

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA APLICADA AO MONITORAMENTO DE GINKGOLÍDEOS EM FORMULAÇÕES À BASE DE EXTRATO DE *Ginkgo biloba* L.

G.P. Rocha¹, C.H.B. Bizarri², L.S. Barbosa³ e C.M.M.C. Andrade,⁴

¹ CTS Ambiental -Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), Rio de Janeiro, Brasil, grocha@firjan.org.br

² CTS Ambiental -Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), Rio de Janeiro, Brasil, cbizarri@firjan.org.br

³ CTS Ambiental -Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), Rio de Janeiro, Brasil, lsbarbosa@firjan.org.br

⁴ CTS Ambiental -Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI), Rio de Janeiro, Brasil, candrade@firjan.org.br

Resumo: A validação do método apresentado demonstrou alta confiabilidade e eficiência, provando ser uma importante ferramenta no monitoramento dos ginkgolídeos A, B e C presentes em formulações à base de extrato de *Ginkgo biloba*. Assim, possibilitando um melhor controle de qualidade da presença e quantidade de compostos ativos.

Palavras-chave: *Ginkgo biloba*, ginkgolídeos, CLAE-UV/VIS, extrato vegetal

1. INTRODUÇÃO

A utilização dos fitoterápicos no mercado nacional tem se tornado crescente nas últimas décadas. Assim, o controle de qualidade para os produtos de origem vegetal, assim como para os medicamentos tradicionais, é de extrema importância; e não só para o produto tecnologicamente acabado, como também para sua matéria-prima¹.

Contudo, garantir a qualidade de um produto implica em um aumento de custos para as indústrias. Atualmente, uma das maiores práticas para a padronização dos extratos de plantas baseia-se na identificação de marcadores químicos, característicos para as espécies. Considerando a complexidade da matriz em questão, torna-se um desafio analítico o desenvolvimento de métodos para a detecção e/ou quantificação simultânea de um grande número de compostos.

Os extratos de folha de *Ginkgo biloba* são comercializados como fitoterápicos e utilizados para aliviar ou reduzir sintomas relacionados à insuficiência cerebral, mal de Alzheimer, depressão, neuropatia diabética, impotência, doença vascular periférica, claudicação intermitente, vertigem, entre outras².

A atividade farmacológica do *Ginkgo biloba* é atribuída ao sinergismo de duas diferentes classes químicas: os flavonóides e as terpenolactonas. Dentre as terpenolactonas, os ginkgolídeos A, B e C são exclusivas desta planta, podendo atuar, portanto, como os marcadores químicos naturais³.

Dentre a categoria dos extratos vegetais, a situação com relação aos métodos de validação, materiais de referência e harmonização ainda é muito pouco avançada. As técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia a gás (CG) estão entre as abordagens mais utilizadas para levar ao avanço da metodologia analítica. As terpenolactonas têm sido analisadas por ambas as técnicas cromatográficas, com resultados diferenciados em função da performance e especificidade da técnica analítica⁴.

O modo de detecção por detector de ultravioleta/visível (UV/VIS) é aquele comumente empregado, contudo, promovendo uma análise pouco seletiva. De forma análoga, a técnica de CG por detecção com ionização em chama (DIC) também não é seletiva. Entretanto, a sensibilidade e seletividade na análise das terpenolactonas são aumentadas através da derivatização com agentes silanizantes^{3,4}.

2. OBJETIVO

No presente trabalho, um produto fitoterápico à base de extrato de *Ginkgo biloba* foi o alvo de estudo através da validação da metodologia de análise de seus principais marcadores químicos, que são os ginkgolídeos A, B e C (terpenolactonas).

O desenvolvimento desta metodologia poderá possibilitar o estabelecimento de novas etapas no controle de qualidade dos medicamentos produzidos à base deste extrato vegetal.

3. MÉTODOS

3.1. Curva Analítica

A partir de uma solução padrão com os ginkgolídeos A, B e C na concentração 1000µg/L foi preparada uma curva de calibração nas concentrações de 16, 24, 32, 56 e 72 µg/L. A derivatização dos ginkgolídeos foi realizada através da adição de 125 µL de N,N Dimetilformamida e 125 µL de solução derivatizante N,O-bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA) : Trimetilclorosilano (TMCS) (95:5). Após a homogeneização em vórtex por 10 segundos, a solução foi aquecida por 45 min. à 120°C no forno do cromatógrafo à gás. A análise dos ginkgolídeos foi realizada através de cromatografia gasosa com detecção por ionização por chama (DIC) empregando uma coluna DB-5MS de 30m de comprimento, 250 mm de diâmetro interno e 0,25mm de espessura de filme. O gradiente de temperatura foi o seguinte: 180°C (1min) ->260°C (20°C/min) -> 310°C (5°C/min). A temperatura do injetor, a temperatura do detector e o fluxo empregado foram, respectivamente, 280°C, 300°C e 1,5mL/min.

