ÁREA DE SUBMISSÃO: PRODUTOS NATURAIS E QUÍMICA MEDICINAL –
PNQM18

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ANALÍTICO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA PARA AS FOLHAS DE *Symphytum officinale* LINN.

W. A. V. DA SILVA¹, M. R. S. BRITTO^{1,2}, M. R. A. FERREIRA^{1,2}, L. A. L. SOARES^{1,2}

¹ Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas

² Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica

E-mail para contato: wli27@yahoo.com.br

RESUMO – *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae) conhecida como confrei, é bastante utilizada pertinente as suas propriedades terapêuticas, assim como à presença dos seus fitoconstituintes. Em razão do crescente uso de plantas medicinais, se faz necessário o controle de qualidade da droga vegetal, para obtenção do perfil de seus compostos e posterior quantificação. Dessa forma, o objetivo do trabalho foi obter o perfil do extrato das folhas de *S. officinale* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). As análises evidenciaram a presença de alantoína e flavonoides, de acordo com os tempos de retenção e espectros de varredura dos picos correspondentes. A metodologia apresentou boa eficiência para separação e detecção da alantoína e flavonoides presentes na matriz, possibilitando sua identificação e quantificação, mostrando adequabilidade para a finalidade da proposta.

Palavras Chave: CLAE. Confrei. Alantoína.

ABSTRACT - *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae) known as confrei, is widely used as its therapeutic properties due to the presence of its phytochemicals. Due to the increasing use of medicinal plants, analytical tools are necessary to control the quality of the such herbal materials. The chemical profiles play a key role on the qualitative and quantitaive evalution of herbal drugs Thus, the objective of this work was the evaluation of chemical profile of the extract from leaves of *S. officinale* by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The data confirmed the presence of allantoin and flavonoids, according to retention times and scanning spectra of the corresponding peaks. The methodology showed good efficiency for the separation and detection of allantoin and flavonoids in the herbal matrix, allowing their identification and quantification, showing the method suitability for the analyse proposed.

Keywords: HPLC. Confrei. Allatoin.

1. INTRODUÇÃO

Symphytum officinale L. é popularmente conhecida como confrei, pertence a família Boraginaceae, é bastante utilizada devido as suas propriedades medicinais, tais como anti-inflamatória, cicatrizante e hidratante (PILLEGGI et al., 2002) antisséptica, bacteriana, fungicida e calmante (RAHAL et al., 2001). Essas atividades estão relacionadas à presença dos seus fitoconstituintes. Já foram relatados flavonoides, esteroides e triterpenoides (TOLEDO et al., 2006) e os alcaloides pirrolizidínicos (BIAVATTI; MIRANDA, 2017). A identificação e quantificação de compostos químicos específicos (marcadores) é uma das estratégias mais importante para o controle de qualidade. Entre os métodos analíticos destinados a quantificação de compostos químicos em fitoterápicos destaca-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a detector de arranjo de diodos (DAD) permite o registro de dados de absorvância do ultravioleta ao visível, fornecendo o espectro de varredura, possibilitando a identificação e análise dos fitoconstituintes presentes na matriz (PRATHAP et al., 2013).

Diante do exposto, o propósito desse trabalho foi desenvolver e otimizar um método para análise dos constituintes das folhas de *S. officinale* por CLAE-DAD, para o emprego no controle de qualidade da espécie vegetal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

As folhas de *Symphytum officinale* L. foram coletadas em Gravatá (Pernambuco-Brasil), entre 8:00 e 9:00 h da manhã. O material botânico identificado no Herbário Dárdano de Andrade Lima do Instituto Agrônomo de Pernambuco, onde foi depositada uma exsicata sob número 91194. Em seguida, o material vegetal foi submetido à secagem em estufa de ar circulante (Luca 82/480, Lucadema[®]) sob temperatura de 40 °C durante 96 h. Em seguida, o material foi pulverizado em moinho de facas tipo Willey (Modelo 340 série 100/08, Adamo[®]) com malha de 10 mesh.

2.2 Obtenção da Solução Extrativa

1,0 g do material vegetal foi transferido para balão de fundo redondo (125 mL) e submetido à extração sob refluxo em banho maria (Lucadema[®]) por 20 min, a temperatura de 85 °C, utilizando 15 mL de etanol 70% (v/v). Após o primeiro ciclo, a solução foi filtrada com auxílio de algodão para balão volumétrico de 50 mL, e, o resíduo+algodão foram submetidos a novo ciclo de extração por mais 20 min, repetindo o processo por 3 vezes. Após resfriamento a temperatura ambiente, as frações foram reunidas em balão volumétrico de 50 mL e o volume foi aferido com o mesmo solvente.

