

**JESSÉ BOQUETT LAGOS**

**ESTUDO COMPARATIVO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS E CASCAS  
DA *Trichilia catigua* A. JUSS., MELIACEAE**

Dissertação apresentada como requisito parcial à  
obtenção do grau de Mestre em Ciências  
Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da  
Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel

CURITIBA

2006

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná.

Ao Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel pela paciência, confiança e ensinamentos dedicados muitas vezes à distância.

Ao Laboratório Catarinense, em especial ao Carlos Eduardo de Carvalho e a Andréa Birckholz Lobo, por tornarem possível a realização deste estudo, e a todos os demais amigos desta.

Ao João Luiz de Souza Carvalho pela amizade e treinamento desde o início da minha carreira profissional.

À Professora Dra. Márcia do Rocio Duarte pelos ensinamentos e disponibilidade para a realização do estudo anatômico da droga vegetal.

Aos demais Professores do Curso de Pós Graduação.

Aos meus pais e irmãs pelo constante amor e suporte incomensuráveis.

À Carolina pelo amor, companhia e ajuda durante todos esses anos.

Aos colegas do Curso de Pós Graduação.

À Janice Valmórbida pela ajuda na coleta do material vegetal.

Ao Nilson, do Departamento de Botânica pela ajuda na confecção das lâminas permanentes.

À Regina, secretária do Curso de Pós Graduação pela ajuda constante.

À todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

À Deus por nos proporcionar o convívio com esta natureza maravilhosa.

## RESUMO

A *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae é uma espécie arbórea nativa do Brasil comumente conhecida como catuaba. Suas cascas são utilizadas na medicina popular como tônico físico e mental e como estimulante sexual. Apesar da sua crescente utilização pelas indústrias farmacêuticas e de alimentos existem poucas publicações sobre a composição química das suas cascas e nenhuma sobre suas folhas. Tendo em vista a falta de estudos que determinem parâmetros para o controle da qualidade dessa espécie, foram realizados estudos botânicos e químicos das cascas e folhas da planta através de técnicas cromatográficas. Os estudos botânicos realizados possibilitaram a caracterização anatômica das cascas e folhas da espécie *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae. Foi identificada a presença dos compostos fenólicos ácido clorogênico, catequina e epi-catequina nas cascas e folhas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foi identificada a presença dos esteróides beta sitosterol e estigmasterol nas cascas e folhas por cromatografia gasosa (CG). Os métodos cromatográficos para a quantificação de ácido clorogênico por CLAE e beta sitosterol por CG foram validados. Foram estudados os métodos extrativos de maceração, sonicação, turbólise, refluxo e soxhlet com etanol 50 % e 96 %. Dentre estes, a turbólise com etanol 50 % foi mais eficiente para a extração de ácido clorogênico e a extração por soxhlet com etanol 50 % foi mais eficiente para a extração de beta sitosterol. O ácido clorogênico está presente em maior concentração nas cascas (2046 µg/g) do que nas folhas (1702 µg/g). Já o beta sitosterol está presente em maior quantidade nas folhas (777 µg/g) do que nas cascas (396 µg/g). As metodologias analíticas desenvolvidas neste estudo demonstraram eficiência, segurança e reprodutibilidade, caracterizando-se como propostas viáveis para rotinas de controle da qualidade da espécie.

**PALAVRAS CHAVE:** *Trichilia catigua*, catuaba, ácido clorogênico, beta sitosterol, fitoquímica.

## ABSTRACT

*Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae is a native tree widely distributed in Brazil commonly known as "catuaba". Its bark has been used in popular medicine as physical and mental tonic and as a sexual stimulant. Despite of its increasing use by the pharmaceutical and food industries there is a lack of publications concerning the chemical composition of its bark and none about the leaves. Because of the lack of studies that determine parameters for the quality control of this species, the phytochemical constitution of the bark and leaves of the plant was investigated through chromatographic techniques. The accomplished botanical studies made possible the anatomical characterization of the bark and leaves of the species. It was identified by HPLC the presence of chlorogenic acid, catechin and epi-catechin in the bark and leaves. It was identified by GC the presence of the steroids beta sitosterol and stigmasterol in the bark and leaves. The chromatographic methods for the quantification of chlorogenic acid by HPLC and beta sitosterol by GC were validated. The extractive methods of maceration, sonication, turbolysis, reflux and soxhlet with 50% and 96% ethanol were evaluated. Among these, the turbolysis with 50% ethanol was more efficient for the extraction of chlorogenic acid and the soxhlet extraction with 50% ethanol was more efficient for the extraction of beta sitosterol. The chlorogenic acid is present in larger concentration in the bark (2046 µg/g) than in the leaves (1702 µg/g). The beta sitosterol is present in larger amount in the leaves (777 µg/g) than in the peels (396 µg/g). The analytical methodologies developed in this study demonstrated efficiency, safety and reproducibility, being characterized as viable proposals for routines for the quality control of the species.

KEY WORDS: *Trichilia catigua*, catuaba, chlorogenic acid, beta sitosterol, phytochemistry.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>3</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>4</b>
3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS.....	4
3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	7
3.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS.....	10
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
4.1 ANÁLISES DA DROGA.....	12
4.1.1 Coleta e Identificação.....	12
4.1.2 Secagem e Moagem.....	12
4.1.3 Determinação Granulométrica.....	13
4.1.4 Ensaio de Pureza.....	13
4.1.4.1 Cinzas totais.....	13
4.1.4.2 Cinzas insolúveis em HCl.....	14
4.1.4.2 Perda por dessecação.....	15
4.1.5 Determinação do Perfil Fitoquímico Preliminar.....	15
4.1.5.1 Preparo dos extratos para o perfil fitoquímico preliminar.....	15
4.1.5.1.1 Ensaio com o extrato aquoso.....	16
4.1.5.1.2 Ensaio com o extrato hidroalcoólico.....	17
4.1.6 Estudo Anatômico.....	18
4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	19
4.2.1 Preparo dos Extratos Brutos.....	19
4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	19
4.2.3 Cromatografia Gasosa.....	22
4.2.4 Cromatografia em Camada Delgada.....	24
4.2.5 Validação analítica.....	25
4.2.5.1 Validação analítica do doseamento do ácido clorogênico por CLAE....	25
4.2.5.1.1 Linearidade.....	25
4.2.5.1.2 Exatidão.....	26
4.2.5.1.3 Especificidade.....	27

4.2.5.1.4	Precisão por repetibilidade.....	28
4.2.5.1.5	Precisão intermediária.....	28
4.2.5.1.5	Robustez.....	28
4.2.5.1.6	Intervalo.....	29
4.2.5.2	Validação analítica do doseamento do beta sitosterol por CG.....	29
4.2.5.2.1	Linearidade.....	29
4.2.5.2.2	Exatidão.....	30
4.2.5.2.3	Especificidade.....	31
4.2.5.2.4	Precisão por repetibilidade.....	32
4.2.5.2.5	Precisão intermediária.....	32
4.2.5.2.5	Robustez.....	32
4.2.5.2.6	Intervalo.....	33
4.3	ANÁLISES DE EFICIÊNCIA EXTRATIVA.....	33
4.3.1	Extração por Maceração.....	33
4.3.2	Extração por Sonicação.....	34
4.3.3	Extração por Turbólise.....	35
4.3.4	Extração por Refluxo.....	36
4.3.5	Extração por Soxhlet.....	37
4.4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>38</b>
5.1	ANÁLISES DA DROGA.....	38
5.1.1	Ensaio de Pureza.....	38
5.1.2	Perfil Fitoquímico Preliminar.....	40
5.1.3	Anatomia Botânica.....	41
5.1.3.1	Folhas.....	41
5.1.3.2	Cascas.....	42
5.2	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	46
5.2.1	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.....	47
5.2.2	Cromatografia Gasosa.....	63
5.2.3	Cromatografia em Camada Delgada.....	70
5.2.4	Validação dos Métodos Analíticos Quantitativos.....	72
5.2.4.1	Validação do método de doseamento de ácido clorogênico por CLAE.....	73
5.2.4.1.1	Linearidade.....	73
5.2.4.1.2	Exatidão.....	74

5.2.4.1.3 Especificidade.....	75
5.2.4.1.4 Precisão por repetibilidade.....	80
5.2.4.1.5 Precisão intermediária.....	81
5.2.4.1.6 Intervalo.....	82
5.2.4.1.7 Robustez.....	82
5.2.4.2 Validação do método de doseamento de beta sitosterol por CG.....	84
5.2.4.2.1 Linearidade.....	84
5.2.4.2.2 Exatidão.....	85
5.2.4.2.3 Especificidade.....	86
5.2.4.2.4 Precisão por Repetibilidade.....	88
5.2.4.2.5 Precisão Intermediária.....	89
5.2.4.2.6 Intervalo.....	90
5.2.4.2.7 Robustez.....	90
5.3 ANÁLISES DE EFICIÊNCIA EXTRATIVA.....	91
5.3.1 Quantificação do ácido clorogênico.....	91
5.3.2 Quantificação do beta sitosterol.....	96
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>97</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>99</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1	ASPECTOS DAS FOLHAS E CASCAS SECAS ANTES DA MOAGEM.....	13
FIGURA 2	PREPARO DOS EXTRATOS POR MACERAÇÃO.....	34
FIGURA 3	PREPARO DOS EXTRATOS POR SONICAÇÃO.....	34
FIGURA 4	PREPARO DOS EXTRATOS POR TURBÓLISE.....	35
FIGURA 5	PREPARO DOS EXTRATOS POR REFLUXO.....	36
FIGURA 6	PREPARO DOS EXTRATOS POR SOXHLET.....	37
FIGURA 7	VISTA FRONTAL DA FACE EPIDÉRMICA ABAXIAL .....	44
FIGURA 8	VISTA FRONTAL DA FACE EPIDÉRMICA ADAXIAL.....	44
FIGURA 9	VISTA TRANSVERSAL DO MESOFILO DORSIVENTRAL.....	44
FIGURA 10	VISTA TRANSVERSAL DA NERVURA CENTRAL.....	44
FIGURA 11	VISTA TRANSVERSAL DA CASCA.....	45
FIGURA 12	VISTA TRANSVERSAL DA CASCA.....	45
FIGURA 13	VISTA LONGITUDINAL DA CASCA.....	45
FIGURA 14	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DOS PADRÕES DE FENÓLICOS NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	49
FIGURA 15	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO GÁLICO.....	50
FIGURA 16	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA CATEQUINA.....	50
FIGURA 17	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	50
FIGURA 18	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CAFEICO.....	51
FIGURA 19	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA EPI-CATEQUINA.....	51
FIGURA 20	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA CUMARINA.....	51
FIGURA 21	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO P-CUMÁRICO.....	52
FIGURA 22	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO FERULICO.....	52
FIGURA 23	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA RUTINA... ..	52
FIGURA 24	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	53
FIGURA 25	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	54

FIGURA 26	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	55
FIGURA 27	ESPECTRO UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA CATEQUINA APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	55
FIGURA 28	ESPECTRO UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	56
FIGURA 29	ESPECTRO UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA EPI CATEQUINA APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	56
FIGURA 30	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	57
FIGURA 31	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA CATEQUINA APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	57
FIGURA 32	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	58
FIGURA 33	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA EPI CATEQUINA APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	58
FIGURA 34	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE....	61
FIGURA 35	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO NO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	61
FIGURA 36	ESPECTROGRAMA E (A) CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE....	62
FIGURA 37	ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	62
FIGURA 38	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ESTERÓIDES E TRITERPENOS DO MÉTODO QUALITATIVO DA CG.....	65
FIGURA 39	CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DO MÉTODO QUALITATIVO DA CG.....	66
FIGURA 40	CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DO MÉTODO QUALITATIVO DA CG.....	66