3.2. Preparação das amostras

Adicionou-se aos 10 mg do material em pó (placebo com adição de ginkgolídeos A, B e C) 5 ml de solução de ácido clorídrico 1 N com 20% de metanol e submetê-lo ao ultrassom por 15 minutos, seguido de aquecimento a 85°C em banho termostatizado por 1 hora (banho de água). Após a extração, adicionou-se 5 mL de acetato de etila e homogeneizado no vortex por 1 minuto. A separação das fases foi efetuada através da centrifugação ds tubos a 2500 rpm por 5 minutos. Foram transferidos 0,5mL da fase orgânica para um vial de 1,5mL e fase orgânica evaporada completamente, através de fluxo de nitrogênio.

A derivatização dos ginkgolídeos foi realizada conforme descrito na preparação da curva analítica.

3.3. Validação do Método

A validação da metodologia foi baseada nas diretrizes do INMETRO (DQO-CGCRE-008)⁵ e ANVISA (RE 899)⁶.

3.3.1. Especificidade

A avaliação da especificidade foi realizada a partir das avaliações do perfil cromatográfico do branco de processo e da substância de interesse frente às impurezas principais dos componentes da formulação (placebo).

3.3.2. Linearidade

Este parâmetro foi avaliado através da avaliação dos resultados dos coeficientes de correlação e determinação assim como homogeneidade das variâncias dos resíduos dos diferentes níveis de concentração.

3.3.3. Repetitividade

As repetitividades intraensaios dos ginkgolídeos foram obtidas através da avaliação de seis determinações no nível de 64ppm.

3.3.4. Precisão Intermediária

Foram comparados os resultados obtidos por dois analistas em dois dias diferentes através do teste de verificação da homogeneidade da variância entre os grupos (Teste F).

3.3.5. Exatidão/Recuperação

Verificou-se a recuperação dos ginkgolídeos em amostras fortificadas (seis replicatas) de placebo no nível de concentração de 64ppm.

3.3.6. Robustez

O fluxo do gás de arraste foi modificado em uma proporção de +/5%.

3.3.7. Estabilidade da solução de padrões

Uma solução mãe dos padrões de ginkgolídeos foi preparada e acondicionada sob refrigeração (4°C) durante 21 dias.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Validação

4.1.1. Especificidade

As amostras do branco não apresentaram picos nos tempos de retenção dos ginkgolídeos A, B e C.

4.1.2. Linearidade

Os resultados obtidos demonstraram resultados das análises de regressão com valores de r e R^2 maiores que 0,99. O estudo da homogeneidade da variância dos resíduos através do teste de Levene demonstrou que as curvas de calibração construídas eram homocedásticas.

4.1.3. Precisão

O desvio padrão relativo (DPR) das medidas para todos os ginkgolídeos foram abaixo de 2,0%. Na avaliação da precisão intermediária em dois diferentes dias e analistas, o estudo estatístico do Teste F comprovou que não houve diferença significativa entre as duas análises.

4.1.4. Exatidão

Os valores de recuperação médios encontrados dos ginkgolídeos A, B e C foram 93,2%, 94,3% e 85,0%, respectivamente.

4.1.5. Robustez

Em todas condições de estudo foi observada a homogeneidade das variâncias, isto é, $F_{\text{calculado}} < F_{\text{tabelado}}$.

4.1.6. Estabilidade da Solução Padrão

Os ginkgolídeos A, B e C apresentaram estabilidade após 21 dias de armazenamento sob refrigeração (4°C). O estudo estatístico do teste F comprovou que não houve diferença significativa entre os resultados obtidos nas duas preparações (fresca e após 21 dias).

5. CONCLUSÃO

Estudos recentes comprovam a inconsistência do conteúdo presente em produtos comerciais à base de Ginkgo biloba. Portanto, torna-se imperiosa a padronização de extratos vegetais a fim de garantir a homogeneidade de conteúdo das cápsulas ou comprimidos.

Na tentativa de minimizar este problema, a validação do método apresentado demonstrou alta confiabilidade e eficiência, provando ser uma importante ferramenta no monitoramento dos ginkgolídeos

A, B e C presentes em formulações à base de extrato de *Ginkgo biloba*. Assim, possibilitando um melhor controle de qualidade da presença e quantidade de compostos ativos, o que ainda se apresenta como um principal desafio na produção de fitoterápicos.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelo Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial (SENAI).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] C. Daolio, "Aplicação de técnicas espectrométricas, cromatográficas e quimiométricas na avaliação da autenticidade de plantas utilizadas como fitoterápicos", Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 140pp., 2006.
- [2] L.S. de Jager, G.A. Perfetti, G.W. Diachenko "Analysis of ginkgolides and bilobalide in food products using LC-APCI-MS". *Journal of Pharmaceutical and Biological Analysis* 41, pp.1552-1559, 2006.
- [3] M.-J. Dubber, I.Kanfer. "Determination of terpene trilactones in Ginkgo biloba solid oral dosage forms using HPLC with evaporative light scattering detection.". *Journal of Pharmaceutical and Biological Analysis* 41, pp. 135-140, 2006.
- [4] F. Deng, S.W. Zito. "Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in Ginkgo biloba L. extract and pharmaceutical preparations". *Journal of Chromatography A*, 986, pp.121-127, 2003.
- [5] INMETRO "Orientações sobre validação de métodos analíticos-DQO-CGCRE-008", revisão 03- FEV/2010.
- [6] Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos - resolução - RE 899 de 29 de maio de 2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde.