

BRUNO GARCIA LIMA

**EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDO
CHIQUÍMICO E ÁCIDO GÁLICO EM *Schinus Terebinthifolius* RADDI E
NAS FEZES DA LAGARTA PREDADORA ASSOCIADA *Automeris* SP.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientador: Geraldo Humberto da Silva

**RIO PARANAÍBA - MINAS GERAIS
2019**

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca da Universidade Federal
de Viçosa - Câmpus Rio Paranaíba**

T

L732e
2019
Lima, Bruno Garcia, 1981-
Extração e determinação cromatográfica de ácido
chiquímico e ácido gálico em *Schinus terebinthifolius* Raddi nas
fezes da lagarta predadora associada *Automeris* sp / Bruno
Garcia Lima. – Rio Paranaíba, MG, 2019.
91f : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Geraldo Humberto Silva.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Inclui bibliografia.

1. Extração. 2. Cromatografia líquida. 3. *Schinus
Terebinthifolius* Raddi. 4. *Automeris*. I. Universidade Federal de
Viçosa. Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas. Mestrado
Multicêntrico em Química de Minas Gerais. II. Título.

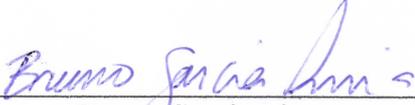
BRUNO GARCIA LIMA

**EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO CROMATOGRÁFICA DE ÁCIDO
CHIQUÍMICO E ÁCIDO GÁLICO EM *Schinus Terebinthifolius* RADDI E
NAS FEZES DA LAGARTA PREDADORA ASSOCIADA *Automeris* SP.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 05 de dezembro de 2019.

Assentimento:



Bruno Garcia Lima
Autor



Geraldo Humberto Silva
Orientador

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, que muito me apoiou e que me incentivou a realizá-lo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha vida e pelas pessoas maravilhosas que Ele colocou em meu caminho.

Aos meus pais Carlos e Rosa que estiveram sempre ao meu lado, apoiando minhas decisões, pelas orações e por sempre acreditarem em mim.

Aos meus irmãos Ana Carolina e Tomás, pelo carinho e pelo incentivo.

Ao Professor e orientador Dr. Geraldo Humberto Silva, pela orientação, dedicação, paciência e todo conhecimento transmitido.

Às Professoras Dr^a. Meire de Oliveira Barbosa e Fabrícia Queiroz Mendes toda a ajuda e pelas oportunas sugestões.

Ao Professor Dr. Hernani Martins Junior pela ajuda nas análises estatísticas.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV) juntamente com o programa da rede mineira pela oportunidade em realizar o Mestrado.

Ao INCT-BioNat juntamente com a coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço também todos os técnicos e funcionários da Universidade Federal de Viçosa – *Campus* de Rio Paranaíba.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Finalizo agradecendo a todos e todas que me ajudaram direta ou indiretamente na conclusão de mais essa etapa. Obrigada por me acompanharem nessa caminhada!

RESUMO

LIMA, Bruno Garcia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, dezembro de 2019. **Extração e determinação cromatográfica de ácido chiquímico e ácido gálico em *Schinus terebinthifolius* Raddi e nas fezes da lagarta predadora associada *Automeris* sp.** Orientador: Geraldo Humberto Silva.

O ácido chiquímico possui alto valor de mercado, pois é o precursor do fármaco Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®), um dos poucos fármacos disponíveis no mercado para tratamento da gripe A (H1N1). Tal substância é extraída comercialmente apenas do anis estrelado chinês (*Illicium verum* Hook.f.), sendo necessário buscar novas fontes desta matéria prima. Neste contexto, buscou-se desenvolver um processo utilizando conceito de química verde, onde lagartas predadoras do gênero *Automeris* sp. foram alimentadas com folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi, com objetivo de aumentar a concentração do ácido chiquímico na nova matriz, as fezes das lagartas. Para quantificar os ácidos chiquímico e gálico, nas folhas e fezes, nas etapas de otimização da extração e purificação foi desenvolvido um método cromatográfico via Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD). A extração dos ácidos das matrizes foi otimizada ajustando as condições temperatura, tempo, granulometria, diluição e os extratores Soxhlet e autoclave. O método desenvolvido e otimizado, por CLAE-DAD, foi rápido, seletivo, preciso e robusto nas condições avaliadas. Dentre os fatores avaliados na etapa de extração, o que mais influenciou foi a temperatura, com a condição ótima a 110°C, com uso de autoclave. A máxima concentração nesta condição, para o ácido chiquímico foi de 3,7% m/m nas fezes e de 2,9% m/m nas folhas, evidenciando o aumento da concentração do ácido chiquímico nas fezes das lagartas em relação as folhas. Os dois ácidos foram separados com eficiência, através de uma extração em fase sólida, na qual extrato aquoso foi efluído através de uma coluna recheada com uma mistura de carvão ativado e sílica-gel. Para entender o processo foram determinadas as isotermas de adsorção, em fluxo, para os dois ácidos, sendo que a capacidade máxima de adsorção de ácido chiquímico, igual a 7,459 mg.g⁻¹, e do ácido gálico sendo igual a 55,780 mg.g⁻¹, calculadas pelo modelo de isoterma de Langmuir.

Palavras-chave: Extração. Cromatografia Líquida. *Schinus Terebinthifolius* Raddi. *Automeris*.

ABSTRACT

LIMA, Bruno Garcia, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa - Campus Rio Paranaíba, December, 2019. **Extraction and chromatographic determination of shikimic acid and gallic acid in *Schinus terebinthifolius* Raddi and in feces of the associated predatory caterpillar *Automeris* sp.** Advisor: Geraldo Humberto Silva.

Shikimic acid has a high market value because it is the precursor of the drug Oseltamivir phosphate (Tamiflu®), one of the few drugs available for the treatment of influenza A (H1N1). Such substance is extracted commercially only from Chinese star anise (*Illicium verum* Hook.f.), and it is necessary to search for new sources of this raw material. In this context, we sought to develop a process using the concept of green chemistry, where predatory caterpillars of the genus *Automeris* sp. were fed leaves of *Schinus terebinthifolius* Raddi in order to increase the shikimic acid concentration in the new matrix, caterpillar feces. In order to quantify the shikimic and gallic acids in the leaves and feces, in the extraction and purification optimization stages, a chromatographic method via High Performance Liquid Chromatography with Diodes Array Detector (CLAE-DAD) was developed. The extraction of acids from the matrices was optimized by adjusting the temperature, time, grain size, dilution conditions and the Soxhlet and autoclave extractors. The method developed and optimized by CLAE-DAD was fast, selective, accurate and robust under the evaluated conditions. Among the factors evaluated in the extraction stage, the one that most influenced was the temperature, with the optimal condition at 110°C, with the use of autoclave. The maximum concentration in this condition for shikimic acid was 3.7% w/w in caterpillar feces and 2.9% w/w in leaves, showing an increase in the concentration of shikimic acid in the feces in relation to the leaves. The two acids were efficiently separated by solid phase extraction, in which aqueous extract was effected through a column filled with a mixture of activated carbon and silica gel. In order to understand the process, the adsorption isotherms in flux were determined for both acids, with the maximum adsorption capacity of shikimic acid equal to 7,459 mg.g⁻¹ and gallic acid being 55,780 mg.g⁻¹, calculated by the Langmuir isotherm model.

Keywords: Extraction. Liquid Chromatography. *Schinus Terebinthifolius* Raddi. *Automeris*.

SUMÁRIO

1. Introdução Geral	10
1.1. Ácido chiquímico	10
1.2. Ácido gálico.....	12
1.3. <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	12
1.4. Lepidópteros	14
1.4.1. <i>Automeris</i> sp.	14
1.5. Cromatografia líquida de alta eficiência.....	16
1.6. Validação de métodos analíticos	17
1.6.1. Especificidade e seletividade.....	18
1.6.2. Linearidade	19
1.6.3. Intervalo.....	20
1.6.4. Precisão.....	20
1.6.5. Limite de detecção.....	21
1.6.6. Limite de quantificação	22
1.6.7. Exatidão	22
1.6.8. Robustez	24
1.7. Conformidade do sistema	24
1.8. Separação.....	25
1.8.1. Adsorção.....	25
1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28
Artigo 1: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CHIQUÍMICO E ÁCIDO GÁLICO EM FOLHAS DE <i>SCHINUS</i> <i>TEREBINTHIFOLIUS</i> RADDI E EM FEZES DE LAGARTAS DO GÊNERO <i>AUTOMERIS</i> SP UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA.....	33
Resumo	34
1. Introdução.....	35

2. Experimental.....	38
2.1. Reagentes e produtos químicos	38
2.2. Material vegetal e fezes da lagarta <i>Automeris</i> sp.	38
2.3. Equipamentos	38
2.4. Condições cromatográficas.....	39
2.5. Preparação de soluções padrão e de amostra.....	40
2.6. Método de validação.....	40
3. Resultados e discussão.....	44
3.1. Otimização do método cromatográfico	44
3.2. Método de validação.....	45
4. Conclusões.....	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
Artigo 2: EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DO ÁCIDO CHIQUÍMICO E DO ÁCIDO GÁLICO EM FOLHAS DE <i>SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS</i> RADDI E EM FEZES DE LAGARTAS DO GÊNERO <i>AUTOMERIS</i> SP	61
Resumo	62
1. Introdução.....	63
2. Materiais e métodos.....	66
2.1. Reagentes e produtos químicos.	66
2.2. Material vegetal e fezes da lagarta <i>Automeris</i> sp	66
2.3. Construção das curvas analíticas	66
2.4. Preparação das amostras	67
2.5. Extração	67
2.6. Purificação	70
3. Resultados e discussão.....	72
3.1. Extração	72
3.2. Análise dos efeitos.....	75
3.3. Purificação do ácido chiquímico	81

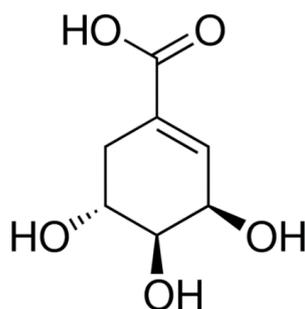
4. Conclusão	87
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
Conclusões Gerais	91

1. Introdução Geral

1.1. Ácido chiquímico

O Ácido Chiquímico (figura 1) (ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-tri-hidroxiciclo-hex-1-eno - carboxílico) é um ácido orgânico encontrado em plantas, sendo precursor de aminoácidos aromáticos e derivados. Tal ácido foi isolado pela primeira vez em 1885, a partir da flor do Anis Estrelado Japonês (*Illicium anisatum*), que é conhecida como Shikimi, dando assim o seu nome. O Ácido Chiquímico é um ácido ciclo-hexanocarboxílico, um ciclitol, opticamente ativo, contendo três grupos hidroxila. Os seus centros quirais o torna um dos principais intermediários na biossíntese de compostos aromáticos no metabolismo vivo (IYER et al., 2007).

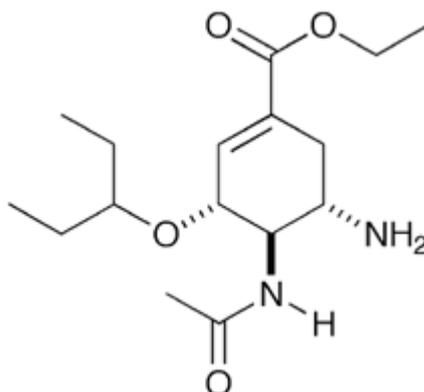
FIGURA 1 - Estrutura química do ácido chiquímico.



Fonte: elaborado pelo autor.

O Ácido Chiquímico é utilizado para a síntese de produtos farmacêuticos, como o fosfato de oseltamivir (Tamiflu®). O fosfato de oseltamivir, figura 2, é um pró-fármaco inibidor potente e seletivo da enzima neuraminidase, impedindo a propagação do vírus da gripe (influenza A e B). A neuraminidase é responsável pela liberação de partículas virais recém-formadas nas células infectadas e para a posterior disseminação do vírus no organismo, portanto, quando ela é inibida, o vírus morre ao não conseguir sair da célula hospedeira sendo impedido de espalhar e infectar outras células do corpo. O fosfato de oseltamivir também inibe a infecção e a replicação *in vitro* do vírus da gripe e inibe a replicação e a patogenicidade *in vivo* do mesmo, assim reduz a proliferação dos dois vírus (influenza A e B), pois inibe a liberação de vírus das células infectadas (ANVISA, 2018).

FIGURA 2 - Estrutura química do fosfato de oseltamivir (Tamiflu®).



Fonte: elaborado pelo autor.

Segundo a ROCHE, o processo de fabricação do Tamiflu® é complexo e envolve pelo menos 10 etapas, sua fabricação leva de 6 a 8 meses, e utiliza como matéria prima, o ácido chiquímico extraído das vagens do anis estrelado (*Illicium verum* Hook.f.), proveniente de uma variedade específica que possui maior concentração deste ácido. Esta espécie de anis para expressar o seu máximo potencial produtivo requer condições climáticas específicas, o que limita seu cultivo a quatro províncias da China, o que dificulta a sua obtenção. Mesmo para essa variedade que produz mais ácido chiquímico, para cada quilograma de ácido são necessários 30 quilogramas de anis (ESCALANTE et al., 2014; ROCHE, 2006).

Novas fontes de ácido chiquímico têm sido objeto de estudo em todo o mundo, ao utilizar diferentes metodologias e matérias-primas. No entanto, somente em alguns tipos de plantas se consegue isolar o ácido chiquímico em maior quantidade, o que torna necessário a otimização dos processos de extração para que possam ser utilizados pela indústria (BOCHKOV et al., 2012). Dentre estes estudos, CARDOSO, LOPES e NASCIMENTO (2014) conseguiram otimizar o processo de extração das folhas secas de *Eichhornia crassipes* e obteve rendimento de 2,7% m/m; MARTIN et al. (2010) utilizou como matéria prima a casca e pedaços de madeira da planta *Liquidambar styraciflua* L. conseguindo um rendimento de 1,68% e 0,20% m/m, respectivamente; USUKI et al. (2011) empregou uma técnica para dissolver a celulose das folhas da planta *Ginkgo biloba* e assim conseguiu um rendimento de 2,3% m/m.

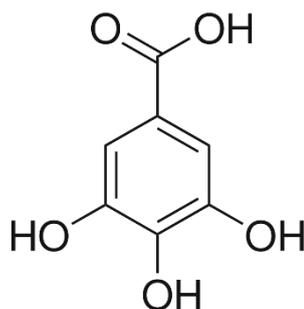
Em um estudo realizado por FEUEREISEN et al. (2014), ficou evidenciado através de análises por espectroscopia por RMN (ressonância magnética nuclear) a presença de derivados

do ácido chiquímico no extrato obtido da planta popularmente conhecida como Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi).

1.2. Ácido gálico

O Ácido Gálico (figura 2) (ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico) é um ácido aromático encontrado nas plantas, como derivado da via metabólica do ácido chiquímico, na forma de ácidos livres, ésteres, derivados de catequina e de taninos hidrolisáveis. É considerado um dos compostos fenólicos mais ativos possuindo atividades antioxidante, antimicrobiana, anti-inflamatória e anticancerígena (AYDOGDU; SUMNU; SAHIN, 2019; KARAMAC; KOSINSKA; PEGG, 2006; SIMÕES et al., 2017)

FIGURA 2 - Estrutura química do ácido gálico.



Fonte: elaborado pelo autor.

Devido a atividade antioxidante do ácido gálico ele é considerando uma substância que age como inibidor de radicais livres (CAO; WARNER; FANG, 2019), possui também um sabor amargo e adstringência fortes o que limita seu uso em alimentos. Sua molécula pode ser degradada pela ação da temperatura, pH, presença de oxigênio e luz (KARAMAC; KOSINSKA; PEGG, 2006).

1.3. *Schinus terebinthifolius* Raddi

Schinus terebinthifolius Raddi, pertencente ao gênero *Schinus* e a família *Anacardiaceae* é uma espécie de planta conhecida popularmente como aroeira, aroeira vermelha, aroeira pimenteira, aroeira do brejo, aroeira mansa, aroeira da praia e diversos outros nomes que variam de região para região.

Segundo STRAPASSON (2002), a *Schinus terebinthifolius* Raddi ocorre em todo continente Sul Americano e é encontrada em todo território brasileiro, de norte ao sul, em diferentes biomas, tais como: cerrado, caatinga e mata atlântica. A espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi é considerada uma planta medicinal e na medicina popular é utilizada contra febre, problemas do trato urinário, cistites, uretrites, blenorragia, problemas menstruais com excesso de sangramento, e gripes (SOUZA; LORENZI, 2012; STRAPASSON; SANTOS; MEDEIROS, 2002).

A aroeira-vermelha pode atingir na idade adulta até 15 m de altura e 30 a 60 cm de diâmetro, podendo formar aglomerados de plantas originadas de sementes ou brotações de raiz. É também considerada como uma planta pioneira ou secundária inicial, podendo ocupar ambientes diferentes com grande capacidade. Suas flores são de coloração branco-amarelada a branco esverdeada, além de serem muito pequenas e numerosas. Seus frutos possuem uma coloração vermelha quando maduros, possuindo de 4 a 5,5 mm de diâmetro, sendo que seu amadurecimento ocorre nos meses de maio a setembro (CARDOSO; SILVEIRA, 2010).

A espécie teve sua importância reconhecida ao ser incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), elaborada pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, que incentiva a pesquisa com plantas, exóticas adaptadas ou nativas (BRASIL, 2019).

Em estudos fitoquímicos realizados para avaliar as propriedades farmacológicas das folhas, cascas e sementes de *S. terebinthifolius* Raddi, foram identificadas as ocorrências de terpenos, flavonóides, ácidos graxos, fenóis, taninos, óleos essenciais em diferentes níveis de concentração. Porém, em grande parte desses estudos pouca atenção foi dada para a quantificação dos compostos químicos presentes na planta, ficando restritos à identificação dos compostos (CARVALHO et al., 2013).

As plantas em geral, muitas vezes servem como habitat para outros seres vivos fazendo o papel de hospedeiras, que possibilitam a sobrevivência de outras espécies parasitas. SPECHT, CORSEUIL e FORMENTINI (2006) ao verificarem a incidência de lepidópteros que possuem ocorrência no Rio Grande do Sul, verificou que a *Schinus terebinthifolius* Raddi é planta hospedeira de duas espécies de lepidópteros, sendo a *Automeris melanops* (Walker) e *Leucanella viridescens* (Walker).

Também foi citado por BARRETO e SILVA (2013) a incidência da lagarta *Automeris* sp. na planta *Schinus terebinthifolius* Raddi ao realizar um estudo no qual avaliou o teor de

ácido gálico nas folhas da planta e nas fezes da lagarta, onde ficou evidenciado que o teor de ácido gálico encontrado nas fezes foi 487 vezes maior que o encontrado nas folhas.

FIGURA 3 - *Schinus terebinthifolius* Raddi



(a) planta adulta, (b) flores, e (c) frutos. Fonte: arquivo pessoal, 2018.

1.4. Lepidópteros

1.4.1. *Automeris* sp.

Fazem parte os insetos popularmente conhecidos como borboletas e mariposas. O nome da ordem lepidóptera tem origem no idioma grego (lepis = escamas, e pteron = asas) que faz referência à presença de escamas nas asas. São insetos que possuem uma metamorfose completa, que têm cobertos por escamas o seu corpo, suas asas membranosas e apêndices (CAMARGO et al., 2015).

Segundo RAFAEL (2012), a maior parte dos insetos adultos são sugadores e se alimentam de néctar, pólen, líquidos de frutos fermentados, excretas, resinas vegetais, podendo ser também hematófagos, porém alguns adultos consomem reservas acumuladas no estágio larval, conseqüentemente não se alimentando na fase adulta. Na fase larval são insetos

herbívoros dotados de aparelho bucal mastigador (RAFAEL; DE MELO; DE CARVALHO, 2012).

O gênero *Automeris* Hübner pertence à família Himeleucidae, que compreende mais de 500 espécies, dentre estas espécies, algumas do gênero *Automeris* possuem interesse econômico, são mariposas que possuem uma grande mácula ocelada, negra ou vermelha, que se vê no meio das asas posteriores, cujas lagartas possuem podem ingerir uma ampla variedade de fontes alimentares. Dentre as espécies deste gênero, as mais comuns são *Automeris melanops* (Walker, 1865), *A. illustris* (Walker, 1855) e *Hyperchiria incisa* (Walker, 1855) (COSTA LIMA, 1950).

Conforme PANIZZI e PARRA (1991), as folhas compõem a principal biomassa da planta e representam a melhor fonte de nutrientes para as lagartas dos lepidópteros, por isso sua fisiologia e comportamentos são afetados diretamente pelos componentes presentes nas folhas.

As lagartas ao serem alimentadas com as folhas, durante o seu o processo digestivo, no qual os alimentos são hidrolisados e transformados, através da ação de enzimas presentes em seu trato intestinal, de macromoléculas complexas em moléculas mais simples para serem absorvidas. No entanto, no trato intestinal dos insetos, nem todos os componentes são digeridos e absorvidos, podendo assim, ocorrer a concentração de uma determinada substância que está presente nas folhas consumidas (LEHANE; BILLINGSLEY, 2012; NATION, 2008).

FIGURA 4 – Lagarta do gênero *Automeris* sp. encontradas nas árvores de aroeira-vermelha.



(a) lagarta *Automeris* sp., (b) fezes. Fonte: arquivo pessoal, 2018.