FIGURA 41	CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CG.....	67
FIGURA 42	CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CG.....	67
FIGURA 43	CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ESTERÓIDES E TRITERPENOS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.....	69
FIGURA 44	CROMATOGRAMA EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.....	69
FIGURA 45	CROMATOGRAMA EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.....	69
FIGURA 46	PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD PARA VISUALIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	71
FIGURA 47	PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD PARA VISUALIZAÇÃO DE ESTERÓIDES.....	72
FIGURA 48	CURVA DE LINEARIDADE DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	73
FIGURA 49	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO PLACEBO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	76
FIGURA 50	ESPECTROGRAMA E CROMATOGRAMA DO PLACEBO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	76
FIGURA 51	ESPECTROGRAMA E CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	77
FIGURA 52	ANÁLISE DE PUREZA (A) E ESPECTRO DE UV (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO DO CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	77
FIGURA 53	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE	78
FIGURA 54	ANÁLISE DE PUREZA (A) E ESPECTRO DE UV (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO DO CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	78
FIGURA 55	ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	79
FIGURA 56	ANÁLISE DE PUREZA E ESPECTRO UV DO ÁCIDO CLOROGÊNICO DO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE .....	79
FIGURA 57	CURVA DE LINEARIDADE DO BETA SITOSTEROL.....	84
FIGURA 58	CROMATOGRAMA DO PLACEBO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.....	86
FIGURA 59	CROMATOGRAMA DO PLACEBO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.....	86

FIGURA 60	CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.....	87
FIGURA 61	CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.....	87
FIGURA 62	CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE BETA SITOSTEROL NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.....	87
FIGURA 63	TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO DOS MÉTODOS EXTRATIVOS REALIZADOS.....	93
FIGURA 64	TEORES DE BETA SITOSTEROL DOS MÉTODOS EXTRATIVOS REALIZADOS.....	95

## ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1	PROGRAMAÇÃO DA MUFLA PARA A ANÁLISE DE CINZAS.....	14
TABELA 2	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DAS FASES MÓVEIS DO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE.....	20
TABELA 3	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DAS FASES MÓVEIS DO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE.....	21
TABELA 4	DADOS PARA O PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	26
TABELA 5	PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLACEBO FORTALECIDO PARA O TESTE DE EXATIDÃO.....	27
TABELA 6	DADOS PARA O PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.....	30
TABELA 7	PREPARO DAS AMOSTRAS FORTALECIDAS PARA O TESTE DE EXATIDÃO.....	31
TABELA 8	TEOR DE CINZAS TOTAIS E INSOLÚVEIS EM HCl DAS CASCAS DA CATUABA.....	38
TABELA 9	TEOR DE CINZAS TOTAIS E INSOLÚVEIS EM HCl DAS FOLHAS DA CATUABA.....	39
TABELA 10	PERDA POR DESSECAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL SECO.....	39
TABELA 11	RESULTADO DO PERFIL FITOQUÍMICO PARA OS EXTRATOS AQUOSOS DAS DROGAS.....	40
TABELA 12	RESULTADO DO PERFIL FITOQUÍMICO PARA O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS DROGAS.....	40
TABELA 13	RETENÇÃO RELATIVA DOS PADRÕES DE ESTERÓIDES E TRITERPENOS NO MÉTODO QUALITATIVO DA CG.....	65
TABELA 14	RESULTADO DO TESTE DE EXATIDÃO PARA O ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	74
TABELA 15	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	80
TABELA 16	AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	80
TABELA 17	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	81
TABELA 18	AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	82
TABELA 19	RESULTADO DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	83
TABELA 20	AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO ÁCIDO CLOROGÊNICO.....	83
TABELA 21	RESULTADO DO TESTE DE EXATIDÃO PARA O BETA SITOSTEROL.....	85

TABELA 22	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO BETA SITOSTEROL.....	88
TABELA 23	AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO BETA SITOSTEROL...	88
TABELA 24	RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO BETA SITOSTEROL.....	89
TABELA 25	AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO BETA SITOSTEROL.....	89
TABELA 26	RESULTADO DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO BETA SITOSTEROL.....	90
TABELA 27	AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO BETA SITOSTEROL.....	91
TABELA 28	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEOR DE ÁCIDO CLOROGÊNICO DOS MÉTODOS EXTRATIVOS REALIZADOS.....	94
TABELA 29	ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEOR DE BETA SITOSTEROL DOS MÉTODOS EXTRATIVOS REALIZADOS.....	96

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CV	Coefficiente de Variação
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DIC	Detector de Ionização de Chamas
DP	Desvio Padrão da Média
EM	Espectrômetro de Massas
EtOH	Etanol
fig	Figura
figs	Figuras
g	Gramas
°C	Grau Celsius
IC	Intervalo de Confiança
kPa	Kilo Pascal
µg	Micrograma
µL	Microlitro
m	massa
M	molar
min	minuto
mm	milímetro
nm	Nanômetro
N	Normal
p.	Página
p	Peso
pa	Para Análise
pH	Potencial de Hidrogênio
UV	Ultravioleta
RE	Resolução
Rf	Mobilidade Relativa ao Fronte
RNM	Ressonância Nuclear Magnética
rpm	Rotações por minuto
r <sup>2</sup>	Coefficiente de Correlação

Vis

v

Visível

volume

## 1 INTRODUÇÃO

Cerca de 25 % dos fármacos disponíveis para a terapêutica atualmente são derivados de produtos naturais, especialmente de plantas superiores. Apesar disso, nas últimas décadas, devido principalmente ao avanço da química combinatória, estudos em produtos naturais pela indústria farmacêutica experimentou um leve declínio. Entretanto as atuais pesquisas nas companhias farmacêuticas demonstraram que para doenças complexas, os produtos naturais ainda representam uma fonte valiosa para a produção de novos compostos químicos, já que eles possuem estruturas privilegiadas selecionadas pelos mecanismos evolucionários em um período de milhões de anos (CALIXTO, 2005).

A maior parte da biodiversidade mundial está presente nos países da América Latina. O Brasil possui cerca de 20 % de todas as plantas e microorganismos existentes no planeta. Em decorrência da exploração descontrolada, uma grande parte desta biodiversidade está sendo reduzida ano a ano (CALIXTO, 2005).

Dentre as várias espécies nativas, a Catuaba - *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae é uma espécie bioativa muito requisitada como matéria-prima industrial e de exportação. Não obstante, poucos estudos têm sido publicados sobre a espécie, especialmente quando se tratam de marcadores químicos, em identidade e concentração adequadas para rotinas de controle da qualidade. A utilização tradicional desta espécie preconiza o uso das cascas da planta. Este fato pode levar a espécie à extinção se não foram tomadas ações para o cultivo e manejo racional das árvores.

O conhecimento da composição química da planta pode contribuir positivamente no controle da qualidade de fitoterápicos, pois somente com estas informações pode-se avaliar tecnicamente desde o início do processo, na elaboração do extrato vegetal, até a obtenção do produto final. Deve ser priorizado o desenvolvimento de análises rápidas, de baixo custo e alta especificidade para a garantia de segurança e eficácia do medicamento.

A legislação vigente que trata do registro de medicamentos fitoterápicos a

Resolução - RDC 48 de 16 de março de 2004, entre várias exigências, determinou a obrigatoriedade da análise de marcadores e/ou princípios ativos para o controle da qualidade dos produtos e suas respectivas matérias primas vegetais. Essa resolução privilegia as plantas importadas, tendo-se em vista a quantidade de estudos já realizados nos países de primeiro mundo, em detrimento a enorme biodiversidade da flora brasileira, onde ainda predomina a falta de estudos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Através de técnicas cromatográficas pretende-se investigar a constituição química das cascas e folhas da *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae e comparar os teores dos marcadores químicos identificados entre estas partes da planta.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar análises de controle da qualidade físico-químico das cascas e folhas da planta;
- ✓ Descrever a anatomia botânica das cascas e folhas da espécie;
- ✓ Identificar e selecionar marcadores químicos comuns das cascas e folhas da planta presentes em quantidade satisfatória para sua quantificação;
- ✓ Desenvolver metodologias cromatográficas para quantificação dos marcadores químicos das cascas e folhas da planta por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia gasosa (CG);
- ✓ Validar os métodos cromatográficos quantitativos;
- ✓ Realizar testes extrativos de maceração, turbólise, Soxhlet, ultra-som e refluxo visando a maior obtenção dos marcadores químicos identificados.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS

Rodolfo Albino Dias da Silva, elaborador da primeira edição da Farmacopéia Brasileira, incluiu a monografia das raízes de uma Bignoniaceae, denominada *Anemopaegma arvense* (Vell.) Stellf. conhecida como catuaba, que era amplamente comercializada na região Sul do Brasil, tornando desta forma tal espécie oficial, ou a “catuaba verdadeira”. Com a utilização progressiva das raízes dessa espécie e pelo fato de serem colhidas as partes subterrâneas, o que prejudica a reposição da planta no seu habitat natural, bem como a falta de iniciativa de cultivo, o seu preço de mercado aumentou gradativamente e o seu fornecimento começou a rarear. Assim, houve uma substituição gradual da planta por várias “novas catuabas”, envolvendo mais de dez espécies de diferentes famílias presentes na medicina popular de várias regiões do país, dentre as quais destacaram-se as cascas de *Erythroxylum catuaba* A. J. Silva, Erythroxylaceae (MARQUES, 1998). No entanto confirmou-se que a espécie *Erythroxylum catuaba* não existe, apesar da tese de doutoramento de A. J. da Silva, que em 1906 identificou botanicamente a espécie fornecedora das cascas de uso popular como tal. Avaliações posteriores demonstraram que a figura constante na tese como documento original apresenta as características da família Meliaceae, levando a crer não se tratar de uma Erythroxylaceae. Tal erro comum na botânica caracteriza o chamado “nomem nudum”, isto é, um nome botânico errado que não corresponde à respectiva espécie vegetal real. Mais tarde o material que é mais utilizado no mercado foi avaliado pela taxonomista Doutora Inez Cordeiro, do Instituto Botânico de São Paulo, e identificado como *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae (MARQUES, 1998).

A família Meliaceae é composta por 51 gêneros com aproximadamente 1400 espécies em grande parte pantropicais, sendo poucas as subtropicais e as de regiões temperadas. Diversas espécies da família Meliaceae destacam-se por

apresentarem grande potencial de utilização, tanto no fornecimento de madeiras, como de óleos essenciais (MOSQUETA, 1995).

Várias espécies da família Meliaceae têm merecido a atenção de pesquisadores que buscam a identificação de diversos compostos químicos, principalmente dos limonóides, geralmente relacionados direta e indiretamente a uma aplicação econômica ou medicinal. Segundo CHAMPAGNE et al. (1992), os limonóides são metabólicos secundários, triterpenos modificados, característicos da ordem Rutales e a maioria das pesquisas realizadas para identificar sua ação, têm sido motivadas pelo interesse de encontrar compostos que possam ser usados para aplicações específicas na agricultura e na medicina. Segundo CORTEZ (1993), os limonóides recebem especial atenção por serem considerados os principais marcadores quimiosistemáticos da família Meliaceae.

A *Trichilia catigua* é popularmente conhecida como catuaba, catiguá, cataguá, angelim-rosa, mangalto-catinga (KLEIN, 1984).

A catuaba é uma árvore de 3 a 5 m de altura no sul do Brasil. Possui ramos jovens curtos e eretamente pubescentes até densamente seríceos, cedo tornando-se glabros até marrons, lenticelados. As folhas são compostas, imparipinadas ou pinadas com um folíolo do último par orientado no sentido de simular um folíolo terminal, pecíolo semicilíndrico, ráquis mais ou menos cilíndrica, vilosa até subglabra. Folíolos são alternos até opostos, oblanceolados, elípticos ou oblongos raramente lanceolados, ápice ordinariamente atenuado muitas vezes com a ponta um pouco emarginada, menos freqüentemente acuminada ou obtusamente cuspidada, base quase sempre assimétrica, um lado agudo ou atenuado ou outro agudo até arredondado, obtuso ou truncado, raramente ambos os lados agudos, mais ou menos cartáceos, os pares inferiores muitas vezes menores; venação eucamptódroma, nervura central quase sempre saliente, raramente plana; nervura secundárias em cada lado da nervura central, ascendentes, ordinariamente mais ou menos retas e mais ou menos paralelas, menos freqüentemente ligeiramente convergentes; intersecundárias obscuras ou ausentes. Flores são unissexuais, plantas dióicas; Inflorescência é axilar ou diversas reunidas em cachos num curto rebento axilar, desde um pequeno fascículo até um delgado tirso piramidal, pubescente ou pubérulo. Cálice é geralmente pateliforme, raramente rotado ou

ciatiforme. Possuía 4 a 5 pétalas, concrecidas até 3/4 do seu comprimento, eretas ou ligeiramente patentes, valvadas, ovadas até lanceoladas, ápice agudo, miudamente apresso-pubérulos na parte externa, glabros por dentro. Tubo estaminal urceolado até curtamente cilíndrico; filetes completamente concrecidos, parte externa glabra ou raramente com esparsos pêlos crespos ao redor do ápice, por dentro com pêlos longos esparsos até densos. Anteras glabras, estaminódios com anteras delgadas, indeiscentes, sem pólen. Nectário ausente. Ovário ovóide, 3-ocular, lóculos com 2 óvulos colaterais; estilete quase sempre glabro; estigma capitado ou tenuemente discóide, às vezes apiculado, igualando ou debaixo das anteras; pistilódio mais ou menos cônico contendo óvulos não funcionais bem formados. Cápsula estreitamente ovóide ou oblonga, lisa, apresso-pubescente até densamente serícea, 3-valvada;. Sementes 1-2, colaterais em cada fruto, obovóides, completamente envolvidas por um arilóide fino, carnoso, que também se envolve ao redor dos óvulos abortados; tegumento da semente membranáceo. Embrião com cotilédones colaterais plano-convexos; radícula apical, inclusa. Endosperma ausente (KLEIN, 1984).

