



ESTUDO DE SCALE-UP PARA O ISOLAMENTO DE MARCADORES FLAVONÓIDES EM EXTRATOS DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

P.C.P. Rosa¹; F.F.Perazzo²; F.L.A. Fonseca²; M.A.Andreo²

1-Departamento de Farmacologia – Universidade Estadual de Campinas, Rua Tessália Vieira de Camargo, 126 – Cep 13083-887 - Campinas- SP – Brasil. Telefone: (19) 3521-9585 – Fax: (19) 32892968 – Email: paulocpr@fcm.unicamp.br

2- Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Rua Prof. Artur Riedel, 275 - Jd. Eldorado - Cep 09972-270 - Diadema – SP, Brasil. Telefone: (11) 33193578.

RESUMO: A principal espécie de fitoterápico *Passiflora* utilizada para alívio de sintomas como a ansiedade é a *Passiflora incarnata* L. Mas, no Brasil, a espécie *Passiflora alata* Curtis também é usada, ocorrendo a frequente substituição de *P. alata* por outras espécies configurando fraudes. O objetivo do trabalho foi partindo do extrato seco de *Passiflora incarnata* isolar e identificados padrões de flavonoides para posterior comparação da composição química com medicamentos fitoterápicos a base de *Passiflora*. A análise foi realizada em CLAE-UV com coluna C18 250x4,6mm, fase móvel (água- metanol-acetonitrila -0,05%TFA) e no scale-up foi usado um sistema preparativo com coluna de 250 x 10 mm. O fator de transposição linear foi obtido pela razão das áreas seccionais das colunas, obtendo-se um valor de 4,7 o que possibilitou a chegar a uma separação semi-preparativa equivalente à obtida em escala analítica. Os compostos obtidos foram isolados e caracterizados para uso em controle de qualidade.

PALAVRAS-CHAVE: cromatografia líquida, scale-up, flavonoides, passiflora.

ABSTRACT: The main species of *Passiflora* herbal used for relief of symptoms such as anxiety is *Passiflora incarnata* L. But in Brazil, the species *Passiflora alata* Curtis is also used, occurring in frequent replacement of *P. alata* by other species by setting fraud. The objective was leaving the dry extract of *Passiflora incarnata* isolate and identified patterns of flavonoids for comparison of the chemical composition with herbal medications based on *Passiflora*. The analysis was performed on HPLC-UV C18 column 250x4.6 mm, mobile phase (methanol-acetonitrile - water 0.05% TFA) and scale-up has been used a preparation system with 250 x 10 mm column. The linear factor transposition was obtained by the ratio of sectional areas of columns, yielding a value of 4.7 which made it possible to reach an equivalent to the obtained analytical scale semi-preparative separation. The obtained compounds were isolated and characterized for use in quality control.

KEYWORDS: liquid chromatography, scale-up, flavonoids, passiflora.

1. INTRODUÇÃO

As Folhas de espécies do gênero *Passiflora* (Passifloraceae) são utilizadas na medicina tradicional em vários países para o alívio de diversos problemas tais como, ansiedade, histeria, epilepsia, espasmos, entre outros (Freitas, 1985). A principal espécie utilizada com estas propriedades

é *Passiflora incarnata* L. (Passifloraceae). Mas, no Brasil, a espécie *Passiflora alata* Curtis também é utilizada como ansiolítico, sedativo, diurético e analgésico (Oga *et al*, 1985). Porém, no comércio brasileiro frequentemente há substituição de *P. alata* por outras espécies, o que configurava fraude, pois só recentemente trabalhos científicos vêm comprovando a validade do uso de outras

espécies como hipnótico/sedativo (Li *et al.*, 2011). Entre as técnicas utilizadas para a separação e identificação dos marcadores em fitoterápicos a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é a técnica mais utilizada para a determinação analítica com ótimas possibilidades de escalonamento para modo preparativo a partir das condições cromatográficas iniciais do método. Neste contexto, o controle de qualidade de fitoterápicos é imprescindível, evitando problemas sérios devido à comercialização de fitoterápicos de má qualidade ou adulterados.

2. OBJETIVOS

Realizar o scale-up da separação cromatográfica analítica por CLAE para semi-preparativa de extrato seco padronizado de *Passiflora incarnata* para isolar e identificar padrões (isovitexina/vitexina) para posterior comparação da composição química deste com medicamentos fitoterápicos a base de *Passiflora* comercializados no Brasil.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1. Parâmetros de composição da fase móvel para o modo de separação por gradiente.