1.5. Cromatografia líquida de alta eficiência

O termo cromatografia é derivado das palavras gregas *chrom* (cor) e *graphe* (escrever), foi utilizado pela primeira vez, em 1906, pelo botânico russo Mikhael Semenovich Tswett, que os utilizou em trabalhos que descreviam suas experiências nas quais ele utilizou colunas de vidro recheadas com diferentes sólidos para arrastar os diferentes componentes de extratos de folhas com éter de petróleo (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

Cromatografia é o método físico-químico no qual ocorre a separação dos componentes de uma mistura pela distribuição desses componentes em duas fases, sendo uma fase estacionária e a outra é denominada de fase móvel, que é aquela se se move através da fase estacionária. Durante essa passagem os componentes da mistura são distribuídos por ambas as fases de maneira que cada um é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em diferenciais de migração desses componentes, possibilitando a identificação e quantificação destas espécies químicas (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

As formas de cromatografia podem ser classificadas pela forma física do sistema cromatográfico (cromatografia em coluna e cromatografia planar), pela fase móvel empregada (a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida e a cromatografia supercrítica), pela fase estacionária utilizada (fase estacionária sólida, líquida e quimicamente ligadas), e pelo modo de separação (adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou combinações desses mecanismos) (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

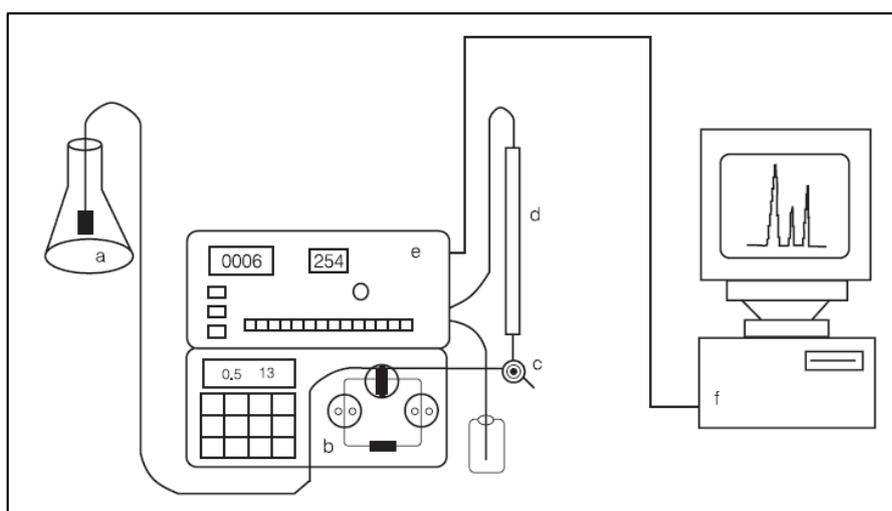
Na década de 60, foram utilizados equipamentos que operavam a fase móvel líquida sob pressão, ao utilizar e aperfeiçoar sistemas de bombeamento, e com métodos de detecção mais sensíveis que possibilitou análises com resultados satisfatórios e com rapidez semelhante àquela obtida na cromatografia gasosa, procedimento que viria a ser chamado de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

A CLAE é uma técnica versátil que possibilita a realização de análises em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e detectabilidade de misturas com uma ampla gama de compostos e na qual também a pode-se utilizar um grande número de diferentes fases estacionárias, o que a torna uma ferramenta importante em várias áreas, tais como, no acompanhamento de sínteses, em análises de pesticidas, feromônios, no isolamento de produtos naturais e sintéticos, entre outras aplicações (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Essa técnica promove uma separação dos componentes de uma amostra, esta que é introduzida no sistema pela sua injeção, sendo que a amostra deve ser filtrada antes de ser

injetada, na fase móvel (que possui alto grau de pureza), que é bombeada à uma vazão contínua, que possibilita a eluição da fase móvel a uma vazão adequada. Em seguida, a fase móvel com a amostra atravessa a fase estacionária o que resulta na separação dos componentes de acordo com a afinidade destes com ambas as fases, e assim as substâncias atingem o detector gerando um sinal, que é enviado ao sistema de registro (computador) e este gera um cromatograma com os dados da amostra, conforme demonstrado na figura 5 (JARDIM; COLLINS; GUIMARÃES, 2006).

FIGURA 5– Equipamento básico de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência



a) reservatório da fase móvel; b) bomba de alta pressão; c) válvula de injeção; d) coluna; e) detector e f) registrador. Fonte: DEGANI, CASS e VIEIRA, 1998.

1.6. Validação de métodos analíticos

Para THOMPSON (2002), a validação do método analítico é essencial, e ao ser implementada em um laboratório ela permite que se produza dados analíticos confiáveis, através da preparação de protocolos sobre estudos de desempenho de métodos (colaborativos), testes de proficiência e controle de qualidade (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

O objetivo da validação de um método analítico é a demonstração do quão ele é adequado para a finalidade pretendida, possibilitando a verificação das características referentes à identificação, controle de impurezas e procedimentos de ensaio (ICH, 2005).

Segundo RIBANI et al. (2004) é possível distinguir dois tipos de validação de métodos: a validação no laboratório e a validação completa. A validação no laboratório são as etapas de validação que ocorrem dentro de um único laboratório, e é utilizada na produção de dados para

publicação de artigos científicos e em etapas preliminares do desenvolvimento de uma nova metodologia. Já a validação completa, é um método que engloba todas as características e realiza um estudo interlaboratorial, e assim é capaz de verificar como a metodologia desenvolvida se comporta ao ser reproduzida em laboratórios distintos.

Várias instituições no mundo desenvolvem protocolos para a validação de métodos e também são responsáveis por acompanhar e credenciar a competência de laboratórios de ensaio. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e o INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial) são órgãos responsáveis por credenciadoras para verificar a competência de laboratórios de ensaios e para isso disponibilizam guias para o procedimento de validação de métodos analíticos, que determinam os parâmetros que devem ser avaliados, entre eles: especificidade/seletividade, intervalos da curva de calibração, linearidade, curva de calibração, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão, precisão, robustez (RIBANI et al., 2004).

1.6.1. Especificidade e seletividade

GONZÁLEZ e HERRADOR (2007) definem a seletividade como sendo o grau em que um método pode quantificar com precisão um analito na presença de interferências existentes nas condições estabelecidas para o ensaio da amostra em estudo.

A seletividade é capaz de avaliar o grau de interferência entre componentes da amostra, podendo ser substâncias ativas diferentes, impurezas, produtos de degradação ou mesmo outros componentes que possam ter propriedades similares entre si, presentes na amostra. Desde modo, é garantido que o pico de resposta obtido pelo método representa exclusivamente a substância de interesse (RIBANI et al., 2004).

Conforme RIBANI et al. (2004), existem várias maneiras de se obter a seletividade: pode-se comparar uma matriz isenta da substância de interesse com a matriz na qual esta substância é adicionada, sendo que nenhum interferente deve possuir o mesmo tempo de retenção da substância de interesse, e esta deve possuir um sinal de resposta bem separado das demais substâncias da amostra; pode ser obtida também através da avaliação dos espectros da amostra com um espectro obtido a partir de uma substância padrão conhecida, e assim pode-se indicar a presença da substância na amostra, e também pode ser utilizadas outras técnicas cromatográficas para analisar a amostra, como por exemplo espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear, espectroscopia no infravermelho.

A International Conference on Harmonisation (ICH) define a especificidade como a capacidade de avaliar corretamente o analito na presença de componentes que podem estar presentes (impurezas, degradantes, matriz, etc.) (ICH, 2005).

Através da especificidade é capaz de identificar um analito garantindo a sua identidade. Podendo ser utilizada para realizar testes de pureza, com intuito de garantir que todos os procedimentos analíticos realizados permitam uma declaração precisa do conteúdo de impurezas de um analito e também pode ser utilizada em ensaios com a finalidade de obter um resultado com exatidão, que permita uma declaração precisa sobre o conteúdo ou a potência do analito em uma amostra (ICH, 2005).

1.6.2. Linearidade

A capacidade do método em prover resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em exame, sob uma faixa de trabalho conhecida, corresponde a linearidade (RIBANI et al., 2004).

A linearidade pode ser avaliada através de um gráfico de sinais em função da concentração ou conteúdo do analito, utilizando métodos estatísticos apropriados para o cálculo da linha de regressão, em alguns casos pode ser necessária uma transformação matemática dos dados antes da análise de regressão (ICH, 2005). Sendo que é considerado como um ajuste ideal, quando se obtém um coeficiente de correlação dos dados para a linha de regressão maior que 0,999 (RIBANI et al., 2004).

A International Conference on Harmonisation (ICH) recomenda que para o estabelecimento da linearidade seja utilizado um mínimo de 5 concentrações para construção da curva analítica (ICH, 2005), enquanto que, a IUPAC recomenda que utilize no mínimo seis valores de concentrações espaçados uniformemente na faixa de concentração de interesse (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A partir da análise de regressão é possível obter uma equação para quantificação de um composto desejado. Os dados para obtenção do modelo matemático podem ser obtidos por métodos de padronização externa, padronização interna; superposição de matriz; adição padrão (RIBANI et al., 2004).

1.6.3. Intervalo

O ICH (2005) definiu o intervalo de um procedimento analítico como sendo aquele entre a concentração superior e inferior do analito na amostra para o qual foi demonstrado que o procedimento analítico tem um nível adequado de precisão, exatidão e linearidade.

A IUPAC recomenda que o intervalo da curva analítica deve abranger 0-150% ou 50-150% da concentração provável de ser encontrada e deve ser executada pelo menos em duplicata (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

A faixa de trabalho ou aplicação compreende as concentrações nas quais foi atingida a linearidade, construindo a curva analítica correspondente (RIBANI et al., 2004).

1.6.4. Precisão

A Precisão de um procedimento expressa a proximidade da concordância entre os resultados medidos em testes independentes realizados a partir de múltiplas amostras da mesma amostra homogênea, em condições prescritas, sendo especificadas em termos do desvio padrão ou desvio padrão relativo (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Para métodos que são utilizados para quantificar substâncias em grandes quantidades o desvio padrão relativo (RSD) desejado é de 1 a 2%, e para métodos que analisam impurezas ou traços são aceitos desvio padrão relativo de até 20%. Uma alternativa para aumentar a precisão é a utilização de um número maior de replicatas (RIBANI et al., 2004).

Conforme as orientações da ICH (2005), a análise da precisão de um método deve ser considerada em três níveis, sendo: a repetibilidade (precisão intra-ensaio), precisão intermediária e reprodutibilidade.

1.6.4.1. Repetibilidade (precisão intra-ensaio)

A concordância dos resultados de análises sucessivas realizadas sob as condições determinadas por um mesmo método em um curto espaço de tempo representa a repetitividade, podendo também ser denominada como precisão intra-ensaio (RIBANI et al., 2004).

A ICH (2005) recomenda que para verificar a repetitividade sejam utilizadas no mínimo nove determinações dentro do intervalo especificado para o método, por exemplo, três níveis,

três repetições cada um; ou então, a utilização de no mínimo seis determinações a uma concentração semelhante à concentração esperada.

1.6.4.2. Precisão intermediária

Precisão intermediária expressa os efeitos das variações que podem ocorrer nas análises de uma amostra em um laboratório quando ocorrem eventos distintos, tais como: dias, analistas ou equipamentos diferentes; ou uma combinação destes fatores. Ela representa a variabilidade dentro do mesmo laboratório, sendo que o principal objetivo é verificar se o método proposto irá fornecer os mesmos resultados (RIBANI et al., 2004).

O ICH (2005) recomenda que o número de ensaios necessários para se avaliar a precisão intermediária seja de pelo menos três repetições e a US-FDA (2018) considera um mínimo cinco repetições, assim, é desejável que se utilize de 3 a 5 replicações.

1.6.5. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é definido como a menor quantidade que pode ser detectada de um analito em uma amostra, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Para RIBANI et al. (2004) para o cálculo do limite de detecção pode ser utilizado três métodos a seguir:

- a) O método visual consiste na utilização da matriz com a adição de concentrações conhecidas da substância de interesse, de forma possa fazer a distinção entre o sinal analítico e ruído pela menor concentração que for detectável.
- b) O método da relação sinal-ruído é aplicado apenas em métodos analíticos nos quais são possíveis visualizar o ruído da linha de base, e assim, para determinar essa relação, é comparado os sinais de amostras da substância de interesse em concentrações, o mais baixo possível, conhecidas na matriz e um branco destas amostras. Sendo que é aceitável estimar a relação sinal-ruído entre 3:1 ou 2:1 (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).
- c) O método baseado em parâmetros da curva analítica é aquele que utiliza os dados de uma curva analítica que utiliza uma matriz que contenha a substância de interesse

com a concentração próxima ao limite de detecção. Podendo ser expresso segundo a equação:

$$LD = 3,3 * \frac{S}{S} \quad (1)$$

Onde:

- S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica;
- s é a estimativa do desvio padrão da resposta, podendo ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação.

1.6.6. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade da substância de interesse numa amostra que pode ser quantitativamente determinada com precisão e exatidão adequadas, sendo este, um parâmetro importante para ensaios quantitativos para baixas concentrações de compostos em amostras, tais como, a determinação de impurezas ou produtos de degradação (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Segundo RIBANI et al. (2004) o limite de quantificação pode utilizar os mesmos critérios de cálculo que o limite de detecção utilizando a relação sinal ruído de 10:1. Podendo ser expresso pela equação:

$$LQ = 10 * \frac{S}{S} \quad (2)$$

Onde:

- S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica;
- s é a estimativa do desvio padrão da resposta, podendo ser a estimativa do desvio padrão do branco, da equação da linha de regressão ou do coeficiente linear da equação.

1.6.7. Exatidão

A exatidão de um método analítico expressa a proximidade da concordância entre o valor que é aceito como um valor verdadeiro e o valor encontrado (ICH, 2005).

A exatidão é medida quantitativamente em termos de “tendência”, ou seja, uma menor tendência indica uma maior veracidade. Para calcular essa tendência é feita uma avaliação estatística dos resultados, sendo recomendado o teste de significância (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Assim, a exatidão é considerada dentro de um limite definido e à um dado nível de confiança, podendo este limite ser pequeno para concentrações mais elevadas e maior para concentrações em níveis de traços (RIBANI et al., 2004).

Para determinar o cálculo da exatidão a ICH (2005) estabelece que seja utilizada no mínimo nove determinações, nas quais envolva três níveis distintos de concentração.

Os métodos mais utilizados, segundo RIBANI et al. (2004), para avaliar a exatidão são:

- a) Materiais de referência certificados (CRM) que são aqueles materiais que possuem um valor de concentração de uma certa substância ou outra grandeza para cada parâmetro e uma incerteza associada conhecidos e acompanhados de um certificado. Sendo que são fornecidos por entidades reconhecidas e confiáveis, tais como: NIST (“National Institute of Standards and Technology” - USA), LGC (“Laboratory of the Government Chemist” - UK), entre outros.
- b) Comparação de métodos, consiste na comparação dos resultados obtidos pelo método em estudo com os resultados obtidos por um método de referência, e assim é avaliado o grau de proximidade entre o resultado do método em estudo com os do método de referência.
- c) Ensaio de recuperação, consistem na “fortificação” da amostra, ou seja, é feita a adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado, refletindo a quantidade de determinada substância, recuperada, em relação à quantidade real presente na amostra (BRITO et al., 2003). A recuperação de determinada substância pode ser calculada pela equação:

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{(\text{valor obtido} - \text{valor real})}{\text{valor real}} * 100 \quad (3)$$

- d) Adição padrão, é o método que consiste em adicionar quantidades conhecidas da substância em níveis distintos de concentração em uma matriz da amostra. Geralmente é adicionada 25, 50 e 100% da concentração esperada da substância na matriz.

1.6.8. Robustez

A robustez é a resistência à mudança nos resultados produzidos por um método analítico frente à pequenos desvios feitos nas condições experimentais descritas no procedimento (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002). E que lida com o efeito de fatores experimentais inerentes ao procedimento analítico (por exemplo, temperatura, composição da fase móvel, comprimento de onda de detecção, pH, etc.), no resultado analítico (ICH, 2005).

Um método é considerado robusto quando ele não é afetado por modificações pequenas e deliberadas em seus fatores, as alterações introduzidas a análise de robustez refletem as alterações que podem ocorrer na utilização do método em outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004).

A análise de robustez é baseada em um procedimento conhecido como teste de Youden, que consiste na escolha de sete fatores influentes, na escolha da condição nominal e das variações inferior e superior, e a partir de um arranjo experimental fatorial, são realizados oito ensaios com a combinação dos efeitos selecionados e assim, verifica-se quais efeitos ou combinação de efeitos podem apresentar variações (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

1.7. Conformidade do sistema

A etapa inicial para a análise de amostras e a validação de um método, consiste em verificar a conformidade do sistema, que é o conjunto de testes que irá garantir que o equipamento utilizado gere resultados com exatidão e precisão aceitáveis (RIBANI et al., 2004).

A aplicabilidade do método é um conjunto de características que cobrem, além das especificações de desempenho, informações sobre a identidade do analito, faixa de concentração coberta, tipo de matriz do material considerado para validação, o protocolo correspondente (descrevendo equipamentos, reagentes, procedimento analítico, incluindo calibração, bem como procedimentos de qualidade e precauções de segurança) e a aplicação pretendida (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

A conformidade do sistema pode ser avaliada por duas abordagens, sendo que a primeira considera que a resolução e a repetitividade do sistema cromatográfico sejam adequadas para a análise a ser realizada, e a segunda considera o sistema como um todo e inclui, além do sistema

cromatográfico, a calibração e manutenção dos equipamentos e instrumentos utilizados em todo o procedimento analítico, dentro das especificações (RIBANI et al., 2004).

Conforme a US-FDA (1994), para garantir a conformidade de análises cromatográficas devem ser avaliados o tempo de retenção de pico, a área de pico, o número de pratos teóricos e fator de rejeição ou assimetria para a amostra.

TABELA 1 - Parâmetros de conformidade do sistema e recomendações para análise de conformidade em cromatografia conforme a US-FDA.

Parâmetro	Recomendações da US-FDA
Fator de retenção (k)	O pico deve estar bem separado de outros picos e do pico correspondente ao tempo de retenção de um composto não retido (tM), $k > 2$.
Precisão/Repetitividade nas injeções (RSD)	RSD < 1% para $n > 5$
Resolução (Rs)	$R_s > 2$ entre o pico de interesse e o interferente potencial mais próximo (impureza, excipiente, degradação produto, padrão interno, etc.).
Fator de cauda (TF)	$TF \leq 2$
Número de pratos teórico da coluna (N)	Em geral deve ser > 2000 para CLAE.

Fonte: (US-FDA, 1994).

1.8. Separação

1.8.1. Adsorção

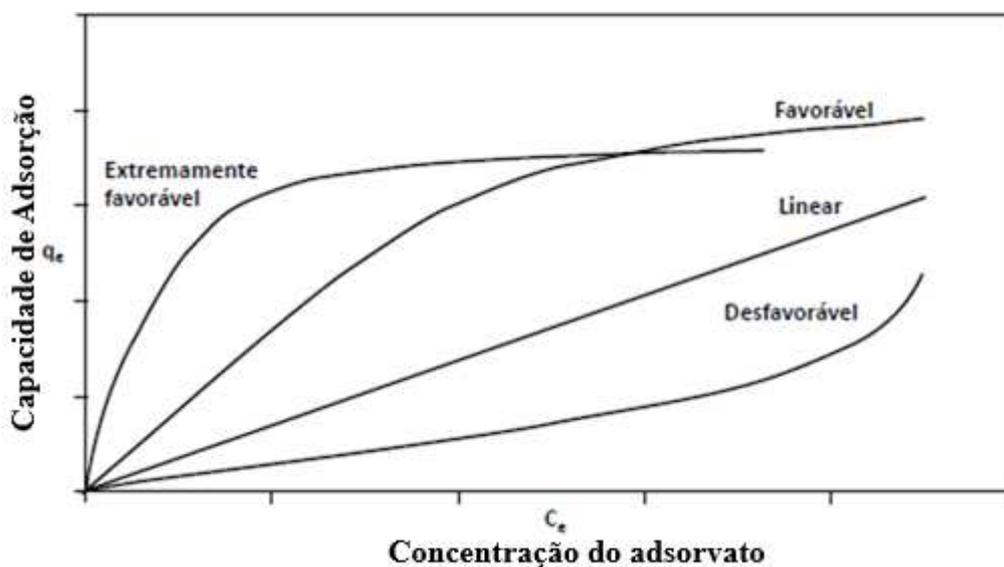
GOMIDE (1988) define a adsorção como sendo uma operação de transferência de massa do tipo sólido-fluido, na qual é utilizada a capacidade de alguns sólidos em concentrar na superfície determinadas substâncias encontradas em soluções gasosas ou líquidas, permitindo a separação destas das demais substâncias que fazem parte destas soluções. A adsorção pode ser dividida em adsorção física ou química, sendo que a adsorção física, é a mais interessante para indústria, pois pode ser desfeita na maioria das vezes.

Segundo RUTHVEN (1984) uma vez que as substâncias presentes nas soluções (adsorbato) são adsorvidas, elas passam a concentrar na superfície externa do sólido

(adsorvente), e quanto maior a superfície externa for por unidade de massa, mais favorável será a adsorção.

O processo para obtenção de uma isoterma de adsorção é simples, no qual uma massa de adsorvente é adicionada à um determinado volume em soluções com concentrações iniciais diferentes e conhecidas. Assim, quando é estabelecido o equilíbrio de adsorção, é possível encontrar concentração final do soluto na solução em equilíbrio e também a capacidade de adsorção do adsorvente. A partir destes resultados pode-se construir um gráfico, figura 6, para representar as isotermas de adsorção, que são capazes de fornecer informações importantes quanto ao mecanismo da adsorção (NASCIMENTO et al., 2014).

FIGURA 6 - Formas possíveis de isotermas de adsorção.



Fonte: MOREIRA, (2008).

Muitos modelos matemáticos foram propostos para descrever a adsorção, podendo ter dois ou mais parâmetros para ajustar os dados experimentais. Dentre eles, os mais utilizados são as equações de Langmuir e Freundlich, pois além de apresentarem apenas dois parâmetros, são capazes de prever a capacidade máxima de adsorção do material possuindo a capacidade de descrever os dados experimentais (NASCIMENTO et al., 2014).

1.8.1.1. Isotherma de Langmuir

É uma das equações mais utilizadas para representação de processos de adsorção, cuja as principais hipóteses adotadas pelo modelo são: há um número definidos de sítios; cada sitio

pode ser ocupada por apenas uma molécula; a energia de cada sitio é equivalente e as moléculas adsorvidas não interagem umas com as outras; e a adsorção ocorrem em uma monocamada. A equação 4, representa a isoterma de Langmuir (LANGMUIR, 1918):

$$q = \frac{Q_{max}K_L C_e}{1 + K_L C_e} \quad (4)$$

Onde:

- q é a quantidade do soluto adsorvido por grama de adsorvente no equilíbrio (mg g^{-1});
- Q_{max} é a capacidade máxima de adsorção (mg g^{-1});
- K_L é a constante de interação adsorvato/adsorvente (L mg^{-1});
- C_e é a concentração do adsorvato no equilíbrio (mg L^{-1}).