Macroscopicamente as cascas da *Trichilia catigua* têm forma plana a levemente encurvada. A superfície externa é acinzentada, variando de tons claros a escuros, com aspecto grosseiramente granuloso; ocorre a presença de lenticelas circulares pequenas e fendas longitudinais curtas e superficiais; a superfície externa é avermelhada, com fibras finamente estriadas no sentido longitudinal; a fratura é externamente granulosa e internamente fibrosa, o odor não é característico e o sabor é fortemente amargo (MARQUES, 1998).

Aspectos morfológicos e estruturais das flores de *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw., Meliaceae foram descritas por SOUZA et al (2001). A antese ocorreu de abril a agosto na *Trichilia catigua*. Sépalas e pétalas apresentaram epiderme papilosa e pilosa e um mesofilo parenquimático. Flores masculinas apresentaram pistilos com óvulos abortivos e um tubo estaminal com anteras tetrasporangiáceas. A parede da antera possui uma epiderme papilosa e um endotécio fibroso.

As plântulas e tirodendros de *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw., Meliaceae foram estudados morfológica e anatomicamente por

MOURÃO et al (2002). Os autores determinaram que as plântulas de *T. catigua* são fanerocotiledonares, os cotilédones são espessos, com epiderme glabra e o mesofilo é parenquimático. A raiz é axial e tetraarca. O primeiro eofilo é simples e varia em espessura entre as espécies. O metafilo é composto. O eofilo e o metafilo não diferem significativamente e estruturalmente entre si caracterizando-se como dorsiventrais, hipoestomáticos e de venação tipo broquidódroma.

A distribuição geográfica de ocorrência da *T. catigua* no estado do Paraná compreende uma região vasta, mas bem definida. Esta faixa localiza-se acima da latitude 25° nas regiões central e leste e acima da latitude 26° no sudoeste do Paraná. A caracterização dos ambientes associados demonstrou que a espécie ocorre em solos férteis, ricos em matéria orgânica e protegida pela floresta (CORREA JUNIOR & MING 2000).

Já no estado de Santa Catarina a *T. catigua* ocorre predominantemente em floresta semidecidual estacional, além de na transição das florestas de Araucária e Atlântica. Ocorre em solos férteis e ricos em matéria orgânica. A formação geomorfológica predominante é basáltica e os tipos predominantes de solos variam de latossolo vermelho até latossolo vermelho-amarelado além de cambissolo de origem basáltica e granítica (MING & CORREA JUNIOR 2000).

### 3.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

Uma mistura de duas flavalignananas epiméricas (cinchonainas 1b e 2b) foi isolada da fração extraída com acetato de etila das cascas de *T. catigua*. Estas flavalignananas exibiram atividade bactericida contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (PIZZOLATTI et al, 2002).

O estudo de outras espécies de *Trichilia* descreve o isolamento de três novos sesquiterpenóides do extrato metanólico dos galhos de *Trichilia clausenii*: 14-hidroxi-10(14)-en-9,11,15-triol e germacra-3,10(14)-dien-9,11-diol-4-carbaldeído. Também foram isolados os sesquiterpenos  $\beta$ -eudesmol,

criptomeridiol e o triterpeno 22,25-diidroxi-9 $\beta$ ,19-ciclolanost-23-en-3-ona. Do extrato diclorometânico das folhas de *T. lepidota* foram isolados mistura de hidrocarbonetos (C<sub>29</sub>H<sub>60</sub>, C<sub>31</sub>H<sub>64</sub> e C<sub>33</sub>H<sub>68</sub>), mistura dos sesquiterpenos epóxido de cariofileno e epóxido de humuleno, espatulenol e os esteróides 24-metileno-12 $\beta$ -hidroxicolesterol, 24-metil-12 $\beta$ -hidroxicolest-4-en-3-ona, 3-palmitato de 24-metil-12 $\beta$ -hidroxicolest-5-eno, mistura de 24-metilenocolesterol, campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol, além de  $\alpha$ -tocoferol e fitol. O extrato metanólico forneceu a *N*-metil-4-hidroxiprolina. As estruturas das substâncias isoladas foram estabelecidas com base em dados espectroscópicos (PUPO et al, 2002).

Realizou-se a caracterização farmacognóstica das cascas da *T. catigua* de amostras coletadas em Caitié (BA) e Maringá (PR). Os dados obtidos confirmaram a presença dos grupos de flavonóides, antracênicos livres, taninos e saponinas, bem como a ausência de alcalóides, mucilagens, cumarinas e óleos essenciais; a reação de Stiasny confirmou que os taninos presentes são do tipo condensados. Determinou-se que as duas amostras possuem composição parecida, com teor de taninos 10,3 % (PR) e 12,5 % (BA) e teor de saponinas 21,4 % (PR) e 17,4 % (BA) (OLIVEIRA et al, 2003).

Foi desenvolvido um método qualitativo através de CLAE para avaliação de amostras comerciais de cascas de catuaba. Utilizou-se uma tintura hidroetanólica (34:66 %, v/v) da *Trichilia catigua* padrão para a obtenção de um perfil cromatográfico em coluna Hyperisil C<sub>18</sub> (15 x 0,45 cm) com gradiente de eluição Água:Metanol e detecção UV a 232 nm. As análises quimiométricas dos cromatogramas de três amostras comerciais demonstraram que estas se assemelham ao cromatograma usado como impressão digital da *Trichilia catigua* padrão (BELTRAME et al, 2003).

Quatorze amostras comerciais de cascas de catuabas comercializadas como espécies de *Anemopaegma*, *Erythroxylum* e *Trichilia* foram examinadas quanto sua pureza e identidade. Somente uma minoria das amostras de catuaba testada continha a droga descrita nos rótulos. Mais da metade dos produtos estava adulterado com diferentes drogas. A maioria das amostras continha cascas de *Trichilia catigua*. Os perfis por CCD confirmaram a heterogeneidade, em 50 % das amostras alcalóides tropânicos em várias concentrações foram detectados. Foram

desenvolvidos métodos de CCD e CLAE para a separação e identificação dos alcalóides tropânicos. Determinou-se a estrutura dos dois principais alcalóides encontrados, catuabina D e seu derivado hidroximetil. Os extratos aquosos e metanólicos de *Trichilia catigua* e suas frações ricas em alcalóides das amostras comerciais não mostraram nenhuma atividade em teste *in vitro* no corpo cavernoso de coelho (KLETTER et al, 2004).

Gama lactonas de *Trichilia catigua* e seus precursores foram identificados por CG-EM. Análises das frações clorofórmicas do extrato das cascas desta espécie foram realizadas por ressonância nuclear magnética (RNM) e CG acoplado a espectrômetro de massa (EM) e levaram à identificação de três ômega-fenil-ácidos alcanóides, cinco ômega-fenil-gama lactonas, duas alquil-gama lactona, uma alquenil-gama lactona, além de uma mistura de ácidos graxos de C<sub>14</sub> a C<sub>26</sub>. Também foram identificados o beta-sitosterol, estigmasterol e campesterol como álcoois livres (PIZZOLLATTI et al, 2004).

Utilizando a técnica de CLAE-ultravioleta (UV)-EM foi desenvolvido um método para a distinção dos extratos das espécies *Trichilia catigua* e *Anemopaega arvensis*, ambas comercializadas no Brasil como catuaba. O acoplamento CLAE-UV-EM permitiu determinar os íons moleculares das principais bandas cromatográficas da impressão digital (*fingerprint*) das amostras de *Trichilia catigua* e *Anemopaega arvensis*. O método se demonstrou útil para análises de fitoterápicos contendo catuaba, podendo ser empregado no controle da qualidade. A interpretação dos dados permitiu demonstrar que as três amostras testadas são da espécie *Trichilia catigua*, apesar de duas destas serem comercializadas como *Anemopaega arvensis* e *Erithroxylum catuaba* (BELTRAME, 2004).

Um método espectrométrico em UV foi validado para a quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina, para extratos comerciais de *Trichilia catigua* e *Ptycopetalum olacoides*. O método foi validado segundo os seguintes resultados experimentais: coeficiente de correlação, intervalo, exatidão, especificidade à quantificação de flavonóides totais, equivalentes em rutina, ao comprimento de onda 361,0 nm, limite de detecção, limite de quantificação, precisão por repetibilidade, precisão intermediária e exatidão por repetibilidade e intermediária (ROLIM et al, 2005).

### 3.3 ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS

A mobilização do ácido araquidônico (AA) pela enzima fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) e síntese das prostaglandinas subsequentes é considerado um evento primordial no processo inflamatório. Desta forma, drogas que inibem a PLA<sub>2</sub>, bloqueando assim as vias metabólicas das enzimas ciclooxygenases na cascata do AA, podem ser efetivas no tratamento dos processos inflamatórios. Neste sentido, novas estratégias para o tratamento de processos inflamatórios podem ser atingidas na pesquisa de princípios ativos de origem vegetal que controlem a produção dos mediadores lipídicos pela inibição da PLA<sub>2</sub>. Uma vasta investigação exploratória dos efeitos da *Trichilia catigua* demonstrou que a atividade da PLA<sub>2</sub> foi totalmente inibida pelo extrato hidroetanólico das cascas desta planta na concentração de 120 µg/mL sugerindo que esta planta possa produzir substâncias com atividade antiinflamatória (BARBOSA et al, 2004).

Foram investigados os possíveis efeitos anti-depressivos em abordagens *in vivo* em duas espécies de roedores (ratos e camundongos) e também *in vitro*. O extrato hidroetanólico das cascas de *Trichilia catigua* produziu efeitos antidepressivos no teste de nado forçado tanto em ratos quanto em camundongos. A atividade antidepressiva do extrato no modelo anti-imobilizantes foi inibida de forma significativa pelo haloperidol ou clorpromasina, mas não pela pimozida, cetanserina, siproxatrina ou p-clorofenilalanina. *In vitro*, o extrato hidroetanólico de *Trichilia catigua* inibiu de forma dose dependente a recaptação de noradrenalina e e principalmente de serotonina e de dopamina, em preparações sinaptosomais em cérebro de ratos. Este estudo demonstrou a convicta evidência de um efeito antidepressivo mediado por monoaminas e pelos princípios ativos deste extrato em ratos e camundongos empregando-se estudos farmacológicos e bioquímicos. Desta forma, um extrato padronizado de *Trichilia catigua* ou suas substâncias purificadas podem possuir interesse potencial do tratamento de distúrbios depressivos (CAMPOS et al, 2005).

Diversos estudos farmacológicos foram realizados para o esclarecimento das atividades farmacológicas do fitoterápico Catuama®, compreendendo testes com a mistura de seus extratos e também dos extratos de forma individual. A seguir

serão descritas as atividades do extrato da *Trichilia catigua* isoladamente, resgatados destes estudos.

A ação vasodilatadora do extrato hidroetanólico de *Trichilia catigua* foi investigada e comparada com a ação da acetilcolina. O experimento foi realizado em anéis da aorta torácica de ratos com e sem endotélio, em artéria pulmonar de cobaias, artéria pulmonar de coelhos e artéria mesentérica de coelhos pré-contráidas com noradrenalina ou fenilefrina. O extrato hidroetanólico de *Trichilia catigua* causou efeito vasorelaxante em aorta de rato com endotélio de 1 a 3000 µg/mL (CALIXTO et al, 1997).