Tempo (minutos)	Aquoso (%)*	Metanol / Acetonitrila (%)*
0	88,5	11,5
20	88,5	11,5
40	82	18
41	0	100
45	0	100

* 0,05% de TFA

O extrato seco de *Passiflora incarnata* L., gentilmente cedido pela empresa Finzelberg, foi solubilizado em água deionizada e filtrado, obtendo uma concentração de 10 mg/mL. Para as análises por CLAE-UV no modo analítico foi utilizado equipamento ACELLA da Thermo Scientific, equipado com injetor automático

ACELLA e detector de UV ACELLA-PDA. Para as análises por CLAE-UV no modo semi-preparativo foi utilizado equipamento Prominence da Shimadzu (LC-20AP). Após otimização, o sistema de separação escolhido para transposição foi: coluna C18 Hypersil ODS (250 x 4,6mm, 5 μ) fase móvel, água com 0,05% de TFA (solvente A) e a mistura de metanol/acetona 1:1 v/v com 0,05% de TFA em modo gradiente de 11,5%B (0-20 min) 11,5-18% B (20-40 min) e 100%B (40-45 min). Para o modo preparativo foi utilizada coluna SupelcosilTM LC-18 (250 x 10mm, 5 μ).

Para a avaliação da separação cromatográfica foram utilizados os parâmetros cromatográficos de fator de retenção, Equação 1, o qual condiciona a retenção do soluto relacionada à razão dos tempos que as moléculas ficam na fase estacionária, t_R , e na fase móvel, t_M (Collins 2006), Snyder e Kirkland 1979, Snyder *et al.*, 1997, Ciola 2000),

$$k = \frac{(t_R - t_M)}{t_M} \quad (01)$$

e fator de resolução (R_s) que expressa a separação entre dois compostos adjacentes determinados pela Equação 2, onde os termos t_R e w_h se referem ao tempo de retenção e largura do pico medido à linha de base de picos adjacentes,

$$R_s = 1,17 \left[\frac{(t_{R2} - t_{R1})}{(w_{h1} + w_{h2})} \right] \quad (02)$$

O fator de transposição linear (*scale-up*), Equação 3, razão das áreas seccionais das colunas.

$$Fator_transposição = -\frac{r^2_{col.P}}{r^2_{col.A}} \quad (03)$$

A partir frações do extrato obtidas após a separação cromatográfica foram realizadas análises por cromatografia acoplada à espectrometria de e ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C massas para identificação dos compostos obtidos (Pereira e Vilegas, 2000).

