

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

BÁRBARA GONÇALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA E
QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES VEGETAIS EM EXTRATOS SECOS DE
*Echinacea Purpurea***

BELO HORIZONTE

2018

BÁRBARA GONÇALVES DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA E
QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES VEGETAIS EM EXTRATOS SECOS DE
*Echinacea Purpurea***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para obtenção do grau de mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Isabela da Costa César.
Coorientador: Prof. Dr. Gerson Antônio Pianetti

BELO HORIZONTE

2018

O48a Oliveira, Bárbara Gonçalves de.
Avaliação das atividades antimicrobiana e imunomoduladora e quantificação de marcadores vegetais em extratos secos de *Echinacea Purpurea* / Bárbara Gonçalves de Oliveira. – 2018.

120 f. : il.

Orientadora: Isabela da Costa César.

Coorientador: Gerson Antônio Pianetti.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Plantas medicinais – Terapêutica – Teses. 2. Infecções – Teses. 3. Atividade antifúngica – Teses. 4. Ácidos – Teses. 5. Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) – Teses. I. César, Isabela da Costa. II. Pianetti, Gerson Antônio. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 615.537

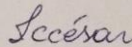
FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação das atividades antimicrobiana e imunomoduladora e quantificação de marcadores vegetais em extratos secos de Echinacea purpurea

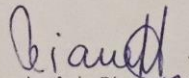
BÁRBARA GONÇALVES DE OLIVEIRA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestra em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

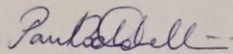
Aprovada em 01 de março de 2018, pela banca constituída pelos membros:



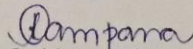
Profa. Isabela da Costa César - Orientadora
UFMG



Prof. Gerson Antônio Pianetti - Coorientador
UFMG



Profa. Paula Rocha Chellini
UFJF



Profa. Priscilla Rodrigues Valadares Campana
UFMG

Belo Horizonte, 1 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, professora Dr^a. Isabela da Costa César, pela atenção, dedicação, presença e pelas valiosas ideias que tanto contribuíram para a realização desse trabalho. Mas, principalmente, por ser a orientadora mais doce e fofinha que poderia ter. E ao corientador do trabalho, professor Dr. Gerson Antonio Pianetti, pela disponibilidade e por ser um exemplo a ser seguido de profissional, farmacêutico e professor.

Ao amigo e IC, Luiz Filipe, que se dedicou, me acompanhou e dividiu comigo as experiências deste projeto.

À todos os professores e aos amigos do laboratório, especialmente à Camila e Ju Veloso, por fazerem meus dias no laboratório mais leves e agradáveis, pelas dicas, conversas e companhia. À Ju Brêtas e Naialy, por tudo que me ensinaram e por contribuírem com a minha formação. Tive muita sorte de tê-las por perto durante o mestrado.

Aos farmacêuticos e funcionários do CEDAFAR, pela disponibilidade de sempre em ajudar.

Aos colegas do laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, professor Dr. Daniel de Assis Santos, Marliete, Rafael e Paulo, pela enorme contribuição com esse trabalho.

Aos meus amigos de sempre e de todas as horas Tayline e Pedro Ivo.

Às amigas Isabelle, Luísa, Fê Lott, Lari e Anacláudia.

Ao meu amigo Saulo Andrade, que despertou em mim a vontade de fazer o mestrado e à minha amiga Stefânia Lavorato, que me ajudou muito quando decidi ingressar no mestrado.

À minha família, que é a razão da minha vida. Ao meu marido Paulo, que além de me apoiar em todas as minhas escolhas, ser um amor, ainda me ajuda muito com o Excel. Ao meu filho que é o que eu mais amo no mundo, Bruno, por ter dormido bem

e feito pouca bagunça nos últimos meses (esse é o maior agradecimento da página, uma vez que sem isso simplesmente não seria possível redigir o presente trabalho).

Aos meus pais, Nando e Marta, que sempre me apoiam. E ao meu irmãozinho, Mateus, que me alegra mesmo à distância, por mensagens quase todos os dias.

À todas as pessoas que alguma forma contribuíram para minha formação e para a realização do mestrado.

À Deus, por ter me dado todas as oportunidades de estudar, por ter me dado uma família linda e por ter colocado várias pessoas especiais na minha vida.

“O que mais me surpreende na humanidade são os homens. Porque perdem a saúde para juntar dinheiro, depois perdem o dinheiro para recuperar a saúde. E, por pensarem ansiosamente no futuro, esquecem do presente de tal forma que acabam por não viver nem o presente nem o futuro. E vivem como se nunca fossem morrer... E morrem como se nunca tivessem vivido.”

Dalai Lama

RESUMO

Plantas medicinais são amplamente utilizadas com finalidades terapêuticas em diversas patologias que acometem a saúde humana. No que concerne à *Echinacea purpurea* (EP), planta de origem norte-americana, seu uso é extensamente difundido pelo mundo, apresentando grande aplicação farmacológica, principalmente no tratamento de infecções dos tratos respiratório e urinário. No Brasil, extratos secos de EP são utilizados para produção de medicamentos por farmácias magistrais e indústrias farmacêuticas, porém, nem sempre a procedência dos mesmos é bem estabelecida. Deste modo, é de extrema importância avaliar a qualidade e a eficácia destes extratos para o tratamento de infecções. Logo, o objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método analítico por cromatografia a líquido de ultra eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLUE-DAD), para identificação e quantificação dos marcadores vegetais em EP. O método por CLUE foi desenvolvido utilizando-se coluna cromatográfica C₁₈ (2,1 x 50 mm; 1,8 µm), mantida a 30 °C. A fase móvel foi composta por acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico a 0,05% (v/v), na proporção de 9:1, em modo isocrático, com fluxo de 0,2 mL/min. O volume de injeção foi 10 µL e o comprimento de onda para detecção foi 300 nm. O método desenvolvido cumpriu com os parâmetros de validação exigidos, se mostrando linear, preciso, exato, seletivo e robusto. Com o método validado, foi feita a quantificação dos teores de ácido caftárico, ácido chicórico e ácido clorogênico em cinco amostras de extratos secos de EP obtidas, sendo verificada variação significativa nos teores entre as diferentes amostras. Também foram realizados testes biológicos *in vitro* para avaliação das atividades antimicrobiana e imunomodulatória de extratos secos de EP. Os resultados obtidos demonstraram que as amostras analisadas não apresentaram atividade antibacteriana significativa, sendo verificada apenas pequena atividade antifúngica. Foram observados, ainda, efeitos positivos dos extratos de *Echinacea purpurea* em relação à modulação da atividade imunológica celular.

Palavras-chave: *Echinacea purpurea*. Ácido chicórico. Ácido caftárico. Ácido Clorogênico. Atividade imunomoduladora. CLUE-UV.

ABSTRACT

Medicinal plants are widely used for therapeutic purposes in several pathologies that affect human health. With regard to *Echinacea purpurea* (EP), a plant of North American origin, its use is widely diffused throughout the world, presenting wide pharmacological application, mainly in the treatment of infections of respiratory and urinary tracts. In Brazil, dry extracts of EP are used to the production of medicines by compounding pharmacies and pharmaceutical industries, however, the source of them is not always well established. So, it is extremely important to evaluate the quality and efficacy of these extracts for the treatment of infections. Therefore, the objective of this work was to develop and validate an analytical method by ultra performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (UPLC-DAD), to identify and quantify the chemical markers in EP. UPLC method was developed using a C₁₈ (2.1 x 50 mm, 1.8 µm) chromatographic column, maintained at 30 °C. The mobile phase was composed of acetonitrile and 0.05% (v/v) formic acid aqueous solution, in a ratio of 9:1, in isocratic mode, flow rate 0.2 mL/min. The injection volume was 10 µL and the wavelength for detection was 300 nm. The developed method complied with the required validation parameters, and showed to be linear, precise, accurate, selective and robust. Using the validated method, the levels of caftaric acid, chicoric acid and chlorogenic acid were quantified in five samples of EP dry extracts obtained, with a significant variation in the contents between the different samples. *In vitro* biological tests were also performed to evaluate the antimicrobial and immunomodulatory activities of dry extracts of EP. The results showed that the analyzed samples showed no significant antibacterial activity, but a low antifungal activity was verified. Positive effects of *Echinacea purpurea* extracts on the modulation of cellular immune activity were also observed.

Key words: *Echinacea purpurea*. Chicoric acid. Caftaric acid. Chlorogenic acid. Immunomodulatory activity. UPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

1 - Flores de <i>Echinacea purpurea</i>	21
2 - Estrutura química do ácido chicórico	24
3 - Estrutura química do ácido caftárico	24
4 - Estrutura química do ácido clorogênico	24
5 - Cromatograma obtido no doseamento de marcadores vegetais de <i>Echinacea purpurea</i> , segundo Farmacopeia Europeia, 2016	31
6 - Avaliação do índice de fagocitose na presença de <i>Echinacea purpurea</i> , em 24 h	51
7 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio na presença de <i>Echinacea purpurea</i>	53
8 - Razão 24h/3h da taxa de proliferação intracelular de <i>C. gatti</i> em macrófagos, na presença de extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	57
9 - Cromatograma do ácido caftárico, obtido pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD (pico 1 = ácido caftárico)	76
10 - Cromatograma do ácido clorogênico, obtido pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD (pico 2 = ácido clorogênico)	76
11 - Cromatograma do ácido chicórico, obtido pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD (pico 3 = ácido chicórico)	76
12 - Cromatograma obtido pela análise da amostra a 10 mg/mL em ácido fórmico 0,05% (pico 1 = ácido caftárico, pico 2 = ácido clorogênico e pico 3 = ácido chicorico)	77
13 - Espectros de absorção no UV dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico , obtidos pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD da solução padrão	78
14 - Espectros de absorção no UV dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico, obtidos pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD, da amostra 4	78
15 - Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	82

16 - Gráfico de distribuição de resíduos da regressão linear para o método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	82
17 - Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	86
18 - Gráfico de distribuição de resíduos da regressão linear para o método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	86
19 - Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	90
20 - Gráfico de distribuição de resíduos da regressão linear para o método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	90
21 - Gráfico para avaliação da pureza espectral do pico de ácido caftárico por CLUE-DAD	92
22 - Gráfico para avaliação da pureza espectral do pico de ácido clorogênico por CLUE-DAD	92
23 - Gráfico para avaliação da pureza espectral do pico de ácido chicórico por CLUE-DAD	92

LISTA DE TABELAS

1 - Efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios da <i>Echinacea purpurea</i>	25
2 - Características das amostras de extrato seco de <i>Echinacea purpurea</i> obtidas de farmácias magistrais	47
3 - Avaliação do crescimento de microrganismos na presença de 512 µg/mL de <i>Echinacea purpurea</i>	48
4 - Determinação da CIM para diferentes cepas de fungos, em µg/mL, de amostras de extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	49
5 - Comparação estatística entre os índices de fagocitose na presença de <i>Echinacea purpurea</i> , em 24h	52
6 - Comparação estatística da produção de espécies reativas de oxigênio em 3 h na presença de EP em meio INFECTADO por <i>C. gatti</i> , entre as diferentes concentrações de cada extrato de <i>Echinacea purpurea</i>	54
7 - Comparação estatística da produção de espécies reativas de oxigênio em 24h na presença de <i>Echinacea purpurea</i> em meio INFECTADO por <i>C. gatti</i> , entre as diferentes concentrações de cada extrato	55
8 - Comparação estatística entre as taxas de proliferação intracelular em diferentes concentrações de extrato de <i>Echinacea purpurea</i>	58
9 - Diluições para avaliação da linearidade do método analítico por CLUE-DAD para quantificação de ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico em extrato seco de <i>Echinacea purpurea</i>	65
10 - Delineamento das concentrações de ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico para avaliação da exatidão do método analítico por CLUE-DAD.	68
11 - Variações de parâmetros analíticos para a avaliação da robustez do método de quantificação de ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	70
12 - Diluições para avaliação do efeito matriz do método analítico por CLUE-DAD para quantificação de ácido clorogênico em extrato seco de <i>Echinacea purpurea</i> - curva em solvente	71
13 - Diluições para avaliação do efeito matriz do método analítico por CLUE-DAD para quantificação de ácido clorogênico em extrato seco de <i>Echinacea purpurea</i> - curva amostra fortificada	71

14 - Esquemas de eluição testados com objetivo de melhorar a resolução dos picos nos cromatogramas	75
15 – Condições otimizadas do método de quantificação de ácidos caftárico, clorogênico e chicórico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	82
16 - Concentrações e valores de área para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	80
17 - Resultados dos testes para avaliação das premissas da linearidade para construção da curva analítica do método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	81
18 - Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	81
19 - Concentrações e valores de área para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	84
20 - Resultados dos testes para avaliação de parâmetros necessários para utilização dos MMQO para para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	85
21 - Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	85
22 - Concentrações e valores de área para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	88
23 - Resultados dos testes para avaliação de parâmetros necessários para utilização dos MMQO para para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	89
24 - Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	89
25 - Resultados da avaliação da precisão para o método de quantificação de marcadores vegetais em extrato seco de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	93

26 - Resultados da avaliação da robustez para o método de quantificação de marcadores vegetais em extrato seco de <i>Echinacea purpurea</i> por CLUE-DAD	96
27 - Resultados dos testes F e t, considerando a área sob os picos de ácido clorogênico	96
28 – Resultados de quantificação de marcadores vegetais em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> , por CLUE-DAD (n=3)	98
29 – Comparação dos resultados de quantificação de marcadores vegetais em extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i> descritos na literatura	102

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

a	Coeficiente linear
b	Coeficiente angular
ABD	Ágar Batata Dextrose
ACa	Ácido Caftárico
ACh	Ácido Chicórico
ACI	Ácido Clorogênico
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Cg	<i>Cryptococcus gatti</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia a Líquido de Alta Eficiência
CLUE	Cromatografia a Líquido de Ultra Eficiência
Conc	Concentração
CV	Coeficiente de Variação
DAD	Detector de Arranjo Diodos
DCF-DA	diclorofluoresceína diacetato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DPR	Desvio Padrão Relativo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	<i>Echinacea purpurea</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FE	Fase estacionária

FM	Fase móvel
g	Gramas(s)
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IPR	<i>Intracellular Proliferation Rate</i>
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
min	Minutos
mg	Miligrama(s)
MH	<i>Mueller-Hinton</i>
mL	Mililitro(s)
m/m	Massa por massa
m/v	Massa por volume
mm	Milímetro(s)
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
nm	Nanômetros(s)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade suficiente para
R	Coefficiente de correlação
R ²	Coefficiente de determinação
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI SFM	<i>Roswell Park Memorial Institute - Serum-Free Medium</i>
Rs	Resolução
SQR	Substância(s) Química(s) de Referência
TA	Temperatura Ambiente
t _r	Tempo de retenção
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
UV	Ultravioleta
v/v	Volume por volume
°C	Graus <i>Celsius</i>
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
µm	Micrômetro(s)
<i>k</i>	Fator de retenção
Φ	Macrófagos

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I	18
1.1	INTRODUÇÃO	19
1.2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
1.2.1	<i>Echinacea purpurea</i>	21
1.2.1.1	Composição fitoquímica	22
1.2.1.2	Atividade antimicrobiana	25
1.2.1.3	Atividade imunomodulatória	26
1.2.1.4	Outras atividades biológicas	29
1.2.1.5	Métodos de quantificação dos marcadores vegetais de <i>Echinacea purpurea</i>	29
1.2.2	Cromatografia a líquido de Ultra Eficiência	32
1.2.3	Comercialização e aspectos regulatórios	33
1.3	OBJETIVOS	35
1.3.1	Objetivo geral	35
1.3.2	Objetivos específicos	35
2	CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA DE <i>Echinacea purpurea</i>	36
2.1	MATERIAIS	37
2.1.1	Material químico	37
2.1.2	Material biológico	37
2.1.3	Equipamentos, instrumentos e materiais acessórios	38
2.2	MÉTODOS	39
2.2.1	Obtenção dos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	39
2.2.2	Testes biológicos <i>in vitro</i>	39
2.2.2.1	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	39
2.2.2.2	Avaliação da atividade imunomoduladora dos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	42
2.2.2.2.1	Fagocitose <i>in vitro</i> , produção de espécies reativas de oxigênio e taxa de proliferação intracelular	43
2.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
2.3.1	Obtenção dos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	46
2.3.2	Testes biológicos <i>in vitro</i>	48
2.3.2.1	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	48
2.3.2.2	Avaliação da atividade imunomoduladora dos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	51
2.3.2.2.1	Fagocitose <i>in vitro</i>	51
2.3.2.2.2	Produção de espécies reativas de oxigênio	52
2.3.2.2.3	Efeito na taxa de proliferação intracelular	56

3	CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES VEGETAIS EM EXTRATOS SECOS DE <i>Echinacea purpurea</i>	60
3.1	MATERIAIS	61
3.1.1	Material químico	61
3.1.2	Equipamentos, instrumentos e materiais acessórios	61
3.2	MÉTODOS	62
3.2.1	Desenvolvimento de método analítico por CLUE-DAD para quantificação de marcadores vegetais nos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	62
3.2.2	Validação de método analítico por CLUE-DAD para quantificação de marcadores vegetais nos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	64
3.2.2.1	Condições cromatográficas	64
3.2.2.2	Linearidade	64
3.2.2.3	Seletividade	66
3.2.2.4	Precisão	66
3.2.2.5	Exatidão	67
3.2.2.6	Limites de Detecção e Quantificação	68
3.2.2.7	Robustez	69
3.2.2.8	Efeito Matriz	70
3.3	QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE MARCADORES VEGETAIS NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS SECOS DE <i>Echinacea purpurea</i>	72
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
3.4.1	Desenvolvimento de método analítico por CLUE-DAD para quantificação de marcadores vegetais nos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	73
3.4.2	Validação de método analítico por CLUE-DAD para quantificação de marcadores vegetais nos extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	79
3.4.2.1	Linearidade	79
3.4.2.1.1	Ácido Caftárico	79
3.4.2.1.2	Ácido Clorogênico	83
3.4.2.1.3	Ácido Chicórico	87
3.4.2.2	Seletividade	91
3.4.2.3	Precisão	93
3.4.2.4	Exatidão	94
3.4.2.5	Limites de Detecção e Quantificação	95
3.4.2.6	Robustez	95
3.4.2.7	Efeito Matriz	96
3.4.3	Quantificação dos teores de marcadores vegetais nas amostras de extratos secos de <i>Echinacea purpurea</i>	98

4 CONCLUSÕES	104
REFERÊNCIAS	105
ANEXO A	111
ANEXO B	113

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUÇÃO

A *Echinacea purpurea* é uma planta utilizada para fins medicinais, especialmente no tratamento de gripes e resfriados comuns. Também é usada como adjuvante em tratamentos com antimicrobianos e para melhorar a resposta imune dos pacientes.

Na Alemanha, por exemplo, a *E. purpurea* está entre os vinte fitoterápicos mais utilizados em monoterapia. Nos Estados Unidos, está entre os doze extratos naturais mais vendidos nos últimos anos.

O controle de qualidade de medicamentos é uma ferramenta muito útil e importante da área farmacêutica para auxiliar a garantir a eficácia e segurança dos medicamentos e, conseqüentemente, a contribuir com saúde da população. Entretanto, o controle de qualidade dos produtos naturais ainda é deficitário, devido à falta de métodos compendiais e às dificuldades analíticas relacionadas à complexidade da matriz vegetal.

Para a determinação quantitativa de marcadores vegetais, fármacos e substâncias relacionadas, a cromatografia a líquido de alta eficiência (CLAE) é considerada, na maioria das vezes, mais adequada. Entretanto, também pode-se empregar a cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE), cujas vantagens são evidentes. Os mecanismos de separação e os princípios cromatográficos são mantidos, enquanto parâmetros como velocidade, eficiência e resolução são melhorados. As principais vantagens são redução significativa do tempo de análise, e conseqüentemente redução no consumo de solvente, além de melhor sensibilidade.

Devido às atuais exigências relativas ao controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos, à comercialização de fitoterápicos a base de *Echinacea purpurea* como adjuvantes no tratamento de infecções, e à ausência de monografia na Farmacopeia Brasileira para avaliar a qualidade destes produtos, torna-se imprescindível desenvolver e validar um método analítico para a determinação de marcadores vegetais para o controle de qualidade de extratos de *Echinacea purpurea* comercializados no país. Tal fato se mostra relevante também tendo em vista as variações nas concentrações desses marcadores encontradas nos produtos a base

de *Echinacea purpurea*, que podem ocorrer devido às condições de armazenamento, aos métodos de extração e à adulteração dos extratos.

Além disso, diante do constante aumento de resistência bacteriana, tanto no âmbito hospitalar quanto comunitário, é de grande relevância a busca por novos agentes antimicrobianos ou mesmo adjuvantes em tratamentos de infecções que atinjam a população como um todo. Atualmente, há um aumento no número de estudos relacionados ao uso de produtos naturais com esse tipo de atividade. Também há vários relatos da atividade de *Echinacea purpurea* no controle de infecções bacterianas e fúngicas. Destaca-se, ainda, a atividade imunomodulatória da equinácea, que ainda não é completamente elucidada, sendo necessários estudos mais aprofundados na área.

1.2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.2.1 *Echinacea purpurea*

A *Echinacea purpurea* (EP), pertencente à família *Asteraceae* (Compositae), é nativa da América do Norte, sendo conhecida também como *purple coneflower* ou apenas equinácea (BARNES *et al.*, 2005). É uma espécie que possui longa história como planta medicinal. Tradicionalmente, são usadas as partes aéreas (**Figura 1**), raízes e eventualmente o restante da planta (ARDJOMAND-WOELKART *et al.*, 2015; SANDASI *et al.*, 2014).

Figura 1 – Flores de *Echinacea purpurea*.



FONTE: SANDASI *et al.*, 2014.

Echinacea purpurea (L.) Moench é a planta medicinal mais cultivada dentro dessa espécie, que tem sido utilizada principalmente em quimioprevenção e quimioterapia para doenças infecciosas dos sistemas respiratórios superior e inferior e doenças do trato urinário (BARNES *et al.*, 2014). Esta espécie tem sido popularmente utilizada para o tratamento da dor de dente, dor intestinal, picada de cobra, doenças de pele, convulsões, artrite crônica e câncer. Embora o isolamento e elucidação estrutural de

seus principais compostos têm sido investigados pelos pesquisadores, não há nenhuma certeza sobre seu mecanismo de ação exato.

As plantas desta espécie apresentam cerca de 100 cm de altura, possuem folhas lanceoladas, áperas e de coloração intensamente esverdeada; escalpo com inflorescência solitária em capítulo, com aproximadamente 20 flores tubulosas ao centro e liguladas na periferia, que formam um disco côncavo que se assemelha a um ouriço-do-mar, do grego “*echinos*”, terminologia da qual se deriva o gênero *Echinacea* (PIRES *et al.*, 2014).

De acordo com relatos da literatura, todas as espécies medicinais de *Echinacea*, incluindo *E. purpurea*, *E. angustifolia* e *E. pallida* são bastante seguras. Apesar da ausência de eventos adversos graves relacionados com a planta não provarem conclusivamente segurança, é uma indicação de que os eventos toxicológicos agudos significativos são raros (ARDJOMAND-WOELKART *et al.*, 2015). Além disso, STANISAVLJEVI e colaboradores (2009) afirmam que não há efeitos tóxicos conhecidos de *Echinacea purpurea*, em ratos ou humanos, mesmo administrada em alta dose.

1.2.1.1 Composição fitoquímica

A *Echinacea purpurea* apresenta em suas partes aéreas constituintes como alcanidas, derivados de ácido cafeico, polissacarídeos, glicoproteínas, poliactilenos, antocianinas e flavonoides, não estando presentes equinacosídeos, ao contrário de outras espécies do mesmo gênero (BARNES *et al.*, 2005). Vários compostos que pertencem a diferentes classes de metabólitos secundários tem sido isolados e identificados em extratos de *Echinacea purpurea*. Alcanidas, derivados do ácido cafeico e polissacárideos são os três principais grupos de metabólitos secundários da planta (MANAYI *et al.*, 2015). Dentre os polifenóis derivados do ácido cafeico, destacam-se os ácidos caftárico, clorogênico e chicórico.

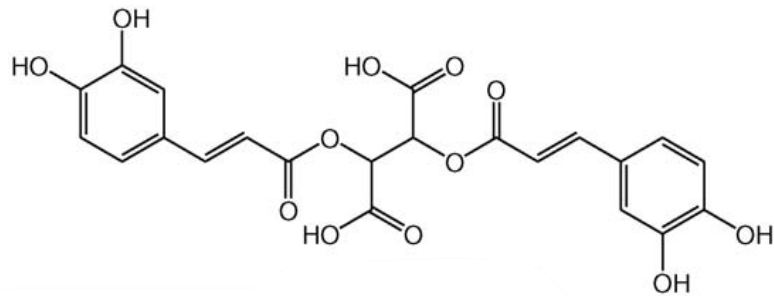
Para aplicação da equinácea nos mais variados tratamentos, utilizam-se majoritariamente extratos secos de suas partes aéreas e eventualmente de suas

raízes, que segundo análises da composição fitoquímica, possuem alcanidas, derivados do ácido cafeico, polissacarídeos, glicoproteínas, óleos essenciais, taninos, fenilpropanoides e flavonoides (MANAYI *et al.*, 2015). De acordo com a Instrução Normativa nº 02, de 13 de maio de 2014 da ANVISA, que apresenta a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”, as partes aéreas floridas são utilizadas para efeitos terapêuticos (BRASIL, 2014). Já o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira, publicado em 2016, descreve a raiz da planta como parte utilizada.

