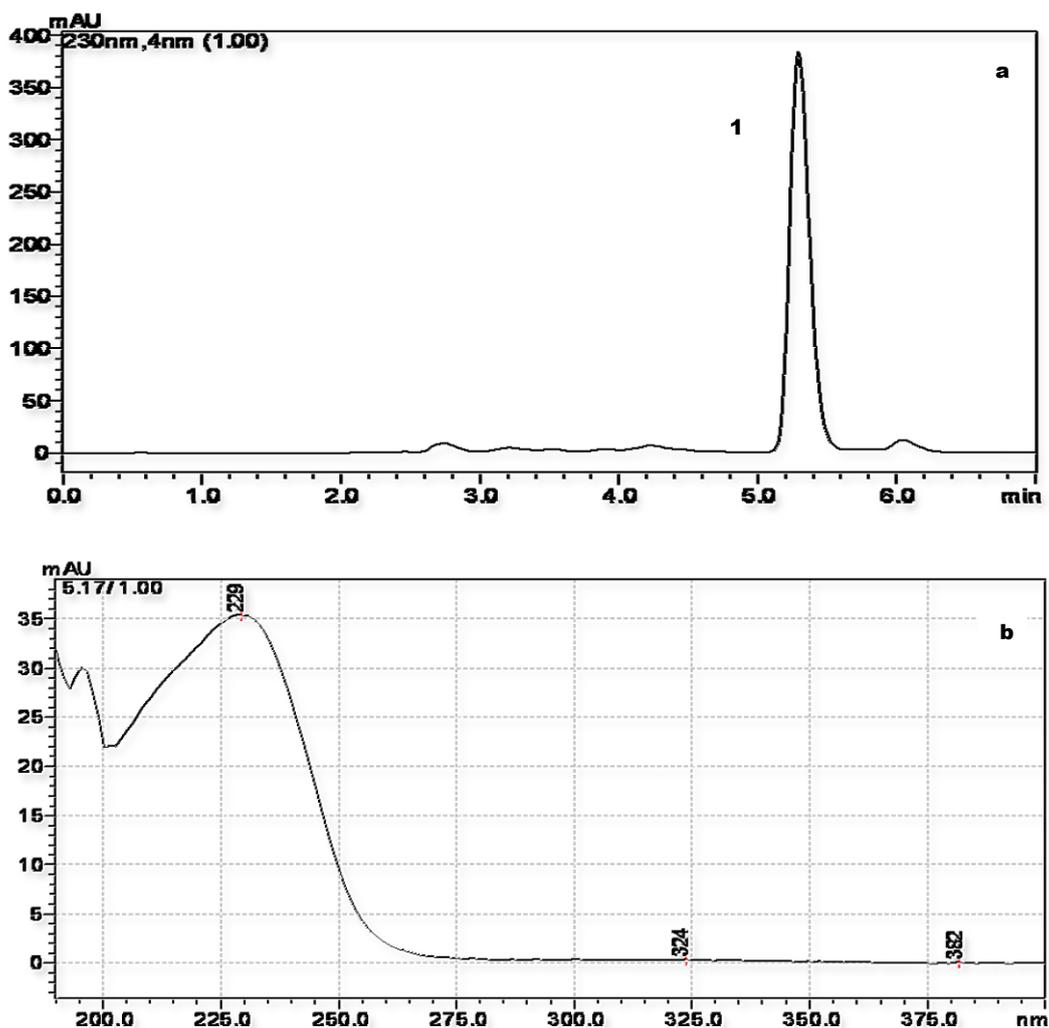
Para realização do desenvolvimento do método foi necessário obter uma quantidade suficiente do padrão. O epilantol não é um padrão comercialmente disponível. Desta forma foi necessário realizar o isolamento e a caracterização das amostras de *S. acmella*.

O padrão foi isolado a partir do extrato da inflorescência seca, já que, na análise qualitativa dos extratos metanólicos, foi o que apresentou uma maior absorção referente à banda do epilantol. As condições cromatográficas de análise foram aquelas utilizadas foi à mesma utilizada nas análises dos

extratos de *S. acmella*, porém foi utilizada uma coluna semi-preparativa e o fluxo foi ajustado para 3,5 mL/min.

No isolamento foi coletada a parte central da banda do espilantol para evitar possíveis contaminações. Após todos os procedimentos (Parte Experimental, item 5.6.2), o rendimento em massa de espilantol foi de 16,7 mg.

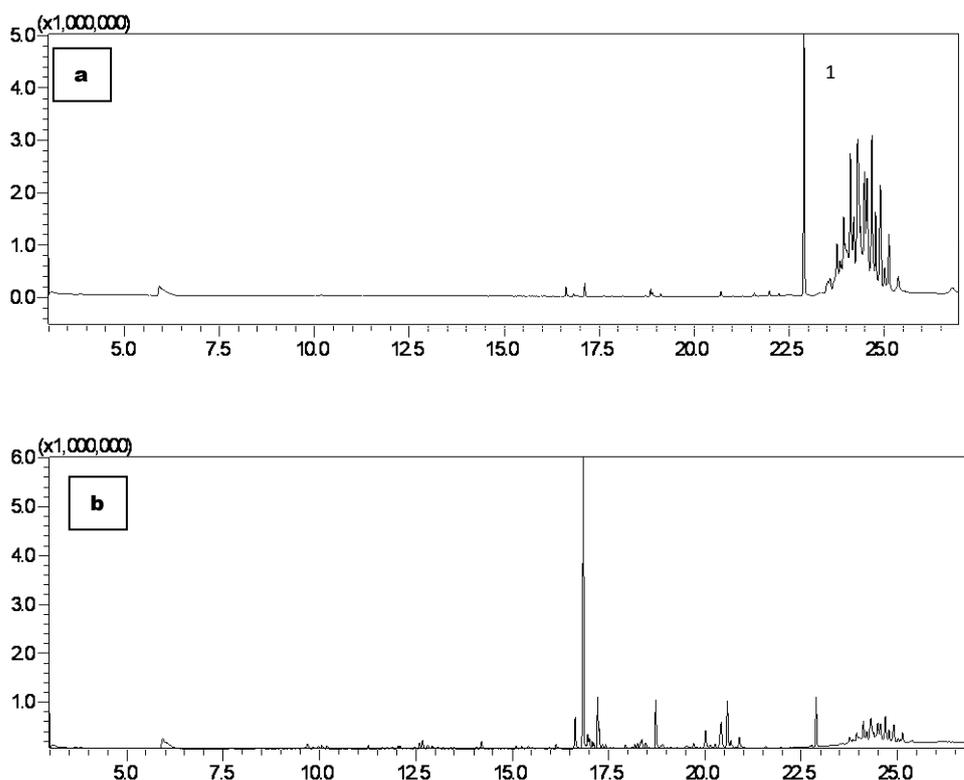
O padrão isolado foi injetado no cromatógrafo em modo gradiente (TABELA 8), para avaliar o grau de pureza, FIGURA 26. Estimou-se o grau de pureza da banda cromatográfica do espilantol em 89,4%.



**Figura 26:** a) Cromatograma (230 nm) do espilantol em CLAE-DAD: sistema gradiente (TABELA 8), coluna C<sub>18</sub> Phenomenex<sup>®</sup> 5 μm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 μL. Pico 1- espilantol tempo de retenção: 5,1 min. b) Espectro do espilantol na região UV-Vis.

