

# Validação de um novo método em CLAE-DAD para análise simultânea de flavonóides e estilipironas em *Cryptocarya mandioccana*

Karin Fabiana Bandeira\* (PG), Alberto José Cavaleiro (PQ)

karinbandeira@bol.com.br

NuBBE – Núcleo de Bioensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais- Depto de Química Orgânica – Instituto de Química de Araraquara – UNESP –R. Francisco Degni, s/n – Quitandinha, CEP: 14800-900, Araraquara-SP.

Palavras Chave: *Cryptocarya mandioccana*, validação.

## Introdução

*Cryptocarya mandioccana* é uma espécie arbórea e caracteriza-se pela presença de alcalóides, flavonóides e estilipironas em seus órgãos<sup>1</sup>. Métodos analíticos são necessários para analisar esses metabólitos nos estudos de variabilidade intraespecífica, nos estudos enzimáticos e para padronização de extratos visando o uso de fitoterápicos. Considerando a importância desses estudos, torna-se necessário o desenvolvimento de metodologias validadas para garantir a confiabilidade dos resultados obtidos. Um novo método cromatográfico foi desenvolvido em CLAE-DAD para análise simultânea de flavonóides e estilipironas em *C. mandioccana*. Para assegurar a confiabilidade do método estabelecido, esse trabalho tem como objetivo validar o novo método cromatográfico proposto.

## Resultados e Discussão

Um método em CLAE-DAD foi desenvolvido e o sistema cromatográfico empregado foi um cromatógrafo líquido Varian ProStar acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) e coluna de fase reversa Phenomenex C8 (250 x 4,6mm, 5µm). A fase móvel foi composta de ACN, MeOH e Tampão (11,9mM de trietilamina e 14,3mM de ácido fosfórico, pH=2,0) em um sistema gradiente com fluxo de 1mL/min. O volume de injeção foi 20µL de amostra solubilizada em MeOH: HAc 10% (1:1). A detecção foi obtida em 254 nm. Através das normas da ANVISA<sup>2</sup> foi estabelecido um protocolo de validação<sup>3</sup> no qual foram definidos critérios de aceitabilidade para os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), limite de detecção, limite de quantificação e exatidão. A seletividade foi verificada analisando amostra e padrões em CLAE-DAD para avaliar a pureza dos picos cromatográficos. Os resultados obtidos demonstraram seletividade adequada. A linearidade foi avaliada através dos coeficientes de correlação da curva analítica na faixa de concentração de 15 a 100µg/mL para o flavonóide

e a estilipirona. A curva analítica com padronização interna foi construída com 7 níveis de concentração e as análises foram realizadas em triplicata. O método mostrou-se linear com coeficientes de correlação  $r^2=0,998$  para o flavonóide e  $r^2=0,999$  para a estilipirona, ambos dentro do critério de aceitação ( $r^2=0,99$ ). A precisão do método foi verificada em dois níveis: repetibilidade e precisão intermediária. Na avaliação da repetibilidade foram analisadas triplicatas em três níveis de concentração para cada analito. Os desvios padrão relativos (DPR) máximos observados foram 4,12 para flavonóide e 4,14 para estilipirona. Na avaliação da precisão intermediária as análises foram realizadas em dois dias diferentes e os valores de DPR máximos observados foram 4,21 para flavonóide e 4,57 para a estilipirona. Ambos dentro do critério de aceitação ( $DPR \leq 5\%$ ). Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) foram estimados utilizando o método visual. Os valores de LD obtidos foram 10µg/mL para o flavonóide e 5µg/mL para a estilipirona. Os valores de LQ foram 15µg/mL para os dois metabólitos. A exatidão foi avaliada através da análise em triplicata do extrato fortificado pelos analitos em três níveis de concentração. Os resultados obtidos indicaram exatidão adequada. Finalmente o método proposto foi utilizado para analisar folhas dos quimiotipos de *C. mandioccana*.

## Conclusões

O novo método desenvolvido em CLAE-DAD para análise simultânea de flavonóides e estilipironas em *C. mandioccana* foi validado segundo a Resolução<sup>2</sup> RE 899. Todos os parâmetros avaliados encontram-se dentro dos critérios de aceitabilidade previamente estabelecidos no protocolo de validação e, portanto, a metodologia foi considerada seletiva, precisa, exata e confiável para a determinação simultânea dos metabólitos em questão nos estudos de variabilidade, enzimáticos e de padronização de extratos de *C. mandioccana*.

## Agradecimentos

Biota-FAPESP, CNPQ.

<sup>1</sup>Cavalheiro, A. J.; Yoshida, M. *Phytochemistry*. **2000**, 53, 811-819.

<sup>2</sup>Anvisa, Resolução RE 899, 29 de maio de 2003.

<sup>3</sup>Ribani, M., et al.; *Química Nova*. **2004**, 27, 771-780.