

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DETERMINAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK
SUBESPÉCIE *PRUINOSA* (PATA-DE-VACA – LEGUMINOSAE)

ANA LÚCIA VARGAS ARIGONY

PORTO ALEGRE, 2005.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE FARMÁCIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

DETERMINAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DE *BAUHINIA FORFICATA* LINK

SUBESPÉCIE *PRUINOSA* (PATA-DE-VACA – *LEGUMINOSAE*)

Dissertação apresentada por **Ana Lúcia Vargas Arigony** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. José Ângelo da Silveira Zuanazzi

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Elfrides Schapoval

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de agosto de 2005 pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Flávia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Mirian Anders Apel

Universidade de Santa Cruz do Sul

Prof. Dr. Pedro Eduardo Fröhlich

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

A699d Arigony, Ana Lúcia Vargas
Determinação Química e Biológica de *Bauhinia forficata* Link
Subespécie *pruinosa* (pata-de-vaca – Leguminosae). / Ana Lúcia
Vargas Arigony – Porto Alegre : UFRGS, 2005.-160 p.: il. tab. graf.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Bauhinia forficata. 2. Pata-de-vaca. 3. Leguminosae. 4.
Validação. 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Atividade
antioxidante. 7. Atividade antiedematogênica. 8. Atividade
anticolinesterásica. I. Zuanazzi, José Ângelo da Silveira. II.
Schapoval, Elfrides Eva Scherman. III. Título.

CDU: 615.322:582.736

Bibliotecária responsável

Margarida Maria C. F. Ferreira-CRB10/480

Os procedimentos experimentais deste trabalho foram realizados nos Laboratórios de Farmacognosia, Ensino e Pesquisa em Controle de Qualidade e Central Analítica do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e no Laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, com suporte financeiro do CNPq, aos quais expresso meus agradecimentos imensuráveis.

**“Que as palavras que tu vais dizer
sejam dignas do silêncio que tu vais quebrar.”**

(Ghandi)

Aos meus pais,

dedico...

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Ângelo Silveira Zuanazzi, pela orientação, incentivo, respeito e confiança, que resultaram em um crescimento profissional, mas acima de tudo, pessoal.

À Professora Dra. Elfrides Schapoval, pela co-orientação, paciência e carinho fundamentais na construção deste trabalho e da minha formação.

Aos meus eternos mestres Profa. Denise Milão, Prof. Josué Schostack e Prof. Sérgio Lamb (*in memoriam*), pelo exemplo de amor e devoção às Ciências Farmacêuticas.

Às Prof^{as}. Dra. Amélia T. Henriques, Prof^{as}. Dra. Edna Suyenaga, Prof^{as}. Dra. Lílian Auler Mentz, Prof. Dra. Roseli Bortoluzzi e principalmente a Prof^{as}. Dra. Miriam Apel e a MSc. Ana Lúcia Aboy pelas contribuições mais do que valiosas ao longo da construção deste trabalho. Ao Prof. Dr. Fábio Menezes (UFRJ) pelo auxílio nos experimentos de atividade antioxidante. Ao Prof. Dr. Cechinel pelas amostras cedidas.

A todos os colegas, bolsistas, professores e funcionários que de alguma forma possam ter contribuído para a realização deste trabalho.

Um agradecimento especial a Msc. Marina Scopel, pela paciência, solicitude e parceria em todos os momentos que precisei.

Aos queridos Msc. Tatiana Castilhos, “quase” Dr. Rogério Petersen, Msc. Paulo Artur Coelho, Vinicius Dorneles, Ana Paula Cappra Silva, Maribete Holzschuh, Msc. Érico Martini, Daniela Ghisleni e Letícia Colomé por me presentarem com a sua amizade e momentos de descontração tão necessários.

Ao meu querido professor Msc. Cabral Pavei pela paciência extrema, a amizade sincera e inúmeras contribuições de imensurável relevância na construção deste trabalho.

A família Cestari e ao pessoal da Medicor Produtos Hospitalares e Riopasa Distribuidora de Medicamentos, pela torcida e pela compreensão todas as vezes que não pude ir trabalhar em nome do desenvolvimento da ciência.

Aos meus conterrâneos Arquimedes e Mara Apratto por cultivarem com todo carinho a minha “pata-de-vaca”. A minha Teacher Márcia pelo incentivo e apoio em diferentes momentos dessa batalha.

A todos os meus amigos do Colégio Bom Conselho e seus adereços, aqui representados pela Beta, Carol, Juli, Lili e Lu; a turma da fronteira oeste, entre eles, Carol A., Carol Pi, Micha, João, Maju, Jê e Su; aos colegas e amigos da PUCRS, Clôzinha, Matheus e Rê Leke; os cariocas, Nanda, Ju e Rafa; a turma da gym, Dani, Lis e Ana; e os meus angels, René e Gabriel; a todos eles, agradeço por inúmeras vezes acreditarem em mim até mesmo quando eu mesma já não mais o fazia.

A minha madrinha Maria Lúcia Vargas e ao meu tio Júpiter da Costa Vargas Filho, por todo o apoio e torcida. A minha tia Tânia Arigony por ter me ensinado, quando criança, o significado da palavra biologia, por que foi mais ou menos aí que tudo começou (e ao meu tio Roberto Arigony por ter se casado com ela).

A família Clemens, Vô Carlos, Vó Caia, Ju, Diego, Carlinhos, Ana, Bê e Isabela, pelo carinho, acolhida e incentivo essenciais na reta final.

Aos meus pais Maria do Carmo e José Narciso Arigony e meu irmão José Mariano Arigony, por que sem eles, eu nada seria. E por que os amo a perder de vista...

Ao Maurício Corte, por de repente, ter acontecido na minha vida...

E obviamente, ao Cara lá de cima, por ter me provado n vezes que até mesmo a Sua aparente ausência, é sinal da Sua presença.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Equações.....	xix
Lista de Abreviaturas.....	xxi
Resumo.....	xxiii
Abstract.....	xxv
INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA.....	1
1 OBJETIVOS GERAIS.....	7
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Aspectos Botânicos.....	13
2.2 Aspectos Químicos.....	15
2.3 Aspectos Farmacológicos.....	18
2.3.1 Atividade Antioxidante.....	18
2.3.2 Atividade Antiinflamatória.....	18
2.3.3 Atividade Hipoglicemiante.....	19
2.3.4 Outras Atividades.....	20
3 DETERMINAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE DE <i>BAUHINIA FORFICATA</i>	23
3.1 Introdução.....	25
3.2 Objetivos específicos.....	26
3.3 Materiais e Métodos.....	27
3.3.1 Material vegetal.....	27
3.3.2 Preparação dos extratos.....	27
3.3.3 Hidrólise ácida.....	27
3.3.4 Análise cromatográfica.....	28
3.3.5 Condições cromatográficas.....	28
3.3.6 Otimização da técnica.....	29
3.3.6.1 Avaliação da influência da proporção droga:solvente.....	29
3.3.6.2 Avaliação do solvente empregado.....	29
3.3.6.3 Avaliação dos métodos de extração.....	29
3.4 Resultados e Discussão.....	30
4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA MAJORITÁRIA (SQM).....	37
4.1 Introdução.....	39

4.2	Objetivos específicos.....	40
4.3	Materiais e Método.....	40
4.3.1	Preparação do extrato.....	40
4.3.2	Isolamento.....	40
4.4	Resultados e Discussão.....	41
5	VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRÁFA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA DETERMINAÇÃO DE SQM.....	45
5.1	Introdução.....	47
5.2	Objetivos específicos.....	50
5.3	Materiais e Método.....	50
5.3.1	Preparação dos extratos.....	50
5.3.2	Análise cromatográfica.....	50
5.3.3	Condições cromatográficas.....	50
5.4	Validação.....	51
5.4.1	Linearidade.....	51
5.4.1.1	Preparação da curva padrão da substância química majoritária (SQM).....	51
5.4.2	Repetibilidade.....	51
5.4.3	Precisão Intermediária.....	52
5.4.4	Exatidão.....	52
5.4.5	Especificidade.....	52
5.4.6	Limites de detecção e quantificação.....	52
5.4.7	Robustez.....	53
5.5	Resultados e Discussão.....	54
6	DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA.....	61
6.1	Introdução.....	63
6.2	Objetivos específicos.....	67
6.3	Materiais e Método.....	67
6.3.1	Estudo de estabilidade acelerada.....	67
6.3.2	Doseamento.....	67
6.3.3	Cálculos da velocidade de degradação (k), dos tempos de vida útil ($t_{90\%}$) e meia-vida ($t_{1/2}$)	67
6.4	Resultados e Discussão.....	68
7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	73
7.1	Introdução.....	75
7.2	Objetivos específicos.....	76

7.3 Materiais e Método.....	76
7.4 Resultados e Discussão.....	78
8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA <i>IN VIVO</i>	81
8.1 Introdução.....	83
8.2 Objetivo específico.....	84
8.3 Materiais e Métodos.....	84
8.3.1 Material biológico.....	84
8.3.2 Preparação do extrato.....	85
8.3.3 Edema em pata de rato.....	85
8.3.4 Método de morte.....	86
8.3.5 Método de descarte do material biológico.....	86
8.4 Resultados e Discussão.....	86
9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA.....	91
9.1 Introdução.....	93
9.2 Objetivo específico.....	94
9.3 Materiais e Método.....	94
9.3.1 Compostos isolados.....	94
9.3.2 Método de Autobiografia.....	95
9.4 Resultados e Discussão.....	95
10 DISCUSSÃO GERAL.....	97
11 CONCLUSÕES GERAIS.....	103
12 REFERÊNCIAS.....	107
13 ANEXOS.....	121
ANEXO 1: Espectro de massas de SQM, <i>eletrospray</i> negativo	
ANEXO 2: Informações complementares sobre o RMN	
ANEXO 3: Resolução do Comitê de Ética da UFRGS	

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Parâmetros para análise cromatográfica de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	28
Tabela 3.2. Sistema gradiente utilizado para a análise por CLAE de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	29
Tabela 3.3. Avaliação da influência da proporção droga:solvente na preparação do extrato de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	31
Tabela 3.4. Avaliação do solvente empregado no processo de extração de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	31
Tabela 5.1. Modificação no gradiente para a realização do teste de robustez no método de CLAE.....	53
Tabela 5.2. Modificação no fluxo para a realização do teste de robustez no método de CLAE.....	53
Tabela 5.3. Áreas absolutas dos picos do marcador SQM de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> obtidas a partir de injeções em CLAE.....	54
Tabela 5.4. Análise de variância dos resultados obtidos para determinação da equação da reta e coeficiente de correlação de SQM.....	55
Tabela 5.5. Resultados da análise de regressão da SQM.....	56
Tabela 5.6. Resultados da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária da solução extrativa de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> por CLAE.....	57
Tabela 5.7. Resultados da análise de exatidão em CLAE para a amostra de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	57
Tabela 5.8. Avaliação do parâmetro de robustez para extratos de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	59
Tabela 6.1. Quadro de definição das zonas climáticas definidas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1996).....	66
Tabela 6.2. Análise de estabilidade acelerada para <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	69
Tabela 6.3. Valores experimentais obtidos no estudo de estabilidade acelerada de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> , considerando-se diferentes ordens de reação.....	71
Tabela 7.1. Percentual de atividade antioxidante demonstrado pelos extratos butanólico, etanólico e aquoso de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	78
Tabela 8.1. Formação do edema em pata de ratos induzido pela carragenina.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Folhas de <i>Bauhinia forficata</i> . No detalhe se observa a presença de espinhos.....	14
Figura 2.2. Flor e legume de <i>Bauhinia forficata</i>	15
Figura 2.3. Flavonóides presentes em <i>Bauhinia forficata</i>	17
Figura 3.1. Cromatograma de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> a 348nm de acordo com o método proposto e destacando SQM com seu respectivo UV.....	30
Figura 3.2. Cromatograma de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>forficata</i> a 348 nm..	32
Figura 3.3. Cromatograma de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>forficata</i> sobreposto com subespécie <i>pruinosa</i> , a 348 nm.....	33
Figura 3.4. Cromatograma de canferitrina, composto presente em <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>forficata</i> , cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Cechinel (UNIVALI – Itajaí/ SC), a 348 nm.....	33
Figura 3.5. Cromatograma de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> sobreposto com canferitrina.....	34
Figura 3.6. Cromatograma de <i>Bauhinia variegata</i> , a 348 nm.....	35
Figura 3.7. Cromatograma de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> com a variação das estações do ano, a 348 nm.....	35
Figura 3.8. Cromatograma demonstrando a formação de quercetina e canferol após hidrólise ácida de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> , a 348 nm.....	36
Figura 4.1. Cromatograma da substância química majoritária (SQM) presente em <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> , a 348 nm.....	42
Figura 4.2. Cromatograma de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> sobreposto com a substância química majoritária (SQM) isolada a partir de extrato butanólico de suas folhas, a 348 nm.....	42
Figura 4.3. Cromatograma de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>forficata</i> sobreposto com a substância química majoritária (SQM) isolada a partir de extrato butanólico de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> , a 348 nm.....	43
Figura 5.4. Representação gráfica da reta e coeficiente de correlação para SQM.....	55
Figura 5.5. Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação ao composto majoritário (SQM).....	58
Figura 6.1. Perfil de decaimento do teor percentual de SQM obtido a partir das análises cromatográficas das amostras provenientes do estudo de estabilidade para <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	69
Figura 6.2. Cromatograma demonstrando o decaimento sistemático dos compostos presentes em <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> no decorrer da análise de estabilidade.....	70
Figura 6.3 Representação gráfica, de ordem zero, da curva de degradação térmica de SQM.....	71

Figura 6.4 Representação gráfica, de primeira ordem, da curva de degradação térmica de SQM.....	71
Figura 6.5 Representação gráfica, de segunda ordem, da curva de degradação térmica de SQM.....	72
Figura 7.1. Representação gráfica da atividade antioxidante apresentada pelos extratos de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i> testados pelo método do DPPH.....	78
Figura 8.1. Aumentos dos volumes dos edemas em pata de ratos.....	88
Figura 9.1. Cromatograma de <i>Bauhinia forficata</i> , a 348 nm, demonstrando os picos das substâncias validadas no experimento de atividade anticolinesterásica.....	96

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 5.1. Cálculo para determinação do limite de detecção.....	52
Equação 5.2. Cálculo para determinação do limite de quantificação.....	52
Equação 5.3. Equação da reta calculada pelo método dos mínimos quadrados para SQM.....	54
Equação 5.4. Equação da reta calculada pelo método dos mínimos quadrados para a solução extrativa de <i>Bauhinia forficata</i> subespécie <i>pruinosa</i>	56
Equação 5.5. Cálculo utilizado para determinação do percentual de recuperação do marcador químico, SQM.....	57
Equação 6.6. Equação utilizada para o cálculo da velocidade de degradação de uma reação de segunda ordem.....	68
Equação 6.7. Equação utilizada para o cálculo do tempo de vida útil ($t_{90\%}$) de SQM de uma reação de segunda ordem.....	68
Equação 6.8. Equação utilizada para o cálculo do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de SQM de uma reação de segunda ordem.....	68
Equação 7.1 Fórmula para a conversão da medida em absorvância em percentual de atividade antioxidante.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de alta eficiência

DP – Desvio padrão

FDA – Administração de Fármacos e Alimentos, Estados Unidos

LD – Limite de detecção

LQ – Limite de quantificação

R_f – Fator de retenção

SQM – Substância química majoritária

SM – Solução mãe

UV – Espectrofotometria na região ultravioleta e visível

RESUMO

Bauhinia forficata, Leguminosae, é conhecida popularmente como pata-de-vaca e seus principais constituintes químicos são flavonóides. É comumente usada como antidiabética, mas existem relatos a respeito de suas atividades antioxidante e antiedematogênica. A fim de avaliar-se o comportamento de seus constituintes químicos frente a variações de temperatura e umidade, realizou-se estudo de estabilidade acelerada ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $90\% \pm 5\%$ U.R.), onde a substância química majoritária (SQM) serviu como marcador para os devidos cálculos e, portanto, o seu isolamento prévio tornou-se imprescindível. Um método devidamente validado por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi utilizado para as análises e através das mesmas pode-se prever uma reação de segunda ordem e, por conseguinte, um tempo de vida útil de 2,63 dias e um tempo de meia-vida de 23,65 dias. Avaliou-se, ainda, as atividades antioxidante (DPPH), antiedematogênica (edema em pata de ratos induzido pela carragenina) e anticolinesterásica (autobiografia). Para a atividade antioxidante, dos extratos testados, o butanólico foi o que demonstrou maior ação ($54,73\text{ }\mu\text{l/ml}$) sendo, no entanto, inferior ao padrão *Ginkgo biloba* ($42,51\text{ }\mu\text{l/ml}$). Na avaliação da atividade antiedematogênica, o extrato aquoso testado demonstrou um máximo de inibição de 76,5%. Ao testar-se a atividade anticolinesterásica de produtos isolados obtidos a partir de *B. forficata*, nenhuma ação significativa foi observada exigindo estudos complementares.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata*, CLAE, validação, estabilidade acelerada, atividades antioxidante, antiedematogênica, anticolinesterásica.

ABSTRACT

Bauhinia forficata, Leguminosae, is popularly known as *pata-de-vaca* and its main chemical constituents are flavonoids. It is used in the folk medicine as anti-diabetes but there are, also, reports regarding its anti-oxidant and antiinflammatory activities. In order to evaluate the behavior of its chemical constituents under temperature and moisture variations, a study of accelerated stability ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ and $90\% \pm 5\%$ R.U.) was carried out. In this study, the major compound was used as a tracer for the calculations and thus, its previous isolation was essential. A properly validated method in High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) was used in the analysis and from this, a second order reaction was predicted. By this mean, the shelf life expectancy was determined to be 2,63 days and the half-life was 81,44 days. The antioxidant (DPPH), antiinflammatory (carrageenin inducing rat paw edema) and anticholinesterasic (biographic) activities were also evaluated. Regarding the antioxidant activity, from the extracts which were tested, the butanolic one presented the best activity (54,73 $\mu\text{l/ml}$). However, it was lower than *Ginkgo biloba* standard (42,51 $\mu\text{l/ml}$). Regarding the antiinflammatory activity, the aqueous extract showed an inhibition maximum at 76,5%. When testing the anticholinesterasic activity of isolated products obtained from *B. forficata*, no significant activity was observed and further studies are required.

Key-words: *Bauhinia forficata*, HPLC, validation, accelerated stability, antioxidant, antiinflammatory and anticholinesterasic activities.

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA DO TEMA

As plantas medicinais e seus derivados constituíram durante muito tempo a base da terapêutica. Atualmente, cerca de 25% dos fármacos utilizados são de origem vegetal, e 50% daqueles de origem sintética têm alguma relação química com os princípios isolados de plantas medicinais. Isto se deve, em parte, à grande variedade de espécies (250-500 mil) de plantas existentes na flora mundial, muitas com importantes propriedades terapêuticas (SILVA e CECHINEL, 2002).

Motivada por inúmeros fatores, tais como a necessidade de inovação e carência de novas drogas para o tratamento de patologias que permanecem ainda sem tratamento adequado, pressão entre as próprias indústrias e, sobretudo por vantagens competitivas e declínio de produtividade, as indústrias farmacêuticas vêm, ultimamente, investindo soma considerável de recursos, visando o desenvolvimento de novos medicamentos (CALIXTO, 2001a).

Sendo assim, se tem verificado um aumento nos estudos que comprovam alguns dos conhecimentos empíricos, visto que a medicina popular é rica em exemplos de plantas utilizadas para diversos fins, que substituem, muitas vezes, a prescrição médica. Acredita-se, inclusive, que cerca de 80% da população mundial use plantas como primeiro recurso terapêutico (SILVA e CECHINEL, 2002).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, pertencentes à família Leguminosae, as quais são encontradas principalmente nas áreas tropicais do planeta, compreendendo aproximadamente 300 espécies. Muitas destas plantas são utilizadas como recurso terapêutico na medicina popular em várias regiões do mundo, incluindo a África, Ásia e América Central e do Sul. Pouco se conhece a respeito da atividade farmacológica das plantas do gênero *Bauhinia*. Dentre os relatos descritos na literatura científica, este gênero é freqüentemente estudado quanto à sua possível ação hipoglicemiante, uma vez que na medicina popular estas plantas são usadas para o tratamento de diabetes (SILVA e CECHINEL, 2002).

Bauhinia forficata é a espécie que apresenta maior número de estudos referentes à atividade hipoglicemiante, sendo considerada, muitas vezes, pela

comunidade rural, como “pata-de-vaca verdadeira”. Esta planta é muito usada na forma de chás e outras preparações fitoterápicas, uma vez que se encontra facilmente disponível no mercado farmacêutico (SILVA e CECHINEL, 2002).

Os índios brasileiros, bem como os nativos de outros países sul-americanos, usavam as folhas do vegetal como cicatrizantes, empregando-as em banhos para feridas ou aplicando-as diretamente sobre os ferimentos. Usavam-nas também como diuréticas, digestivas e expectorantes. As atividades analgésica e antiinflamatória também são mencionadas para *B. forficata* (ALONSO, 2000).

B. forficata é muitas vezes considerada como sendo a “insulina natural” devido ao seu emprego no controle do Diabetes (MIYAKE *et al.*, 1986). JULIANI (1931) foi o responsável pelo primeiro relato sobre a sua ação hipoglicemiante a partir do qual se seguiram muitos outros estudos. RUSSO e colaboradores (1990), no entanto, concluíram que em casos de Diabetes do Tipo II, não há nenhuma ação comprovada com o uso de infusão preparada a partir de *B. forficata*. SILVA e colaboradores (2002), por sua vez, usaram uma pequena fração *n*-butanólica da planta, e constataram uma significativa redução nos níveis glicêmicos dos ratos utilizados no experimento. Segundo PEPATO e colaboradores (2002), aparentemente, o efeito causado por *B. forficata* nos níveis de glicemia é maior em casos de diabetes moderada. Os diferentes e inconclusivos resultados podem ser devido a vários aspectos não levados em consideração nestas investigações, como os fatores ambientais (tipo de solo, clima, etc) e sazonais (SILVA e CECHINEL, 2002).

A *B. forficata* vem sendo usada, principalmente, como um antidiabético, sem, no entanto, possuir um estudo apropriado sobre a sua estabilidade ou ao menos, uma metodologia de análise para um controle de qualidade adequado. A proposta aqui apresentada tem como finalidade desenvolver um controle de qualidade para a *B. forficata* Link em função de sua estabilidade, mediante variações de temperatura e umidade de armazenamento.

Considerações a respeito de atividades biológicas, tais como antioxidante e antiedematogênica, também tornaram-se relevantes por serem citadas, mas não

estudadas cientificamente, por outros autores como BRACA e colaboradores (2001) e MENEZES e colaboradores (2004) para atividade antioxidante; SILVA e colaboradores (2000), OLIVEIRA e colaboradores (2001) e SOSA e colaboradores (2002) para atividade antiedematogênica e antiinflamatória, tanto para *B. forficata* como para outras espécies de *Bauhinia*.

No que se refere à atividade anticolinesterásica, as especulações cada vez maiores em torno da Doença de Alzheimer e a capacidade dos flavonóides em contribuir para a integridade do tecido neuronal por diferentes mecanismos (FRAGA *et al.*, 2004) foram o principal motivo pelo qual decidiu-se verificar alguma possível relação entre *B. forficata* e este distúrbio.

1 OBJETIVOS GERAIS

1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como principais objetivos a determinação da estabilidade química de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*, bem como a avaliação de atividades antioxidante, antiedematogênia e anticolinesterásica tanto de diferentes extratos como de produtos isolados da planta.

Para as análises e validação do método tornou-se imprescindível o isolamento da substância química majoritária presente em *B. forficata*.

Os objetivos específicos encontram-se descritos nos próprios capítulos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

O gênero *Bauhinia* Bentham apresenta aproximadamente 250 espécies distribuídas pelas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do mundo, especialmente na América e na África (FORTUNATO, 1986). O nome do gênero foi dado por Bentham em homenagem aos irmãos Bauhin, médicos e botânicos suíços que viveram no século XVII (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

A espécie *Bauhinia forficata* Link pertence à seção Pauletia (Cav.) DC e família Leguminosae (Fabaceae) Jussieu, contendo as subespécies *pruinosa* (Vogel) Fortunato *et* Wunderlin e *forficata* (JUDD *et al.*, 1999). A sinonímia mais comumente encontrada para *B. forficata* Link é *B. candicans* Bentham (OLIVEIRA *et al.*, 2001), mas, normalmente, *B. candicans* é sinônimo da subespécie *pruinosa*. Popularmente é conhecida como Pata-de-vaca, Unha-de-vaca, Unha-de-boi, Casco-de-vaca, Pata-de-boi, Unha-de-boi-de-espinho, Pata-de-toro, Mahogani, Pata-de-chivo, Pezuna-de-vaca, Caubá entre outros (COSTA, 1942; CRUZ, 1979; LORENZI, 1982 e 1992; PIO CORREIA, 1984; OLIVEIRA *et al.*, 2001).