O efeito antinociceptivo do extrato hidroetanólico das cascas de *Trichilia catigua* foi investigado em modelos químicos e térmicos de nocicepção em camundongos. O extrato administrado na dose de 200 mg/kg via oral, seis horas antes do experimento inibiu em  $82 \pm 2$  % a nocicepção induzida por ácido acético avaliada no número de contrações abdominais. Utilizando a mesma forma de administração, o extrato também foi capaz de inibir a dor em ambas as fases do teste da formalina, indicando que o mesmo possa ter efeitos antinociceptivos relacionados ao sistema opióide (VAZ et al, 1997).

A ação de relaxamento do corpo cavernoso isolado de coelho foi investigada para o extrato hidroetanólico das cascas de *Trichilia catigua*. Este extrato provocou de forma dose dependente um efeito relaxante de longa duração. O relaxamento produzido não foi significativamente inibido pela infusão de 10 µM de N-nitro-L-arginina metil éster, o inibidor da síntese de óxido nítrico. A infusão de 10 µM de inibidor solúvel da guanilatociclase reduziu em mais de 50 % o relaxamento induzido pelo extrato. O extrato hidroetanólico de *Trichilia catigua* (1-100 mg) não causou aumento da liberação do nucleotídeo AMP cíclico de forma significativa acima dos níveis basais. Portanto o efeito relaxante do extrato em corpo cavernoso isolado de coelho não parece ter relação com a liberação de óxido nítrico (ANTUNES et al, 2001).

Um estudo clínico de fase I investigou a administração crônica de 25 mL de Catuama® duas vezes por dia por 28 dias, em voluntários saudáveis de ambos os sexos. Objetivou-se a observação de quaisquer efeitos tóxicos do fitoterápico. Nenhuma reação adversa tóxica foi relatada ou mudanças hematopoiéticas e

bioquímicas foram detectadas (OLIVEIRA et al, 2005). Por conseguinte, o extrato hidroetanólico das cascas de *Trichilia catigua* na concentração presente no fitoterápico Catuama® pode ser considerado seguro e bem tolerado.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ANÁLISES DA DROGA**

#### **4.1.1 Coleta e Identificação**

A coleta das amostras utilizadas para este estudo foi realizada em uma região de ocorrência natural da espécie no estado de Santa Catarina em janeiro de 2005. Coletaram-se amostras de cascas e folhas de uma população de cerca de 20 árvores de *T. catigua* na cidade de São Miguel do Oeste - SC, com altitude entre 522 a 536 metros, latitude 26º 46' 950" a 26º 47' 006" e longitude 53º 30' 612" a 53º 30' 910".

Realizou-se uma exsicata do material, a qual foi identificada pelo botânico Dr. Gerdt Hatchbach e depositada no herbário da Prefeitura Municipal de Curitiba sob o registro número 306253.

#### **4.1.2- Secagem e Moagem**

Após a coleta, as amostras das folhas e das cascas, Figura 1, foram secas em estufa a 50 °C por 24 h. Separou-se uma parte para a realização do estudo anatômico e o restante do material foi moído em moinho de martelos IKA modelo

MFC com tela de 3 mm e armazenadas em frasco âmbar até o momento das análises.

FIGURA 1 – ASPECTOS DAS FOLHAS E CASCAS SECAS ANTES DA MOAGEM.



#### 4.1.3 Determinação Granulométrica

A determinação da granulometria da droga moída foi realizada no granulômetro Produtest modelo T, segundo a Farmacopéia Brasileira IV ed. 1988, utilizando-se exatamente cerca de 50 g de amostra. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.1.4 Ensaio de Pureza

##### 4.1.4.1 Determinação das cinzas totais

Pesou-se exatamente cerca de 3 g da droga moída em um cadinho de porcelana previamente calcinado a 800 °C em mufla EDG modelo 1800, resfriado em dessecador e pesado. A amostra foi então incinerada aumentando-se a

temperatura gradativamente até 450 °C como pode ser observado na Tabela 1. O cadinho foi então resfriado em dessecador e o peso final foi anotado.

A relação das cinzas totais se dá pela subtração do peso final do cadinho com a amostra e o peso do cadinho vazio, dividido pelo total de amostra. A análise foi realizada em triplicata.

TABELA 1- PROGRAMAÇÃO DA MUFLA PARA A ANÁLISE DE CINZAS

<b><i>Patamar de aquecimento</i></b>	<b><i>1</i></b>	<b><i>2</i></b>	<b><i>3</i></b>
Temperatura (°C)	105	250	450
Rampa de aquecimento (°C/min)	5	10	25
Tempo de estabilização no patamar (min)	60	60	180

#### 4.1.4.2 Determinação das cinzas insolúveis em HCl

O resíduo obtido da determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com uma solução de ácido clorídrico 0,2 M. O resíduo insolúvel no ácido clorídrico foi recolhido em papel de filtro com cinzas conhecidas e lavado com água quente até o filtrado tornar-se neutro. O papel de filtro foi transferido para o cadinho original e incinerado paulatinamente a cerca de 450 °C, com a mesma programação de aquecimento da mufla da análise de cinzas totais, até peso constante.

A relação das cinzas insolúveis se dá pela diferença entre o peso do cadinho incinerado com a amostra e do cadinho vazio, dividido pela quantidade de amostra. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.1.4.2 Determinação da perda por dessecação

Foi realizada em balança de infravermelho Sartorius modelo MA 30, segundo a Farmacopéia Brasileira 4 ed. (1988) modificada pelo departamento de Garantia da Qualidade do Laboratório Catarinense. Pesou-se exatamente cerca de 2 g de droga em um prato de alumínio específico para determinação de perda e dessecou-se a 105 °C por 60 minutos.

A perda por dessecação se dá pela diferença do prato de alumínio com a amostra antes da dessecação e após a dessecação, dividido pelo peso da amostra, cálculo realizado automaticamente pelo equipamento. A análise foi realizada em triplicata.

#### 4.1.5 Determinação do Perfil Fitoquímico Preliminar

Determinou-se o perfil fitoquímico do extrato aquoso e hidroalcoólico das cascas e folhas da espécie segundo método descrito por MOREIRA (1979).

##### 4.1.5.1 Preparo dos extratos para a determinação do perfil fitoquímico preliminar

O extrato aquoso foi produzido a 20 % (40 g da droga moída macerada por 24 horas com 200 mL de água purificada) e o extrato hidroalcoólico foi produzido e também a 20 % (40 g da droga moída macerada por 24 horas com 200 mL etanol a 70 % v/v). Após a maceração, os extratos foram filtrados por papel de filtro e armazenados em frascos âmbar mantidos sob refrigeração. Com os mesmos procedeu-se a análise fitoquímica preliminar.

#### 4.1.5.1.1 Ensaio com o extrato aquoso

a) Heterosídeos antociânicos: Separaram-se 3 porções de 5 mL do extrato aquoso em três tubos de ensaio e levou-se um ao pH ácido, um ao pH neutro e outro ao pH básico (com solução aquosa de hidróxido de potássio a 5 % e solução aquosa de ácido clorídrico 1 M), obtendo os respectivos pHs: 5,5 (pH ácido) ; 7,0 (pH neutro) e 9,5 (pH básico). Mudança de coloração nas três porções indica a presença de heterosídeos antociânicos.

b) Heterosídeos saponínicos: Os três tubos obtidos no ensaio anterior foram agitados energicamente durante 5 minutos. Espuma persistente em um dos tubos indica a presença de saponinas, que é confirmada pela adição de solução aquosa de ácido clorídrico a 1 %.

c) Heterosídeos cianogenéticos: Foram transferidos 15 mL do extrato aquoso para um tubo de ensaio, com o cuidado de não umedecer as paredes superiores. Adicionou-se 1 mL de ácido sulfúrico 1 N. Uma tira de papel picro-sódico foi suspensa no tubo com o auxílio de uma tampa. O tubo de ensaio foi deixado em um banho-maria à temperatura de 60 °C, durante 30 minutos. O papel adquirindo coloração vermelha indica a presença de heterosídeos cianogenéticos.

d) Taninos: Em 5 mL do extrato adicionaram-se 5 gotas de cloreto férrico a 1 %. Havendo a formação de um precipitado escuro o seguinte ensaio é efetuado: 5 mL do extrato aquoso é transferido para um balão de fundo chato de 100 mL. Nele acrescenta-se 5 gotas de formaldeído a 37 % e 4 mL de ácido clorídrico. A mistura é aquecida sob refluxo durante 1 hora. Após seu resfriamento, a solução é filtrada e o insolúvel é lavado com água purificada e com álcool. Se no insolúvel houver formação de coloração pela adição de algumas gotas de solução aquosa de hidróxido de potássio a 5 %, significa a presença de taninos condensados. Se no filtrado, pelo excesso de acetato de sódio e a adição de 10 gotas de cloreto férrico a 1 %, houver formação de precipitado escuro ou azul, indica a presença de taninos hidrolisáveis.

e) Amino-grupos: Foram concentrados 10 mL do extrato aquoso à 50 °C até o volume de 5 mL. Em um papel de filtro, 5 gotas deste extrato foram

depositadas. Após secos, foram nebulizados com solução butanólica de ninhidrina. Depois do aquecimento em estufa a 90-100 °C durante 15 minutos, o aparecimento de coloração azul-violácea indica a presença de amino-grupos.

#### 4.1.5.1.2 Ensaio com o extrato hidroalcoólico

a) Esteróides e triterpenos: Foram evaporados à secura 20 mL do extrato alcoólico e extraído com 3 vezes sucessivas de 5 mL de diclorometano. O extrato diclorometânico foi concentrado a um volume de 3 mL e transferido para um tubo de ensaio, onde juntou-se 2 mL de anidrido acético. Cautelosamente adicionaram-se 3 gotas de ácido sulfúrico. O desenvolvimento de coloração azul a verde indica a provável presença de núcleo esteroidal e o aparecimento de coloração vermelha, rósea, púrpura ou violácea indica a provável presença de policíclicos triterpênicos.

b) Alcalóides: Foram evaporados 50 mL do extrato alcoólico em banho-maria a 60 °C. O resíduo foi dissolvido em 1 mL de etanol e 20 mL de solução de ácido clorídrico 1 %. A mistura foi transferida para um funil de separação e alcalinizada com solução de hidróxido de amônio 6 N até pH 9-10. O extrato alcalinizado foi extraído três vezes sucessivas de 15 mL com uma mistura de éter etílico e diclorometano (3:1). O extrato éter-diclorometano-amoniaco foi evaporado à secura em banho-maria a 50 °C, e dissolvido em 0,5 mL de etanol e 5 mL de solução de ácido clorídrico 1 %. A mistura foi dividida em 5 tubos de ensaio. Após resfriamento gotejam-se os reativos de Mayer, Bertrand, Bouchardat e Dragendorff. Turvação nos tubos quando comparados ao tubo branco indica a presença de alcalóides.

c) Cumarinas: Depositou-se em um papel de filtro 15 gotas do extrato etéreo obtido no teste b, dividido em 3 pontos. Dois pontos foram tratados com uma gota de hidróxido de sódio 1 N e então o papel foi levado a uma câmara de luz UV em ondas longas durante 3 minutos. O desenvolvimento de fluorescência azul ou verde-amarelada nas manchas tratadas com o hidróxido de sódio revela a presença de cumarinas.

d) Ácidos orgânicos: o restante do extrato etéreo obtido no teste b foi

levado à secura e dissolvido em 5 mL de água purificada. O pH ácido desta solução indica a presença de ácidos orgânicos.

e) Hidroxiantraquinonas: Foram fervidos 20 mL do extrato alcoólico adicionado de 3 mL de ácido sulfúrico 10 % sob refluxo durante 15 minutos. O líquido foi filtrado ainda quente e após o resfriamento foi transferido para um funil de separação junto com 30 mL de água purificada e extraído por 3 vezes de 10 mL de tolueno. O extrato toluênico foi concentrado a 10 mL e transferido para um tubo de ensaio. Então foi agitado com 10 mL de solução reagente de hidróxido de sódio. O aparecimento de coloração rósea ou avermelhada indica a presença de hidroxiantraquinonas.

f) Flavonóides: Em um tubo de ensaio mantido sob gelo, adicionou-se 5 mL do extrato alcoólico, 2 g de limalhas de magnésio e 2 mL de ácido clorídrico concentrado. Deixou-se reagir 15 minutos e observou-se. Desenvolvimento de coloração rósea ou vermelha indica a presença de heterosídeos flavônicos.