4. RESULTADOS

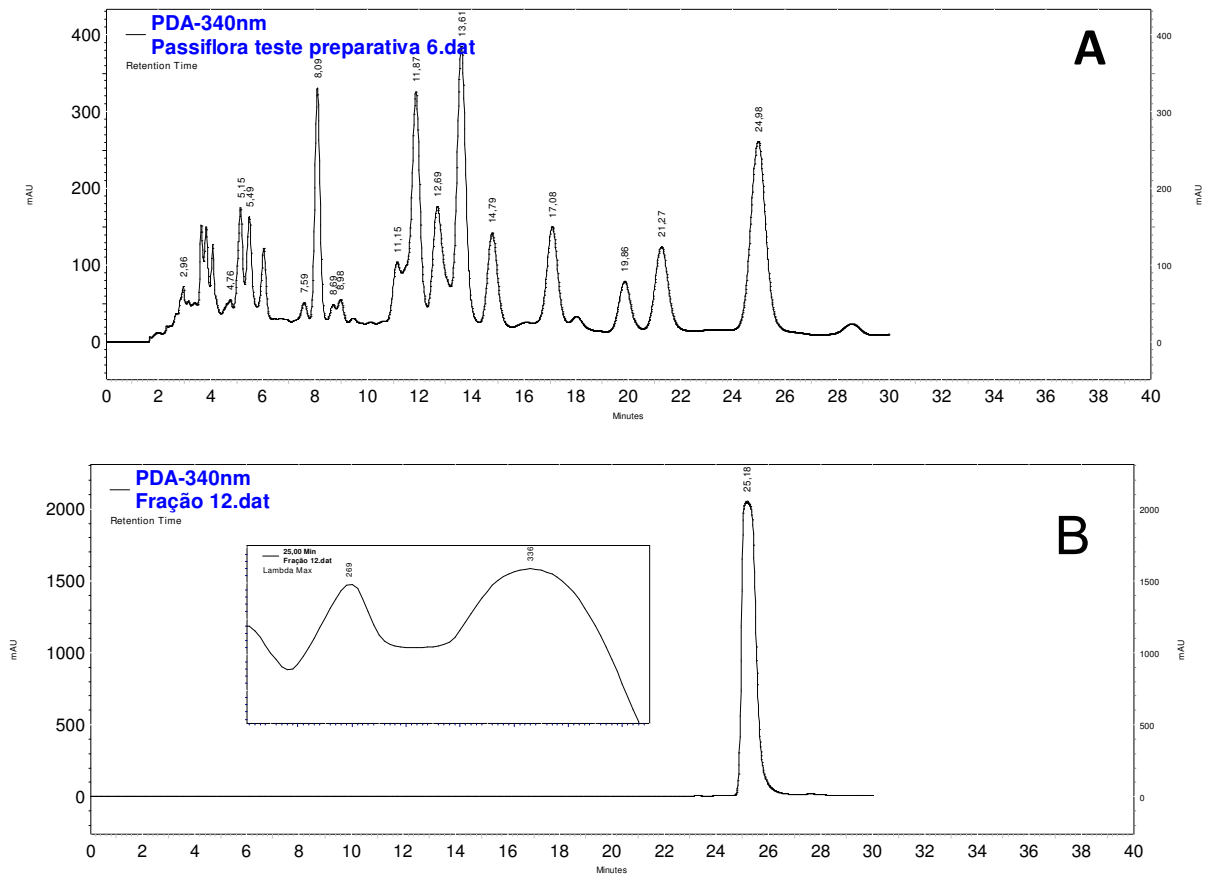


Figura 1 – Cromatogramas obtido por CLAE-UV no modo preparativo do extrato de *P. incarnata*. (A) e fração 12 (B) Condições cromatográficas: coluna Hypersil ODS (250x4,6mm, 5 μ) fase móvel, água com 0,05% de TFA (solvente A) e a mistura de metanol/acetonitrila 1:1 v/v com 0,05% de TFA em modo gradiente de 11,5%B (0-20 min) 11,5-18% B (20-40 min) e 100%B (40-45 min). Fluxo de 1,0 mL/min. Injeção de 10 μ L de solução a 10 mg/mL e 1 mg/mL, respectivamente.

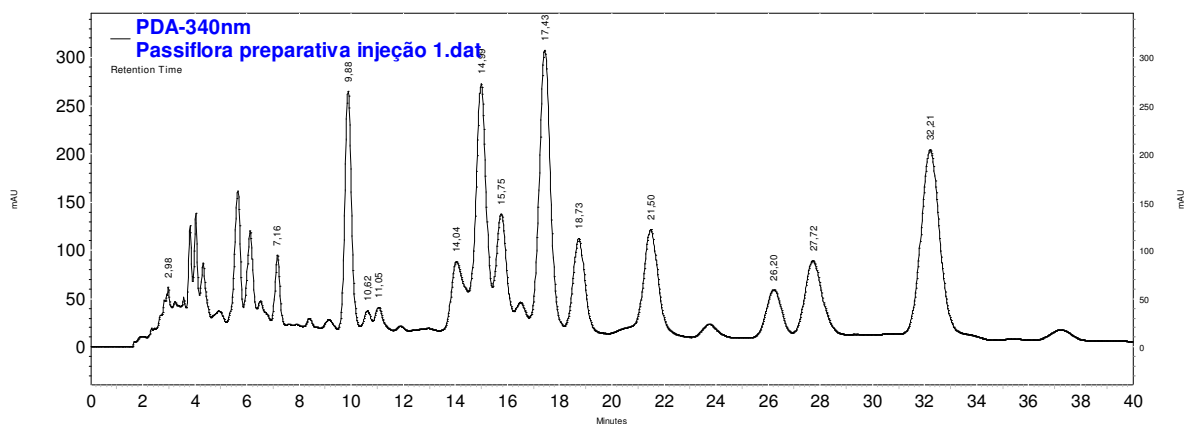


Figura 2 – Cromatograma obtido por CLAE-UV no modo preparativo do extrato de *P. incarnata*. Condições cromatográficas: coluna SupelcosilTM LC-18 (250x10mm, 5 μ) fase móvel, água com 0,05% de TFA (solvente A) e a mistura de metanol/acetonitrila 1:1 v/v com 0,05% de TFA em modo gradiente de 11,5%B (0-20 min) 11,5-18% B (20-40 min) e 100%B (40-45 min). Fluxo de 4,7 mL/min. Injeção de 500 μ L de solução a 100 mg/mL.