1.8.1.2. Isoterma de Freundlich

A equação proposta por Freundlich relaciona a quantidade de material adsorvido e a concentração do material na solução em um modelo a partir de características empíricas, sendo que ele pode ser aplicado para sistemas não ideais, em adsorção em multicamada e em superfícies heterogêneas (CIOLA, 1981; MCKAY, 1996). Este modelo considera um sólido heterogêneo e para isso pode ser aplicado uma distribuição exponencial para identificar os diferentes tipos de sítios de adsorção, pois eles possuem energias adsorptivas diferentes (FEBRIANTO et al., 2009).

A equação (5) da isoterma de Freundlich assume a forma:

$$q_e = K_F C_e^{1/n} \quad (5)$$

Onde:

- q_e é a quantidade do adsorbato adsorvida no equilíbrio (mg g^{-1})
- C_e é a concentração do adsorbato no equilíbrio (mg L^{-1})
- $K_F [(\text{mg g}^{-1}) (\text{L mg}^{-1})^{1/n}]$ e n são as constantes de Freundlich, K_F representa a capacidade de adsorção e n representa a intensidade do processo de adsorção.

1.9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Tamiflu. Fosfato de oseltamivir. Disponível em:

<www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9710392015&pIdAnexo=2932954>. Acesso em: 15 dez. 2018.

AYDOGDU, A.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Fabrication of gallic acid loaded Hydroxypropyl methylcellulose nanofibers by electrospinning technique as active packaging material. *Carbohydrate Polymers*, v. 208, p. 241–250, mar. 2019.

BARRETO, J. R. S.; SILVA, G. H. Estudo da interação química entre aroeira e lagarta predadora. Parte 1: Avaliação do teor de ácido gálico nas folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e fezes da lagarta *Automeris* sp. Recife, PE: 65^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2013

BOCHKOV, D. V. et al. Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. *Journal of Chemical Biology*, v. 5, n. 1, p. 5–17, 24 jan. 2012.

BRASIL, M. DA S. Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

BRITO, N. M. et al. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, v. 13, n. Supplement 1, p. 301–585, 31 dez. 2003.

CAMARGO, A. J. A. DE et al. Coleções Entomológicas: Legislação brasileira, Coleta, Curadoria e Taxonomia para as principais Ordens. 1. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2015.

CAO, Y.; WARNER, R. D.; FANG, Z. Effect of chitosan/nisin/gallic acid coating on preservation of pork loin in high oxygen modified atmosphere packaging. *Food Control*, v.

101, p. 9–16, jul. 2019.

CARDOSO, J. H.; SILVEIRA, J. V. D. L. Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* raddi). Embrapa Clima Temperado-Fôlder/Folheto/Cartilha (INFOTECA-E), 2010.

CARDOSO, S. F.; LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R. Eichhornia crassipes: An advantageous source of shikimic acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 4, p. 439–442, jul. 2014.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 15, n. 1, p. 158–169, 2013.

CIOLA, R. Fundamentos da Catálise. 1^a ed. São Paulo, SP: Moderna, 1981.

COSTA LIMA, A. M. DA. Insetos do Brasil: lepidópteros. Escola Nacional de Agronomia. Série Didática, n. 8, 1950.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia um breve ensaio. *Química nova na escola*, v. 7, n. 1, 1998.

ESCALANTE, A. et al. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*, p. 35, 2014.

FEBRIANTO, J. et al. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials*, v. 162, n. 2–3, p. 616–645, mar. 2009.

FEUEREISEN, M. M. et al. Characterization of Phenolic Compounds in Brazilian Pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Exocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 26, p. 6219–6226, 2 jul. 2014.

GOMIDE, R. Operações unitárias: operações de transferência de massa. 1^a ed. São Paulo, SP: [s.n.]. v. 4. 1988.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 227–238, mar. 2007.

ICH, I. C. ON H. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonization, 2005

IYER, S. V. et al. Method for obtaining Shikimic Acid World Intellectual Property Organization, , 2007.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: *Fundamentos de cromatografia*. Campinas, SP: UNICAMP, 2006.

KARAMAC, M.; KOSINSKA, A.; PEGG, R. Content of gallic acid in selected plant extracts. *Polish journal of food and nutrition sciences*, v. 15, n. 1, p. 55–58, 2006.

LANGMUIR, I. The adsorption of gases on plane surfaces of glass, mica and platinum. *Journal of the American Chemical society*, v. 40, n. 9, p. 1361–1403, 1918.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. *Biology of the insect midgut*. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.

MARTIN, E. et al. Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.): Extraction of Shikimic Acid Coupled to Dilute Acid Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, n. 6, p. 1660–1668, 27 nov. 2010.

MCKAY, G. *Characterization of Adsorbents: Use of adsorbents for the Removal of Pollutants from wastewater*. 1. ed. [s.l.] CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1996.

MOREIRA, S. DE A. Adsorção de íons metálicos de efluente aquoso usando bagaço do

pedúnculo de caju: estudo de batelada e coluna de leite fixoMestrado) Pós-Graduação em Engenharia Civil, UFC, Fortaleza - CE, 2008.

NASCIMENTO, R. F. et al. Adsorção: Aspectos teóricos e aplicações ambientais. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará (UFC). [s.l: s.n.]. 2014.

NATION, J. L. Insect physiology and biochemistry. 2º ed. [s.l.] CRC press, 2008.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. Ecologia nutricional de insetos e suas implicacoes no manejo de pragas. [s.l.] Manole, 1991.

RAFAEL, J. A.; DE MELO, G. A. R.; DE CARVALHO, C. J. B. Insetos do Brasil: diversidade e taxonomia. [s.l.] Holos Editora, 2012.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. Química Nova, 2004.

ROCHE. Factsheet Tamiflu. 2006. Disponível em:
<www.roche.com/med_mbtamiflu05e.pdf>.

RUTHVEN, D. M. Principles of adsorption and adsorption processes. [s.l.] John Wiley & Sons, 1984.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. [s.l.] Artmed Editora Ltda, 2017.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. [s.l: s.n.].2012.

SPECHT, A.; CORSEUIL, E.; FORMENTINI, A. C. Lepdópteros de Importância Médica Ocorrentes no Rio Grande do Sul - IV. Lasiocampidae. Biociências, v. 14, n. 1, p. 53–60, 2006.

STRAPASSON, M.; SANTOS, Á. F. DOS; MEDEIROS, A. C. DE S. Fungos Associados às Sementes de Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*) Seed-Borne Fungi Associated with *Schinus terebinthifolius*. Revista Pesquisa Florestal Brasileira, n. 45, p. 131–135, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, v. 74, n. 5, p. 835–855, 1 jan. 2002.

US-FDA, U. S. F. AND D. A. Reviewer Guidance: validation of chromatographic methods Center for Drug Evaluation Research, 1994.

US-FDA, U. S. F. AND D. A. Guidance for Industry: Bioanalytical method validation. U S Food and Drug Administration, 2018.

USUKI, T. et al. Extraction and isolation of shikimic acid from Ginkgo biloba leaves utilizing an ionic liquid that dissolves cellulose. Chemical Communications, v. 47, n. 38, p. 10560, 2011.

Artigo 1: VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA A DETERMINAÇÃO DE ÁCIDO CHIQUÍMICO E ÁCIDO GÁLICO EM FOLHAS DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI E EM FEZES DE LAGARTAS DO GÊNERO *AUTOMERIS* SP UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Bruno Garcia Lima¹, Geraldo Humberto Silva^{1*}.

*1 – Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Campus de Rio Paranaíba, Rodovia MG 230 km 7, CEP 38810-000, Rio Paranaíba - MG, Brazil. *e-mail: silvagh@ufv.br*

Resumo

O ácido chiquímico é o precursor do fármaco Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®), um dos poucos fármacos disponíveis no mercado para tratamento da gripe A (H1N1), possuindo um alto valor de mercado. Sua extração comercial é realizada a partir, apenas, do anis estrelado chinês (*Illicium verum* Hook.f.), demanda a busca de novas fontes. Trabalhos prévios realizados no laboratório mostrou que uma fonte alternativa para produção de ácido chiquímico é o uso de folhas de *S. terebinthifolius* Raddi diretamente ou fezes obtidas da lagarta *Automeris* alimentadas com suas folhas. Esta é uma planta de fácil propagação, pouco exigente em fertilidade do solo, e utilizada para recuperação de área degradada. Para otimizar o processo de extração e purificação e controlar o teor de ácido chiquímico nas folhas e produto final foi desenvolvido e validado um método analítico por CLAE DAD. O sistema cromatográfico teve como fase estacionária, coluna Luna C18(2), 4,6 x 250 mm (5 µm), sob a temperatura de 40 °C, detecção em 235 e 240 nm. A fase móvel foi composta por ácido acético 0,01%, sob vazão de 1 mL.min⁻¹. O método analítico desenvolvido permite separar e quantificar simultânea o ácido chiquímico (ACC) e ácido gálico (ACG) nas folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e fezes da lagarta *Automeris* sp., apresenta um fator de retenção de 1,44 e 6,75, fator de cauda de 1,214 e 1,089, para o ACC e ACG, respectivamente, além de um número de pratos teóricos acima de 2000. O método atende os parâmetros de validação exigidos nas diretrizes da United States Food and Drug Administration. Os coeficientes de correlação da análise de regressão linear obtido a partir da solução padrão foi de 0,9983 e 0,9992, para o ACC e ACG, respectivamente, com um intervalo de trabalho de 0 a 150%. Os limites de detecção e de quantificação para o ACC e ACG foram de 0,0120 e 0,0364; e 0,0079 e 0,0239 mg.mL⁻¹, respectivamente. As análises realizadas a partir das soluções preparadas com os padrões de ACC e ACG, apresentaram repetibilidade (desvio padrão relativo de 0,47 % e 0,78 %), precisão intermediária (desvio padrão relativo de 1,65% e 2,00 %), e recuperação satisfatórias (acima de 93,04 ± 0,84% e 96,94 ± 1,20). O método foi considerado robusto, através da análise pelo método de Youden & Steiner, e seletivo para quantificação de ACC e ACG nas condições avaliadas e foi considerado validado.

Palavras-chaves: *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS*, ÁCIDO CHIQUÍMICO, ÁCIDO GÁLICO, CLAE, VALIDAÇÃO.

1. Introdução

O Ácido Chiquímico (ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-tri-hidroxiciclo-hex-1-eno -carboxílico) é um ácido orgânico encontrados nas plantas, e é precursor dos aminoácidos aromáticos, foi isolado pela primeira vez em 1885, a partir da flor do Anis Estrelado Japonês (*Illicium anisatum*). Apresenta em sua estrutura química centros quirais que o torna um importante intermediário na biossíntese de compostos aromáticos no metabolismo de seres vivos (IYER et al., 2007).

O Ácido Chiquímico é utilizado para a síntese de produtos farmacêuticos, como o fosfato de oseltamivir (Tamiflu®), um pró-fármaco seletivo e com potente efeito inibidor das enzimas neuraminidase do vírus da gripe (influenza A e B). Estas enzimas são responsáveis pela disseminação do vírus infeccioso no organismo, pois permite a liberação de partículas virais recém-formadas das células infectadas. Desta forma o fosfato de oseltamivir inibe a replicação e a patogenicidade *in vivo* do mesmo e assim reduz a proliferação dos dois vírus (influenza A e B), pois inibe a liberação de vírus das células infectadas (ANVISA, 2018).

Segundo ROCHE, o processo de fabricação do Tamiflu® é complexo e envolve pelo menos 10 etapas, sua fabricação leva de 6 a 8 meses, e utiliza como matéria prima, o ácido chiquímico, que é extraído de uma variedade específica de anis estrelado (*Illicium verum* Hook.f.), que o produz maior quantidade. No entanto, esta espécie de anis requer condições climáticas específicas, sendo cultivado em apenas quatro províncias da China. Mesmo para essa variedade que produz mais ácido chiquímico, para cada quilograma de ácido são necessários 30 quilogramas de anis (ESCALANTE et al., 2014; ROCHE, 2006).

Novas fontes de ácido chiquímico têm sido objeto de estudo em todo o mundo, ao utilizar diferentes metodologias e matérias-primas. No entanto, somente em alguns tipos de plantas se consegue isolar o ácido chiquímico em maior quantidade, o que torna necessário a otimização dos processos de extração para que possam ser utilizados pela indústria (BOCHKOV et al., 2012). Dentre estes estudos, CARDOSO, LOPES e NASCIMENTO, (2014) conseguiram otimizar o processo de extração das folhas secas de *Eichhornia crassipes* e obteve rendimento de 2,7% m/m; MARTIN et al. (2010) utilizou como matéria prima a casca e pedaços de madeira da planta *Liquidambar styraciflua* L. conseguindo um rendimento de 1,68% e 0,20% m/m, respectivamente; USUKI et al. (2011) empregou uma técnica para dissolver a celulose das folhas da planta *Ginkgo biloba* e assim conseguiu um rendimento de 2,3% m/m.

Estudo realizado por FEUEREISEN et al. (2014), evidenciou através de análises por espectroscopia por RMN (ressonância magnética nuclear) a presença de derivados do ácido chiquímico no extrato obtido da planta popularmente conhecida como Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Em virtude disto, este trabalho propôs estudar a utilização das folhas da espécie *Schinus terebinthifolius* Raddi como fonte de ácido chiquímico.

A *Schinus terebinthifolius* Raddi ocorre em todo continente Sul Americano sendo encontrada em todo território brasileiro, de norte ao sul, em diferentes biomas, tais como: cerrado, caatinga e mata atlântica. Esta espécie vem sendo utilizada para recuperação de áreas degradadas, como ambientes contaminados por compostos químicos e recuperação de matas ciliares, segundo Barbosa et al. (2003) no Estado de São Paulo ela é utilizada em 70% dos projetos com esta finalidade, *S. terebinthifolius* também é utilizada na medicina popular contra febre, problemas do trato urinário, cistites, uretrites, blenorragia, problemas menstruais com excesso de sangramento, e gripes (BARBOSA et al., 2003; SOUZA; LORENZI, 2012; STRAPASSON; SANTOS; MEDEIROS, 2002).

Em estudos fitoquímicos realizados para avaliar as propriedades farmacológicas das folhas, cascas e sementes de *S. terebinthifolius* Raddi, foram identificadas as ocorrências de terpenos, flavonóides, ácidos graxos, fenóis, taninos, óleos essenciais em diferentes níveis de concentração. Porém, em grande parte destes estudos pouca atenção foi dada para a quantificação dos compostos químicos presentes na planta, ficando restritos à identificação dos compostos (CARVALHO et al., 2013).

As plantas servem como habitat para outros seres vivos fazendo o papel de hospedeiras, o que possibilitam a sobrevivência de outras espécies parasitas. SPECHT, CORSEUIL e FORMENTINI (2006) verificaram que duas espécies de lepidópteros, a *Automeris melanops* (Walker) e *Leucanella viridescens* (Walker) predam folhas da planta *S. terebinthifolius* Raddi, já BARRETO e SILVA (2013) verificaram que nas fezes da lagarta *Automeris* sp. alimentadas com folhas de *S. terebinthifolius* Raddi a quantidade de ácido gálico foi 487 vezes maior que nas folhas.

Segundo PANIZZI e PARRA (1991), as folhas compõem a principal biomassa da planta e representam a melhor fonte de nutrientes para as lagartas dos lepidópteros. As lagartas ao serem alimentadas com as folhas, durante o seu processo digestivo, os alimentos são hidrolisados, pela ação das enzimas digestivas, e transformando macromoléculas complexas em moléculas mais simples para serem absorvidas. No entanto, no trato intestinal dos insetos, nem todos os componentes são absorvidos, podendo assim, ocorrer a concentração de uma

determinada substância que está presente nas folhas consumidas (LEHANE; BILLINGSLEY, 2012; NATION, 2008).

Através da análise de ensaios preliminares dos extratos aquosos das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e das fezes da lagarta *Automeris* sp., utilizando um sistema CLAE com uma solução de ácido acético como fase móvel e uma coluna C18 como fase estacionária, foram identificados o ácido chiquímico e o ácido gálico como substâncias majoritárias. Este que pode ser encontrado nas plantas como derivado da rota metabólica do ácido chiquímico, na forma de ácidos livres, ésteres, derivados de catequina e de taninos hidrolisáveis (AYDOGDU; SUMNU; SAHIN, 2019; KARAMAC; KOSINSKA; PEGG, 2006; SIMÕES et al., 2017).

Portanto, neste trabalho, o principal objetivo foi desenvolver e validar um método Cromatográfico de Alta Performance (CLAE) específico e simples para a quantificação das substâncias ácido chiquímico e ácido gálico presentes nas folhas da planta *S. Terebinthifolius* Raddi e nas fezes das lagartas *Automeris* sp. alimentadas com elas para dar suporte ao desenvolvimento de uma nova metodologia para produção de ácido chiquímico destas matérias primas.

2. Experimental

2.1. Reagentes e produtos químicos

Os materiais utilizados para o desenvolvimento do método analítico proposto foram os seguintes: Ácido Clorídrico com pureza acima de 99.99%, adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), Ácido Gálico com pureza acima de 98%, adquirido da Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, São Paulo, Brasil), Metanol grau CLAE adquirido da J.T.Baker (Bridgewater, New Jersey, Estados Unidos da América), água ultrapura que foi purificada utilizando um sistema Milli-Q Plus (Millipore) com condutividade de 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Ácido Acético Glacial P.A adquiridos juntos à ISO FAR (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

2.2. Material vegetal e fezes da lagarta *Automeris* sp.

As amostras das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi, foram coletadas de vários exemplares de plantas, na Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba, posteriormente estas amostras foram secas em estufa por 7 dias a 45 °C, moídas em moinho de faca tipo cróton, peneiradas para homogeneizar o tamanho das partículas da amostra e acondicionadas em ambiente refrigerado para a obtenção dos extratos em etapa posterior.

As amostras de fezes de lagartas da espécie *Automeris* sp., foram obtidas de espécimes coletados na Universidade Federal de Sergipe no *Campus* Prof. Aloísio de Campos em São Cristóvão/SE, as quais foram criadas em laboratório utilizando gaiolas fabricadas com material reciclado. E diariamente o procedimento de limpeza, troca do alimento (folhas de *S. terebinthifolius* Raddi) e coleta das fezes foi realizado. As fezes foram coletadas, secas para evitar a proliferação de micro-organismos e acondicionadas em ambiente seco para a obtenção dos extratos em etapa posterior.

2.3. Equipamentos

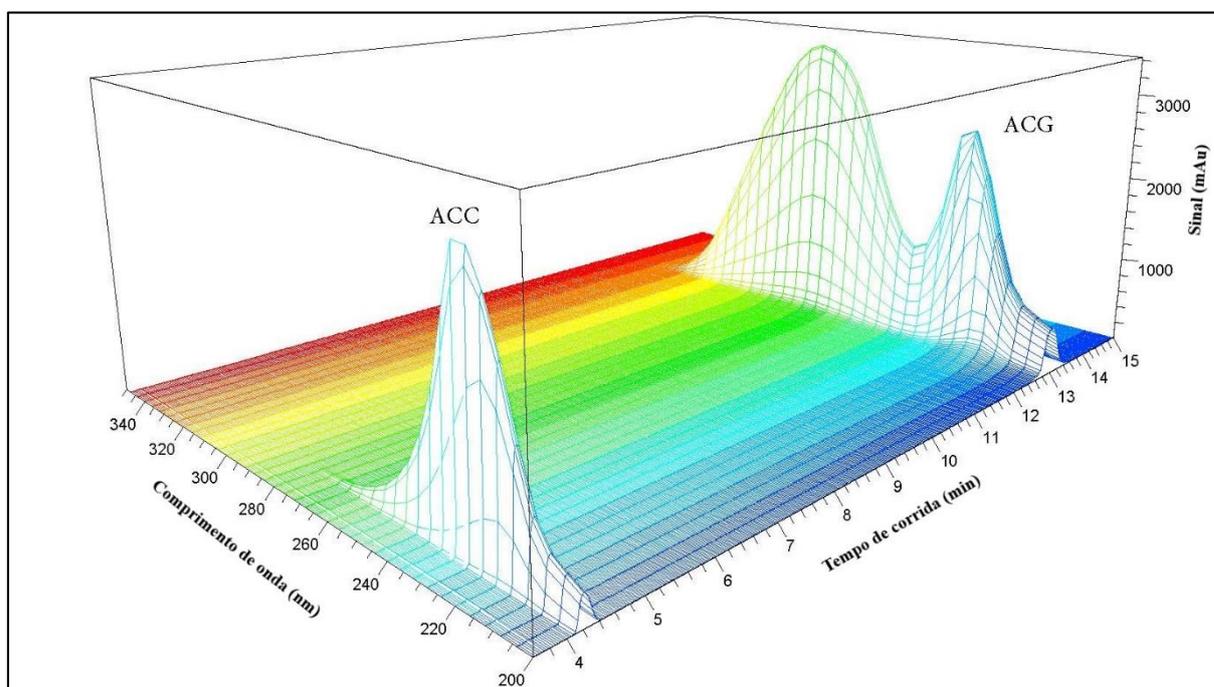
A análise cromatográfica foi realizada utilizando o sistema Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA) equipado com bomba G7111B 1260 Quat, amostrador automático G7129A 1260 Vialsampler, detector G7117C 1260 DAD HS, coluna

Luna C18(2) (Phenomenex; Torrance, CA, EUA, 4.6 mm ID x 250 mm, 5 μm) e coluna ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA, 4.6 mm ID x 250 mm, 5 μm). O software de cromatografia, OpenLab CDS ChemStation Edition, foi utilizado para o controle de equipamentos, aquisição de dados e análises.

2.4. Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas no modo de eluição isocrática, sendo a fase móvel constituída de uma solução de ácido acético a 0,1%, foi utilizada uma vazão de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, a temperatura da coluna foi ajustada a 40 $^{\circ}\text{C}$, o volume de injeção foi de 20 μL e o comprimento de onda utilizado foi de 240 nm para detecção simultânea de ácido chiquímico e ácido gálico durante um período de 16 min de corrida, como pode ser demonstrado pela figura 1. Para a análise foi utilizada área total dos picos.