2.3 Condições Cromatográficas

Os ensaios foram realizados em Cromatógrafo Líquido (Ultimate 3000, Thermo Fisher Scientific[®]), acoplado a um detector de arranjo de fotodiodo (DAD; Thermo Fisher Scientific[®]) e equipado com bomba binária (HPG-3x00RS, Thermo Fisher Scientific[®]), degaseificador e amostrador automático equipado com um loop de 20 µL (ACC-3000, Thermo Fisher Scientific[®]). As análises foram conduzidas com coluna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm d.i., 5 µm) Dionex[®] equipada com pré-coluna (C₁₈ de 4 mm x 3,9 µm; Phenomenex[®]). A fase móvel foi composta por água ultrapura (Purelab Classic UV, Elga[®]) (solvente A) e acetonitrila grau HPLC (Tedia[®]) (solvente B). As análises foram realizadas com fluxo de fase móvel igual a 1,0 mL/min, segundo o gradiente: 0-5 min:

1%B, 5-10 min: 1-100%B, 10-15 min: 100%B e 15-20 min: 100-1%B. Os cromatogramas foram obtidos em temperatura igual a 25 °C; e com comprimento de onda igual a 210 nm e 350 nm.

2.4 Avaliação do método

Para a avaliação do método uma alíquota de 1 mL da Solução Estoque (SEA) foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume aferido com a solução metanólica 50% (v/v) (concentração igual a 2000 µg/mL). Por fim, a solução foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 µm para vials. Foi utilizado como padrão a alantoína (Sigma®), sendo pesados 10 mg para balão volumétrico de 10 mL e diluído com a solução metanólica 50% (v/v) obtendo a Solução Estoque do Padrão (SEP). Uma alíquota de 0,1 mL da solução (SEP) foi transferida para balão volumétrico de 10 mL e o volume aferido com a solução metanólica 50% (v/v) (concentração igual a 10 µg/mL).

Por fim, a solução foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 µm para vials. Adicionalmente, uma solução contendo quantidades da solução amostra (1 mL) e solução do padrão (0,1 mL), foram transferidos para balão volumétrico de 10 mL, para confirmar a presença de alantoína na amostra. Ao final, a solução foi filtrada em filtro de PVDF 0,45 µm para vials.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com a análise preliminar realizada para obter o perfil do extrato hidroalcoólico das folhas de *S. officinale*, foi possível observar o pico correspondente a presença de alantoína em aproximadamente 3,20 min. A figura 1 traz os cromatogramas referentes ao extrato de *S. officinale* (1), extrato de *S. officinale* fortificado com o padrão de alantoína (2) e o padrão alantoína (3). Dessa forma foi possível confirmar a presença de alantoína na amostra, pela co-injeção do padrão com a amostra, resultando em aumento de área e pelo tempo de retenção do pico correspondente.

Figura - Cromatogramas do extrato de *S. officinale* (1), extrato de *S. officinale* fortificado com o padrão de alantoína (2) e o padrão alantoína (3), evidenciados em 210 nm.

Como o extrato também foi monitorado em 350 nm (Figura 2), foram observados dois picos com espectro de varreduras semelhantes à classe de flavonoides, com máximos de absorção correspondentes as bandas I e II. O primeiro pico, em 10,41 min, apresentou máximos de absorção em 204.6/256.6/355.5; já o segundo, com T_R de 12,78 min com máximos em 198.0/327.7.

Figura - Cromatograma do extrato de *S. officinale* evidenciado em 350 nm.

4. CONCLUSÃO

A metodologia desenvolvida por CLAE-DAD, para o extrato bruto das folhas de *Symphytum officinale* L., apresentou boa eficiência de separação e detecção dos constituintes presentes no derivado vegetal. Porém, a metodologia ainda necessita de validação para assegurar a precisão e reprodutibilidade das respostas analíticas viabilizando a sua aplicação ao controle de qualidade de folhas de *Symphytum officinale* L.

5. REFERÊNCIAS

- BLAVATTI, M. W.; MIRANDA, R. P. Alcalóides pirrolizidínicos. In: SIMÕES, C.M.O.(Org) et al. **Farmacognosia do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, cap. 25, p. 389 - 402, 2017.
- GOLDMAN, R. S.; FREITAS, P. C. D.; OGA, S. Wound healing and analgesic effect of crude extracts of *Symphytum officinale* in Rats. **Fitoterapia**, v. 56, n. 6, p. 323-9, 1985.
- PILEGGI, M.; RAIMAN, P. M.; MICHAELI, A.; BEATRIZ, S.; BOBATO, V., Ação antimicrobiana e intraendolífica em *Symphytum officinale* L. **Biolog. Health Sci.**, v. 8, n. 1, p. 47-55, 2002.
- RAHAL, E. A. L. S. S.; ROCHA, N. S.; BLESSA, E. P.; IWABE, S.; CROCI, A. J. Pomada orgânica natural ou solução isotônica no tratamento de feridas limpas em ratos. **Ciênc. Rural**, v. 31, n. 6, p. 1007–1011, 2001.
- TOLEDO, A. C. O.; DUARTE, M. R.; NAKASHIMA, T. Caracterização morfoanatômica de raízes e rizomas de *Symphytum officinale* L. (Boraginaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 16, p. 185-191, 2006.

6. AGRADECIMENTOS

Os integrantes agradecem a FACEPE (APQ-0493- 4.03/14) e ao CNPq (308386/2015-9).