As condições de armazenamento e métodos de extração podem influenciar significativamente o conteúdo de ácido chicórico e derivados de alcanida. Outros compostos, incluindo alcaloides, amidas, e flavonoides (quercetina, kaempferol e isoramnetina e seus ácidos fenólicos livres, incluindo ácido p-coumárico, ácido p-hidroxibenzoico, e ácido protocatecuico), também foram isolados e identificados a partir da planta (MANAYI *et al.*, 2015).

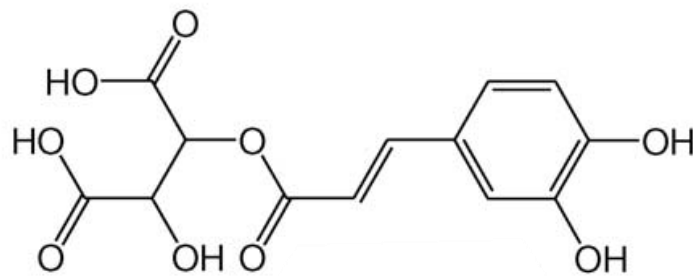
Os marcadores vegetais de *Echinacea purpurea* preconizados como ativos no Brasil segundo a Instrução Normativa nº 02 de 2014 (BRASIL, 2014) são o ácido chicórico, de fórmula $C_{22}H_{18}O_{12}$ e massa molar 474,37 g/mol, (**Figura 2**) e ácido caftárico, fórmula $C_{13}H_{12}O_9$ e massa molar 312,23 g/mol (**Figura 3**) (BRASIL, 2014). A Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008 citava também o ácido clorogênico (**Figura 4**), de massa molar 354,311 g/mol e fórmula $C_{16}H_{18}O_9$, e equinacosídeos na composição preconizada da planta (BRASIL, 2008). Entretanto, esta norma não se encontra mais em vigor no país.

Figura 2 – Estrutura química do ácido chicórico.



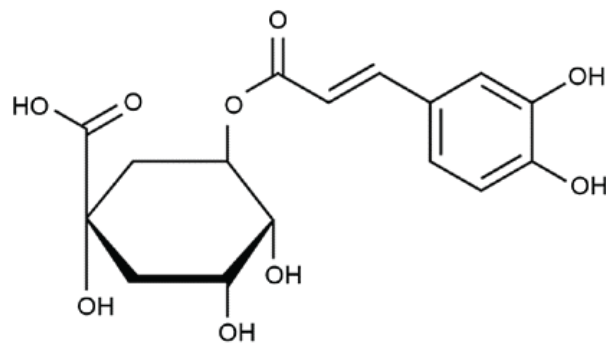
Fonte: CECH *et al.*, (2006).

Figura 3 – Estrutura química do ácido caftárico.



Fonte: CECH *et al.*, (2006).

Figura 4 - Estrutura química do ácido clorogênico.



Fonte: KONG *et al.*, (2017).

Segundo Rattanadechsakul *et al.* (2007), a *Echinacea purpurea* possui componentes que se degradam facilmente, portanto é altamente recomendável que os seus produtos relacionados sejam mantidos na geladeira para uma vida útil prolongada. Além disso, técnicas de formulação apropriadas, como o encapsulamento, devem ser aplicadas para aumentar sua estabilidade.

1.2.1.2 Atividade antimicrobiana

As diferentes espécies e partes de *Echinacea* tem sido utilizadas tradicionalmente na América do Norte para o tratamento de resfriados comuns e gripes, bem como para o tratamento de candidíase, doenças respiratórias, e cicatrização de feridas (HUDSON *et al.*, 2012).

Quando se trata de infecções do trato respiratório, há diversas bactérias potencialmente patogênicas que podem causá-las. Ao infectarem um hospedeiro, tais microrganismos se proliferam, resultando em dano celular, geralmente acompanhado de indução de citocinas pró-inflamatórias, levando a um quadro de inflamação. Em contrapartida, Sharma *et al.* (2010) demonstraram que muitas destas bactérias apresentam sua proliferação atenuada quando expostas às preparações de EP, que também apresentaram efeito anti-inflamatório frente às inflamações secundárias às infecções, como mostra a **Tabela 1**.

Tabela 1 - Efeitos antibacterianos e anti-inflamatórios da *Echinacea purpurea*.

Bactérias	Atividade antimicrobiana (- até ++)	Resposta anti-inflamatória (- ou +)
<i>Streptococcus pyogenes</i>	++	+
<i>Haemophilus influenzae</i>	++	+
<i>Legionella pneumophila</i>	++	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+/-	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+/-	não testado
<i>Propionibacterium acnes</i>	++	+
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	+	+
<i>Clostridium difficile</i>	++	+

(+): houve atividade antimicrobiana; (+/-): houve baixa atividade antimicrobiana; (++): houve alta atividade antimicrobiana.

Fonte: Sharma *et al.* (2010).

Segundo Manayi *et al.* (2015), o extrato das raízes de *E. purpurea* também possui efeitos antifúngicos, inibindo consideravelmente o crescimento de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, mas não causando nenhuma inibição de *Aspergillus niger*. BARNES *et al.* (2005) também relataram atividade anti *Candida* spp. de *Echinacea purpurea*, além de atividade contra as bactérias *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Segundo Hudson e colaboradores (2012), estudos recentes com preparações padronizadas de Echinaforce® (EF, produzido por Vogel Bioforce, Suíça), composto por extratos etanólicos de *E. purpurea* constituídos de 95% de partes aéreas e 5% de raízes, demonstraram elevada atividade antiviral contra vários vírus envelopados. Em estudos adicionais, observou-se uma menor eficácia de *Echinacea purpurea* contra vírus intracelulares. Consequentemente, vírus já presentes dentro de uma célula podem ser refratários para o efeito inibidor de EP, enquanto as partículas de vírus que vertem para os fluidos extracelulares podem ser vulneráveis. Portanto, EP pode atuar durante o contato inicial com o vírus, isto é, no início da infecção e também durante a transmissão de vírus a partir de células infectadas (HUDSON *et al.*, 2012).

Barnes *et al.*, 2005 realizaram diversos estudos clínicos randomizados para avaliar o potencial de preparações feitas com *E. purpurea* na prevenção de resfriados comuns, entretanto nenhum dos estudos demonstrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes que receberam placebo e os que receberam preparações à base de *E. purpurea*.

1.2.1.3 Atividade imunomodulatória

Devido a suas propriedades imunomodulatórias, a *Echinacea purpurea* não deve ser administrada em pessoas com esclerose múltipla, colagenose, síndrome da imunodeficiência adquirida, tuberculose, pacientes em uso de medicamentos imunossupressores e outras desordens autoimunes (MEMENTO, 2016).

Segundo Manayi *et al.* (2015), a atividade imunoestimulante da planta ou de suas preparações pode ocorrer por três mecanismos: ativação de fagocitose, estimulação dos fibroblastos, e aumento da atividade respiratória, que resulta no aumento da mobilidade de leucócitos. Alguns estudos *in vivo* sobre os efeitos imunomoduladores e anti-inflamatórios da equinácea sugerem que a imunidade inata é reforçada pela administração da planta e que o sistema imunológico é fortalecido contra infecções patogênicas por meio da ativação dos neutrófilos, macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e células *natural killer*. Por esta razão, o uso da planta pode ser adequado para prevenção e tratamento de várias doenças infecciosas, como infecções do sistema respiratório, infecções de feridas e infecções pélvicas crônicas. (MANAYI *et al.*, 2015).

Haron e colaboradores (2016) apresentam uma teoria de que grande parte da atividade imunológica da *Echinacea purpurea* está relacionada às bactérias que colonizam a planta, em especial proteobactérias que compõem a comunidade bacteriana associada à planta. A eficácia das preparações de *E. purpurea* contra infecções respiratórias pode ser determinada pela composição da comunidade de proteobactérias da planta, uma vez que a ingestão dessas bactérias (probióticos) é relatada como tendo um efeito protetor para a saúde.

Hudson e colaboradores (2012) testaram as funções imunológicas de *Echinacea purpurea* em culturas celulares de cobaias, demonstrando que a incubação de preparações de monócitos, macrófagos e linfócitos peritoneais, alveolares ou do baço com *Echinacea purpurea* resultou na estimulação da fagocitose e produção de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, observou-se também que a equinácea promove considerável redução da resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeos bacterianos em células humanas e de ratos (HUDSON *et al.*, 2012; ZHAI *et al.*, 2009). Além disso, a *Echinacea purpurea* pode causar redução de edema de pata induzido em cobaias, sendo que este efeito pode ser atribuído à inibição da COX1 e, em menor extensão da COX2 pelas alcanidas (MANAYI *et al.*, 2015; BIRT *et al.*, 2008).

As espécies reativas de oxigênio (ERO), como o peróxido de hidrogênio, produzidas externamente ou durante o metabolismo normal, podem danificar diferentes componentes celulares e geralmente desencadeiam uma resposta antioxidante contrária. Animais e seres humanos utilizam ERO e espécies relacionadas ao nitrogênio para prevenir infecções. Entretanto, alguns microrganismos, especialmente fungos filamentosos, possuem mecanismos para minimizar o efeito das espécies reativas de oxigênio, como enzimas antioxidantes e metabólitos secundários com funções antioxidantes (AGUIRRE *et al.*, 2006).

Ainda de acordo com Aguirre e colaboradores (2006), as espécies reativas de oxigênio são subprodutos do metabolismo aeróbio normal, produzidas principalmente por redução parcial do oxigênio durante a respiração. ERO podem oxidar praticamente qualquer molécula celular, causando danos ao DNA, inativação de proteínas, reticulação e fragmentação de proteínas e peroxidação de lipídios. As células tem uma série de mecanismos para manter baixos níveis intracelulares de espécies reativas de oxigênio, que coletivamente constituem a resposta antioxidante. Por serem prejudiciais, as ERO são produzidas pelos seres humanos e animais de forma regulada, como parte de um mecanismo de defesa contra todos os tipos de agentes patogênicos, incluindo fungos como *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Todos esses oxidantes produzidos como explosão oxidativa tem uma elevada atividade antimicrobiana.

De acordo com Fonseca e colaboradores (2014), os compostos presentes nos extratos secos de *Echinacea purpurea* tem a capacidade de estimular o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, inibindo o crescimento de fungos em testes *in vivo*. Segundo Stanisavljevi *et al.*, (2009), dos derivados de ácido cafeico, apenas o ácido chicórico, considerado o composto fenólico principal em *E. purpurea*, apresenta propriedades imunomodulatórias, promovendo atividade de fagocitose *in vitro* e *in vivo*. Além do ácido chicórico, os constituintes típicos dos extratos de *E. purpurea* como o ácido clorogênico e o ácido caftárico são capazes de promover a produção de radicais livres e a peroxidação lipídica, envolvida no desenvolvimento da inflamação, e ainda fracos efeitos antibacterianos, antivirais e produtores de espécies reativas de oxigênio (STANISAVLJEVI *et al.*, 2009).

Além disso, alguns estudos demonstram que os extratos de *E. purpurea* protegem os camundongos contra infecções sistêmicas com *Listeria monocytogenes* e *Candida albicans*, estimulando a função dos macrófagos e dos neutrófilos (TSAY *et al.*, 2012).

1.2.1.4 Outras atividades biológicas

A atividade ansiolítica de preparações de *Echinacea* foi determinada em animais experimentais com doses mais baixas do que as usadas nas indicações tradicionais. Alcamidas de *Echinacea* foram mencionadas como tendo propriedades canabinomiméticas em ambos receptores canabinóides CB1 e CB2. Tal fato pode ser atribuído à sua semelhança estrutural com o canabinóide endógeno que se liga ao receptor de anandamida. Os efeitos da anandamida são mediados no cérebro e sistema nervoso periférico pelos receptores CB1 e CB2. A ativação do receptor CB1 com ligantes endógenos desempenha um papel importante no controle da ansiedade e o CB2 é principalmente envolvido em atividades do sistema imunológico (MANAYI *et al.*, 2015).

1.2.1.5 Métodos para quantificação dos marcadores vegetais de *Echinacea purpurea*

De acordo com Sandasi *et al.* (2014), vários produtos a base de *Echinacea* com qualidade inadequada já foram identificados, alguns não indicando as espécies ou partes de plantas utilizadas, enquanto outros adulteravam a espécie mencionada. De 59 produtos comerciais analisados no estudo, 28 (48%) não continham a espécie identificada no rótulo.

Moolgard e colaboradores (2003) desenvolveram um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase reversa, para quantificar os marcadores vegetais e seus derivados. Foi determinado o teor de derivados de ácido cafeico, ácido chicórico e alcamidas de partes aéreas de *Echinacea purpurea*. O método consistiu na extração dos compostos fenólicos hidrofílicos, assim como das

alcamidas lipofílicas, em seguida procedeu-se com a quantificação analítica por CLAE para determinação desses compostos. Foi o primeiro método validado para a determinação simultânea desses dois grupos de compostos.

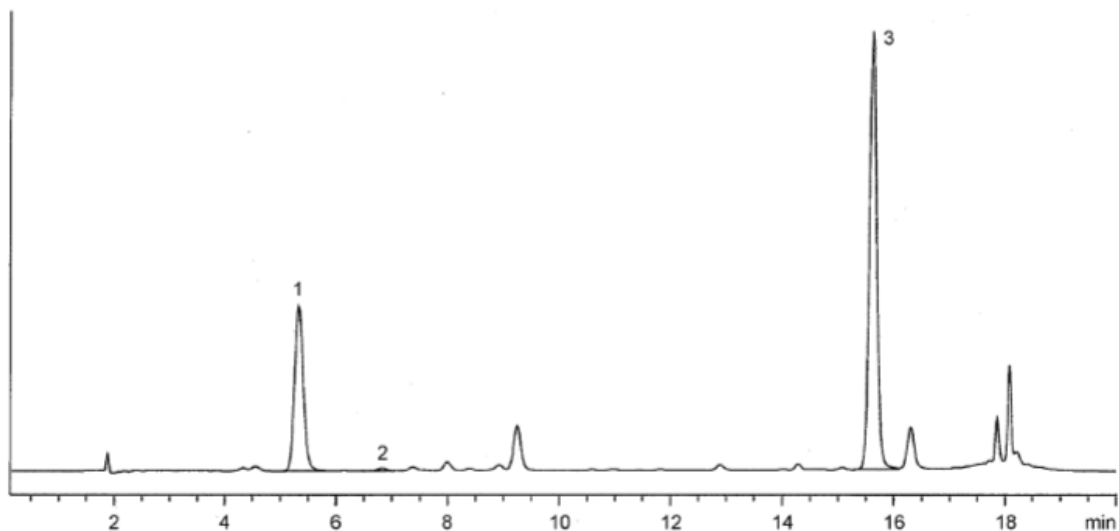
Outros métodos já foram relatados para a análise de componentes de extratos de *E. purpurea*. Tipicamente, essas técnicas requerem duas análises separadas para a determinação de classes diferentes de constituintes. Por exemplo, os pesquisadores tem empregado CLAE de fase reversa com detecção espectrofotométrica na região do UV, detecção eletroquímica coulométrica, ou ionização por *electrospray* com detecção por espectrometria de massas para a determinação de alcamidas. Derivados do ácido cafeico de extratos de *E. purpurea* foram analisados utilizando CLAE de fase reversa ou eletroforese capilar com detecção espectrofotométrica na região do UV (CECH *et al.*, 2006). Entretanto, recentemente, foram desenvolvidos métodos para análise simultânea dos marcadores de EP por técnica de eletroforese capilar usando detector de arranjo de diodos (MOOLGARD *et al.*, 2003).

A eluição em gradiente por CLAE tem sido empregada para análise concomitante de derivados de ácido cafeico e alcamidas presentes em *E. purpurea*, utilizando vários detectores, tais como a espectrometria de massas e espectrofotometria no UV (MANAYI *et al.*, 2015).

Não estão disponíveis monografias para *Echinacea purpurea* na Farmacopeia Brasileira 5ª edição (2010). A Farmacopeia Americana 38ª edição (2014) apresenta diferentes monografias para a planta: *Echinacea purpurea* partes aéreas, *Echinacea purpurea* raízes e extratos de *Echinacea purpurea*, que são constituídos de partes aéreas, raízes ou a mistura destas. Nas monografias, é descrito um método por CLAE-UV para quantificação de ácido chicórico, ácido caftárico e ácido clorogênico, com detector UV a 330 nm; coluna C18 de 4,6 mm x 25 cm, com esquema de eluição em gradiente, em que a fase móvel é constituída de ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila, fluxo de 1,5 mL/min e tempo de corrida 30 minutos. Além disso, é descrito outro método por CLAE-UV para determinação de alcamidas calculadas como ácido dodecatetraenoico e isobutilamida, com condições cromatográficas diferentes do primeiro método, devido às diferenças no comportamento químico e polaridade entre os dois grupos de marcadores.

A Farmacopeia Europeia 9ª edição (2016) também apresenta monografia para partes aéreas e raízes de EP. As condições cromatográficas para quantificação de ácido caftárico, chicórico e clorogênico se diferenciam daquelas propostas pela USP 38 apenas no esquema de eluição em gradiente, sendo a fase móvel também composta por ácido fosfórico 0,1% e acetonitrila, com tempo total de corrida de 20 min. O cromatograma apresentado nesta farmacopeia está representado na **Figura 5**, em que os picos 1, 2 e 3 representam respectivamente, os ácidos caftárico, clorogênico e chicórico, sendo que o segundo nem sempre estará presente nas amostras.

Figura 5 - Cromatograma apresentado para o doseamento de marcadores vegetais de *Echinacea purpurea*, segundo Farmacopeia Europeia 9ª edição, 2016. (pico 1 = ácido caftárico, pico 2 = ácido clorogênico e pico 3 = ácido chicórico).



Fonte: THE EUROPEAN PHARMACOPEIA 9.0 (2016).

Apesar de alguns artigos descreverem a quantificação de marcadores vegetais de EP por CLAE com diferentes detectores, não foram encontrados métodos na literatura para quantificação destes marcadores por CLUE.

1.2.2 Cromatografia a líquido de ultra eficiência

Na realização de análises de rotina, é importante considerar a velocidade, sensibilidade e resolução cromatográfica, mas também o custo de análise e a manutenção da coluna e do equipamento. É importante a escolha de fases móveis adequadas, a lavagem cuidadosa do sistema e a aplicação de taxas de fluxo adequadas às propriedades da coluna e do sistema cromatográfico (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2006b).

Segundo Wren e colaboradores (2006), a demanda por métodos de análise rápidos e com elevada eficiência tem crescido significativamente. Cada vez mais existe a necessidade de utilização de métodos que permitam a determinação, com elevada eficiência, de um grande número de analitos, em um curto tempo de análise.

Embora a CLAE seja uma técnica confiável muito bem estabelecida e seja adequada ao controle da qualidade de produtos farmacêuticos, alguns fatores ainda podem ser melhorados, uma vez que muitas vezes é uma técnica lenta devido à complexidade de algumas das amostras farmacêuticas encontradas. Reduzir os tempos de separação em CLAE sem reduzir a qualidade da separação requer uma maior capacidade de análise por unidade de tempo. Embora a resolução entre analitos individuais em uma amostra específica possa ser aumentada pela melhoria da seletividade ou retenção, a melhor abordagem geral para aumentar o poder de resolução é aumentar a eficiência de separação (WREN *et al.*, 2006).

Uma opção para melhoria dos parâmetros de análises é a cromatografia a líquido de ultra eficiência (CLUE), em que as partículas porosas constituintes da fase estacionária possuem diâmetro médio inferior a 2 μm (GUILLARME *et al.*, 2006). O cromatógrafo para CLUE foi especialmente concebido de modo a resistir a pressões mais elevadas do que na cromatografia líquida habitual. Nele, o sistema de injeção da amostra é caracterizado por ciclos rápidos e com volumes baixos, que em conjunto contribuem para a velocidade e sensibilidade de análise por CLUE (NOVÁKOVÁ *et al.*, 2006a). O sistema cromatográfico utilizado na CLUE suporta pressões de até 15000 psi (cerca de 1000 bar), é mais sofisticado e equipado com detectores com menor tempo de resposta, maior taxa de aquisição de dados e menor volume interno da célula de detecção. Além disso, as tubulações devem ser

de menor comprimento e diâmetro interno, reduzindo o alargamento de bandas por efeito extracoluna (GUILLARME *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2008).

Segundo NOVÁKOVÁ *et al.* (2006a), as análises realizadas por CLUE são muito mais eficientes do que as realizadas por CLAE, com números muito mais elevados de pratos teóricos e em menor tempo de corrida. Na prática, o uso do sistema CLUE durante o desenvolvimento, validação e posterior aplicação de rotina subsequente também significa reduções significativas no consumo total de tempo e solventes.

MIRANDA e colaboradores (2015) compararam o tempo de execução total de um método desenvolvido em CLUE com a mesma análise em CLAE para quantificação simultânea de cloroquina e primaquina em comprimidos. A análise por CLUE foi feita em metade do tempo da análise por CLAE. Apesar de um tempo mais longo para o reequilíbrio de coluna ser necessário para o método CLUE, o tempo de execução total foi mais rápido e a taxa de fluxo da fase móvel de CLUE foi menor do que o método CLAE, obtendo-se a mesma eficiência cromatográfica. Logo, promoveu-se um consumo de solventes consideravelmente baixo, reduzindo o custo de análise e demonstrando uma abordagem cromatográfica mais ecológica para análises de rotina (MIRANDA *et al.*, 2015).

1.2.3 Comercialização e aspectos regulatórios

Os rizomas e raízes da *Echinacea purpurea* tem sido usados para fins medicinais, assim como as partes aéreas frescas ou secas, podendo ser comercializados em diversas formas, como tinturas, extratos etanólicos, cápsulas, chás, comprimidos e preparações para uso parenteral (BARNES *et al.*, 2005).

No Brasil, a *Echinacea Purpurea* é comercializada principalmente em forma de cápsulas contendo 200 a 300 mg de extrato seco, sendo utilizadas para diversas indicações, como antiviral, ansiolítico e imunoestimulante, entre outras.

No entanto, de acordo com a ANVISA, o extrato de *Echinacea purpurea* é indicado somente como preventivo e coadjuvante na terapia de resfriados e infecções do trato

respiratório e urinário, sendo as demais aplicações consideradas de uso popular (BRASIL, 2014). A venda das diversas formas farmacêuticas de *Echinacea purpurea* no Brasil é livre, não sendo necessária retenção de prescrição médica.

No Brasil, a Instrução Normativa nº 02, de 13 de maio de 2014, preconiza para adultos a dose diária de 13 a 36 mg da soma de ácido caftárico e chicórico, administrada por via oral (BRASIL, 2014).

Na Farmacopeia Europeia 9ª edição, a indicação é de que haja o teor mínimo de 0,1% da soma dos ácidos caftárico e chicórico nas partes aéreas pulverizadas e 0,5% da soma dos mesmos ácidos na raiz pulverizada (EUROPEAN PHARMACOPOEIA, 2016). Já a Farmacopeia Americana 38ª edição traz diferentes indicações para os teores mínimos da soma de ácido chicórico e ácido caftárico. Para as partes aéreas pulverizadas, indicação é de que haja o teor mínimo de 1,0% da soma dos ácidos caftárico e chicórico, e para a raiz pulverizada, mínimo de 0,5% da soma dos mesmos ácidos. A mesma farmacopeia preconiza que o extrato seco da planta apresente pelo menos 4,0% de fenóis totais, calculados como a soma dos ácidos caftárico, chicórico e clorogênico (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014). Observa-se certa discrepância nas especificações, uma vez que a Farmacopeia Europeia 9ª edição preconiza maior teor de marcadores nas raízes da planta, enquanto a Farmacopeia Americana 38ª edição descreve um maior teor nas partes aéreas.

Manayi *et al.* (2015) sugeriram a padronização de no mínimo 3 mg/g para alcamidas e no mínimo 5 mg/g para o ácido chicórico nos extratos de EP para a comercialização.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antimicrobiana e imunomodulatória e quantificar os principais marcadores vegetais em extratos secos de *Echinacea purpurea*, por meio do desenvolvimento e validação de método analítico por cromatografia a líquido de ultra eficiência com detector de arranjo de diodos (CLUE-DAD).

1.3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar um método analítico por CLUE-DAD para quantificação de ácido chicórico, ácido caftárico e ácido clorogênico em extratos secos de *Echinacea purpurea*.
- Avaliar a qualidade de extratos secos de *Echinacea purpurea* utilizados para manipulação de cápsulas por farmácias magistrais, empregando o método validado.
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos secos de *Echinacea purpurea*, por meio da realização de testes biológicos *in vitro*, por microdiluição em caldo e determinação de concentração inibitória mínima (CIM).
- Avaliar a atividade imunomodulatória dos extratos secos de *Echinacea purpurea*, por meio da realização de testes biológicos *in vitro* de avaliação de fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio e taxa de proliferação intracelular.

**CAPÍTULO II: AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA E
IMUNOMODULADORA DE *Echinacea purpurea***

2.1 MATERIAIS

2.1.1 Material químico

- Extratos secos de *Echinacea purpurea* doados por farmácias magistrais, provenientes dos fornecedores VivaFarma, Ely Martins e Florian;
- cloranfenicol Sigma-Aldrich®;
- itraconazol Sigma-Aldrich®;
- dimetilsulfóxido (DMSO);
- ágar Sabouraud;
- padrão de McFarland 0.5;
- corante azul de tripan e corante panótico;
- PBS e PBS/EDTA gelado;
- meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640;
- ágar Sabouraud Dextrose (ASD);
- ágar Batata Dextrose (ABD);
- ágar Müeller-Hinton (MH);
- meio BHI (*Brain Heart Infusion*);
- solução salina NaCl 0,9%;
- tween 20 0,1%;
- solução de diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA);
- água destilada.

2.1.2 Material biológico

- Cepas das bactérias: *Salmonella entérica* subespécie *enterica* sorovar *Typhimurium* ATCC14028, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433, *Acinetobacter baumannii* ATCC19606, *Staphylococcus aureus* ATCC 33591, *Klebsiella pneumonia* ATCC 13882 e *Shigella flexnelli* ATCC 12022;

- Cepas dos fungos: *Cryptococcus gattii* R265, *Cryptococcus gattii* ATCC 24065, *Cryptococcus neoformans* H99, *Cryptococcus neoformans* ATCC 24067, *Candida albicans* ATCC 18804, *Aspergillus fumigatus* (isolado clínico) e os dermatófitos *Trichophyton inderdigitale* ATCC 9533, *Trichophyton rubrum* ATCC 40051 e *Microsporum gypseum* (isolado clínico).
- Células de medula óssea de camundongos C57BL/6 (8 a 12 semanas de vida) em cultura.

Os microrganismos que não possuem número de referência eram pertencentes à Coleção de Cultura de Microrganismos do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG.

2.1.3 Equipamentos, instrumentos e materiais acessórios

- Espectrofotômetro SHIMADZU® 160-A;
- microscópio óptico LM-LUX Leitz® ;
- câmara de fluxo laminar QUIMIS®;
- agitador vórtex MS1 Minishaker IKA®;
- fluorímetro (Synergy 2 SL Luminescence Microplate Reader; Biotek®);
- alça de inoculação descartável;
- filtros de 0,22 µm;
- micropipetadores e respectivas ponteiras;
- microplacas de poliestireno com 96 poços;
- seringas de 5 mL;
- tubos tipo Falcon, estéreis e não-estéreis;
- vidrarias de uso comum em laboratório;
- placas de Petri;
- pérolas de vidro;
- lamínulas circulares;
- pinça autoclavada;
- tubos Eppendorf®.

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Obtenção dos extratos secos de *Echinacea purpurea*

A obtenção dos extratos secos de *Echinacea purpurea* ocorreu por meio de doações de farmácias magistrais. Foram contactadas 32 farmácias de manipulação em Belo Horizonte e região metropolitana. As farmácias foram localizadas via *internet*, contactadas via telefone e aquelas que se disponibilizaram a fazer a doação do extrato seco de *Echinacea purpurea* receberam uma cópia da carta de pedido de doação.

2.2.2 Testes biológicos *in vitro*

2.2.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos secos de *Echinacea purpurea*

Devido às escassas quantidades disponíveis das demais SQR, o marcador vegetal de referência utilizado foi o ácido clorogênico que, apesar de não ser um dos marcadores vegetais da EP preconizados pela ANVISA, é um derivado do ácido cafeico assim como os ácidos caftárico e chicórico.

As bactérias foram selecionadas para o teste observando-se o critério conhecido como grupo ESKAPE. Esse grupo é formado por **E**-Enterobacter; **S**-Staphylococcus; **K**- Klebsiella; **A**- Acinetobacter; **P**- Pseudomonas; **E**- Enterococcus. Entretanto, não foi possível realizar o teste em Enterobacter, por indisponibilidade de cepas. As bactérias do grupo ESKAPE são de grande relevância clínica por serem as que apresentam conhecidamente maior resistência aos antimicrobianos de uso clínico. Os fungos também foram selecionados de acordo com sua relevância clínica. Além disso, as cepas de fungos e bactérias foram selecionadas de acordo com a literatura consultada para atividade antimicrobiana de EP e também de acordo com a disponibilidade dos microrganismos no laboratório de Micologia do ICB/UFMG.

A susceptibilidade dos microrganismos frente aos extratos secos de *Echinacea purpurea* foi determinada segundo metodologia de microdiluição em caldo, em placa de poliestireno de 96 poços, conforme proposto pelos documentos M7-A9 para bactérias, M27-A3 para leveduras e M38-A2 para fungos filamentosos, do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008a, 2008b e 2012).

Os inóculos das bactérias analisadas foram preparados a partir do crescimento das amostras em BHI com incubação a 37 °C por aproximadamente 24 h. Padronizou-se a concentração da suspensão bacteriana por meio da comparação da turbidez do inóculo, em relação ao padrão 0,5 da escala de *MacFarland*, em espectrofotômetro com leitura em 625 nm. O resultado da absorvância deve estar entre 0,08 e 0,10, equivalente a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Após a padronização, a suspensão bacteriana foi homogeneizada em vórtex e diluída na proporção 1:50, seguida da diluição de 1:20, ambas em caldo MH, para obtenção do inóculo concentrado usado no teste entre $1,0 \times 10^5$ e $2,0 \times 10^5$ UFC/mL (CLSI, 2012).

As amostras de levedura foram previamente cultivadas em meio ASD por 48 h (*Cryptococcus* spp.) a temperatura de 35 °C. As colônias coletadas foram suspendidas em solução salina, colocadas em vórtex por 15 segundos e, em seguida, suas porcentagens de transmitância foram determinadas em espectrofotômetro a 530 nm. Foram efetuadas diluições necessárias com solução salina estéril, de maneira que fossem obtidas porcentagens de transmitância entre 77 e 75%, gerando desse modo, suspensões estoque com concentrações finais de $1,0$ a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL, de cada fungo testado. A partir dessas suspensões, foram preparadas suspensões de trabalho de cada fungo, pela diluição de 1:50 seguido de diluição de 1:20 da suspensão de trabalho em meio RPMI-1640, resultando em suspensões finais com concentração entre $5,0 \times 10^2$ e $1,0 \times 10^3$ UFC/mL.

As amostras de fungos filamentosos foram previamente cultivadas em ágar Batata Dextrose (ABD) por 7 dias a temperatura de 28 °C. Em seguida, as colônias de fungos foram cobertas com 5 mL de solução salina estéril acrescida de 1% de Tween 80 para obtenção de uma suspensão. A suspensão foi homogeneizada em vórtex e a mistura de fragmentos de conídios e hifas filtrada em filtro Whatman n° 40 (tamanho dos poros - 8 µm), que reteve os fragmentos de hifas e permitiu apenas a passagem de microconídios dos fungos filamentosos testados. As densidades das

suspensões foram ajustadas em espectrofotômetro em 520 nm a uma transmitância de 70 a 72%, a qual corresponde à concentração de 2 a 4 x 10⁶ UFC/mL (BARROS *et. al.*, 2007).

Para a realização dos ensaios, primeiramente, foi preparada uma solução aquosa dos extratos secos de *Echinacea purpurea*, na concentração de 10 mg/mL de extrato seco. Em seguida, 205 µL da solução final de cada extrato solubilizado foram adicionados aos respectivos tubos tipo Falcon contendo 4 mL de meio RPMI-1640. Após a adição, foram realizadas diluições sucessivas em 2 mL do respectivo meio, gerando soluções com as concentrações finais de 512, 256, 128, 64 e 32 µg/mL. Para as análises referentes à avaliação antifúngica, foram testadas todas as concentrações preparadas, enquanto para a avaliação antibacteriana foi testada a concentração de 512 µg/mL.

Após as diluições, 100 µL das soluções finais de cada concentração dos extratos avaliados foram adicionadas nos poços correspondentes de cada microplaca, já contendo 100 µL do respectivo meio de cultura, com exceção de uma fileira pré-definida em que não foi adicionado nenhum extrato para controle de crescimento positivo de cada fungo a ser testado. As análises foram realizadas em duplicata. Itraconazol foi o antimicrobiano utilizado para o controle positivo de inibição e para o controle negativo uma placa não inoculada com microrganismos foi incubada nas mesmas condições do teste.

Após a preparação dos inóculos, 100 µL da suspensão de trabalho de cada microrganismo foram adicionados aos respectivos poços das microplacas, em duplicata. Por fim, as placas foram incubadas a uma temperatura de 28 °C para fungos dermatófitos e a 35 °C para os outros microrganismos. As leituras foram realizadas após 24 h para bactérias, 48 h para *Aspergillus fumigatus*, 72 h para *Cryptococcus* spp. e 7 dias para fungos dermatófitos. Em seguida, os crescimentos dos microrganismos foram comparados visualmente com o controle positivo utilizado em cada microplaca, de maneira a determinar a CIM de cada extrato frente aos microrganismos avaliados. Os valores de concentração inibitória mínima foram determinados como a menor concentração do extrato sem crescimento aparente do microrganismo quando comparado ao controle positivo de crescimento por análise visual.

2.2.2.2 Avaliação da atividade imunomoduladora dos extratos secos de *Echinacea purpurea*

Inicialmente, foi realizada uma triagem das concentrações dos extratos de EP para os testes de imunomodulação. Avaliou-se a viabilidade celular dos macrófagos por meio do teste de redução de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), no qual as células (macrófagos) foram colocadas em presença do MTT e do extrato seco de EP na concentração avaliada. Basicamente, células viáveis com metabolismo ativo convertem o reagente MTT em um produto de coloração roxa (formazan), enquanto células mortas não são capazes de realizar essa conversão. Dessa forma, foi possível avaliar se o extrato seco de *Echinacea purpurea* estaria ou não inviabilizando os macrófagos. As concentrações de 10 e 100 µg/mL de extrato seco em água foram selecionadas, por não causarem diminuição da viabilidade dos macrófagos a serem utilizados no teste de imunomodulação.

Com as concentrações ideais definidas, foram feitos testes *in vitro* para avaliar o potencial dos extratos de *Echinacea purpurea* em estimular a capacidade dos macrófagos fagocitarem o fungo *Cryptococcus gatti*. Este fungo foi selecionado por já ser utilizado em um modelo para avaliação de atividade imunomodulatória no Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, onde os experimentos foram realizados.

Para realização dos testes, células de medula óssea de camundongos C57BL/6 (8 a 12 semanas de vida) foram removidas. Para a diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea, as células foram ressuspensas em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de SFB (Soro Fetal Bovino) e submetidas a 30% de sobrenadante de cultura de células L-929, que contém quantidade significativa de Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos, um fator de crescimento essencial na diferenciação de células progenitoras a macrófagos. O protocolo do estudo foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA-UFMG), sob número 34/2016.

Também foi avaliada a capacidade do extrato em alterar a produção de espécies reativas de oxigênio para controle da infecção com o fungo, e a taxa de proliferação

intracelular do fungo *Cryptococcus gattii*, após a fagocitose por macrófagos, na presença de extratos secos de *Echinacea purpurea*.

2.2.2.2.1 Fagocitose *in vitro*, produção de espécies reativas de oxigênio e taxa de proliferação intracelular

Cultivou-se *C. gattii* em meio Ágar-Sabouraud por 48 horas. Em seguida, foi preparada uma suspensão fúngica com a massa celular de *C. gattii* em PBS e a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer com azul de Trypan para padronização do inóculo.

Para o ensaio de fagocitose e para a determinação da Taxa de Proliferação Intracelular (do inglês *Intracellular Proliferation Rate* - IPR), foram utilizadas placas de 24 poços. Primeiramente, no fundo de cada poço da placa, foram adicionadas lamínulas circulares estéreis (13-16 mm). Os macrófagos foram adicionados nas placas, com volume final de 500 μ L, na concentração de 2×10^5 cel/mL.

Para infecção dos macrófagos com o fungo, as leveduras viáveis de *C. gattii* foram ajustadas para $0,4 \times 10^5$ células/mL (proporção 1:5 de leveduras em relação aos macrófagos) e adicionadas à cultura de macrófagos nas placas. Foram feitos dois controles: um deles apenas com a suspensão de macrófagos e outro com a suspensão de macrófagos infectados com *C. gattii* sem tratamentos.

Em metade dos poços, foi adicionada solução do extrato seco de *Echinacea purpurea* na concentração de 10 μ g/mL e na outra metade, uma concentração de 100 μ g/mL do mesmo extrato, para que ambas as concentrações e suas respectivas respostas fossem avaliadas. As placas foram incubadas a 37 °C, com atmosfera de 5% CO₂.

Para o ensaio de fagocitose, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas 24 h após infecção, lavadas em PBS estéril para a remoção do sobrenadante, secas, fixadas com metanol gelado, montadas em lâminas e coradas com o corante Panótico (10 segundos cada reagente). A contagem dos macrófagos (Φ) foi realizada por meio de microscopia óptica e a capacidade fagocítica foi expressa pelo percentual de macrófagos com fungo internalizado.

Para investigar a capacidade dos macrófagos em controlar a proliferação fúngica após fagocitose, obtendo a taxa de proliferação intracelular do fungo, nos tempos de 3 e 24 h após infecção, cada poço foi lavado com PBS para remoção de fungo extracelular, ou seja, das leveduras não internalizadas. Em seguida, as células foram lisadas utilizando 200 µL de água destilada estéril aquecida para recuperação do fungo intracelular. Cada placa foi incubada a 37 °C por 30 min para lise total das células. Após o período de incubação, 50 µL do lisado foi coletado e plaqueado em ASD para determinação do número de UFC. Quanto menor o número de UFC recuperado, maior a capacidade do macrófago de controlar a proliferação celular do fungo estudado. A taxa de proliferação intracelular foi calculada pela divisão do número (UFC) de leveduras intracelulares em 24 horas (t 24h) pelo número (UFC) inicial de leveduras intracelulares em 3 horas (t 3h).

Para o ensaio de quantificação de espécies reativas de oxigênio, os macrófagos foram plaqueados em placas de 96 poços, com volume final de 100 µL, na mesma concentração utilizada para os testes de fagocitose e taxa de proliferação intracelular (2×10^5 células/mL). As células permaneceram em repouso *overnight*. Para infecção dos macrófagos com o fungo, as leveduras viáveis foram ajustadas para $0,4 \times 10^5$ células/mL e adicionadas à cultura de macrófagos, na proporção de 1:5. Foram feitos dois controles: um deles apenas com a suspensão de macrófagos e outro apenas com a suspensão de *C. gattii* sem tratamentos. Em seguida, foi colocada na metade dos poços solução de extrato seco de *Echinacea purpurea* a uma concentração de 10 µg/mL e na outra metade, uma concentração de 100 µg/mL do mesmo extrato. As placas foram incubadas a 37 °C, com atmosfera de 5% CO₂, por 3 e 24 horas.

Para quantificação de espécies reativas de oxigênio, foram adicionados nos poços 10 µL da solução de solução de diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) após período de incubação. DCF-DA não é uma substância fluorescente, mas na presença de espécies reativas de oxigênio, este reagente é oxidado e torna-se verde fluorescente.

Nos tempos previstos, as placas foram lidas no fluorímetro. Os dados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência. Os resultados foram estatisticamente comparados pelo software GraphPad Prism® *Statistical Software* 5.0, versão para Macintosh.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.3.1 Obtenção dos extratos secos de *Echinacea purpurea*

Após contato com 32 farmácias magistrais, foram obtidas 6 amostras de extratos secos de *Echinacea purpurea*. Muitas das farmácias possuíam o extrato seco de EP em seu catálogo, porém estavam com o produto em falta. Mais da metade das farmácias comercializavam o produto.

Características dos seis extratos obtidos estão disponibilizadas na **Tabela 2**. Vale ressaltar que os dados foram extraídos dos laudos enviados pelos fornecedores das amostras, excetuando-se as amostras 3, 5 e 6, que não possuíam laudo e tiveram suas características descritas de acordo com observações de seu aspecto físico. Dentre as amostras que possuíam laudo, todas apresentavam suas características em conformidade em relação às especificações dos fornecedores da matéria-prima, porém a amostra 2 se mostrava fora do prazo de validade.

Nas amostras 2, 3 e 5, observou-se formação de grumos após aproximadamente três meses de armazenamento, em condições idênticas às demais amostras (embalagem escura, vedada com Parafilm® e em dessecador). O uso das amostras 2 e 5 para o estudo ainda era possibilitado por meio da raspagem do corpo sólido formado, pulverizando-o. Já o extrato 3 se tornou uma massa sólida rígida e de coloração escura, sendo excluída dos testes realizados.

Tabela 2 - Características das amostras de extrato seco de *Echinacea purpurea* obtidas de farmácias magistrais.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4	Amostra 5	Amostra 6
Data de validade	Fevereiro/2018	Setembro/2016	-	Setembro/2017	-	-
Partes utilizadas	Folha, caule e raiz	Folha, caule e raiz	-	Raiz	-	-
Armazenamento	Temperatura Ambiente	Temperatura Ambiente	Temperatura Ambiente	Temperatura Ambiente	Temperatura Ambiente	Temperatura Ambiente
Descrição	Pó fino, higroscópico, livre de partículas estranhas	Pó fino e higroscópico, livre de partículas estranhas	Pó fino, livre de partículas estranhas	Pó fino, livre de elementos estranhos	Pó fino, livre de partículas estranhas	Pó fino, livre de partículas estranhas
Cor	Pardo claro a pardo	Pardo claro a pardo	Marrom	Marrom	Marrom	Pardo
Sabor e odor	Característicos	Característicos	Característicos	Característicos	Característicos	Característicos
Solubilidade	Parcialmente solúvel em água e insolúvel em etanol	Parcialmente solúvel em água e insolúvel em etanol	-	90% solúvel em água	-	-
Doseamento	Taninos totais (polifenóis) \geq 1,5 %	Taninos totais \geq 1,5 %	-	Teor de polifenóis > 4,0 %	-	-

2.3.2 Testes biológicos *in vitro*

2.3.2.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos secos de *Echinacea purpurea*

Os resultados da avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos secos de EP e do padrão de ácido clorogênico em relação a diferentes cepas de bactérias e fungos se encontram na **Tabela 3**. De acordo com os dados obtidos, nenhum dos extratos foi capaz de inibir o crescimento das cepas das bactérias testadas.

Tabela 3 - Avaliação do crescimento de microrganismos na presença de 512 µg/mL de *Echinacea purpurea*.

Microrganismos	Amostras de <i>Echinacea purpurea</i>					ACI
	1	2	4	5	6	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella enterica</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-	-	-	-

(+): houve crescimento microbiano; (-): houve inibição do crescimento microbiano
ACI = Ácido Clorogênico

Foi observada uma possível atividade antifúngica dos extratos, em relação a *Cryptococcus neoformans*, de forma que testes complementares foram realizados para determinação da CIM dos extratos frente a diferentes cepas de fungos.

A leitura dos testes foi realizada pela observação visual da inibição de crescimento em cada poço e comparada com o crescimento observado no poço do controle positivo (CLSI, 2008). Para os compostos estudados, a CIM foi considerada a menor concentração que inibiu 100% do crescimento microbiano após o tempo de incubação, por análise visual.

Como controle positivo de inibição de crescimento foi utilizado o antifúngico itraconazol em concentrações seriadas entre 16 e 0,015 µg/mL, sendo considerada a CIM como sendo a menor concentração capaz de inibir 100% do crescimento fúngico (CLSI, 2008).

Como demonstrado na **Tabela 4**, as amostras 1, 2, 5 e 6 não foram capazes de inibir o crescimento de nenhuma das linhagens de fungos empregados no teste, em nenhuma das concentrações examinadas.

Tabela 4 - Determinação da CIM para diferentes cepas de fungos, em µg/mL, de amostras de extratos secos de *Echinacea purpurea*.

Microrganismos	Amostra de extrato seco de EP					ACI
	1	2	4	5	6	
<i>C. gattii</i> R265	>512	>512	512	>512	>512	512
<i>C. gattii</i> ATCC 24065	>512	>512	512	>512	>512	256
<i>C. neoformans</i> H99	>512	>512	512	>512	>512	512
<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	>512	>512	512	>512	>512	512
<i>Trichophyton inderdigitale</i> ATCC 9533	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	512
<i>Trichophyton rubrum</i> ATCC 40051	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	512
<i>Microsporium gypseum</i>	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	512

ACI = Ácido Clorogênico

O extrato seco 4, por sua vez, apresentou CIM de 512 µg/mL para todas as cepas de *Cryptococcus sp.* De acordo com o laudo do fornecedor e com os resultados do doseamento descritos no **Capítulo III**, a amostra 4 foi a que apresentou maior teor dos marcadores vegetais. Isso pode justificar a maior atividade antifúngica desta amostra, comparada às outras. Além disso, dentre as amostras com procedência conhecida, a amostra 4 era a única composta apenas pela raiz da planta, enquanto as outras eram compostas por partes aéreas, ou mistura de partes aéreas e raízes.

O ácido clorogênico apresentou CIM de 512 µg/mL para seis das sete cepas de microrganismos testadas e de 256 µg/mL para uma delas, *C. gattii* ATCC 24065. Esse derivado do ácido cafeico, assim como os demais, possuem inúmeras atividades biológicas, tal como a antimicrobiana (ADOLPHO, 2012). Além disso, Kong e colaboradores (2017) demonstraram que o ácido clorogênico é capaz de reduzir a formação de biofilme pelo fungo *Aspergillus fumigatus*, revelando seu potencial efeito antifúngico. Os resultados do presente estudo mostraram que, de fato, o ácido clorogênico foi capaz de inibir o crescimento de *Cryptococcus gatti* em teste. Entretanto, o mesmo não apresentou efeito contra o crescimento bacteriano.

As amostras analisadas não apresentaram atividade contra bactérias, ao contrário do elevado efeito antibacteriano de uma preparação de EP, em extrato etanólico de equinácea, com 65% de partes aéreas e 5% de raiz em concentração de 160 µg/mL, demonstrado pelos estudos de Sharma *et al.* (2010). Já no presente estudo, os extratos secos de EP foram testados na concentração de 512 µg/mL, de forma que esperava-se uma resposta antibacteriana maior.

A diferença na atividade antimicrobiana das amostras testadas no presente estudo e aquelas dos artigos analisados pode estar relacionada com a forma de extração, solventes utilizados para a obtenção do extrato ou até mesmo da parte da planta utilizada, uma vez que os laudos das amostras coletadas em farmácias magistrais não apresentam os percentuais que representam cada parte da planta no extrato. Além disso, os laudos não informavam qual foi o solvente utilizado para a extração, enquanto Sharma *et al.* (2010) utilizam extrato etanólico.

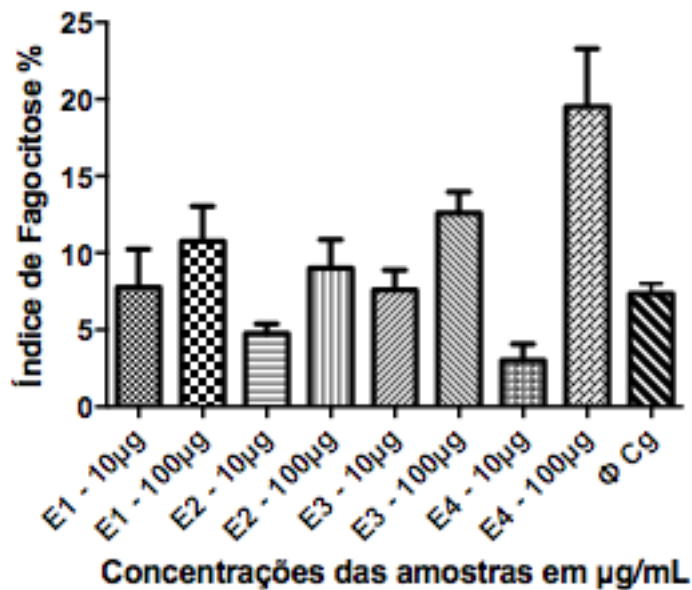
Tradicionalmente, a *Echinacea purpurea* é utilizada no tratamento de infecções, entretanto, o efeito antibacteriano não foi comprovado no presente trabalho. Pode ser que a planta *in natura* apresente este efeito, mas os extratos secos analisados não, em virtude dos fatores previamente mencionados, como forma de extração e solventes utilizados.

2.3.2.2 Avaliação da atividade imunomoduladora dos extratos secos de *Echinacea purpurea*

2.3.2.2.1 Fagocitose *in vitro*

O índice fagocítico foi calculado como percentual de macrófagos com leveduras internalizadas, em relação ao número total de macrófagos. Os resultados dos testes de fagocitose foram avaliados no tempo de 24 h de incubação das placas, por meio de microscopia óptica, e estão dispostos no gráfico a seguir.

Figura 6 - Avaliação do índice de fagocitose na presença de *Echinacea purpurea*, em 24 h.



ΦCg = macrófagos infectados com *Cryptococcus gatti*; E1-10 e E1-100 = amostra 1 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente; E2-10 e E2-100 = amostra 2 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente; E4-10 e E4-100 = amostra 4 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente; E5-10 e E5-100 = amostra 5 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Foram comparadas, através do teste de comparação múltipla de *Tukey*, as respostas dos macrófagos infectados com *Cryptococcus gatti* (Φ Cg) na presença das duas concentrações de EP utilizadas: 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ dos diferentes extratos testados. Os resultados são apresentados na **Tabela 5**.

Tabela 5 – Comparação estatística entre os índices de fagocitose na presença de *Echinacea purpurea*, em 24h.

Comparações	Diferença média	Diferença estatisticamente significativa
E1 – 10 $\mu\text{g/mL}$ vs. E1 – 100 $\mu\text{g/mL}$	-3	Não
E2 – 10 $\mu\text{g/mL}$ vs. E2 – 100 $\mu\text{g/mL}$	-4,25	Não
E4 – 10 $\mu\text{g/mL}$ vs. E4 – 100 $\mu\text{g/mL}$	-5	Não
E5 – 10 $\mu\text{g/mL}$ vs. E5 – 100 $\mu\text{g/mL}$	-16,5	SIM
Φ Cg vs. E5 - 100$\mu\text{g/mL}$	-12,17	SIM

Φ Cg = macrófagos infectados com *Cryptococcus gatti*;

E1-10 e E1-100 = amostra 1 nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente;

E2-10 e E2-100 = amostra 2 nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente;

E4-10 e E4-100 = amostra 4 nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente;

E5-10 e E5-100 = amostra 5 nas concentrações de 10 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

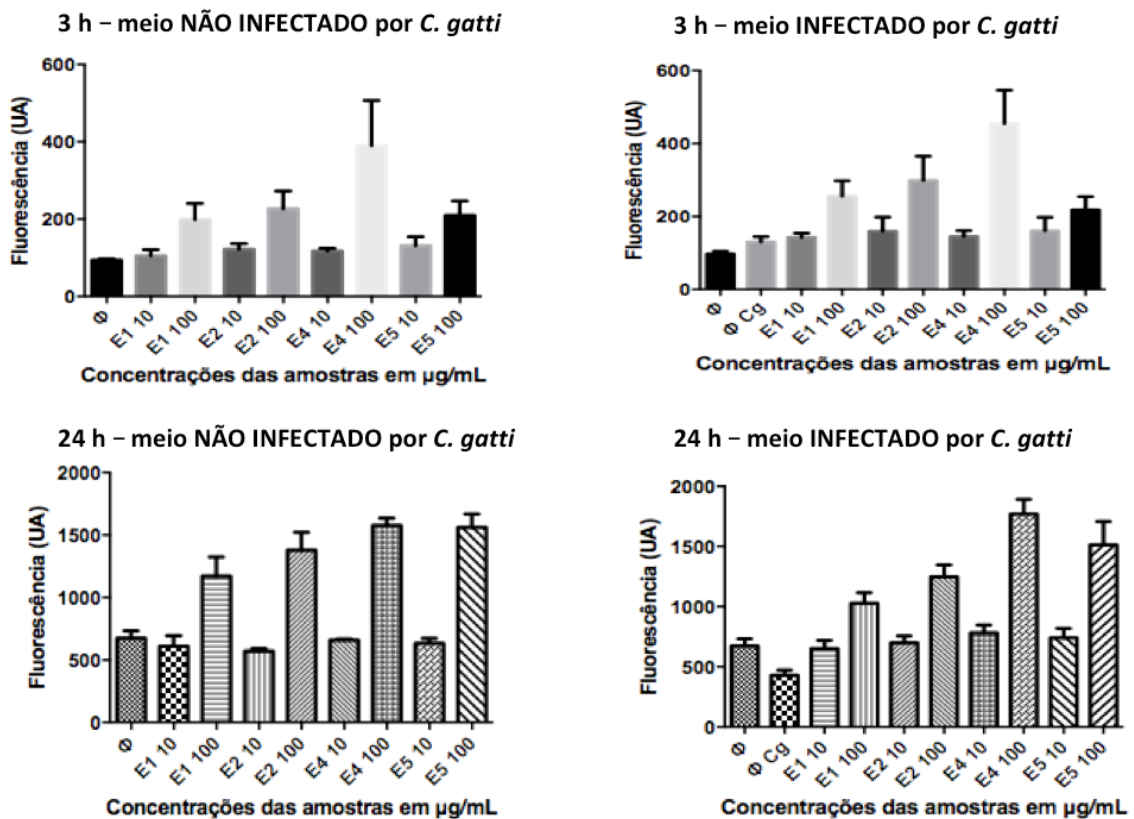
Analisando a tabela com o tratamento estatístico comparativo, pode-se observar que somente o índice da fagocitose estimulada pela amostra 5, na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, teve diferença estatisticamente significativa em relação ao índice de fagocitose ocorrido em macrófagos infectados, sem tratamento com o extrato da planta. Também houve diferença estatisticamente significativa comparando-se os índices de fagocitose ocorridos com as concentrações de 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Demonstrando assim, que a amostra 5 em maior concentração pode estimular a fagocitose *in vitro* nos testes realizados de forma mais pronunciada e dosedependente.

2.3.2.2.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

Os resultados dos testes que avaliariam os efeitos da *Echinacea purpurea* no estímulo da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) foram avaliados nos tempos de 3 e 24 h de incubação das placas, em fluorímetro, e estão dispostos na **Figura 7**, na qual são demonstrados os números de Unidades Arbitrárias (UA) de

fluorescência para cada uma das concentrações e amostras analisadas. Quanto maior a fluorescência observada, maior a produção de espécies reativas de oxigênio.

Figura 7 - Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio na presença de *Echinacea purpurea*.



Φ = macrófagos; Φ Cg = macrófagos infectados com *Cryptococcus gatti*; E1-10 e E1-100 = amostra 1 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente; E2-10 e E2-100 = amostra 2 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente; E4-10 e E4-100 = amostra 4 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente; E5-10 e E5-100 = amostra 5 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Comparando-se o grupo de macrófagos infectados na ausência de EP e na presença de extratos secos de EP, pode-se observar que o extrato estimula o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, de forma dose dependente.

Ou seja, a produção de ERO pode ser relacionada à concentração do extrato no meio.

Comparou-se por meio do teste de *Tukey* as respostas das células nas duas concentrações de EP utilizadas: 10 e 100 µg/mL dos diferentes extratos testados. Os resultados são apresentados nas **Tabelas 6 e 7**.

Tabela 6 – Comparação estatística da produção de espécies reativas de oxigênio em 3 h na presença de *Echinacea purpurea* em meio INFECTADO por *C. gatti*, entre as diferentes concentrações de cada extrato de EP.

Comparações	Diferença média	Diferença estatisticamente significativa
Φ vs. Φ Cg	-33	Não
Φ vs. E1 10	-45,38	Não
Φ vs. E1 100	-158,2	SIM
Φ vs. E2 10	-62,43	Não
Φ vs. E2 100	-200,8	SIM
Φ vs. E4 10	-47,63	Não
Φ vs. E4 100	-357,4	SIM
Φ vs. E5 100	-63,23	Não
Φ vs. E5 100	-120,4	SIM
Φ Cg vs. E1 10	-12,38	Não
Φ Cg vs. E1 100	-125,2	SIM
Φ Cg vs. E2 10	-29,43	Não
Φ Cg vs. E2 100	-167,8	SIM
Φ Cg vs. E4 10	-14,63	Não
Φ Cg vs. E4 100	-324,4	SIM
Φ Cg vs. E5 100	-30,23	Não
Φ Cg vs. E5 100	-87,43	SIM
E1 10 vs. E1 100	-112,9	SIM
E2 10 vs. E2 100	-138,4	SIM
E4 10 vs. E4 100	-309,8	SIM
E5 10 vs. E5 100	-57,2	Não

Φ = macrófagos; ΦCg = macrófagos infectados com *Cryptococcus gatti*; E1-10 e E1-100 = amostra 1 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E2-10 e E2-100 = amostra 2 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E4-10 e E4-100 = amostra 4 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E5-10 e E5-100 = amostra 5 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Tabela 7 – Comparação estatística da produção de espécies reativas de oxigênio em 24h na presença de *Echinacea purpurea* em meio INFECTADO por *C. gatti*, entre as diferentes concentrações de cada extrato.

Comparações	Diferença média	Diferença estatisticamente significativa
Φ vs. Φ Cg	244,7	Não
Φ vs. E1 10	22,38	Não
Φ vs. E1 100	-354,2	Não
Φ vs. E2 10	-25,23	Não
Φ vs. E2 100	-573,4	SIM
Φ vs. E4 10	-108,2	Não
Φ vs. E4 100	-1096	SIM
Φ vs. E5 100	-67,83	Não
Φ vs. E5 100	-839,4	SIM
Φ Cg vs. E1 10	-222,3	Não
Φ Cg vs. E1 100	-598,9	SIM
Φ Cg vs. E2 10	-269,9	Não
Φ Cg vs. E2 100	-818,1	SIM
Φ Cg vs. E4 10	-352,9	Não
Φ Cg vs. E4 100	-1341	SIM
Φ Cg vs. E5 100	-312,5	Não
Φ Cg vs. E5 100	-1084	SIM
E1 10 vs. E1 100	-376,6	Não
E2 10 vs. E2 100	-548,2	SIM
E4 10 vs. E4 100	-987,6	SIM
E5 10 vs. E5 100	-771,6	SIM

Φ = macrófagos; ΦCg = macrófagos infectados com *Cryptococcus gatti*; E1-10 e E1-100 = amostra 1 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E2-10 e E2-100 = amostra 2 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E4-10 e E4-100 = amostra 4 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E5-10 e E5-100 = amostra 5 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Analisando-se os testes estatísticos de comparação entre os extratos e suas respectivas concentrações, pode-se observar que nos meios infectados com *C. gatti*, no tempo de 3 h, todas as amostras na concentração de 100 µg/mL apresentaram diferença significativa na produção de espécies reativas de oxigênio, quando comparadas com os macrófagos infectados na ausência de extratos de EP. Nas comparações entre concentrações, somente a amostra 5 não apresenta diferença estatisticamente significativa na produção de espécies reativas de oxigênio.

No tempo de 24 h para os meios infectados com *C. gatti*, todas as amostras na concentração de 100 µg/mL também apresentaram diferença significativa na produção de espécies reativas de oxigênio, quando comparadas com os macrófagos infectados na ausência de extratos de EP. Nas comparações entre concentrações, somente a amostra 1 não apresentou diferença estatisticamente significativa na produção de espécies reativas de oxigênio.

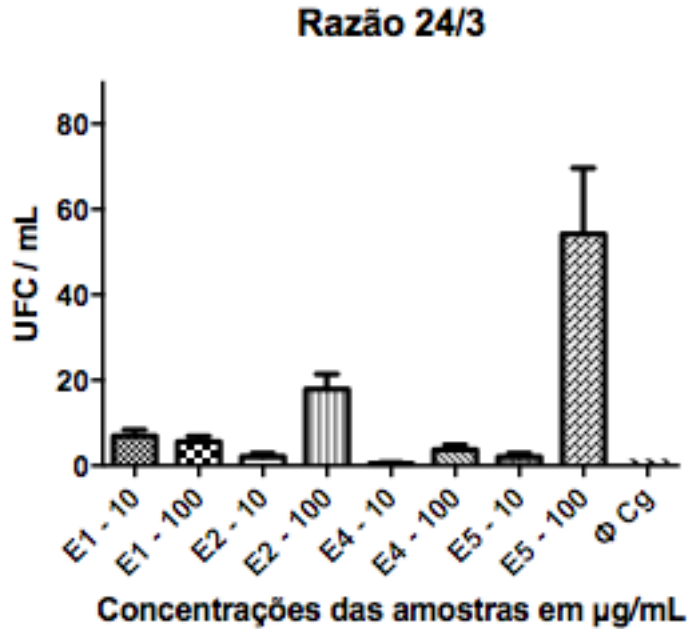
Comparando-se os macrófagos não infectados sem tratamento, com os macrófagos não infectados e tratados com *Echinacea purpurea*, tanto no tempo de 3 h quanto no tempo de 24 h, nenhum dos extratos na concentração de 10 µg/mL foi capaz de aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio. Já na concentração de 100 µg/mL, mesmo nos meios não infectados, houve aumento da produção de espécies reativas de oxigênio no caso dos extratos secos 1, 2 e 4.

Logo, pode-se observar que há influência positiva dos extratos testados na produção de espécies reativas de oxigênio e que esse efeito é diretamente relacionado à concentração dos extratos secos de *Echinacea purpurea*, ou seja, dose dependente. Uma vez que as ERO facilitam a resolução de infecções, verificou-se um potencial da *Echinacea purpurea* como adjuvante na modulação da resposta imunológica, de forma a auxiliar na eliminação do microrganismo após a infecção. Estes resultados são condizentes com Fonseca e colaboradores (2014), que demonstraram que os compostos presentes nos extratos secos de *Echinacea purpurea* tem a capacidade de estimular o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, inibindo o crescimento de fungos em testes *in vivo*.

2.3.2.2.3 Efeito na taxa de proliferação intracelular

Os resultados dos testes de taxa de proliferação intracelular *in vitro* foram avaliados nos tempos de 3 e 24 h de incubação das placas, por meio da contagem do número de UFC nos dois tempos. A taxa de proliferação intracelular é dada pela razão entre os números de unidades observadas nos tempos de 24 e 3 h. Na **Figura 8** é possível observar o gráfico que representa essa razão.

Figura 8 – Razão 24h/3h da taxa de proliferação intracelular de *C. gatti* em macrófagos, na presença de extratos secos de *Echinacea purpurea*.



ΦCg = macrófagos infectados com *Cryptococcus gatti*; E1-10 e E1-100 = amostra 1 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E2-10 e E2-100 = amostra 2 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E4-10 e E4-100 = amostra 4 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E5-10 e E5-100 = amostra 5 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Para avaliar a significância estatística dos resultados obtidos, foram comparadas através do Teste de *Tukey* as respostas das células nas duas concentrações de extratos de EP utilizadas: 10 e 100 µg/mL. Os resultados são apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Comparação estatística entre as taxas de proliferação intracelular em diferentes concentrações de extrato de *Echinacea purpurea*.

Comparações	Diferença média	Diferença estatisticamente significativa
Φ Cg vs. E1 - 10	-5,481	Não
Φ Cg vs. E1 - 100	-4,125	Não
Φ Cg vs. E2 - 10	-0,691	Não
Φ Cg vs. E2 - 100	-16,45	Não
Φ Cg vs. E4 - 10	0,9662	Não
Φ Cg vs. E4 - 100	-2,259	Não
Φ Cg vs. E5 - 10	-0,6111	Não
Φ Cg vs. E5 - 100	-52,71	SIM
E1 - 10 vs. E1 - 100	1,356	Não
E2 - 10 vs. E2 - 100	-15,76	Não
E5 - 10 vs. E5 - 100	-52,1	SIM

ΦCg = macrófagos infectados com *Cryptococcus gatti*; E1-10 e E1-100 = amostra 1 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E2-10 e E2-100 = amostra 2 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E4-10 e E4-100 = amostra 4 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente. E5-10 e E5-100 = amostra 5 nas concentrações de 10 µg/mL e 100 µg/mL, respectivamente.

Uma vez que quanto menor o número de UFC recuperado e quanto menor a razão 24 h/3 h, maior a capacidade fungicida do macrófago, pode-se observar pela análise da **Figura 11**, que a amostra 4 em concentração de 10 µg/mL foi a que mais estimulou a capacidade fungicida do macrófago. No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre a referida amostra e as demais, nem mesmo entre a amostra 4 e os macrófagos infectados na ausência de EP, concluindo-se que a taxa de proliferação intracelular não é significativamente alterada pelos extratos de *Echinacea purpurea*.

Os testes realizados para avaliação da atividade imunomodulatória são interligados e complementares, visto que a taxa de proliferação intracelular é consequência da fagocitose e da produção de espécies reativas de oxigênio. Nos experimentos realizados, verificou-se que os extratos secos de EP foram capazes de estimular a fagocitose do fungo pelos macrófagos e aumentar a produção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos infectados por *C. gatti*, de forma dosedependente.

Apesar da taxa de proliferação intracelular do fungo não ter sido significativamente alterada, pode-se comprovar a atividade imunomodulatória dos extratos de EP avaliados, sendo este um mecanismo importante para combate às infecções microbianas.

A partir dos testes biológicos realizados, é possível inferir que o provável mecanismo pelo qual a *Echinacea purpurea* é eficaz para o tratamento de infecções seria um mecanismo indireto, principalmente pela ativação do sistema imunológico, atuando em diferentes vias existentes. O efeito antimicrobiano direto parece ser menos pronunciado, uma vez que não foi observada atividade antibacteriana significativa e apenas leve atividade antifúngica, contra as cepas avaliadas e nas condições dos testes.

**3 CAPÍTULO III: DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO
PARA QUANTIFICAÇÃO DE MARCADORES VEGETAIS EM EXTRATOS SECOS
DE *Echinacea purpurea***

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Material químico

- Extratos secos de *Echinacea purpurea* doados por farmácias magistrais, provenientes dos fornecedores VivaFarma, Ely Martins e Florian;
- substâncias químicas de referência (SQR) dos ácidos caftárico, chicórico e clorogênico, todas da marca Sigma-Aldrich®;
- reagentes grau cromatográfico: acetonitrila, metanol, ácido fórmico;
- reagentes grau analítico: ácido acético e ácido trifluoroacético;
- água destilada e deionizada em sistema Milipore®.

3.1.2 Equipamentos, instrumentos e materiais acessórios

- Balança analítica Startorius BP 221D;
- coluna cromatográfica C₁₈ ZORBAX Eclipse Plus (2,1 x 50 mm; 1,8 µm);
- sistema CLUE-UV WATERS UPLC® ACQUITY com detector DAD, autoinjeter, forno de coluna, e bomba binária, conectado ao software Empower Pro 2;
- pHmetro Metrohm 827;
- refrigerador Consul 240;
- ultrassom BRANSON 1510;
- purificador de água Millipore® Direct-Q 3UV com filtro de 0,22 µm;
- pipetas automáticas calibradas marca BRAND;
- filtros de celulose regenerada 0,22 µm;
- vidrarias de uso comum em laboratório.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Desenvolvimento de método analítico por CLUE-DAD para quantificação de marcadores vegetais nos extratos secos de *Echinacea purpurea*

Por meio de adaptações dos métodos de quantificação dos marcadores vegetais de EP preconizado pela Farmacopeia Americana 38^a edição e pela Farmacopeia Europeia 9^a edição, de consultas à literatura disponível sobre a planta e de análises experimentais, foram determinadas as condições cromatográficas ideais para melhor resolução dos picos referentes aos marcadores vegetais estudados (ácido caftárico, ácido chicórico e ácido clorogênico).

As análises foram realizadas por meio da CLUE, utilizando o sistema de cromatografia a líquido de ultra eficiência WATERS UPLC[®] ACQUITY com detector DAD, autoinjeter, forno de coluna, e bomba binária. Utilizou-se coluna cromatográfica ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ com dimensões de 2,1 x 50 mm e tamanho de partículas de 1,8 µm. Os dados foram coletados e processados pelo *software* Empower Pro 2.

Foram avaliadas as seguintes condições:

- comprimento de onda para detecção no UV: além das análises feitas no comprimento de onda de 330 nm, como estabelecido pelas farmacopeias americana e europeia, todo o espectro na região do ultravioleta (200-400 nm) foi analisado, para estabelecer qual seria o melhor comprimento de onda para identificação e quantificação dos marcadores;
- composição da fase móvel (FM): foram testadas diversas proporções da mistura entre os solventes orgânicos acetonitrila e metanol, e os ácidos acético, trifluoroacético e fórmico diluídos em água, os mais utilizados para a referida análise nas farmacopeias e literaturas consultadas;
- forma de eluição: foram analisadas as eluições isocrática, na qual a força da fase móvel se mantém constante durante toda a corrida, e em gradiente, onde tal força é alterada ao longo do tempo de análise, devido alterações na composição da FM;

- fluxo da fase móvel;
- volume de injeção;
- tempo de corrida;
- temperatura da coluna.

Para o preparo da solução estoque padrão, pesou-se, exatamente, cerca de 1,6 mg de ácido caftárico e 0,48 mg de ácido chicórico, transferindo-se quantitativamente para balão volumétrico de 10 mL. Para o ácido clorogênico, pesou-se, exatamente, cerca 3,0 mg de ácido clorogênico SQR, transferiu-se quantitativamente para um balão volumétrico de 25 mL, e completou-se o volume com água. Desta solução de ácido clorogênico, transferiu-se 1 mL para balão o volumétrico de 10 mL em que já se encontravam os outros padrões, e completou-se o volume com água. Obteve-se então, concentração final de 160 µg/mL para o ácido caftárico, 12 µg/mL para o ácido clorogênico e 48 µg/mL para o ácido chicórico.

As soluções amostra foram preparadas pesando-se 20 mg das amostras de extrato seco de *Echinacea purpurea*, transferindo-se quantitativamente para balão de 2 mL e completando-se o volume com solução aquosa de ácido fórmico 0,05% (v/v), obtendo-se uma concentração final de 10 mg/mL. O conteúdo foi homogeneizado e filtrado em membrana de 0,22 µm.

O preparo da fase móvel foi realizado adicionando-se 100 µL de ácido fórmico grau analítico a 200 mL de água deionizada. Foi aferido pH 2,8, em peagâmetro calibrado.

Ao proceder as análises, a seleção das condições ideais foi baseada na avaliação de parâmetros cromatográficos, como fator de retenção, fator de cauda e resolução, tendo em vista a otimização do método para identificação e quantificação dos marcadores vegetais da EP.

3.2.2 Validação de método analítico por CLUE-UV para quantificação de marcadores vegetais nos extratos secos de *Echinacea purpurea*

A validação do método analítico foi realizada de acordo com as especificações da Resolução nº 166, de 24 de julho de 2017, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Os resultados foram tratados pelo *Software* Microsoft Excel® para Mac 2011 versão 14.7.7. Para a validação do método, foi utilizada a amostra 4 de extrato seco de EP.

3.2.2.1 Condições cromatográficas

Após otimização das condições cromatográficas, a fase móvel utilizada foi composta por acetonitrila e solução aquosa de ácido fórmico a 0,05% (v/v), na proporção de 90:10, com fluxo 0,2 mL/min. O volume de injeção foi 10 µL e os espectros na região do ultravioleta foram armazenados na faixa de 200 a 400 nm, por meio do detector DAD, para identificação dos picos cromatográficos. Os comprimentos de onda selecionados para quantificação dos marcadores foram 300 e 330 nm.

3.2.2.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada construindo-se uma curva analítica para cada um dos marcadores analisados com sete níveis de concentração, na faixa de 20 a 200% da concentração de trabalho de cada marcador: ácido caftárico (40 µg/mL), ácido clorogênico (3 µg/mL) e ácido chicórico (12 µg/mL).

Para a construção da curva analítica, foi preparada uma solução padrão estoque com os três marcadores analisados, nas concentrações de 160 µg/mL para o ácido caftárico, 12 µg/mL para o ácido clorogênico e 48 µg/mL para o ácido chicórico, conforme procedimento descrito no item **3.2.1**.

Em seguida, prepararam-se as soluções amostras a 20, 50, 80, 110, 140, 170 e 200% da concentração de trabalho, por meio da diluição das soluções padrão

estoque em água, utilizando-se pipetador automático *Handy Step*[®]. Cada ponto foi analisado em triplicata.

As soluções amostra foram filtradas em membrana de 0,22 µm, transferidas para vials e injetadas para a análise por CLUE. As diluições feitas para obtenção das soluções amostra estão representadas na **Tabela 9**.

Tabela 9 – Diluições para avaliação da linearidade do método analítico por CLUE-DAD para quantificação de ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico em extrato seco de *Echinacea purpurea*.

Intervalo Linear (%)	Volume da solução padrão estoque (mL)	Concentração final (µg/mL)	H ₂ O q.s.p (mL)
20	0,25	8,0 Aca + 0,6 ACI + 2,4 ACh	5,0
50	0,625	20,0 Aca + 1,5 ACI + 6,0 ACh	5,0
80	1,0	32,0 Aca + 2,4 ACI + 9,6 ACh	5,0
110	1,375	44,0 Aca + 3,3 ACI + 13,0 ACh	5,0
140	1,75	56,0 Aca + 4,2 ACI + 17,0 ACh	5,0
170	2,125	68,0 Aca + 5,1 ACI + 20,4 ACh	5,0
200	2,5	80,0 Aca + 6,0 ACI + 24 ACh	5,0

Aca = ácido caftárico; ACI = ácido clorogênico; ACh = ácido chicórico

Os *outliers* foram identificados pelo teste de resíduo padronizado de Jackknife ($\alpha = 0,05$). O critério de aceitação utilizado foi que no máximo 22% dos dados originais da curva de calibração podem ser excluídos (SOUZA, 2007).

Em seguida, testes estatísticos foram utilizados para analisar se os resíduos da regressão seguiam a distribuição normal, possuíam variância constante ao longo do eixo x e eram independentes.

A normalidade da regressão foi avaliada pelo teste de Ryan-Joiner, a homocedasticidade pelo teste de Levene modificado por Brown e Forsythe e a independência dos resíduos da regressão pelo teste de Durbin-Watson. Também foi analisado se a regressão era significativa e se o desvio da linearidade não era significativo, utilizando a análise de variância (ANOVA) (SOUZA, 2007; SOUZA; JUNQUEIRA, 2005). A curva analítica foi construída com os valores de área sob o pico de cada um dos marcadores, obtidas para cada nível de concentração.

A linearidade foi avaliada pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), por meio da estimativa dos parâmetros coeficiente de determinação (R^2), coeficiente angular (b) e coeficiente linear (a).

3.2.2.3 Seletividade

A seletividade do método por CLUE-DAD foi determinada pela avaliação da pureza espectral dos picos dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico, obtidos em cromatogramas de soluções padrão e amostra, nas concentrações de trabalho de cada um dos marcadores, com auxílio do detector DAD, a partir de cálculos feitos pelo *Software Empower® Pro 2*.

3.2.2.4 Precisão

A precisão intracorrída foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho estimada para cada marcador vegetal analisado da EP: ácido caftárico (40 µg/mL), ácido clorogênico (3 µg/mL) e ácido chicórico (12 µg/mL), em um mesmo dia, com o mesmo analista.

Para isso, preparou-se seis soluções amostra independentes, conforme procedimento descrito no **item 3.2.1**, obtendo-se uma concentração final de 10 mg/mL.

Preparou-se uma solução padrão, a partir da solução estoque descrita no **item 3.2.1**, com os três marcadores analisados, obtendo-se concentração final de 40 µg/mL para o ácido caftárico, 3 µg/mL para o ácido clorogênico e 12 µg/mL para o ácido chicórico.

Para avaliação da precisão intercorrídas, o mesmo procedimento foi adotado, realizando-se análises em dois dias consecutivos, com analistas diferentes. Os teores dos marcadores vegetais e o desvio padrão relativo (DPR) foram determinados para o primeiro dia de análise e para os dias consecutivos.

3.2.2.5 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada pelo procedimento de adição de padrão, sendo avaliada a partir de nove determinações contemplando os níveis de 50% (baixo), 100% (médio) e 150% (alto) da concentração de trabalho dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico. A análise foi realizada em triplicata para cada nível de concentração.

Preparou-se uma solução padrão estoque, nas concentrações de 80 µg/mL para o ácido caftárico, 6 µg/mL para o ácido clorogênico, 24 µg/mL para o ácido chicórico.

A solução amostra estoque foi preparada pesando-se 100 mg da amostra de extrato seco, transferindo-se quantitativamente para um balão volumétrico de 10 mL, completando-se o volume com solução aquosa de ácido fórmico 0,05% (v/v) e homogeneizando-se. Obteve-se, teoricamente, as seguintes concentrações: 40 µg/mL para o ácido caftárico, 3 µg/mL para o ácido clorogênico, 12 µg/mL para o ácido chicórico.

Para o preparo das soluções fortificadas com concentrações finais de 50, 100 e 150% dos marcadores, 2 mL da solução amostra foram adicionados em nove balões volumétricos de 5 mL. Em seguida, foram adicionadas em cada balão volumétrico, os seguintes volumes de solução padrão estoque: 0,25 mL para a concentração final de 50%, 1,5 mL para a concentração final de 100% e 2,75 mL para a concentração final de 150%. Os volumes foram completados com água e homogeneizados. Também foi preparada uma solução da amostra diluída, transferindo-se 4 mL da solução amostra estoque para balão volumétrico de 10 mL e completando-se o volume com ácido fórmico 0,05% (v/v), a fim de se obter uma solução com concentração teoricamente de 16 µg/mL para o ácido caftárico, 1,2 µg/mL para o ácido clorogênico, 4,8 µg/mL para o ácido chicórico. As amostras foram filtradas em membranas de 0,22 µm, transferidas para *vials* e injetadas no cromatógrafo. Na **Tabela 10** estão descritas as concentrações em nível alto, médio e baixo, para avaliação da exatidão do método.

Tabela 10 – Delineamento das concentrações de ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico para avaliação da exatidão do método analítico por CLUE-DAD.

% correspondente	Concentração teórica final (µg/mL)	Concentração da amostra adicionada (µg/mL)	Concentração do padrão adicionado (µg/mL)
50	20,0 Aca + 1,5 Acl + 6,0 Ach	16,0 Aca + 1,2 Acl + 4,8 Ach (40%)	4,0 Aca + 0,3 Acl + 1,2 Ach (10%)
100	40,0 Aca + 3,0 Acl + 12,0 Ach	16,0 Aca + 1,2 Acl + 4,8 Ach (40%)	24,0 Aca + 1,8 Acl + 7,2 Ach (60%)
150	60,0 Aca + 4,5 Acl + 18,0 Ach	16,0 Aca + 1,2 Acl + 4,8 Ach (40%)	44,0 Aca + 3,3 Acl + 13,2 Ach (110%)

Aca = ácido caftárico; Acl = ácido clorogênico; Ach = ácido chicórico

As porcentagens de recuperação foram calculadas pela relação entre as concentrações dos marcadores obtidas experimentalmente e as concentrações teóricas dos mesmos marcadores nas preparações fortificadas, de acordo com a equação a seguir (BRASIL, 2017):

$$\text{Recuperação} = \frac{CE_f - CE_{aa}}{CT_{pa}} \times 100$$

Em que: CE_f corresponde à concentração experimental final, CE_{aa} à concentração experimental da amostra adicionada, e CT_{pa} é a concentração teórica do padrão adicionado.

3.2.2.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico foram estimados a partir das equações que levam em consideração parâmetros da curva analítica, conforme item 3.2.2.2.

As equações estão representadas a seguir (BRASIL, 2017):

$$LD = 3,3 \frac{DP_a}{b} \qquad LQ = 10 \frac{DP_a}{b}$$

Em que: LD corresponde ao Limite de Detecção, LQ ao limite de quantificação, DP_a corresponde ao desvio padrão do intercepto e b é o valor da inclinação da curva analítica.

3.2.2.7 Robustez

Uma solução padrão e seis soluções amostra independentes do extrato seco foram preparadas, conforme previamente descrito.

As soluções amostra foram preparadas na concentração de 10 mg/mL. A solução padrão foi preparada, conforme descrito no **item 3.2.1**, com concentrações de 40 µg/mL para o ácido caftárico, 3 µg/mL para o ácido clorogênico e 12 µg/mL para o ácido chicórico.

As soluções preparadas foram analisadas nas condições nominais e variando-se os seguintes parâmetros analíticos: proporção de acetonitrila e ácido fórmico 0,05% (v/v), fluxo da fase móvel e temperatura da coluna. As variações estabelecidas para cada parâmetro estão demonstradas na **Tabela 11**.

Tabela 11 – Variações de parâmetros analíticos para a avaliação da robustez do método de quantificação de ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico em extratos secos de *Echinacea purpurea*.

Parâmetro	Menor Valor	Valor Nominal	Maior Valor	Variação
Proporção de ác. fórmico na FM (%)	8	10	12	± 2,00
Fluxo da FM (mL/min)	0,18	0,20	0,22	± 0,02
Temperatura da coluna (°C)	27	30	33	± 3,00

Em cada uma das condições, os teores dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico foram determinados e os valores obtidos nas condições nominais e nas condições variadas foram estatisticamente comparados por meio de análise de variância (ANOVA).

3.2.2.8 Efeito Matriz

O efeito matriz pode ser avaliado por meio de curvas analíticas plotadas com amostras fortificadas com quantidades conhecidas do padrão do analito. No presente estudo, a avaliação deste parâmetro foi realizada utilizando-se ácido clorogênico, devido a baixa disponibilidade das substâncias químicas de referência dos outros dois marcadores vegetais.

Para a avaliação do efeito matriz, construiu-se uma curva analítica para o ácido clorogênico SQR com sete níveis de concentração, na faixa de 20 a 200% da concentração de trabalho e uma segunda curva analítica com a amostra de extrato seco fortificada com ácido clorogênico SQR, também com sete níveis de concentração, proporcionais aos da primeira curva (40 a 220% da concentração de trabalho).

Para a construção da curva analítica, foi preparada uma solução padrão estoque de ácido clorogênico a 12 µg/mL. Para isso, pesou-se, exatamente, cerca 3 mg de ácido clorogênico SQR, transferiu-se quantitativamente para balão volumétrico de

25 mL, e completou-se o volume com água. Desta solução, transferiu-se 1 mL para balão volumétrico de 10 mL e completou-se o volume com água.

Em seguida, preparou-se uma solução amostra com concentração estimada de 3 µg/mL de ácido clorogênico, pesando-se 100 mg da amostra de extrato seco de EP e transferindo-se para um balão de 10 mL. Completou-se o volume com ácido fórmico 0,05% (v/v).

As diluições feitas para obtenção das soluções analisadas estão representadas nas Tabelas 12 e 13 a seguir.

Tabela 12 – Diluições para avaliação do efeito matriz do método analítico por CLUE-DAD para quantificação de ácido clorogênico em extrato seco de *Echinacea purpurea* - curva em solvente.

%	Concentração de ácido clorogênico (µg/mL)	Volume da solução padrão (mL)	H ₂ O q.s.p (mL)
20	0,6	0,25	5,0
50	1,5	0,625	5,0
80	2,4	1,0	5,0
110	3,3	1,375	5,0
140	4,2	1,75	5,0
170	5,1	2,125	5,0
200	6,0	2,5	5,0

Tabela 13 – Diluições para avaliação do efeito matriz do método analítico por CLUE-DAD para quantificação de ácido clorogênico em extrato seco de *Echinacea purpurea* - curva amostra fortificada.

%	Concentração de ácido clorogênico (µg/mL)	Volume da solução padrão (mL)	Volume da solução amostra (mL)	H ₂ O q.s.p (mL)
40	1,2	0,25	1,0	5,0
70	2,1	0,625	1,0	5,0
100	3,0	1,0	1,0	5,0
130	3,9	1,375	1,0	5,0
160	4,8	1,75	1,0	5,0
190	5,7	2,125	1,0	5,0
220	6,6	2,5	1,0	5,0

A análise estatística foi feita pelo método dos mínimos quadrados ordinários, por meio da estimativa dos parâmetros coeficiente de determinação, coeficiente angular e coeficiente linear.

O efeito matriz foi avaliado por meio da comparação entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas com o ácido clorogênico em solvente e com a amostra fortificada (matriz), como preconiza a Resolução RE nº 166/2017 (ANVISA). O paralelismo das retas é indicativo de ausência de interferência dos constituintes da matriz (BRASIL, 2017).

Após análise da linearidade das curvas em solução e em matriz, aplicou-se o teste *F* (*Fischer-Snedecor*) para avaliação da homogeneidade das variâncias dos resíduos das duas curvas. De acordo com o resultado deste teste, aplicou-se o teste *t* de *Student* com variâncias distintas para comparação das inclinações, pois as variâncias das duas curvas foram heterogêneas.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DOS TEORES DE MARCADORES VEGETAIS NAS AMOSTRAS DE EXTRATOS SECOS DE *Echinacea purpurea*

Para a quantificação dos teores de marcadores vegetais nas amostras de extratos secos de *Echinacea purpurea*, foram analisadas as cinco amostras disponíveis: 1, 2, 4, 5, e 6, cada uma em triplicata.

Cada solução amostra foi preparada a 100% da concentração de trabalho, pesando-se 20 mg da amostra, transferindo-se quantitativamente para um balão volumétrico de 2 mL, completando-se o volume com solução aquosa de ácido fórmico 0,05% (v/v) e homogeneizando-se, de forma a obter concentração final dos extratos 10 mg/mL. Para quantificação, foi preparada solução padrão dos marcadores, nas concentrações 40 µg/mL para o ácido caftárico, 3 µg/mL para o ácido clorogênico, 12 µg/mL para o ácido chicórico.

As amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm, transferidas para vials e injetadas no cromatógrafo em triplicata. O teor de cada marcador em cada amostra de extrato seco foi expresso em % (m/m).

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1 Desenvolvimento de método analítico por CLUE-UV para quantificação de marcadores vegetais nos extratos secos de *Echinacea purpurea*

Foram realizadas diversas análises por CLUE-DAD buscando as melhores condições cromatográficas para que se pudesse alcançar uma boa separação dos picos dos analitos, tanto entre si, quanto ao restante dos componentes da matriz, para assim quantificar os ácidos caftárico, chicórico e clorogênico em todos os extratos.

A cromatografia é uma técnica analítica de separação de substâncias, que funciona por diversos meios, sendo um deles a partição, onde os analitos são separados de acordo com a sua capacidade de interagir com a fase móvel (FM) e a fase estacionária (FE). A FE utilizada é composta de uma base de sílica quimicamente ligada a um grupo octadecilsilano, conferindo à mesma caráter altamente hidrofóbico (SNYDER *et al.*, 1997). Desta forma, quanto mais polar a substância, mais rapidamente ela irá eluir, sendo identificada por exemplo, por um método espectrofotométrico de absorção no ultravioleta (UV) que, por sua vez, se baseia em transições eletrônicas após incidência de radiação específica.

Os testes para otimização do método foram realizados com a amostra 4, visto que, além de ser a que apresentou melhores resultados nos testes biológicos, ela se apresentava com melhor aspecto físico em relação às demais.

As condições utilizadas inicialmente foram baseadas nos métodos de quantificação determinados pelas farmacopeias americana e europeia. A técnica indicada por estas farmacopeias é a CLAE, mas optou-se por utilizar a CLUE devido suas vantagens em relação à CLAE e pela inovação da aplicação do método à análise de *Echinacea purpurea*. Apesar dos princípios das cromatografias e os mecanismos de separação permanecerem os mesmos, a CLUE possui velocidade e eficiência de análise superiores, apresentando maior sensibilidade e melhor resolução de picos (NOVÁKOVÁ *et al.* 2006a).

O tamanho de partículas da coluna usada em CLUE é menor do que as usadas em CLAE, conseqüentemente a pressão requerida para o equipamento é muito maior. De acordo com Miranda *et al.* (2015), é possível reduzir consideravelmente o uso de solventes na CLUE, em relação à CLAE, diminuindo os custos de análise e contribuindo com o meio ambiente.

Foram testados três ácidos, indicados na literatura, como componentes aquosos da FM. O ácido acético foi utilizado em solução aquosa a 5%, enquanto o trifluoroacético e o fórmico foram usados também em solução aquosa a 0,05%. Tais diluições garantiram que os valores de pH da solução aquosa estivessem dentro de uma faixa ótima de trabalho da coluna empregada. O detector DAD foi programado para fazer varredura em toda região do ultravioleta, compreendida na faixa de 200 a 400 nm.

Assim, as primeiras condições testadas foram:

- amostras de extratos secos nas concentrações de 0,5 a 10 mg/mL, diluída em água ultrapura;
- solução padrão das substâncias químicas de referência, com concentração de 4 µg/mL de ácido caftárico, 0,3 µg/mL de ácido clorogênico e 1,2 µg/mL de ácido chicórico, em água.
- fluxo: 0,2 mL/min;
- temperatura da coluna: 35 °C;
- volume de injeção: 5 µL;
- tempo de corrida: 20 minutos;
- eluição: gradiente linear exploratório variando de 5 a 95 % de acetonitrila e de 95 a 5 % das soluções aquosas acidificadas;
- comprimento de onda: 330 nm; varredura de 200 a 400 nm.

Ao se comparar os cromatogramas obtidos com os três ácidos, observou-se que aquele referente à fase móvel composta por acetonitrila e ácido fórmico apresentou melhor resolução e menor quantidade de picos interferentes.

Com objetivo de melhorar os parâmetros de separação, foram testados diferentes esquemas de eluição, dispostos na **Tabela 14**, até que se chegasse a um cromatograma com boa resolução.

Tabela 14 - Esquemas de eluição testados com objetivo de melhorar a resolução dos picos nos cromatogramas.

Esquema	Tempo (minutos)	Acetonitrila (%)	Ácido fórmico 0,05% (%)	Eluição
A	0-10	10 → 60	90 → 40	Gradiente linear
B	0-10	10 → 50	90 → 50	Gradiente linear
C	0-5	30	70	Isocrática
D	0-5	20	80	Isocrática
E	0-8	10	90	Isocrática

Como a faixa do gradiente necessária para a separação dos três picos foi relativamente estreita, condições com eluição isocrática também foram testadas. A primeira delas, o esquema C, foi determinado pelos valores médios das proporções utilizadas no esquema anterior, que mostraram bons resultados.

Com objetivo de aumentar o tempo de retenção dos analitos e conseqüentemente a separação cromatográfica, aumentou-se a proporção do componente aquoso na fase móvel, fazendo com que a interação entre fase estacionária (FE) e analitos aumentasse e, conseqüentemente, os tempos de retenção também.

As **Figuras 9, 10 e 11** mostram os cromatogramas das substâncias químicas de referência dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico, respectivamente, obtida com o esquema de eluição E (10% acetonitrila). A concentração da solução amostra precisou ser aumentada para 10 mg/mL, para que fosse possível obter o pico cromatográfico dos marcadores com intensidade adequada para detecção. A substituição de água por solução aquosa de ácido fórmico 0,05% (v/v) para o preparo da solução amostra foi necessária para garantir simetria dos picos dos marcadores. A **Figura 12** representa o cromatograma da amostra na concentração de 10,0 mg/mL, solubilizada em solução aquosa de ácido fórmico 0,05% (v/v), no mesmo esquema de eluição.

Figura 9 - Cromatograma do ácido caftárico, obtido pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD (pico 1 = ácido caftárico).

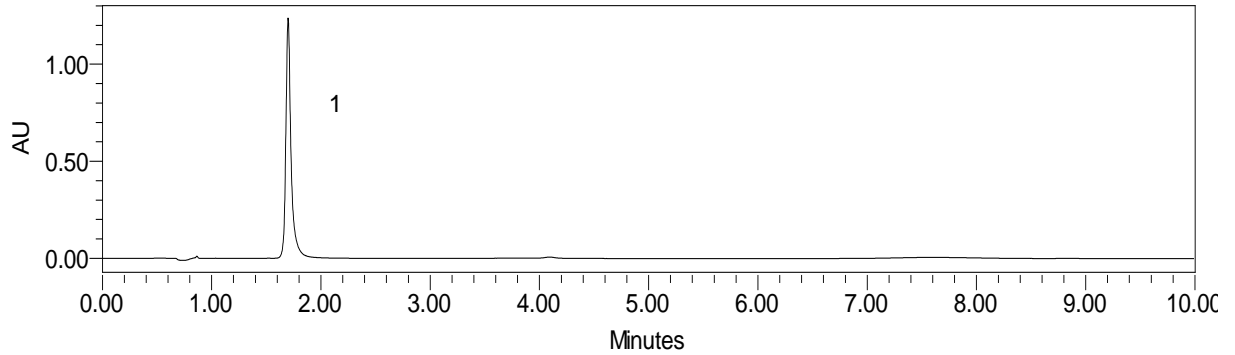


Figura 10 - Cromatograma do ácido clorogênico, obtido pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD (pico 2 = ácido clorogênico).

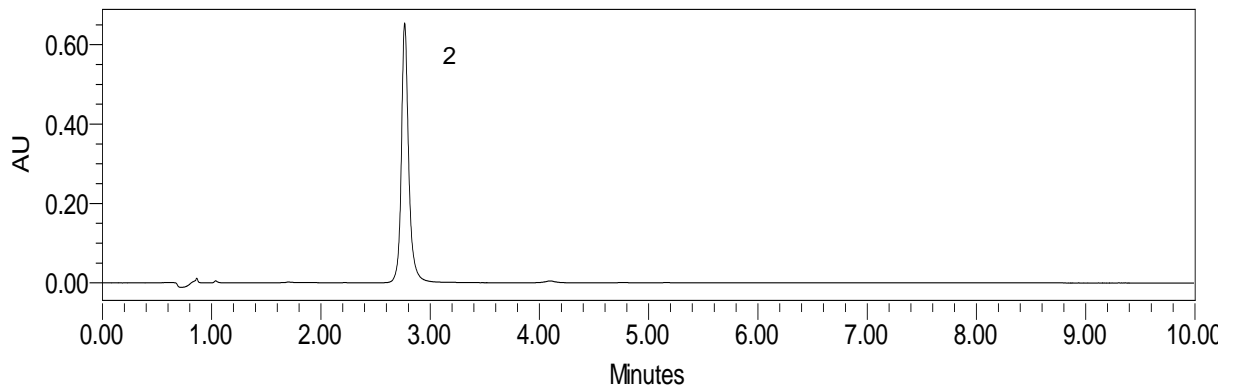


Figura 11 - Cromatograma do ácido chicórico, obtido pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD (pico 3 = ácido chicórico).

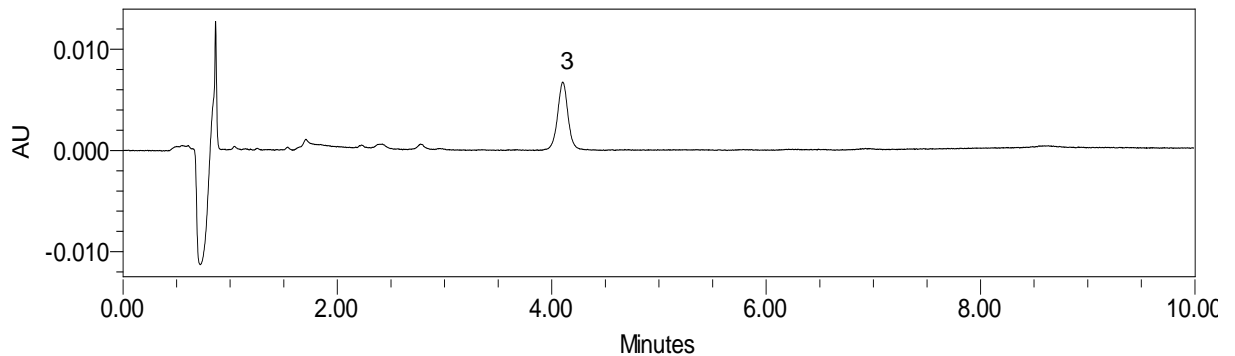
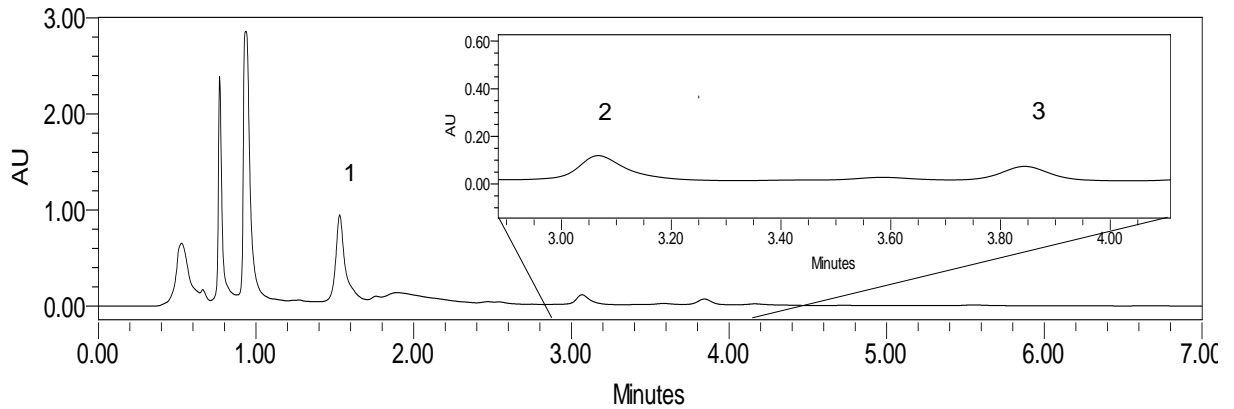


Figura 12 - Cromatograma obtido pela análise da amostra a 10 mg/mL em ácido fórmico 0,05% (pico 1 = ácido caftárico, pico 2 = ácido clorogênico e pico 3 = ácido chicórico).

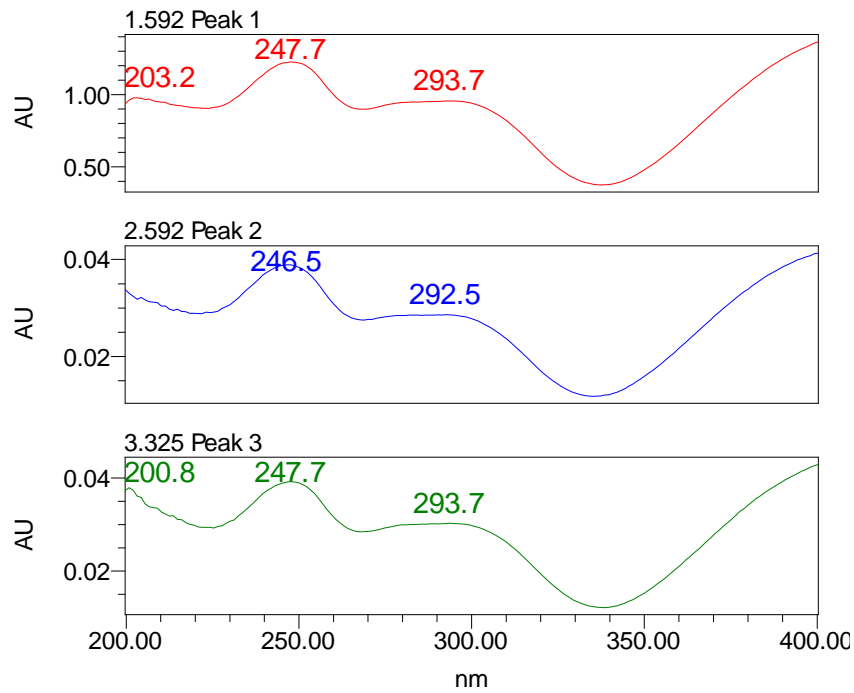


As soluções padrões dos marcadores e a solução do extrato seco foram submetidas à análise, para que pudesse ser feita a comparação dos tempos de retenção e dos espectros na região do ultravioleta dos picos, visando sua identificação.