FORTUNATO (1986), ao estudar mais detalhadamente a espécie *B. forficata* Link, observou que a subespécie *pruinosa* (Vog.) Fortunato *et* Wunderlin cresce nos bordos de matas no Paraguai, sul do Brasil (incluindo o Rio Grande do Sul), Uruguai e Argentina. Ocorre, ainda, na Bolívia e no Norte da Argentina. A *B. forficata* Link subespécie *forficata* ocorre unicamente no Brasil, sendo sua distribuição geográfica desde o estado do Piauí, passando por toda a região nordeste e sudeste, alcançando o estado de Santa Catarina.

No Brasil existem muitas outras espécies de *Bauhinia* nativas e introduzidas. No Rio Grande do Sul, mais propriamente, pode-se citar uma espécie introduzida que, por sua vez, é comumente confundida com *B. forficata*, a *Bauhinia variegata* Linn. No entanto, *B. variegata* não apresenta espinhos e pode ser encontrada com flores tanto na cor branca como rósea, enquanto *B. forficata* tem como principais características morfológicas a presença de espinhos (**Figura 2.1**) e flores exclusivamente na cor branca (**Figura 2.2**).

B. forficata Link é uma pequena árvore que atinge em média de 5-9 metros (SILVA *et al.*, 2002) e apresenta potencial para uso em recuperação de áreas degradadas, plantios mistos, sendo empregada, ainda, como planta ornamental (ATROCH *et al.*, 2001). O tronco geralmente é tortuoso (LORENZI, 1982 e 1992) recoberto por súber castanho amarronzado, apresentando sulcos mais ou menos profundos e aspecto ligeiramente estriado no sentido longitudinal (OLIVEIRA *et al.*, 2001).

Em relação ao seu cultivo, de acordo com REIS e MARIOT (2003), deve ser plantada em covas devido ao seu porte e adapta-se facilmente a situações de formações secundárias.

As folhas medem geralmente, quando adultas, de 7 a 12 cm de comprimento e apresentam-se divididas em dois lobos, os quais atingem o terço superior ou, com mais freqüência, a metade do comprimento da folha. No vértice, entre os dois lobos pode-se observar a presença de um pequeno múcro. A base foliar varia de arredondada a subcordiforme, apresentando nessa região, no ponto de inserção do pecíolo, a presença de pulvinos. Os ápices dos lobos são agudos ou acuminados e a margem foliar é lisa. A lâmina foliar apresenta consistência membranácea e a superfície foliar é lisa, glabra ou ligeiramente pubescente na fase dorsal. A nervação é palmada, sendo constituída de 9 a 11 nervuras que curvam para o ápice. O pecíolo foliar é de comprimento mediano e apresenta dois espinhos em sua base, junto à inserção no caule (MIYAKE *et al.*, 1986). Uma foto ilustrativa das folhas de *B. forficata* pode ser observada na **Figura 2.1**.



Figura 2.1. Folhas de *Bauhinia forficata*. No detalhe se observa a presença de espinhos.

A inflorescência encontra-se na forma panícula, sendo integrada por flores grandes, brancas, de tamanhos variados e de pedúnculos germinados nos pedúnculos comuns curtos e laterais às folhas. O cálice tubuloso, característico, de 1,5 a 3 cm de comprimento, abrindo-se em lacínias de 3 a 5 cm de comprimento, apresenta coloração verde-clara. As pétalas são brancas em número de cinco, largo-lineares duas vezes mais longas que as sépalas, obtusas no ápice e de base contraída em forma de unha (OLIVEIRA *et al.*, 2001; **Figura 2.2**).

Os frutos são do tipo legume perfeito, de 15 a 25 cm de comprimento, de coloração escura, amarronzada quando na época da abertura. As sementes possuem contorno subovalado, são achatadas, de coloração escura, providas de uma linha esbranquiçada que delimita sua forma. Em sua extremidade mais afilada é bem visível a cicatriz denominada hilo, algumas vezes acompanhada de um resquício de funículo (OLIVEIRA *et al.*, 2001; **Figura 2.2**).



Figura 2.2. Flor e legume de *Bauhinia forficata*.

2.2 ASPECTOS QUÍMICOS

Algumas espécies de plantas do gênero *Bauhinia* foram e estão sendo estudadas química e farmacologicamente e, com isto, alguns dos seus compostos foram isolados e identificados. Assim, diferentes classes de metabólitos de

interesse medicinal existentes nessas espécies foram relatados, incluindo lactonas, flavonóides, terpenóides, esteróis, triterpenos, taninos e quinonas. Predominando, em praticamente todo o gênero, a presença de flavonóides. Apesar de muitos dos compostos presentes em *Bauhinia* serem conhecidos, pouco se sabe sobre a atividade farmacológica da maioria das substâncias isoladas do gênero *Bauhinia* (SILVA e CECHINEL, 2002).

No que diz respeito à composição química da *B. forficata*, pode-se citar a presença de esteróides, flavonóides, alcalóides, álcoois e poliálcoois. SALATINO *et al.* (1999) estudarem 9 espécies de *Bauhinia*, entre elas *B. forficata*, isolaram derivados glicosilados de canferol, quercetina, isoramnetina e miricetina. Sendo que para *B. forficata* eles relataram apenas a presença de canferol e quercetina glicosilados.

SILVA e CECHINEL (2002) relatam para *B. candicans* a presença de sitosterol, campesterol, estigmasterol, colesterol, canferol 3-O- β -rutinosídeo, canferol 3-O- β -rutinosídeo 7-O- α -ramnopiranosídeo, trigonelina, triacontanol e 3-O-metil-D-inositol (D-pinitol). Para *B. forficata*, os mesmos autores mencionam a presença de canferol-3,7-dirhamnosídeo (canferitrina), canferol-3-O- α -diramnosídeo e sitosterol.

PIZZOLATTI e colaboradores (2003), fracionando extratos das folhas de *B. forficata*, isolaram β -sitosterol, canferol [1], canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo [3], quercetina 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo [4], canferol 3-O-[β -D-glucopiranosídeo-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosídeo]-7-O- α -L-ramnopiranosídeo [5] e quercetina 3-O-[β -D-glucopiranosídeo-(1 \rightarrow 6)- α -L-ramnopiranosídeo]-7-O- α -L-ramnopiranosídeo [6]. Os mesmos autores obtiveram, a partir do extrato butanólico das flores, canferol 7-O- α -L-ramnopiranosídeo [2]. Conforme **Figura 2.3**.

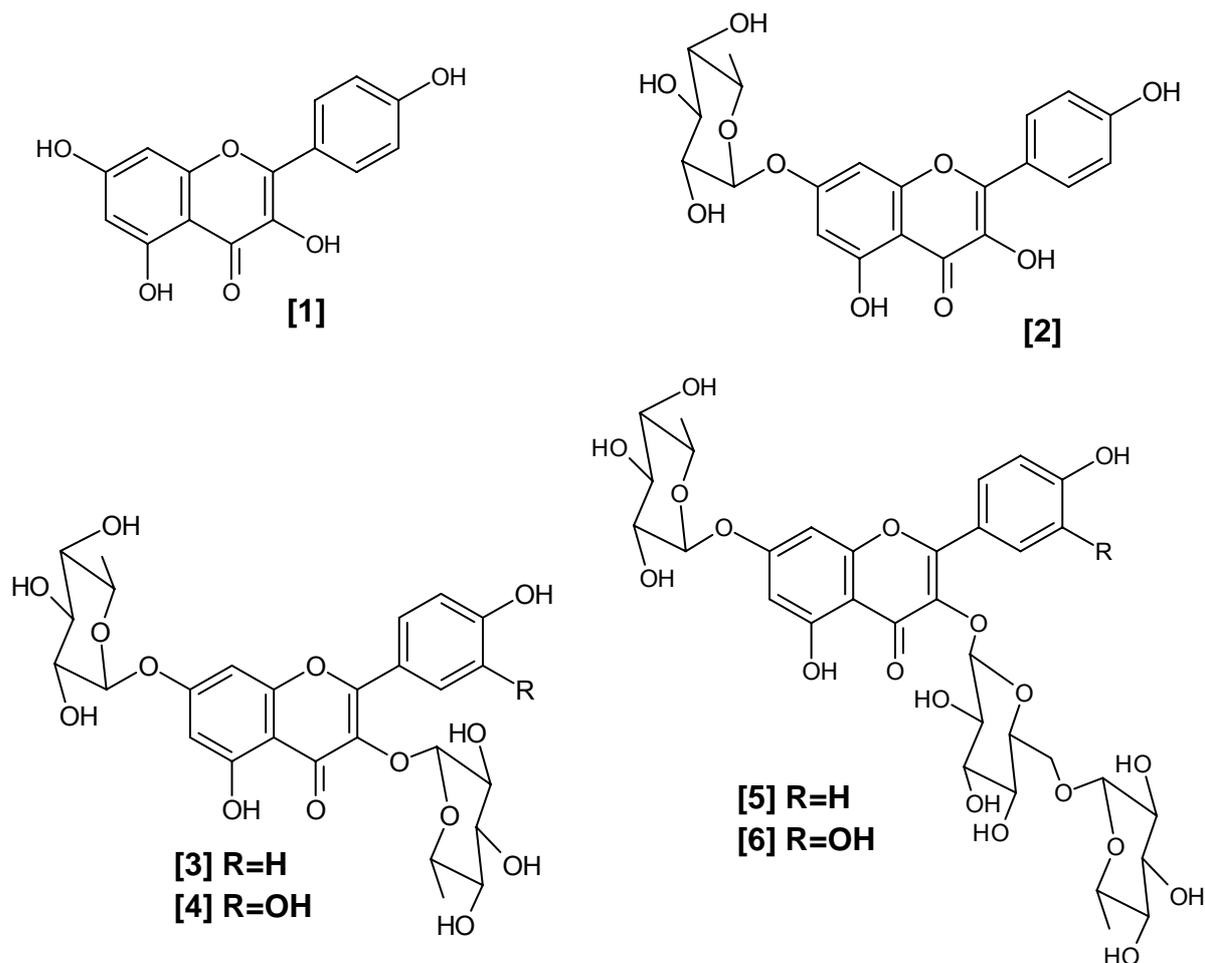


Figura 2.3. Flavonóides presentes em *Bauhinia forficata*.

Através de delineamentos fitoquímicos foi mencionada também a presença de taninos e mucilagens, não sendo verificada a ocorrência de antraderivados e saponinas (MIYAKE *et al.*, 1986).

Um estudo comparativo entre diferentes partes da planta (folhas, caule e raízes), realizado por SILVA e colaboradores (2000), indicou a presença de esteróides e terpenos em todas as partes, predominantemente nas folhas. No entanto, canferol 3,7-di-O- α -L-ramnopiranosídeo (canferitrina) foi detectado exclusivamente nas folhas de *B. forficata*. Este canferol poderia, portanto, segundo os autores, ser considerado um marcador químico para o controle de qualidade em preparações com as folhas de *B. forficata*, uma vez que não é encontrado em nenhuma outra parte do vegetal.

Os flavonóides são considerados bons marcadores quimiotaxonômicos. Esta característica lhes é conferida pela sua abundância relativa em quase todo o reino vegetal, especificidade em algumas espécies, relativa facilidade de identificação, relativa estabilidade e seu acúmulo com maior influência do meio ambiente (BRUNETON, 1991; ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). Neste trabalho, pretende-se utilizar o flavonóide majoritário, nas folhas, como marcador para fins de padronização do extrato vegetal de *B. forficata* por serem exatamente os flavonóides os principais compostos químicos presentes em *Bauhinia*.

2.3 ASPECTOS FARMACOLÓGICOS

2.3.1 Atividade Antioxidante

Considerações a respeito da atividade antioxidante de *B. forficata* têm sido feitas em função da presença marcante dos flavonóides entre seus principais constituintes.

BRACA e colaboradores (2001) testaram a atividade antioxidante de sete produtos isolados a partir de folhas de *Bauhinia tarapotensis*. De acordo com os resultados, puderam confirmar que três dos compostos avaliados possuíam alguma atividade antioxidante.

MENEZES e colaboradores (2004) verificaram a atividade antioxidante de espécies coletadas no estado do Paraná e constataram que *B. mycrostachya* era a mais potente de acordo com os modelos utilizados no estudo.

SOUSA e colaboradores (2004), por sua vez, testaram o potencial antioxidante de um dos produtos isolados a partir da fração n-butanólica de folhas de *B. forficata*, o canferol – 3,7- O – α – diraminosídeo. Eles demonstraram que o composto possui uma atividade significativa frente à metodologia empregada.

2.3.2 Atividade Antiinflamatória

B. forficata Link tem sido mencionada como possuidora de atividade antinociceptiva e antiinflamatória (SILVA *et al.*, 2000). Tais atividades são freqüentemente citadas para plantas do gênero. YADAVA e REDDY (2003), ao avaliarem *B. variegata*, demonstraram atividade antiinflamatória vinculada ao

flavonóide glicosilado 5,7,3', 4'-tetrahydroxi-3-metoxi-7-O-raminopiranosídeo (1-3)-O-galactopiranosídeo isolado a partir de raízes da planta. SOSA e colaboradores (2002) confirmaram a atividade antiinflamatória para *B. tarapotensis*.

2.3.3 Atividade Hipoglicemiante

A ação hipoglicemiante da *B. forficata*, há muito observada empiricamente em seu emprego como antidiabético, e cientificamente demonstrada primeiramente por JULIANE (1931), não foi devidamente elucidada até os dias de hoje. Desta forma, ainda não se sabe a qual dos princípios químicos de *B. forficata* se deve atribuir esta atividade e a mesma continua sendo discutida e investigada.

RUSSO e colaboradores (1990) demonstraram que a infusão preparada com as folhas de *B. forficata* não apresentou efeito hipoglicemiante em pacientes com glicemia normal e em pacientes com diabetes Tipo II (não-insulino dependente).

LEMUS e colaboradores (1999) avaliaram a atividade hipoglicemiante de quatro plantas usadas na medicina popular chilena, entre elas *B. candicans*. As infusões não alteraram os níveis glicêmicos de ratos saudáveis, mas em animais diabéticos o extrato de *B. candicans* reduziu em 39% a glicemia induzida pela aloxona, tendo sido este efeito atribuído à presença do alcalóide trigonelina.

SILVA e colaboradores (2002) testaram um extrato *n*-butanólico, preparado a partir das folhas de *B. forficata*, nos níveis séricos de glicose em ratos. A administração oral do extrato demonstrou uma diminuição considerável nos níveis de glicose tanto nos animais saudáveis quanto nos hiperglicêmicos.

PEPATO e colaboradores (2002) também realizaram experimentos para verificar a atividade hipoglicemiante de *B. forficata*. Administraram o decocto cronicamente a ratos, durante 31 dias, via oral, e constataram uma redução nos níveis séricos de glucose e de uréia presentes na urina.

Mais recentemente, SOUSA e colaboradores (2004) testaram o efeito hipoglicemiante de um produto isolado a partir da fração *n*-butanólica de *B. forficata*, o canferol – 3,7-O – α – diraminosídeo (canferitrina). A administração

oral da canferitrina causou efeito hipoglicemiante nos ratos normais e naqueles em que se induziu diabetes previamente.

2.3.4 Outras Atividades

De uma maneira geral, as atividades diurética e hipoglicemiante, relacionadas às preparações feitas com as folhas de *B. forficata*, são as mais reconhecidas.

COSTA (1942) menciona propriedades estimulantes, expectorantes e adstringentes ligando-as muitas vezes às cascas do caule; propriedades diuréticas, antiblenorrágicas e vermífugas, às raízes; e finalmente, propriedades purgativas, às flores. Contudo, estas indicações, são muito antigas, não havendo confirmação em trabalhos recentes.

A ação diurética, no entanto, foi observada por SILVA e CECHINEL (2002) através do teste geral de atividades (TGA), no qual foi administrado o extrato bruto da tintura da planta e dez minutos após houve intensa diurese.

PIZZOLATTI e colaboradores (2003) relatam que a infusão das folhas de *Bauhinia forficata* é utilizada na medicina popular brasileira como agente diurético, hipoglicemiante, tônico, depurativo, no combate à elefantíase e na redução da glicosúria.

MARTINS e colaboradores, em 1994, realizaram um estudo a fim de demonstrar a atividade mutagênica de algumas plantas utilizadas popularmente, entre elas, *B. forficata*, e constataram uma certa toxicidade que deveria receber maior atenção.

NETO e colaboradores (2003) demonstraram uma possível inibição da peroxidase tireóidea pelo extrato de *B. forficata*. Foi observada uma inibição de 50% na atividade de oxidação do iodeto da TPO *in vitro* na presença de 0,011% de extrato da planta, sugerindo que o consumo crônico poderia levar ao hipotireoidismo e à formação de bócio.

Recentemente, HAEYOUNG e colaboradores (2005) comprovaram a inibição da progressão do ciclo celular de células HeLa por um composto isolado de *B. forficata*, chamado pelos autores de HY52.

OLIVEIRA e colaboradores (2005) verificaram que o extrato aquoso de folhas de *B. forficata* é capaz de neutralizar a coagulação induzida por veneno das cobras *Bothrops* e *Crotalus*, demonstrando possuir atividades anticoagulante e antifibrinogênica.

Para o gênero *Bauhinia* ainda são descritas outras inúmeras atividades sendo que algumas já foram estudadas cientificamente. PANDA e KAR (1999), em seus estudos, concluíram que *B. purpurea* possui atividade estimulante sobre a função da glândula tireóide. GONZALEZ-MUJICA *et al.* (2002) comprovaram que o extrato aquoso de *B. megalandra* é capaz de inibir, de forma dose-dependente, a absorção de glicose intestinal. RAJKAPOOR e colaboradores (2003), por sua vez, constataram que o extrato etanólico de *B. variegata* pode ser um agente em potencial no tratamento do Linfoma de Dalton.

Na literatura encontram-se, ainda, relatos a respeito da atividade anticolinesterásica. TREVISAN e MACEDO (2003) avaliaram a atividade anticolinesterásica de várias plantas, entre elas a *Bauhinia chyilantha*, que por sua vez não demonstrou possuir propriedade. ISHIGE e colaboradores (2001) realizaram experimento no qual testaram o efeito do canferol, que por sua vez demonstrou pouca atividade.

**3 DETERMINAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E ANÁLISE DO PERFIL
CROMATOGRÁFICO POR CLAE DE *BAUHINIA FORFICATA***

3 DETERMINAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO E ANÁLISE DO PERFIL CROMATOGRÁFICO POR CLAE DE *BAUHINIA FORFICATA*

3.1 INTRODUÇÃO

Ao se estudar metabólitos secundários, observa-se que muitas amostras contêm compostos polares e não voláteis, sendo que usualmente a cromatografia líquida, combinada com um detector UV – visível, pode ser o sistema escolhido para o isolamento e detecção dos metabólitos de interesse. A cromatográfica líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica analítica que compreende uma grande variedade de modos de separação, os quais podem ser escolhidos segundo a natureza química dos compostos a serem analisados (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

A dosagem conjunta dos flavonóides é bastante complexa em virtude do comportamento dos heterosídeos das respectivas agliconas e pela dificuldade de isolamento dessas substâncias de outras classes de fenóis (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003). O teor dos constituintes presentes nas plantas também varia consideravelmente em função de fatores externos, incluindo: temperatura, umidade, luminosidade, nutrientes do solo, método de coleta, secagem e transporte, parte da planta usada, entre outros. Cada um desses fatores pode afetar diretamente a qualidade da matéria-prima vegetal e, conseqüentemente, o produto final e a eficácia clínica dos medicamentos fitoterápicos (CALIXTO, 2001b).

A necessidade do desenvolvimento de um método analítico mais específico, exato e reprodutível favorece a análise dos extratos vegetais por CLAE. Reconhecida como a técnica mais adequada para a determinação quantitativa de marcadores químicos em preparações vegetais, a CLAE pode ser utilizada como um parâmetro de comparação e de validação de outra metodologia analítica, pois permite identificar e quantificar substâncias mesmo na presença de interferentes da matriz vegetal ou no analito (PAVEI, 2004).

A CLAE é considerada um método rápido e preciso, permitindo a separação e doseamento de quantidades relativamente pequenas de material (ZUANAZZI e MONTANHA, 2003).

Quando o objetivo da análise é o controle de qualidade do produto final, as exigências analíticas incidentes devem considerar diversos fatores, como especificidade, exatidão, precisão e tempo de rotina analítica. Dessa maneira, para fins de controle de qualidade, o método analítico deve ser validado para uma substância ou grupo de substâncias (PETRY, 1999). Recomenda-se, também, que o mesmo possa ser utilizado em estudos de estabilidade, permitindo, inclusive, a detecção de produtos oriundos da degradação das substâncias ativas ou dos marcadores químicos (SONAGLIO *et al.*, 2003).

A CLAE é o método de escolha para análises de estabilidade de componentes vegetais e seus possíveis produtos de degradação. Respeitando a composição química da droga vegetal, a CLAE permite separar um largo espectro de UV de flavonóides, alcançando desde os compostos polares até os apolares (HEIGL e FRANZ, 2003).

Considerando-se que a CLAE é bastante eficiente na análise de extratos vegetais, decidiu-se não somente avaliar o perfil cromatográfico de *B. forficata*, como também comparar diferentes subespécies e espécies do gênero.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) estabelecer e otimizar um sistema de análise por CLAE para *Bauhinia forficata*;
- b) avaliar o perfil cromatográfico de *B. forficata* por CLAE.
- c) comparar o perfil cromatográfico entre diferentes subespécies de *B. forficata*;
- d) verificar as possíveis alterações na composição química de *B. forficata* com a variação das estações do ano.
- e) comparar o perfil cromatográfico de *B. forficata* e *B. variegata*.

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Material vegetal

B. forficata foi coletada na região da fronteira oeste do Estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Rosário do Sul, no mês de outubro de 2003. Após identificação, realizada pelas Biólogas Botânicas Prof. Dra. Líliam Mentz e Dra. Roseli Bortoluzzi, as folhas secaram em temperatura ambiente. Material testemunho da planta encontra-se no Herbário do Instituto de Ciências Naturais da UFRGS, Departamento de Botânica, sob o registro de ICN 136705. Uma duplicata do mesmo material encontra-se disponível no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, incluído na seção Registro Botânico (RB), sob o código de RB 398065.

3.3.2 Preparação dos extratos

O material vegetal, composto por folhas, foi pulverizado com o auxílio de um moinho de facas IKA A11 basic (IKA-WERKE) e 150 mg, pesados em balança analítica (BELMACK ENGINEERING), foram submetidas à extração por turbólise, com Ultra Turrax T8 S8N-5G (IKA-WERKE), durante 5 minutos, utilizando 5 ml de solução etanólica 80% como solvente. As amostras foram filtradas a vácuo por papel filtro, em kitazato, com auxílio de funil de büchner e o seu volume foi retomado em balão volumétrico de 5 ml com a mesma solução etanólica 80%, sendo posteriormente levadas à análise cromatográfica descrita nos itens **3.3.4** e **3.3.5**.

3.3.3 Hidrólise Ácida

Pesou-se aproximadamente cerca de 150 mg de planta pulverizada, adicionou-se 4,0 ml de solução hidroetanólica 80% e 1ml de ácido clorídrico concentrado. Refluxou-se por 90 minutos a amostra. Após, evaporou-se o solvente em evaporador rotatório por 30 minutos. A amostra foi então, ressuspensa em 5,0 ml de metanol grau analítico e posteriormente filtrada com membrana apropriada para que se pudesse fazer a análise por CLAE, conforme os itens **3.3.4** e **3.3.5** (PIZZOLATTI *et al.*, 2003).

3.3.4 Análise cromatográfica

Os extratos foram diluídos, na proporção 5:1 (v:v) em metanol (grau analítico para CLAE / VETEC). Estas amostras foram filtradas por membrana filtrante hidrofóbica (Millipore; 0,45µm; 13 mm) e após, se procedeu a injeção no equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo realizadas três determinações.

3.3.5 Condições cromatográficas

Procedeu-se a análise cromatográfica utilizando os parâmetros descritos na **Tabela 3.1** a seguir.