#### 4.1.6 Estudo Anatômico

As análises dos caracteres anatômicos foram efetuadas em folhas adultas e cascas de caule secas re-hidratadas em água destilada antes da realização dos cortes.

Prepararam-se lâminas semipermanentes, a partir de secções paradérmicas à mão livre do limbo das folhas, incluindo a nervura central. Os cortes foram submetidos à coloração com azul de astra e fuccina básica (ROESER, 1962). As lâminas foram montadas com glicerina diluída a 50 % (BERLYN, MISCHÉ, 1976) e para a lutagem foi utilizado esmalte incolor (BEÇAK, PAULETE, 1976).

As lâminas permanentes foram obtidas a partir de secções transversais do limbo das folhas, incluindo a nervura central. Para as cascas foram realizados cortes transversais e longitudinais. O material foi desidratado em série etanólica e incluído em glicol-metacrilato (Leica Historesine ®) (KRAUSS, ADUIN, 1997). O material

incluído foi então seccionado no micrótomo Olympus CUT 4055, obtendo-se cortes de 7  $\mu\text{m}$  de espessura corados com azul de astra e fuccina básica (ROESER, 1962) ou azul de toluidina (O'BRIEN, FEDER MCCULLY, 1965).

Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias no microscópio fotônico Olympus BX 40, acoplado à unidade de controle PM-20.

## 4.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

### 4.2.1 Preparo dos Extratos Brutos

Para o desenvolvimento das análises cromatográficas foram utilizados extratos brutos das cascas e folhas da catuaba. Os extratos foram preparados em extrator tipo Soxhlet com solvente etanol a 96 % (v/v). Adicionaram-se exatamente cerca de 5 gramas de droga em um tubo de Falcon de polipropileno perfurado na parte cônica com algodão nas extremidades. Colocou-se o tubo na parte extratora do aparelho de Soxhlet acoplado a um balão de fundo chato contendo 120 mL de solvente e pérolas de vidro. Verteram-se 80 mL de solvente sobre o tubo com a amostra, conectou-se o conjunto ao condensador de bolas e deixou-se o sistema sob refluxo em chapa de aquecimento por 5 horas. Decorrido o tempo, filtrou-se o extrato em papel de filtro e concentrou-se em rotavapor a 50 °C até 50 mL, constituindo-se assim os extratos brutos das cascas e folhas.

### 4.2.2 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

As análises de CLAE foram desenvolvidas em aparelho Merck-Hitachi LaChrom Elite equipado com detector DAD L-2450, forno de coluna L-2300, bomba

quaternária L-2130 e amostrador automático L-2200. O programa de aquisição de dados utilizado foi o EZChrom Elite.

As separações foram realizadas em coluna Waters X-Terra com fase reversa octadecilsílica (RP-18) de 250 mm comprimento, 4,6 mm diâmetro interno, preenchida com partículas esféricas de 5 µm e associada a uma pré-coluna. O forno da coluna operou a temperatura de 25 °C. As fases móveis constituíram-se de ácido fosfórico a 0,2 % em ácido sulfúrico 0,01 M – fase móvel ácida (Bomba A), e acetonitrila grau CLAE 90 % em água purificada (Bomba B). Estas soluções foram filtradas a vácuo por membrana de 0,45 µm de celulose modificada antes de serem submetidas ao gradiente da análise. O gradiente de eluição das fases móveis utilizado no método qualitativo da CLAE foi o descrito na Tabela 2.

TABELA 2- GRADIENTE DE ELUIÇÃO DAS FASES MÓVEIS DO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

<i>Tempo (min)</i>	<i>A (%)</i>	<i>B (%)</i>	<i>Fluxo (mL/min)</i>
0	90	10	0,7
25	88	12	0,7
75	63	37	0,7
77	10	90	0,7
81	10	90	1,0
82	10	90	0,9
83	90	10	0,8
85	90	10	0,7
90	90	10	0,7

O detector de arranjo de diodos (DAD) foi configurado para realizar a varredura de 200 a 400 nm e integrar o cromatograma a 280 nm.

Foram feitas soluções estoque dos padrões de referência de ácido gálico, epi-catequina, ácido clorogênico, ácido cafêico, catequina, cumarina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e rutina em metanol na concentração de 1 mg/mL (p/v). Foi realizada uma mistura dos padrões diluídos para 0,1 mg/mL na fase móvel ácida. Após o preparo a solução padrão foi homogeneizada em vortex, centrifugada, filtrada por membrana de 45 µm e 20 µL da solução foi injetada no equipamento.

Na análise das amostras, os extratos brutos das cascas e das folhas foram diluídos 4 vezes na fase móvel ácida. Após o preparo as amostras foram homogeneizadas em vortex, centrifugadas, filtradas por membrana de 45 µm e 20 µL da solução foi injetada no equipamento.

A presença dos compostos fenólicos identificados foi confirmada pela adição de 0,1 mg/mL do padrão de referência nas amostras dos extratos brutos diluídos na fase móvel ácida. Após o preparo as amostras foram homogeneizadas em vortex, centrifugadas, filtradas por membrana de 45 µm e 20 µL da solução foi injetada no equipamento.

Para a quantificação do ácido clorogênico utilizou-se a mesma coluna e fases móveis do método do perfil de fenólicos. O gradiente de eluição das fases móveis utilizado no método quantitativo foi o descrito na Tabela 3.

TABELA 3- GRADIENTE DE ELUIÇÃO DAS FASES MÓVEIS DO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

<b><i>Tempo (min)</i></b>	<b><i>A (%)</i></b>	<b><i>B (%)</i></b>	<b><i>Fluxo (mL/min)</i></b>
0	80	20	0,7
9	77	23	0,7
10	10	90	0,7
11	10	90	0,7
13	10	90	0,8
14	80	20	0,9
15	80	20	0,7
16	80	20	0,7
20	80	20	0,7

O DAD foi configurado para realizar a varredura de 230 a 400 nm e integrar o cromatograma a 326 nm. Foram feitas soluções estoque do padrão de referência de ácido clorogênico em metanol na concentração de 0,5 mg/mL (p/v). Foi realizada uma diluição do padrão para 0,1 mg/mL na fase móvel ácida e 20 µL da solução foram injetados no equipamento.

Realizaram-se análises espectrais da resposta do DAD, onde o perfil espectral determinando o comprimento de onda máximo e a pureza do pico do padrão de ácido clorogênico foi avaliada.

Para a análise das amostras os extratos brutos das cascas e das folhas foram diluídos adicionando-se 750 µL do extrato em um balão volumétrico de 5 mL e completando-se o volume com fase ácida. Para confirmar a presença dos fenólicos identificados foi realizada análise por adição de padrão de referência nas amostras dos extratos brutos diluídos na fase móvel ácida. Após o preparo as amostras foram homogeneizadas, centrifugadas, filtradas por membrana de 45 µm e 20 µL da solução foi injetada no equipamento. Foram realizadas análises espectrais onde a pureza do pico de ácido clorogênico antes e após a adição do padrão de referência foi avaliada.

#### 4.2.3 Cromatografia Gasosa

As análises de CG foram realizadas em aparelho Shimadzu 14-B equipado com detector de ionização de chama (DIC), forno de colunas com rampas de aquecimento programáveis e interface CBM-101. O programa de aquisição de dados utilizado foi o Class GC.

As separações foram realizadas em coluna J&W Scientific DB-17, com 0,53 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento, 1 µm de filme da fase estacionária 50 % fenil e 50 % dimetilpolisiloxano. Utilizou-se como gás de arraste hidrogênio a 30 kPa. O gradiente de temperatura utilizado foi: temperatura inicial 100 °C com patamar de 1 minuto e rampa de aquecimento a 7 °C por minuto até 260 °C com patamar de 66 minutos. A temperatura do injetor foi de 260 °C e do detector foi de 280 °C. As amostras foram injetadas em modo de divisão de amostra (*split mode*) à razão de 1:10 e o volume de injeção foi de 4 µL. A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa Class-CG.

Foram feitas soluções estoque dos padrões de referência dos esteróides estigmasterol e beta-sitosterol, e os triterpenos lupeol, alfa-amirina e beta-amirina. O padrão interno utilizado foi o acetato de tocoferol. Todos os padrões foram diluídos em etanol na concentração de 1 mg/mL (p/v). Foi realizada uma solução padrão da mistura dos padrões diluídos para 0,1 mg/mL em etanol. Após o preparo a solução padrão foi homogeneizada em vortex, centrifugada e 4 µL da solução foram injetados no equipamento.

O preparo das soluções amostra foi realizado adicionando 25 mL do extrato bruto adicionado de 5 mL de água em um tubo de Falcon. Extraíu-se a solução com cinco porções de 20 mL de éter de petróleo por agitação da solução em vortex. Após cada extração a solução foi centrifugada e as porções etéreas foram reunidas e evaporadas à secura em rotavapor a 50 °C. Em seguida adicionou-se 500 µL da solução de padrão interno de acetato de tocoferol 1 mg/mL em um balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume ressuspendendo o resíduo do balão de evaporação com porções de 1 mL de etanol absoluto. Centrifugou-se uma porção da solução do balão volumétrico e 4 µL foram injetados no equipamento.

A presença dos compostos identificados foi confirmada pela adição de 0,1 mg/mL do padrão de referência nas amostras dos extratos brutos extraídos. Após o preparo as amostras foram homogeneizadas em vortex, centrifugadas e 4 µL da solução foi injetada no equipamento.

Para a quantificação do beta-sitosterol foi desenvolvido um método na coluna Phenomenex ZB-1, com 0,53 mm de diâmetro interno, 30 m de comprimento 0,5 µm de filme da fase estacionária 100 % dimetilpolisiloxano. Utilizou-se como gás de arraste hidrogênio a 30 kPa. O gradiente de temperatura utilizado foi: temperatura inicial 100 °C com patamar de 1 minuto, rampa de aquecimento a 8 °C por minuto até 270 °C com patamar de 35 minutos e rampa de aquecimento a 40 °C por minuto até 300 °C com patamar de 5 minutos. A temperatura do injetor foi de 280 °C e do detector foi de 300 °C. As amostras foram injetadas em modo de divisão de amostra (*split mode*) à razão de 1:10 e o volume de injeção foi de 4 µL. A análise dos dados obtidos foi realizada utilizando o programa Class-CG.

#### 4.2.4 Cromatografia em Camada Delgada

A análise de compostos fenólicos foi realizada em cromatoplasas Merck recobertas com Sílica gel 60 F<sub>254</sub>. Esta análise compreendeu o desenvolvimento de um sistema de fase móvel, o qual constituiu-se da mistura de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água na proporção 68:7:7:18 volumes respectivamente. A corrida cromatográfica ascendente foi desenvolvida em cuba de vidro previamente saturada com a fase móvel.

Com o auxílio de uma micropipeta aplicaram-se na placa bandas de 10 µL dos extratos brutos e dos padrões de referência. A confirmação da presença dos compostos foi realizada aplicando os extratos brutos adicionados da solução do padrão de referência. A visualização do perfil de fenólicos foi realizada através da revelação com o reativo de NEU (éster-β-etilamina do ácido difenilborônico a 1 % em etanol seguido de polietilenoglicol-4000 a 5 % em etanol) e observadas sob luz UV a 366 nm (WAGNER,1996).

A análise de esteróides e triterpenos foi realizada em cromatoplasas Merck recobertas com Sílica gel 60 F<sub>254</sub>. A fase móvel utilizada constituiu-se da mistura de clorofórmio e etanol na proporção 95:5 respectivamente. A corrida cromatográfica foi desenvolvida em cuba de vidro previamente saturada com a fase móvel.

Com o auxílio de uma micropipeta aplicaram-se na placa bandas de 10 µL dos extratos brutos e dos padrões de referência. A confirmação da presença dos compostos foi realizada aplicando os extratos brutos adicionados da solução do padrão de referência. A visualização do perfil de esteróides e triterpenos foi realizada através da revelação com vanilina fosfórica (1 g de vanilina em 100 mL de ácido fosfórico a 50 %). Em seguida a placa foi colocada em estufa a 100 °C por 10 minutos e observada sob luz visível (WAGNER,1996).

#### 4.2.5 Validação analítica

As análises cromatográficas quantitativas por CLAE e CG foram validadas segundo o Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos (RE-899 de 29 de maio de 2003) da ANVISA.

Segundo esta resolução, as metodologias se classificam, segundo sua finalidade, na categoria I – Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas. Esta categoria exige a realização dos seguintes ensaios: especificidade, linearidade, intervalo, precisão por repetibilidade e intermediária, exatidão e robustez.