Os ácidos caftárico e clorogênico foram detectados a 300 nm e o ácido chicórico foi detectado a 330 nm. No comprimento de onda 330 nm, o pico do ácido chicórico é mais intenso e simétrico, entretanto nesse mesmo comprimento de onda os picos de ácido caftárico e ácido clorogênico sofrem redução significativa da área.

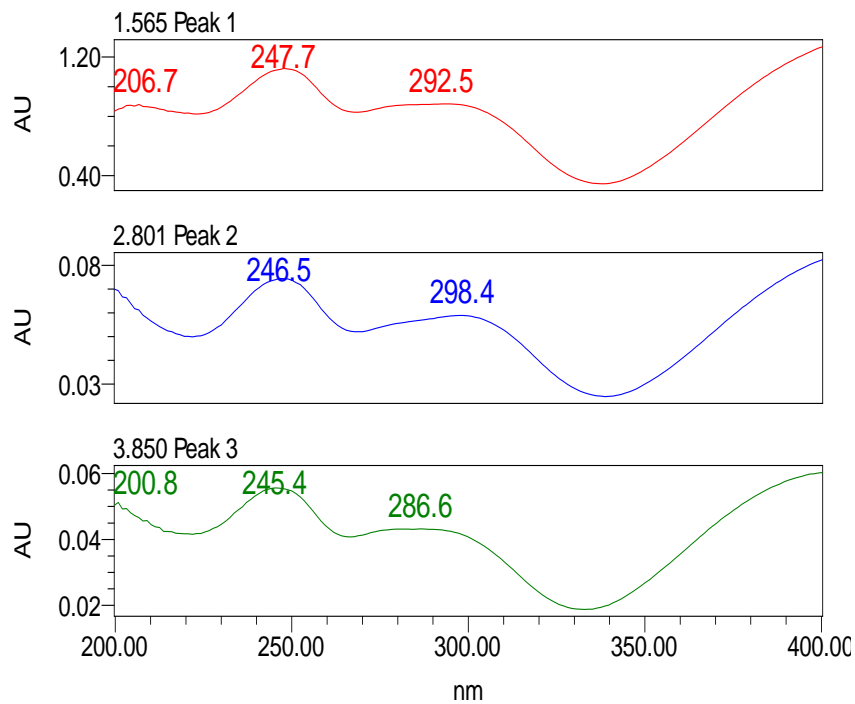
As **Figuras 13** e **14** a seguir representam os espectros de absorção no UV da solução padrão e das soluções amostras. Os espectros nas cores vermelha, azul e verde correspondem aos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico, respectivamente. Foi possível verificar similaridade nos comprimentos de onda de absorção máxima nos espectros e também nos tempos de retenção obtidos com as soluções padrão e amostra. Observou-se, ainda, que os espectros de absorção no ultravioleta dos três marcadores vegetais são parecidos, devido ao fato de todos serem derivados do ácido cafeico, com estruturas químicas afins.

Figura 13 - Espectros de absorção no UV dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico, obtidos pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD da solução padrão.



ácido caftárico = vermelho; ácido clorogênico = azul e ácido chicorico = verde.

Figura 14 - Espectros de absorção no UV dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico, obtidos pelo método analítico otimizado por CLUE-DAD, da amostra 4.



ácido caftárico = vermelho; ácido clorogênico = azul e ácido chicorico = verde.

Após todas as otimizações realizadas, as condições cromatográficas do método desenvolvido são apresentadas na **Tabela 15**.

Tabela 15 – Condições otimizadas do método de quantificação de ácidos caftárico, clorogênico e chicórico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Condições	Valores otimizados
Concentração das soluções aquosas de SQR	40 µg/mL de ácido caftárico 3 µg/mL de ácido clorogênico 12 µg/mL de ácido chicórico
Concentração da amostra em solução aquosa de ácido fórmico 0,05% (v/v)	10 mg/mL
Fluxo	0,2 mL/min
Temperatura da coluna	30 °C
Volume de injeção	10 µL
Tempo de corrida	6 min
Fase móvel	Solução aquosa de ácido fórmico 0,05% e ACN (90:10)
Tipo de eluição	isocrática
Detecção - comprimentos de onda	300 e 330 nm

Uma vez desenvolvido, o método por CLUE-DAD foi validado e aplicado a todas as amostras de extratos secos, com intuito de identificar e quantificar os marcadores vegetais presentes.

3.4.2 Validação de método analítico por CLUE-UV para quantificação de marcadores vegetais nos extratos secos de *Echinacea purpurea*

3.4.2.1 Linearidade

3.4.2.1.1 Ácido caftárico

Inicialmente, a faixa de concentrações analisada foi de 8,0 a 80,0 µg/mL (20 a 200% da concentração de trabalho). Entretanto, nessa faixa de concentrações o método apresentou desvio significativo de linearidade. Então, optou-se por reduzir a faixa de trabalho, excluindo-se a concentração menor e a concentração maior, a fim de ser possível aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). A curva

analítica obtida pelo método por CLUE-DAD indicou correlação linear adequada entre as concentrações de ácido caftárico e as áreas dos picos, na faixa de 20,0 a 68,0 µg/mL (50 a 170%), na curva analítica analisada com cinco níveis de concentração, igualmente espaçados. A faixa linear obtida ainda atende a faixa recomendada pela Resolução RE nº 166/2017 (ANVISA) para métodos de quantificação e se mostrou adequada para quantificação deste marcador nas amostras de extratos secos de EP. Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados nas **Tabelas 16 e 17**.

Tabela 16 – Concentrações e valores de área para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Ácido caftárico (µg/mL)	Nível de concentração	Área (mAu.s)
20	50%	1314113
		1325009
		1320818
32	80%	2155828
		2172057
		2172057
44	110%	3030751
		3038018
		3043657 *
56	140%	3863397
		3858827
		3870399
68	170%	4695456
		4702927
		4708926

* *Outlier*

Os dados foram avaliados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), para avaliar se atendiam às premissas da linearidade. Conforme **Tabela 16**, foi excluído um ponto considerado *outlier*. Os resíduos se mostraram normais, independentes e homocedásticos.

Tabela 17 – Resultados dos testes para avaliação das premissas da linearidade para construção da curva analítica do método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Parâmetro	Especificação	Resultado obtido	Conclusão
Teste de outliers pelo método Jacknife	$ J_{ei} > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Um ponto apresentou $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão do ponto considerados <i>outlier</i>
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9720$ $R_{crítico} = 0,9351$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u=1,3493$ $d_{cal}=1,4526$ $4-d_u=2,6507$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$t_L = 0,30$ $t_{crítico} = 2,18$	Há homocedasticidade entre os resíduos.

A partir dos resultados em relação às premissas da linearidade, foi possível obter a curva analítica, a equação da reta, o coeficiente de determinação (R^2) e o coeficiente de correlação (R). Os resultados são mostrados na **Tabela 18** e nas **Figuras 15 e 16**.

Tabela 18 – Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Parâmetro	Resultado
Coeficiente de determinação (R^2)	0,99994
Coeficiente de correlação (R)	0,99997
Intercepto \pm erro padrão	-86579,41 \pm 7455,49
Inclinação \pm erro padrão	70520,61 \pm 157,36

Figura 15 – Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUEDAD.

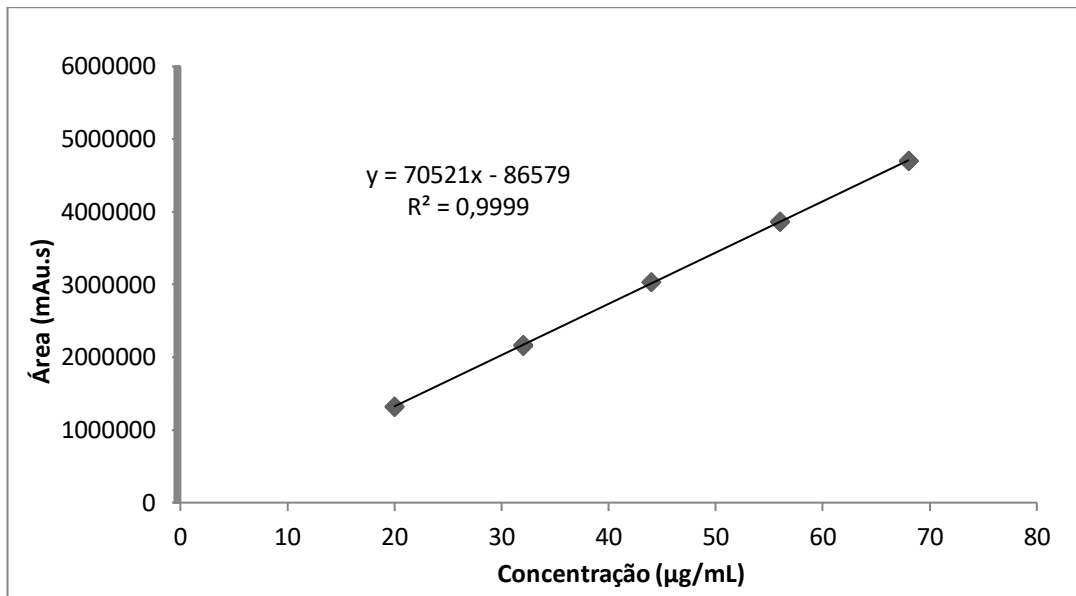
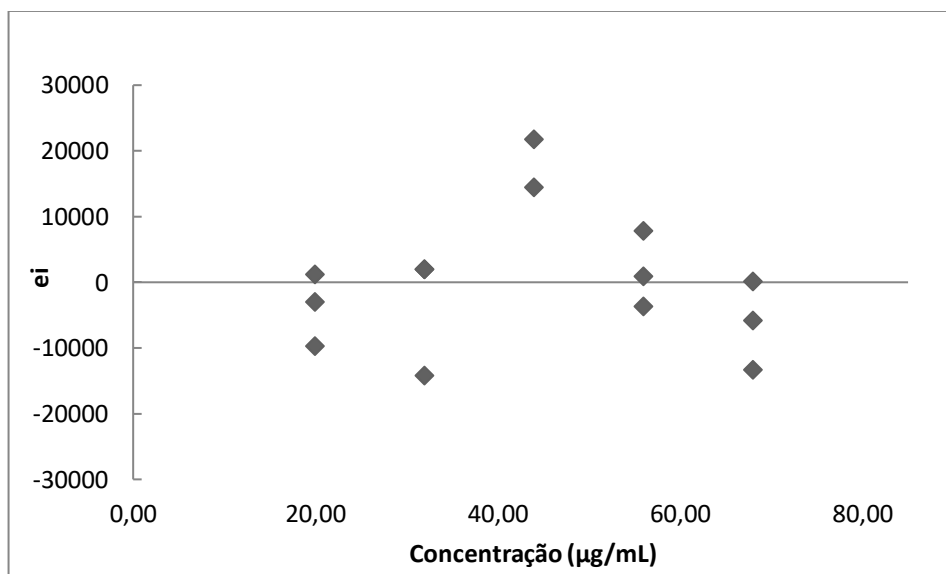


Figura 16 – Gráfico de distribuição de resíduos da regressão linear para o método de quantificação de ácido caftárico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUEDAD.



O coeficiente de determinação foi 0,99994 e o coeficiente de correlação 0,99997, apresentando-se, portanto, de acordo com a Resolução RE nº 166/2017 (ANVISA), que preconiza que o critério mínimo aceitável para um método ser considerado linear, é que a curva analítica apresente um coeficiente de correlação (R) maior ou igual a 0,990 (BRASIL, 2017).

A seguir, realizou-se o teste ANOVA para determinar a significância da regressão e verificar se há desvio de linearidade. Com os resultados obtidos, concluiu-se que a regressão é estatisticamente significativa a um nível de significância de 0,05 e que não há desvio de linearidade ($p > 0,05$), ou seja, o método demonstrou ser linear na faixa analisada (50 a 170% da concentração de trabalho).

O gráfico de distribuição de resíduos demonstra uma distribuição aleatória dos pontos e, portanto, ausência de qualquer tendência.

3.4.2.1.2 Ácido clorogênico

Inicialmente, a faixa de concentrações analisada foi de 0,6 a 6,0 µg/mL (20 a 200% da concentração de trabalho). Entretanto, nessa faixa de concentrações o método apresentou desvio significativo de linearidade. Então, optou-se por reduzir a faixa de trabalho, excluindo-se a concentração menor e a concentração maior, a fim de ser possível aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). A curva analítica obtida pelo método por CLUE-DAD indicou correlação linear adequada entre as concentrações de ácido clorogênico e as áreas dos picos, na faixa de 1,5 a 5,1 µg/mL (50 a 170%), na curva analítica analisada com cinco níveis de concentração, igualmente espaçados. A faixa linear obtida ainda atende a faixa recomendada pela Resolução RE nº 166/2017 (ANVISA) para métodos de quantificação e se mostrou adequada para quantificação deste marcador nas amostras de extratos secos de EP. Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados nas **Tabelas 19 e 20**.

Tabela 19 – Concentrações e valores de área para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Ácido clorogênico ($\mu\text{g/mL}$)	Nível de concentração	Área (mAu.s)
1,5	50%	61593
		62080
		62889
2,4	80%	104267
		107001
		105821
3,3	110%	150847
		151814
		155494
4,2	140%	201968
		202325
		201095
5,1	170%	252801
		251029
		248510

Avaliou-se os dados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), para avaliar se atendiam às premissas da linearidade. Conforme **Tabela 20**, os resíduos se mostraram normais, independentes e homocedásticos.

Tabela 20 – Resultados dos testes para avaliação de parâmetros necessários para utilização dos MMQO para para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Parâmetro	Especificação	Resultado obtido	Conclusão
Teste de outliers pelo método Jacknife	$ J_{ei} > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Nenhum ponto apresentou $J_{ei} > J_{crítico}$	Nenhum ponto excluído
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9920$ $R_{crítico} = 0,9383$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson	$d_u < d_{calculado} < 4-d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u = 1,3596$ $d_{cal} = 1,4732$ $4-d_u = 2,6404$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$t_L = 1,91$ $t_{crítico} = 2,16$	Há homocedasticidade entre os resíduos.

A partir dos resultados em relação às premissas da linearidade, foi possível obter a curva analítica, a equação da reta, o R^2 e o R, por meio da aplicação do método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). Os resultados são mostrados na **Tabela 21** e nas **Figuras 17 e 18**.

Tabela 21 – Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Parâmetro	Resultado
Coeficiente de determinação (R^2)	0,99901
Coeficiente de correlação (R)	0,99950
Intercepto \pm erro padrão	-18902,23 \pm 1627,80
Inclinação \pm erro padrão	52587,22 \pm 460,22

Figura 17 – Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

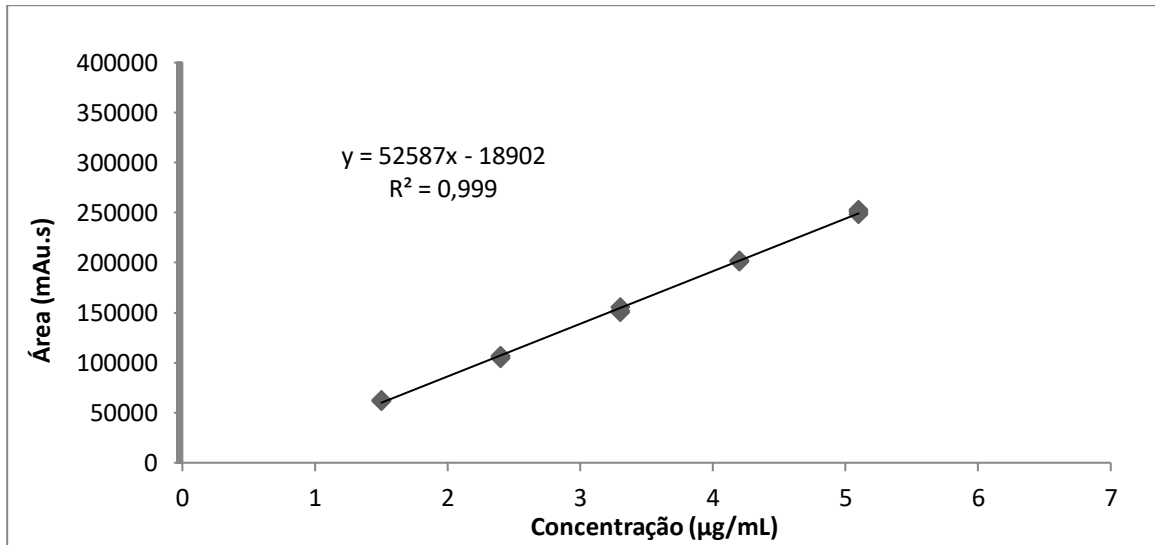
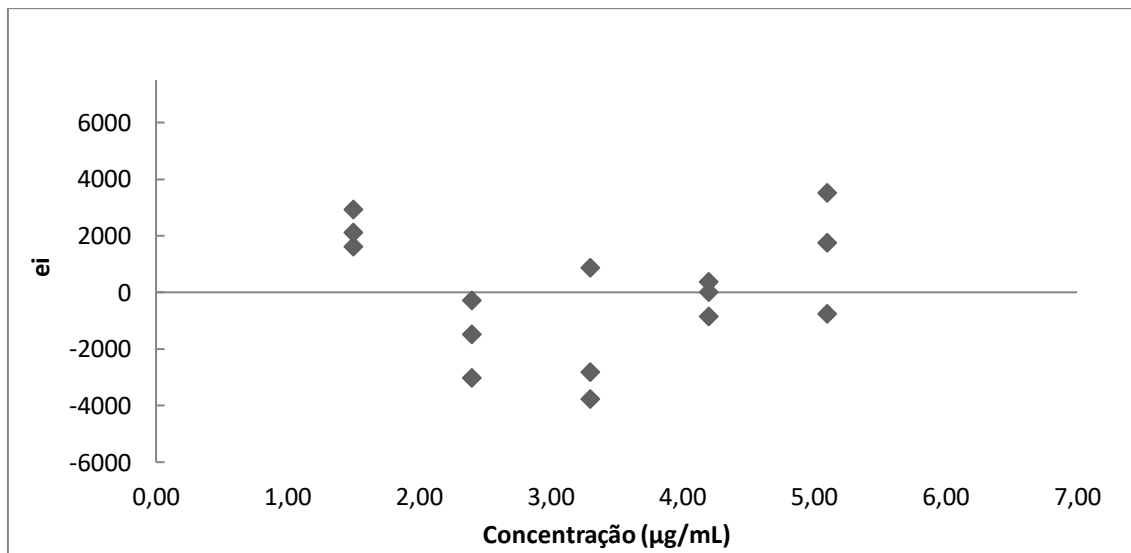


Figura 18 – Gráfico de distribuição de resíduos da regressão linear para o método de quantificação de ácido clorogênico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.



O coeficiente de determinação foi 0,99901 e o coeficiente de correlação 0,99950, apresentaram-se, portanto, de acordo com o preconizado pela Resolução RE nº 166/2017 (ANVISA), em que é preconizado que o critério mínimo aceitável para um método ser considerado linear, é que a curva analítica apresente um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,990 (BRASIL, 2017).

A seguir, realizou-se o teste ANOVA para determinar a significância da regressão e do desvio de linearidade. Com os resultados obtidos, conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa a um nível de significância de 0,05 e que não há desvio de linearidade ($p > 0,05$), ou seja, o método demonstrou ser linear na faixa analisada (50 a 170% da concentração de trabalho).

O gráfico de distribuição de resíduos demonstra uma distribuição aleatória dos pontos e, portanto, ausência de qualquer tendência.

3.4.2.1.3 Ácido chicórico

Inicialmente a faixa de concentrações analisada foi de 2,4 a 24,0 $\mu\text{g/mL}$ (20 a 200% da faixa de trabalho). Entretanto, nessa faixa de concentrações o método apresentou desvio significativo de linearidade. Então, optou-se por reduzir a faixa de trabalho, excluindo-se as duas maiores concentrações, a fim de ser possível aplicar o método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO). A curva analítica obtida pelo método por CLUE-DAD indicou correlação linear adequada entre as concentrações de ácido chicórico e as áreas dos picos, na faixa de 2,4 a 17,0 $\mu\text{g/mL}$ (20 a 140%), na curva analítica analisada com cinco níveis de concentração, igualmente espaçados. A faixa linear obtida ainda atende a faixa recomendada pela Resolução RE nº 166/2017 (ANVISA) para métodos de quantificação e se mostrou adequada para quantificação deste marcador nas amostras de extratos secos de EP. Os dados da análise de regressão linear estão demonstrados nas **Tabelas 22 e 23**.

Tabela 22 – Concentrações e valores de área para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Ácido chicórico (µg/mL)	Nível de concentração	Área (mAu.s)
2,4	20%	135465 *
		144936
		132051
6	50%	293483
		298008
		287956
9,6	80%	461277
		448871
		442452
13	110%	655048 *
		652705
		645803
17	140%	802572
		818487
		806239

* *Outlier*

Os dados foram avaliados pelo método dos mínimos quadrados ordinários (MMQO), para avaliar se atendiam às premissas da linearidade. Conforme **Tabela 23**, foram excluídos dois pontos considerado *outliers*. Os resíduos se mostraram normais, independentes e homocedásticos.

Tabela 23 – Resultados dos testes para avaliação de parâmetros necessários para utilização dos MMQO para para a construção da curva analítica do método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUEDAD.

Parâmetro	Especificação	Resultado obtido	Conclusão
Teste de outliers pelo método Jacknife	$ J_{ei} > J_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	Dois pontos apresentaram $J_{ei} > J_{crítico}$	Exclusão dos pontos considerados outliers
Avaliação da normalidade pelo teste de Ryan-Jones	$R_{eq} \geq R_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$R_{eq} = 0,9848$ $R_{crítico} = 0,9315$	Os resíduos seguem a distribuição normal
Avaliação da independência dos resíduos pelo teste de Durbin-Watson	$d_u < d_{calculado} < 4 - d_u$ para $\alpha=0,05$	$d_u = 1,3394$ $d_{cal} = 1,7911$ $4 - d_u = 2,6605$	Não há correlação entre os resíduos (os resíduos são independentes)
Avaliação da homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe ou Levene modificado	$t_L \leq t_{crítico}$ para $\alpha=0,05$	$t_L = 1,61$ $t_{crítico} = 2,20$	Há homocedasticidade entre os resíduos.

Diante dos resultados em relação às premissas, foi possível obter a curva analítica, a equação da reta, o coeficiente de determinação e o coeficiente de correlação, através da aplicação do MMQO. Os resultados são mostrados a seguir na **Tabela 24** e **Figuras 19** e **20**.

Tabela 24 – Resultados da análise de regressão linear para o método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUEDAD.

Parâmetro	Resultado
Coeficiente de determinação (R^2)	0,99640
Coeficiente de correlação (R)	0,99820
Intercepto \pm erro padrão	16523,31 \pm 9405,86
Inclinação \pm erro padrão	46812,1 \pm 847,57

Figura 19 – Representação gráfica da regressão linear para o método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUEDAD.

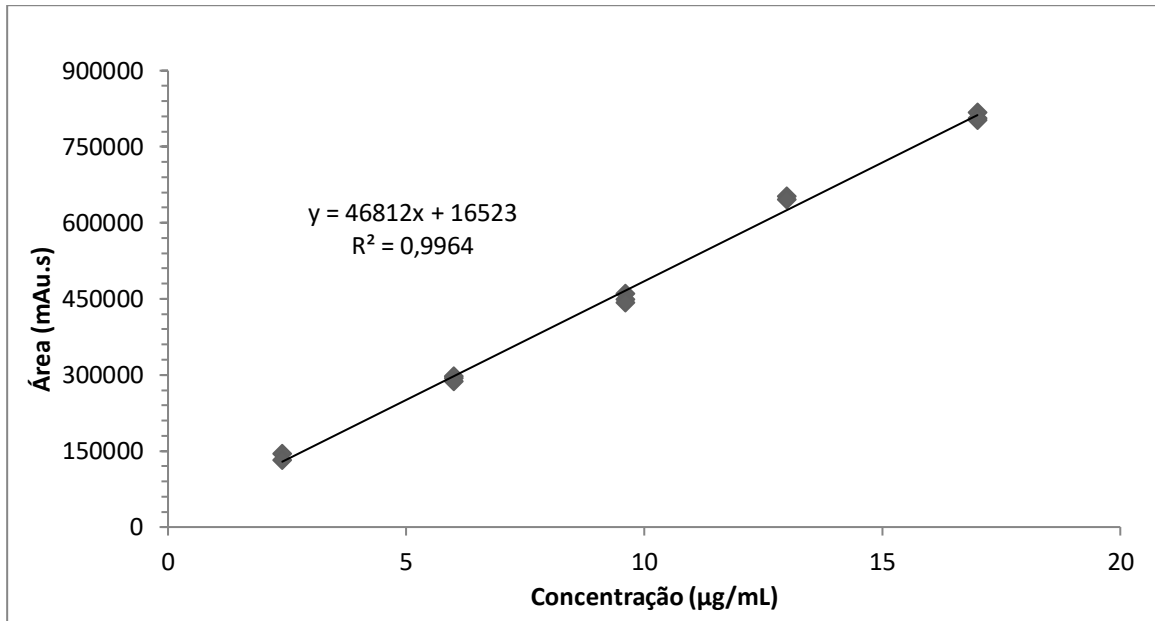
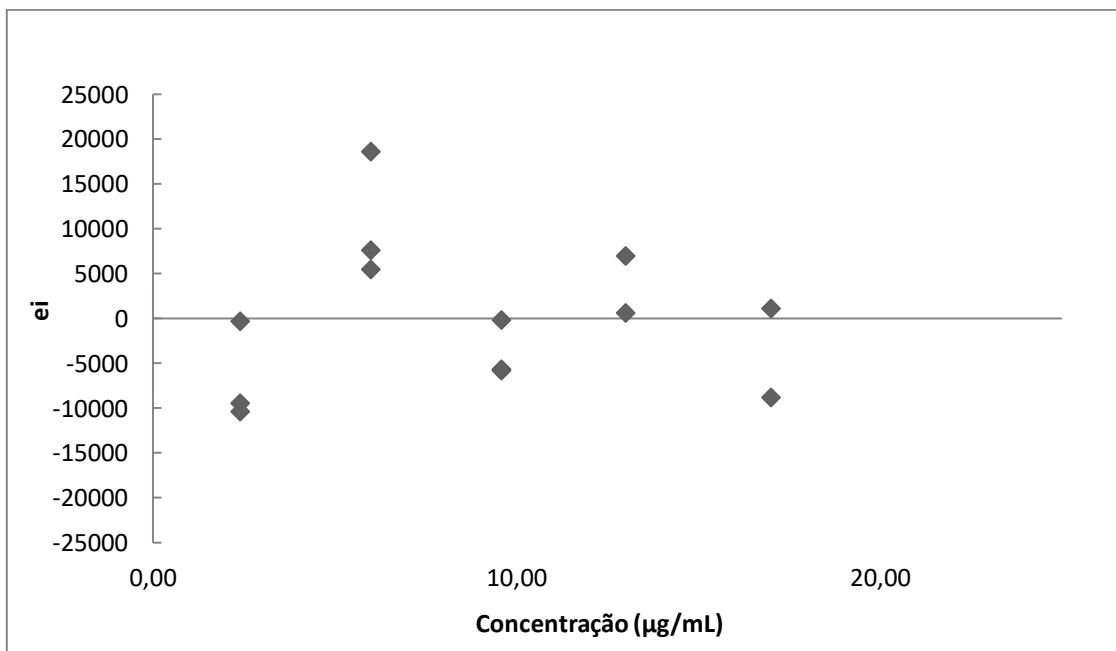


Figura 20 – Gráfico de distribuição de resíduos da regressão linear para o método de quantificação de ácido chicórico em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUEDAD.



O coeficiente de determinação foi 0,99640 e o coeficiente de correlação 0,99820. Apresentaram-se, portanto, de acordo com o preconizado pela Resolução RE nº 166/2017 (ANVISA), em que é preconizado que o critério mínimo aceitável para um método ser considerado linear, é que a curva analítica apresente um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,990 (BRASIL, 2017).

A seguir, realizou-se o teste ANOVA para determinar a significância da regressão e do desvio de linearidade. Com os resultados obtidos, conclui-se que a regressão é estatisticamente significativa a um nível de significância de 0,05 e que não há desvio de linearidade ($p > 0,05$), ou seja, o método demonstrou ser linear na faixa analisada (20 a 140% da concentração de trabalho).

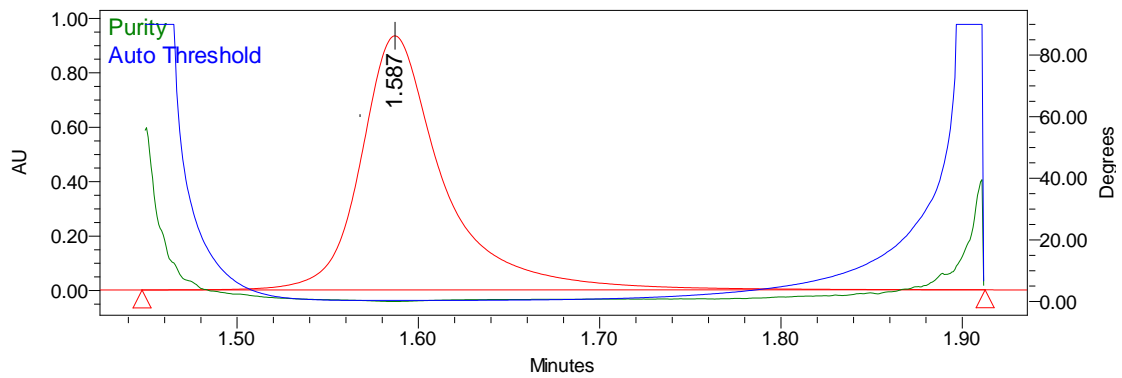
O gráfico de distribuição de resíduos demonstra uma distribuição aleatória dos pontos e, portanto, ausência de qualquer tendência.

O método desenvolvido se mostrou linear nas faixas utilizadas para análise de ácido caftárico, ácido chicórico e ácido clorogênico. Logo, pode-se concluir que dentro das faixas analisadas, as respostas analíticas foram diretamente proporcionais às concentrações de cada analito.

3.4.2.2 Seletividade

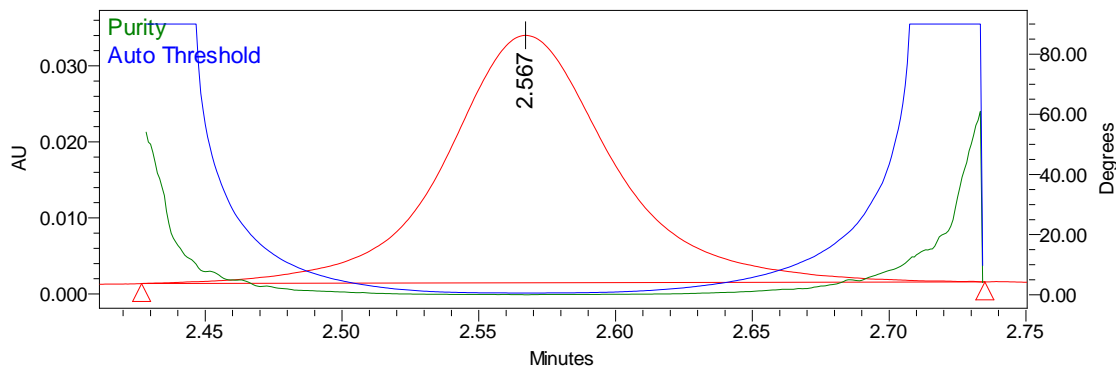
A análise da pureza espectral dos picos permitiu avaliar se algum interferente estava coeluinto com os analitos de interesse. Pela seletividade calculada pelo *Software Empower® PRO 2*, os picos dos três marcadores: ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico, apresentavam-se puros, como mostram os gráficos gerados pelo sistema, representados nas **Figuras 21, 22 e 23**.

Figura 21 – Gráfico para avaliação da pureza espectral do pico de ácido caftárico por CLUE-DAD.



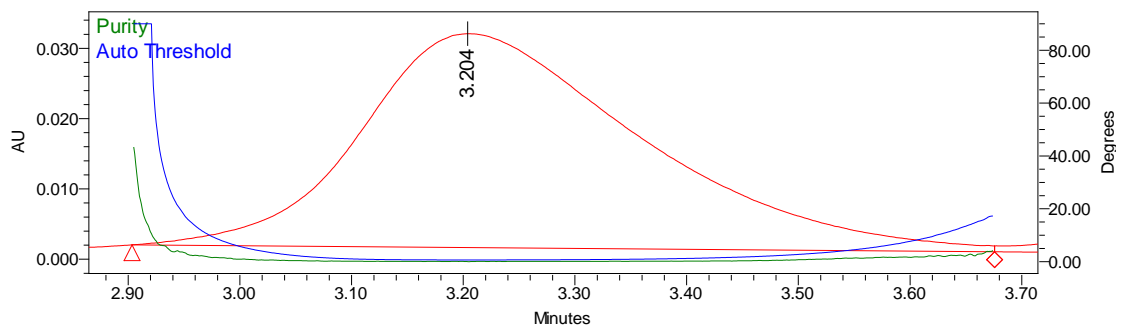
FONTE: gráfico gerado pelo Software Empower® PRO 2.

Figura 22 – Gráfico para avaliação da pureza espectral do pico de ácido clorogênico por CLUE-DAD.



FONTE: gráfico gerado pelo Software Empower® PRO 2.

Figura 23 – Gráfico para avaliação da pureza espectral do pico de ácido chicórico por CLUE-DAD.



FONTE: gráfico gerado pelo Software Empower® PRO 2.

Pode-se então concluir que tanto para as amostras, quanto para as substâncias químicas de referência, não houve coeluição dos analitos com outras substâncias, demonstrando assim, a seletividade do método.

3.4.2.3 Precisão

A precisão intracorrída e intercorrídas do método por CLUE-DAD foi avaliada por meio de seis determinações a 100% da concentração de trabalho para os três marcadores vegetais estudados (40,0 µg/mL para o ácido caftárico, 3,0 µg/mL para o ácido clorogênico e 12,0 µg/mL para o ácido chicórico). Os valores de DPR obtidos nas análises estão demonstrados na **Tabela 25**.

Tabela 25 – Resultados da avaliação da precisão para o método de quantificação de marcadores vegetais em extrato seco de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Dia	Amostra	Teor (%) Ácido Caftárico	Teor (%) Ácido Clorogênico	Teor (%) Ácido Chicórico
1º	1	0,4942	0,0301	0,1940
	2	0,5026	0,0299	0,1957
	3	0,5000	0,0294	0,1958
	4	0,5015	0,0306	0,1947
	5	0,5031	0,0295	0,1922
	6	0,4960	0,0289	0,1891
Média teores (n=6) (%)		0,4996	0,02973	0,1936
DPR intradia (%)		0,73	2,00	1,31
2º	7	0,4840	0,0292	0,1933
	8	0,4911	0,0269	0,1907
	9	0,4885	0,0274	0,1847
	10	0,4796	0,0297	0,1928
	11	0,4962	0,0302	0,1839
	12	0,4842	0,0292	0,1831
Média teores (n=12) (%)		0,4934	0,0293	0,1908
DPR interdía (%)		1,61	3,70	2,42

Segundo a Resolução RE nº 166/2017 (ANVISA), o valor máximo aceitável para os valores de DPR deve ser definido de acordo com a metodologia empregada, a concentração do analito na amostra, o tipo de matriz e a finalidade do método, não se admitindo valores superiores a 5% (BRASIL, 2017).

A publicação *Standard Method Performance Requirement*, da Association of Official Analytical Chemists (AOAC), preconiza que o DPR da precisão intradia seja até 3,7% (AOAC, 2011).

Os valores de DPR obtidos estão de acordo com os limites preconizados, portanto, o método de quantificação de marcadores vegetais em extratos secos de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD apresenta precisão intracorrida (repetibilidade) e precisão intercorridas (precisão intermediária) satisfatórias.

3.4.2.4 Exatidão

A exatidão foi avaliada pelo método de adição de padrão, em três níveis de concentração, cada um em triplicata. As porcentagens de recuperação média do método foram de 101,83% para o ácido caftárico, 100,65% para o ácido clorogênico e 104,74% para o ácido chicorico

De acordo com a Resolução RDC nº166/2017, os critérios de aceitação para percentuais de recuperação, assim como os critérios para precisão, devem ser definidos e justificados de acordo com os seguintes aspectos: objetivo do método, variabilidade intrínseca do método, concentração de trabalho e concentração do analito na amostra.

Segundo a publicação *Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals*, para que o método seja considerado exato, os valores para a recuperação média devem estar entre 90 e 108% (AOAC, 2002). Já a publicação *Standard Method Performance Requirement*, preconiza que a recuperação esteja entre 95 e 105% (AOAC, 2011), para concentração de trabalho do analito utilizada na presente análise.

Todos os valores de recuperação média encontraram-se dentro das faixas propostas pelos guias consultados, indicando dessa forma, que o método apresentou exatidão adequada para quantificação de ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico em extratos secos de *Echinacea Purpurea*.

3.4.2.5 Limites de detecção e quantificação

O valor encontrado para o desvio padrão da resposta da curva analítica para ácido caftárico foi de 7455,49. Aplicando-se as equações descritas no **item 3.2.2.6**, o limite de detecção encontrado foi de 0,3489 µg/mL e o limite de quantificação encontrado foi de 1,0572 µg/mL.

Para o ácido clorogênico, o desvio padrão da resposta da curva analítica foi de 1627,80. Aplicando-se as equações descritas no **item 3.2.2.6**, o limite de detecção encontrado foi de 0,1022 µg/mL e o limite de quantificação encontrado foi de 0,3095 µg/mL.

Finalmente, no caso do ácido chicórico, o desvio padrão da resposta da curva analítica foi de 9405,87. Aplicando-se as equações descritas no **item 3.2.2.6**, o limite de detecção encontrado foi de 0,6631 µg/mL e o limite de quantificação encontrado foi de 2,0093 µg/mL.

A partir dos valores encontrados, pode-se concluir que os limites encontrados são adequados para detectar e quantificar todos os marcadores vegetais nas concentrações utilizadas das amostras analisadas e padrões, demonstrando a sensibilidade adequada do método.

3.4.2.6 Robustez

Ao analisar robustez de um método analítico, avalia-se a sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações nos parâmetros analíticos. Ao serem constatadas variações do método nas condições analíticas desenvolvidas, deverá haver maior controle e cuidados devem ser incluídos no procedimento.

Os resultados de teor e DPR para os picos dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico, nas diferentes condições analisadas, estão representados na **Tabela 26**.

A análise de variância (ANOVA) e a comparação das médias utilizando o teste de *Tukey* demonstraram que não houve diferença estatisticamente significativa entre o

resultado obtido nas condições nominais descritas no **item 3.2.2.7** e os resultados obtidos em cada uma das condições avaliadas. Desta forma, o método se mostrou robusto em relação às variações analíticas induzidas, demonstrando sua confiabilidade durante análises rotineiras.

Tabela 26 – Resultados da avaliação da robustez para o método de quantificação de marcadores vegetais em extrato seco de *Echinacea purpurea* por CLUE-DAD.

Parâmetro	F calculado			F crítico
	Ácido Caftárico	Ácido Clorogênico	Ácido Chicórico	
Fluxo da FM (mL/min)	0,1460	0,1968	0,2376	3,4668
Temperatura da coluna (°C)	0,3461	0,1125	0,5463	3,4668
Proporção de ác. fórmico na FM (%)	0,2136	0,0321	0,5694	3,4668

3.4.2.7 Efeito Matriz

Foi feita uma nova curva analítica para avaliação do efeito matriz. O teste *F* indicou que as variâncias das curvas de ácido clorogênico em solvente e em matriz foram heterogêneas, logo, utilizou-se o teste *t* de *Student* com variâncias distintas.

O teste *t* de *Student* indicou valor de $t_{calculado}$ inferior ao valor de $t_{crítico}$, demonstrando que a matriz vegetal não afetou a inclinação da curva de ácido clorogênico. Os resultados dos testes *F* e *t* para as curvas construídas, considerando a área sob os picos, estão descritos na **Tabela 27**.

Tabela 27 – Resultados dos testes *F* e *t*, considerando a área sob os picos de ácido clorogênico.

Parâmetro	Resultado	Conclusão
$F_{crítico}$	2,5769	Há heterocedasticidade
$F_{calculado}$	26,7117	
$t_{crítico}$	2,1604	As inclinações não diferem entre si
$t_{calculado}$	1,0227	

A partir dos resultados analisados, pode-se concluir que não há nenhum constituinte na matriz vegetal que cause alteração na detecção ou quantificação do ácido clorogênico, portanto pode-se preparar a solução padrão em água para quantificar o marcador que originalmente se encontra no extrato, como foi feito para o ácido clorogênico. Ou seja, o efeito matriz dos extratos secos de EP não é significativo no método de quantificação desenvolvido.

3.4.3 Quantificação dos teores de marcadores vegetais nas amostras de extratos secos de *Echinacea purpurea*

Após o desenvolvimento e a validação do método analítico para quantificação dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico em extratos secos de *Echinacea purpurea*, por CLUE-DAD, procedeu-se com a quantificação desses marcadores nas amostras coletadas em farmácias magistrais.

As análises foram feitas em triplicata e os teores dos marcadores vegetais foram expressos em % m/m, em relação à massa do extrato seco analisado. Os teores dos ácidos obtidos em cada amostra estão descritos na **Tabela 28**.

Tabela 28 – Resultados de quantificação de marcadores vegetais em extratos secos de *Echinacea purpurea*, por CLUE-DAD (n = 3).

Amostra	Teor %			
	Ácido Caftárico	Ácido Clorogênico	Ácido Chicórico	Soma
1	0,1103	0,0527	0,0402	0,2032
2	0,1104	0,0843	0,0402	0,2349
4	0,5071	0,0250	0,1791	0,7112
5	0,1129	0,0240	0,0434	0,1803
6	0,1137	0,0129	0,1294	0,2560

Todas as amostras apresentaram valores próximos entre si de teores dos marcadores vegetais analisados, exceto pela amostra 4, que demonstrou teores mais elevados dos ácidos caftárico e chicórico. Já o ácido clorogênico teve o maior teor encontrado na amostra 2, mas não muito discrepante dos demais.

Um ponto relevante a ser discutido é que a amostra 4, segundo o laudo obtido do fornecedor (**ANEXO B**), foi a única que apresentou em sua composição apenas a raiz da planta. As outras amostras possuíam somente partes aéreas ou partes aéreas misturadas a caule e raiz para obtenção do extrato. Então, pode ser que a raiz da planta seja mais indicada para a obtenção de extratos com maior

concentração dos princípios ativos, e, conseqüentemente, melhores resultados terapêuticos.

Segundo TSAI *et al.* (2012), os fenóis totais e derivados do ácido cafeico estão presentes em maior teor nas raízes, seguido do caule e folhas e em menor teor nas flores. Assim como THOMSEN *et al.* (2012) também afirmam que as raízes de *Echinacea purpurea* e *Echinacea pallida* são as partes das plantas que contém o maior teor de substâncias responsáveis pelos efeitos biológicos atribuídos à espécie.

Nos testes biológicos realizados, a amostra 4 foi a única que apresentou atividade antimicrobiana direta contra *C. gatti*. Isso pode ter ocorrido devido às concentrações mais elevadas das substâncias consideradas ativas na planta. Já a amostra 5 foi aquela que mais estimulou a fagocitose em macrófagos e a taxa de proliferação intracelular, na dose de 100 µg/mL, confirmando a atividade imunomoduladora da planta, apesar da amostra 4 ter apresentado maiores teores dos marcadores vegetais.

Os laudos dos fornecedores das amostras 1, 4 e 5 indicam a presença de 1,62, 4,00 e 1,00% de polifenóis totais na composição do extrato, respectivamente. No laudo da amostra 2, não há indicação específica do teor de polifenóis. A amostra 3 não possuía laudo de fornecedor, e por razões já mencionadas não foi analisada. Também não foi possível ter acesso ao laudo do fornecedor da amostra 6.

De acordo com os laudos, a amostra 4 apresentou maior teor de polifenóis totais, resultado condizente com os teores dos marcadores vegetais determinados no presente trabalho. Entretanto, para os outros extratos, não foi observada concordância elevada entre os teores dos marcadores determinados e os valores apresentados pelos laudos dos fornecedores.

Os fabricantes nacionais do medicamento fitoterápico a base de *Echinacea purpurea* recomendam a utilização diária de 2 a 3 cápsulas com dose diária total de até 600 mg de extrato seco (IMUNAX, 2009). Analisando os resultados obtidos neste estudo, na amostra 4, que apresentou maiores teores dos marcadores, 600 mg do extrato seco equivalem, proporcionalmente, a 3,0 mg de ácido caftárico, 0,15 mg de ácido clorogênico e 1,07 mg de ácido chicórico, totalizando uma soma de 4,22 mg

dos marcadores ativos. Sendo assim, as demais amostras apresentariam níveis ainda menores dos princípios ativos. Tais teores são muito inferiores à dose diária preconizada na Instrução Normativa de nº 2, de 13 de maio de 2014 da ANVISA (13 a 36 mg diários da soma dos ácidos caftárico e chicórico) para uso terapêutico (BRASIL, 2014). Para atender à recomendação de dose diária dos marcadores descrita na Instrução Normativa da ANVISA, seria necessário o paciente ingerir de 1848 a 5118 mg do extrato seco por dia, no caso da amostra 4, a mais concentrada.

A Farmacopeia Europeia 9ª edição preconiza que as partes aéreas pulverizadas de *Echinacea purpurea* contenham, no mínimo, 0,1% da soma de ácido caftárico e ácido chicórico. Para a raiz pulverizada, a especificação é de no mínimo, 0,5% da soma dessas substâncias (EUROPEAN PHARMACOPEIA, 2016). No presente trabalho, foram utilizados os extratos secos e não com a planta seca e pulverizada, como descrito nas monografias da Farmacopeia Europeia. Entretanto, os valores de teor obtidos nas análises cromatográficas realizadas estão de acordo com o que é estipulado pela Farmacopeia Europeia. A Farmacopeia Britânica 2016 apresenta as mesmas especificações descritas na Farmacopeia Europeia.

Já a Farmacopeia Americana 38ª edição apresenta a especificação de 0,5% da soma de fenois totais (ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico) para a raiz pulverizada da planta. Para as partes aéreas pulverizadas, a especificação é de no mínimo 1,0% da soma de ácidos caftárico e chicórico, não incluindo, portanto, o ácido clorogênico. Além disso, preconiza que o extrato seco da planta, obtido de partes aéreas, de raiz ou de ambas misturadas, tenha pelo menos 4,0% da soma de fenois totais (THE UNITED STATES PHARMACOPEIA, 2014). Ou seja, no extrato seco espera-se obter um teor mais elevado dos marcadores, uma vez que um dos objetivos do processo de extração seria justamente concentrar essas substâncias ativas. Apesar do grupo fenois totais envolver outros compostos além daqueles quantificados no presente trabalho, observou-se que os teores dos marcadores nos extratos secos analisados foram inferiores à especificação da Farmacopeia Americana 38ª edição para o extrato da planta.

Como pode ser observado na **Tabela 29**, em quantificações já realizadas e descritas na literatura foram encontrados teores muito variados dos ácidos caftárico, clorogênico e chicórico em produtos a base de EP. Isso pode ocorrer por inúmeros

fatores, como já mencionado, como as condições em que foram realizadas as extrações, temperatura e tempo de armazenamento, parte da planta utilizada para a extração, método adotado para análise ou até mesmo pelas condições de plantio e cultivo da *Echinacea purpurea*.

Tabela 29 – Comparação dos resultados de quantificação de marcadores vegetais em extratos secos de *Echinacea purpurea*.

Referência	Parte da Planta Avaliada	Concentração de Ácido Caftárico encontrada	Concentração de Ácido Clorogênico encontrada	Concentração de Ácido Chicórico encontrada
Qu <i>et al.</i> , 2005	Raíz - extrato etanólico	não avaliado	não avaliado	8,95 ± 6,46 mg/g
Tsai <i>et al.</i> , 2012	Flores - extrato etanólico	16,56 a 67,74 mg/g	0,14 a 2,94 mg/g	37,23 a 182,05 mg/g
Thomsen <i>et al.</i> , 2012	Raíz - extrato etanólico	0,15 ± 0,06 mg/g	0,06 ± 0,05 mg/g	2,87 ± 0,96 mg/g
Konar <i>et al.</i> , 2014	Flores - extrato metanólico	0,26 a 0,30 mg/g	inferior a 0,001 mg/g	0,09 a 0,13 mg/g
Cech <i>et al.</i> , 2006	Raíz - extrato hidroetanólico	0,35 mg/g	não detectado nas condições de análise	0,36 mg/g
Presente estudo	Flores e raíz – extrato seco	1,11 a 5,07 mg/g	0,13 a 0,84 mg/g	0,40 a 1,79 mg/g

Apesar de já existirem métodos para identificação e quantificação dos componentes da *Echinacea purpurea*, todos os métodos descritos na literatura e nas farmacopeias empregam CLAE. O método desenvolvido no presente trabalho é inovador dentro da área de análises de fitoterápicos, uma vez que utiliza a CLUE como sistema de análise, trazendo as vantagens que esse tipo de cromatografia proporciona: as análises são mais rápidas e eficientes que as descritas por CLAE, reduzindo-se, portanto os gastos de solvente, com maior resolução e capacidade de detecção.

Rattanadechsakul e colaboradores (2007) recomendam que as amostras e extratos de *Echinacea purpurea* permaneçam o tempo todo em geladeira para evitar a degradação dos marcadores ativos. Visto que os fornecedores das amostras não fazem nenhuma recomendação específica quanto a isso, e que os extratos são armazenados, expostos e comercializados pelas farmácias magistrais em temperatura ambiente, optou-se por manter as amostras coletadas também em temperatura ambiente, para que a análise fosse mais realista e condizente com o produto que chega ao consumidor final.

Uma vez que os teores encontrados dos marcadores vegetais variam de uma amostra para outra, se o paciente adquire o medicamento de uma farmácia magistral diferente durante o período de uso, este fato poderá interferir na eficácia e continuidade dos tratamentos com o fitoterápico. Portanto, pode-se perceber a grande necessidade de maior padronização dos teores individuais dos marcadores e de um controle de qualidade efetivo dos produtos a base de *Echinacea purpurea* presentes no mercado

4 CONCLUSÕES

Apesar da *Echinacea purpurea* ser indicada para tratamento de diferentes tipos de infecções, nos testes para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos secos de EP não foi verificada atividade significativa contra bactérias, sendo observada apenas pequena atividade antifúngica. Entretanto, os testes para avaliação da atividade imunológica dos extratos da planta foram satisfatórios, demonstrando um efeito positivo dos extratos em relação à modulação da atividade imunológica celular. O conjunto de resultados demonstra que os extratos podem atuar por um mecanismo indireto, via ativação do sistema imunológico, para combater ou prevenir infecções por microrganismos.

O método analítico desenvolvido e validado se mostrou eficaz na análise das amostras que, em sua totalidade, possuíam todos os marcadores. Desta forma, pode-se inferir que as amostras realmente se tratavam de partes aéreas e/ou raízes de *Echinacea purpurea*. Foi possível também quantificar ácido caftárico, ácido clorogênico e ácido chicórico nos extratos da planta. Entretanto, os teores de todas as amostras foram inferiores às doses terapêuticas preconizadas pela agência regulatória responsável no Brasil, sendo necessária a administração de uma quantidade muito grande de extrato para atender à dose recomendada para efeitos terapêuticos. Portanto, os produtos analisados não atendem à especificação recomendada pela agência regulatória.

Por fim, esse estudo contribuiu para aumentar as informações disponíveis sobre *Echinacea purpurea*, que são relativamente escassas, disponibilizando um novo método por CLUE-DAD para quantificação de componentes dessa planta, com maior rapidez e eficiência.

REFERÊNCIAS

ADOLPHO, L. O. Derivados dos ácidos clorogênico, cafeico e cinâmico: obtenção, avaliação da atividade antimicrobiana e de inibição enzimática. 2012. Tese (Mestrado em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

AGUIRRE, J.; HANSBERG, W.; NAVARRO, R. Fungal responses to reactive oxygen species. **Medical Mycology**, v. 44, p. 101-107, 2006.

AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. **AOAC INTERNATIONAL**. Gaithersburg, 2002.

AOAC Standard Method Performance Requirement (SMPR) Documents. **AOAC INTERNATIONAL**. Gaithersburg, 2011.

ARDJOMAND-WOELKART, K.; BAUER, R. Review and Assessment of Medicinal Safety Data of Orally Used *Echinacea* Preparations. **Planta Medica**, v. 82, p. 17-31, 2016.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; GIBBONS, S.; PHILIPSON, J. D. *Echinacea* species (*Echinacea angustifolia* (DC.) Hell., *Echinacea pallida* (Nutt.) Nutt., *Echinacea purpurea* (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.57, p. 929-954, 2005.

BARROS, M. E. S.; SANTOS, D. A.; HAMDAN, J. S. Evaluation of susceptibility of Trichophyton mentagrophytes and Trichophyton rubrum clinical isolates to antifungal drugs using a modified CLSI microdilution method (M38-A). **Journal of Medical Microbiology**, v. 56. P. 514-518, 2007.

BENSON, J. M.; POKORNY, A. J.; RHULE, A.; WENNER, C. A.; KANDHI, V.; CECH, N. B.; SHEPHERD, D. M. Echinacea purpurea extracts modulate murine dendritic cell fate and function. **Food and Chemical Toxicology**. v. 48. p.1170–1177. 2010.

BIRT, F. D.; WIDRLECHNER, M. P.; LALONE C. A.; L.; BAE, J.; SOLCO, KS. A.; KRAUS, G. A.; MURPHY, P. A.; WURTELE, E. S.; LENG, Q.; HEBERT, S. C.; MAURY, W. J.; PRICE, J. P. *Echinacea* in infection. **American Journal of Clinical Nutrition**. v. 87, n. 2. p. 488–492. 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 05 de 11 de dezembro de 2008. Determina A Publicação Da "Lista De Medicamentos Fitoterápicos De Registro Simplificado". **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 02 de 13 de maio de 2014. Publica a Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado e Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2017.

BRITISH Pharmacopoeia. London: Her majesty's Stationary Office, 2016.

BROWN, P.; CHAN, M.; PALEY, L.; BETZ, J. M. Determination of Major Phenolic Compounds in *Echinacea* spp. Raw Materials and Finished Products by High-Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection: Single- Laboratory Validation Matrix Extension. **Journal AOAC International**. v. 94, n.5. p.1400–1410. 2011.

CECH, N. B.; ELEAZER M. S.; SHOFFNER, L. T.; CROSSWHITE, M. R.; DAVIS, A. C.; MORTENSON, A. M. High performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for simultaneous analysis of alkamides and caffeic acid derivatives from *Echinacea purpurea* extracts. New trace constituents of kava resin. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 219-228, 2006.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard, 2^a ed. CLSI document M27–A2. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA: 2008a.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 3^a ed CLSI document M38-A2. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA: 2008b.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for **Bacteria** That Grow Aerobically, approved standard, 9^a ed CLSI document M07-A9. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA, 2012.

EUROPEAN Pharmacopoeia. 9. ed. Strasbourg: Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (EDQM), 2016.

FARMACOPEIA Brasileira, 5. ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2010.

FONSECA, F. N.; PAPANICOLAOU, G.; HONG LIN, H.; LAU, C. B. S.; KENNELLY, E. J.; CASSILETH, B. R.; CUNNINGHAM-RUNDLES, S. *Echinacea purpurea* (L.) Moench modulates human T-cell cytokine response. **International Immunopharmacology**. v.19. p. 94–102. 2014.

GUILLARME, D; NGUYEN, D. T.; RUDAZ, S.; VEUTHEY, J. L. Method transfer for fast liquid chromatography in pharmaceutical analysis: Application to short columns packed with small particle. Part I: Isocratic separation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, p. 475–482, 2006.

HARON, M.H.; TYLER, H.L.; PUGH, N.D.; MORAES, R.M.; MADDUX, V. L.; JACKSON, C.R.; PASCO, D.S. Activities And Prevalence Of Proteobacteria Members Colonizing *Echinacea purpurea* Fully Account for Macrophage Activation Exhibited by Extracts of this Botanical. **Planta Medica**. v. 82, n. 14. p. 258–1265. 2016.

HARRIS, N. D.; GREENE, R. J. **Patologia e terapêuticas para farmacêuticos: Bases para a prática da farmácia clínica**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

HUDSON, J. B. Applications of the Phytomedicine *Echinacea purpurea* (Purple Coneflower) in Infectious Diseases. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p. 1-16, 2012.

IMUNAX Extrato seco de *Echinacea purpurea*. Campinas: **Ativus Farmacêutica LTDA**, 2009. Bula de medicamento.

KONG, J.; LUO, J.; LI, B.; YINGDONG, B.; H. HONG.; WANG, K. CHEN, Y.Q. In vitro activity of chlorogenic acid against *Aspergillus fumigatus* biofilm and gliotoxin production. **Experimental and therapeutic medicine**. v. 13, p. 2637-2644, 2017.

KONAR, N.; DALABASMAZ, S.; POYRAZOGLU, E. S.; ARTIK, N.; COLAK, A. The determination of the caffeic acid derivatives of *Echinacea purpurea* aerial parts under various extraction conditions by supercritical fluid extraction (SFE). **Journal of Supercritical Fluids**. v. 89. p. 128-136. 2014.

MANAYI, A.; VAZIRIAN, M.; SAEIDNIA, S. *Echinacea purpurea*: Pharmacology, phytochemistry and analysis methods. **Farmacognosy reviews**, v. 9, n. 17, p. 63-72, 2015.

MEMENTO FITOTERÁPICO da Farmacopeia Brasileira, 1. ed., Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2016.

MIRANDA, T. A.; SILVA, P.H.R.; PIANETTI, G.A.; CÉSAR, I.C. Simultaneous quantitation of chloroquine and primaquine by UPLC-DAD and comparison with a HPLC-DAD method. **Malaria Journal**. v. 14, p. 29-35, 2015.

MOLGAARD, P.; JOHNSEN, S. CHRISTENSEN, P.; CORNETT, C. HPLC method validated for the simultaneous analysis of cichoric acid and alkamides in *Echinacea purpurea* plants and products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 6922-6933, 2003.

NOVÁKOVÁ, L.; MATYSOVA, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 68, p. 908-918, 2006(a).

NOVÁKOVÁ, L.; SOLICHOVÁ, L.; SOLICH, P. Advantages of ultra performance liquid chromatography over high-performance liquid chromatography: comparison of different analytical approaches during analysis of diclofenac gel. **Journal of Separation Science**. v. 29, p. 2433-2443, 2006(b).

QU, L.; YING CHEN, Y.; WANG, X.; SCALZO, R.; DAVIS, J. M. Patterns of Variation in Alkamides and Cichoric Acid in Roots and Aboveground Parts of *Echinacea purpurea* (L.) Moench. **HortScience**. v. 40, n. 5, p.1239–1242, 2005.

RATTANADECHSAKUL, P.;RATTANADECHSAKUL, J.; OKONOJI, S.; SIRITHUNYALUG, J.; YOTSAWIMONWAT, S. Stability of Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of *Echinacea purpurea* Extract. **XVth International Workshop on Bioencapsulation**. Vienna, 2007.

REX, J. H. *et al.* Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard-second edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. v. 28, n. 16, p. 1-35, 2008(a).

REX, J. H. *et al.* Reference method for Broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**. v. 28, n. 14, p. 1-25, 2008(b).

SANDASI, M.; VERMAAK, I.; CHEN, W.; VILJOEN, A. M. Hyperspectral Imaging and Chemometric Modeling of *Echinacea* — A Novel Approach in the Quality Control of Herbal Medicines. **Molecules**. v. 19, p. 13104-13121, 2014.

SHARMA, S. M.; ANDERSON, M.; SCHOOP, S. R.; HUDSON, J. B. Bactericidal and anti-inflammatory properties of a standardized *Echinacea* extract (Echinaforce): Dual actions against respiratory bacteria. **Phytomedicine**, v. 17, p. 563-568, 2010.

SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J.L. Practical HPLC method development. 2. ed, New York: John Wiley Interscience. p.765, 1997.

SOUZA, S. V. C.; JUNQUEIRA, R. G. A procedure to assess linearity by ordinary least squares method. **Analytica Chimica Acta**. v. 552, p. 25-35, 2005.

SOUZA, S. V. C. Procedimento para validação intralaboratorial de métodos de ensaio: delineamento e aplicabilidade em análise de alimentos. 2007. 297f. Tese de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte – MG, 2007.

STANISAVLJEVI, I.; STOJI EVI, S. Š.; KOVI, D. V.; VELJKOVI, V.; LAZI, M. Antioxidant and Antimicrobial Activities of Echinacea (*Echinacea purpurea* L.) Extracts Obtained by Classical and Ultrasound Extraction. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. v. 17, n. 3, p. 478-48, 2009.

THE UNITED States Pharmacopeia. USP 38. 38. ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2014.

THOMSEN, M. O. ; FRETTÉ, X.C.; CHRISTENSEN, K.B.; CHRISTENSEN, L. P.; GREVSEN, K. Seasonal Variations in the Concentrations of Lipophilic Compounds and Phenolic Acids in the Roots of *Echinacea purpurea* and *Echinacea pallida*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 60, p. 12131-12141, 2012.

TSAI, Y.; CHIOU, S.Y.; CHAN, K.C.; SUNG, J. M.; LIN, S.D. Caffeic acid derivatives, total phenols, antioxidant and antimutagenic activities of *Echinacea purpurea* flower extracts. **Food Science and Technology**. v. 46, p. 169-176, 2012.

Ultra Performance LC™ by design. **Waters Corporation**, USA, 2004.

WREN, S.A.C.; TCHELITCHEFF, P. Use of ultra-performance liquid chromatography in pharmaceutical development. **Journal of Chromatography A**. v. 1119, p. 140-146, 2006.

WU, T.; WANG, C.; WANG, X.; XIAO, H.; MA, Q.; ZHANG, Q. Comparison of UPLC and HPLC for Analysis of 12 Phthalates. **Chromatographia**. v. 68, p. 803-806, 2008.

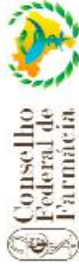
ZHAI, Z.; SOLCO, A.; LANKUN, W.; WURTELE E. S.; KOHUT, M. L.; MURPHY, P. A.; CUNNICK, J. E. Echinacea increases arginase activity and has anti-inflammatory properties in RAW 264.7 macrophage cells indicative of alternative macrophage activation. **Journal of Ethnopharmacology**. v 122, n. 1, p 76-85, 2009.

ANEXO A

Certificado de apresentação de trabalho no I Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas



I Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas
8º Congresso Brasileiro sobre o Uso Racional de Medicamentos
I Congresso Pan-Americano sobre o Uso Racional de Medicamentos
I Congresso Latino-Americano de Estudantes de Farmácia
II Congresso Brasileiro de Farmácia Estética
III Simpósio Farmacológico de Nutracêuticos
III Encontro Nacional de Educadores em Farmácia Clínica



MINISTÉRIO DA SAÚDE



Certificado

Certificamos que o trabalho científico intitulado **AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS VEGETAIS DE ECHINACEA PURPUREA COMERCIALIZADOS POR FARMÁCIAS MAGISTRAIS**, de autoria de LUIZ FILIPE FERREIRA SANTOS, BÁRBARA GONÇALVES DE OLIVEIRA, RAFAEL WESLEY BASTOS, DANIEL DE ASSIS SANTOS e ISABELA DA COSTA CÉSAR foi apresentado como pôster no I Congresso Brasileiro de Ciências Farmacêuticas, 6º Congresso Brasileiro sobre o Uso Racional de Medicamentos, I Congresso Pan-Americano sobre o Uso Racional de Medicamentos, I Congresso Latino-Americano de Estudantes de Farmácia, II Congresso Brasileiro de Farmácia Estética, II Simpósio Farmacológico de Nutracêuticos e III Encontro Nacional de Educadores em Farmácia Clínica, realizados pelo Conselho Federal de Farmácia, Fundação Brasileira de Ciências Farmacêuticas e realização do Ministério da Saúde, nos dias 15 a 18 de novembro de 2017, no Rafain Palace Hotel & Convention Center, em Foz do Iguaçu, Paraná.

Foz do Iguaçu - PR, 18 de novembro de 2017.


Walter da Silva Jorge João
Presidente do Conselho Federal de Farmácia


Carlos André Oeiros Sena
Presidente do Instituto Brasileiro de Ciências Farmacêuticas


Renato Alves Teixeira Lima
Ministério da Saúde

ANEXO B

Laudos dos fornecedores

Amostra 1



CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	Equinacea Extrato Seco	Data de Análise:	15-02-2018
Lote interno:	15B10-B022-001669	Lote Fabricante:	4/1
Data de Fabricação:	30-06-2010	Data de Validade:	28-02-2018
Origem:	Brasil	Procedência:	Brasil
Condições de Armazenamento:	Temperatura até 25°C	Ordem de Fracionamento:	001669

DCB:	-	DCI:	-	
CAS:	-	Peso Molecular:	-	
Fórmula Molecular:	-			
Observações:	Parte Utilizada:	Folha, caule e raiz	Nome Científico:	Echinacea purpurea

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição	Pó fino, higroscópico, livre de partículas estranhas	Conforme		Fabricante
Cor	Pardo claro a pardo	Pardo Claro		Fabricante
Sabor	Característico	Característico		Fabricante
Odor	Característico	Característico		Fabricante
Densidade Aparente	0,650 a 0,850	0,658	g/mL	Fabricante
Umidade	<= 8,0	4,99	%	Fabricante
pH	4,50 a 6,50	4,90		Fabricante
Solubilidade	Parcialmente solúvel em água e insolúvel em etanol	Conforme		Fabricante
Cinzas insolúveis em ácidos	<= 2,0	0,38	%	Fabricante
Cinzas Sulfatadas	<= 8,0	2,96	%	Fabricante
Cinzas Totais	<= 10,0	4,13	%	Fabricante
Elementos Estranhos	Não detectado	Não detectado		Fabricante
Fluidez volumétrica	650 a 850	658	g/l	Fabricante
Granulometria	Malha 100	Malha 100		Fabricante
Doseamento	Taninos totais (Polifenóis) >= 1,5	1,62	%	Fabricante
Metais Pesados (AAS)	Chumbo < 0,80	0,0017	ppm	Fabricante
Metais Pesados (AAS)	Cobre < 30,0	0,0008	ppm	Fabricante
Metais Pesados (AAS)	Antimônio < 2,00	0,0029	ppm	Fabricante

Amostra 2



CERTIFICADO DE ANÁLISE

INSUMO:		EQUINACEA EXTRATO SECO ()		Pág 1	
ORIGEM/PROCEDÊNCIA:	BRASIL/BRASIL	DATA DE ANÁLISE:	03/09/2015		
LOTE INTERNO:	1511570	LOTE FABRICANTE:	4/1		
DATA DE FABRICAÇÃO:	Junho/2010	DATA DE VALIDADE:	Agosto/2016		
CONDIÇÕES DE ARMAZENAGEM:		TEMPERATURA AMBIENTE			
OBS 1:	Nome Comum: Equinácea				
OBS 2:	Nome científico: Equinacea purpurea L.M				
OBS 3:	Família: Asteraceae				
OBS 4:	Parte utilizada: Folha, caule e raiz				
DATA DE EMISSÃO:	00/00/0000	NF:	000.000	ORDEM FRACIONAMENTO:	15010707A00
				DATA ENC:	03/09/2015
TESTES	ESPECIFICAÇÕES	RESULTADOS	REFERÊNCIAS		
Descrição*	Pó fino e higroscópico, livre de partículas estranhas, pardo claro a pardo, com odor característico	Pó fino e higroscópico, livre de partículas estranhas, pardo com odor característico	Fabricante		
Elementos estranhos*	Não detectado	Não detectado	Fabricante		
Cinzas totais*	≤ 10%	4,39%	Fabricante		
Cinzas insolúveis em ácido*	≤ 2,0%	0,58%	Fabricante		
Densidade aparente*	0,650 - 0,850 g/mL	0,694 g/mL	Fabricante		
Perda por dessecação*	≤ 8,0% (2g/ 105°C/5 horas)	1,73%	Fabricante		
pH*	4,50 a 6,50 (solução 1%)	4,75	Fabricante		
Doseamento*	Taninos totais ≥ 1,5%	2,8%	Fabricante		
Metais pesados*	≤ 20 ppm	< 20 ppm	Fabricante		
Metais pesados (AAS)	Chumbo < 0,80 ppm Cobre < 30,00 ppm Antimônio < 2,0 ppm	0,0017 ppm 0,0008 ppm 0,0029 ppm	Fabricante		
Solubilidade*	Parcialmente solúvel em água e insolúvel em etanol	Conforme	Fabricante		
Cinzas sulfatadas*	≤ 8,0%	2,81%	Fabricante		
Fluidez volumétrica*	650 - 850 g/L	694 g/L	Fabricante		
TESTES MICROBIOLÓGICOS					
Bactérias totais aeróbias*	≤ 2000 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante		
Fungos e leveduras*	≤ 200 UFC/g	< 10 UFC/g	Fabricante		
Escherichia coli*	Ausente	Ausente	Fabricante		
Salmonella sp*	Ausente	Ausente	Fabricante		

*Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACEUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

LEGENDA DAS REFERÊNCIAS: FB (Farmacopeia Brasileira) / USP (United States Pharmacopoeia) / EP (European Pharmacopoeia) / BP (British Pharmacopoeia) / JP (Japanese Pharmacopoeia) / MG (Método Geral farmacopeico) / Fabricante (especificação e metodologia conforme o fabricante do insumo) / Informativo (resultado fornecido como informativo pelo LCQ SM EMPREENDIMENTOS FARMACÉUTICOS LTDA).

CONCLUSÃO: (X) Aprovado () Reprovado

Amostra 4



INFORMAÇÕES GERAIS

Nome lote:	055697	Parte utilizada:	Raiz	Validade:	09/2017
Nome claturalura:	EQUINÁCEA EXTRATO SECO 4%	Esterilização:	Não houve	Nossa Validade:	09/2017
Nome Científico:	Echinacea purpurea	Fabricação:	09/2014	DCB:	10713
Origem:	China	Lote Origem:	FL15010413A		

CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

Cor:	Marrom	Odor:	Característico	Sabor:	Característico
------	--------	-------	----------------	--------	----------------

CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

Análise	Especificação	Resultado
Aspecto	Pó fino	De acordo
Elementos Estranhos	Ausente	De acordo
Umidade	< 5,0%	3,81%
Funções Totais	< 10,0%	7,32%
Metais Pesados	Em Pb < 3 mg/kg	< 0,001 mg/kg
Solubilidade	90% Solúvel em água	De acordo
Densidade	40 - 60 g/mL	54 g/100mL

TESTES DE IDENTIFICAÇÃO

Análise	Método
Positivo para Polif	Outros

CARACTERÍSTICAS MICROBIOLÓGICAS

Análise	Especificação	Resultado	Conclusão
Contagem Padrão em placas	Máx. 10.000 ufc/g	< 1000 ufc/g	De acordo
Bactérias e Leveduras	Máx. 100 ufc/g ou mL	< 100 ufc/g	De acordo
Escherichia coli (coliformes)	Ausência	Ausente	De acordo
Staphylococcus aureus	Ausência	Ausente	De acordo
Pseudomonas aeruginosas	Ausência	Ausente	De acordo
Salmonella sp	Ausência	Ausente	De acordo

TEOR DE PRINCÍPIO ATIVO

Análise	Resultado
Teor de Polifenóis > 4%:	4,46%

DBS

Densidade sem compactação.

CONCLUSÃO

Data da análise:	2015-03-11 15:19:00	Conclusão:	Aprovado
------------------	---------------------	------------	----------

Amostra 5

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Código do Produto: ES06 Nota Fiscal: 58848

Nome Comercial do Produto: EXT. SECO EQUINACEA (1,00 POL)
 Nome Científico: EXTRACTA SICCA EQUINACEA PURP
 Procedência: CHINA
 Data de Fabricação: 06/2010
 Data de Validade: 08/2016
 Número de Lote do Fabricante: 4/1 - (339)

Emissao: 09/05/2014

22
anos

Codigo: 5215
 Nota fiscal: 12704
 Insumo farmaceutico ativo: Extrato seco de Equinacea (1,00%)
 Materia-prima : Equinacea purpurea (L.) Moench
 Familia : Asteraceae (Compositae)
 Metodo de secagem : Spray-dryer
 Origem/Procedencia : China/China
 Parte utilizada : Raiz, caule e folha
 Excipiente : Amido
 Solvente utilizado : Agua
 Numero da analise : 4212
 Deve conter : Minimo 1,00% de Taninos totais (Polifenol)
 Preparacoes : Descontaminacao por irradiacao gama

ANALISE BOTANICA
 ASPECTO MACROSCOPICO: Po fino e higroscopico, livre de particuls
 estranhas.
 ASPECTO MICROSCOPICO: Nao e realizado analise microscopica por nao
 ser possivel a visualizacao das estruturas histologicas que
 caracterizam a especie.

ANALISES	PARAMETROS	RESULTADOS
CARACTERISTICAS FISICO-QUIMICAS		
Cor	Parda a Pardo-clara	Parda
Odor	Caracteristico	Caracteristico
Sabor	Caracteristico	Caracteristico
pH (solucao 1,00%)	4,50 a 6,50	4,55
Densidade aparente	0,650 a 0,850g/mL	0,658g/mL
Fluidez volumetrica	650,00g/L a 850,00g/L	658,00g/L
Solubilidade		
Em agua	Parcialmente Soluvel	Parciamente Soluvel
Em etanol	Insoluvel	Insoluvel
ENSAIOS DE PUREZA		
Umidade	Maximo 8,00%	2,96%
Cinzas totais	Maximo 10,00%	4,13%
Cinzas insolueis em acido	Maximo 2,00%	0,38%
Cinzas sulfatadas	Maximo 8,00%	2,96%
ANALISES FISICO-QUIMICAS COMPLEMENTARES		
Metais pesados (Pb)	<=20,00ppm	<0,50ppm
Metais pesados (AAS)		
Cu	<=30,00ppm	0,0008ppm
Pb	<=8,00ppm	0,0017ppm
Sb	<=2,00ppm	0,0029ppm