FIGURA 1 – Cromatograma com os espectros de absorção para os padrões de ácido chiquímico (ACC) e ácido gálico (ACG).



[ACC] e [ACG] = 0,20 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; Fase móvel = solução 0,1% ácido acético; Fase estacionária = coluna C18(2) luna. Fonte: elaborado pelo autor.

2.5. Preparação de soluções padrão e de amostra

Conforme as recomendações da IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002), foram preparadas soluções estoque com o padrão de ácido chiquímico e de ácido gálico com uma concentração de 1 mg.mL^{-1} , em triplicata, que foram dissolvidos em água purificada. A partir destas soluções para o ácido chiquímico foram feitas 12 diluições (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 225, 250, 275 e $300 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) e para o ácido gálico foram feitas 6 diluições (50, 100, 150, 200, 250 e $300 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) para obter soluções padrão a diferentes concentrações dentro intervalo dos intervalos de interesse.

Soluções foram preparadas diariamente a partir das amostras trituradas das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e das fezes da lagarta *Automeris* sp., pesando-se com o auxílio de um balança analítica 500 mg e 300 mg, respectivamente, e diluídas em água ultrapura nas proporções de 1:50, 1:100 e 1:150. A extração foi realizada através método de decocção, com o auxílio de uma autoclave, para que fosse possível a utilização de uma temperatura 100 a 120 °C com a pressão variando de 0 a 1 kfg.cm⁻².

As soluções das amostras antes de serem injetadas no sistema CLAE foram filtradas utilizando filtros para seringa CROMAFIL XTRA PTFE 0,45 μm da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), assim a concentração de ácido chiquímico e ácido gálico foram analisadas e determinadas a partir da curva analítica previamente construída.

2.6. Método de validação

O método de CLAE foi validado de acordo com as diretrizes da International Conference on Harmonisation - ICH (ICH, 2005) e da International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002) nos termos dos parâmetros analíticos a seguir: especificidade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exatidão e robustez.

2.6.1. Adequação do sistema

A avaliação da aplicabilidade do sistema foi realizada conforme as diretrizes da United States Food and Drug Administration (US-FDA, 1994), nas quais para garantir a conformidade

das análises cromatográficas devem ser avaliados os do tempo de retenção de pico, área de pico, pratos teóricos e fator de rejeição ou assimetria para a amostra.

2.6.2. Especificidade e seletividade

A especificidade foi utilizada para determinar a capacidade do método analítico de medir com precisão as concentrações de ácido chiquímico e ácido gálico presentes nas amostras de folhas e fezes sem que ocorram interferências devido outras substâncias que possam estar presentes.

Neste trabalho, a especificidade e a seletividade foram avaliadas por comparação das áreas dos picos dos cromatogramas correspondentes às soluções de padrões de ácido chiquímico e ácido gálico e também em extratos das folhas e das fezes, que contém possíveis substâncias interferentes.

2.6.3. Linearidade

A linearidade do método para a determinação do ácido chiquímico foi avaliada pelo preparo de uma curva analítica a partir de 12 (doze) soluções preparadas, em triplicata, pela diluição de uma solução com concentração de 1 mg.mL^{-1} do padrão do ácido chiquímico, na faixa de concentração de 0,025 a $0,300 \text{ mg.mL}^{-1}$, espaçadas uniformemente.

Para a determinação do ácido gálico, a linearidade do método foi avaliada pelo preparo de uma curva analítica a partir de 6 (seis) soluções preparadas, em triplicata, a partir da diluição de uma solução com concentração de 1 mg.mL^{-1} do padrão do ácido gálico, na faixa de concentração de 0,05 a $0,300 \text{ mg.mL}^{-1}$, espaçadas uniformemente.

Para obtenção dos dados foram injetados 20 microlitros de cada solução diluída, nas condições cromatográficas descritas anteriormente. Os resultados foram submetidos à análise de regressão linear análise de variância ANOVA com nível mínimo de significância estabelecido em $p < 0,05$.

2.6.4. Limites de detecção e quantificação

Para calcular os limites de detecção e quantificação foi utilizado o método baseado em parâmetros da curva analítica, no qual foi utilizado os dados de uma curva analítica construída

a partir de uma matriz que continha a substância de interesse com a concentração próxima ao limite de detecção, sendo expressos segundo as equações:

$$(1) LD = 3,3 * \frac{s}{S} \qquad (2) LQ = 10 * \frac{s}{S}$$

Onde:

- S é a inclinação (“slope”) ou coeficiente angular da curva analítica;
- s é a estimativa do desvio padrão dos resíduos da curva analítica.

2.6.5. Precisão

A precisão foi avaliada em três níveis diferentes: precisão e repetibilidade do método (precisão intra-dia) e precisão intermediária (precisão inter-dias). Para o método em estudo no qual envolve quantificar substâncias em grandes quantidades, o desvio padrão relativo (RSD) recomendado é de 1 a 2% (RIBANI et al., 2004).

2.6.5.1. Repetibilidade do método.

A repetibilidade do método foi avaliada pela análise, no mesmo dia, de seis soluções padrão dos ácidos chiquímico e gálico com uma concentração próxima ao valor esperado nas matrizes analisadas e injetadas em triplicata.

2.6.5.1. Precisão intermediária

A precisão intermediária foi avaliada pela análise, de seis soluções padrão dos ácidos chiquímico e gálico com uma concentração próxima ao valor esperado, injetadas em triplicata por cinco dias consecutivos.

2.6.6. Exatidão

A exatidão foi avaliada comparando o valor teórico com a porcentagem de recuperação encontrada a partir da concentração média de cinco amostras do extrato aquoso de folhas de *S.*

terebinthifolius enriquecido com ácido chiquímico e ácido gálico em três níveis de concentração diferentes, e foi determinado para cada nível o desvio padrão relativo (RSD).

2.6.7. Robustez

A robustez foi avaliada pelo teste Youden & Steiner, um procedimento que consiste na escolha de sete fatores influentes, na escolha da condição nominal e das variações inferior e superior, onde a partir de um arranjo experimental fatorial, foram realizados oito ensaios, utilizando soluções feitas com os padrões, com a combinação dos efeitos selecionados e assim, verificou-se quais efeitos ou combinação de efeitos apresentavam variações (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007).

A Tabela 1 mostra as condições utilizadas para o teste, no qual as condições nominais são representadas por letras maiúsculas e as variações são representadas por letras minúsculas. As soluções preparadas a partir dos padrões de ácido chiquímico e ácido gálico com concentrações de 0,12 e 0,11 mg.mL⁻¹, respectivamente, foram usadas para cada ensaio.

TABELA 1 - Parâmetros e variações utilizados no teste Youden & Steiner para avaliar a robustez do método utilizando soluções com os padrões de Ácido Chiquímico e Ácido Gálico

Parâmetros	Condições		Combinação dos ensaios							
	Nominal	Variação	1	2	3	4	5	6	7	8
(P1) Concentração de ácido acético na fase móvel (%)	0,10	0,15	A	A	A	A	a	a	a	A
(P2) Temperatura da coluna (°C)	40	42	B	B	b	b	B	B	b	B
(P3) Vazão da fase móvel (mL.min ⁻¹)	1,0	1,1	C	c	C	c	C	c	C	C
(P4) Fornecedor coluna	Phenomenex Luna C18(2)	Agilent Zorbax Eclipse Plus C18	D	D	d	d	d	d	D	D
(P5) Marca do ácido acético	Isofar	Proquimios	E	e	E	e	e	E	e	E
(P6) Comprimento de onda (nm)	240	235	F	f	f	F	F	f	f	F
(P7) Volume de injeção (µL)	20	22	G	g	g	G	g	G	G	G
Resultados			s	t	u	v	w	x	y	Z

Condições normais = A, B, C, D, E, F, G; Condições variadas = a, b, c, d, e, f, g.

Fonte: elaborado pelo autor.

3. Resultados e discussão

3.1. Otimização do método cromatográfico

O método proposto foi desenvolvido com o objetivo de fornecer um método analítico simples e otimizado para determinação via CLAE de ácido chiquímico e ácido gálico presentes nas folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e nas fezes das lagartas *Automeris* sp.

Os parâmetros e as condições cromatográficas foram ajustados para se obter resultados confiáveis após uma análise simples dos picos presentes nos cromatogramas, com uma melhor resolução de pico, procurando assim reduzir o tempo de execução e análise e também o custo de análise.

O procedimento foi baseado inicialmente em estudos anteriores realizados pelo grupo de pesquisa e assim, foi utilizada uma eluição isocrática na fase móvel, na qual se buscou otimizar a concentração do solvente, sendo que foram testadas como fase móvel soluções contendo água purificada, solução de ácido acético 0,1% e solução de ácido acético 0,2%. Para que fosse obtido um cromatograma com a melhor separação dos picos das substâncias em estudo.

Porém, as concentrações presentes nas amostras de folhas e fezes eram relativamente grandes, o que causou uma saturação no detector nos comprimentos de onda ideais para cada substância (223 nm para o ácido chiquímico e 270 nm para o ácido gálico).

Para resolver este problema foi selecionado o comprimento de onda de 240 nm para que fosse possível uma detecção simultânea para o ácido chiquímico e ácido gálico e foi definida como a fase móvel que se obteve a melhor separação dos picos a solução de ácido acético a 0,1%, o que resultou em um tempo de corrida de aproximadamente 15 minutos e uma resolução (R) entre os picos do ácido chiquímico e gálico igual a 11,138.

Os parâmetros de adequação resultantes da otimização cromatográfica para validação do método são apresentados na Tabela 2.

TABELA 2 – Adequação do sistema cromatográfico para análise dos ácidos chiquímico e gálico

Parâmetro	Ácido Chiquímico	Ácido Gálico	Critérios de aceitação
Área do pico	4973,72 ± 6,73	11590,2 ± 15,36	-
Tempo de retenção (Rt) (min)	4,470 ± 0,004	14,197 ± 0,049	-
Fator de retenção (k)	1,442 ± 0,002	6,758 ± 0,027	k > 2
Fator de cauda (TF)	1,214 ± 0,008	1,089 ± 0,008	TF ≤ 2
Número teórico de pratos (N)	12127,6 ± 26,1	19021,0 ± 26,9	N > 2000

Cada valor denota a média ±% CV (n = 3); [ACC] = 0,12 mg.mL⁻¹; [ACG] = 0,11 mg.mL⁻¹.

Fonte: elaborado pelo autor.

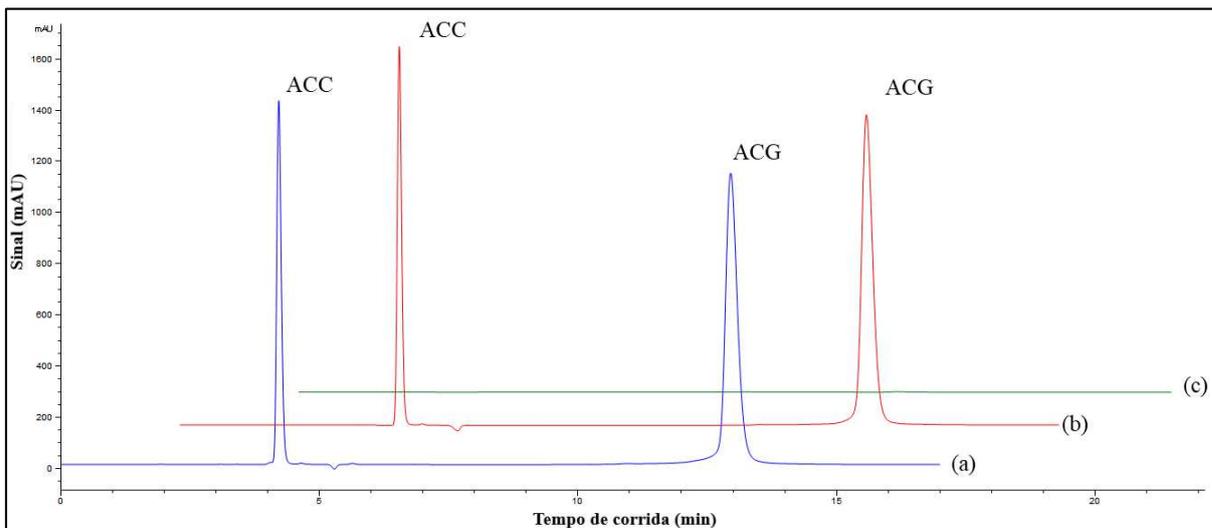
3.2. Método de validação

3.2.1. Especificidade e seletividade

Para avaliar a especificidade e a seletividade foram preparadas soluções com concentrações conhecidas dos padrões de ácido chiquímico e ácido gálico e soluções a partir do extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e do extrato aquoso das fezes da lagarta *Automeris* sp. enriquecidos com os padrões.

As amostras foram injetadas utilizando três fases móveis distintas, uma contendo apenas água ultrapura, uma solução a 0,1% de Ácido Acético e uma solução a 0,2% de Ácido Acético, para a verificação de inexistência de co-eluição ou interferentes e assim a escolha da fase móvel adequada, sendo que a solução a 0,1% de Ácido Acético foi a que apresentou os melhores cromatogramas, como é observado na figura 2.

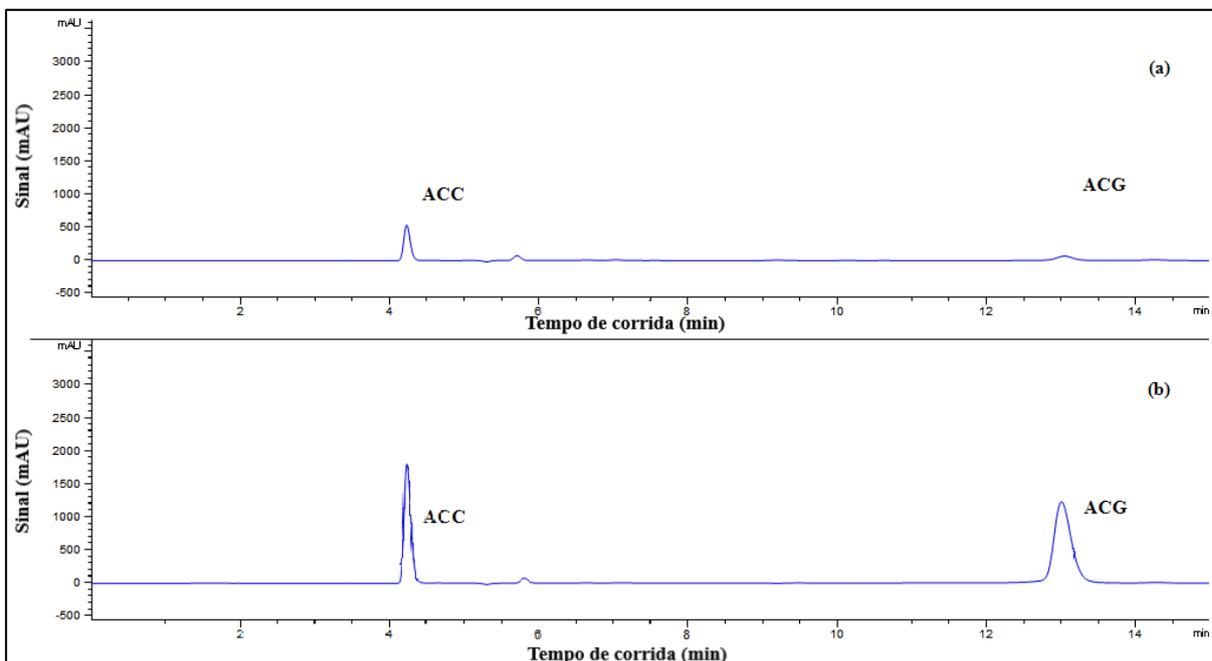
FIGURA 2 – Cromatograma dos padrões de ácido chiquímico (ACC) e ácido gálico (ACG).



Fase móvel: (a) = ácido acético 0,1%; (b) = ácido acético 0,2%; (c) água pura. Amostra: solução padrão de [ACC] e [ACG] = 0,10 mg.mL⁻¹. Fonte: elaborado pelo autor.

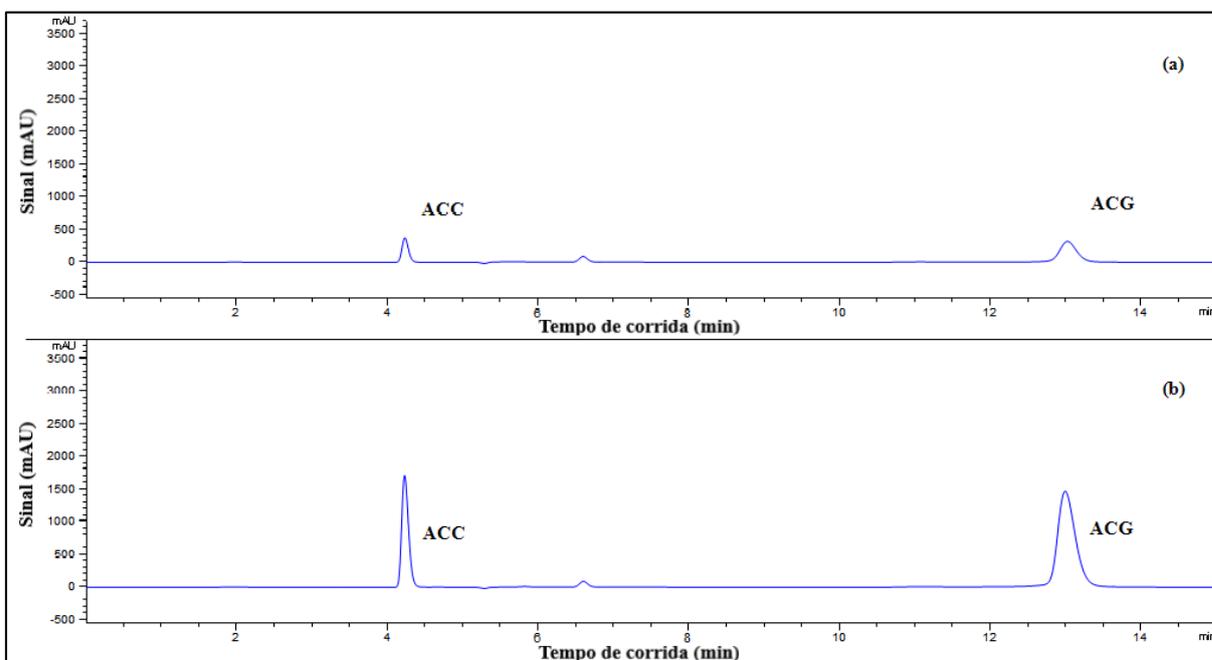
Após a escolha da fase móvel foram injetadas as soluções preparadas, e assim, foram avaliadas por comparação das áreas dos picos dos cromatogramas correspondentes às soluções de padrões de ácido chiquímico e ácido gálico, com os picos presentes nas amostras dos extratos de folhas e de fezes, como podem ser observados nas figuras 3 e 4.

FIGURA 3 – Cromatograma das amostras do extrato aquoso das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi



(a) extrato das folhas: [ACC] = 0,10 mg.mL⁻¹; [ACG] = 0,02 mg.mL⁻¹; (b) extrato das folhas enriquecido: [ACC] = 0,22 mg.mL⁻¹; [ACG] = 0,12 mg.mL⁻¹; Fonte: elaborado pelo autor.

FIGURA 4 – Cromatograma das amostras do extrato das fezes da lagarta *Automeris* sp.



(a) extrato das fezes: [ACC] = 0,072 mg.mL⁻¹; [ACG] = 0,078 mg.mL⁻¹; (b) extrato das fezes enriquecido: [ACC] = 0,189 mg.mL⁻¹; [ACG] = 0,182 mg.mL⁻¹; Fonte: elaborado pelo autor.

3.2.2. Linearidade

A linearidade do método para a determinação do ácido chiquímico e ácido gálico foi avaliada pelo preparo das curvas analíticas sendo os resultados submetidos à análise de regressão linear (tabela 3 e 4) e análise de variância ANOVA (tabelas 3 e 4), com nível mínimo de significância estabelecido em $p < 0,05$. O teste *t* aplicado aos dados utilizados para obtenção das curvas analíticas mostra que a regressão linear foi significativa, tanto para a inclinação quanto para o intercepto para os dois ácidos.

TABELA 3 – Análise estatística da regressão linear para determinação do Ácido Chiquímico

	Estimativa	t-estatística	p-valor
Inclinação	40028,14 ± 281,87	2,3687	0,02367
Intercepto	122,85 ± 51,86	142,0074	9,494E-49
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9983		

Cada valor denota a média ± DP (n = 3). Fonte: elaborada pelo autor.

TABELA 4 – Análise estatística da variância para determinação do Ácido Chiquímico

Parâmetro	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p-valor
Regressão	429603812	1	429603812	20166,12	9,494E-49
Resíduos	724310	34	21303,24		

Cada valor denota a média ± DP (n = 3). Fonte: elaborada pelo autor.

TABELA 5 – Análise estatística da regressão linear para determinação do Ácido Gálico

	Estimativa	t-estatística	p-valor
Inclinação	99230,91 ± 656,13	3,46	0,003223
Intercepto	442,08 ± 127,76	151,24	1,119E-26
Coefficiente de correlação (r^2)	0,9992		

Cada valor denota a média ± DP (n = 3). Fonte: elaborada pelo autor.

TABELA 6 – Análise estatística da variância para determinação do Ácido Gálico

Parâmetro	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	F	p-valor
Regressão	1292389133	1	1292389133	22872,76	1,119E-26
Resíduos	904054	16	56503		

Fonte: elaborada pelo autor.

3.2.3. Limites de detecção e quantificação

Para determinar os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) (tabela 7) foram utilizadas as equações (1) e (2), e com o auxílio dos parâmetros obtidos nas curvas de calibração construídas com os padrões do Ácido Chiquímico e Ácido Gálico.

TABELA 7 – Limites de detecção e quantificação utilizando soluções preparadas com os padrões de ácido chiquímico e ácido gálico

	Ácido Chiquímico	Ácido Gálico
Limite de detecção (mg.mL ⁻¹)	0,0120	0,0079
Limite de quantificação (mg.mL ⁻¹)	0,0364	0,0239

Fonte: elaborada pelo autor.

3.2.4. Precisão

A precisão foi analisada através da repetibilidade (precisão intra-dia) e da precisão intermediária (inter-dias).

Para análise da repetibilidade foram injetadas seis amostras preparadas com os padrões de ácido chiquímico e ácido gálico, pelo mesmo analista e dia, com concentrações 0,12 mg.mL⁻¹ e 0,11 mg.mL⁻¹, respectivamente, próximas a 100% a concentração de trabalho, conforme apresentado nas tabelas 6 e 7, sendo obtidos um DPR de 0,47 a 2,81% para o ácido chiquímico e de 0,78 a 3,72% para o ácido gálico, estes que ficaram dentro do valor recomendando para a validação do método (DPR ≤ 5 %).

Para análise da precisão intermediária foram injetadas seis amostras de soluções dos padrões de ácido chiquímico e ácido gálico, pelo mesmo analista, durante o intervalo de cinco dias, a uma concentração 0,12 mg.mL⁻¹ e 0,11 mg.mL⁻¹, respectivamente, próximas a 100% a concentração de trabalho, conforme apresentado nas tabelas 8 e 9, sendo obtidos um DPR de

1,65 % para o ácido chiquímico e de 2,00% para o ácido gálico, estes que focaram dentro do valor recomendando para a validação do método ($DPR \leq 5\%$).

TABELA 8 – Análise da precisão para o Ácido Chiquímico utilizando soluções preparadas com o padrão

Concentração nominal (mg/mL)	Dia	Concentração medida (mg/mL) ^a	Precisão ^b
			Variação intra-dia (n = 6)
0,12	1	0,1183 ± 0,0034	2,81
	2	0,1175 ± 0,0010	0,89
	3	0,1191 ± 0,0013	1,06
	4	0,1185 ± 0,0015	1,25
	5	0,1202 ± 0,0006	0,47
			Variação inter-dias (n = 6x5)
		0,1187 ± 0,0020	1,65

^a Cada valor denota a média ± DP (n = 6). ^b Cada valor denota a % CV. Fonte: Elaborada pelo autor.

TABELA 9 – Precisão para o Ácido Gálico utilizando soluções preparadas com o padrão

Concentração nominal (mg/mL)	Dia	Concentração medida (mg/mL) ^a	Precisão ^b
			Variação intra-dia (n = 6)
0,11	1	0,1099 ± 0,0041	3,72
	2	0,1111 ± 0,0009	0,78
	3	0,1106 ± 0,0024	2,14
	4	0,1107 ± 0,0014	1,31
	5	0,1111 ± 0,0015	1,35
			Variação inter-dias (n = 6x5)
		0,1107 ± 0,0022	2,00

^a Cada valor denota a média ± DP (n = 6). ^b Cada valor denota a % CV. Fonte: Elaborada pelo autor.

3.2.5. Exatidão

Para a avaliação da exatidão foram preparadas, em quintuplicata, três soluções a partir do extrato aquoso da folha de *S. terebinthifolius* Raddi e do extrato aquoso das fezes da lagarta *Automeris* sp., com concentrações definidas, nas quais foram adicionados os padrões de ácido chiquímico (ACC) e ácido gálico (ACG) com concentrações próximas a 40%, 70% e 100 das concentrações teóricas do teste.

Foi utilizado o método de adição padrão, no qual quantidades conhecidas dos padrões de referência foram adicionadas aos extratos das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e das fezes da lagarta *Automeris* sp. com concentrações definidas de ácido chiquímico (0,106 e 0,072 mg.mL⁻¹, respectivamente) e ácido gálico (0,023 e 0,078 mg.mL⁻¹, respectivamente).

A determinação da exatidão foi avaliada pela média da porcentagem de recuperação da solução preparada com os padrões de ácido chiquímico e ácido gálico, que foram adicionadas às amostras de extrato das folhas e das fezes, obtidas pela equação (3):

$$Recuperação (\%) = \frac{(\text{valor obtido} - \text{valor real})}{\text{valor real}} * 100 \quad (3)$$

Sendo encontrados um percentual de recuperação para do ácido chiquímico entre 96,22 a 97,75% na amostra fortificada do extrato aquoso das folhas, e entre 96,94 a 98,84% na amostra fortificada do extrato aquoso das fezes, conforme a tabela 10. E para o ácido gálico foram encontrados um percentual de recuperação para o ácido chiquímico entre 93,04 a 98,90% na amostra fortificada do extrato aquoso das folhas, e entre 99,57 a 99,77% na amostra fortificada do extrato aquoso das fezes, conforme a tabela 11.

TABELA 10 – Exatidão para o Ácido Chiquímico pelo método de adição padrão.

Amostra	Concentração original (mg.mL⁻¹)	Concentração adicionada (mg.mL⁻¹)	Concentração medida (mg.mL⁻¹)^a	% Recuperação^a
Folhas	0,106	0,048	0,1522 ± 0,0008	97,75 ± 1,76
		0,083	0,1858 ± 0,0011	96,22 ± 1,32
		0,119	0,2204 ± 0,0013	96,46 ± 1,13
Fezes	0,072	0,048	0,1198 ± 0,0004	98,84 ± 0,94
		0,083	0,1530 ± 0,0010	96,94 ± 1,20
		0,119	0,1892 ± 0,0013	98,30 ± 1,10

^a Cada valor denota a média ± DP (n = 5). Fonte: Elaborada pelo autor.

TABELA 11 – Exatidão para o Ácido Gálico pelo método de adição padrão.

Amostra	Concentração original (mg.mL⁻¹)	Concentração adicionada (mg.mL⁻¹)	Concentração medida (mg.mL⁻¹)^a	% Recuperação^a
Folhas	0,023	0,042	0,0625 ± 0,0003	93,04 ± 0,84
		0,074	0,0961 ± 0,0006	98,76 ± 0,76
		0,105	0,1274 ± 0,0011	98,90 ± 1,06
Fezes	0,078	0,042	0,1196 ± 0,0004	99,71 ± 1,00
		0,074	0,1512 ± 0,0012	99,77 ± 1,65
		0,105	0,1824 ± 0,0006	99,57 ± 0,54

^a Cada valor denota a média ± DP (n = 5). Fonte: Elaborada pelo autor.

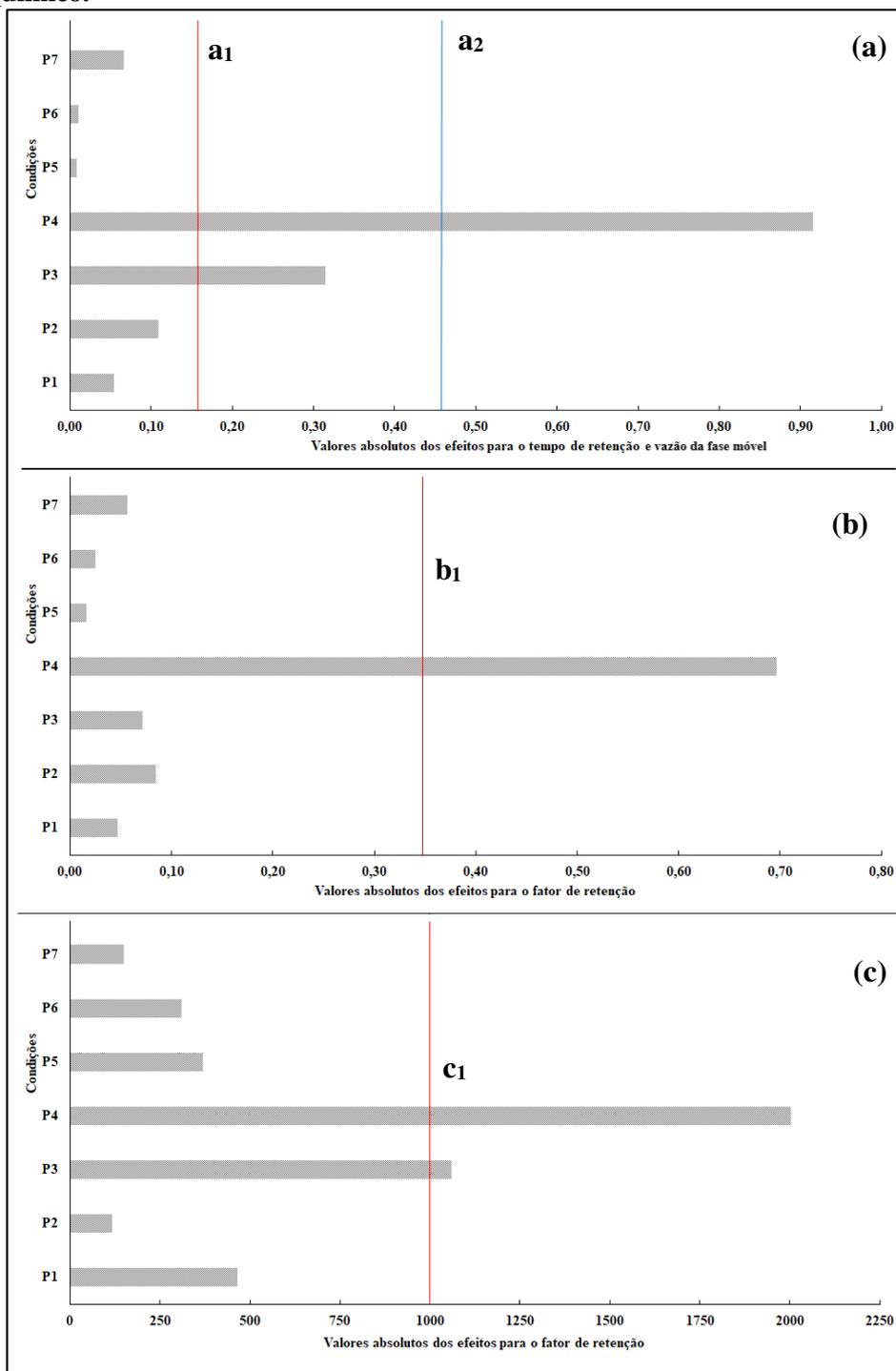
3.2.6. Robustez

A robustez do método analítico foi analisada pelo teste de Youden & Steiner, no qual o seu objetivo é introduzir muitas variações de uma vez e assim determinar os seus efeitos (GONZÁLEZ; HERRADOR, 2007), foi considerado para a análise dos efeitos o nível mínimo de significância de 5%. Para a análise foram preparadas soluções com os padrões de ácido chiquímico e ácido gálico com as concentrações de 0,12 mg.mL⁻¹ e 0,11 mg.ml⁻¹ para serem utilizadas em cada ensaio.

Nas análises realizadas para o ácido chiquímico, foram encontrados efeitos significativos no tempo de retenção em relação alteração na vazão da fase móvel ($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$), pois seu valor (0,31) é superior ao valor calculado do efeito (0,15), que é representado por uma linha azul na Figura 6a e na alteração do fornecedor da coluna, pois o valor do efeito (0,92) é superior ao valor calculado (0,45), que é representado por uma linha vermelha na figura 5a. Foi encontrado efeito significativo no fator de retenção em relação a alteração do fornecedor da coluna, pois o valor do efeito (0,69) é superior ao valor calculado (0,35), que é representado por uma linha vermelha na figura 5b. E também foi encontrado efeito significativo no número de pratos teóricos em relação a alteração do fornecedor da coluna, pois o valor do efeito (2003,4) é superior ao valor calculado (1001,7), que é representado por uma linha vermelha na figura 5c. Para todas as outras condições, o método foi considerado robusto, conforme representados na tabela 12.

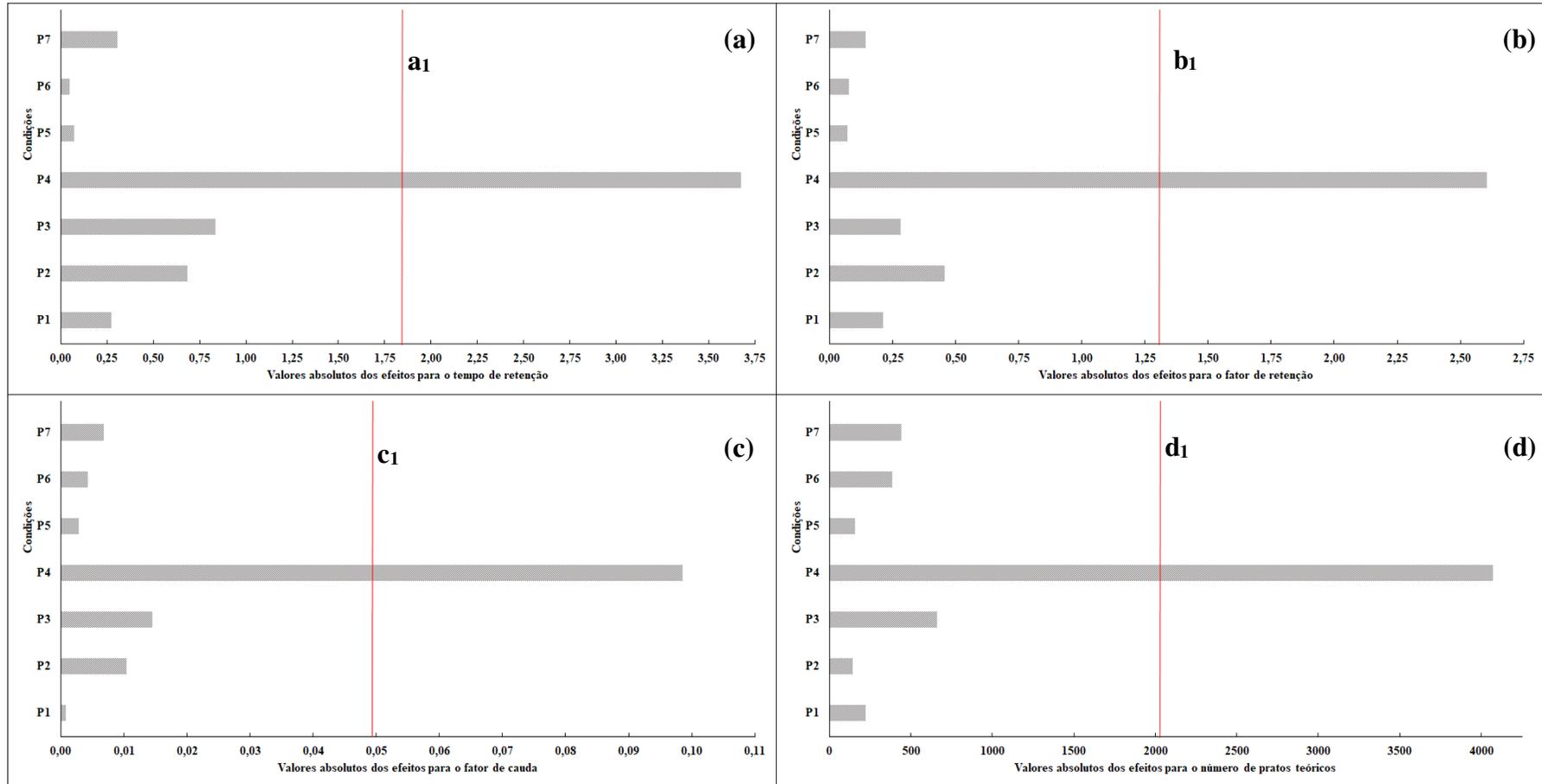
Nas análises realizadas para o ácido gálico houveram efeitos significativos com a alteração do fornecedor da coluna que causou alterações no tempo de retenção, pois o valor do efeito (3,68) é superior ao valor calculado (1,83), que é representado por uma linha vermelha na figura 6a, no fator de retenção pois o valor do efeito (2,61) é superior ao valor calculado (1,30), que é representado por uma linha vermelha na figura 6b, no fator de cauda pois o valor do efeito (-0,10) é inferior ao valor calculado (-0,05), que é representado por uma linha vermelha na figura 6c, e no número de pratos teóricos, pois o valor do efeito (4071,2) é superior ao valor calculado (2035,6), que é representado por uma linha vermelha na figura 6d. Para todas as outras condições, o método foi considerado robusto, conforme representados na tabela 12.

FIGURA 5 - Efeito das variações pelo teste de Youden para avaliar a robustez do método para o ácido chiquímico.



(P1) Concentração de ácido acético na fase móvel; (P2) Temperatura da coluna; (P3) Vazão da fase móvel; (P4) Fornecedor coluna; (P5) Marca do ácido acético; (P6) Comprimento de onda; (P7) Volume de injeção; (a₁) valor estimado para vazão; (a₂) valor estimado para o tempo de retenção; (b₁) valor estimado para o fator de retenção; (c₁) valor estimado para o fator de retenção. Fonte: Elaborada pelo autor.

FIGURA 6 - Efeito das variações pelo teste de Youden para avaliar a robustez do método para o ácido gálico.



(P1) Concentração de ácido acético na fase móvel; (P2) Temperatura da coluna; (P3) Vazão da fase móvel; (P4) Fornecedor coluna; (P5) Marca do ácido acético; (P6) Comprimento de onda; (P7) Volume de injeção. (a_1) valor estimado para o tempo de retenção; (b_1) valor estimado para o fator de retenção; (c_1) valor estimado para o fator de cauda; (d_1) valor estimado para o número de pratos teóricos. Fonte: Elaborada pelo autor.

TABELA 12 - Efeitos das variações obtidas pelo teste de Youden

Parâmetros	Área		Rt		k		TF		N	
	ACC	ACG	ACC	ACG	ACC	ACG	ACC	ACG	ACC	ACG
(P1) Concentração de ácido acético na fase móvel (%)	409,5	491,6	0,05	0,27	0,05	0,21	0,12	0,001	-464,6	-220,7
(P2) Temperatura da coluna (°C)	-180,6	170,8	0,11	0,69	0,08	0,46	-0,01	-0,010	118,4	142,2
(P3) Vazão da fase móvel (mL.min ⁻¹)	-1075,9	187,4	0,31*	0,83	-0,07	-0,28	-0,09	0,014	1059,6	657,8
(P4) Fornecedor coluna	223,5	1408,2	0,92*	3,68*	0,70*	2,61*	0,13	-0,099*	2003,4*	4071,2*
(P5) Marca do ácido acético	1573,3	724,4	0,01	0,07	0,02	0,07	0,04	0,003	-369,8	-156,2
(P6) Comprimento de onda (nm)	-1632,0	-820,4	0,01	0,05	0,03	0,08	-0,08	-0,004	308,9	383,3
(P7) Volume de injeção (µL)	-1872,6	-1933,0	0,07	0,31	-0,06	-0,14	0,08	-0,007	149,9	443,0

Rt = tempo de retenção (min); TF = fator de cauda; N= número teórico de pratos; k = fator de retenção; ACC = ácido chiquímico; ACG = ácido gálico. *

valores dos efeitos nos parâmetros que influenciaram significativamente a resposta.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4. Conclusões

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método analítico para quantificação das substâncias ácido chiquímico e ácido gálico presente nas folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi ou nas fezes das lagartas *Automeris* sp. visando sua aplicação para o desenvolvimento de um método alternativo para produção industrial de ácido chiquímico. O método analítico desenvolvido por CLAE DAD apresentou precisão e exatidão aceitáveis nas concentrações testadas e robustez pelo teste Youden. Portanto, conclui-se que o método desenvolvido é confiável dentro dos parâmetros analisados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Tamiflu. Fosfato de oseltamivir. Disponível em:

<www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9710392015&pIdAnexo=2932954>. Acesso em: 15 dez. 2018.

AYDOGDU, A.; SUMNU, G.; SAHIN, S. Fabrication of gallic acid loaded Hydroxypropyl methylcellulose nanofibers by electrospinning technique as active packaging material. *Carbohydrate Polymers*, v. 208, p. 241–250, mar. 2019.

BARBOSA, L. M. et al. Recuperação florestal com espécies nativas no estado de São Paulo: pesquisas apontam mudanças necessárias. *Florestar Estatístico*, v.6, n.1, p.28-34, 2003.

BARRETO, J. R. S.; SILVA, G. H. Estudo da interação química entre aroeira e lagarta predadora. Parte 1: Avaliação do teor de ácido gálico nas folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e fezes da lagarta *Automeris* sp. Recife, PE: 65^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2013

BOCHKOV, D. V. et al. Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. *Journal of Chemical Biology*, v. 5, n. 1, p. 5–17, 24 jan. 2012.

BRASIL, M. DA S. Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnpmf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

CARDOSO, S. F.; LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R. *Eichhornia crassipes*: An advantageous source of shikimic acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 4, p. 439–442, jul. 2014.

ESCALANTE, A. et al. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Research and Reports in Medicinal Chemistry*, p. 35, 2014.

FEUEREISEN, M. M. et al. Characterization of Phenolic Compounds in Brazilian Pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Exocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 26, p. 6219–6226, 2 jul. 2014.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 26, n. 3, p. 227–238, mar. 2007.

ICH, I. C. ON H. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). International Conference on Harmonization. *Anais*. 2005

IYER, S. V. et al. Method for obtaining Shikimic Acid World Intellectual Property Organization, , 2007.

KARAMAC, M.; KOSINSKA, A.; PEGG, R. Content of gallic acid in selected plant extracts. *Polish journal of food and nutrition sciences*, v. 15, n. 1, p. 55–58, 2006.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. *Biology of the insect midgut*. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.

MARTIN, E. et al. Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.): Extraction of Shikimic Acid Coupled to Dilute Acid Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, n. 6, p. 1660–1668, 27 nov. 2010.

NATION, J. L. *Insect physiology and biochemistry*. 2^o ed. [s.l.] CRC press, 2008.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicacoes no manejo de pragas*. [s.l.] Manole, 1991.

RIBANI, M. et al. *Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos*. Química Nova, 2004.

ROCHE. Factsheet Tamiflu. 2006. Disponível em:

<www.roche.com/med_mbtamiflu05e.pdf>.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: Do Produto Natural ao Medicamento. [s.l.] Artmed Editora Ltda, 2017.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. [s.l.: s.n.].

SPECHT, A.; CORSEUIL, E.; FORMENTINI, A. C. Lepdópteros de Importância Médica Ocorrentes no Rio Grande do Sul - IV. Lasiocampidae. Biociências, v. 14, n. 1, p. 53–60, 2006.

