

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



Marque a opção do tipo de trabalho que está inscrevendo:

Resumo

Relato de Caso

VALIDAÇÃO DE MÉTODO PARA DETERMINAÇÃO DE GALOCATEQUINA E EPIGALOCATEQUINA POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA

AUTOR PRINCIPAL: Angélica Wagner da Costa

COAUTORES: Aline Camilotti Gaio, Simone Meredith Scheffer Basso, Ricardo Antunes Flores

ORIENTADOR: Charise Dallazem Bertol

UNIVERSIDADE: Instituto de Ciências Biológicas - Curso de Farmácia da Universidade de Passo Fundo

INTRODUÇÃO:

As prodelfinidinas (galocatequina (GAL) e epigalocatequina (EPG)) estão presentes em diversas plantas, e sua determinação é importante durante a caracterização fitoquímica. Para isso, é necessário desenvolver e validar um método. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (BRASIL, 2003). O objetivo deste trabalho foi desenvolver e validar um método para GAL e EPG por cromatografia líquida de alta eficiência (LC) considerando os parâmetros linearidade, limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), robustez, precisão e exatidão, para posterior quantificação destas substâncias em extratos de *Lotus spp*, ou mesmo de qualquer outra espécie vegetal.

DESENVOLVIMENTO:

Metodologia: Foram utilizada SQR (substâncias químicas de referência) (-)-Galocatequina e (-)-Epigalocatequina e as análises foram realizadas em cromatógrafo líquido Flexar Perkin Elmer, e com detector PDA (LC/PDA), ajustado em 225 nm. Foi utilizada uma coluna C18 e, como fase móvel, acetonitrila e água (10:90), pH 3,4 e fluxo de 1mL/min. As curvas foram submetidas à ANOVA (Suplemento Portal Action), e a adequação do modelo de regressão foi avaliada pelo coeficiente de correlação de regressão, falta de ajuste e análise de resíduos. A normalidade foi analisada pelos testes de Anderson-Darling, Shapiro-Wilk Kolmogorov-Smirnov e Ryan-Joiner, ausência de autocorrelação pelo teste de Durbin-Watson e a homocedasticidade pelo teste de Cochran. LD e LQ foram avaliados usando a média dos valores de 3 curvas independentes, e foram determinados usando as equações $LD = (3.3 \sigma)/S$; $LQ = (10 \sigma)/S$, σ é o desvio padrão da resposta e S é a inclinação. Para robustez foram alterados os fatores: pH (3,2, 3,4 e 3,6), fluxo da fase móvel (0,9, 1,0 e 1,1 mL/min) e concentração de acetonitrila (89%, 90% e 91%) em 3 níveis diferentes (-1, 0 e +1). O

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



delineamento fatorial foi submetido à aleatorização em software Minitab. A exatidão e a precisão foram determinadas a partir do percentual de recuperação e do desvio padrão relativo (DPR), utilizando soluções das SQR nas concentrações de 50 – 150 µg/mL, em triplicata.

Resultados e Discussão: O método foi considerado linear no intervalo de 50 a 150 µg/mL para ambas SQR. O valor do R² foi maior que 0,99 (GAL: $y = 53,773x - 1047,5$, $R^2 = 0,9996$; e EPG $y = 53,773x - 1047,5$, $R^2 = 0,9998$) (figura 1). Os resíduos foram analisados de acordo com a normalidade, e mostraram que estão normalmente distribuídos (pvalue > p0,05, mostrando significância nos testes de Anderson-Darling, Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov e Ryan-Joiner), ausência de autocorrelação (teste de Durbin-Watson que indica a aleatoriedade dos resíduos de regressão) e homocedasticidade dos dados (sem valores discrepantes pelo teste de Cochran). O LD foi de 0,77 µg/mL e de 2,34 µg/mL para a GAL e EPG, respectivamente, e o LQ foi de 0,45 µg/mL e de 1,37 µg/mL, para a GAL e EPG, respectivamente, demonstrando a alta sensibilidade do método. Para a precisão e exatidão, os valores de DPR foram menores que 5% em todas as concentrações analisadas, e os percentuais de recuperação ficaram próximos a 100%, demonstrando a precisão e exatidão do método. O resultado da robustez é mostrada através do diagrama de Pareto que apresenta a magnitude e a importância de cada efeito. O gráfico mostra nas barras o valor absoluto dos efeitos e desenha uma linha vertical que representa o t-valor crítico ($\alpha = 5\%$). Os fatores estudados (pH, fluxo e concentração de acetonitrila) não apresentaram um efeito significativo sobre a quantificação das SQR observados através dos gráficos de Pareto (figuras 2 e 3), demonstrando que o método é robusto para ambas as substâncias

CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O método utilizando LC/PDA para quantificar GAL e EPG foi validado conforme os parâmetros propostos pela legislação vigente mostrando-se linear, preciso, exato, robusto e com alta sensibilidade, adequado para a quantificação em extratos de plantas do *Lotus* spp.

REFERÊNCIAS:

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); Resolução RE nº 899, de 29/05/2003.

BRITO, Natilene Mesquita.; JUNIOR, Ozelito Possidônio de Amarante.; POLESE, Luciana.; RIBEIRO, Maria Lúcia. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. Pesticidas: R.Ecotoxicol. e Meio Ambiente, Curitiba, v. 13, p. 129-146, jan./dez. 2003.

ICH- International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human use: Q2 (R1)-Validation of Analytical procedures: text and methodology, 2005.

IV SEMANA DO CONHECIMENTO

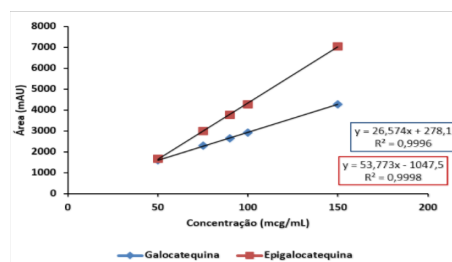
COMPARTILHANDO E FORTALECENDO REDES DE SABERES

6 A 10 DE NOVEMBRO DE 2017



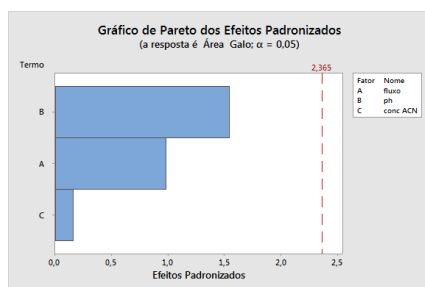
ANEXOS:

Figura 1. Representação gráfica da linearidade em área (mAU) pela concentração de GAL e EPG ($\mu\text{g/mL}$).



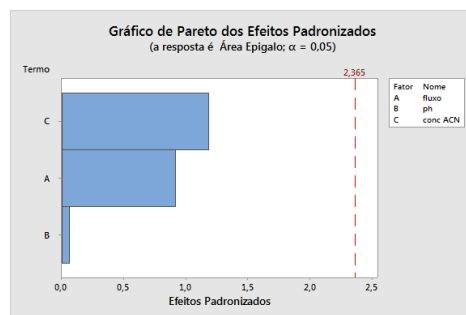
Fonte: Autora (2017).

Figura 2. Representação gráfica (gráfico de Pareto) da Robustez para GAL.



Fonte: Autora (2017).

Figura 3. Representação gráfica (gráfico de Pareto) da Robustez para EPG.



Fonte: Autora (2017).