Tabela 3.1. Parâmetros para análise cromatográfica de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Características	Descrição
Cromatógrafo	Waters Alliance 2695
Detector	UV/Vis Waters 2487 ou Waters 996 (PDA)
Coluna	Nova-Pak C18 ¹
Pré-coluna	Lichrospher Merck ²
Sistema de eluição	Gradiente
Fase móvel	A Acetonitrila:Água:Ácido Trifluoroacético (5:95:0,01; v/v/v) B Acetonitrila:Ácido Trifluoroacético (100:0,01; v/v)
Fluxo	0,8 ml/min
Volume de injeção	10 µl
Comprimento de onda	348nm
Sensibilidade de detecção	0,05 AUFS

¹ Dimensões da coluna / Tamanho de partícula: 3,9 x 150 mm / 4µm

² Dimensões da pré-coluna / Preenchimento: 10x4mm / 37-55 µm

A acetonitrila (grau analítico para CLAE / VETEC), água ultrapura (Milli-Q) e ácido trifluoroacético (TFA) (NUCLEAR) foram filtradas previamente através de membrana filtrante (HPLV 047 / Millipore) e desaeradas por 10 minutos em banho de ultra-som. O sistema utilizado foi gradiente e encontra-se descrito na **Tabela 3.2**.

Tabela 3.2. Sistema gradiente utilizado para a análise por CLAE de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Tempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0,00	100	0
10,0	59	41
13,0	0	100

3.3.6 Otimização da técnica

3.3.6.1 Avaliação da influência da proporção droga:solvente

Pesaram-se analiticamente, em balança, 150, 250 e 350 mg de material vegetal seco e pulverizado de *B. forficata*, submetendo-se, em duplicata, à extração e posterior verificação cromatográfica, em CLAE, conforme descrito nos itens **3.3.4** e **3.3.5**, com injeções em triplicata. O resultado obtido foi observado através da diferenciação média da integração das áreas do maior pico demonstrado, considerado neste experimento como sendo o marcador, após sobreposição dos cromatogramas.

3.3.6.2 Avaliação do solvente empregado

Extratos aquosos, etanólicos e hidroetanólicos (20:80, 50:50, 80:20; V/V) de *B. forficata*, foram submetidos à análise utilizando o resultado de quantidade de planta ideal obtido no item **3.3.6.1** para preparação dos extratos e posterior análise cromatográfica em triplicata, em CLAE. Os resultados obtidos foram observados através da diferenciação da integração da área do maior pico demonstrado, após sobreposição dos cromatogramas.

3.3.6.3 Avaliação dos métodos de extração

Turbólise e maceração estática durante 7 dias, foram testadas utilizando as condições pré-estabelecidas após a realização dos testes descritos nos itens **3.3.6.1** e **3.3.6.2**. Os extratos feitos em duplicata foram submetidos a análise e verificação cromatográfica com três determinações. Os resultados obtidos foram observados através da diferenciação da integração da área do maior pico demonstrado, após sobreposição dos cromatogramas.

3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O perfil cromatográfico dos flavonóides de *B. forficata*, após a extração descrita no item 3.3.1, analisado segundo o item 3.3.4 e de acordo com as condições preconizadas em 3.3.5, pode ser observado na **Figura 3.1**. Sendo o segundo pico (tempo de retenção em torno de 7,2 minutos) o flavonóide (constituente) majoritário, considerado neste trabalho, como sendo o marcador e ao qual será referido por substância química majoritária (SQM) apresentando UV mínimo 267,2 nm e máximo 348,1 nm.

Através da análise em CLAE com detector PDA, foi possível verificar-se que o grau de pureza do pico majoritário era satisfatório para as análises.

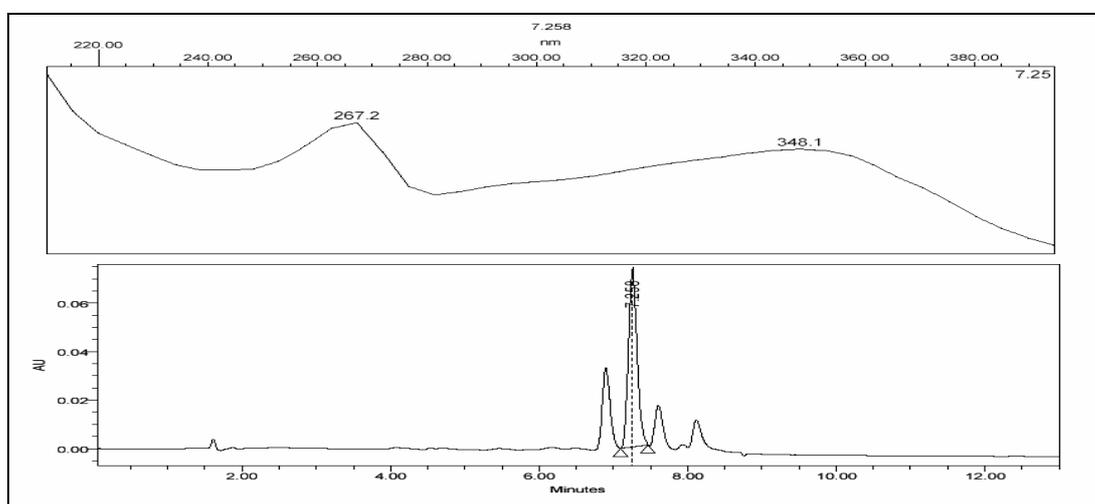


Figura 3.1. Cromatograma de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa* a 348nm de acordo com o método proposto e destacando SQM com seu respectivo UV.

O cromatograma apresentado denota que o método proposto parece bastante adequado para a análise de *B. forficata* considerando-se o perfil de flavonóides, pela análise de seus UVs e a substância química majoritária, SQM.

A otimização da técnica levou a inúmeros resultados que contribuíram para a determinação do método de análise empregado no decorrer de todo o trabalho. Ao se avaliar o item 3.3.3.1, referente à influência da proporção droga:solvente, obteve-se as seguintes áreas de marcador, descritas na **Tabela 3.3**.

Tabela 3.3. Avaliação da influência da proporção droga:solvente na preparação do extrato de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Massa de planta (mg)	Área de marcador (mV.s)
100	452679
150	503901
250	504025
350	504176

Os resultados demonstram que a quantidade de planta utilizada no preparo dos extratos não está vinculada, necessariamente, a uma maior concentração de marcador a partir do momento em que se atinge a saturação do solvente. No caso, a saturação foi atingida em 150mg e, portanto, a partir deste ponto, as alterações na área foram mínimas até 350mg se comparadas com a variação entre 100 e 150mg.

As áreas do maior pico, considerado o marcador, descritas na **Tabela 3.4**, foram obtidas a partir das análises para avaliação da melhor solução extrativa.

Tabela 3.4. Avaliação do solvente empregado no processo de extração de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Tipo de Sol. Extratoras	Área de marcador (mV.s)
Aquoso	475283
Etanólico	539146
Hidroetanólico (20:80)	558677
Hidroetanólico (50:50)	512297
Hidroetanólico (80:20)	495386

Os flavonóides são solúveis em álcoois, portanto, considerando-se que os constituintes de *B. forficata* são em sua maioria canferóis glicosilados, pode-se inferir que o melhor resultado esteja proporcionalmente vinculado a esta característica. De tal forma, a proporção da solução hidroetanólica (20:80) demonstrou ter solubilizado uma maior quantidade do canferol, por causa da percentagem de etanol, bem como os açúcares ligados ao mesmo, solúveis em água, por sua vez.

O último experimento relacionado à otimização da técnica foi o de avaliação do método de extração mais adequado, turbólise ou maceração estática durante 7 dias. Os valores de área para o marcador foram respectivamente 554908 e 526179. O método de turbólise mostrou-se superior à extração estática, neste caso, possivelmente pela sua capacidade de agitação com diminuição de partículas.

Partindo-se do método proposto foi possível fazer uma comparação entre o perfil cromatográfico de diferentes subespécies de *B. forficata*. Na **Figura 3.2**, verifica-se o perfil da subespécie *forficata* proveniente da cidade de Itajaí (SC) e gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Cechinel (UNIVALI – Itajaí/ SC).

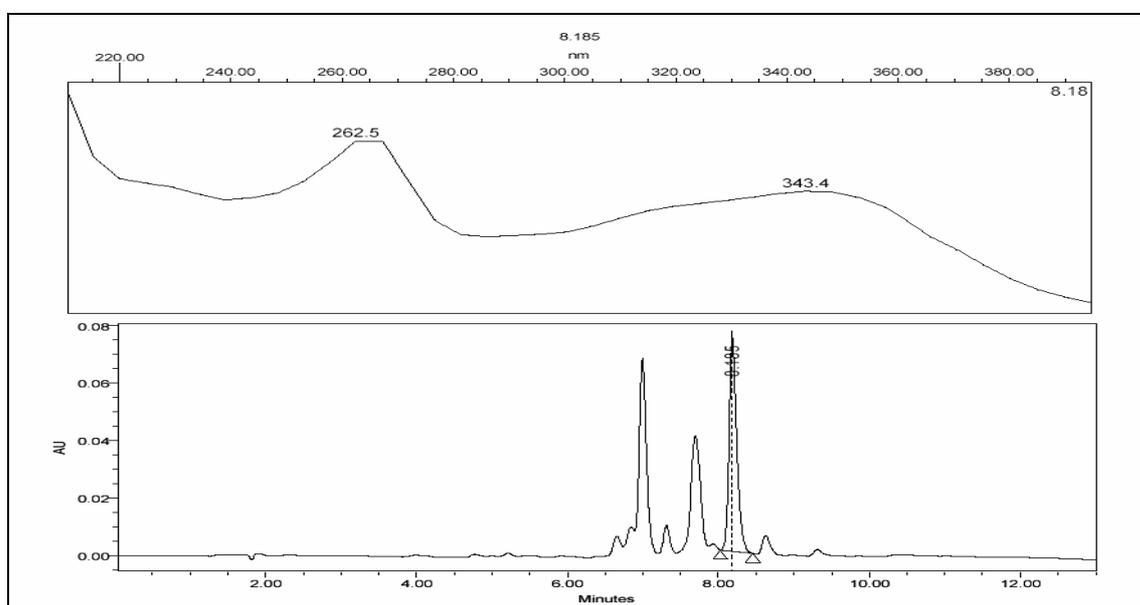


Figura 3.2. Cromatograma de *Bauhinia forficata* subespécie *forficata* a 348 nm.

Sobrepondo-se os cromatogramas das diferentes subespécies de *B. forficata* (**Figura 3.3**) percebeu-se claramente as particularidades na composição química de seus constituintes. De tal forma, pode-se considerar o fato de o marcador, possivelmente, diferir entre as subespécies.

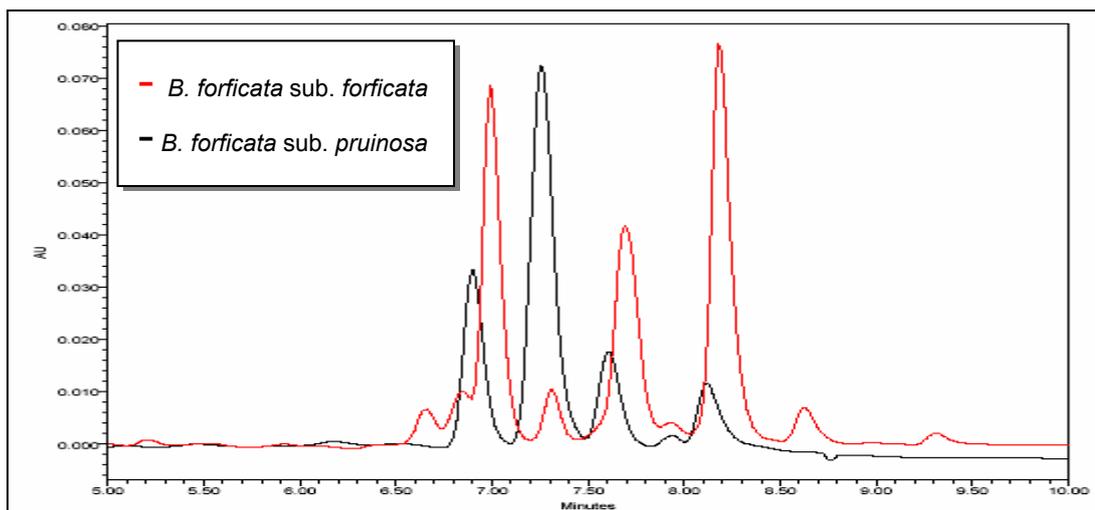


Figura 3.3. Cromatograma de *Bauhinia forficata* subespécie *forficata* sobreposto com subespécie *pruinosa*, a 348 nm.

Na seqüência está apresentada a **Figura 3.4** com o cromatograma da substância química majoritária, canferitrina, gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Cechinel (UNIVALI – Itajaí/SC) da subespécie *forficata*, onde se observa o tempo de retenção em torno de 7,6 e os UV mínimo e máximo, 262,5 e 343,4 nm, respectivamente.

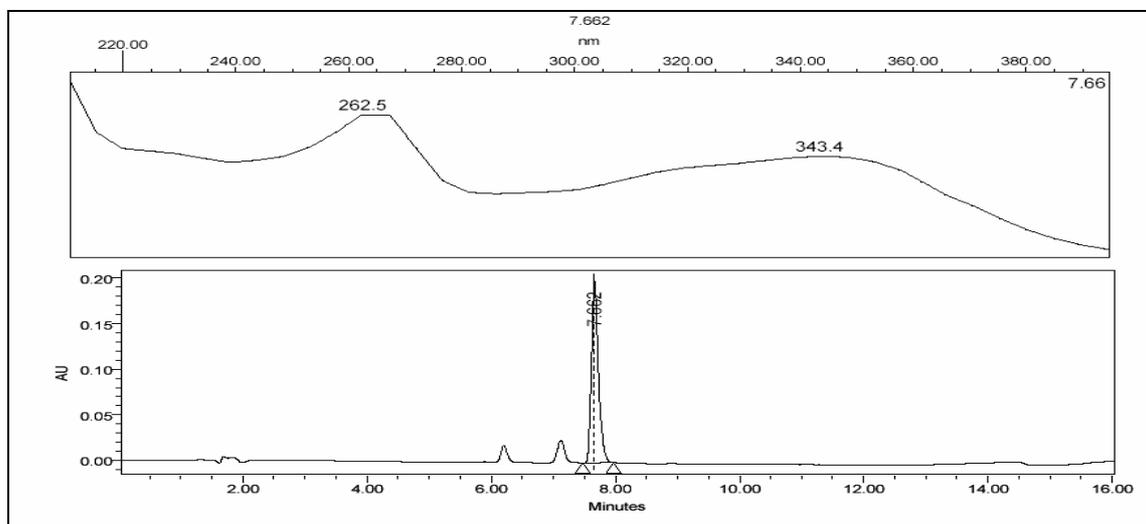


Figura 3.4. Cromatograma de canferitrina, composto presente em *Bauhinia forficata* subespécie *forficata*, cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Cechinel (UNIVALI – Itajaí/ SC), a 348 nm.

O cromatograma exposto na **Figura 3.5** demonstra que o marcador presente em *B. forficata* subespécie *forficata*, por sua vez, não pode ser

considerado um marcador para a subespécie *pruinosa* pois pela análise em UV não foi detectada a sua presença.

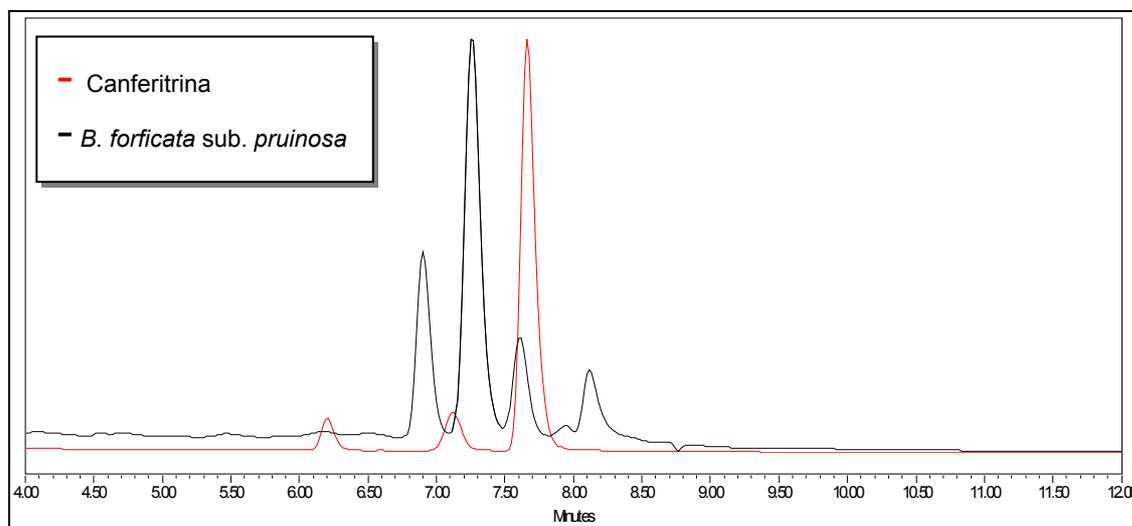


Figura 3.5. Cromatograma de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa* sobreposto com canferitrina.

Considerando-se, então, que a canferitrina não demonstrou ser um marcador para a subespécie *pruinosa*, tornou-se necessário o isolamento de marcador (SQM) desta subespécie, cujo tempo de retenção é menor do que aquele verificado para o da sub. *forficata*, podendo variar conforme as condições ambientais do dia da análise e os UV. mín. e máx. são respectivamente 267,2 e 348,1 nm (**Figura 3.1**).

Ainda, utilizando-se o método cromatográfico proposto, foi possível verificar o comportamento de outra espécie de *Bauhinia* bastante freqüente no Rio Grande do Sul, a *Bauhinia variegata*, uma espécie introduzida e muito utilizada como ornamental.

A *B. variegata* é comumente confundida com a *B. forficata* por também possuir flores de cor branca, além de cor lilás. No entanto, convém ressaltar o fato de que as diferenças entre ambas são extensivas à sua constituição química, como demonstra o cromatograma (**Figura 3.6**), ou seja, não se limita a aspectos botânicos e morfológicos. Os UVs apresentados por *B. variegata* foram distintos daqueles observados para ambas as subespécies de *B. forficata* denotando as diferenças químicas entre as espécies.

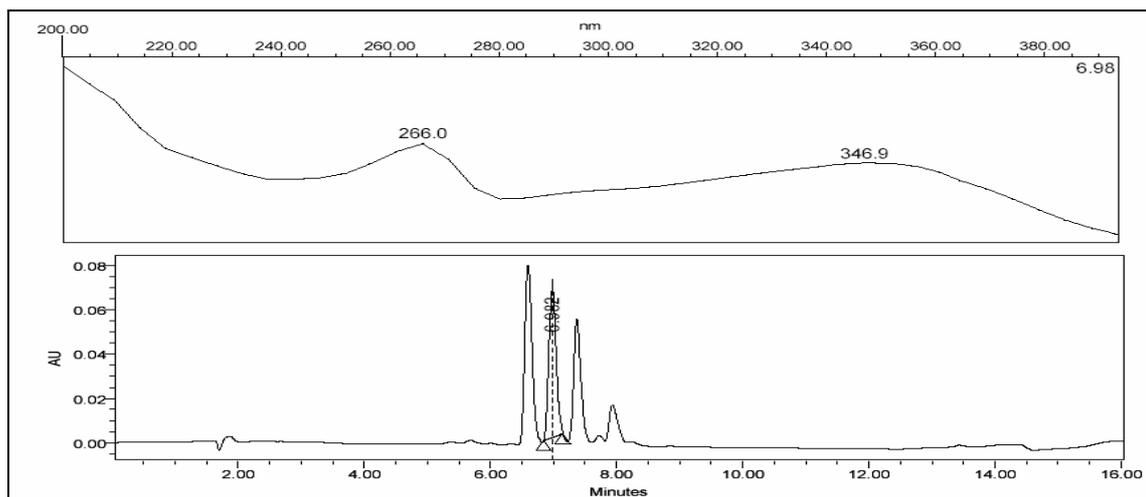


Figura 3.6. Cromatograma de *Bauhinia variegata*, a 348 nm.

Realizou-se, ainda, uma análise sobre a variação no perfil cromatográfico de *B. forficata* sub. *pruinosa* conforme as diferentes estações do ano. As coletas foram realizadas sempre até o décimo dia do segundo mês da estação em vigor e as análises foram feitas logo após a coleta e secagem das folhas. Todas as coletas foram provenientes da mesma árvore. É possível verificar-se as variações nos níveis dos compostos químicos presentes na planta analisando-se a **Figura 3.7** que segue.

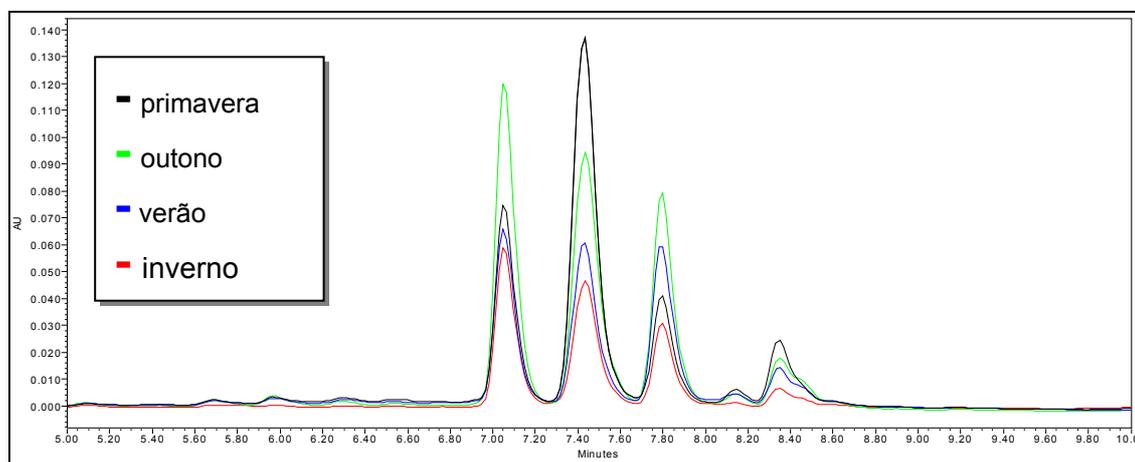


Figura 3.7. Cromatograma de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa* com a variação das estações do ano, a 348 nm.

O cromatograma evidencia variações bastante significativas entre os constituintes da planta. Sendo que no inverno todos os constituintes apresentam a sua menor concentração. A SQM também pode variar conforme a estação em que a planta for coletada. Inclusive, a substância que consideramos como sendo

SQM, somente é a majoritária na primavera, justamente a estação em que foi feita a coleta para este experimento. Provavelmente exista alguma relação de SQM com a floração da *B. forficata*, pois é na primavera que a planta começa a florescer permanecendo florida durante o verão.

Por fim, realizou-se a hidrólise ácida do extrato de *B. forficata* a fim de verificar se os compostos presentes tratavam-se de fato do flavonol canferol glicosilado. Obteve-se uma alteração visível no perfil cromatográfico do extrato com a formação de dois novos picos com tempos de retenção em torno de 10 e 11 minutos (**Figura 3.8**). Ao analisar as absorções máximas e mínimas destes novos compostos, observou-se que as mesmas eram referentes às agliconas quercetina (mín. 257,7 e máx. 370,6 nm) e canferol (mín. 267,2 e máx. 365,8 nm), respectivamente. As devidas sobreposições com os compostos puros foram realizadas e os tempos de retenção bem como os UVs eram correspondentes.

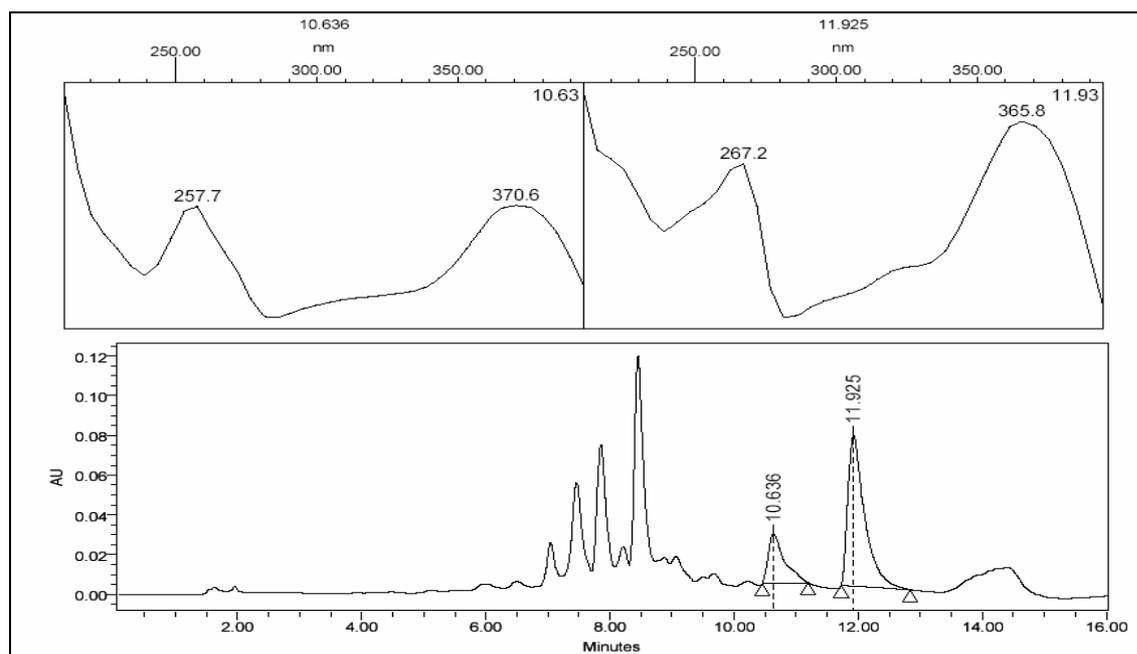


Figura 3.8. Cromatograma demonstrando a formação de quercetina e canferol após hidrólise ácida de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*, a 348 nm.