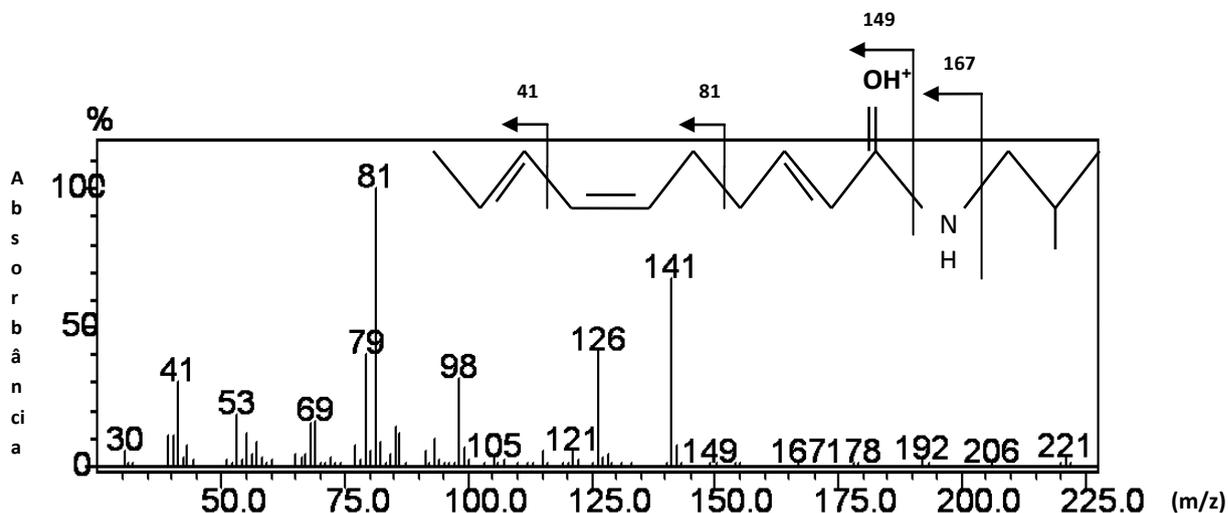
A CLAE-DAD limita-se a existência de grupos cromóforos na molécula para o detector na região do UV.<sup>43</sup> Portanto, o grau de pureza do padrão isolado foi também avaliado por a gás acoplada a espectrofotômetro de massas.

O epilantol isolado e o solvente metanol (utilizado no processo de isolamento) foram analisados por CG-EM. Na FIGURA 27 (a e b), apresenta os cromatogramas obtidos, demonstrando haver uma contaminação do padrão com o solvente utilizado. Com os resultados das áreas obtidas a partir dos cromatogramas, foi feito um *background* obtendo-se uma pureza de 82,05%, que será utilizado de referência para a quantificação nas amostras de *S. acmella*.



**Figura 27:** Cromatogramas analisados em CG-MS: modo de injeção *splitless*, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da coluna 80 °C, gás de arraste Hélio com fluxo de 1,6 mL/min e coluna da Supelco, Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25µm). Modo de impacto por elétrons a 70 eV. Programação de temperatura para a coluna 80°C - 290°C (razão de 10°C/min), com tempo de análise de 27 min. a- cromatograma do epilantol e b- cromatograma do metanol.

Na FIGURA 28, o espectro de massa identifica o espilantol nessas fragmentações dos picos como m/z 41[C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>], m/z 81[C<sub>6</sub>H<sub>9</sub>], m/z 149 [C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>O<sup>+</sup>], m/z 167 [C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>NO<sup>+</sup>], característicos de aminas.<sup>13,14</sup>



**Figura 28:** Espectros de massas obtidos no CG-MS: modo de injeção *splitless*, temperatura do injetor 250 °C, temperatura da coluna 80 °C, gás de arraste Hélio com fluxo de 1,6 mL/min e coluna, Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Modo de ionização impacto de elétrons a 70 eV. Programação de temperatura para a coluna 80°C - 290°C (razão de 10°C/min), com tempo de corrida de 27 min.

A estereoquímica do espilantol isolado foi confirmada nesses espectros de <sup>1</sup>H-RMN e <sup>13</sup>C-RMN, comparando-se com dados da literatura<sup>13,14</sup>, referentes ao espilantol: <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ 6.83 (dt, 1H, J=15Hz), 6.29 (br dd, 1H, J=15Hz), 5.97 (dd, 1H, J=11Hz), 5.77 (br d, 1H, J=15Hz), 5.70 (dq, 1H, J=15Hz), 5.47 (br s, 1H), 5.26 (dt, 1H, J=11Hz), 3.14 (dd, 2H), 2.29 (m, 4H), 1.78 (m, 1H), 1.78 (d, 3H), 0.93 (d, 6H) e para o espectro de <sup>13</sup>C-RMN (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), δ 165.97, 143.61, 129.96, 129.45, 127.66, 126.69, 124.10, 46.86, 32.10, 28.59, 26.38, 20.31, 18.31. Os espectros obtidos são mostrados nas FIGURAS 29-34.

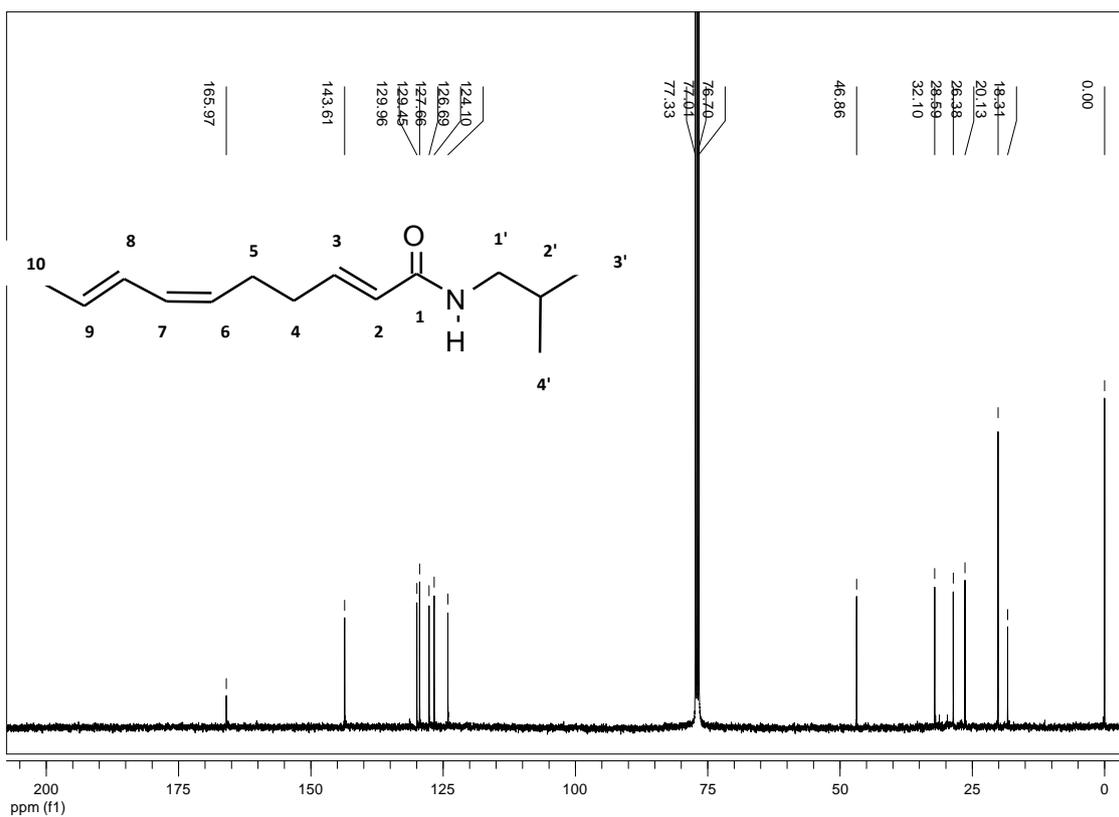


Figura 29: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do epilantol (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

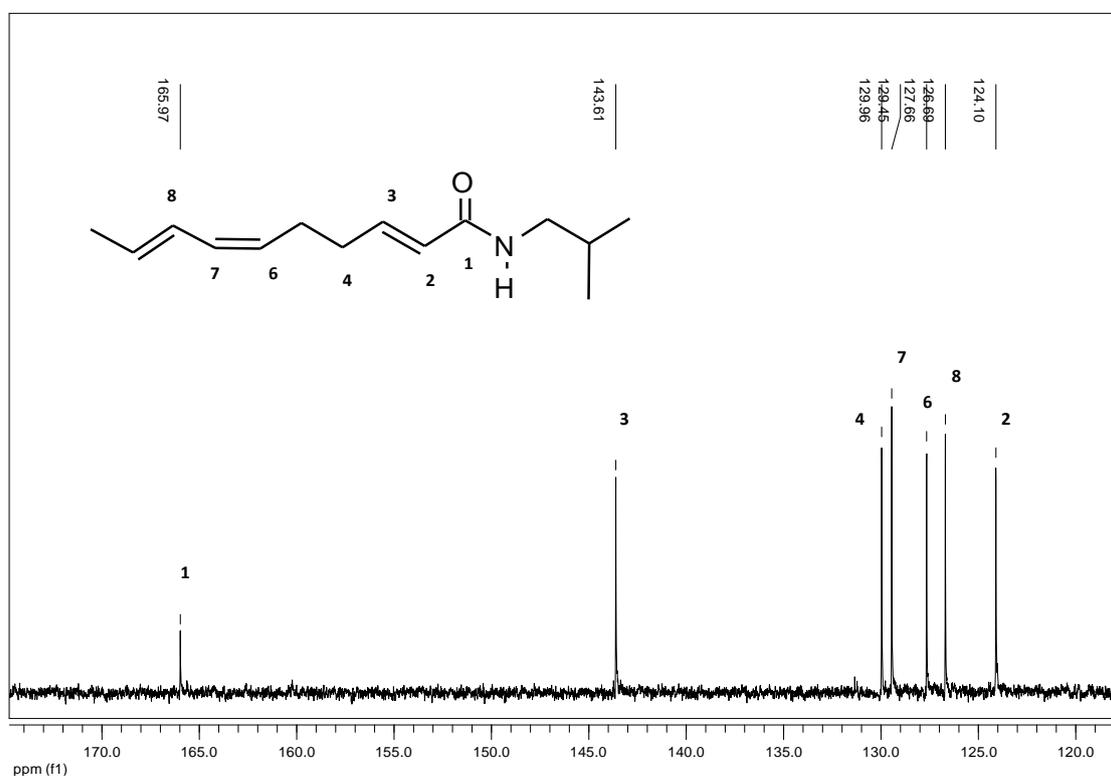
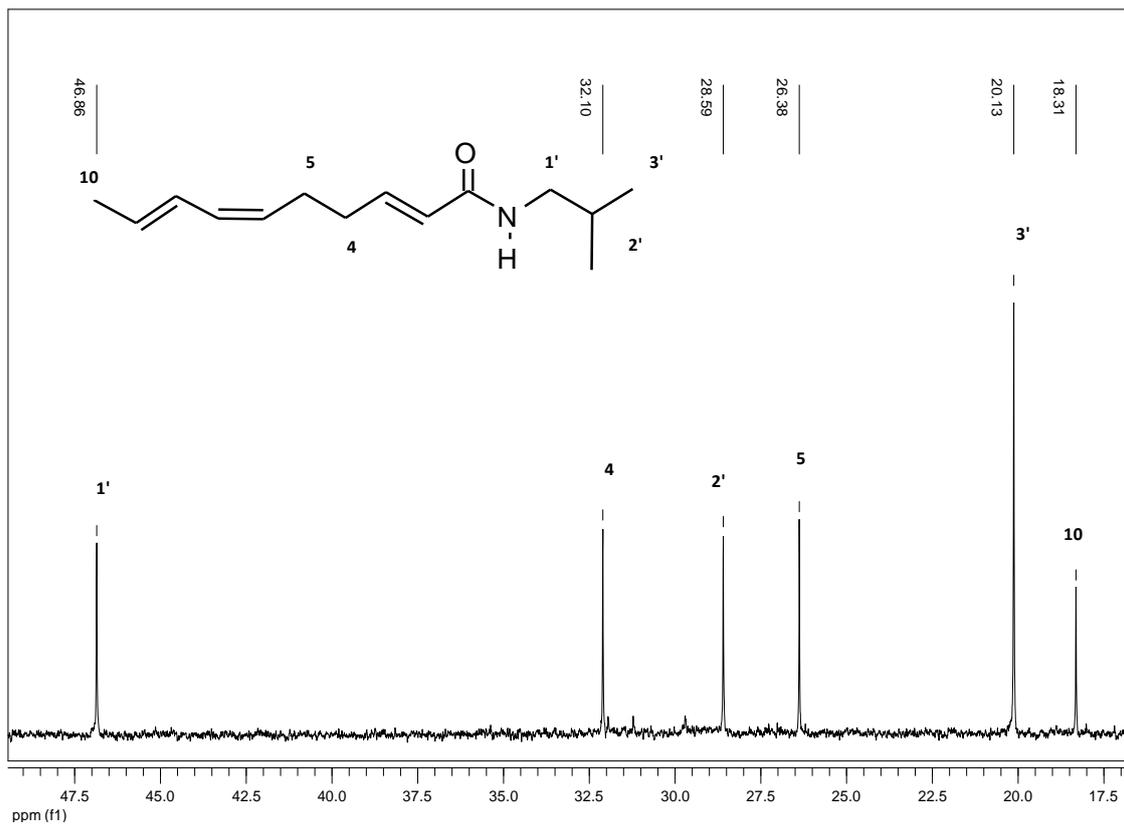
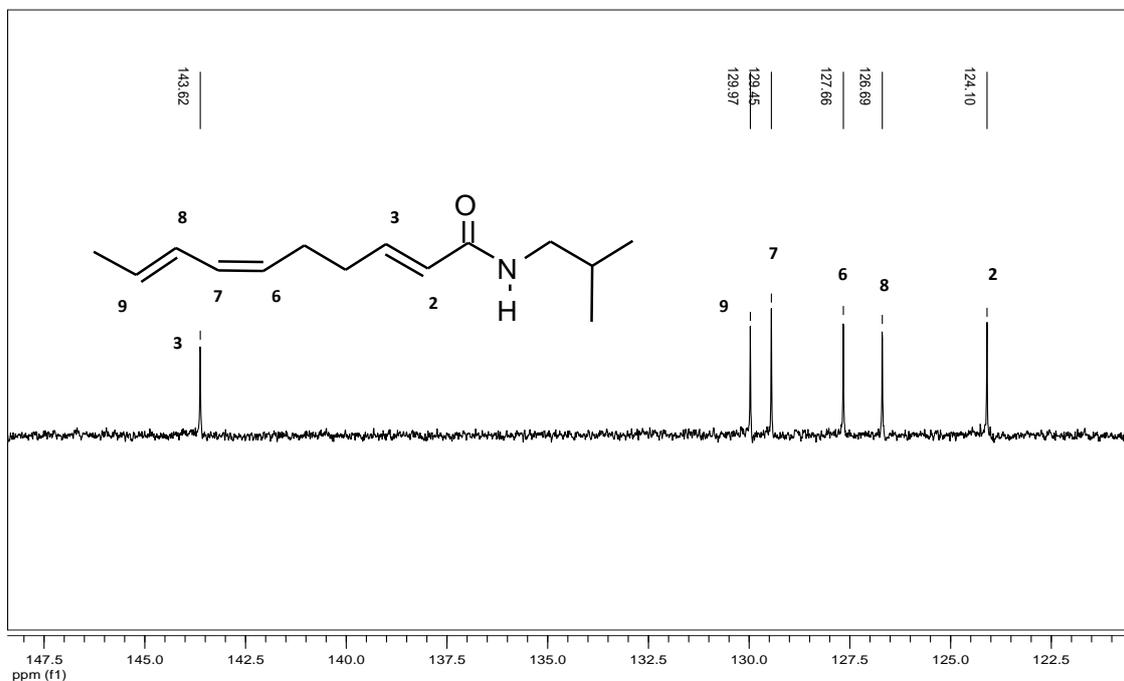


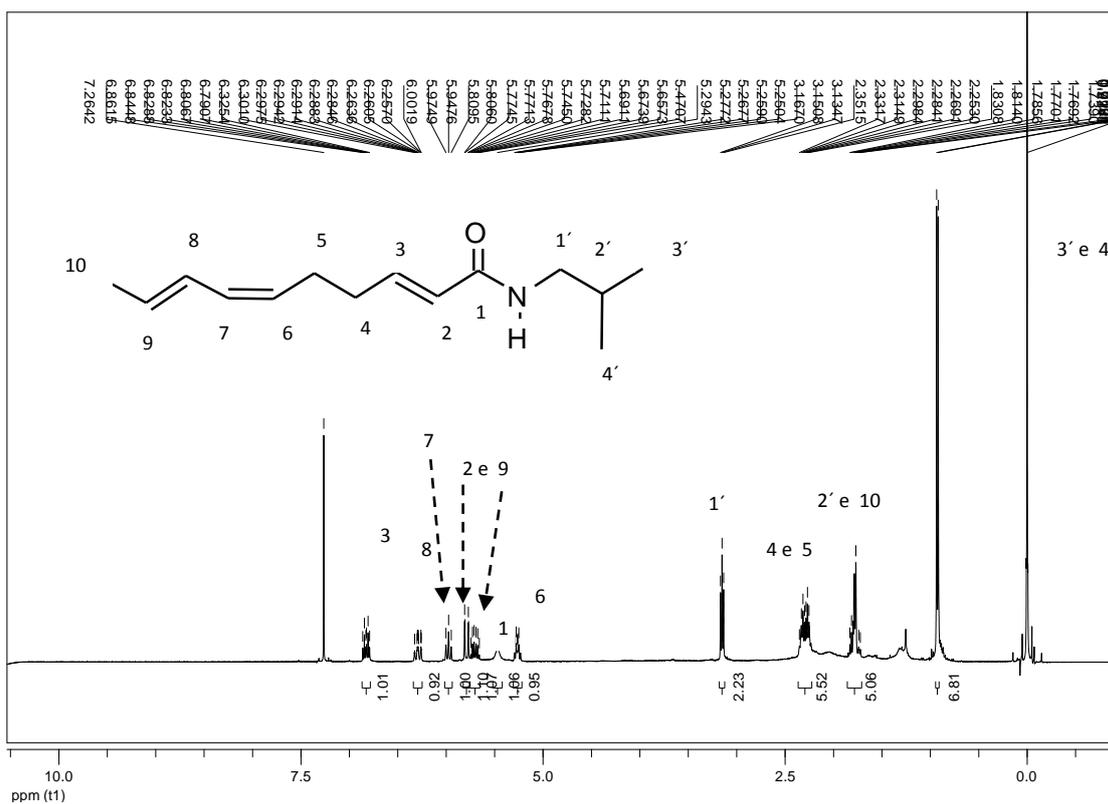
Figura 30: Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN do epilantol ampliado entre 120-170 ppm (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



**Figura 31:** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN DEPT 135 do epilantol ampliado entre 17.5-47.5 ppm (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



**Figura 32:** Espectro de <sup>13</sup>C-RMN DEPT 135 do epilantol ampliado entre 122-147 ppm (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>).



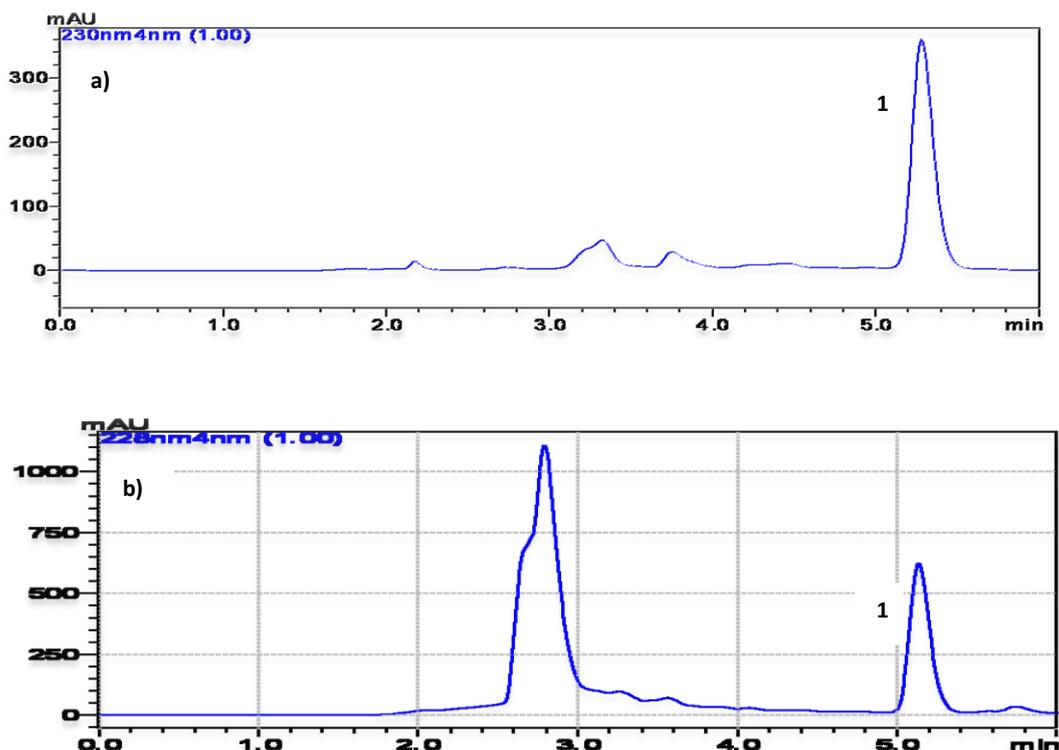
## 5.7 Validação do método

A validação do método seguiu as normas estabelecidas pela ANVISA através da RDC de nº 899 de 2003<sup>48</sup>, para validação de métodos analíticos. Foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: especificidade, linearidade, precisão, exatidão, limites de quantificação e de detecção.

A validação do método permite verificar se os resultados obtidos no desenvolvimento do método são confiáveis, de forma que possa ser aplicado rotineiramente em análises de extratos de *S. acmella*.

### 5.7.1 Especificidade

A especificidade do método cromatográfico pôde ser determinada pela comparação dos perfis cromatográficos obtidos da solução padrão (FIGURA 35-a) e dos extratos de *S. acmella* (FIGURA 35-b), demonstrando a inexistência de quaisquer interferentes nos cromatogramas, independente da amostra analisada.



**Figura 35:** Cromatogramas dos extratos metanólicos de *S. acmella*. EFS: e CLAE-DAD (TABELA 17), coluna Phenomenex<sup>®</sup> C<sub>18</sub> 5 µm (250 x 4,6 mm); fluxo 1 mL/min; volume de injeção 25 µL. a) amostra do espilantol e b) amostra do acesso N02, Pico 1- espilantol ( $t_r= 5,1$  min.), 230 nm.

### 5.7.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada por dois métodos de calibração: padronização externa e padronização por adição de padrão. A padronização externa é utilizada em amostras que não precisam de extenso pré-tratamento,<sup>46</sup> como é o caso das análises de extratos de espécies de *S. acmella* estudadas no presente trabalho. Neste caso, a construção da curva de calibração foi feita através de padrões de calibração, que são soluções de concentrações conhecidas do analito.

Avaliando-se os resultados obtidos na TABELA 18, conclui-se que a curva analítica apresentou linearidade satisfatória na faixa de 2 a 122 µg/mL, uma vez que as razões S/Q para cada ponto da curva não se desviaram mais do que 5% em relação ao coeficiente angular da reta.

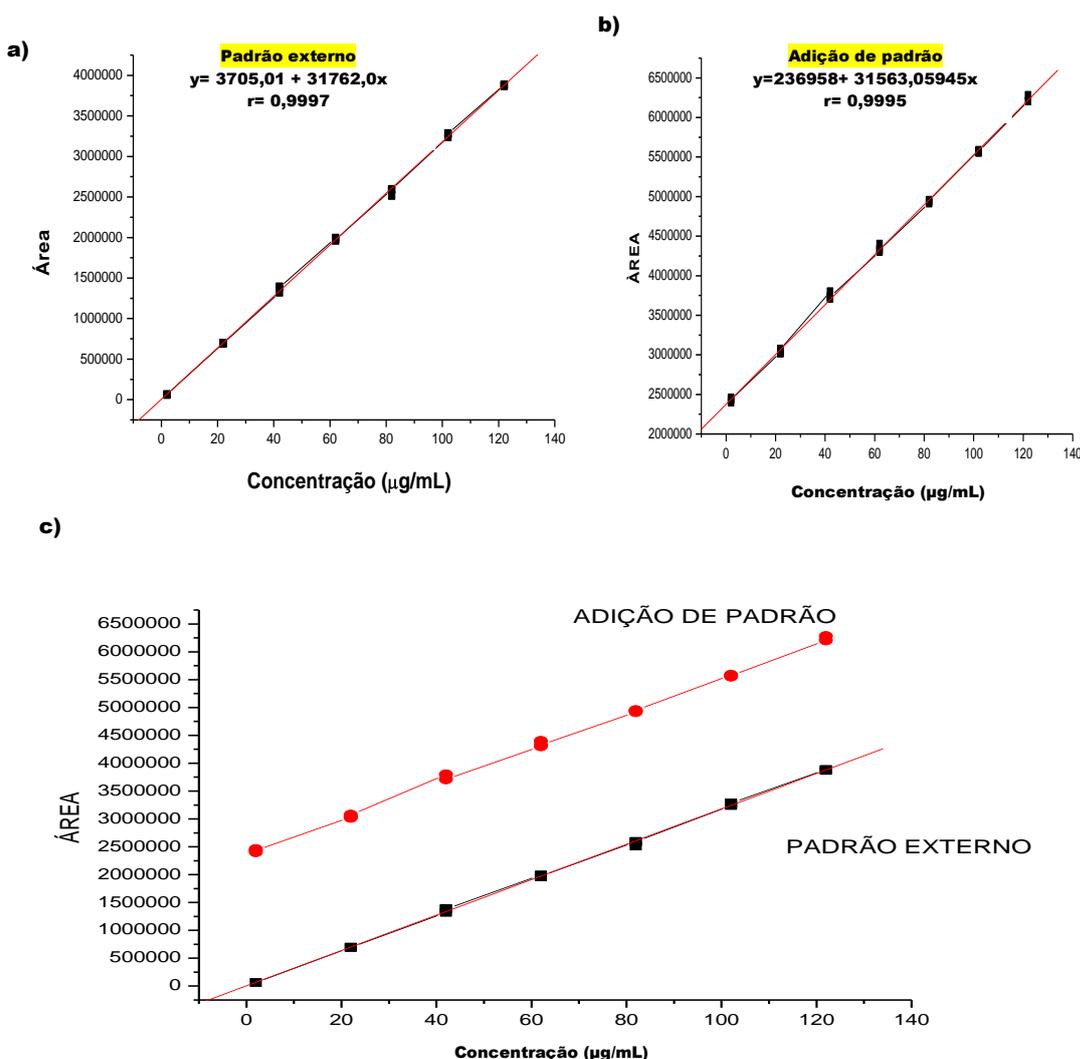
**Tabela 18.** Resultados referentes ao estudo da linearidade tendo como base a concentração de espilantol e a área média obtida nas análises cromatográficas.

Concentração (µg/mL)	Área média	S/Q (%)
2	62352,6	92,3
22	695018,3	98,9
42	1366516,6	102,1
62	1976863,3	100,2
82	2566376,6	98,4
102	3266603,3	100,7
122	3876920,0	99,9

#### 5.7.2.1 Curvas de calibração analíticas

As curvas analíticas foram construídas a partir de sete concentrações diferentes de espilantol (2, 22, 42, 62, 82, 102 e 122 µg/mL), as quais foram analisadas em triplicatas, e a regressão foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados. O procedimento de preparação das amostras foi descrito nos itens 4.3 e 4.7.1 do Procedimento Experimental.

As curvas analíticas estão na FIGURA 35. Os valores de correlação foram de 0,9997 e 0,9995 para a curva de padrão externo e adição de padrão respectivamente. Esses valores estão de acordo com o exigido pela ANVISA,<sup>48</sup> para métodos analíticos,  $r^2 = 0,99$ .



**Figura 36:** Curvas analíticas: a) curva por padrão externo, b) curva de adição de padrão e c) comparação entre as duas curvas obtidas por adição de padrão e por padrão externo para o método da quantificação de espilantol em amostras de *S. acmella*.

A comparação entre as duas curvas (FIGURA 36-c) mostra o comportamento paralelo entre as linhas de regressão, o que demonstra ser um método seletivo. Essa seletividade também foi avaliada a partir de dados

estatísticos, como mostra o TABELA 19. A comparação foi feita pela quantificação do espilantol na amostra V03 (sem adição de padrão) utilizando a regressão por padrão externo e por adição de padrão sendo calculada através da EQUAÇÃO 5. O coeficiente de variação de 0,45% entre os valores de concentração experimental prova a seletividade do método.

**Tabela 19:** Comparação entre as curvas de calibração, através da quantificação do espilantol na amostra do acesso V03.

Equação da reta	Área VO3 (2381784)
(Padrão externo) $y=3705,1+31762,0x$	Conc. Exp.= 75,21µg/mL
(Adição de Padrão) $y=2,369 \times 10^6 + 31563,05x$	Conc. Exp.= 75,68 µg/mL

### 5.6.3 Limite de quantificação e Limite de detecção

O Limite de detecção (LD) e o Limite de quantificação (LQ) podem ser calculados pelo método relação sinal-ruído ou métodos baseado em parâmetros da curva analítica.<sup>46</sup> As soluções utilizadas nas construções das curvas estão descritas no item 4.7.2 do Procedimento Experimental. Neste trabalho foram utilizados parâmetros da curva analítica para determina o LD e o LQ desse método.

O limite de detecção representa a menor concentração da substância em análise que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental.<sup>41</sup> O LD foi determinado pela análise em quintuplicata de amostras preparadas em ordem decrescente (abaixo de 0,5 µg/mL). O limite de detecção determinado foi de 0,1 µg/mL.