STRAPASSON, M.; SANTOS, Á. F. DOS; MEDEIROS, A. C. DE S. Fungos Associados às Sementes de Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*) Seed-Borne Fungi Associated with *Schinus terebinthifolius*. Revista Pesquisa Florestal Brasileira, n. 45, p. 131–135, 2002.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). Pure and Applied Chemistry, v. 74, n. 5, p. 835–855, 1 jan. 2002.

US-FDA, U. S. F. AND D. A. Reviewer Guidance: validation of chromatographic methods Center for Drug Evaluation Research, 1994.

USUKI, T. et al. Extraction and isolation of shikimic acid from Ginkgo biloba leaves utilizing an ionic liquid that dissolves cellulose. Chemical Communications, v. 47, n. 38, p. 10560, 2011.

Artigo 2: EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E SEPARAÇÃO DO ÁCIDO CHIQUÍMICO E DO ÁCIDO GÁLICO EM FOLHAS DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI E EM FEZES DE LAGARTAS DO GÊNERO *AUTOMERIS* SP

Bruno Garcia Lima¹, Geraldo Humberto Silva^{1*}.

*1 – Universidade Federal de Viçosa, Instituto de Ciências Exatas e Tecnológicas, Campus de Rio Paranaíba, Rodovia MG 230 km 7, CEP 38810-000, Rio Paranaíba - MG, Brazil. *e-mail: silvagh@ufv.br*

Resumo

O ácido chiquímico possui um alto valor comercial, devido ao fato de ser o precursor do fármaco Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®), um dos poucos fármacos disponíveis comercialmente para tratamento da gripe A (H1N1). Comercialmente é extraído apenas do anis estrelado chinês (*Illicium verum* Hook.f.), em virtude dessa dependência, é necessário buscar novas fontes desta matéria prima. Neste contexto, buscou-se desenvolver um processo utilizando conceito de química verde, onde lagartas predadoras do gênero *Automeris* sp. foram alimentadas com folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi, com objetivo de aumentar a concentração do ácido chiquímico na nova matriz, as fezes das lagartas. O objetivo deste trabalho foi de desenvolver e otimizar um método para a extração do ácido chiquímico (ACC) e ácido gálico (ACG), utilizando água quente, nas folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e fezes da lagarta *Automeris* sp e a posterior purificação do ACC. Assim, a extração foi otimizada ajustando os parâmetros de temperatura, tempo, granulometria, diluição e os extratores Soxhlet e autoclave. Dentre os fatores avaliados na etapa de extração, o que mais influenciou foi a temperatura, com a condição ótima a 110°C, com uso de autoclave. A máxima concentração nesta condição, para o ácido chiquímico foi de 3,7% m/m nas fezes e de 2,9% m/m nas folhas, evidenciando o aumento da concentração do ácido chiquímico nas fezes das lagartas em relação as folhas. O ACC e ACG foram separados com eficiência, através de uma extração em fase sólida, na qual extrato aquoso foi efluído, com uma vazão média de 7,46 mL.min⁻¹, através de uma coluna recheada com material adsorvente composto de carvão ativado e sílica-gel na proporção de 1:1. Foram determinadas as isotermas de adsorção, em fluxo, para os dois ácidos, sendo que a capacidade máxima de adsorção de ácido chiquímico, igual a 7,459 mg.g⁻¹, e do ácido gálico sendo igual a 55,780 mg.g⁻¹, calculadas pelo modelo de isoterma de Langmuir, ficando evidenciado que a coluna foi capaz de adsorver o ACG aproximadamente 7,48 vezes maior mais do que o ACC, sendo assim, após eluído na coluna, o extrato apresentou apenas o ACC purificado. Conclui-se que os métodos de extração e purificação desenvolvidos produzem resultados satisfatórios dentro dos parâmetros analisados.

Palavras-chave: EXTRAÇÃO; CROMATOGRAFIA LÍQUIDA; *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* RADDI; *AUTOMERIS*.

1. Introdução

O Ácido Chiquímico (ácido (3R,4S,5R)-3,4,5-tri-hidroxiciclo-hex-1-eno - carboxílico) é encontrado em várias plantas, pois é um precursor dos aminoácidos aromáticos e derivados indólicos tal ácido foi isolado pela primeira vez em 1885, a partir da flor do Anis Estrelado Japonês (*Illicium anisatum*), que é conhecida como Shikimi. O Ácido Chiquímico é uma substância opticamente ativa que contém três grupos hidroxila, o que a torna um dos principais intermediários na biossíntese de compostos aromáticos no metabolismo vivo (IYER et al., 2007).

O Ácido Chiquímico obtido de anis estrelado é utilizado para a síntese de produtos farmacêuticos, como o fosfato de oseltamivir, um pró-fármaco com capacidade de inibir a liberação de partículas virais de células infectadas com o vírus da gripe (influenza A e B), pois tal fármaco inibe de forma seletiva as enzimas neuraminidase necessárias à sua liberação. Desta forma inibi a replicação e a patogenicidade *in vivo* do mesmo, assim reduz a proliferação dos dois vírus (influenza A e B), pois inibe a liberação de vírus das células infectadas (ANVISA, 2018).

O processo de fabricação do Tamiflu® é complexo, pois envolve 10 etapas, o que o torna também demorado, sendo necessário de 6 a 8 meses para obtenção do fosfato oseltamivir (ROCHE, 2006).

O ácido chiquímico utilizado nesta síntese é extraído das vagens do anis estrelado (*Illicium verum* Hook.f.), proveniente de um quimiotipo específico que é cultivado em apenas quatro províncias da China, pois requer condições climáticas específicas, para o produzi-lo em maior quantidade. Mesmo para essa variedade que produz mais ácido chiquímico, para cada quilograma de ácido são necessários 30 quilogramas de anis (ESCALANTE et al., 2014).

Novas fontes de ácido chiquímico têm sido objeto de estudo em todo o mundo, ao utilizar diferentes metodologias e matérias-primas. No entanto, somente em alguns tipos de plantas se consegue isolar o ácido chiquímico em maior quantidade, o que torna necessário a otimização dos processos de extração para que então possam ser utilizados pela indústria (BOCHKOV et al., 2012).

Dentre estes estudos, CARDOSO et.al. (2014) ao utilizar as partes aéreas da planta *Eichhornia crassipes* secas obteve rendimento de 2,7% m/m na extração; MARTIN et al. (2010) utilizou como matéria prima a casca e pedaços de madeira da planta *Liquidambar styraciflua* L. conseguindo um rendimento de 1.68% e 0,20% m/m, respectivamente;

USUKI *et al.* (2011) empregou uma técnica para dissolver a celulose das folhas da planta *Ginkgo biloba* e assim conseguiu um rendimento de 2,3% m/m.

Em um estudo realizado por FEUEREISEN *et al.* (2014), ficou evidenciado através de análises por espectroscopia por RMN (ressonância magnética nuclear) a presença de derivados do ácido chiquímico no extrato obtido da planta popularmente conhecida como Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Em virtude disto, este trabalho propõe estudar a utilização das folhas da espécie *S. terebinthifolius* Raddi como fonte de ácido chiquímico.

Segundo STRAPASSON, SANTOS e MEDEIROS (2002), a *S. terebinthifolius* Raddi ocorre em todo continente Sul Americano e é encontrada em todo território brasileiro, de norte ao sul, em diferentes biomas, tais como: cerrado, caatinga e mata atlântica. A espécie *S. terebinthifolius* Raddi é considerada uma planta medicinal e na medicina popular é utilizada contra febre, problemas do trato urinário, cistites, uretrites, blenorragia, problemas menstruais com excesso de sangramento, e gripes (SOUZA; LORENZI, 2012).

A aroeira-vermelha pode atingir na idade adulta até 15 m de altura e 30 a 60 cm de diâmetro, podendo formar aglomerados de plantas originadas de sementes ou brotações de raiz. É também considerada como uma planta pioneira ou secundária inicial, podendo ocupar ambientes diferentes com grande capacidade. Suas flores são de coloração branco-amarelada a branco esverdeada, além de serem muito pequenas e numerosas. Seus frutos possuem uma coloração vermelha quando maduros possuindo de 4 a 5,5 mm de diâmetro, sendo que seu amadurecimento ocorre dos meses de maio a setembro (CARDOSO; SILVEIRA, 2010).

Em estudos fitoquímicos realizados nas folhas, cascas e sementes de *S. terebinthifolius* Raddi identificaram a ocorrência de terpenos, flavonóides, ácidos graxos, fenóis, taninos, óleos essenciais em diferentes níveis de concentração (CARVALHO *et al.*, 2013). A espécie teve sua importância reconhecida ao ser incluída na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), elaborada pelo Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas, que incentiva a pesquisa com plantas, exóticas adaptadas ou nativas (BRASIL, 2019).

As plantas em geral, muitas vezes servem como habitat para outros seres vivos fazendo o papel de hospedeiras, que possibilitam a sobrevivência de outras espécies parasitas. SPECHT; CORSEUIL e FORMENTINI (2006) ao verificar a incidência de

lepidópteros que possuem ocorrência no Rio Grande do Sul, verificou que a *S. terebinthifolius* Raddi é planta hospedeira de duas espécies de lepidópteros, sendo a *Automeris melanops* (Walker) e *Leucanella viridescens* (Walker).

Também foi citado por BARRETO e SILVA (2013) a incidência da lagarta *Automeris* sp. na planta *S. terebinthifolius* Raddi ao realizar um estudo no qual avaliou o teor de ácido gálico nas folhas da planta e nas fezes da lagarta, onde ficou evidenciado que o teor de ácido gálico encontrado nas fezes foi 487 vezes maior que o encontrado nas folhas.

Segundo PANIZZI e PARRA (1991), as folhas compõem a principal biomassa da planta e representam a melhor fonte de nutrientes para as lagartas dos lepidópteros, por isso sua fisiologia e comportamentos são afetados diretamente pelos componentes presentes nas folhas.

As lagartas ao serem alimentadas com as folhas, durante o seu processo digestivo, no qual os alimentos são hidrolisados e transformados, através da ação de enzimas presentes em seu trato intestinal, de macromoléculas complexas em moléculas mais simples para serem absorvidas. No entanto, no trato intestinal dos insetos, nem todos os componentes são digeridos e absorvidos, podendo assim, ocorrer a concentração de uma determinada substância que está presente nas folhas consumidas (LEHANE; BILLINGSLEY, 2012; NATION, 2008).

Neste trabalho, o objetivo de desenvolver e otimizar um método para a extração do ácido chiquímico (ACC) e ácido gálico (ACG), utilizando água quente, nas folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e fezes da lagarta *Automeris* sp e a posterior purificação do ACC, para que a *S. terebinthifolius* Raddi seja viável como fonte comercial de ácido chiquímico.

2. Materiais e métodos

2.1. Reagentes e produtos químicos.

Os materiais utilizados para o desenvolvimento do método analítico proposto foram os seguintes: Ácido Chiquímico com pureza acima de 99.99%, adquirido da Sigma Aldrich (St. Louis, Missouri, Estados Unidos da América), Ácido Gálico com pureza acima de 98%, adquirido da Dinâmica Química Contemporânea (Indaiatuba, São Paulo, Brasil), Metanol grau CLAE adquirido da J.T.Baker (Bridgewater, New Jersey, Estados Unidos da América), água ultrapura que foi purificada utilizando um sistema Milli-Q Plus (Millipore) com condutividade de 20 $\mu\text{S}/\text{cm}$, Ácido Acético Glacial P.A adquiridos juntos à ISOFAR (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil).

2.2. Material vegetal e fezes da lagarta *Automeris* sp

As amostras das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi, foram coletadas de sete exemplares da planta, de forma aleatória, na Universidade Federal de Viçosa - *Campus* Rio Paranaíba. As folhas foram secas em estufa por 7 dias a 45 °C, moídas em moinho de faca tipo cróton, peneiradas em três faixas de tamanhos de partícula, 0-300 μm , 300-450 μm ou 450-600 μm , para homogeneizar o tamanho das partículas da amostra e acondicionadas em ambiente refrigerado.

As amostras de fezes de lagartas da espécie *Automeris* sp., foram obtidas de espécimes coletados na Universidade Federal de Sergipe no *Campus* Prof. Aloísio de Campos em São Cristóvão/SE, as quais foram criadas em laboratório utilizando gaiolas fabricadas com material reciclado. A coleta das fezes foi diária seguida do procedimento de limpeza, troca do alimento (folhas de *S. terebinthifolius* Raddi). As fezes foram coletadas, secas para evitar a proliferação de micro-organismos e acondicionadas em ambiente seco para a obtenção dos extratos em etapa posterior.

2.3. Construção das curvas analíticas

Conforme as recomendações da IUPAC (Thompson et al., 2002), foram preparadas soluções estoque com o padrão de ácido chiquímico e de ácido gálico com uma concentração de 1,00 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, em triplicata, que foram dissolvidos em água

purificada, e a partir destas, foram feitas 12 diluições para obter soluções padrão a diferentes concentrações dentro intervalo de interesse (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o ácido chiquímico e 6 diluições para obter soluções padrão a diferentes concentrações dentro intervalo de interesse (50, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$) para o ácido gálico.

As condições de análise por cromatografia líquida de alta eficiência foram: sistema cromatográfico Agilent 1260 Infinity (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), fase estacionária Luna C18(2) (Phenomenex; Torrance, CA, EUA, 4.6 mm ID x 250 mm, 5 μm); fase móvel: sistema isocrático 0,1% CH_3COOH em água (v/v); vazão de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; volume de injeção: 20 μL ; temperatura de análise de 40 $^\circ\text{C}$; detecção a 240 nm.

2.4. Preparação das amostras

Foram preparadas diariamente soluções a partir das amostras trituradas das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e das fezes da lagarta *Automeris* sp., foram pesadas com o auxílio de um balança analítica 500 mg e 300 mg, respectivamente, e diluídas em água ultrapura nas proporções de 1:50, 1:100 e 1:150.

As soluções das amostras antes de serem injetadas no sistema CLAE foram filtradas utilizando filtros para seringa CROMAFIL XTRA PTFE 0,45 μm da Macherey-Nagel (Düren, Alemanha), assim a concentração de ácido chiquímico e ácido gálico foram analisadas e determinadas a partir da curva analítica previamente construída.

2.5. Extração

Para a análise por CLAE das amostras das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e das fezes da lagarta *Automeris* sp. diluídas em água ultrapura, nas proporções conforme descrito anteriormente, foi utilizado uma extração por decocção com auxílio de um sistema de autoclave para que fosse possível a utilização de uma temperatura entre 100 a 120 $^\circ\text{C}$ e uma pressão de 0 a 1 $\text{kgf}\cdot\text{cm}^2$. Foram utilizados planejamentos fatoriais de 2^4 e 2^3 com ponto central, para avaliar os fatores que influenciam a extração nas folhas e fezes, respectivamente, conforme as tabelas 1 e 2.

TABELA 1 – Planejamento Fatorial 2⁴ com ponto central para análise as amostras das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi

Ensaio	Temperatura	Tempo	Granulometria	Diluição
1	-1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1
4	1	1	-1	-1
5	-1	-1	1	-1
6	1	-1	1	-1
7	-1	1	1	-1
8	1	1	1	-1
9	-1	-1	-1	1
10	1	-1	-1	1
11	-1	1	-1	1
12	1	1	-1	1
13	-1	-1	1	1
14	1	-1	1	1
15	-1	1	1	1
16	1	1	1	1
17	0	0	0	0
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0

Onde as condições de análise foram as seguintes:

	-1	0	1
Temperatura (°C)	100	110	120
Tempo (min)	5	10	15
Granulometria (µm)	0-300	300-425	425-600
Diluição	1:50	1:100	1:150

Fonte: elaborada pelo autor.

TABELA 2 – Planejamento Fatorial 2³ com ponto central para análise as amostras das fezes das lagartas *Automeris* sp.

Ensaio	Temperatura	Tempo	Diluição
1	-1	-1	-1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	-1
5	-1	-1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0
12	0	0	0
13	0	0	0

Onde as condições de análise foram as seguintes:

	-1	0	1
Temperatura (°C)	100	110	120
Tempo (min)	5	10	15
Diluição	1:50	1:100	1:150

Fonte: elaborada pelo autor.

As extrações utilizadas para avaliar a recuperação foram feitas, em triplicata, o equipamento SOXHLET, utilizando a 1,0 g de amostra das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi com a granulometria na faixa de 0-300 µm, e metanol como solvente por um tempo de 72 horas, conforme descrito por (OHIRA et al., 2009), com o intuito de conseguir extrair todo ácido chiquímico presente na amostra e assim foram comparadas com a quantidade de ácido chiquímico obtido através da extração com o auxílio da autoclave, conforme a equação:

$$Recuperação (\%) = \frac{\text{ácido chiquímico na amostra via autoclave [mg]}}{\text{ácido chiquímico na amostra via soxhlet [mg]}} * 100\%$$

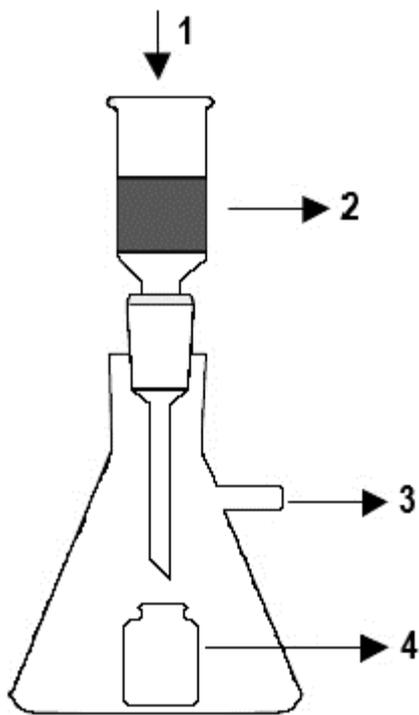
2.6. Purificação

Para o ensaio de purificação pode-se adotar um processo de adsorção, que pode ser realizado através de experimentos em batelada ou em fluxo. TAN, AHMAD e HAMEED (2008), após a realização de experimentos de adsorção em carvão ativado em batelada e em fluxo, melhores resultados foram obtidos para o processo em batelada, porém, para o processo em fluxo contínuo foi obtido uma menor capacidade de adsorção para as mesmas concentrações iniciais amostras utilizadas, devido ao fator de empacotamento do adsorvente na coluna que diminui a superfície de contato disponível para a adsorção.

Em virtude disso, para o ensaio de purificação do ácido chiquímico foi adotado um processo de adsorção em fluxo, utilizando como coluna de leito fixo, uma seringa descartável de plástico com 20 mm de diâmetro interno e 90 mm de comprimento, que foi disposta em um kitasato e ligada à uma bomba de vácuo para controlar o fluxo das amostras pela coluna, a uma vazão média de aproximadamente $7,45 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ a uma temperatura ambiente de $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Uma mistura contendo 1,00 g de carvão ativado (tamanho de partícula de 0,050 mm a 0,100 mm) com 1,00 g de sílica gel (tamanho de partícula de 0,063 mm a 0,210 mm), na proporção de 1:1, foi empacotada na coluna com uma camada de algodão na parte inferior, como mostra a figura 1.

Alíquotas de 10 mL da solução de extrato das fezes de *Automeris* sp. foram introduzida na coluna, sendo assim filtrado. As amostras de efluentes foram coletadas em intervalos especificados e analisadas quanto à concentração residual de ácido chiquímico e ácido gálico utilizando um sistema de cromatografia líquida (CLAE DAD) no comprimento de onda de 240 nm. Os estudos da coluna foram encerrados quando a coluna atingiu a exaustão.

FIGURA 1 - Diagrama esquemático da coluna para análise da adsorção



1. Alimentação da solução de extrato
2. Coluna com mistura de carvão-sílica
3. Ligação da bomba à vácuo
4. Reservatório para coleta do efluente

Fonte: Elaborada pelo autor.

3. Resultados e discussão

3.1. Extração

Para quantificar o ácido chiquímico presente nas folhas e nas fezes, foram preparados ensaios utilizando a metodologia de análise fatorial 2^4 e 2^3 com ponto central, na qual foram avaliadas variações na temperatura, no tempo, na granulometria da amostra (para as folhas) e a diluição da amostra. Para os ensaios com a amostra das folhas foram pesadas 500 mg da amostra em uma balança analítica e para a amostra das fezes foram pesadas 300 mg, estas amostras foram então acondicionadas em erlenmeyers e posteriormente diluídas conforme determinado no planejamento fatorial e em seguida foram colocadas dentro de uma autoclave para realizar a extração por decocção, conforme a figura 2, em seguida os extratos obtidos foram filtrados e acondicionados em balões volumétricos de 100 mL.

FIGURA 2 – Extração com auxílio da autoclave.



Fonte: arquivo pessoal, 2019.

Em seguida os extratos foram injetados em um sistema de cromatografia líquida de alta pressão (CLAE DAD), utilizando uma eluição isocrática de uma solução de 0,1% de ácido acético, como fase móvel, e uma coluna Phenomenex Luna C18(2), como fase reversa, a uma temperatura de 40 °C e utilizando um comprimento de onda de 240 nm.

A partir da área dos picos presentes nos cromatogramas das amostras foi quantificado o ácido chiquímico presente em cada ensaio, sendo que para a amostra de

folhas foram encontrados um valor de 2,60 a 2,96% m/m da amostra (tabela 3), e para a amostra das fezes foi encontrado um valor de 3,28 a 3,86% m/m da amostra (tabela 4).

TABELA 3 – Ácido chiquímico presente na amostra de folhas

Ensaio	% peso (m/m)	Área do pico ($\lambda = 240 \text{ nm}$)
1	2,66	5445,0
2	2,64	5409,6
3	2,64	5409,5
4	2,61	5331,6
5	2,65	5407,5
6	2,69	5510,4
7	2,63	5347,1
8	2,64	5377,9
9	2,68	5484,0
10	2,69	5483,2
11	2,64	5383,8
12	2,66	5454,2
13	2,62	5321,4
14	2,63	5369,4
15	2,60	5293,8
16	2,66	5429,2
17	2,92	5945,0
18	2,93	5973,3
19	2,94	6018,3
20	2,96	6012,0
21	2,91	5943,3

Fonte: Elaborada pelo autor.

TABELA 4 – Ácido chiquímico presente na amostra de fezes

Ensaio	% peso (m/m)	Área do pico (240nm)
1	3,53	4385,9
2	3,49	4322,3
3	3,28	4077,5
4	3,50	4357,4
5	3,34	4158,6
6	3,59	4444,9
7	3,47	4289,7
8	3,48	4331,8
9	3,86	4788,6
10	3,64	4522,5
11	3,65	4532,9
12	3,70	4584,1
13	3,73	4617,1

Fonte: Elaborada pelo autor.