Esta última análise também auxiliaria no momento de se prever o que possivelmente ocorreria durante o estudo de estabilidade acelerada. Se poderia, de certa forma, prever quais seriam os compostos de degradação que se formariam mediante a exposição do material vegetal a variações de temperatura e umidade.

**4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA
MAJORITÁRIA (SQM)**

4 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA SUBSTÂNCIA QUÍMICA MAJORITÁRIA (SQM)

4.1 INTRODUÇÃO

O isolamento seguido de elucidação estrutural e identificação dos constituintes mais importantes de um vegetal, responsáveis ou não pela ação biológica do mesmo, permitem identificar a espécie vegetal e, conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas (SONAGLIO *et al.*, 2003).

O estabelecimento de marcadores químicos é indispensável para o planejamento e monitoramento das ações de transformação tecnológicas e para os estudos de estabilidade dos produtos intermediário e final. Marcador, de acordo com a Resolução n. 48 (BRASIL, 2004a) é um componente ou classe de compostos químicos (ex: alcalóides, flavonóides, ácidos graxos, etc.) presente na matéria-prima vegetal idealmente o próprio princípio ativo, e preferencialmente que tenha correlação com o efeito terapêutico, que é utilizado como referência no controle de qualidade da matéria-prima vegetal e dos medicamentos fitoterápicos.

Nesse sentido, o conhecimento da estrutura química tem especial relevância no caso de substâncias facilmente degradáveis por fatores tais como luz, calor e solventes, atrelados ao processo tecnológico. Tal é o caso dos polifenóis ou taninos, assim como de inúmeros compostos heterocíclicos e polifuncionais de distribuição abundante na natureza, como os flavonóides.

Os métodos analíticos permitem a avaliação da qualidade do produto fitoterápico, garantindo, assim, a constância de ação terapêutica e a segurança de utilização (SONAGLIO *et al.*, 2003).

A avaliação quantitativa, semi-quantitativa ou qualitativa envolve a utilização de métodos espectrofotométricos, cromatográficos, físicos, físico-químicos e/ou químicos. Nos casos em que os constituintes responsáveis pela atividade farmacológica são desconhecidos, a análise é realizada utilizando-se marcadores químicos, selecionados segundo a sua abundância, facilidade de detecção e doseamento (SONAGLIO *et al.*, 2003).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) isolar a substância química majoritária (SQM) de *Bauhinia forficata*, detectada em cromatograma de CLAE ;

b) identificar a substância química majoritária (marcador) empregando-se técnicas espectroscópicas;

c) quantificar a substância química majoritária;

4.3 MATERIAIS E MÉTODO

4.3.1 Preparação do extrato

As folhas secas de *B. forficata* foram maceradas com solução etanólica 80%, em ultra-turrax (T25 BASIC IKA-WERKE) por 15 minutos e permaneceram sob maceração por mais 3 dias. Na seqüência filtrou-se o macerado, em algodão, reservando-se o filtrado e colocando o remanescente novamente em maceração, com solução etanólica 80%, por mais 1 dia. Após, ambos filtrados foram reunidos e o solvente eliminado em evaporador rotatório a 40 °C (BÜCHI ROTAVAPOR R114).

O material vegetal foi retomado em água e lavado três vezes com diclorometano (QUIMEX; grau de pureza p.a.) para eliminar possíveis interferentes e compostos mais polares que não eram de interesse. A fração aquosa foi novamente extraída três vezes, porém, dessa vez, com álcool butílico (QUIMEX; grau de pureza p.a.). Esse extrato butanólico foi seco em evaporador rotatório a 40 °C.

4.3.2 Isolamento

Para a realização de cromatografia em camada delgada, modo preparativa, 250 mg do extrato butanólico foram ressuspensos em q.s. de metanol (QUIMEX; grau de pureza p.a.) e aplicados, com o auxílio de capilares de vidro, em placas de vidro recobertas com sílica modo preparativa (MERCK) e previamente ativadas em estufa (QUIMIS APARELHOS CIENTÍFICOS MODELO317.B.122 N^o SÉRIE 905583) a 100 °C durante 30 minutos a fim de

eliminar qualquer possível presença de umidade que pudesse interferir no desempenho do sistema.

As placas foram depositadas em cuba de vidro com sistema eluente composto por acetato de etila:água:ácido acético:ácido fórmico (65:15:10:10) (QUIMEX; grau de pureza p.a.). Após a migração foram observadas 5 manchas em UV, sendo que apenas três com suficiente resolução. Estas foram removidas cuidadosamente, com auxílio de espátula. A sílica com a faixa de interesse ($R_f = 0,3$) foi lavada com metanol e filtrada com funil de vidro sinterizado G5. A amostra foi concentrada em evaporador rotatório e injetada em cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE) (Waters Alliance 2695) para verificar sua pureza, de acordo com os parâmetros especificados anteriormente nos itens **3.3.4** e **3.3.5**. A determinação do comprimento de onda utilizado (348 nm) para a detecção e análise do marcador químico foi feita utilizando-se o detector de fotodiodos Waters 996 PDA, onde foram observados os máximos de absorção do pico cromatográfico.

Dando-se seqüência à investigação química, o composto dissolvido em metanol teve sua massa determinada com injeção direta em equipamento Micromass (Quattro LC, software Masslynk 3.5), eletrospray negativo. Além disso, foi encaminhado a análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A substância química majoritária (SQM) foi devidamente isolada e analisada por CLAE, conforme os parâmetros descritos nos itens **3.3.4** e **3.3.5** (**Figura 4.1**).

Pode-se verificar a sobreposição do cromatograma da SQM ao cromatograma da *B. forficata* sub. *pruinosa* na **Figura 4.2**.

A sobreposição da SQM com a *B. forficata* sub. *forficata* reforça ainda mais as diferenças na composição química das subespécies já analisadas no **Capítulo 3** (**Figura 4.3**).

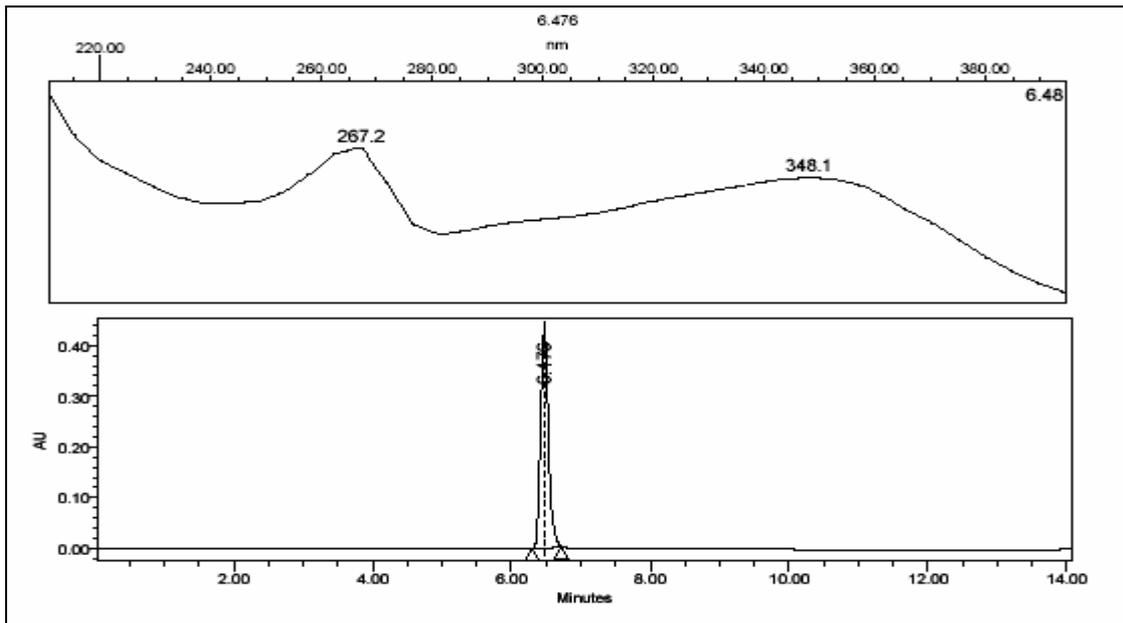


Figura 4.1. Cromatograma da substância química majoritária (SQM) presente em *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*, a 348 nm.

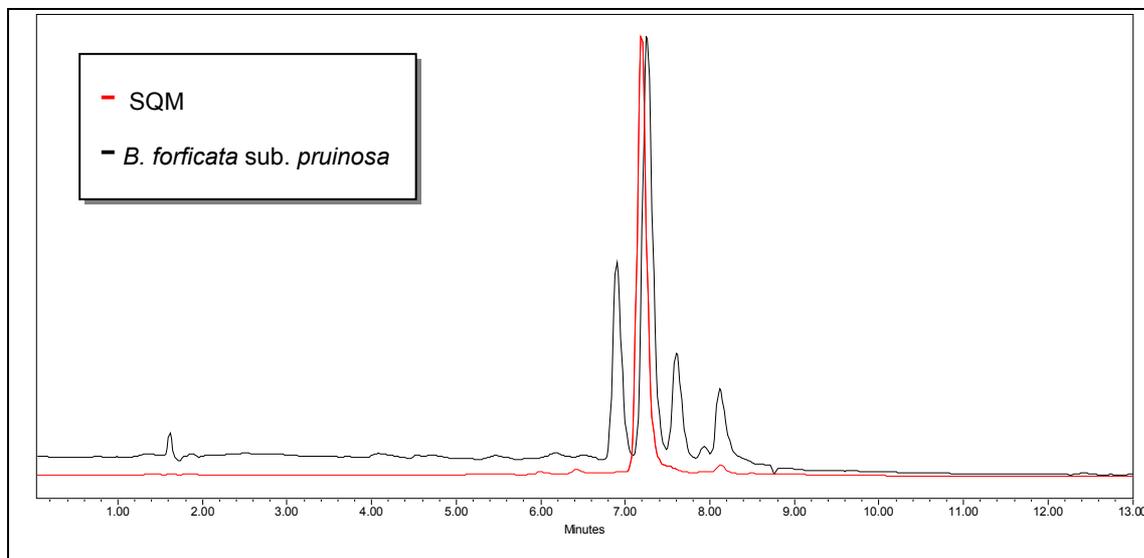


Figura 4.2. Cromatograma de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*, sobreposto com a substância química majoritária (SQM) isolada a partir de extrato butanólico de suas folhas, a 348 nm.

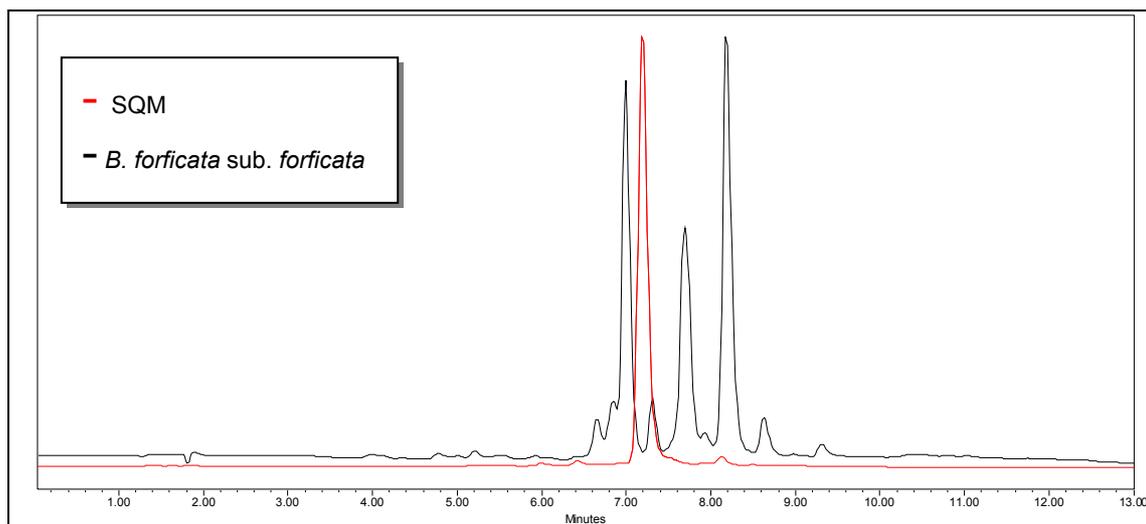


Figura 4.3. Cromatograma de *Bauhinia forficata* subespécie *forficata* sobreposto com a substância química majoritária (SQM) isolada a partir de extrato butanólico de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*, a 348 nm.

Os UV mín. e máx. são respectivamente 267,2 e 348, 1 nm, como citados anteriormente no item 3.4 dando indícios de se tratar possivelmente de um canferol glicosilado.

Pela análise do espectro de massas, em anexo (ANEXO 1), verifica-se um sinal de fragmentação pertencente à aglicona canferol em torno de 284 associado a outro em m/z 739 eletrospray negativo, correspondendo a uma massa de 740 e que por sua vez, pode corresponder aos açúcares presentes no composto. Desta forma, pode-se sugerir que SQM trata-se de um canferol glicosilado. No entanto, para uma afirmação mais precisa a respeito de sua estrutura, exigem-se espectros de RMN que infelizmente, apresentaram problemas e devem ser refeitos. Informações mais detalhadas sobre os equipamentos utilizados e os laboratórios onde os experimentos de RMN foram realizados encontram-se no ANEXO 2.

Até o presente momento, a partir desta análise e de pesquisa na literatura (MARFAK *et al.* 2003; MARCH e MIAO, 2004; MARCH *et al.*, 2004; MONTSERRAT *et al.* 2004), foi proposto para SQM a estrutura do canferol 3 - robinosídeo 7 - rhamnosídeo, cuja massa é igual à de SQM e os UV mínimo e máximo são 263,4 e 346,6 nm, respectivamente, muito próximos.

**5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA
EFICIÊNCIA (CLAE) PARA DETERMINAÇÃO DE SQM**

5 VALIDAÇÃO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA DETERMINAÇÃO DE SQM

5.1 INTRODUÇÃO

A validação de metodologia analítica está ligada ao desenvolvimento de métodos e permite assegurar que o mesmo seja adequado para obter resultados confiáveis.

Os métodos analíticos podem ser de quatro tipos (ICH,1993), descritos a seguir.

- Testes de identificação: os quais visam assegurar a identidade do analito presente na amostra. Geralmente é realizado através de ensaios comparativos das propriedades da amostra e um padrão.
- Testes para a quantificação de impurezas: permitem conhecer as características de pureza da amostra.
- Testes para o controle do limite de impurezas.
- Testes para a quantificação da substância ativa presente em amostra da substância pura ou de produtos acabados, ou de componentes que fazem parte da formulação.

Segundo o tipo de método analítico desenvolvido, o analista escolhe quais parâmetros específicos devem ser avaliados para assegurar que o mesmo esteja validado. Estes parâmetros encontram-se descritos a seguir (USP 28, 2005; ICH, 1996; BRASIL, 2003).

a) Exatidão: mede a proximidade entre o valor de referência (aquele aceito como valor real ou convencional) e o valor encontrado.

Pode ser determinada através de:

- análise de misturas elaboradas com componentes do produto farmacêutico, as quais foram adicionadas quantidades conhecidas da substância ativa de interesse;

- quando não for possível adquirir todos os componentes da formulação é admissível adicionar quantidades conhecidas da substância ativa ao produto ou formulação original, ou comparar os resultados obtidos com outro método cuja validade já tenha sido comprovada;
- na determinação da exatidão deve-se utilizar um mínimo de nove determinações de três concentrações que estejam dentro da faixa de linearidade do método. A exatidão deve expressar-se como percentagem de recuperação da quantidade de substância ativa adicionada na amostra ou como a diferença entre o valor médio e o valor real, junto com os intervalos de confiança.

b) Precisão: expressa o grau de acerto entre uma série de medidas obtidas de múltiplas medições de uma amostra homogênea. A precisão tem três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade e se expressa em termos de variância, desvio padrão relativo ou coeficiente de variação de uma série de medidas.

A *repetibilidade* ou *precisão intra-dias* se refere à precisão do método quando se utilizam as mesmas condições operativas, num curto período de tempo. Este parâmetro se avalia utilizando um mínimo de nove (9) determinações com concentrações dentro da faixa de linearidade do método, ou com um mínimo de seis (6) determinações com 100% da concentração esperada da amostra.

A *precisão intermediária* mede as variações que podem ocorrer dentro do laboratório, tais como dias diferentes de análise, diferentes analistas, diferentes equipamentos.

A *reprodutibilidade* expressa a precisão entre laboratórios diferentes e é testada através de estudos colaborativos.

A Farmacopéia Americana (USP 28, 2005) estabelece a repetibilidade como o parâmetro a ser tomado em consideração para a análise regular dos dados, enquanto a reprodutibilidade e a precisão intermediária precisam ser

demonstradas quando os métodos são avaliados para a sua inclusão em compêndio oficial.

c) Especificidade: indica a capacidade do método de avaliar sem equívoco o analito de interesse, ainda em presença de outras substâncias (impurezas, produtos de degradação, excipientes). Este termo pode relacionar-se à *seletividade*, mas este último é reservado para designar métodos que detectam qualitativamente o analito na presença de outras substâncias (SHARP, 2000; ICH, 1993). A especificidade de métodos de identificação se comprova mediante a comparação dos resultados obtidos com amostras do analito e os obtidos com amostras nas quais não está presente o analito. Em métodos cromatográficos a especificidade é comprovada pela resolução dos componentes.

d) Limite de quantificação: refere-se à quantidade mínima de amostra que pode ser quantificada com a precisão e exatidão adequadas; utiliza-se sobretudo em determinação de impurezas e de produtos de degradação. Este parâmetro é determinado através de cálculos matemáticos, e é recomendável validar, experimentalmente, estes dados mediante análise de uma quantidade apropriada de amostras preparadas de modo tal que contenham concentrações perto do limite de quantificação calculado.

e) Limite de detecção: é a menor quantidade da substância ativa na amostra que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada. Pode ser determinado através de cálculos matemáticos.

f) Linearidade: é a capacidade do método de obter resultados que são diretamente proporcionais à concentração ou quantidade do analito na amostra, dentro de um intervalo determinado. A linearidade é avaliada mediante análise da reta gerada por um grupo de sinais como função da concentração do analito. Deve-se utilizar um mínimo de concentrações, e apresentar-se o coeficiente de correlação, o intercepto da ordenada, a inclinação da linha de regressão e a soma residual dos quadrados, assim como o gráfico obtido e o desvio padrão.

g) Intervalo de linearidade: é a faixa entre a maior e a menor concentração do analito na amostra para a qual é possível demonstrar que o método apresenta precisão, exatidão e linearidade apropriadas. O intervalo de

linearidade é estabelecido confirmando se o método apresenta linearidade, exatidão e precisão ao ser aplicado à análise de amostras com concentrações entre 80-120% da substância ativa presente na formulação.

h) Robustez: é a capacidade do método de manter-se inalterado diante de pequenas variações controladas de alguns parâmetros. Esta qualidade é indicativo da confiança que se pode esperar do método durante seu uso cotidiano.

A validação de métodos analíticos visa garantir a inserção da técnica desenvolvida na rotina de análises laboratoriais assegurando, através do uso de ferramentas estatísticas e segundo critérios e parâmetros pré-estabelecidos, linearidade, exatidão, reprodutibilidade, limites de detecção e quantificação, especificidade e robustez frente às metodologias analíticas propostas (ICH, 1996; SWARTZ e KRULL, 1997; FDA, 2001; PAVEI, 2004).

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) validar o método analítico empregando SQM como referência;

b) verificar se o método demonstra linearidade, repetibilidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez.

5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

5.3.1 Preparação dos extratos

Os extratos foram preparados conforme descrito no item **3.3.2**.

5.3.2 Análise cromatográfica

A análise cromatográfica seguiu as especificações citadas no item **3.3.4**.

5.3.3 Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram as mesmas citadas anteriormente no item **3.3.5**.

5.4 VALIDAÇÃO

Os parâmetros utilizados para a validação do método por CLAE foram fundamentados nas normas estabelecidas pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 1996), HONG & SHAH (2000), USP (2005) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) Resolução de n. 899 (BRASIL, 2003) e estão descritos a seguir:

5.4.1 Linearidade

5.4.1.1 Preparação da curva padrão da substância química majoritária (SQM)

A partir de uma solução referência (SR) do marcador SQM, na concentração de 1 mg/ml em metanol, foram feitas sucessivas diluições obtendo-se concentrações teóricas de 10, 30, 60, 120, 250, 350, 500 µg/ml. Para cada concentração foram preparadas três amostras sendo as análises realizadas em triplicata.

A linearidade do método proposto foi verificada através da análise das áreas totais do pico de interesse (marcador) utilizando o método dos mínimos quadrados e análise de variância (ANOVA).

5.4.2 Repetibilidade

Pesou-se exatamente cerca de 1,5 g de matéria-prima vegetal e submeteu-se à extração com 50 ml de solução etanólica 80%, conforme descrito no item **3.3.2**, constituindo-se a solução mãe (SM).

A verificação da repetibilidade apresentada pelo método foi realizada mediante a análise de nove diluições, preparadas a partir da SM, de mesma concentração teórica (5,02 mg/ml) e situada na faixa de concentração da curva padrão da substância química majoritária. Os resultados foram expressos como desvio padrão relativo (DPR %).

5.4.3 Precisão Intermediária

Seguindo o procedimento de preparação da amostra descrito no item **3.3.2**, foram preparadas e analisadas três diluições, na mesma concentração, a partir de SM para a determinação do teor de marcador no extrato, durante cinco dias consecutivos. A precisão foi expressa através do DPR dos resultados obtidos.

5.4.4 Exatidão

Foi determinada através do teste de recuperação de SQM adicionando-se concentrações crescentes de marcador à solução extrativa. Os resultados foram expressos como percentagem de recuperação. Cada diluição foi preparada em triplicata e injetada três vezes em CLAE.

5.4.5 Especificidade

A especificidade do método foi comprovada pela análise do cromatograma por CLAE com detector de fotodiôdo pelo fato destas amostras serem consideradas matrizes complexas.

5.4.6 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram calculados matematicamente a partir da curva padrão da SQM usando a **Equação 5.1** e **Equação 5.2**, respectivamente.

Equação 5.1. Cálculo para determinação do limite de detecção.

$$LD = \frac{dp. 3,3}{i}$$

Equação 5.2. Cálculo para determinação do limite de quantificação.

$$LQ = \frac{dp. 10}{i}$$

Onde: *dp* ou *S* = desvio padrão do coeficiente linear (intercepto);

i = inclinação da curva padrão.

5.4.7 Robustez

A robustez do método foi testada através de variações no gradiente da fase móvel e no fluxo do mesmo em relação a determinação quantitativa de marcador químico.

Tabela 5.1. Modificação no gradiente para a realização do teste de robustez no método de CLAE*.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Fluxo (ml/min)</i>	<i>Fase A (%)</i>	<i>Fase B (%)</i>
0,00	0,8	100	0
10,0	0,8	70	30
13,0	0,8	0	100

*Gradiente original verificar **Tabela 3.2**

Tabela 5.2. Modificação no fluxo para a realização do teste de robustez no método de CLAE*.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Fluxo (ml/min)</i>	<i>Fase A (%)</i>	<i>Fase B (%)</i>
0,00	0,7	100	0
10,0	0,7	59	41
13,0	0,7	0	100

*Fluxo original = 0,8, conforme **Tabela 3.1**

5.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **Tabela 5.3** são mostradas as áreas absolutas dos picos de SQM obtidos para a construção da curva padrão para o método por CLAE.

Tabela 5.3. Áreas absolutas dos picos do marcador SQM de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*, obtidas a partir de injeções em CLAE.

Concentração ($\mu\text{g/ml}$) *	Área (mV.s) média \pm d.p.	DPR %
10	55453,5 \pm 614,47	1,11
30	116101,5 \pm 1059,95	0,91
60	228733 \pm 5002,07	2,18
120	460704,5 \pm 5534,52	1,20
250	926623 \pm 2469,22	0,26
350	1227307 \pm 17594,23	1,43
500	1714841,5 \pm 70989,98	4,13

* todas as determinações foram feitas em triplicata.