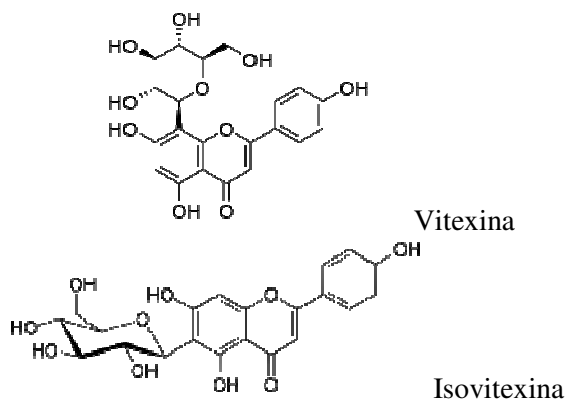


Figura 3. Estrutura química para vitexina e isovitexina.

Após otimização, o gradiente empregado, com fluxo de 1 mL/min, viabilizou a separação no modo analítico de uma série de substâncias com perfil UV flavonoídico, distribuídas no intervalo de aproximadamente 26 min. (**Figura 1, A**). Com a aplicação do fator de transposição encontrado (4,7), foi possível chegar a uma separação semi-preparativa equivalente àquela obtida em escala analítica (**Figura 2**). As separações cromatográficas foram obtidas com parâmetros de fator de retenção entre 2 a 8 e resolução maior de 1,5 para os picos de maior interesse, comprovando uma separação satisfatória. Após 20 repetições da injeção no modo semi-preparativo, as 15 frações obtidas foram reunidas e analisadas por CLAE-UV. Os resultados mostraram o isolamento de 6 substâncias que foram enviadas para análises por RMN e espectrometria de massas para a devida identificação. A fração 12 foi avaliada em CLAE-UV pela co-injeção com padrão autêntico de Isovitexina (**Figura 3**) permitindo assim a sua prévia identificação (**Figura 1, B**). As demais frações estão em análise para identificação e posterior doseamento no extrato seco.

5. CONCLUSÕES

O método desenvolvido em equipamento analítico foi transposto segundo o conceito de *scale-up* para o modo preparativo, proporcionando metodologia rápida para a obtenção de padrões, que depois de identificados e caracterizados serão utilizados para o controle de qualidade qualitativo e quantitativo de fitoterápicos à base de espécies de *Passiflora*, comercializados no Brasil. As

separações cromatográficas foram obtidas com parâmetros de fator de retenção e resolução que possibilitaram boa separação para obtenção do composto de interesse isoladamente.

6. REFERÊNCIAS

- COLLINS, C. H. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. In: *Fundamentos de Cromatografia*. Campinas: Editora da UNICAMP, cap. I, p. 17-45, 2006
- CIOLA, R. *Fundamentos de cromatografia a líquido de alto desempenho HPLC*, Editora Edgard Blücher, São Paulo, 2000.
- FREITAS, P.C.D. Dissertação, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 1985.
- LI, H.; ZHOU, Y.; BAI, M.; LI, H.; LI, L. "Anxilytic and sedative activities of *Passiflora edulis f. flavicarpa*," *Journal of Ethnopharmacology* v.133, p.1085-1090, 2011.
- OGA, S.; FREITAS, P. C.; SILVA, A. C. G.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. *Planta Medica*, v. 50, n. 4, p. 303-306, 1984.
- PEREIRA, C.A.M.; VILEGAS, J.H.Y. Constituintes químicos e farmacologia do gênero *Passiflora* com ênfase a *P. alata* Dryander., *P. edulis* Sims e *P. incarnata* L. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 3, n. 1, p. 1-12, 2000.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J.; GLAJCH, J. L. *Practical HPLC method development*, 2ª ed., Wiley, New York 1997.
- SNYDER, L.R.; KIRKLAND, J.J. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2ª ed., John Wiley & Sons, New York, 1979.

7. AGRADECIMENTOS

Os autores são gratos à FAPESP, CNPq, UNICAMP, UNIFESP-Diadema e a empresa Finzelberg.