##### 4.2.5.1 Validação analítica do doseamento do ácido clorogênico por CLAE

A descrição detalhada da execução do ensaio analítico para fins de validação do método de doseamento de ácido clorogênico no extrato bruto de catuaba cascas e folhas apresenta-se a seguir.

As análises foram realizadas utilizando o extrato bruto das cascas, somente a análise de especificidade utilizará a amostra do placebo das folhas no intuito de demonstrar a aplicabilidade do método aos dois extratos. As condições da análise cromatográfica bem como o modo de preparo da amostra encontram-se descritas no item 4.2.2. Os resultados são demonstrados em micrograma de analito por grama de droga ( $\mu\text{g/g}$ ).

##### 4.2.5.1.1 Linearidade

Para a realização da curva de calibração foram preparadas cinco concentrações diferentes a partir da solução padrão de referência de ácido

clorogênico [0,5 mg/mL]. Para cada concentração foram realizadas 5 corridas (5 pontos por concentração). Prepararam-se as soluções em balões volumétricos calibrados de 5 mL conforme Tabela 4. Apesar da RE 899 da ANVISA (2003) preconizar um intervalo entre 80 a 120 % para análises de determinação quantitativa do analito em matérias-primas resolveu-se estender este intervalo para 50 a 150 %, visando a obtenção mais precisa dos resultados de eficiência extrativa, os quais podem demonstrar variações maiores que 20 %. A condição de análise é que o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) deve resultar no mínimo 0,99.

TABELA 4 - DADOS PARA O PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO

<b>Concentração do padrão de referência (%)</b>	<b>Volume da solução de referência ácido clorogênico [0,5 mg/mL] (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volume de fase ácida</b>
50	67	
75	100	
100	133	Q.s.p. 5 mL
125	167	
150	200	

#### 4.2.5.1.2 Exatidão

O placebo do extrato bruto foi considerado o resíduo da droga que já passou pelo processo de extração por soxhlet. Amostras dos placebos das cascas e folhas fortalecidas com o padrão de referência foram analisadas em triplicata em três níveis de concentrações determinando a porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do padrão adicionada na amostra. Para os cálculos serão utilizadas no mínimo três leituras.

Foi utilizado o padrão de referência de ácido clorogênico para preparo da amostra placebo fortalecido nas concentrações de 50 %, 100 % e 150 %. As extrações foram feitas com o mesmo processo do preparo dos extratos brutos, substituindo a droga pelo resíduo de extração adicionado do padrão de referência.

As amostras de placebo fortalecido foram preparadas em três replicatas conforme a Tabela 5.

TABELA 5 – PREPARO DAS AMOSTRAS DE PLACEBO FORTALECIDO PARA O TESTE DE EXATIDÃO

<b>Amostra (%)</b>	<b>Concentração esperada (µg/mL)</b>	<b>Resíduo de extração (g)</b>	<b>Padrão de referência ácido clorogênico (mg)</b>
50	6,70	5	2,23
100	13,30	5	4,43
150	20,00	5	6,67

A exatidão é expressa em porcentagem de recuperação através do ensaio do ativo adicionado em quantidade conhecida. Esta porcentagem é calculada determinando-se a razão da quantidade encontrada dividida pela quantidade adicionada e multiplicando-se por 100. O valor de recuperação deve ficar entre 95 a 105 %.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração prática do padrão adicionado} \times 100}{\text{Concentração teórica padrão adicionado}}$$

#### 4.2.5.1.3 Especificidade

Foram analisadas as soluções do padrão de referência e as soluções placebo das cascas e folhas, para a determinação da interferência de cada amostra nas análises. A solução placebo foi preparada da mesma forma que a amostra, substituindo a droga pelo resíduo da extração.

Os cromatogramas resultantes foram analisados por sobreposição, não podendo haver resposta maior que 2 % nas soluções placebo, no mesmo tempo de retenção do ácido clorogênico obtido nas soluções padrão e placebo fortalecido.

#### 4.2.5.1.4 Precisão por repetibilidade

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão por repetibilidade (intra- corrida) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Foram realizadas três análises da amostra com seis repetições no mesmo dia, com o mesmo analista e mesmo equipamento.

#### 4.2.5.1.5 Precisão intermediária

A precisão por intermediária (inter-corridas) é a concordância entre os resultados dentro de um mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Foram realizadas três análises da amostra com seis repetições em dias diferentes e com analistas diferentes.

#### 4.2.5.1.5 Robustez

É a medida da capacidade de um método analítico resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Para a CLAE serão considerados como fatores de variação do método:

- Uso de outra coluna cromatográfica com lote diferente da utilizada para as análises anteriores;
- Variação do pH da fase móvel ácida em menos 0,2 pontos (de 2,20 para 2,00) adicionando ácido fosfórico concentrado à fase móvel;
- Aumento da temperatura do forno de colunas em 2 °C, ou seja, de 25 °C para 27 °C.

#### 4.2.5.1.6 Intervalo

O intervalo de utilização do método foi considerado aquele compreendido entre os valores utilizados no teste da linearidade. Todas as amostras testadas foram diluídas de modo que sua concentração de ácido clorogênico ficasse dentro destes parâmetros.

#### 4.2.5.2 Validação analítica do doseamento do beta sitosterol por CG

Descrição detalhada da execução do ensaio analítico para fins de validação do teste de doseamento de beta sitosterol no extrato bruto de catuaba cascas apresenta-se a seguir.

As análises serão realizadas utilizando o extrato bruto das cascas. Somente a análise de especificidade utilizará a amostra do placebo das folhas no intuito de demonstrar a aplicabilidade do método a ambos os extratos. As condições da análise cromatográfica bem como o modo de preparo da amostra encontram-se descritas no item 4.2.2. Os resultados são demonstrados em micrograma de analito por grama de droga ( $\mu\text{g/g}$ ).

##### 4.2.5.2.1 Linearidade

Para a realização da curva de calibração foram preparadas cinco concentrações diferentes a partir da solução padrão de referência de beta sitosterol [1 mg/mL]. Para cada concentração foram realizadas 5 corridas (5 pontos por concentração). Prepararam-se as soluções em balões volumétricos calibrados de 5 mL conforme Tabela 6. Apesar da RE 899 da ANVISA (2003) preconizar um intervalo entre 80 a 120 % para análises de determinação quantitativa do analito em matérias-primas resolveu-se estender este intervalo para 50 % a 150 %, visando a

obtenção mais precisa dos resultados de eficiência extrativa, os quais podem demonstrar variações maiores que 20 %. A condição de análise é que o coeficiente de correlação ( $r^2$ ) resulte no mínimo 0,99.

TABELA 6 - DADOS PARA O PREPARO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO.

<b>Concentração do padrão de referência (%)</b>	<b>Volume do padrão interno acetato de tocoferol [1 mg/mL] (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volume do padrão de referência beta sitosterol [1 mg/mL] (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Volume de etanol</b>
50	500	250	
75	500	375	
100	500	500	Q.s.p. 5 mL
125	500	625	
150	500	750	

#### 4.2.5.2.2 Exatidão

O placebo para extração do extrato bruto foi considerado o resíduo das drogas que já passaram pelo processo de extração por soxhlet. Foi utilizado o padrão de referência beta sitosterol para preparo da amostra placebo fortalecido nas concentrações de 50 %, 100 % e 150 %. As extrações foram feitas com o mesmo processo do preparo dos extratos brutos, substituindo a droga pelo resíduo de extração adicionado do padrão de referência.

As amostras fortalecidas foram preparadas em três replicatas conforme a Tabela 7.

TABELA 7 – PREPARO DAS AMOSTRAS FORTALECIDAS PARA O TESTE DE EXATIDÃO.

<b>Amostra (%)</b>	<b>Concentração esperada (µg/mL)</b>	<b>Resíduo de extração (g)</b>	<b>Padrão de referência beta sitosterol (mg)</b>
50	50	5	0,50
100	100	5	1,00
150	150	5	1,50

A exatidão é expressa em porcentagem de recuperação através do ensaio do ativo adicionado em quantidade conhecida. Esta porcentagem é calculada determinando-se a razão da quantidade encontrada dividida pela quantidade adicionada e multiplicando-se por 100. O valor de recuperação deve ficar entre 95 a 105 %.

$$\text{Recuperação (\%)} = \frac{\text{Concentração prática do padrão adicionado} \times 100}{\text{Concentração teórica padrão adicionado}}$$

Concentração teórica padrão adicionado

#### 4.2.5.2.3 Especificidade

Foram analisadas as soluções do padrão de referência e as soluções placebo das cascas e folhas, para a determinação da interferência de cada amostra nas análises. A solução placebo foi preparada da mesma forma que a amostra, substituindo a droga pelo resíduo da extração.

Os cromatogramas resultantes foram analisados por sobreposição, não podendo haver resposta maior que 2 % na solução placebo, no mesmo tempo de retenção do beta sitosterol obtido nas soluções padrão e placebo fortalecido.

#### 4.2.5.2.4 Precisão por repetibilidade

A precisão é a proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão por repetibilidade (intra- corrida) é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação. Foram realizadas três análises da amostra com seis repetições no mesmo dia, com o mesmo analista e mesmo equipamento.

#### 4.2.5.2.5 Precisão intermediária

A precisão por intermediária (inter-corridas) é a concordância entre os resultados dentro de um mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Foram realizadas três análises da amostra com seis repetições em dias diferentes e com analistas diferentes.

#### 4.2.5.2.5 Robustez

É a medida da capacidade de um método analítico resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Para a CG serão considerados como fatores de variação do método:

- Uso de outra coluna cromatográfica com lote diferente da utilizada para as análises anteriores;
- Variação da vazão do gás de arraste, de 30 para 32 Kpa;
- Aumento da temperatura do forno de colunas em 2 °C, ou seja, de 280 °C para 282 °C.

#### 4.2.5.2.6 Intervalo

O intervalo de utilização do método foi considerado aquele compreendido entre os valores utilizados no teste da linearidade. Todas as amostras testadas foram diluídas de modo que sua concentração de beta sitosterol ficasse dentro destes parâmetros.

### 4.3 ANÁLISES DE EFICIÊNCIA EXTRATIVA

Realizaram-se análises de eficiência extrativa pelos métodos descritos a seguir. As extrações das cascas e folhas foram realizadas em paralelo e utilizaram como solvente extrator o etanol a 96 % (v/v) e etanol 50 % (v/v), constituindo extratos a 10 % (p/v).

Após a confecção dos extratos, foi realizado o perfil cromatográfico por CLAE de cada extrato, conforme metodologia descrita no item 4.2.2. As quantificações de ácido clorogênico e beta-sitosterol foram realizadas conforme as metodologias validadas.

#### 4.3.1 Extração por Maceração

Adicionaram-se exatamente cerca de 5 g de droga em um erlenmeyer de 125 mL e verteu-se 50 mL de solvente extrator. Tampou-se o erlenmeyer e o sistema permaneceu em repouso por 24 horas, Figura 2. Decorrido o tempo filtrou-se o extrato sobre algodão para um balão volumétrico de 50 mL e lavou-se a droga com o solvente extrator até completar o volume do balão volumétrico.

FIGURA 2 – PREPARO DOS EXTRATOS POR MACERAÇÃO



#### 4.3.2 Extração por Sonicação

Adicionaram-se exatamente cerca de 5 g de droga em um erlenmeyer de 125 mL e verteu-se 50 mL de solvente extrator. Tampou-se o erlenmeyer e o sistema foi colocado em um banho de ultra-som Bransom modelo 2210 por uma hora, Figura 3. Decorrido o tempo filtrou-se o extrato sobre algodão para um balão volumétrico de 50 mL e lavou-se a droga com o solvente extrator até completar o volume do balão volumétrico.

FIGURA 3 – PREPARO DOS EXTRATOS POR SONICAÇÃO



#### 4.3.3 Extração por Turbólise

Adicionaram-se exatamente cerca de 5 g de droga em um tubo de polipropileno de 50 mL e verteu-se 15 mL de solvente extrator. Realizou-se a extração em Ultra Turrax IKA modelo T25 basic a 24000 rpm por 5 minutos, Figura 4. Após a extração, centrifugou-se o tubo de polipropileno e o sobrenadante foi filtrado sobre algodão para um balão volumétrico de 50 mL. Repetiu-se o processo extrativo com mais quatro porções de 10 mL de solvente extrator até completar o volume do balão volumétrico.