A equação da reta calculada pelo método dos mínimos quadrados está demonstrada na **Equação 5.3**.

Equação 5.3. Equação da reta calculada pelo método dos mínimos quadrados para SQM.

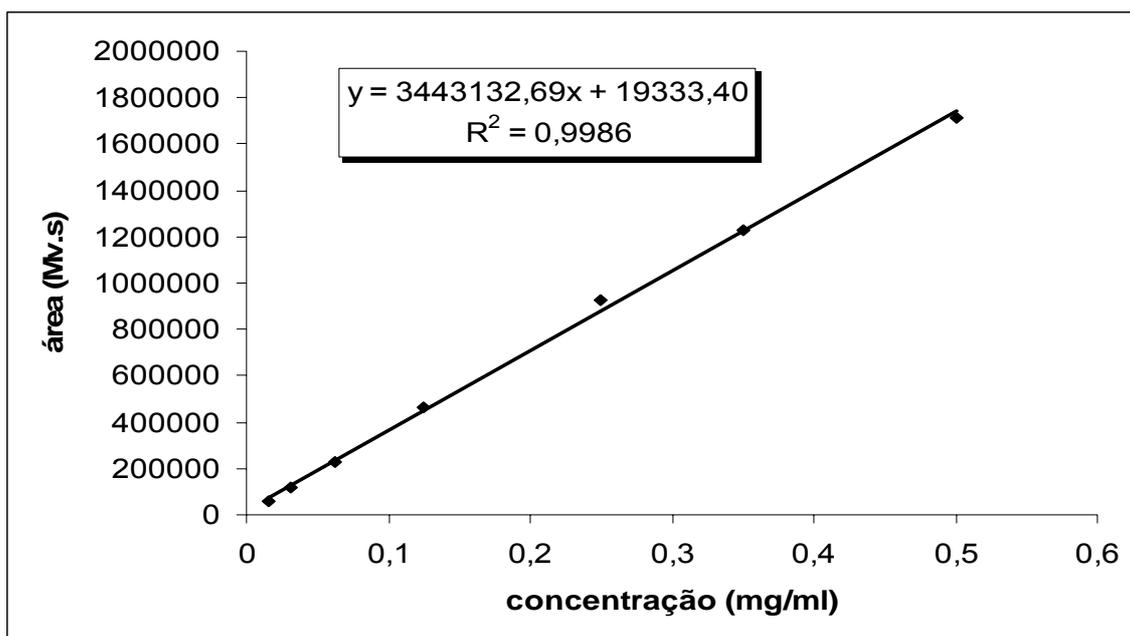
$$x = \frac{y - 19333,40}{3443132,69}$$

Onde: x = concentração do marcador em mg/ml

y = média das áreas obtidas a partir de 3 injeções consecutivas

Esta equação é utilizada para quantificação de SQM nas amostras e para auxiliar na validação do método proposto. O coeficiente de determinação linear é $r^2 = 0,9986$ (**Figura 5.4**).

Figura 5.4. Representação gráfica da reta e coeficiente de correlação para SQM.



Os resultados da análise de variância (ANOVA) são mostrados na **Tabela 5.4** e os resultados da análise de regressão linear da curva do SQM, na **Tabela 5.5**.

Tabela 5.4. Análise de variância dos resultados obtidos para determinação da equação da reta e coeficiente de correlação de SQM.

ANOVA					
	<i>Gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significação</i>
Regressão	1	2,38747x10 ¹²	2,38747x10 ¹²	3476,095139*	6,61
Resíduo	5	3434129719	686825943,9		
Total	6	2,39091x10 ¹²			

* significativo $p < 0,05$; *G* l= grau de liberdade; *SQ* = soma dos quadrados das médias; *MQ* = média quadrada da soma dos quadrados.

A partir dos resultados demonstrados na **Tabela 5.4**, de ANOVA, obtida da curva padrão de SQM, constata-se pelo valor de *F* que a regressão apresenta-se linear e com inclinação igual a 1, assegurando que com o aumento das concentrações do analito tem-se uma resposta crescente e proporcional nas áreas encontradas.

Tabela 5.5. Resultados da análise de regressão da SQM.

Parâmetros	Coefficiente	Erro padrão	LC_{inferior}	LC_{superior}	Valor-p
Intersecção (a)	19333,40	14901,27	- 18971,46	57638,26	0,2512
Inclinação (b)	3443132,69	58399,34	3293012,66	3593252,73	2,65605x10 ⁻⁸

LC: limite de confiança; gl: n-2

Analisando a **Tabela 5.5** que dispõe os resultados da análise de regressão de SQM, pode-se inferir a ausência de erro sistemático em função dos limites de confiança da curva conterem o zero. Os coeficientes presentes nesta tabela constituem a equação obtida para SQM.

Concomitantemente, a linearidade foi avaliada na solução extrativa a fim de confirmar a inexistência de substâncias que viessem a interferir no sinal principal quando presentes em uma matriz complexa. A partir deste ensaio, verificou-se a manutenção da integridade do pico referente a substância química majoritária, SQM, sendo obtida a curva com coeficiente de regressão satisfatório ($r^2 = 0,9857$), representada na **Equação 5.4**.

Equação 5.4. Equação da reta calculada pelo método dos mínimos quadrados para a solução extrativa de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

$$x = \frac{y + 137454,77}{4710,88}$$

Onde: x = concentração do marcador em mg/ml

y = média das áreas obtidas a partir de 3 injeções consecutivas

A precisão do método foi avaliada mediante a determinação dos parâmetros repetibilidade e precisão intermediária da solução extrativa. O desvio padrão foi determinado e analisado através da medida das áreas de SQM presente na amostra, de um total de 10 injeções e está apresentado na **Tabela 5.6**.

Tabela 5.6. Resultados da avaliação da repetibilidade e precisão intermediária da solução extrativa de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa* por CLAE.

	Repetibilidade; média* ± d.p. (DPR%)	Precisão Intermediária; média* ± d.p. (DPR%)
Sol. extrativa	558677,1 ± 4748,2 (0,85)	556304,2 ± 3043,2 (0,55)

* os valores médios (n=10) correspondem a área de marcador em mV.s.

Analisando-se os resultados pode-se dizer que o método demonstra repetibilidade e precisão em suas análises.

Os resultados obtidos após a realização dos testes de exatidão foram submetidos a **Equação 5.5** que expressa o percentual de recuperação do marcador químico adicionado as soluções de referência (SR).

Equação 5.5. Cálculo utilizado para determinação do percentual de recuperação do marcador químico, SQM.

$$R\% = \frac{[(C_F - C_A)]}{C_P} \cdot 100$$

Onde: C_F = concentração do extrato adicionado de subst. referência (mg/ml);

C_A = concentração do extrato determinado neste método (mg/ml);

C_P = concentração da solução padrão adicionada (mg/ml).

O método por CLAE mostrou ser exato quanto ao teor de SQM recuperado exibindo um valor médio de 96,4% para a análise realizada com *Bauhinia forficata* (**Tabela 5.7**).

Tabela 5.7. Resultados da análise de exatidão em CLAE para a amostra de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Amostras*	Concentração		Recuperação (%)	Média (%)
	Adicionada (mg/ml)	Recuperada (mg/ml)		
SR 1	0,039	0,037	94,4	96,4
SR 2	0,027	0,026	94,8	
SR 3	0,012	0,012	99,9	

*n=3

O cromatograma da amostra para a análise de especificidade é apresentado na **Figura 5.5** com os respectivos espectros de UV de SQM.

Avaliando-se cuidadosamente o pico referente ao marcador encontrado no cromatograma da especificidade, pode-se considerar o método proposto específico, pois em todas as faixas analisadas o pico majoritário, SQM, não apresentou variação nos seu máximo de absorvância indicada no CLAE/PDA.

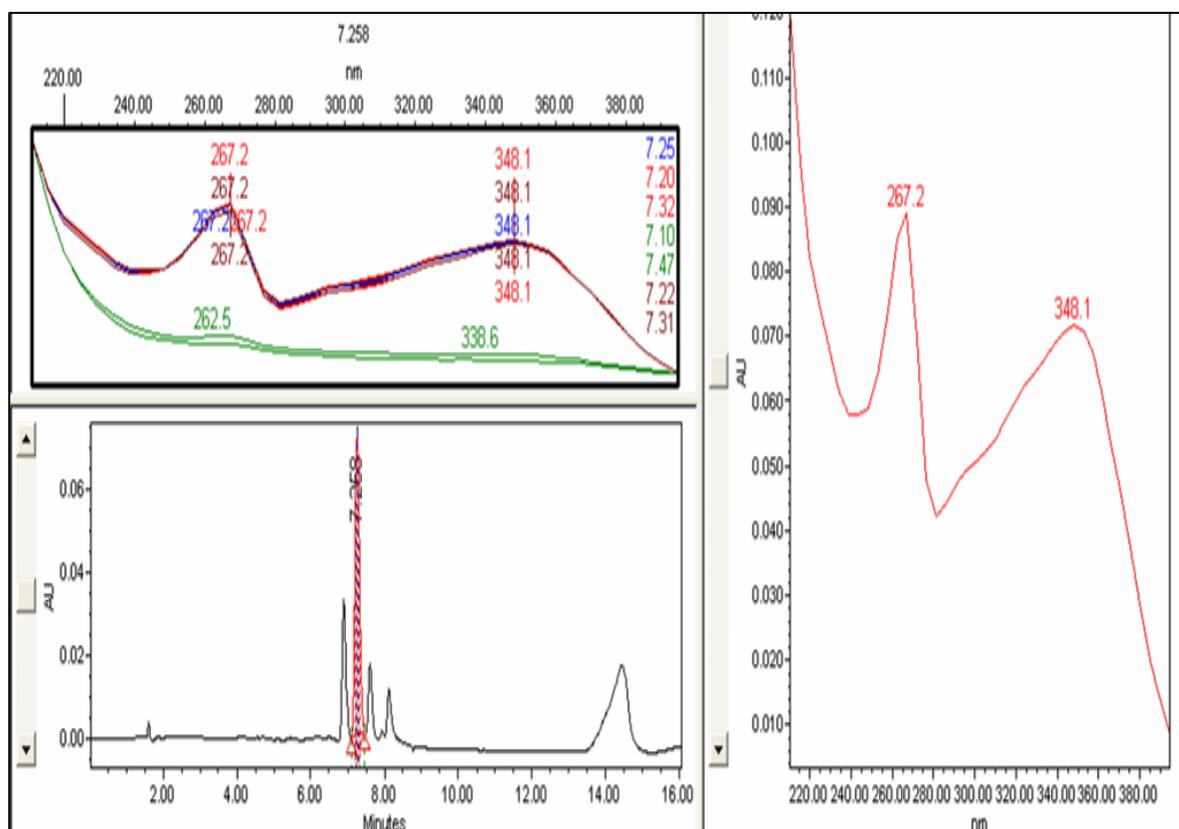


Figura 5.5. Cromatograma comprovando a especificidade do método em relação ao composto majoritário (SQM).

O limite de detecção (LD) e quantificação (LQ) obtidos para SQM foram de 14,28 $\mu\text{g/ml}$ e 43,28 $\mu\text{g/ml}$. No entanto, observa-se que tanto LD quanto LQ estão inseridos nos valores utilizados para a construção da curva do marcador, todavia, tal fato não comprometeu os valores de DPR% obtidos indicando que o método cromatográfico utilizado apresenta boa sensibilidade.

Os resultados dos testes de robustez do método constam na **Tabela 5.8**.

Tabela 5.8. Avaliação do parâmetro de robustez para extratos de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Parâmetro	Tempo de Retenção (min.)
Alteração de Gradiente	6,231
Alteração de Fluxo	7,622

Em relação ao teste de robustez, as mudanças estabelecidas não alteraram significativamente o cromatograma, observando-se somente ligeira alteração no tempo de retenção do marcador químico, permanecendo, os teores do mesmo, semelhantes aos encontrados para as análises de precisão. Assim, é possível afirmar que o método desenvolvido é capaz de suportar mudanças no gradiente e no fluxo da fase móvel.

Ao findar-se a análise de todos os parâmetros propostos para a validação do método para a quantificação da substância química majoritária, SQM, de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*, pode-se inferir que o método em questão está validado, garantindo confiabilidade aos resultados obtidos.

6 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA

6 DETERMINAÇÃO DA ESTABILIDADE QUÍMICA

6.1 INTRODUÇÃO

Um importante pré-requisito para a qualidade de um medicamento é a garantia de sua qualidade durante a sua vida útil. Estabilidade é definida como sendo a manutenção da qualidade e integridade até o fim da vida útil estabelecida para determinado medicamento (FEIDEN, 1994).

Drogas de origem vegetal e preparações de origem vegetal obedecem aos mesmos regulamentos oficiais que regem os medicamentos químicos definidos como substâncias que respeitam qualidade, eficácia e segurança (LOWEN *et al.*, 1999). No entanto, na maioria das monografias não são relatados estudos de estabilidade para os compostos farmacologicamente ativos ou marcadores químicos das mesmas. Por esta razão, torna-se cada vez mais imprescindível se obter informações sobre a estabilidade destes componentes (BILIA *et al.* 2001 e 2002; HEIGL e FRANZ, 2003). De qualquer forma, se os constituintes com atividade terapêutica não são conhecidos, um limite de variação $\pm 10\%$ do valor do ensaio inicial é aceito (NUDELMAN, 1976; LACHMAN *et al.*, 2001; HEIGL & FRANZ, 2003) e 5% para condições aceleradas de estabilidade, segundo a Resolução n. 398 da ANVISA (BRASIL, 2004b; WHO, 1996).

O teste de estabilidade tem como finalidade avaliar o comportamento dos fármacos ou medicamentos que se alteram com o tempo, por influência de uma variedade de fatores ambientais, tais como: a temperatura, a umidade e a luz. Além disso, pretende estabelecer um período de contraprova ou a vida útil para os medicamentos e condições de armazenamento recomendadas.

Os estudos de estabilidade acelerada são destinados a aumentar a velocidade de degradação química e modificação física de uma substância e/ou alterações de características de forma farmacêutica, usando condições forçadas de armazenamento, com o propósito de monitorar as reações de degradação e prever o prazo de validade nas condições normais de armazenamento. Os dados assim obtidos, juntamente com aqueles derivados dos estudos de longa duração, podem ser usados para avaliar efeitos químicos prolongados em condições não aceleradas e para avaliar o impacto de curtas exposições a situações fora

daquelas estabelecidas no rótulo do produto, que podem ocorrer durante o transporte.

Os ensaios de estabilidade acelerada permitem estabelecer um período de vida útil provisório. Os mesmos devem ser complementados com estudos de longa duração, realizados nas condições de armazenamento determinadas para o medicamento. Estudos de estabilidade de longa duração, por sua vez, são validações dos experimentos em relação às características físicas, químicas e biológicas do medicamento, durante e depois do prazo de validade.

A necessidade de se realizar testes de estabilidade surge no momento em que o empirismo verificado até então foi, na sua maioria, substituído por princípios mais científicos na avaliação da estabilidade baseando-se em princípios físicos e químicos mais apropriados para caracterizar o envelhecimento de um medicamento.

O plano de estudo de estabilidade deve contemplar avaliações físicas, químicas, físico-químicas e microbiológicas, quando for o caso. Deve-se avaliar também a presença ou formação qualitativa e quantitativa de subprodutos e/ou produtos de degradação utilizando metodologia adequada e validada. Estudos adicionais, tais como: fotoestabilidade e outros que se façam pertinentes de acordo com as propriedades do produto em questão, poderão ser necessárias para a comprovação da estabilidade de produtos farmacêuticos (BRASIL 2004b).

De fato, a aplicação de alguns princípios físico-químicos no desenvolvimento de estudos de estabilidade tem provado ser muito vantajosa no desenvolvimento de formas farmacêuticas estáveis. Só através do uso desta metodologia é possível extrapolar os resultados obtidos a partir das condições de armazenamento exageradas com o intuito de prever a estabilidade para períodos de tempo prolongado de armazenamento em prateleira.

As reações de degradação nos medicamentos ocorrem a velocidades definidas e são de natureza química, podendo ser aceleradas pelo aumento, por exemplo, da temperatura (NUDELMAN, 1976). Estas reações dependem de várias condições, tais como, a concentração dos reagentes, da temperatura, do pH, da radiação ou da presença de catalisadores, além de estarem relacionados,

muitas vezes, ao próprio produto como as propriedades físico-químicas de substâncias ativas e excipientes farmacêuticos, forma farmacêutica e sua composição, processo de fabricação, tipo e propriedades dos materiais de embalagem (LACHMAN *et al.*, 2001; BRASIL, 2004b).

A maioria dos métodos de estudo de estabilidade acelerada fundamentam-se na medida da velocidade de degradação a temperaturas superiores que a normal, para logo fazer inferências do que aconteceria a temperatura ambiente. Estão embasados em princípios físico-químicos e para tanto se torna necessário conhecimentos básicos em cinética química a fim de poder interpretar os resultados (NUDELMAN, 1976).

A avaliação da estabilidade de cada forma farmacêutica que está disponível no mercado é necessária a fim de assegurar a identidade, efetividade, potência, segurança e pureza do medicamento até o momento de seu uso. Está perfeitamente estabelecido que durante o período de vida útil de um medicamento devem conservar-se, em geral, uma concentração de droga ativa não inferior a 90%, a eficácia terapêutica, a segurança, as características farmacotécnicas e os caracteres organolépticos (NUDELMAN, 1976).

Os fatores que podem alterar um produto com o tempo são: temperatura, radiações, umidade, oxigênio ou outros gases atmosféricos, pressão, solventes, variações de pH, interações, contaminação microbiana, etc. Todos os métodos para estudar a estabilidade devem levar em conta estes fatores.

Atualmente, uma das exigências para o registro de medicamentos fitoterápicos é o prazo de validade dos mesmos, onde devem constar resultados do estudo de estabilidade acelerada acompanhados dos estudos de estabilidade de longa-duração em andamento ou já concluídos (BRASIL, 2004a).

O teste de estabilidade foi projetado exatamente para que se possa obter informações sobre a estabilidade de produtos farmacêuticos visando definir seu prazo de validade e período de utilização em embalagem e condições de armazenamento especificadas.

A zona climática é um dos fatores que deve ser observado no momento de se realizar o teste de estabilidade, pois o tempo de conservação de um fármaco deve ser estabelecido levando-se em consideração a região em que um produto encontra-se disponível para a comercialização (WHO, 1996). Quatro diferentes zonas climáticas são especificadas pela Organização Mundial da Saúde e estão descritas na **Tabela 6.1** (WHO, 1996). Entende-se por zona climática o espaço ou zona geograficamente delimitada de acordo com os critérios de temperatura e umidade aplicável quando da realização de estudos de estabilidade. O Brasil situa-se na Zona Climática IV (quente/úmida) (BRASIL, 2004b).

Tabela 6.1. Quadro de definição das zonas climáticas definidas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1996).

Zona	Descrição	Temperatura	Umidade Relativa (U.R.)
Zona I	Clima Temperado	21 °C ± 2 °C	45% ± 5%
Zona II	Mediterrâneo	25 °C ± 2 °C	60% ± 5%
Zona III	Quente e Seco	30 °C ± 2 °C	35% ± 5%
Zona IV	Quente e Úmido	30 °C ± 2 °C	70% ± 5%

Os testes para o estudo de estabilidade acelerada devem ser conduzidos para a zona IV nas condições de temperatura de 40 °C ± 2 °C e 75% ± 5% de umidade relativa (U.R.) em 6 meses e como alternativa 50 °C ± 2 °C e 90% ± 5% em 3 meses (BRASIL, 2004b).

Para que se possa realizar estudos de estabilidade acelerada em uma droga vegetal, antes de mais nada, é necessário a identificação de um marcador. Os flavonóides, grupo de compostos vegetais largamente distribuído e presente em *B. forficata*, é conhecido pela sua diversidade fisiológica e suas atividades farmacológicas. O interesse neste grupo de substâncias tem crescido nos últimos anos. Entretanto, poucos estudos de estabilidade sobre este importante grupo de compostos naturais são encontrados na literatura.

B. forficata é uma planta bastante utilizada popularmente e vendida deliberadamente em estabelecimentos diversos. Portanto, torna-se cada vez mais necessária uma análise mais precisa relacionada aos seus constituintes químicos e, principalmente, a estabilidade dos mesmos.

6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar a estabilidade química acelerada de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*;

b) Analisar físico-quimicamente os resultados, determinando a ordem da reação, a velocidade de degradação (k), o tempo em que a concentração de SQM é 90% do inicial ($t_{90\%}$) e o tempo de meia vida ($t_{1/2}$).

6.3 MATERIAIS E MÉTODO

6.3.1 Estudo de estabilidade acelerada

Foram submetidas à análise, em triplicata, cerca de 10 g de folhas de *B. forficata* dispostas em embalagens de papel. As condições preconizadas para este tipo de estudo, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA - na Resolução de n. 398 do ano de 2004 (BRASIL, 2004b), são temperatura de $50\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$ e $90\% \pm 5\%$ de umidade relativa, avaliando-se os pontos P0, P1, P2 e P3, respectivamente, inicial, 30, 60 e 90 dias em câmara climática (NOVA ÉTICA, MODELO 420 LCD).

6.3.2 Doseamento

Injetando-se as respectivas amostras de cada ponto em CLAE, foi possível verificar se houve ou não degradação do marcador químico com o surgimento de outros compostos antes não observados pela quantificação de SQM e posterior análise físico-química. Os extratos foram todos devidamente preparados e analisados conforme descrito no **Capítulo 3**.

6.3.3 Cálculos da velocidade de degradação (k), dos tempos de vida útil ($t_{90\%}$) e meia-vida ($t_{1/2}$)

Com base na análise dos coeficientes de correlação, calculados através de regressão linear dos dados obtidos para o tratamento, é possível se identificar se a reação é de zero, primeira ou segunda ordem. Por conseguinte, torna-se viável calcular a velocidade de degradação (k) e os tempos de vida útil ($t_{90\%}$) e meia-vida ($t_{1/2}$). As equações utilizadas para os devidos cálculos estão descritas a seguir e

referem-se a uma reação de segunda ordem e foram extraídas de NUDELMAN (1976).

Equação 6.6. Equação utilizada para o cálculo da velocidade de degradação de uma reação de segunda ordem.

$$K = 1/t (1/C - 1/Co)$$

Onde: Co = Concentração inicial da substância ativa

C = Concentração da substância ativa no tempo "t"

k = Constante de velocidade de reação

t = tempo, em dias

Equação 6.7. Equação utilizada para o cálculo do tempo de vida útil ($t_{90\%}$) de SQM de uma reação de segunda ordem.

$$t_{90\%} = 1/(9k.Co)$$

Equação 6.8. Equação utilizada para o cálculo do tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de SQM de uma reação de segunda ordem.

$$t_{1/2} = 1/k.Co$$

6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras de *B. forficata* sub. *pruinosa* foram analisadas de acordo com as condições preconizadas pela Resolução n. 398 (BRASIL, 2004b) para estudos de estabilidade acelerada para concessão de prazo de validade provisório (50 °C ± 2 °C e 90% ± 5% U.R.).

Todas as amostras submetidas às variações de temperatura e umidade apresentaram modificações de coloração, passando de verde à marrom e, o odor que era levemente acre, acentuou-se significativamente.

Os resultados da quantificação da análise de marcador no extrato das amostras submetidas ao estudo de estabilidade, utilizando-se metodologia

validade por CLAE, encontram-se descritos na **Tabela 6.2**. Os fatores de diluição utilizados para o cálculo do teor de marcador foi igual a 6 para o P0, já para as amostras relativas aos pontos 1, 2 e 3 de *B. forficata* este valor foi de 3 pelo fato dos valores das áreas obtidas inicialmente não fazerem parte da faixa linear obtida com a curva de linearidade.

Tabela 6.2. Análise de estabilidade acelerada para *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Amostras	Concentração de SQM (mg%) ± d.p.*	DPR %
P0	3,22 ± 0,037	1,15
P1	1,28 ± 0,009**	0,70
P2	0,76 ± 0,011**	1,46
P3	0,67 ± 0,009**	1,44

* Para cada ponto da análise foram tomadas três amostras e feitas três determinações para cada, totalizando 9 determinações.