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em análise que pode ser medida.<sup>48</sup> O LD foi determinado pela análise em quintuplicata de amostras preparadas em ordem decrescente (abaixo de 2,0 µg/mL) . O limite de quantificação determinado foi de 0,7 µg/mL.

#### 5.6.4 Precisão

A precisão foi avaliada pela repetibilidade (precisão intra-corrída) e da precisão intermediária (precisão inter-corrídas). A precisão do método foi verificada utilizando-se três concentrações da solução padrão: 2,2 µg/mL (baixa), 62 µg/mL (média) e 103 µg/mL (alta), contemplando a faixa de variação da curva de calibração, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração em dias não consecutivos.

A TABELA 20 mostra os valores obtidos nas análises cromatográficas. O coeficiente de variação, que é utilizado para avaliar precisão do método, variou entre 0,9 e 4,3%, estando dentro do limite aceitável pela ANVISA,<sup>48</sup> de 15%, demonstrando que o método analítico é preciso para quantificação de amostras de *S. acmella* no intervalo de concentração estudado.

**Tabela 20:** Dados da análise da precisão (repetibilidade).

Concentração do padrão (µg/mL)	1° dia (n=5)	2° dia (n=5)	3° dia (n=5)
	CV	CV	CV
2,2	1,23	1,51	0,9
62	2,37	2,23	4,3
103	1,35	1,97	1,28

CV= coeficiente de variação e n= número de análises cromatográficas.

#### 5.6.5 Exatidão

A exatidão é um parâmetro que permite julgar a confiabilidade do método analítico e deve ser investigada após a determinação da especificidade, linearidade e precisão do método.<sup>47</sup> Na validação de método analítico, a exatidão é obtida através da aproximação de resultados, ou seja, devido à impossibilidade de se trabalhar com amostras certificadas do analito na matriz de interesse, as amostras padrão são obtidas pela adição do analito na amostra branco ou pelo uso amostra que já contenham uma determinada quantidade do analito.<sup>46</sup>

Para avaliar a exatidão do método foi utilizado o processo de ensaio de recuperação. Esse método é usado quando é difícil ou impossível preparar um

branco da matriz sem a substância de interesse.<sup>47</sup> Utilizando as amostras controle de qualidade (CQ) que devem ser determinadas em 3 concentrações diferentes baseados nos intervalos das concentrações da curva de padrão externo: controle de qualidade baixa (CQB) que deve ser menor ou igual a 3x LIQ (limite inferior de quantificação); controle de qualidade média (CQM) que deve ser aproximadamente a média entre CQB e CQA e o controle de qualidade alta (CBA) que deve ser 75 a 90% da maior concentração da curva de calibração.

Amostra da matriz V03 foi fortificada com três níveis de concentrações diferentes de solução padrão: 2 µg/mL (baixa), 62 µg/mL (média) e 122 µg/mL (alta), e em seguida, foram adicionadas amostra da matriz conforme o item 4.7.4 no Procedimento Experimental. A amostra sem a adição de padrão (V03) e cada uma das amostras com adição do padrão (concentração estimada) foram analisados e a recuperação foi expressa em termo de porcentagem da quantidade medida da substância em relação à quantidade adicionada na matriz. Os valores obtidos encontram-se descritos na TABELA 21.

A determinação da recuperação do analito foi realizada através da sua quantificação na matriz em estudo pelo emprego de um padrão. A porcentagem de recuperação possui valores aceitáveis das especificações esperadas para matrizes complexas (80-120%).<sup>48</sup>

**Tabela 21:** Porcentagem de recuperação de espilantol aplicando-se o método analítico.

Nível de fortificação (µg/mL)	Concentração experimental (µg/mL)	Recuperação (%)
2	2,1	105,0
62	63,25	102,01
122	122,29	100,24

Com os valores obtidos em cada parâmetro, dentro dos limites aceitáveis da ANVISA<sup>48</sup>, o método mostra-se preciso e exato para aplicação de análise quantitativa de espilantol em amostras da espécie *Spilanthes acmella*.

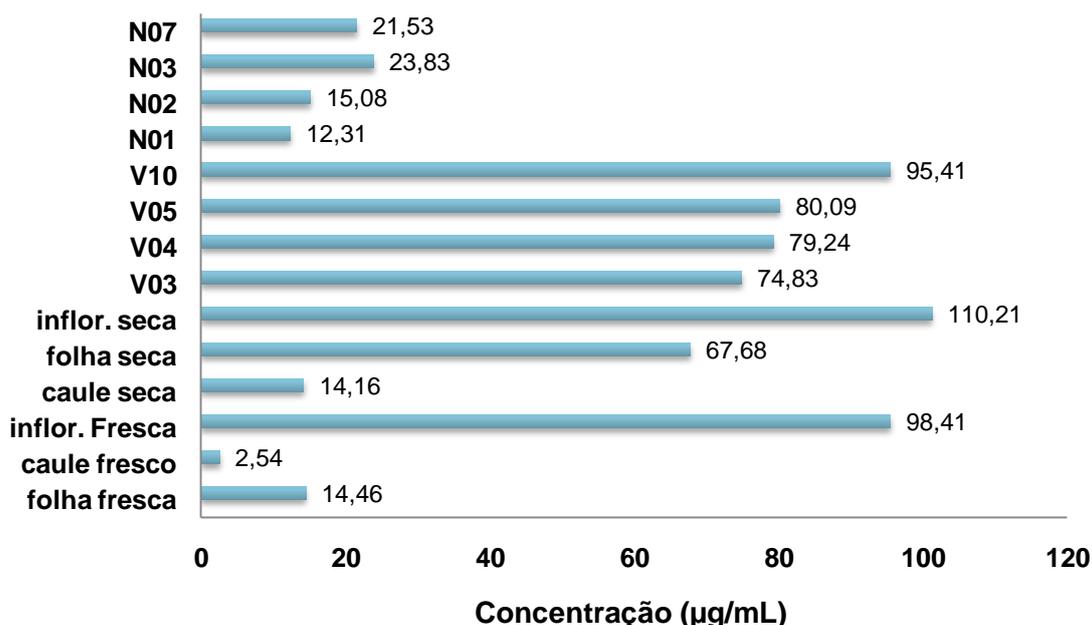
## 5.8 Aplicação do método

O método analítico desenvolvido foi aplicado em 14 amostras de extratos metanólicos e 27 amostras de extratos etanólicos oriundas de melhoramento genético de *S. acmella*.

A quantificação de espilantol nessas amostras foi realizada utilizando os valores das áreas da banda cromatográfica do espilantol, e aplicada à regressão linear obtida na curva por padrão externo.

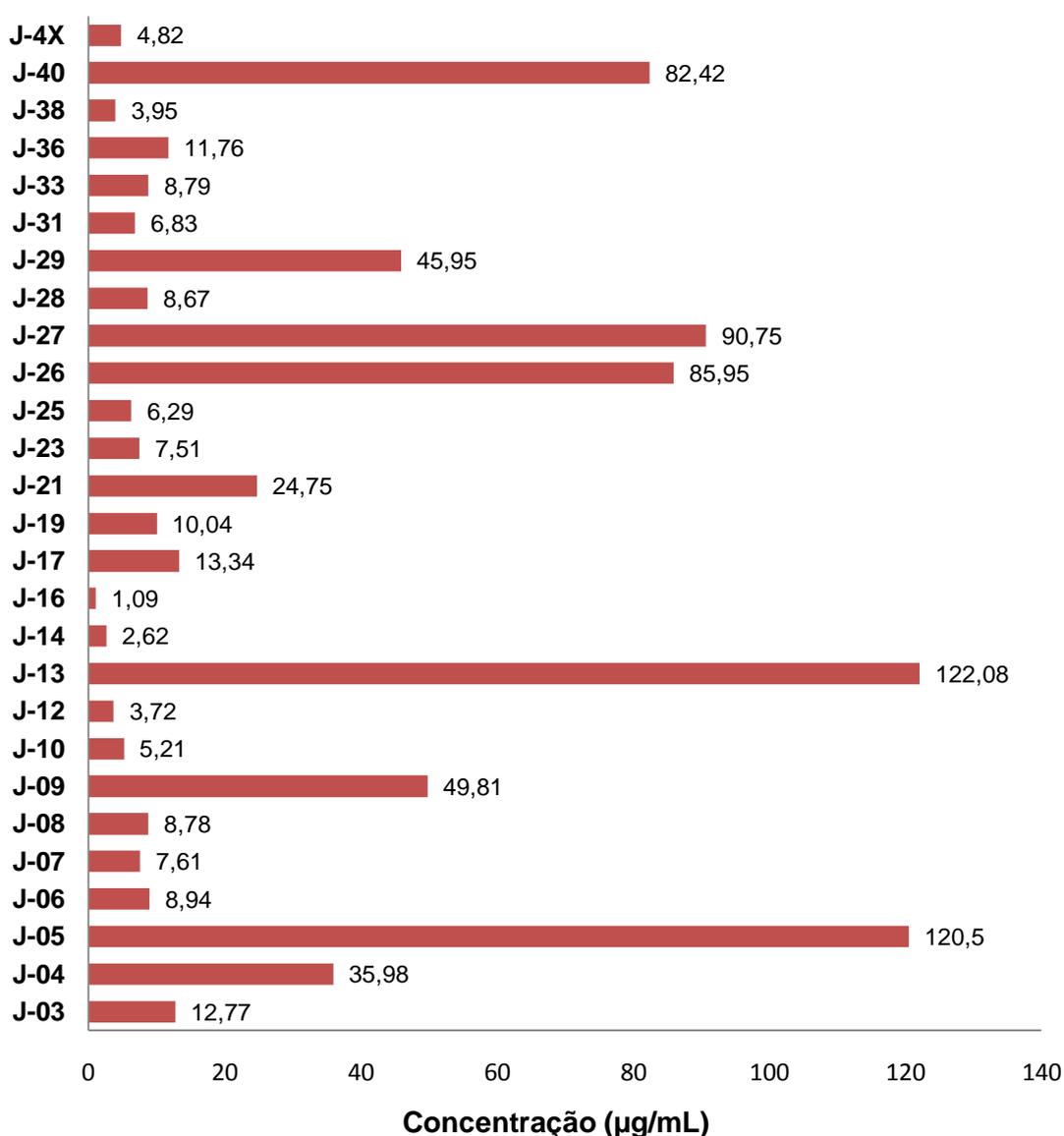
O espilantol foi encontrado em maior quantidade nos extratos metanólicos nas partes da inflorescência seca (110,65 µg/mL) e fresca (98,41 µg/mL), não havendo uma variação significativa, confirmando os dados encontrados na literatura,<sup>45-60</sup> que afirma ser a parte da planta que apresenta maior concentração de espilantol. Entretanto, houve uma variação significativa entre as partes do caule e folha fresca e seca (FIGURA 36). Portanto, na análise das partes das plantas, a inflorescência seca ou fresca, demonstra ser uma melhor desse metabólito.

Nos acessos do tipo V (FIGURA 37), também foram encontrados altas concentrações do espilantol, mostrando que a planta completa, também é uma boa fonte desse composto.



**Figura 37:** Gráfico da análise quantitativa de espilantol nas amostras de *S. acmella*.

Nas amostras oriundas de melhoramento genético de *S. acmella*, foram quantificadas de forma análoga as amostras de extratos metanólicos. A FIGURA 38 mostra o resultado da quantificação dos extratos etanólicos. Foram encontrados uma maior quantidade de espilantol nos acessos J-05, J-13, J-26, J-27 e J-40. O método desenvolvido pode, portanto, ser aplicado em estudos de monitoramento do manejo agrônômico dessas espécies, nos casos em que se pretende aumentar a concentração dessa classe de metabólitos secundários no vegetal.



**Figura 38:** Gráfico da análise quantitativa de espilantol nas amostras de *S. acmella*.

## 6 Conclusão

Esse trabalho apresenta uma contribuição no controle de qualidade da espécie *Spilanthes acmella* (L.) Murray, através da quantificação de seu principal metabólito secundário, o espilantol.

Para isso, o desenvolvimento de um método padronizado por extração em fase sólida foi fundamental, possibilitando um método cromatográfico que forneceu perfis cromatográficos apropriado para a representatividade das amostras submetidas ao estudo.

A utilização da CLAE possibilitou separação de bandas cromatográficas utilizando uma coluna C<sub>18</sub>, com ajuda do detector com espectrômetro de diodo e tendo como fase móvel metanol e água, e pode ser considerado como um método rápido, econômico e livre de interferentes capazes de caracterizar e distinguir as amostras de *S. acmella* analisadas.

O procedimento de validação do método demonstrou que o processo de extração e das análises cromatográficas é adequado com ótimos resultados em todas as etapas, mostrando ser um método sensível, preciso e exato.

O método quantitativo em amostras cultivadas de *S. acmella* demonstrou que existem variações na concentração de espilantol, onde é encontrado uma maior quantidade na parte da inflorescência fresca e seca e no acesso V10 da planta. As amostras oriundas de melhoramento genético apresentaram também alto teor de espilantol, mostrando que esse método também pode ser aplicado no monitoramento de espilantol em novas amostras de *S. acmella*, como forma de manejo agrônomo para aumentar o teor de espilantol em amostras dessa espécie.

## 7. Referências

1. SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre, UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2007. p. 371.
2. WHO. World Health Organization. Quality control methods for medicinal plant materials - Revised Draft Update. p.62, 2005.
3. NETO, E. M.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; BALBINO, E. E.; CARVALHO, A. C. B. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n.3, 2006.
4. GOBBO-NETTO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
5. LOPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, v. 1, n. 1, p. 19-27, 2006.
6. MARCIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, 2002.
7. BARATA, Lauro. Empirismo e Ciência: fonte de novos fitomedicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 57, n. 4, 2005.
8. VEIGA. Valdir F.; PINTO, Ângelo C. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
9. PINTO, C. P.; SILVA, D. H. S.; BALZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 45-46, 2002.
10. TOLEDO, A. C.; HIRATA, L. L.; BUFFON, M. C. M.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, v. 21, n.1, p. 7-13, 2003.
11. MONTE, C. Fitos e interfaces. **T&C Amazônia**, v. 5, n. 11, p. 1-8, 2007.
12. GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1 , p .1–93, 2006.

13. NASCIMENTO, J. E.; LACERDA, E. U. NASCIMENTO, V. T; MELO, J. G.; ALVES, B. S.; SILVA, G. M.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E.L. Produtos à base de plantas medicinais comercializadas em Pernambuco-nordeste do Brasil. **Revista Acta Farm. Bonaerense**, v. 24, n. 1, p. 113-122, 2005.
14. OLIVEIRA, A. B.; LONGHI, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. B.; MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 7, n. 2, 2006.
15. FARIAS, M. R.; SCHENKEL, E. P.; BERGOLD, A. M.; PETROVICK, P. R. O problema da qualidade dos fitoterápicos. **Caderno da Farmácia**, v. 1, n. 2, p. 73, 1985.
16. BARA, M. T. F.; RIBEIRO, P. A. M.; ARANTES, M. C.; AMORIM, L. L. S. S.; PAULA, J. R. Determinação do teor de princípios ativos em matérias-primas vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 10, n. 2, p. 211-215, 2006.
17. FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.
18. LIANG, Y-Z.; XIEP, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal Chromatography B**, v. 812, n.1-2, p. 53-70, 2004.
19. MARTINS, L. R. R. Perfil cromatográfico a Análise multivariada para o controle de qualidade comerciais do gênero *Phyllanthus* (quebra-pedra). **Tese (Doutorado em Química)**- Universidade Federal de São Carlos, 2008.
20. ALVES, F. N. R. Desafio para a inovação em fitomedicamentos no contexto da indústria farmacêutica nacional. **Revista Fitos**, v. 1, n.1, p. 18-29, 2005.
21. OLIVEIRA, J. E. Z.; AMARAL, C. L. F.; CASALI, V. W. D. Recursos genéticos e perspectivas do melhoramento de plantas. **Recursos Genéticos e Melhoramento de Plantas para o Nordeste Brasileiro**, v. 1, n. 2, 2004.
22. COSTA, C. C.; FREITAS, R. E. Contribuição do melhoramento genético para a redução de preços dos alimentos. **Revista de Economia Agrícola**, v. 24, n. 1, p. 59-73, 2007.

23. AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes ambientais. **Revista Brasileira Epidemiologica**, v. 6; n. 6, 2003.
24. RODRIGUES, M. V. N.; REHDER, V. L. G.; SARTORATTO, A.; BOAVENTURA, S.; SANTOS, A. S. O emprego de técnicas hifenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiências: Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, n. 5, 2006.
25. AQUINO NETO, F. R.; SILVA, D.; NUNES, S. **Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interferência, 2003.
26. HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorvents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n. 3, 1999.
27. QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; Métodos de Extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v.24, n.1, p.68-70, 2001.
28. ONG, E. S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1-2, p. 23-33, 2004.
29. TONHL, E.; COLLINS, K. E.; JARDIM, I. C. S.; COLLINS, C. H. Fases, estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa(CLAE-FR) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 616-623, 2002.
30. SNYDER, L. R., KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. New York: Wiley; 1997. p. 233-291. Non-ionic samples: reversed and normal phase HPLC. In: Practical HPLC method development.
31. MEYER, V. R. Reversed-phase chromatography. In: Practical High-Performance Liquid Chromatography. Chichester: Wiley; 1993. p. 144-157.

32. DRASAR, P.; MORAVCOCA, J. Recent advances in analysis of Chinese medical plants and traditional medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1, p. 3-21, 2004.
33. HE, X.-G. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 880, n. 1-2, p. 203-232, 2000.
34. HOSTETTMAN K.; QUEIROZ; E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos, SP: EdUFSCar; 2003. p.152.
35. ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; VERBEKE, J.; HEYDEN Y.; Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, n. 1, p. 1–8, 2007.
36. HENDRINKS, M. M. W. B.; CRUZ-JUAREZ, L.; BONT, D. D.; HALL, R. D. Preprocessing and exploratory analysis of chromatographic profiles of plant extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 545, n. 1, p. 53-64, 2005.
37. FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre, RS; Florianópolis, SC: Editora da UFSC, Editora da UFRGS; 2004. p 263-288.
38. NYIREDY, S. Separation strategies of plant constituents current status. **Journal of Chromatography B**, v. 812, n. 1, p. 35-51, 2004.
39. BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; ARAÚJO, J. X. O uso de produtos naturais vegetais como matérias-primas vegetais para a síntese e planejamento de fármacos. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis, SC /Porto Alegre, RS: Editora da UFSC/Editora da UFRGS; 2004. p 147-210.
40. RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.5, n.27, p.771-180, 2004.

41. CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n.4, p. 1021-1030, 2009.
42. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Resolução RE 899 de 29 de maio de 2003**. Diário Oficial da União de 18 de março de 2004. Brasília.
43. BRASIL. Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientação sobre validação de métodos de ensaios químicos. **DOQ-CGCRE-008, 2003**.
44. OLIVEIRA, M.A.S. Germinação, crescimento, adubação e espaçamento para a produção de capítulos florais de jambú (*Acmella oleracea* - Asteraceae). **Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)** - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 2004.
45. NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. LC-MS analysis and structure determination of pungent alkaloids from *Spilanthes acmella* L. flowers. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v.25, n.5, p. 417-421, 1992.
46. NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent alkaloids from *Spilanthes acmella* L. Var. *oleracea* Clarke. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n.5, p. 759-762, 1992.
47. BAE, S. S. A HPLC/ESI-MS method developed and validated to evaluate the quantity, identity, and stability of the alkaloids in ethanolic extracts of *Spilanthes acmella*. **Dissertação (Mestrado em Química)**. University of North Carolina, 2007.
48. LENG, T.; CHEE, H.; ANG, B.; KENG, C. L. Effect of reduced N6-benzyladenine, explant type, explant orientation, culture temperature and culture vessel type on regeneration of adventitious shoot and in vitro plantlets of *Spilanthes acmella*. **Journal of Plant Biology**, v. 47, n. 1, p. 15-20, 2004.
49. RATNASOORIYA, W. D.; Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n.2-3, p. 371-320, 2004.

50. RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J. Bioactive N-isobutylamides from flower buds of *Spilantes acmella*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 51, p.729-732,1999.
51. RANI, S. A.; MURTY, S. U.; Antifungal potential of flower head extract of *Spilantes acmella* Linn. **African Journal of Biomedical Research**, v. 9, n. 1, p. 67-68, 2006.
52. CAVALCANTI, V. M. S. Extração de espilantol de *Spilantes acmella* var *oleraceae* com dióxido de carbono supercrítico. **Tese (Doutorado em Química)**- Universidade Estadual de Campinas, 2008.
53. BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; BURVENICH, B.; DE SPIEGELERR B. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilantes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** (2010), doi:10.1016/j.jpba.2010.02.010
54. BOHLMANN, F.; ZIESCHE, J.; ROBINSON, H.; KING, R. M. New Amide of *Spilantes alba*. **Phytochemistry**, v. 19, n.7, p.1535, 1980.
55. MARTIN, R. B. H. Amides and Other Constituents from *Acmella ciliata*. **Phytochemistry**, v. 24, n.10, p. 2295-1300, 1985.
56. MARTIN, R. B. H. *Spilanthol*- Related Amides from *Acmella ciliata*. **Phytochemistry**, v. 23, n.8, p. 1781-1783, 1984.
57. JONDIKO, I. J.O. A mosquito larvicide in *Spilantes mauritiana*. **Phytochemistry**, v. 25, n.10, p. 2289, 1986.
58. BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; BURVENICH, B.; DE SPIEGELERR B. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilantes acmella* (Compositae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 77-84, 2010.
59. DELARCINA-JUNIOR, S., CAGNON, J. R., SILVA, A. R., FUKUSAWA, V. E. N. **Processo de preparação de extrato de jambu, uso do referido extrato, composições cosméticas compreendendo o mesmo e produtos**

**cosméticos compreendendo as ditas composições cosméticas.** Natura Cosméticos S.A., Brasil. PI0500886-7. Marco 23, 2005.

60. FLAMER, L., GRAINGER, B., BODEN, R., CHRISTENSEN, C. **Anti-dandruff and antiitch compositions containing a cooling sensate material and a cooling sensate enhancer.** International Flavors & Fragrances Inc., USA. EP Patent 1332772. Aug. 06, 2003.