FIGURA 4 – PREPARO DOS EXTRATOS POR TURBÓLISE



#### 4.3.4 Extração por Refluxo

Adicionaram-se exatamente cerca de 5 g de droga em um balão de fundo chato de 250 mL e verteu-se 50 mL de solvente extrator. Acoplou-se o balão em um condensador de bolas e o sistema foi colocado sobre uma chapa de aquecimento onde permaneceu em refluxo por uma hora, Figura 5. Decorrido o tempo filtrou-se o extrato sobre algodão para um balão volumétrico de 50 mL e lavou-se a droga com o solvente extrator até completar o volume do balão volumétrico.

FIGURA 5 – PREPARO DOS EXTRATOS POR REFLUXO



#### 4.3.5 Extração por Soxhlet

Adicionaram-se exatamente cerca de 5 gramas de droga em um tubo de Falcon de polipropileno perfurado na parte cônica com algodão nas extremidades. Colocou-se o tubo na parte extratora do aparelho de Soxhlet acoplado a um balão de fundo chato contendo 120 mL de solvente extrator e pérolas de vidro, Figura 6. Verteram-se 80 mL de solvente extrator sobre o tubo com a amostra, conectou-se o conjunto ao condensador de bolas e deixou-se o sistema sob refluxo em chapa de aquecimento por cinco horas. Decorrido o tempo, filtrou-se o extrato em algodão e concentrou-se em rotavapor a 50 °C até 50 mL, constituindo-se assim os extratos brutos das cascas e folhas.

FIGURA 6 – PREPARO DOS EXTRATOS POR SOXHLET



#### 4.4- ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Foi realizada análise de variância ANOVA ao nível de 5 % de significância utilizando um delineamento inteiramente casualizado. O teste foi aplicado para comparar os teores de marcadores químicos nas cascas e folhas dos diferentes processos extrativos. Para a comparação entre médias foi realizado o teste de Tukey ao nível de 95 % de probabilidade.

### 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 5.1 ANÁLISES DA DROGA

##### 5.1.1 Ensaio de Pureza

Os resultados para a análise de cinzas totais e insolúveis em ácido clorídrico podem ser observados nas Tabelas 8 e 9.

TABELA 8 - TEOR DE CINZAS TOTAIS E INSOLÚVEIS EM HCl DAS CASCAS DA CATUABA

<b><i>Cadinho</i></b>	<b><i>Cinzas totais (%)</i></b>	<b><i>Cinzas insolúveis em HCl (%)</i></b>
1	7.56	0.87
2	7.49	1.07
3	7.41	1.41
<b>Média</b>	<b>7.52</b>	<b>1.11</b>
DP	0.04	0.27

TABELA 9 - TEOR DE CINZAS TOTAIS E INSOLÚVEIS EM HCl DAS FOLHAS DA CATUABA.

<b>Cadinho</b>	<b>Cinzas totais (%)</b>	<b>Cinzas insolúveis em HCl (%)</b>
4	8.23	1.43
5	8.13	0.91
6	8.21	1.01
<b>Média</b>	<b>8.19</b>	<b>1.12</b>
DP	0.05	0.27

Observou-se que o teor de cinzas totais das cascas é 0,67 % menor que o das folhas, mas as cinzas insolúveis em HCl das duas partes da planta estudadas são praticamente iguais variando em apenas 0,01 %.

Os resultados das análises de perda por dessecação podem ser observados na Tabela 10.

TABELA 10- PERDA POR DESSECAÇÃO DA CATUABA

<b>Análise</b>	<b>Cascas (%)</b>	<b>Folhas (%)</b>
1	10,64	11,52
2	10,67	11,90
3	10,60	11,75
<b>Média</b>	<b>10,64</b>	<b>11,72</b>
DP	0,04	0,19

Observou-se que a perda por dessecação das cascas é de 1,08 % menor que o das folhas. Os resultados demonstram que as análises de ensaio de pureza possuem repetibilidade pelo baixo desvio padrão da média encontrado.

### 5.1.2 Perfil Fitoquímico Preliminar

Os resultados do perfil fitoquímico dos extratos aquoso e hidroalcoólico das cascas e folhas da catuaba podem ser observados nas Tabelas 11 e 12.

TABELA 11 - RESULTADO DO PERFIL FITOQUÍMICO PARA OS EXTRATOS AQUOSOS DAS DROGAS.

<b>Grupo</b>	<b>Reação positiva</b>	<b>Folhas</b>	<b>Cascas</b>
Heterosídeos Antociânicos	Coloração diferente	+	+
Saponinas	Espuma persistente	-	+
Heterosídeos Cianogenéticos	Papel vermelho	-	-
Taninos com FeCl <sub>3</sub> 1 %	Marrom	+	+
Taninos com acetato de chumbo	Precipitado	+	+
Taninos com formol-clorídrico	Condensados - azul	+	+
	Hidrolisáveis - azul	+	+
Amino-grupos	Azul-violácea	-	-

O resultado do perfil fitoquímico dos extratos aquosos das cascas e folhas foi praticamente igual sendo observada a presença de heterosídeos antociânicos, taninos condensados e hidrolisáveis. A exceção foi a presença de saponinas que somente foram detectadas nas cascas da planta.

TABELA 12 - RESULTADO DO PERFIL FITOQUÍMICO PARA O EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS DROGAS.

<b>Grupo</b>	<b>Reação positiva</b>	<b>Folhas</b>	<b>Cascas</b>
Alcalóides	Fomação de precipitado	-	-
Flavonóides	Coloração vermelha	+	+
Cumarinas	Fluorescência azul-amarelada	-	-
Antraquinonas	Coloração vermelha	-	-
Esteróides	Coloração Azul-esverdeada	+	+
Triterpenos	Coloração Vermelha-violácea	-	-

O resultado do perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico das cascas e folhas foi igual sendo observada a presença de flavonóides e esteróides demonstrando a similaridade da composição das duas partes da planta nesse extrato.

### 5.1.3 Anatomia Botânica

#### 5.1.3.1 Folhas

Na vista frontal do limbo, as células epidérmicas da face adaxial apresentam contorno praticamente poligonal (fig 8) e as da abaxial levemente ondulada (fig7), com campos primários de pontuação visíveis (figs. 7 e 8). A epiderme é uniestratificada, apresenta células alongadas periclinalmente e são revestidas por uma cutícula espessa e estriada. Os estômatos, do tipo anomocítico, estão inseridos no mesmo nível em relação às demais células da epiderme, sendo encontrados exclusivamente na face abaxial, caracterizando a folha como hipoestomática. As células-guarda possuem formato reniforme e apresentam crista externa evidente (fig 7). Observa-se também a presença de tricomas tectores uni e pluricelulares com parede espessada, cutícula granulosa e ápice agudo em ambas as faces.

O mesofilo é dorsiventral, composto por um estrato de parênquima paliçádico junto à face adaxial e por parênquima esponjoso composto por cerca de seis camadas de células com espaços intercelulares evidentes. Neste, distribuem-se feixes vasculares de pequeno porte do tipo colateral, envoltos por uma bainha parenquimática (fig 9).

A nervura central apresenta secção biconvexa, com uma leve curvatura na face adaxial e maior proeminência na abaxial. A epiderme é uniestratificada, revestida por cutícula estriada e espessada, com presença significativa de tricomas tectores principalmente na face abaxial. O parênquima paliçádico gradualmente se interrompe e é substituído por colênquima do tipo anelar composto por cerca de

cinco camadas na face adaxial e cerca de três camadas na abaxial. Observa-se também a presença de idioblastos contendo drusas de oxalato de cálcio pelo parênquima fundamental. Percorrendo o parênquima fundamental observa-se um único feixe vascular concêntrico anficrival, sendo que a região central é ocupada por células parenquimáticas. Este feixe é completamente envolto por uma bainha esclerenquimática. O xilema é completamente lignificado, os elementos traqueais estão dispostos em fileiras e a zona cambial é nítida. O floema consiste de uma faixa contínua e estreita envolvendo todo o xilema (fig 10).

Numerosos idioblastos cristalíferos com drusas de oxalato de cálcio são observados no mesofilo e no parênquima fundamental da nervura central (figs 9 e 10). Idioblastos constituídos por células aproximadamente isodiamétricas e comparativamente maiores que as células adjacentes com conteúdo mucilaginoso que se coram de azul são encontrados no mesofilo (fig 9).

#### 5.1.3.2 Cascas

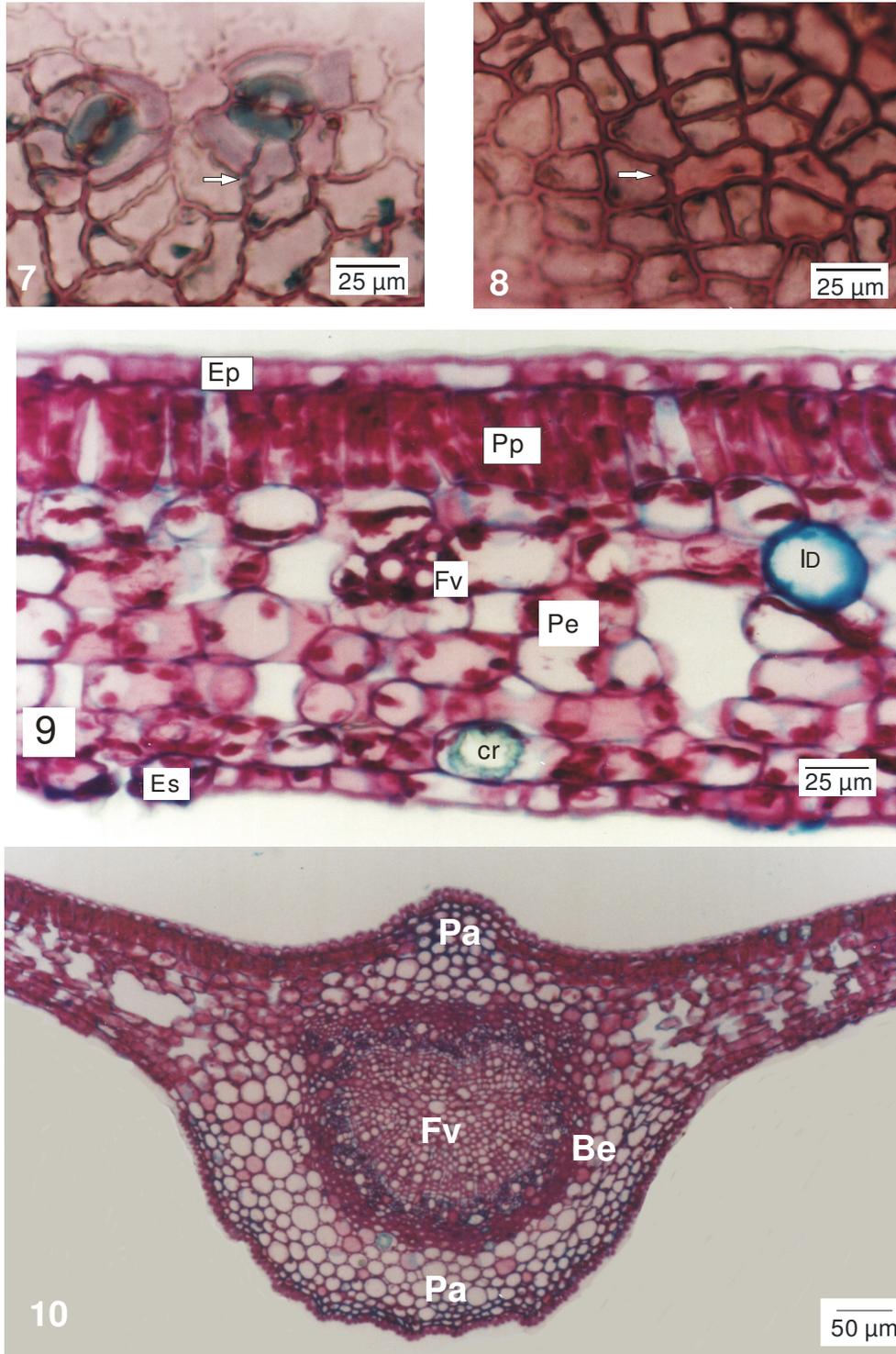
Morfologicamente as cascas são todos os tecidos e sistemas externos ao câmbio vascular, periderme, cortex e floema. Portanto, o xilema não faz parte das cascas, mas eventualmente na coleta deste material, parte do caule pode ser retirado junto. Este fato justifica a presença de xilema na droga popularmente chamada de casca.