** Diluição diferenciada, fator de diluição = 3.

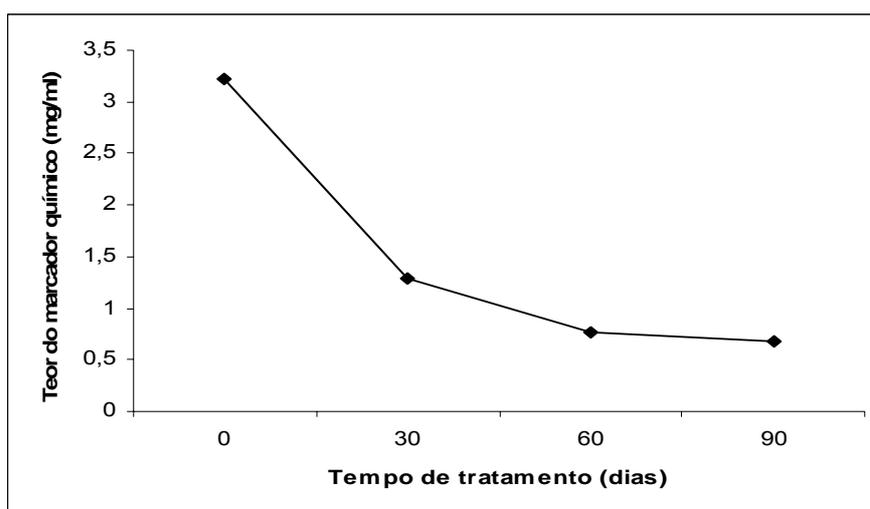


Figura 6.1. Perfil de decaimento do teor percentual de SQM obtido a partir das análises cromatográficas das amostras provenientes do estudo de estabilidade para *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Os resultados apresentados na **Tabela 6.2** bem como a visualização da **Figura 6.1** denotam o decaimento no teor de marcador, SQM, presente em *B. forficata* com o aumento do período de permanência na câmara climática.

Ao calcular-se os percentuais médios de degradação do teor do marcador, em função das condições propostas de temperatura e umidade, foi possível constatar uma abrupta redução de 60,25% nos níveis do marcador após os

primeiros 30 dias de análise. E após 60 dias, a redução atingiu valores de 76,4%. No final do tempo de tratamento, a redução máxima percentual foi de 79,8% em relação ao P0.

No momento em que todos os picos passíveis de análise foram devidamente integrados nos respectivos cromatogramas referentes aos pontos zero, 30, 60 e 90 dias, pode-se notar que todos apresentaram seus valores de área média alterados. Os picos sofreram decaimento gradual com o aumento da permanência na câmara climática (**Figura 6.2**).

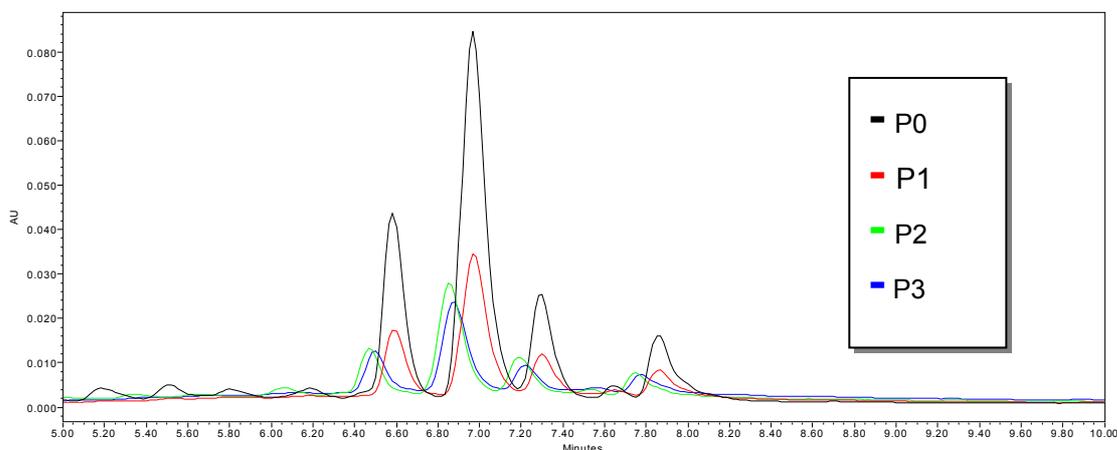


Figura 6.2. Cromatograma demonstrando o decaimento sistemático dos compostos presentes em *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa* no decorrer da análise de estabilidade.

Ao verificar os resultados da hidrólise ácida, realizada no **Capítulo 3**, **Figura 3.8**, pode-se observar claramente o surgimento de dois novos picos, que por sua vez correspondem, de acordo com os UV máximos apresentados, à quercetina (370,6 nm) e ao canferol (365,8 nm) portanto, era de se esperar que ocorresse o mesmo durante o estudo da estabilidade acelerada.

No entanto, ao analisar o cromatograma verifica-se que mesmo com a redução gradual na concentração dos compostos nenhum pico é formado a partir da linha de base. Tal fenômeno poderia ser explicado pelo fato de tratar-se de um produto de origem vegetal onde outros metabólitos, possivelmente não detectados por CLAE, estariam envolvidos.

A **Tabela 6.3** apresenta os valores médios dos dados obtidos experimentalmente para as amostras submetidas ao estudo de estabilidade acelerada considerando-se diferentes ordens de reação.

Tabela 6.3. Valores experimentais obtidos no estudo de estabilidade acelerada de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*, considerando-se diferentes ordens de reação.

Temp o (dias)	Reação de ordem zero Teor de SQM (mg/ml)⁽¹⁾	Reação de primeira ordem log C⁽²⁾	Reação de segunda ordem 1/C⁽³⁾
0	3,22	0,5083	0,3102
30	1,28	0,1091	0,7778
60	0,76	-0,1192	1,3160
90	0,67	-0,1767	1,4848

⁽¹⁾ coeficiente de correlação (r) = -0,887152

⁽²⁾ coeficiente de correlação (r) = -0,946229

⁽³⁾ coeficiente de correlação (r) = 0,981153

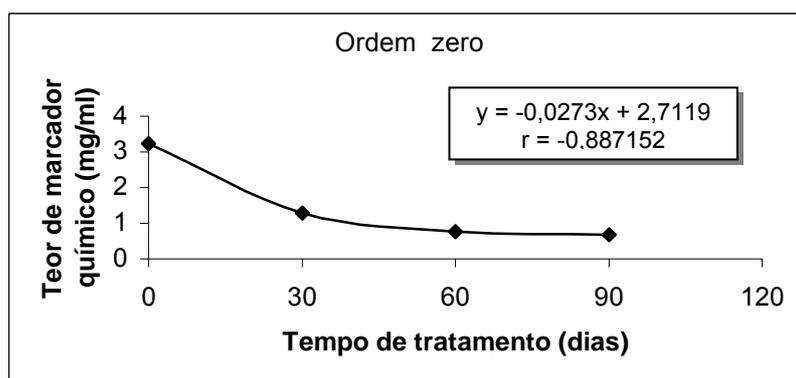


Figura 6.3 Representação gráfica, de ordem zero, da curva de degradação térmica de SQM.

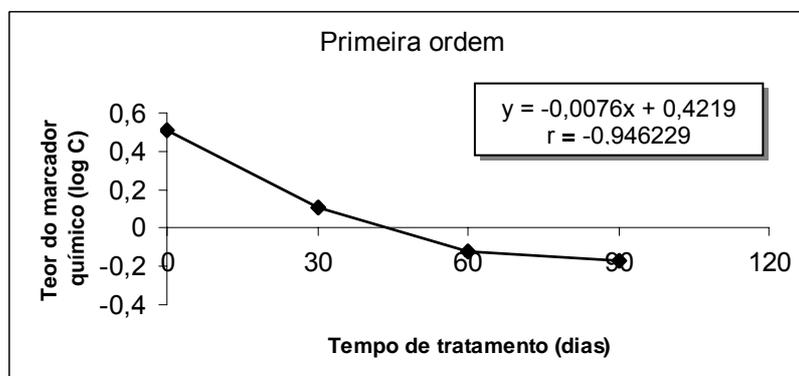


Figura 6.4 Representação gráfica, de primeira ordem, da curva de degradação térmica de SQM.

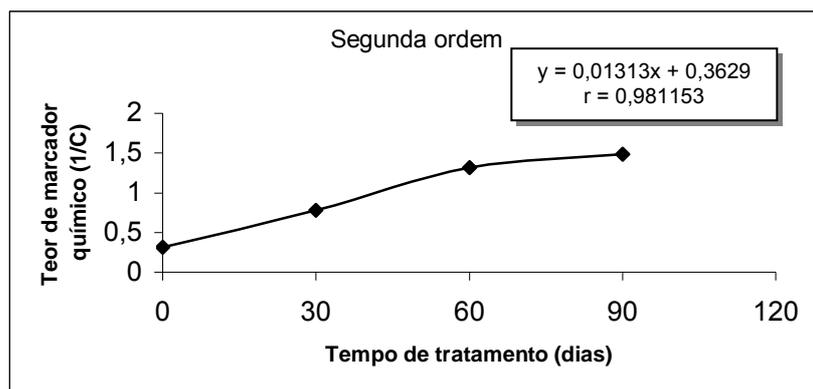


Figura 6.5 Representação gráfica, de segunda ordem, da curva de degradação térmica de SQM.

Com base na análise dos coeficientes de correlação, calculados através de regressão linear dos dados obtidos para o tratamento apresentado na **Tabela 6.3** foi possível a determinação da respectiva ordem de reação. Os valores foram indicativos de uma reação de segunda ordem, com um $r = 0,981153$.

A constante da velocidade de degradação (k) apresentou o valor de $0,01313 \text{ dias}^{-1}$. A equação utilizada para a obtenção deste dado está indicada segundo a **Equação 6.6**.

A partir do valor de velocidade de degradação e do conhecimento da respectiva ordem de reação, calculou-se o tempo de vida útil ($t_{90\%}$) e o tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) de SQM de *B. forficata*. Os valores encontrados foram 2,63 dias e 23,65 dias, respectivamente. As fórmulas utilizadas para a obtenção destes dados estão indicadas segundo as **Equações 6.7 e 6.8**.

7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

7.1 INTRODUÇÃO

O oxigênio é o elemento mais abundante na biosfera e as oxidações biológicas realizadas através do oxigênio molecular representam a principal fonte de energia utilizada pela grande maioria de plantas e animais (WILHELM *et al.*, 2001). Os radicais formados a partir destas oxidações são conhecidos globalmente como espécies reativas de oxigênio e entre eles encontram-se os radicais livres de oxigênio (BOVERIS *et al.*, 2000). A toxicidade associada ao consumo de oxigênio poderia ser resumida como decorrência do determinismo, vinculado à segunda lei da termodinâmica, no qual a vida (organização) é mantida às custas do gasto de energia, em última análise, do seu poder redutor, enquanto que a morte (desorganização) constituiria os processos de oxidação (HENDRY e CRAWFORD, 1994).

Por conseqüência, as plantas, ao longo do tempo evolutivo, assim como também os organismos animais, foram dotados de distintas defesas antioxidantes, para compensar os efeitos deletérios associados à constante formação de radicais livres oriundas da presença e utilização do oxigênio nos seus tecidos (WILHELM *et al.*, 2001).

O uso terapêutico de plantas parece ser tão antigo quanto à própria espécie humana. Entretanto, o conhecimento das propriedades antioxidantes é relativamente recente. Nas duas últimas décadas observou-se um enorme crescimento da investigação científica desta atividade, envolvendo desde o efeito de extratos brutos, de frações ou de componentes isolados e/ou modificados. Os antioxidantes vegetais são de natureza muito variada, mas, indubitavelmente, os flavonóides constituem o grupo mais representativo (WILHELM *et al.*, 2001).

Os flavonóides protegem os constituintes alimentares contra danos oxidativos, podendo também contribuir para a prevenção de importantes patologias, como doenças cardiovasculares, envelhecimento, cânceres, e outras. Existem vários relatos de que os flavonóides exibem uma grande variedade de efeitos biológicos (WILHELM *et al.*, 2001).

Considerando-se que os principais constituintes químicos presentes em *Bauhinia forficata* são os flavonóides, associando-se tal dado a estudos realizados em outras espécies de *Bauhinia* e na própria *B. forficata* (item 2.3.1), tornou-se bastante interessante que a avaliação da atividade antioxidante de seus diferentes extratos.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Determinar a atividade antioxidante de *Bauhinia forficata* sub. *pruinosa* pelo método fotocolorimétrico do DPPH;
- b) Testar o potencial antioxidante de diferentes extratos de *B. forficata*.

7.3 MATERIAIS E MÉTODOS

Todo o procedimento foi realizado de acordo com a técnica descrita por MENSOR e colaboradores (2001). Os reagentes utilizados foram de grau analítico, obtidos da Merck. A atividade antioxidante dos extratos de *B. forficata* foi determinada através do método de doseamento fotocolorimétrico do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil-hidrato (DPPH), em processo guiado pela redução e descoloração deste em solução alcoólica na presença de agentes antioxidantes. Como substância controle foi utilizado padrão de rutina (Merck) e o experimento foi todo desenvolvido em colaboração com o Prof. Dr. Fábio Menezes do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os extratos de *B. forficata* sub. *pruinosa* foram obtidos de maneiras distintas, sendo o etanólico, segundo o método descrito no **Capítulo 3** e o extrato butanólico, conforme descrito no **Capítulo 4**. O extrato aquoso, por sua vez, foi obtido através de maceração, com ultra-turrax (5 minutos), de 250 mg de planta pulverizada em água, filtrado a vácuo e liofilizado para a obtenção de uma amostra isenta de água (liofilizador SAVANT MICROMODULYO).

Preparou-se solução amostra a partir dos diferentes extratos de *Bauhinia forficata* na concentração de 1 mg/ml. Em seguida, dilui-se em etanol (MERCK; grau de pureza p.a.) nas concentrações: 5, 10, 25, 50, 125, e 250 µg/ml.

Preparou-se, em paralelo, uma solução de DPPH 0,3 mM em etanol. Adicionou-se 1ml da solução de DPPH em 2,5 ml das diferentes concentrações da solução amostra. Deixou-se reagir em temperatura ambiente por 30 minutos.

Utilizou-se 1,0 ml de etanol mais 2,5 ml de solução amostra como branco e solução de DPPH (1,0 ml; 0,3mM) mais 2,5 ml de etanol como controle negativo. Os controles positivos foram as soluções padrão de *Ginkgo biloba* e rutina preparadas usando o mesmo procedimento de diluição utilizado para as amostras. A rutina foi solubilizada em metanol (MERCK; grau de pureza p.a.).

Após, foi possível verificar as medidas de absorvância em 518 nm, convertendo-se tais valores em percentual de atividade antioxidante (AA) usando a fórmula descrita na **Equação 7.1**.

Equação 7.1. Fórmula para a conversão da medida em absorvância em percentual de atividade antioxidante.

$$AA\% = 100 - \{[(AAM - AAB) \times 100] / AC\}$$

Onde: AAM = Absorvância da amostra;

AAB = Absorvância do branco;

AC = Absorvância do controle.

A concentração efetiva para se obter 50% do máximo da atividade estimada em 100% é dita CE₅₀, sendo calculada por regressão linear das curvas construídas das concentrações dos extratos testados, onde a abscissa (x) representa a concentração do extrato vegetal testado e a ordenada (y) é a média de 3 análises do percentual de atividade antioxidante.

7.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os ensaios mostraram as seguintes atividades antioxidantes: CE_{50} de 54,73 $\mu\text{l/ml}$ para o extrato butanólico, CE_{50} de 283,9 $\mu\text{g/ml}$ para o extrato aquoso e CE_{50} de 308,1 $\mu\text{g/ml}$ para o extrato etanólico, enquanto a CE_{50} para o extrato de *Ginkgo biloba* é de 42,51 $\mu\text{l/ml}$ e para o padrão rutina é 14,16 $\mu\text{l/ml}$. O percentual da atividade antioxidante e o desvio padrão percentual de cada extrato de *B. forficata* está demonstrado na **Tabela 7.1**. E a representação gráfica dos mesmos pode ser verificada na **Figura 7.1**.

Tabela 7.1. Percentual de atividade antioxidante demonstrado pelos extratos butanólico, etanólico e aquoso de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa*.

Concentração do extrato ($\mu\text{g/ml}$)	Atividade Antioxidante* \pm DP (%) de <i>B. forficata</i>		
	Extrato butanólico	Extrato aquoso	Extrato etanólico
5	4,13 \pm 1,36	1,31 \pm 0,24	1,5 \pm 0,55
10	7,52 \pm 0,24	1,82 \pm 0,09	2,9 \pm 0,22
25	19,16 \pm 0,53	5,13 \pm 0,68	4,64 \pm 0,25
50	36,61 \pm 0,43	6,98 \pm 0,45	8,45 \pm 0,28
125	80,06 \pm 0,33	20,40 \pm 0,52	20,75 \pm 0,41
250	89,66 \pm 0,18	44,9 \pm 0,45	40,79 \pm 0,43

* Média para três determinações.

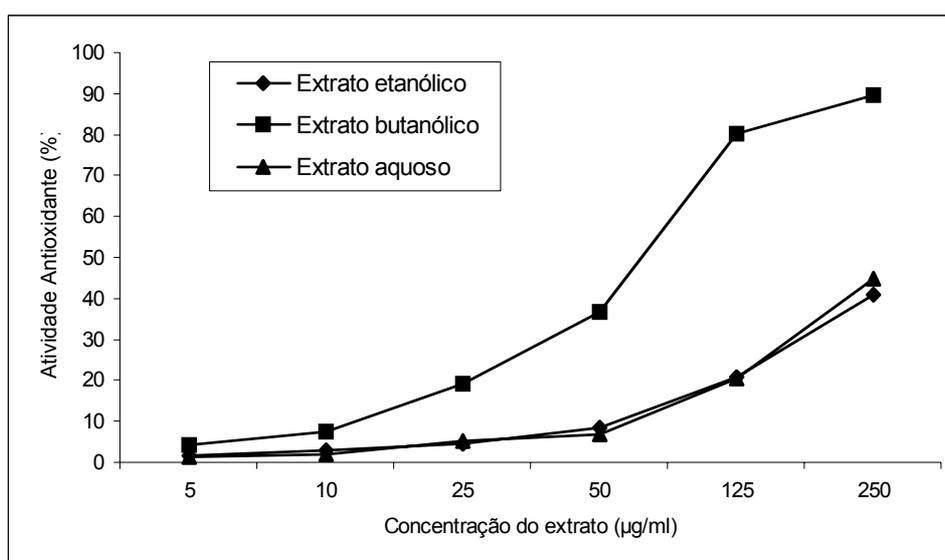


Figura 7.1. Representação gráfica da atividade antioxidante apresentada pelos extratos de *Bauhinia forficata* subespécie *pruinosa* testados pelo método do DPPH.

Analisando-se a **Tabela 7.1** e a **Figura 7.2**, verifica-se que os extratos butanólico, aquoso e etanólico demonstraram possuir alguma atividade antioxidante, sendo o extrato butanólico o que mais se aproxima do extrato de *Ginkgo biloba*, considerado padrão para este ensaio. O extrato aquoso demonstrou ser superior ao etanólico.

Segundo MENSOR e colaboradores (2001), o líquido extrator influencia o potencial antioxidante do extrato originado, onde aqueles de maior polaridade têm demonstrado possuir maior atividade antioxidante.

DPPH é um radical livre, estável à temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em etanol. Sua redução ocorre na presença de moléculas antioxidantes, tornando-se uma solução descolorida. O uso de DPPH proporciona uma forma rápida e fácil de se avaliar o potencial antioxidante (MENSOR *et al.*, 2001).

A interação do potencial antioxidante com DPPH depende da conformação estrutural. O número de moléculas de DPPH que são reduzidas parece estar correlacionado com o número de hidroxilas livres (BRAND – WILLIAMS *et al.*, 1995). Pode-se inferir que o radical livre DPPH extrai o hidrogênio fenólico da molécula doadora de elétrons e este, por sua vez, pode ser o mecanismo geral de alimentação dos flavonóides antiperoxidantes, por exemplo (RATTY *et al.*, 1988).

Considerando-se o mecanismo de redução da molécula de DPPH extensivamente descrito na literatura (TOUVAY *et al.*, 1986; TAKAO *et al.*, 1994; NANJO, *et al.*, 1996; COTELLE *et al.*, 1996; SREEJAYAN e RAO, 1996; BASNET *et al.*, 1997; BURMISTROV *et al.*, 1997; FAUCONNEAU *et al.*, 1997; KOROUNAKIS, *et al.*, 1997; TSENG *et al.*, 1997), que se correlaciona com a presença de grupos hidroxila presentes na molécula antioxidante, pode-se inferir que a atividade apresentada pelo extrato mais polar é provavelmente devida a presença de substâncias com hidroxilas livres (fenólicas ou não). Essa exigência estrutural pode estar vinculada à presença de flavonóides, que ocorrem, entre outras, em plantas pertencentes à família Leguminosae e na espécie *Bauhinia*.

De fato, substâncias como os flavonóides já têm sido estudadas como antioxidantes e demonstrado possuir potencial atividade (GORDON, 1996; RAPTA *et al.*, 1995; YOKOZAWA *et al.*, 1997; MARFAK *et al.*, 2003).

A atividade antioxidante apresentada pelos extratos de *B. forficata* é satisfatória, porém, não superior a de *Ginkgo biloba* denotando a presença de seqüestradores de radicais livres, como os flavonóides, conhecidos antioxidantes.

8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA *IN VIVO*

8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA *IN VIVO*

8.1 Introdução

Os flavonóides têm sido amplamente estudados por possuírem atividade antiinflamatória e antiedematogênica (MASCOLO *et al.*, 1988; EMIM *et al.*, 1994; RECIO *et al.*, 1995; PELZER *et al.*, 1998; HARBONE e WILLIANS, 2000). Ao considerar-se que um dos principais efeitos adversos dos antiinflamatórios não-esteróides é o desenvolvimento de problemas gastrintestinais, principalmente na ulcerogênese, decorrente da inibição da enzima cicloxigenase-1 e o crescente interesse da população mundial em terapias alternativas e possivelmente menos agressivas, aprofundar os estudos a fim de comprovar atividades empíricas relacionadas aos flavonóides tornou-se fundamental.

O processo inflamatório, apesar de ser um fenômeno complexo, caracteriza-se fundamentalmente por manifestar-se de maneira estereotipada. Trata-se de uma cadeia complexa de eventos, os quais representam respostas de defesa do organismo contra as injúrias. Dependendo da intensidade e do tempo de duração, a reação inflamatória pode não ocorrer como evento meramente local e, além de estar ajustada à intensidade e persistência do estímulo nocivo, é passível de ser influenciada por mecanismos gerais de defesa, que podem ser alterados por circunstâncias que afetam o organismo como um todo (SCHAPOVAL, 1974; GARCIA LEME, 1981).

A atividade dos flavonóides pode ser explicada por diversos mecanismos de ação, entre eles à inibição da cicloxigenase (COX). Para MORONEY e colaboradores (1988) alguns flavonóides inibem seletivamente a enzima 5-lipoxigenase, envolvida na formação dos leucotrienos a partir do ácido araquidônico. Substâncias derivadas do canferol atuam inibindo as COX e 5-lipoxigenase concomitantemente (SERTIÉ *et al.*, 1990). Outro possível mecanismo de ação é a inibição da síntese das prostaglandinas PGE2 e PGE2a e à própria atividade antioxidante (GARG *et al.*, 2001).

Popularmente, atividades analgésica, antiedematogênica e antiinflamatória bem como antioxidante (discutida no **Capítulo 7**) são relacionadas às *Bauhinias*,

possivelmente, por serem, justamente, os flavonóides os seus principais constituintes químicos.

MEYRE-SILVA e colaboradores (2001) realizaram estudos com *Bauhinia microstachya* a fim de verificar sua atividade analgésica. Estes autores testaram seu extrato metanólico e flavonóides isolados da própria planta confirmando o seu uso popular como analgésica. Enquanto SOSA e colaboradores (2002) demonstraram que *Bauhinia tarapotensis* possui propriedade antiinflamatória também confirmando o seu emprego popular.

Bauhinia forficata é dita popularmente como possuidora de propriedades antiinflamatória e antiedematogênica (ver **Capítulo 2**), mas, infelizmente, não existem estudos mais aprofundados relacionados a tais atividades descritos na literatura. Para se verificar a atividade antiinflamatória segue-se normalmente modelos *in vitro*, como a quimiotaxia, e *in vivo*, edema de pata de ratos, pleurisia e microcirculação *in situ*. Decidiu-se, então, neste trabalho, avaliar a atividade antiedematogênica de *B. forficata* a partir do seu extrato aquoso, uso comumente relatado, através do método de edema em pata de ratos.

8.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

a) Determinar a atividade antiedematogênica do extrato aquoso de *Bauhinia forficata* sub. *pruinosa* através do método de edema em pata de ratos induzido pela carragenina.