Para quantificar a quantidade de ácido chiquímico total presente nas amostras de folhas, foi utilizado o método de extração sucessiva, com auxílio do equipamento SOXHLET (figura 3), utilizando 1,00 g de amostra das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi com a granulometria na faixa de 0-300 μm , e metanol como solvente por um tempo de 72 horas a uma temperatura na manta de aquecimento próximo a 80 °C, conforme descrito por OHIRA *et al.* (2009), realizado em triplicada. Após a extração, as amostras foram preparadas e injetadas utilizando a mesma metodologia utilizada nas amostras que foram extraídas utilizando a autoclave e após a análise da área dos picos presentes nos cromatogramas destas amostras foi quantificado o ácido chiquímico total presente na amostra um valor médio de 2,639% m/m da amostra, com um desvio padrão relativo de 0,82%.

FIGURA 3 – Extração com auxílio do Soxhlet.



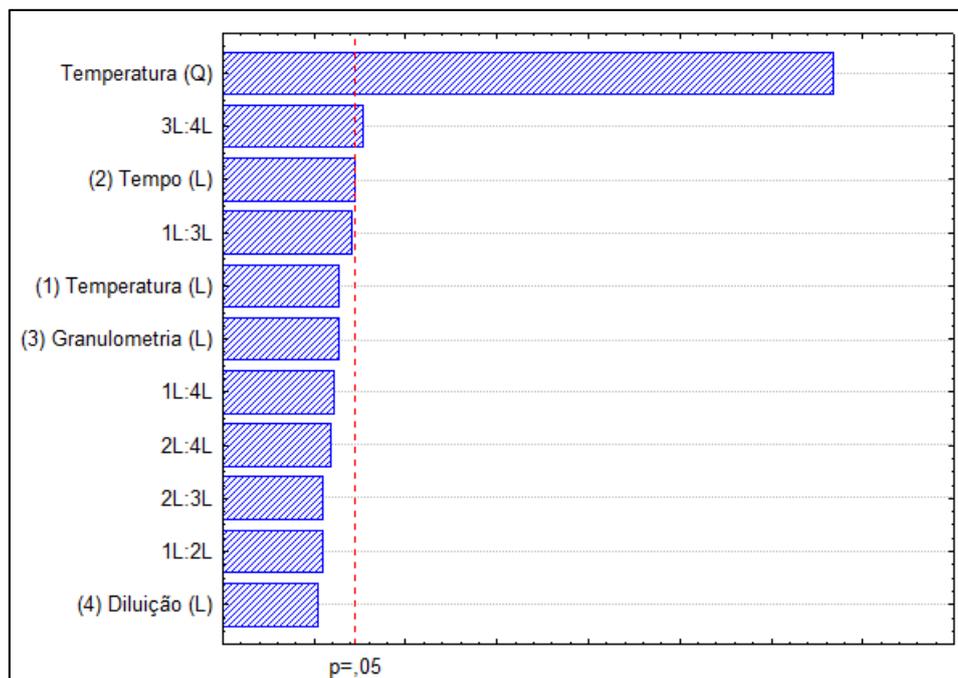
Fonte: arquivo pessoal, 2019.

3.2. Análise dos efeitos

Para a análise dos efeitos foi utilizado uma análise estatística com nível de significância de 5% a partir da qual foi possível estimar os efeitos dos fatores: tempo, temperatura, granulometria e diluição na extração do ácido chiquímico nas folhas de *S. Terebinthifolius* Raddi; e tempo, temperatura e diluição na extração do ácido chiquímico nas fezes da lagarta *Automeris* sp.

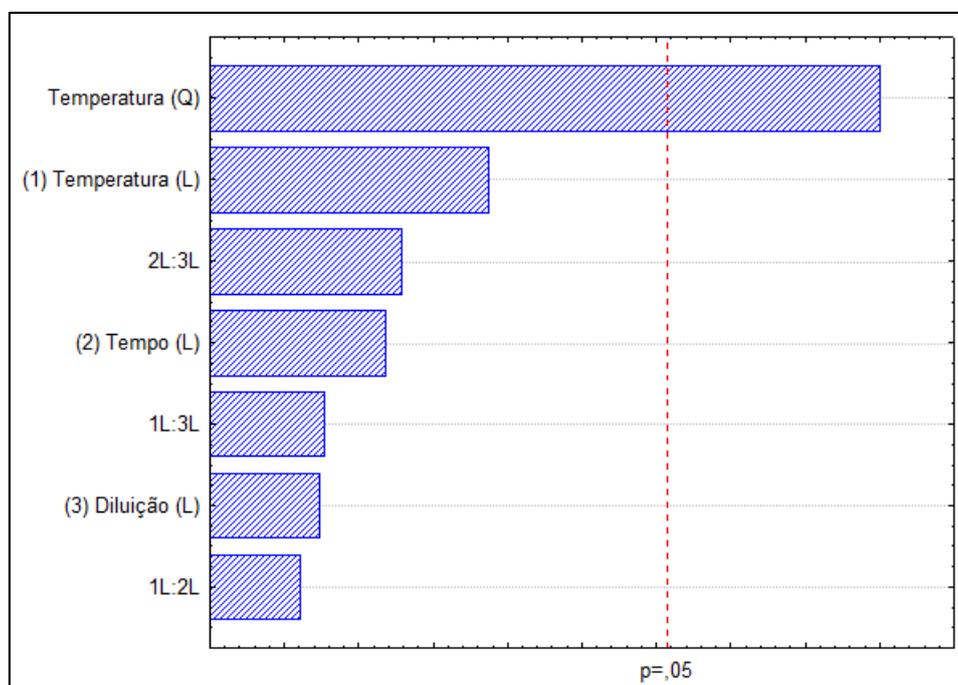
A partir da análise dos gráficos de pareto dos efeitos (figuras 4 e 5) e das estimativas de efeitos (tabelas 5 e 6) dos extratos aquosos das folhas e fezes, respectivamente, verificou que o fator de diluição e o tempo de extração não demonstraram efeitos significativos na extração do ácido chiquímico, tanto para as amostras de folha de *S. Terebinthifolius* Raddi, quanto para as amostras de fezes das lagartas *Automeris* sp. A temperatura demonstrou um efeito (quadrático) significativo para ambas amostras e a granulometria um efeito (linear) significativo, porém com menor intensidade do que o demonstrado pela temperatura, para a extração do ácido chiquímico nas amostras de folha de *S. Terebinthifolius* Raddi.

FIGURA 4 – Gráfico de Pareto de Efeitos para solução do extrato aquoso das folhas de *S. Terebinthifolius* Raddi



L = efeito linear; Q = efeito quadrático. Fonte: elaborada pelo autor.

FIGURA 5 - Gráfico de Pareto de Efeitos para solução do extrato aquoso das fezes da lagarta *Automeris* sp.



L = efeito linear; Q = efeito quadrático. Fonte: elaborada pelo autor.

TABELA 5 - Estimativas de Efeitos para solução do extrato aquoso das folhas de *S. Terebinthifolius* Raddi ($r^2 = 0,9893$)

Fator	Efeito	Erro Padrão.	t(9)	p	Erro Padrão do Coeficiente
Mean/Interc.*	2,930249	0,008672	337,9065	0,000000	0,008672
(1) Temperatura (L)	0,013394	0,009695	1,3815	0,200467	0,004848
Temperatura (Q)*	-0,564936	0,019870	-28,4323	0,000000	0,009935
(2) Tempo (L)	-0,021736	0,009695	-2,2419	0,051683	0,004848
(3) Granulometria (L)	-0,012683	0,009695	-1,3081	0,223250	0,004848
(4) Diluição (L)	0,002069	0,009695	0,2134	0,835795	0,004848
1L:2L	0,004667	0,009695	0,4814	0,641755	0,004848
1L:3L	0,019617	0,009695	2,0233	0,073723	0,004848
1L:4L	0,010575	0,009695	1,0907	0,303736	0,004848
2L:3L	0,004922	0,009695	0,5077	0,623867	0,004848
2L:4L	0,008401	0,009695	0,8665	0,408722	0,004848
3L:4L*	-0,025428	0,009695	-2,6227	0,027688	0,004848

L = efeito linear; Q = efeito quadrático. * fatores significativos. Fonte: Elaborado pelo autor.

TABELA 6 - Estimativas de Efeitos para solução do extrato aquoso das fezes da lagarta *Automeris sp* ($r^2 = 0,7928$).

Fator	Efeito	Erro Padrão.	t(5)	p	Erro Padrão do Coeficiente
Mean/Interc.*	3,716165	0,049888	74,49058	0,000000	0,049888
(1) Temperatura (L)	0,108751	0,078879	1,37870	0,226478	0,039440
Temperatura (Q)*	-0,509096	0,127189	-4,00267	0,010296	0,063595
(2) Tempo (L)	-0,053365	0,078879	-0,67654	0,528726	0,039440
(3) Diluição (L)	0,018424	0,078879	0,23357	0,824580	0,039440
1L:2L	0,008711	0,078879	0,11043	0,916362	0,039440
1L:3L	0,021165	0,078879	0,26833	0,799167	0,039440
2L:3L	0,061944	0,078879	0,78530	0,467840	0,039440

L = efeito linear; Q = efeito quadrático. * fatores significativos. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.1. Efeito da temperatura

A alteração na temperatura demonstrou efeito significativo nas recuperações das extrações, tanto para a amostra de folhas, quanto para a amostra de fezes, como pode ser visto nas figuras 4 e 5.

Na temperatura mais baixa, equivalente a 100 °C, foi obtido um percentual entre 2,5 a 2,6% m/m da amostra de folhas (figura 6) e 3,3 a 3,4% m/m das fezes (figura 7), variando muito pouco com o tempo de extração.

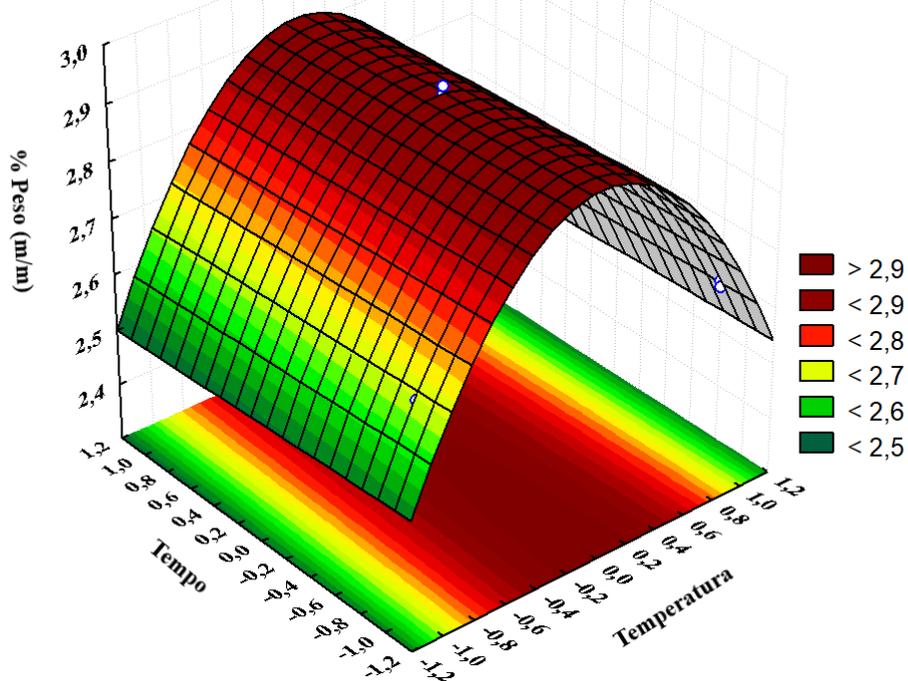
O efeito da temperatura mostrou um comportamento quadrático, com um ponto de máximo no ponto central, que equivale a temperatura de 110 °C, no qual foi obtido um percentual maior 2,9% m/m da amostra de folhas (figura 6) e 3,7% m/m das fezes (figura 7), acima da temperatura de 110 °C o percentual extraído diminuiu gradativamente.

Essa diminuição do percentual extraído se deve ao aumento da quantidade de interferentes extraídos conforme a temperatura aumenta.

Ao avaliar a recuperação obtida, verificou-se que já na temperatura de 100 °C se consegue uma recuperação próxima a 100% para as folhas e na temperatura de 110 °C foi

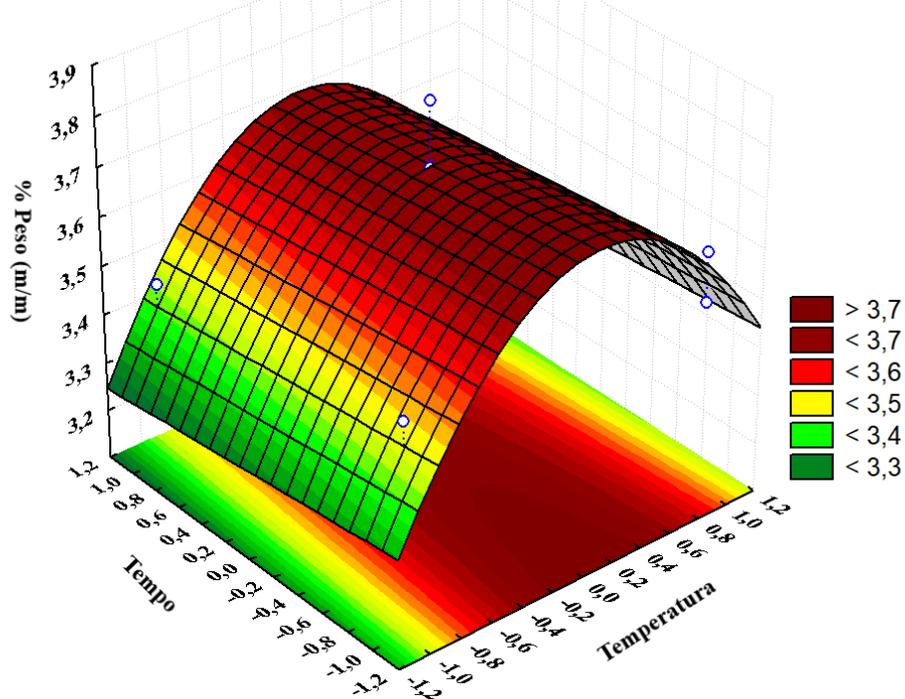
obtido uma recuperação de aproximadamente 110% para as folhas e de 140% para as fezes.

FIGURA 6 – Efeito da temperatura na extração da amostra de folhas



Fonte: Elaborado pelo autor.

FIGURA 7– Efeito da temperatura na extração da amostra de fezes



Fonte: Elaborado pelo autor.

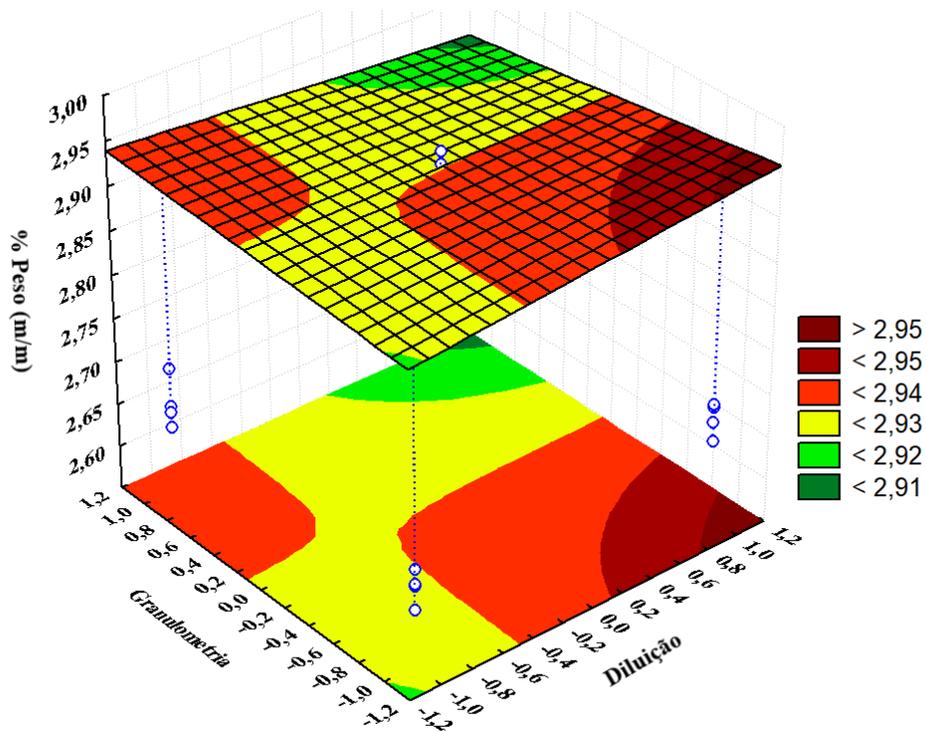
3.2.2. Efeito do tamanho de partícula

A figura 8 mostra o percentual do ácido chiquímico obtido na extração das folhas de *S. Terebinthifolius* Raddi utilizando água quente nas temperaturas de 100, 110 e 120 °C, nas três faixas de granulometria analisadas (0-300, 300-425 e 425-600 µm).

O percentual máximo, encontrado foi para a menor faixa de granulometria e na maior diluição (1:150), o que significou que, quanto menor o tamanho da partícula, mais eficiente é a extração do ácido chiquímico para uma determinada temperatura, conforme demonstrado na figura 8.

Como pode ser visto na tabela 5, o percentual de extração possui um efeito significativo, porém, em menor escala que o efeito da temperatura, na extração.

FIGURA 8 – Efeito da granulometria e da diluição na extração da amostra de folhas



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.3. Efeitos do tempo de extração e do fator de diluição

O fator de diluição e o tempo de extração não demonstraram um efeito significativo na extração do ácido chiquímico tanto para as amostras de folha de *S. Terebinthifolius* Raddi, quanto para as amostras de fezes das lagartas *Automeris* sp..

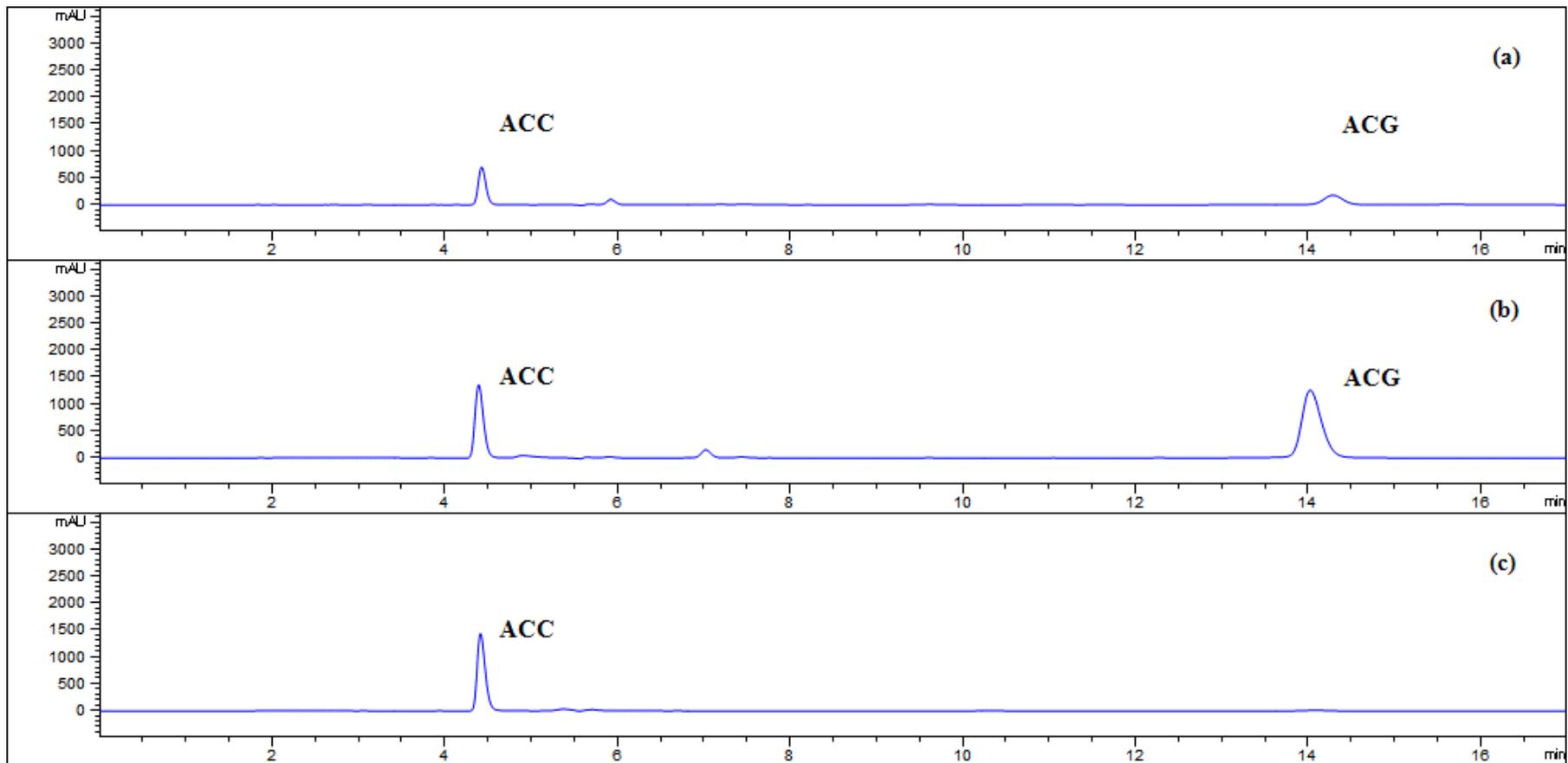
3.3. Purificação do ácido chiquímico

Experimentos em uma coluna com leito fixo e em fluxo foram utilizados para separar o ácido chiquímico (ACC) do ácido gálico (ACG) presentes no extrato das fezes de *Automeris* sp., na proporção de concentração de aproximadamente 1:1. Como adsorventes foram utilizados carvão ativado (com o objetivo de reter substâncias aromáticas, o ácido gálico) e sílica gel (com objetivo de aumentar a porosidade da coluna).