8.3 MATERIAIS E MÉTODOS

8.3.1 Material biológico

Para a realização deste experimento, foram utilizados 23 animais fornecidos pela Fundação Estadual de Pesquisa e Produção em Saúde (FEPPS). Para tanto, ratos da raça Wistar machos pesando de 180 a 200 g, foram mantidos em caixas plásticas contendo, no máximo, cinco animais, com livre acesso à água e ração. Os mesmos passaram por um período de adaptação de 48 horas no Biotério da Faculdade de Farmácia – UFRGS, com temperatura controlada (23 ± 2 °C), controle de claro/escuro de 12 horas (7 h – 19 h) e umidade monitorada.

A manipulação animal foi realizada seguindo princípios éticos relatados por GOLDIM (1995) para a experimentação animal. O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética desta Universidade tendo sido aprovado sob o registro CEP 23078.034044/03-15, na reunião n. 27, ata n. 48, no dia 27 de maio de 2004, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (ANEXO 3).

8.3.2 Preparação do extrato

O extrato aquoso de *B. forficata* foi preparado pelo método de infusão seguido de maceração estática, por ser esse, freqüentemente, o seu preparo popular. A fim de se obter uma concentração teórica em torno de 100 mg/ml verteu-se 200 ml de água fervente sobre, cerca de, 20 g de planta seca. O infuso permaneceu em repouso 24 horas, caracterizando a maceração estática, e após este período, foi filtrado à vácuo.

8.3.3 Edema em pata de rato

A atividade antiedematogênica foi avaliada de acordo com metodologia descrita por WINTER e colaboradores (1962), na qual foi utilizada carragenina para indução de edema em pata de rato. A reação inflamatória desenvolvida em edema de pata de rato, com adição prévia de agente flogístico pode ser transformada em teste quantitativo pela medida do diâmetro da pata ou pela medida do volume da pata através de pletismômetro (SUYENAGA, 2002).

Como controle positivo foi utilizada a indometacina (SIGMA) na dose de 10 mg/kg, por via oral. E como controle negativo foi empregada solução salina. Os animais foram tratados com extrato aquoso, preparado conforme descrito no item **8.3.2**, por via oral, na dose de 500 mg/kg, uma hora antes da indução do edema. Tal dose foi definida com base em experimentos realizados com extratos de *B. forficata* por outros autores, entre eles SILVA e colaboradores (2002) e DAMASCENO e colaboradores (2004), principalmente em estudos de sua atividade hipoglicemiante. Após, os animais foram anestesiados, pela via intraperitoneal, com pentobarbital sódico, na dose de 40 mg/kg de peso corporal, e mantidos sedados durante as medidas.

O edema foi induzido na aponevrose subplantar da pata traseira esquerda dos ratos, através de injeção de 0,1 ml de solução de carragenina (SIGMA) em salina (5 mg/ml). As patas direitas serviram de controle, através da injeção de 0,1 ml de solução salina. O volume das patas foi medido em triplicata, nos tempos 1, 2, 3, 4 horas após a injeção do agente flogístico, utilizando o plestimômetro Ugo Basile. O líquido utilizado no aparelho foi uma solução contendo 4 ml (m/V) de laurilssulfato de sódio e 0,4 g de NaCl, dissolvidos em um litro de água.

Os resultados de redução de edema foram calculados em relação ao aumento percentual do volume das patas traseiras de 6 animais controles positivos, de 7 animais controles negativo e de 10 animais tratados. Os resultados dos volumes médios das patas foram analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student.

8.3.4 Método de morte

Imediatamente após os experimentos os animais foram sacrificados por atordoamento com éter etílico, em capela de exaustão, e posterior deslocamento cervical.

8.3.5 Método de descarte do material biológico

O material biológico foi armazenado em sacos plásticos, em freezer com temperatura de – 20 °C, destinado especialmente para este fim, até a coleta pelo Centro de Controle de Zoonoses da Prefeitura Municipal de Porto Alegre.

8.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os efeitos da administração oral do extrato aquoso de *B. forficata* na inibição da formação do edema em pata de ratos induzido pela carragenina, podem ser observados na **Tabela 8.1**. Os aumentos dos volumes dos edemas das patas de ratos estão ilustrados na **Figura 8.1**. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão (d.p.) e analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student.

Tabela 8.1. Formação do edema em pata de ratos induzido pela carragenina.

Tratamento	Vol. do edema de pata (ml) ± d.p. (% de inibição)			
	1h	2h	3h	4h
Controle	0,63 ± 0,17	0,73 ± 0,09	2,0 ± 0,23	2,64 ± 0,49
Indometacina (10mg/kg)	0,54 ± 0,13 (14,28%)	0,60 ± 0,09 (17,80%)	0,33 ± 0,01* (83,5%)	0,75 ± 0,36* (71,59%)
Extrato (500mg/kg)	0,48 ± 0,09 (23,80%)	0,37 ± 0,07* (49,32%)	0,47 ± 0,12* (76,5%)	0,71 ± 0,18* (73,20%)

* significativo $p < 0,05$ em relação ao controle.

Na **Tabela 8.1** estão os resultados obtidos a partir da administração v.o. do extrato aquoso de *B. forficata* em relação ao controle negativo e à indometacina. Pode-se observar que o extrato demonstrou atividade antiedematogênica significativa, para um $\alpha = 0,05$, a partir da segunda hora (49,32%). Enquanto o controle positivo só demonstrou atividade significativa a partir da terceira hora (83,5%).

O extrato demonstrou atividade significativa ao longo de três horas. Inclusive, já na primeira hora, apesar do seu percentual de inibição ainda não ser significativo, demonstrou-se superior ao da indometacina (controle positivo). E na segunda hora, sua inibição já era estatisticamente significativa enquanto o controle positivo ainda demonstrava-se inativo. Na terceira hora, atingiu seu máximo de inibição (76,3%) e na quarta hora manteve-se com um percentual de inibição bastante elevado (73,20%) e novamente superior ao da indometacina.

Considerando-se que o extrato aquoso de *B. forficata* possui como constituintes majoritários canferol e quercetina glicosilados, sugere-se que a atividade demonstrada esteja relacionada a um possível sinergismo entre os compostos. Pode-se, ainda, relacionar a atividade ao grupamento catecol ou à presença da hidroxila no carbono 3. ALCARAZ e FERRANDIZ (1987), ao estudar o canferol, sugeriram a inibição seletiva da enzima COX (ciclooxigenase), devido à presença do grupamento catecol no anel A ou B e, também que a presença da hidroxila na posição 3 seria suficiente para inibir esta enzima.

RECIO e colaboradores (1995) verificaram que os flavonóis foram ativos contra a resposta vascular primária mediada pelas aminas e prostaglandinas,

destacando-se a aglicona quercetina, que inibiu a fosfolipase A₂ dos leucócitos humanos, bem como a liberação de histamina dos basófilos.

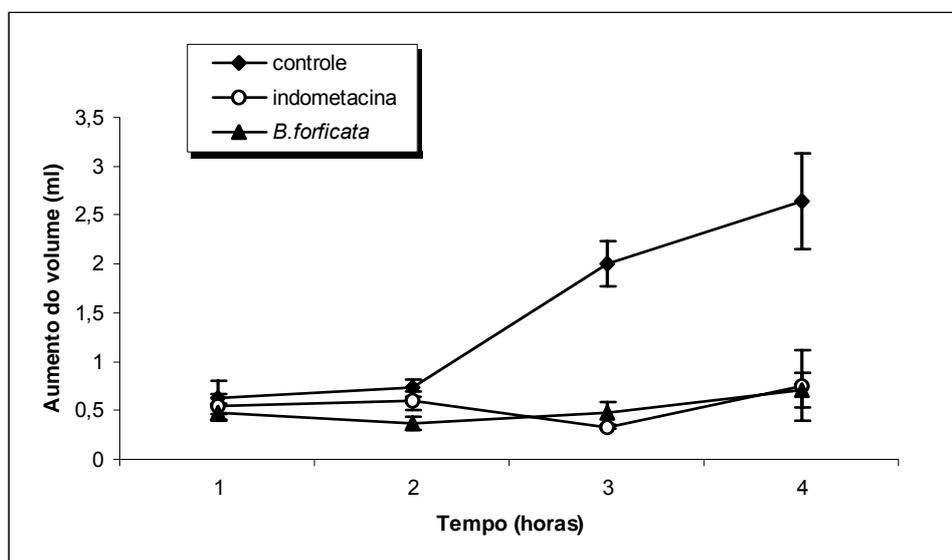


Figura 8.1. Aumentos dos volumes dos edemas em pata de ratos.

Ao analisar-se a **Figura 8.1** evidencia-se claramente que o comportamento do extrato de *B. forficata* aproxima-se bastante ao do controle positivo (indometacina). Sendo que nos tempos 2 e 4, o efeito do extrato demonstra-se superior, pois o aumento do volume é menor do que aquele observado para o animal tratado com indometacina, demonstrando, assim, que o extrato aquoso de fato possui atividade anti edematogênica.

A atividade antiinflamatória relacionada aos flavonóides é bastante conhecida e estudada. Explica-se, em parte, como sendo devido à inibição da cicloxigenase (COX) onde o canferol, por exemplo, atuaria inibindo as enzimas COX e 5-lipoxigenase, ou ainda, inibindo a granulação tecidual. A quercetina atuaria inibindo seletivamente a enzima 5-lipoxigenase, envolvida na formação dos leucotrienos a partir do ácido araquidônico (MORONEY *et al.*, 1988; SERTIÉ *et al.*, 1990).

Considerando-se que o gênero *Bauhinia* caracteriza-se pelo acúmulo de flavonóides livres e glicosilados (PIZZOLATTI *et al.*, 2003), pode-se perfeitamente julgar que *B. forficata* seja capaz de demonstrar atividade antiinflamatória em ensaios apropriados (ex. pleurisia).

Corroborando para a obtenção de tal resultado positivo em *B. forficata*, tem-se ainda, a presença de β -sitosterol, substância tida como antinociceptiva, e que de certa forma, pode justificar e reforçar esse tipo de atividade (OLIVEIRA *et al.*, 2001). A presença de β -sitosterol, por sua vez, foi demonstrada por SILVA e colaboradores (2000) em experimento com *B. forficata*. Embora não constem na literatura, até o presente momento, trabalhos científicos que possam comprovar a atividade antiinflamatória do β -sitosterol, este composto é bastante comum em produtos naturais e apresenta importantes atividades farmacológicas (HANDA *et al.*, 1992).

9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

9 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

9.1 INTRODUÇÃO

A Doença de Alzheimer é uma das causas mais comuns de demência senil em idosos. É uma doença degenerativa que destrói as células do cérebro, lenta e progressivamente, afetando o funcionamento mental (pensamento, fala, memória, etc). Estima-se que mais de 4 milhões de pessoas sofram deste mal nos Estados Unidos (MARSTON *et al.*, 2002).

Os inibidores da acetilcolinesterase, enzima responsável pela degradação da acetilcolina cerebral, têm sido a base da terapia dos mais novos medicamentos disponíveis no mercado contra o Mal de Alzheimer. Tais inibidores agem corrigindo a deficiência do neurotransmissor acetilcolina nas sinapses do córtex cerebral. Fisostigmina (alcalóide obtido da Fava de Calabar, *Physostigma venenosum*; Leguminosae) é um excelente inibidor da acetilcolinesterase, mas é pouco absorvido pelo trato gastrointestinal em humanos. Por esta razão, análogos como a rivastigmina, tem sido introduzida na terapêutica (FORETTE *et al.*, 1999). Galantamina, alcalóide isolado de plantas da família Amaryllidaceae, também tem sido utilizada no tratamento do Mal de Alzheimer (FULTON e BENFIELD, 1996; CALIXTO 2001b).

Os flavonóides por sua vez, podem atuar de diferentes formas, contribuindo para a integridade do tecido neuronal: a) inibindo a atividade das enzimas superóxido-dismutase e monoamina-oxidase, que contribuem para a geração de radicais livres no cérebro e no corpo; b) seqüestrando radicais livres que poderiam causar dano aos neurônios e, conseqüentemente, retardar as mudanças associadas à idade no cérebro e c) reduzindo a liberação de ácido araquidônico, um co-produto tóxico do metabolismo lipídico, que aparece no cérebro logo após o episódio isquêmico (ISHIGE *et al.*, 2001; GRUNDMAN e DELANEY, 2002; FRAGA *et al.*, 2004).

ISHIGE e colaboradores (2001) ao estudarem os mecanismos pelos quais os flavonóides protegem as células neuronais, concluíram que, se o estresse oxidativo é responsável por inúmeros distúrbios, entre eles o Mal de Alzheimer, os

flavonóides bem como os alimentos que os contêm podem ter muitos efeitos benéficos no tratamento dessa doença.

Novamente, a presença de flavonóides como constituintes majoritários em *Bauhinia forficata* contribuem para que se realize um ensaio autobiográfico a fim de se verificar uma possível atividade anticolinesterásica. No entanto, na literatura encontram-se relatos em que os resultados não foram positivos, como os citados no **Capítulo 2**, no item **2.3.4**.

Tendo-se em vista o potencial de plantas para a descoberta de novos inibidores da acetilcolinesterase, o ensaio de autobiografia por cromatografia em camada delgada (CCD) foi introduzido para *screening* de extratos provenientes de plantas. O método de CCD foi escolhido, pois permite um acesso rápido à informação considerando tanto a atividade como a localização da ação no complexo material vegetal. Os constituintes separados podem ser diretamente detectados na placa de CCD. O teste consiste na clivagem do 1-naftil acetato pela acetilcolinesterase em 1-naftol, o qual reage com o reagente *Fast Blue B salt* formando um diazônio de coloração púrpura. As regiões da placa que contêm os inibidores da acetilcolinesterase apresentam uma mancha branca contra o fundo púrpura.

9.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

a) avaliar uma possível atividade anticolinesterásica de 3 compostos isolados de *Bauhinia forficata* sub. *pruinosa* com o auxílio da técnica de autobiografia por CCD.

9.3 MATERIAIS E MÉTODO

9.3.1 Compostos isolados

Durante o processo de isolamento de SQM, descrito no **Capítulo 3**, foi possível visualizar outras 2 bandas cromatográficas em CCD com bastante nitidez, as quais também foram isoladas pelo mesmo método e avaliadas, juntamente com SQM, no experimento de autobiografia. Os produtos isolados foram diluídos em uma solução metanólica na concentração de 1 mg/ml e 10 μ l foram aplicados sobre a placa de CCD.

9.3.2 Método da Autobiografia

O experimento foi desenvolvido segundo método descrito por MARSTON e colaboradores (2002).

Preparou-se uma solução estoque dissolvendo-se acetilcolinesterase (1000 U) em 150 ml de tampão Tris-ácido clorídrico 0,05M a pH 7,8. Adicionou-se albumina de soro bovino (150 mg) a solução para estabilizar a enzima durante o bioensaio. A solução de estoque foi mantida a 4 °C.

As três soluções metanólicas, contendo as substâncias puras isoladas de *B. forficata*, foram devidamente depositadas (aplicadas) sobre a placa de CCD, que foi seca imediatamente para a completa remoção do solvente.

A placa foi, então, nebulizada com a solução estoque e seca novamente.

Na seqüência, para que ocorresse a devida incubação da enzima, deitou-se a placa sobre um suporte em um tanque contendo um pouco de água, a uma temperatura de 37 °C durante 20 minutos. Desta forma, a água não entrou diretamente em contato com a placa, mas a atmosfera permaneceu úmida. A enzima apresentou uma estabilidade satisfatória nestas condições.

Para detecção da enzima, uma solução de 1-naftil acetato (250 mg) em etanol (100 ml) e de *Fast Blue B salt* (400 mg) em água destilada (160 ml) foram preparadas imediatamente antes do uso (a fim de prevenir decomposição).

Após a incubação da placa de CCD, 10 ml da solução de 1-naftil acetato e 40 ml da solução de *Fast Blue B salt* foram misturadas e, em seguida, aspergidas na placa, ocorrendo o desenvolvimento de coloração púrpura no decorrer de 1-2 minutos. Em caso de atividade anticolinesterásica, uma mancha branca contra o fundo púrpura deve ser formada nos pontos de aplicação da substância avaliada.

9.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio autobiográfico realizado, o resultado apresentado pelas três soluções metanólicas preparadas a partir de compostos isolados de *B. forficata*,

estando entre eles SQM (**Figura 9.1**), foi negativo, pois nenhuma mancha branca contra o fundo púrpura foi visualizada.

O resultado pode ser atribuído ao fato de uma possível atividade anticolinesterásica, se existente, estar vinculada a um sinergismo entre os diferentes compostos presentes em *B. forficata*. De maneira que, ao se analisarem 3 dos cinco produtos isoladamente, todos demonstraram não possuir qualquer atividade. O extrato puro não foi analisado em um primeiro momento pois buscava-se identificar uma possível atividade já vinculando a mesma a um composto puro presente na planta e devidamente isolado. Considerando-se o resultado obtido, pode-se sugerir a análise do extrato para novas conclusões.

Outra explicação plausível seria relacionada ao fato de que os compostos testados tratavam-se, possivelmente, de canferóis com diferentes glicosídeos ligados e a atividade colinesterásica, por sua vez, pode estar associada somente a agliconas livres.

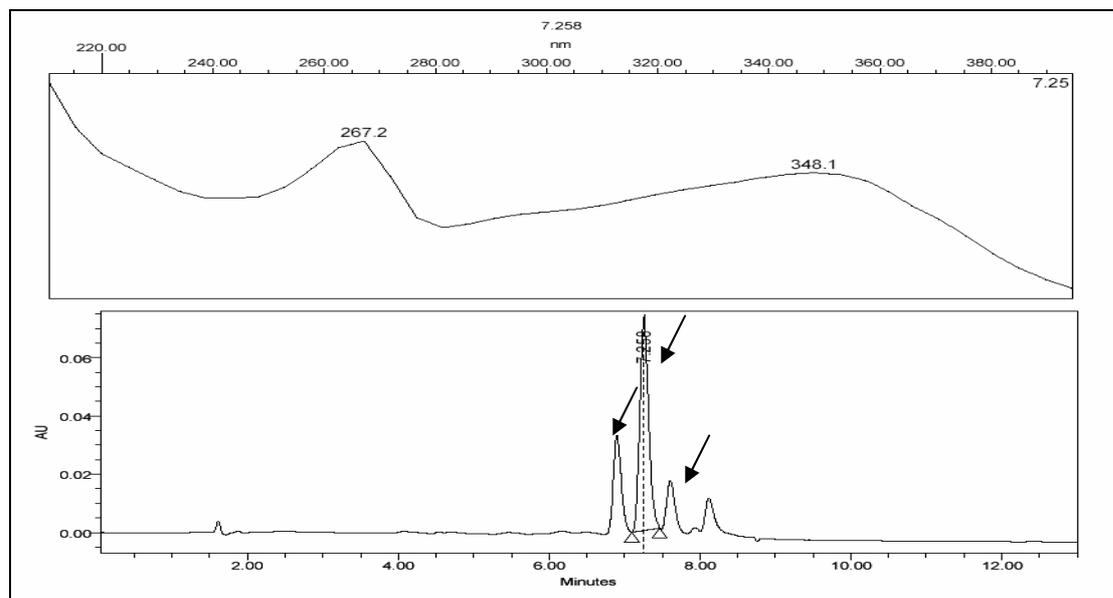


Figura 9.1. Cromatograma de *Bauhinia forficata*, a 348 nm, demonstrando os picos das substâncias avaliadas no experimento de atividade anticolinesterásica.

10 DISCUSSÃO GERAL

A utilização de plantas como fonte de medicamentos para o tratamento das mais diversas doenças que acometem o homem, remonta aos primórdios da humanidade. Muito provavelmente, a terapêutica moderna não teria atingido o grau de desenvolvimento atual se não fosse o auxílio das plantas.

Apesar do vasto uso de preparações de origem vegetal como medicamentos, poucas foram estudadas cientificamente para comprovação de sua eficácia clínica e para a avaliação de sua segurança. De tal forma, raramente os princípios ativos são conhecidos.

O controle de qualidade, a padronização e a estabilização dos medicamentos fitoterápicos constituem uma tarefa bastante complexa, embora possível, atualmente, em função dos avanços crescentes alcançados nos métodos analíticos de alta resolução.

Considerando as dificuldades para garantir a qualidade e a estabilidade dos medicamentos fitoterápicos, a tendência vigente é o cultivo das plantas medicinais, fator crucial para manter a qualidade da matéria-prima e, conseqüentemente, do produto final acabado.

No Brasil, as plantas são usadas em grande escala como medicamentos. Considerando-se a vasta riqueza natural, ainda sem estudo, e as possibilidades que observamos para o desenvolvimento de novos fitoterápicos, torna-se cada vez mais imprescindível a pesquisa e o estudo aprofundados sobre as mesmas e suas propriedades.

Bauhinia forficata é uma das tantas plantas da flora brasileira, usada deliberadamente pela população sem qualquer controle específico. No decorrer deste trabalho foi possível constatar as inúmeras ambigüidades relacionadas à identificação de *B. forficata* que persistem. Concomitantemente, as diferenças químicas entre as diferentes subespécies contribuíram ainda mais para que se reconsidere a nomenclatura e a sinonímia utilizadas atualmente.

Ao analisar-se *B. forficata* quimicamente, foi possível estabelecer que o seu emprego correto está diretamente relacionado com diferentes etapas, desde o

seu cultivo, passando pela estação da sua coleta e a correta identificação da espécie e subespécie.

Muito provavelmente, as variações nas atividades biológicas estejam ligadas às variações químicas da planta. Corroborando para que muitos estudos, até então vinculados às suas possíveis atividades, fossem inconclusivos. Soma-se ainda, o fato de os constituintes químicos presentes em *B. forficata* subespécie *pruinosa* serem extremamente sensíveis e degradarem com certa facilidade, o que pode ser observado no experimento de estabilidade acelerada realizado. Reforça-se então, a necessidade de um controle de qualidade adequado para *B. forficata* com um número maior de amostras e um período de análise de longa duração.

Além disso, como ter certeza a respeito das atividades biológicas relatadas até então para *B. forficata* se a subespécie dificilmente é informada? Se elas apresentam diferenças químicas nítidas, por que não poderiam ter efeitos terapêuticos distintos também?

Em ensaios de estabilidade acelerada, poucas plantas resistem às condições preconizadas para os medicamentos, gerando dificuldades no momento de se sugerir um prazo de validade até mesmo provisório para as mesmas. A exigência de estudos mais aprofundados e de longa duração torna-se fundamental para o correto uso de plantas medicinais. Na análise de *B. forficata* subespécie *pruinosa*, os tempos de vida útil e meia-vida encontrados demonstraram valores bastante reduzidos, sugerindo assim uma altíssima sensibilidade da planta frente às variações de temperatura e umidade as quais a mesma foi exposta.

A embalagem bastante simples utilizada no experimento, com o intuito de se aproximar das comerciais, serve como subsídio para que se reconsidere as apresentações encontradas no mercado atualmente e reforça a importância do material de acondicionamento e embalagem na garantia de produtos naturais.

Sendo assim, como garantir o uso correto de fitoterápicos pela população em geral, uma vez que os mesmos não têm os devidos estudos de estabilidade, validação e controle de sua qualidade?

Muitos estudos já desmistificam as propriedades populares e tornaram-nas científicas vinculando ou não as mesmas a um determinado componente ou grupo de presentes na planta. Por isso, comprovar a integridade química da mesma durante um determinado período de tempo é cada vez mais coeso frente ao posicionamento tanto dos estudiosos, que se dedicam e interessam pelas plantas existentes na flora mundial, como da população que consume e confia na eficácia de medicamentos provenientes de plantas.

Para que as análises de estabilidade fossem realizadas e devidamente validadas, a identificação de uma substância química majoritária responsável ou não por possíveis propriedades terapêuticas de *B. forficata* foi crescente.

Importante ressaltar que, em um primeiro momento, o isolamento de compostos químicos não fazia parte dos objetivos desta Dissertação, uma vez que diferentes substâncias já haviam sido devidamente elucidadas para *B. forficata*. Além disso, um marcador foi sugerido para a espécie *B. forficata* por SILVA e CECHINEL (2002) chamado de canferitrina, um heterosídeo de canferol. Este metabólito não foi identificado na planta estudada neste trabalho. Aprofundando as análises foi verificado que as subespécies *forficata* e *pruinosa*, apresentam perfil químico diferenciado. Desta forma, ao analisar e comparar estas subespécies, o isolamento da substância química majoritária (SQM) tornou-se praticamente vital para que os estudos fossem de fato realizados. Até o presente momento, pode-se apenas sugerir que SQM seja o canferol 3-robinosídeo – 7 rhamnosídeo identificado através de espectrometria de massas e ultravioleta.

A validação do método, geralmente aplicada a medicamentos sintéticos, é uma exigência crescente nos últimos anos a fim de assegurar que as especificações técnicas dos produtos possam ser mantidas indistintamente do lugar de fabricação ou do tempo/distância de transporte. Sendo assim, com o intuito de se obter resultados confiáveis na análise da estabilidade acelerada de *B. forficata* sub. *pruinosa*, a validação do método por CLAE empregado foi fundamental.

No que diz respeito às atividades biológicas estudadas no presente trabalho, pode-se inferir que algumas das propriedades relatadas pela população, foram elucidadas para *B. forficata* subespécie *pruinosa*.

A atividade antioxidante, já bastante vinculada aos flavonóides, foi demonstrada, *in vitro*, para diferentes extratos de *B. forficata* e corroborou para que se realizassem, então, outros experimentos, como o edema em pata de ratos para a atividade antiedematogênica e a autobiografia para a atividade anticolinesterásica. Considerando-se, desta forma, que o mecanismo de ação demonstrado pelos flavonóides para a atividade antioxidante pode estar, de fato, bastante relacionado com os mecanismos de ação das outras duas atividades. E ainda, a presença de substâncias antioxidantes pode estar de alguma forma relacionada, até mesmo, com a atividade antidiabetes largamente estudada para *B. forficata*.

O teste do edema em pata de ratos, por sua vez, demonstrou uma atividade significativa para o extrato aquoso da planta, confirmando o seu emprego popular como antiinflamatória e antiedematogênica. Enquanto a autobiografia apresentou um resultado negativo, mas considerando-se que nenhum extrato foi testado, sugere-se que estudos complementares sejam realizados antes que se façam afirmações mais precisas.

Ao se estudar e valorizar o desenvolvimento da química de plantas medicinais, a sua importância torna-se evidente, não só como embasamento científico de uma medicina alternativa, mas como fonte de novos e potentes fármacos.

Convém recordar que existe uma tendência mundial em implementar a qualidade de vida e, por isso, as exigências a tratamentos menos agressivos ao organismo ou que causem efeitos adversos mais suaves são crescentes. É justamente esse um dos principais motivos que impulsiona a poderosa indústria farmacêutica em busca de novos fármacos. Sendo assim, a pesquisa e propostas de controle de qualidade viáveis tornam-se extremamente necessárias e valiosas na área científico-tecnológica relacionadas aos fitoterápicos.

11 CONCLUSÕES GERAIS

- Analisando-se o perfil cromatográfico de *Bauhinia forficata* pode-se verificar que a análise por CLAE foi bastante valiosa e que o método estabelecido demonstrou-se satisfatório para o estudo desta espécie.
- Pode verificar também, que o comportamento químico entre diferentes subespécies é distinto, bem como na mesma subespécie, com a variação nas estações do ano.
- Observou-se distinções químicas entre *B. forficata* subespécie *pruinosa* e a espécie *Bauhinia variegata*, frequentemente confundida pela população com a primeira em função de semelhanças morfológicas.
- Para a completa elucidação e identificação da substância química majoritária (SQM) isolada a partir do extrato butanólico de *B. forficata* tornam-se imprescindíveis análises complementares; podendo-se, até o presente momento, inferir que, segundo análises espectrométricas de massas e UV, trata-se do canferol 3 – robinosídeo 7 – rhamnosídeo.
- A partir dos resultados obtidos para a validação de metodologia analítica empregada pode-se afirmar que o método de CLAE foi devidamente validado apresentando linearidade, repetibilidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez.
- Com a análise da estabilidade química pode-se verificar que a reação demonstrou comportamento característico de uma reação de segunda ordem e a velocidade de degradação foi de 0,01313 por dia.
- Pode-se, ainda, inferir que o tempo de vida útil e o tempo de meia-vida de *B. forficata*, nas condições propostas foram de 2,63 e 23,65 dias, respectivamente, sugerindo que estudos de estabilidade de longa duração sejam realizados para conclusões mais precisas.
- Ao determinar-se a atividade antioxidante de diferentes extratos de *B. forficata* pode-se observar que apenas o extrato butanólico apresentou uma atividade efetiva quando comparado ao padrão usado no ensaio; no

entanto estudos mais detalhados sobre a composição química desses extratos, bem como outros modelos, do tipo peroxidação lipídica e ensaios *in vivo*, são essenciais para caracterizá-los como antioxidantes biológicos além de poder inferir sobre os possíveis mecanismos de captura dos radicais livres pelas moléculas de *B. forficata*.

- Analisando-se os resultados de determinação de atividade antiedematogênia pode-se dizer que o extrato aquoso de *B. forficata* apresentou um efeito bastante significativo frente ao controle indometacina.
- Ao testar-se a atividade anticolinesterásica constatou-se que os compostos testados não demonstraram atividade sugerindo que estudos complementares sejam realizados.

12 REFERÊNCIAS

ALCARAZ, M.J.; FERRÁNDIZ, M.L. Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21, p. 209-229, 1987.

ALONSO, J.R. **Tratado de Fitomedicina: bases clínicas e farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS ediciones, 2000. p. 805-806.

ATROCH, E.M.A.C.; SOARES, A.M.; ALVARENGA, A.A.; CASTRO, E.M. Crescimento, teor de clorofilas, distribuição de biomassa e características anatômicas de plantas jovens de *Bauhinia forficata* LINK submetidas a diferentes condições de sombreamento. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras, v.25, n.4, p.853-862, 2001.

BASNET, P.; MATSUMO, T.; NEIDLEIN, R. Potent free radical scavenging activity of propol isolated from Brazilian propolis. **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 51, n. 11-12, p. 828-833, 1997.

BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; MORGENNI, F.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F. Evaluation of chemical stability of St. John's wort commercial extract and some preparations. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 213, p. 199-208, 2001.

BILIA, A. R.; BERGONZI, M. C.; GALLORI, S.; MAZZI, G.; VINCIERI, F. F. Stability of the constituents of Calendula, Milk-thistle and Passionflower tinctures by LC-DAD and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, n. 30, p. 613-624, 2002.

BOVERIS, A.; ALVAREZ, S.; ARNAIZ, S.A.; VALDEZ, L. **Handbook of Antioxidant.**, Cadenas, E., Packer, L., Eds.,2000. p. 351.

BRACA, A.; TOMMASI, N.; BARI, L.; PIZZA, C.; POLITI, M.; MORELLI, I. Antioxidant Principles from *Bauhinia tarapotensis*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 892-895, 2001.

BRAND – WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**. v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 899 de 29 de maio de 2003: Guia para a Validação de Métodos Analíticos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2003.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 48, de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2004a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 398 de 12 de novembro de 2004. Guia para a Realização do Estudo de Estabilidade. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2004b.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y farmacognosia**. Zaragoza: Acribia, 1991.

BUSMISTROV, S.O.; OPARINA, T.I.; PROKOPENKO, V.M.; ARUTIUNIAN, A.V. Antioxidant activity of the blood serum in pregnant and nonpregnant women: a comparison of various detection methods. **Klin. Lab. Diagnosys.**, v.11, p.14-17,1997.

CALIXTO, J. B. Estudo Farmacológico pré-clínico de Plantas Mediciniais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001a. 500 p.

CALIXTO, J. B. Medicamentos Fitoterápicos. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Mediciniais: sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó: Argos, 2001b. 500 p.

COTELLE, N.; BERNIER, J.L.; CATTEAU, J.P.; POMMERY, J.; WALLET, J.C.; GAYDOU, E.M. Antioxidant properties of hydroxy-flavones. **Free Radical Biology Medicine**, v.21, p. 35-43, 1996.

CRUZ, G.L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1979.

COSTA, O. A. Estudo farmacodinâmico da unha-de-vaca. **Revista da Flora Medicinal**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 4, p. 179-189, 1942.

EMIM, J.A.D.S.; OLIVEIRA, A.B.; LAPA, A.J. Pharmacological evaluation of the antiinflammatory activity of citrus bioflavonoid, hesperidin and the isoflavonoids, dauricin and claussequinone, in rats and mice. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.46, p. 118-122, 1994.

FAUCONNEAU, B.; WAFFO TEGUO, P.; HUGUET, F.; BARRIER, L.; DECENDIT, A.; MERILLON, J.M. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. **Life Science**, v.61, p. 2103-2110, 1997.

FEIDEN, K. (ed.). **Arzneimittelprufrichtlinien**. Stuttgart: Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft, 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Center for Drug Evaluation and Research. **Review Guidance: Validation of Chromatographic Methods**. Rockville: 1994.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation**, Rockville: 2001.

FORETTE, F.; ANAND, R.; GHARABAWI, G. A phase II study in patients with Alzheimer's disease to assess the preliminary efficacy and maximum tolerated dose of rivastigmine. **European Journal of Neurology**, v. 6, p. 423-429, 1999.

FORTUNATO, R. H. Revision del genero *Bauhinia* (Cerdideae, Calsalpinioidea, Fabacea para la Argentina). **Darwiniana**, v. 27, n. 1-4, p. 527-557, 1986.

FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J.; VIEGAS, C.; BOLZANI, V.S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do Mal de Alzheimer. **Química Nova**, v.27, n. 4, p. 655-660, 2004.

FULTON, B.; BENFIELD, P. Galanthamine. **Drugs Aging**, v. 9, p. 60-65, 1996.

GARCIA-LEME, J. Regulatory mechanisms in inflammation: new aspects of autopharmacology. **General Pharmacology**, v. 12, p. 15, 1981.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L.J.D.; SINGLA, A.K. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 655-699, 2001.

GOLDIM, J. R. **Pesquisa em Saúde e Direito dos Animais**. Porto Alegre: HCPA, 1995. 28 p.

GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; MÁRQUEZ, A.H.; CAPOTE-ZULUETA, J. Effects of *Bauhinia megalandra* aqueous leaf extract on intestinal glucose

absorption and uptake by enterocyte brush border membrane vesicles. **Fitoterapia**, n. 74, p. 84-90, 2002.

GORDON, M.H. Dietary antioxidants in disease prevention. **Natural Products Report**, v.13, p. 265-273, 1996.

GRUNDMAN, M.; DELANEY, P. Antioxidant strategies for Alzheimer's disease. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 61, p. 191 – 202, 2002.

HAEYOUNG, L.; KIM, M.K.; LIM, Y.; CHO, Y.; LEE, C. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cells by HY52, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. **Cancer Letters**, v. 20, p. 1-9, 2005.

HANDA, S.S.; CHAWLA, A.L.; SHARMA, A.K. Plants with anti-inflammatory activity. **Fitoterapia**, v. 63, p. 3-31, 1992.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advantages in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HEIGL, D.; FRANZ, G. Stability testing on typical flavonoid containing herbal drugs. **Die Pharmazie**, v. 12, p. 881-885, 2003.

HENDRY, G.A.; CRAWFORD, R.M.M. **Proceedings of the Royal Society of Edinburgh**, n.102B, p.1, 1994.

HONG, D. D.; SHAH, M. Development and Validation of HPLC Stability-Indicating Assays. In: CARSTENSEN, J. T.; RHODES, C. T. (Ed). **Drug Stability: principles and practices**. 3rd ed. New York: Marcel Dekker, 2000. 773p.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Text on Validation of Analytical Procedures**. Switzerland: ICH, 1993.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION. **Validation of Analytical Procedures: Methodology**. London: ICH, 1996.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidative stress by three distinct mechanisms. **Free Radical Biology e Medicine**, v. 30, p. 433 – 446, 2001.

JUDD, W. S., CAMPBELL, C. S., KELLOGG, E. A., STEVENS, P. F. **Plant Systematics**: a phylogenetic approach. Massachusetts: Sinauer Associates, 1999.

JULIANI, C. The hypoglycemic action of unha-de-vaca. **Review of Medicine, Pharmacy, Chemistry and Physics**, v. 2, n. 1, p. 165-169, 1931.

KOROUNAKIS, A.P.; REKKA, E.A.; KOROUNAKIS, P.N. Antioxidant activity of guaiazulene and protection against paracetamol hepatotoxicity in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 49, p. 938-942, 1997.

LACHMAN, L.; DELUCA, P.; AKERS, M. J. Testes de Estabilidade e Fundamentos de Cinética Química. In: LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L.. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. v. 2, cap. 256.

LEMUS, I.; GARCIA, R.; DELVILLAR, E.; KNOP, G. Hypoglycaemic Activity of Four Plants Used in Chilean Popular Medicine. **Phytotherapy Research**, v. 13, p. 91-94, 1999.

LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1982.

LORENZI, H. **Árvores do Brasil**. Nova Odessa: Plantarum, 1992. v. 1.

LOWEN, D.; HABS, M.; KLIMM, H.D.; TRUNZLER, G. **Phytopharmakareport**. 2 ed. Darmstadt: Steinkopff-Verlag, 1999. p. 1.

MARCH, R.; MIAO, X. A fragmentation study of kaempferol using electrospray quadropole time-of-flight mass spectrometry at high mass resolution. **International Journal of Mass Spectrometry**, n. 23, p. 157-167, 2004.

MARCH, R.; MIAO, X.; METCALFE, D. A fragmentation study of a flavone triglycoside, kaempferol-3-O-robinoside-7-O-rhamnoside. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 18, n. 9, p. 931-934, 2004.

MARFAK, A.; TROUILLAS, P.; ALLAIS, D.; CHAMPAVIER, Y.; CALLISTE, C.; DUROUX, J. Radiolysis of kaempferol in water/methanol mixtures and evaluation of antioxidant activity of kaempferol and products formed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1270-1277, 2003.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A Rapid TLC Bioautographic Method for the Detection of Acetylcholinesterase and Butyrylcholinesterase Inhibitors in Plants. **Phytochemical Analysis**, v. 23, p. 51 – 54, 2002.

MARTINS, M.T.; SANCHEZ P.S.; SATO M.I.Z.; COELHO, M.C.L. Genotoxicity Assessment Through the Ames Test of Medicinal Plants commonly Used in Brazil. **Environmental Toxicology and Water Quality**: an international journal, v. 9, p.87-93, 1994.

MASCOLO, N.; PINTO, A.; CAPASSO, F. Flavonoids, leucocyte migration and eicosanoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, p. 293–295, 1988.

MENEZES, P.R.; SCHWARZ, E.A.; SANTOS, C.A.M. In vitro antioxidant activity of species collected in Paraná. **Fitoterapia**, v. 75, p. 398-400, 2004.

MENSOR, L. MENEZES, F. LEITÃO, G. REIS, A. SANTOS, T. COUBE, C. LEITÃO, S. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by Use of DPPH Free Radical Method, **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

MEYRE-SILVA, C.; YUNES, R.; MONACHE, F.; SANTOS, A.; SCHMELING, L.; GADOTTI, V.; LIZ, F.; CECHINEL, V. Phytochemical and Pharmacological Análisis of *Bauhinia microstachya* (Raddi) Macbr. (Leguminosae). **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 56, p. 939 – 942, 2001.

MIYAKE, E.T.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. Pharmacognostic characterization of pata-de-vaca *Bauhinia forficata*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.1, p.58-68, 1986.

MONTSERRAT, D.; ESTRELLA, I.; HERNÁNDEZ, T.; Occurrence of phenolic compounds in the seed coat and the cotyledon of peas (*Pisum sativum* L.). **European Food Research and Technology**, n. 219, p. 116-123, 2004.

MORONEY, M-A.; ALCARAZ, M. J.; FORDER, R.A.; CAREY, F.; HOULT, J.R.S. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by na anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 40, p. 787-792, 1988.

NANJO, F.; GOTO, K.; SETO, R.; SUZUKI, M.; SAKAI, M.; HARA, Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. **Free Radical Biology Medicine**, v.21, p. 895-902, 1996.

NETO, J.C.; FERREIRA, A.C.F.; KUSTER R.M.; AMORIN, M.B.; CARVALHO, D.P. **Inibição da Peroxidase Tireóidea pelo Extrato de Pata-de-vaca e de Pedra Hume Kaá**. Rio de Janeiro: Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho e Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, UFRJ, 2003. Disponível em: <<http://tiroides2000.org/p121.htm>> Acesso em 27 jul. 2003.

NUDELMAN, N. S. **Estabilidad de Medicamentos**. Buenos Aires: El Ateneo, 1976. 187 p.

OLIVEIRA, C.; MAIORANO, V.; MARCUSSI, S.; SANT'ANA, C.; JANUÁRIO, A.; LOURENÇO, M.; SAMPAIO, S.; FRANÇA, S.; PEREIRA, P.; SOARES, A. Anticoagulant and antifibrinogenolytic properties of aqueous extract from *Bauhinia forficata* against snake venoms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 213-216, 2005.

OLIVEIRA, F.; KATO, E. T. M.; RODRIGUES; R. F.; BASSO, S. L. Mitos e Verdades sobre Pata-de-vaca – *Bauhinia forficata* LINK – Uma Revisão. **Revista Lecta**, v. 19 p. 07-20, 2001.

PANDA, S.; KAR, A. *Withania somnifera* and *Bauhinia purpurea* in the regulation of circulating thyroid hormone concentrations in female mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 233-239, 1999.

PAVEI, C. **Desenvolvimento de métodos analíticos e tecnológicos aplicados à fração saponosídica presente nos frutos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hil.** Porto Alegre: Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFRGS, 2004. Dissertação de Mestrado.

PELZER, L.E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, A.O.; GUERREIRO, E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. **Il Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PEPATO, M.T.; KELLER, E.H.; BAVIERA, A.M.; KETTELHUT I.C.; VENDRAMINI, R.C.; BRUNETTI, I.L. Anti-diabetic activity of *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p.191-197, 2002.

PETRY, R.D. **Desenvolvimento e validação de métodos de doseamento de flavonóides de *Passiflora edulis* Sims. (maracujá)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1999. Dissertação de Mestrado.

PIO CORREA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional IBDF, 1984. v.5.

PIZZOLATTI, M.G.; CUNHA, A.J.; SZPOGANICZ, B.; SOUSA, E. Flavonóides glicosilados das folhas e flores de *Bauhinia forficata* (LEGUMINOSAE). **Química Nova**, v.26, n. 4, p. 466-469, 2003.

RAJKAPOOR, B.; JAYAKAR, B.; MURUGESH, N. Antitumor activity of *Bauhinia variegata* on Dalton's ascitic lymphoma. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 89, p. 107-109, 2003.

RAPTA, P.; MISIK, V.; VRÁBEL, I. Redox intermediates of flavonoids and caffeic acid esters from propolis: an EPR spectroscopy and cyclic voltammetry study. **Free Radical Biology Medicine**, v. 18, p.901-908, 1995.

RATTY, A.K.; SUNAMOTO, J.; DAS, N.P. Interaction of flavonols with 1,1 – diphenyl – picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 989 – 995, 1988.

RECIO, C.; GINER, R.M.; MANEZ, S.; TALENS, A.; RIOS, J.L. Antiinflammatory activity of flavonol glycosides from *Erythrospermum montocolum* depending on single or repeated local TPA administration. **Planta Medica**, v.61, n.6, p. 502-504, 1995.

REIS, M.S.; MARIOT, A. Diversidade e Domesticação de Plantas Medicinais. In: SIMÕES, *et al* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. cap. 3, p. 45 -74.

RUSSO, E.M.K.; REICHEL, A.A.J.; DE-SÁ, J.R.; FURLANETTO, R.P.; MOISÉS, R.C.S.; KASAMATSU, T.S.; CHACRA, A.R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. **Brazilian Journal of Medicine and Biology Research**, v.23, p.11-20, 1990.

SALATINO, A.; BLATT, C.T.T.; DOS SANTOS, D.Y.A.C.; VAZ, A.M.S.F. Foliar flavonoids of nine species of *Bauhinia*. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 22, n. 1, p.17-20, 1999.

SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Anti-inflammatory activity and sub-acute toxicity of artemetin. **Planta Medica**, v.56, p. 36-40, 1990.

SHAPOVAL, E.S.S. **Influências neuro-endócrinas no desenvolvimento de reações inflamatórias agudas no rato**. Faculdade de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo / USP, 1974. Tese de Doutorado.

SHARP, J. **Quality in the manufacture of medicines and other health products**. London: Pharmaceutical Press, 2000. cap. 17, p.309-321.

SILVA, F. R.; SZPOGANICZ B.; PIZZOLATTI, M.G.; WILLRICH, M.A.V.; DE SOUZA, E. Acute effect of *Bauhinia forficata* on serum glucose levels in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p.33-37, 2002.

SILVA, K.; BIAVATTI, M.W.; LEITE, S.N.; YUNES, R.A.; MONACHE, F.D.; CECHINEL, V. Phytochemical and Pharmacognostic investigation of *Bauhinia forficata* Link (Leguminosae). **Zeitschrift fur Naturforschung**, v. 55c, p. 478-480, 2000.

SILVA, K.; CECHINEL, V., Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.; PETROVICK, P.; BASSANI, V. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos In: SIMÕES, *et al* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. 1102 p.

SOSA, S.; BRACA, A.; ALTINIER, G.; DELLA LOGGIA, R.; MORELLI, I.; TUBARO, A.; Topical anti-inflammatory activity of *Bauhinia tarapotensis* leaves. **Phytomedicine**, v. 9, p. 646-653, 2002.

SOUSA, E.; ZANATTA, L.; SEIFRIZ, I.; PASA, T.B.; PIZZOLATTI, M.G.; SZPOGANICZ, B.; SILVA, F.R. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol – 3,7- O – α – dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 829-832, 2004.

SREEJANYAN, N.; RAO, M.N. Free radical scavenging activity of curcuminoids. **Arzneimittelforschung**, v. 46, p. 169-171, 1996.

SUYENAGA, E.S. **Avaliação da atividade antiinflamatória de flavonóides por ensaios *in vivo* e *in vitro***. Porto Alegre: Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul / UFRGS, 2002. p. 79-81. Tese (Doutorado).

SWARTZ, M.E.; KRULL, I.S. **Analytical Method Development and Validation**. New York: Marcel Dekker, 1997.

TAKAO, T.; KITATANI, F.; WATANABE, N.; YAGI, A.; SAKATA, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 58, p. 1780-1783, 1994.

TOUVAY, C.; VILAIN, B.; ETIENNE, A.; SIROIS, P.; BORGEAT, P.; BRAQUET, P. Characterization of platelet activating factor (PAF)-acether-induced contractions of guinea pig lung strips by selected inhibitors of arachidonic acid metabolism and by PAF-acether antagonists. **Immunopharmacology**, v. 12, p. 97-104, 1986.

TREVISAN, M.; MACEDO, F. Seleção de plantas com atividade anticolinesterásica para tratamento da Doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, p. 301 – 304, 2003.

TSENG, T.H.; KAO, E.S.; CHU, C.Y.; CHOU, F.P.; LIN WU, H.W.; WANG, C.J. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food Chemistry Toxicology**, v.35, p.1159-1164, 1997.

USP. The United States Pharmacopeia. NF 23. 28 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 2005. 3187p.

VIANA, E.P.; SANTA-ROSA, R.S.; ALMEIDA, S.S.M.S.; SANTOS, L.S. Constituents of the stem bark of *Bauhinia guianensis*. **Fitoterapia**, v. 70, p.111-112, 1998.

WILHELM FILHO, D.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides Antioxidantes de plantas Medicinais e Alimentos: Importância e perspectivas terapêuticas. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais**: sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001. 500 p.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carragenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**; v. 111, p. 244-247, 1962.

WHO. Stability testing of pharmaceutical products containing well established drug substances in conventional dosage forms. **World Health Organization**: Technical Report Series. n. 863, annex 5, 1996. Disponível em: <www.who.gov> Acesso em 21/07/2004.

YADAVA, R.N.; REDDY, V.M.S. Anti-inflammatory activity of a novel flavonol glycoside from the *Bauhinia variegata* Linn. **Natural Product Research**, v. 17, n. 3, p. 165-169, 2003.

YOKOZAWA, T.; DONG, E.; WU LIU, Z.; SHIMIDZU, M. Antioxidant activity of flavones and flavonols *in vitro*. **Phytotherapy Research**, v.11, p.446-449, 1997.

ZUANAZZI, J. A. e MONTANHA, J. A. Flavonóides. In: SIMÕES, *et al* (org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Ed. da UFSC, 2003. 1102 p.

ANEXO 1: Espectro de massas de SQM, eletrospray negativo.

Os experimentos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foram realizados nos laboratórios listados abaixo, com suas respectivas informações complementares:

1. Instituto de Química da Universidade de Santa Maria, sob a responsabilidade do Professor Ademir Morel
 - Equipamento: BRUKER (^1H - 400 MHz e ^{13}C – 100 MHz)
 - Solventes: CD_3OD e DMSO-d_6
2. Departament de Productes Naturals, Biologia Vegetal i Edafologia, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Barcelona, sob a responsabilidade do Professor Jaume Bastida
 - Equipamento: VARIAN (^1H - 200 MHz e ^{13}C – 50 MHz)
 - Solventes: CD_3OD e DMSO-d_6

Condições Gerais:

- Temperatura ambiente;
- Solventes deuterados;
- Tetra-metil-silano (TMS), como referência.

ANEXO 2: Informações complementares sobre o RMN.

ANEXO 3: Resolução do Comitê de Ética e Pesquisa da UFRGS.