Ensaio preliminares verificaram que a sílica gel não reteve as substâncias presentes na matriz, mostrando assim, ser viável a sua utilização para aumentar a porosidade da coluna.

Os cromatogramas dos extratos das folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e das fezes da lagarta *Automeris* sp. (antes e após a purificação) (figura 9), mostrou que os adsorventes utilizados foram capazes de reter, seletivamente, as substâncias presentes nos extratos das fezes.

FIGURA 9 – Cromatograma dos extratos de folhas de *S. terebinthifolius* Raddi e fezes da lagarta *Automeris* sp.



(a) extrato das folhas: [ACC] = 0,11 mg.mL⁻¹; [ACG] = 0,03 mg.mL⁻¹.

(b) extrato das fezes: [ACC] = 0,23 mg.mL⁻¹; [ACG] = 0,20 mg.mL⁻¹.

(c) extrato das fezes purificado: : [ACC] = 0,23 mg.mL⁻¹; [ACG] \cong 0 mg.mL⁻¹.

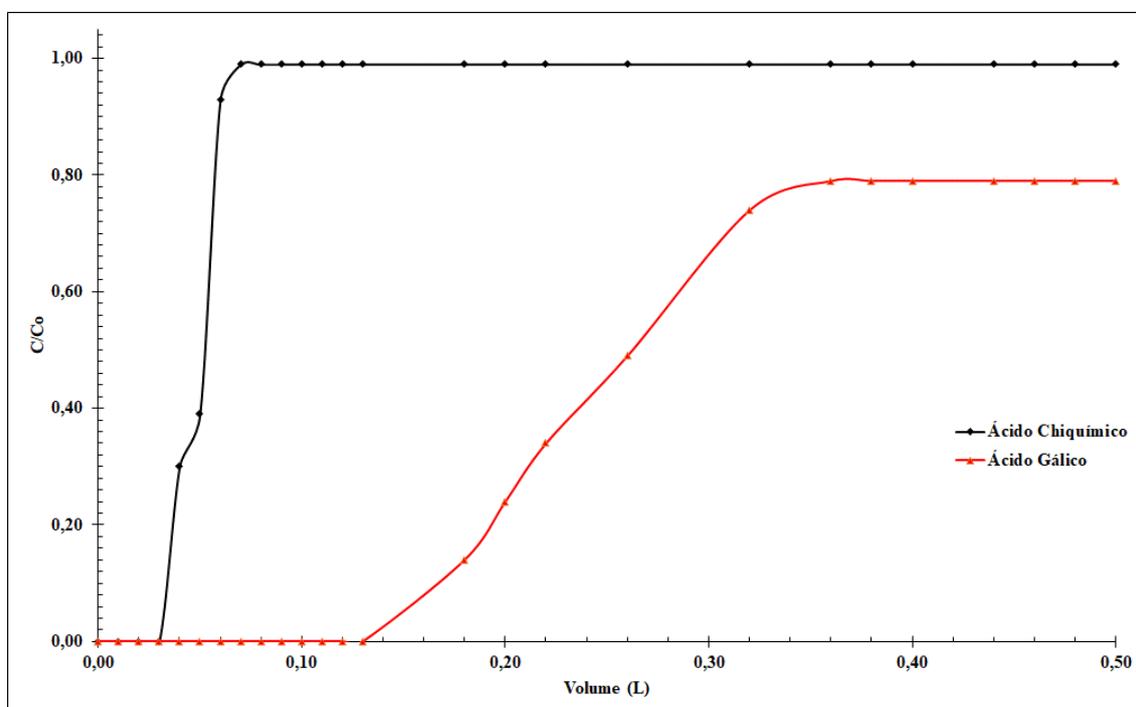
Fonte: elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos foram analisados conforme os modelos linearizados de Isotermas de Langmuir e Freundlich (FEBRIANTO et al., 2009) e apresentados nas Figuras 11 e 12.

Os resultados da adsorção dos ácidos chiquímico e gálico no carvão ativado foram apresentados na forma de curvas de ruptura (figura 10), que mostraram os comportamentos da quantidade de ácido chiquímico e ácido gálico adsorvidos da solução, expressa em termos de concentração normalizada definida como a razão da concentração de saída à concentração de entrada em função do volume (L) da solução eluída (C/C_0 vs. V).

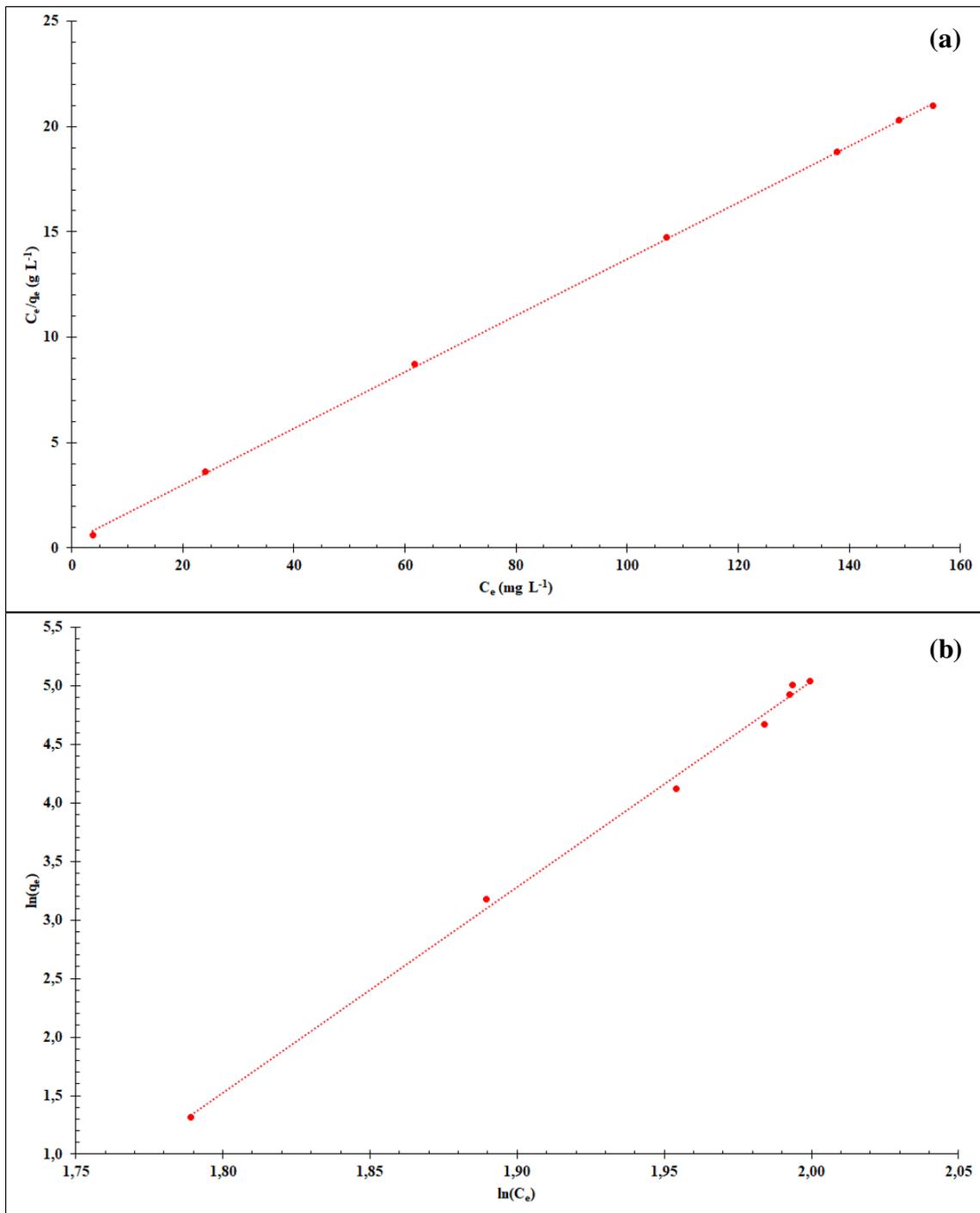
A partir da observação das curvas de ruptura (figura 10) ficou evidenciado que a coluna de carvão ativado fica saturada primeiro com o ácido chiquímico, com percentual de saturação próximo a 100%, e enquanto que ácido gálico continua a ser adsorvido até que atinja um percentual de saturação próximo a 80%. Isso faz com que uma fração do ácido chiquímico presente no extrato não seja adsorvido, saindo da coluna, enquanto que o ácido gálico ainda continua sendo adsorvido no carvão ativado.

FIGURA 10 - Curva de ruptura (breakthrough) para adsorção do Ácido Chiquímico e Ácido Gálico em carvão ativado presentes no extrato aquoso das fezes da lagarta *Automeris* sp.



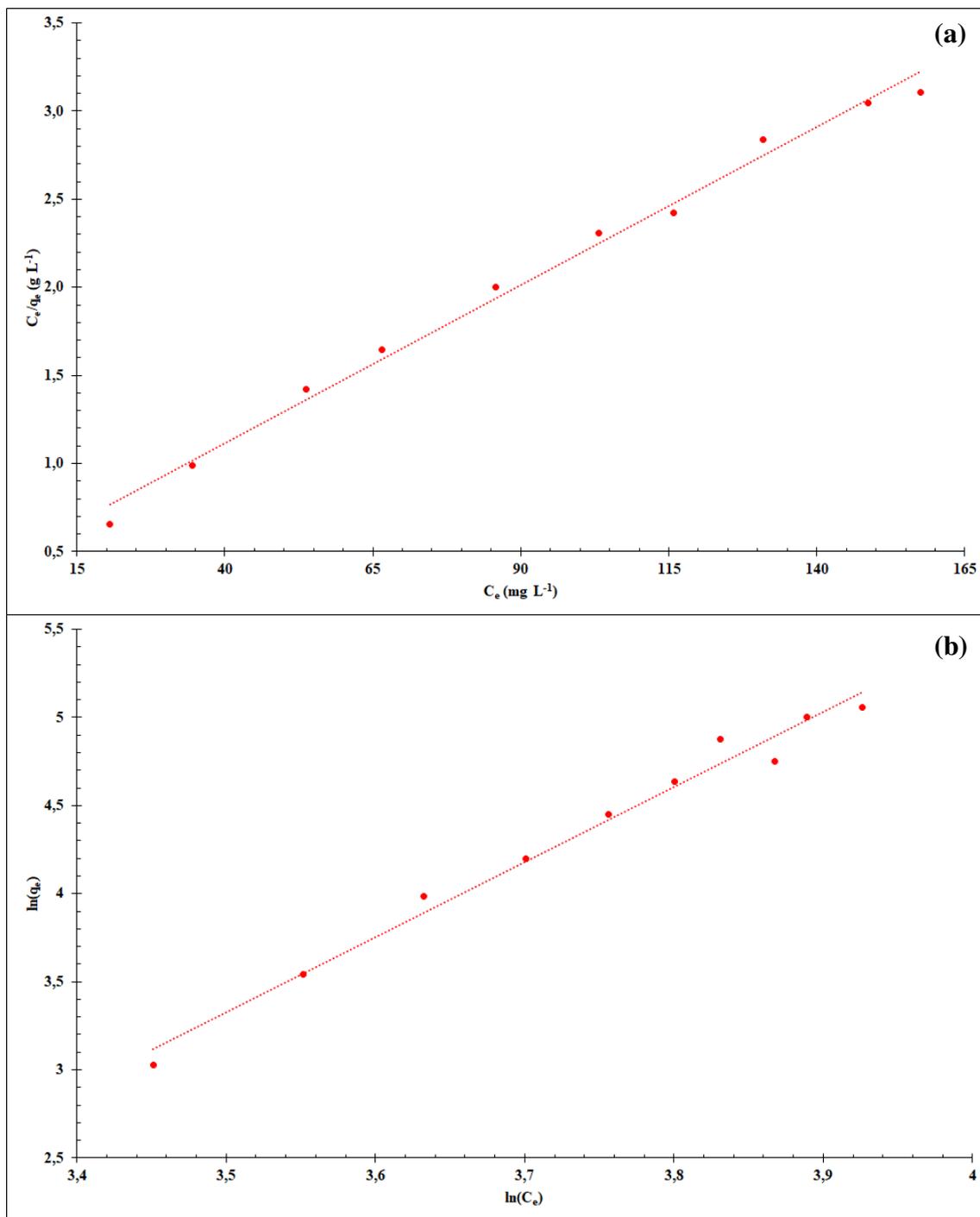
[ACC]: $C_0 = 0,23 \text{ mg.mL}^{-1}$; [ACG]: $C_0 = 0,20 \text{ mg.mL}^{-1}$; Fonte: elaborada pelo autor.

FIGURA 11 – Modelos linearizados das Isotermas de adsorção de Ácido Chiquímico em Carvão Ativado presente no extrato aquoso das fezes da lagarta *Automeris* sp.



(a) Langmuir, (b) Freundlich. Fonte: elaborado pelo autor.

FIGURA 12 – Modelos linearizados das isotermas de adsorção de Ácido Gálico em Carvão Ativado presente no extrato aquoso das fezes da lagarta *Automeris* sp.



(a) Langmuir, (b) Freundlich. Fonte: elaborado pelo autor.

A tabela 7 apresenta as constantes obtidas para as Isotermas de Langmuir e Freundlich, a partir dos modelos linearizados. É observado pelos dados da tabela 7 os dois modelos de isoterma, apresentaram coeficiente de correlação (R^2) satisfatórios,

sendo que o modelo de Langmuir apresentou os melhores coeficientes de correlação tanto para o ácido chiquímico, quanto para o ácido gálico.

TABELA 7 - Parâmetros das isotermas de adsorção para o Ácido Chiquímico e Ácido Gálico segundo Langmuir e Freundlich.

		Ácido Chiquímico	Ácido Gálico
Langmuir	Q_{\max} (mg·g ⁻¹)	7,459	55,780
	K_L (L·mg ⁻¹)	0,4232	0,0450
	R^2	0,9998	0,9919
Freundlich	K_F	1,714	2,7372
	N	17,620	4,3378
	R^2	0,9971	0,9839

Fonte: elaborado pelo autor.

Através do modelo de isoterma de Langmuir, foram calculadas as capacidades máxima de adsorção de ácido chiquímico, sendo igual a 7,459 mg.g⁻¹, e do ácido gálico sendo igual a 55,780 mg.g⁻¹, no carvão ativado. Ficando evidenciado que o carvão ativado consegue adsorver aproximadamente 7,48 vezes mais ácido gálico do que o ácido chiquímico, o que possibilita sua separação.

4. Conclusão

Neste trabalho examinamos a extração em água quente de ácido chiquímico e gálico presente nas folhas de *S. terebinthifolius* Raddi ou nas fezes das lagartas *Automeris* sp. Verificou-se que o ácido chiquímico pode ser extraído das matrizes com água a temperaturas superiores a 100 ° C, nesta temperatura, já se consegue uma recuperação próxima a 100% para as folhas e na temperatura de 110 °C obteve uma recuperação de aproximadamente 110% para as folhas e de 140% para as fezes.

Uma temperatura de extração de 110 ° C mostrou-se levar às extrações mais rápidas e com maior recuperação para a menor quantidade de água. A diluição e o tempo de extração não desempenham um papel relevante nas recuperações de extração. O tamanho das partículas que proporcionou as maiores taxas de extração e as máximas recuperações foi de 0 a 300 µm.

A lagarta *Automeris* sp. mostrou ser capaz de absorver seletivamente algumas substâncias em seu processo digestivo. Das suas fezes foi obtida nova matriz com um menor número de substâncias, os ácidos chiquímico e gálico foram identificados como substâncias majoritárias e quantificados, e assim foi obtida uma proporção de aproximadamente 1:1 para os ácidos. E também foi quantificado nas fezes, uma concentração de ácido chiquímico de aproximadamente 1,27 vezes maior que a concentração encontrada nas folhas da *S. terebinthifolius* Raddi.

A purificação dos extratos de através da utilização de coluna com leito fixo com uma mistura de carvão ativado e sílica, em fluxo contínuo, mostrou-se ser viável, pois o carvão ativado mostrou possui maior capacidade para adsorver o ácido gálico do que o ácido chiquímico, aproximadamente 7,48 vezes maior. Portanto, conclui-se que os métodos de extração e purificação desenvolvidos produzem resultados satisfatórios dentro dos parâmetros analisados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Tamiflu. Fosfato de oseltamivir. Disponível em:

<www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9710392015&pIdAnexo=2932954>. Acesso em: 15 dez. 2018.

BARRETO, J. R. S.; SILVA, G. H. Estudo da interação química entre aroeira e lagarta predadora. Parte 1: Avaliação do teor de ácido gálico nas folhas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) e fezes da lagarta *Automeris* sp. Recife, PE: 65ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 2013

BOCHKOV, D. V. et al. Shikimic acid: review of its analytical, isolation, and purification techniques from plant and microbial sources. *Journal of Chemical Biology*, v. 5, n. 1, p. 5–17, 24 jan. 2012.

BRASIL, M. DA S. Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/acoes-e-programas/programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos-ppnmpf/politica-e-programa-nacional-de-plantas-medicinais-e-fitoterapicos/plantas-medicinais-de-interesse-ao-sus-renisus>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

CARDOSO, J. H.; SILVEIRA, J. V. D. L. Aroeira-vermelha Importância Econômica e Ambiental Floração e Frutificação. Pelotas, RS: [s.n.].2010.

CARDOSO, S. F.; LOPES, L. M. X.; NASCIMENTO, I. R. Eichhornia crassipes: An advantageous source of shikimic acid. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 24, n. 4, p. 439–442, jul. 2014.

CARVALHO, M. G. et al. *Schinus terebinthifolius* Raddi: chemical composition, biological properties and toxicity. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 15, n. 1, p. 158–169, 2013.

ESCALANTE, A. et al. Current perspectives on applications of shikimic and aminoshikimic acids in pharmaceutical chemistry. *Research and Reports in Medicinal*

Chemistry, p. 35, 2014.

FEBRIANTO, J. et al. Equilibrium and kinetic studies in adsorption of heavy metals using biosorbent: A summary of recent studies. *Journal of Hazardous Materials*, v. 162, n. 2–3, p. 616–645, mar. 2009.

FEUEREISEN, M. M. et al. Characterization of Phenolic Compounds in Brazilian Pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) Exocarp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 26, p. 6219–6226, 2 jul. 2014.

IYER, S. V. et al. Method for obtaining Shikimic Acid World Intellectual Property Organization, , 2007.

LEHANE, M. J.; BILLINGSLEY, P. F. *Biology of the insect midgut*. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.

MARTIN, E. et al. Sweetgum (*Liquidambar styraciflua* L.): Extraction of Shikimic Acid Coupled to Dilute Acid Pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 162, n. 6, p. 1660–1668, 27 nov. 2010.

NATION, J. L. *Insect physiology and biochemistry*. 2^o ed. [s.l.] CRC press, 2008.

OHIRA, H. et al. Rapid separation of shikimic acid from Chinese star anise (*Illicium verum* Hook. f.) with hot water extraction. *Separation and Purification Technology*, v. 69, n. 1, p. 102–108, set. 2009.

PANIZZI, A. R.; PARRA, J. R. P. *Ecologia nutricional de insetos e suas implicacoes no manejo de pragas*. [s.l.] Manole, 1991.

ROCHE. Factsheet Tamiflu. 2006. Disponível em:
<www.roche.com/med_mbtamiflu05e.pdf>.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III*. [s.l.:

s.n.]. 2012.

SPECHT, A.; CORSEUIL, E.; FORMENTINI, A. C. Lepdópteros de Importância Médica Ocorrentes no Rio Grande do Sul - IV. Lasiocampidae. *Biociências*, v. 14, n. 1, p. 53–60, 2006.

STRAPASSON, M.; SANTOS, Á. F. DOS; MEDEIROS, A. C. DE S. Fungos Associados às Sementes de Aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius*) Seed-Borne Fungi Associated with *Schinus terebinthifolius*. *Revista Pesquisa Florestal Brasileira*, n. 45, p. 131–135, 2002.

TAN, I. A. W.; AHMAD, A. L.; HAMEED, B. H. Adsorption of basic dye using activated carbon prepared from oil palm shell: batch and fixed bed studies. *Desalination*, v. 225, n. 1–3, p. 13–28, maio 2008.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 74, n. 5, p. 835–855, 1 jan. 2002.

USUKI, T. et al. Extraction and isolation of shikimic acid from *Ginkgo biloba* leaves utilizing an ionic liquid that dissolves cellulose. *Chemical Communications*, v. 47, n. 38, p. 10560, 2011.

Conclusões Gerais

A partir dos resultados apresentados nos dois artigos acima foi possível concluir que o método analítico, desenvolvido por CLAE DAD e validado, para quantificação das substâncias ácido chiquímico e ácido gálico presente nas folhas de *S. terebinthifolius* Raddi ou nas fezes das lagartas *Automeris* sp., apresentou precisão e exatidão aceitáveis nas concentrações testadas e robustez pelo teste Youden, mostrando ser confiável dentro dos parâmetros analisados.

Conclui-se também que o ácido chiquímico pode ser extraído dos produtos naturais através de extração em água quente, com recuperações próximo à 100% a temperaturas acima de 100 °C.

A lagarta *Automeris* sp. mostrou ser capaz de absorver seletivamente algumas substâncias em seu processo digestivo. Suas fezes, foi obtida nova matriz com um menor número de substâncias, os ácidos chiquímico e gálico foram identificados como substâncias majoritárias e quantificados, e assim foi obtida uma proporção de aproximadamente 1:1 para os ácidos. E também foi quantificado nas fezes, uma concentração de ácido chiquímico de aproximadamente 1,27 vezes maior que a concentração encontrada nas folhas da *S. terebinthifolius* Raddi.

O método de purificação com coluna de leito fixo de carvão ativado se mostrou uma ótima ferramenta, pois garantiu que o ácido gálico ficasse retido na coluna, enquanto que o ácido chiquímico eluiu através do carvão, tendo apenas uma pequena fração retida, possibilitando assim a sua separação.

Os métodos desenvolvidos se mostraram serem simples e rápidos, e capazes de produzir resultados satisfatórios dentro dos parâmetros analisados.