Em secção transversal, a casca do caule apresenta periderme sendo o súber formado por cerca de 10 camadas de células tabulares de paredes espessadas. O feloderme evidente é formado por uma camada de cerca de 7 células (fig. 12).

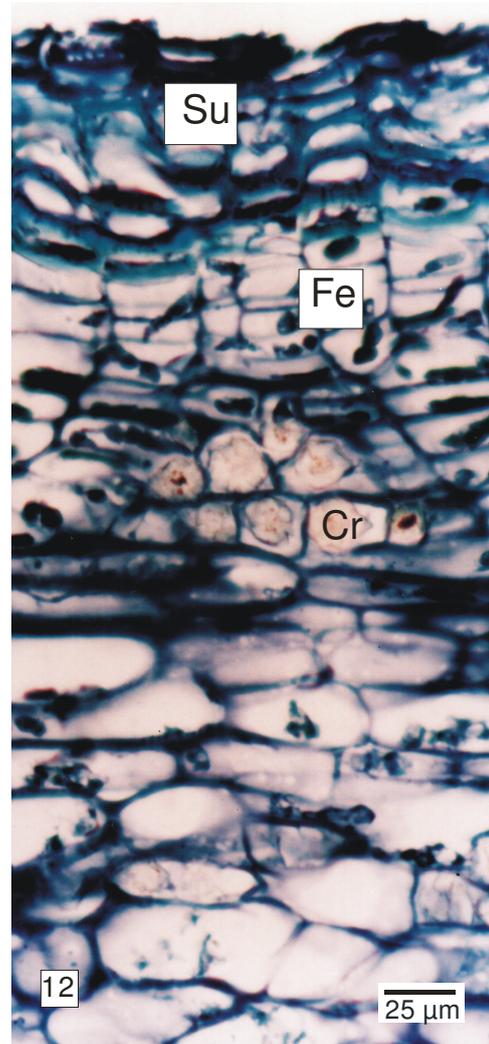
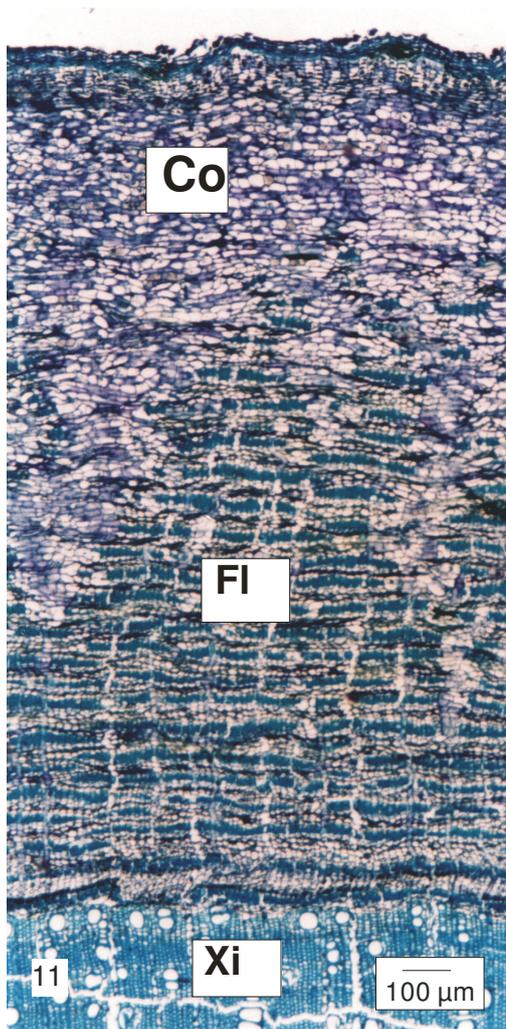
A região cortical é formada por 20 a 30 camadas de células parenquimáticas alongadas tangencialmente. O floema, comparativamente bem desenvolvido, é formado por células parenquimáticas, elementos crivados e por fibras dispostas isoladamente, ou na sua maioria, em pequenas faixas. Ambas as regiões cortical e

floemática são repletas de células isodiamétricas contendo cristais de oxalato de cálcio no formato de drusas e prismas (figs. 12 e 13).

O sistema vascular é percorrido por raios estreitos sendo as células destes lignificadas no xilema. O xilema é totalmente lignificado, formado de elementos traqueais dispostos em fileiras (fig. 11).



Figuras 7-10: *T. catigua* limbo: 7,8. Vista Frontal das faces epidérmicas abaxial e adaxial, respectivamente, mostrando cutícula estriada, estômatos anomocíticos e campos primários de pontuação (setas); 9. Vista transversal do mesófilo dorsiventral mostrando a epiderme uniestratificada (Ep), parênquima paliçádico (Pp), parênquima esponjoso (Pe), feixe vascular (Fv), idioblasto (Id), estômato (Es) e cristal de oxalato de cálcio (Cr); 10. Nervura central mostrando parênquima anelar (Pa), feixe vascular (Fv) e bainha esclerenquimática (Be).



Figuras 11-13. *T. catigua* cascas: 11,12. Vista transversal das cascas mostrando suber (Su), feloderme (Fé), região cortical (Co), floema (Fl) e drusas (Dr); 13. Vista longitudinal mostrando prismas (Pr).

## 5.2 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

O conceito de “fitoequivalência” foi desenvolvido na Alemanha para assegurar a consistência das plantas medicinais. De acordo com este conceito, um perfil químico, como o perfil cromatográfico, para uma planta medicinal deve ser construído e comparado com o perfil de um produto de referência aprovado clinicamente. Por definição, um perfil fitoquímico é, na prática, um padrão cromatográfico do extrato da planta com componentes químicos farmacologicamente ativos e ou característicos quimicamente. Sugere-se que com a ajuda de perfis cromatográficos obtidos, a autenticação e identificação de plantas medicinais podem ser conduzidas com maior precisão, ou perfis cromatográficos podem demonstrar com sucesso ambas “semelhanças” e “diferenças” entre várias amostras. Então, deve-se considerar globalmente múltiplos constituintes nos extratos de plantas medicinais e não considerar individualmente um e/ou dois marcadores químicos para a avaliação da qualidade dos produtos das plantas medicinais (LIANG et al, 2004).

Entretanto, em qualquer planta medicinal e seu extrato, existem centenas de componentes desconhecidos e muitos deles estão em baixa quantidade. Além disso, usualmente existe variabilidade no mesmo material vegetal. Conseqüentemente, para obter perfis cromatográficos que representem componentes farmacologicamente ativos ou compostos químicos característicos não é tarefa fácil. A cromatografia oferece uma capacidade de separação muito poderosa, de modo que o complexo de componentes químicos de um extrato de planta medicinal pode ser separado em várias sub frações relativamente simples. Além disso, os recentes avanços na aplicação de cromatografia conjugada com espectrometria tais como CLAE-DAD, CLAE-EM e CG-EM, podem prover informação espectral adicional, a qual será muito útil para a análise qualitativa e até mesmo para a elucidação estrutural on-line (LIANG et al, 2004).

### 5.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A CLAE é um método popular para a análise de plantas medicinais, pois é fácil de aprender e seu uso não é limitado pela volatilidade ou estabilidade dos compostos da amostra. Geralmente, CLAE pode ser utilizada para analisar quase todos os compostos das plantas medicinais. Assim, nas últimas décadas, CLAE é o método mais aplicado na análise das plantas medicinais. As colunas de fase reversa são as mais populares utilizadas na separação analítica de plantas medicinais (LIANG et al, 2004).

A CLAE-DAD tornou-se uma técnica comum na maioria dos laboratórios analíticos do mundo atualmente. Com a informação espectral adicional, a análise qualitativa de amostras complexas em plantas medicinais torna-se muito mais fácil que antigamente. Por exemplo, pode-se checar a pureza do pico e comparar o espectro do padrão conhecido com o da amostra investigada. Perfis cromatográficos por CLAE podem ser aplicados para a documentação de extratos vegetais completos com informações importantes (LIANG et al, 2004).

Existem diversos métodos para a quantificação de compostos fenólicos nas plantas. O método de Folin-Denis é o procedimento mais utilizado para a quantificação de fenólicos totais em plantas. A redução do reagente ácido fosfomolibdico-fosfotungico (Folin-Denis) para um complexo azul em solução alcalina ocorre na presença de compostos fenólicos detectados por espectrofotometria. O método de Folin-Ciocalteu também é utilizado para a determinação do conteúdo total de fenólicos nas plantas. Ambos os reagentes de Folin-Denis e Folin-Ciocalteu não são específicos e detectam todos os grupos de compostos fenólicos nos extratos, incluindo aqueles das proteínas extraíveis. Outra desvantagem destes métodos é a interferência de substâncias redutoras como o ácido ascórbico (NACZK et al, 2004). Além disso, já foi publicada a validação de um método de análise de flavonóides totais da *Trichilia catigua* por espectrofotometria (ROLIM et al, 2005). Por estas razões, resolveu-se não quantificar os compostos fenólicos da catuaba por espectrofotometria e sim desenvolver uma metodologia por CLAE para este fim.

Primeiramente desenvolveu-se um método capaz de separar alguns padrões

de compostos fenólicos de interesse, tendo em vista a revisão bibliográfica realizada. Submeteram-se também os extratos brutos a este método proporcionando um perfil cromatográfico de fenólicos dos extratos e a possibilidade de identificação de marcadores químicos.

Compostos fenólicos são considerados metabólicos secundários que são sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal e em resposta a condições de stress como infecções, lesões e radiação UV, entre outros. Estes compostos são onipresentes nas plantas e são um grupo muito diversificado de fitoquímicos derivados da fenilalanina e tirosina. Compostos fenólicos das plantas incluem fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ambos ácido benzóico e ácido cinâmico), cumarinas, flavonóides, taninos hidrolisáveis e condensados, lignanas e ligninas. Nas plantas, os fenólicos podem atuar como fitoalexinas, atratores de polinizadores, contribuintes da pigmentação da planta, antioxidantes e agentes protetores contra a radiação UV, entre outros. Nos alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir para o amargor, adstringência, cor, sabor, odor e estabilidade oxidativa dos produtos. Além disso, a capacidade da proteção da saúde de alguns e propriedades antinutricionais de outros fenólicos das plantas são de grande importância para os produtores, processadores e consumidores (NACZK et al, 2004).

Considerando outros antioxidantes dietéticos, a medida da capacidade antioxidante total do plasma após a injeção de polifenóis sugere que metabólitos formados em nossos tecidos e/ou pela microflora do cólon contribui significativamente para a capacidade antioxidante, para a prevenção do estresse oxidativo e suas influências na prevenção de doenças (TAPIERO et al, 2002).

Técnicas de CLAE são atualmente as mais utilizadas para ambas separação e quantificação de compostos fenólicos. Vários suportes e fases móveis estão disponíveis para a análise de antocianinas, procianidinas, flavononas e flavonóis, flavan-3-ols, flavonas, ácidos fenólicos e secoiridóides. A introdução de colunas de fase reversa aumentou consideravelmente a separação por CLAE de diferentes classes de compostos fenólicos. Muitas revisões foram publicadas sobre a aplicação de metodologias por CLAE para a análise de fenólicos. Compostos fenólicos são comumente detectados utilizando detectores UV-vis, detector de arranjo de

fotodiodos (DAD) e detectores de fluorescência. Recentemente foram comparados procedimentos eletroquímicos (voltametria diferencial de pulso e biosensor amperométrico) e CLAE-DAD para a análise de fenólicos em matrizes naturais. Dentre estes, a técnica CLAE-DAD demonstrou-se a mais exata (NACZK et al, 2004).

O método desenvolvido para a detecção dos padrões dos compostos fenólicos mostrou-se eficiente para a separação dos compostos estudados. Como estes compostos possuem estruturas de polaridade semelhante foi preciso utilizar um método com tempo longo de análise e com gradiente de eluição. Obteve-se assim o cromatograma padrão integrado em 280 nm de ácido gálico, epi-catequina, ácido clorogênico, ácido caféico, catequina, cumarina, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e rutina. Foi também realizada a análise espectral destes compostos pelo detector de DAD onde se verificaram os comprimentos de onda máximos entre 200 e 400 nm e a pureza dos picos dos padrões. Estes dados podem ser observados nas figuras 14 e 15.

FIGURA 14 – ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DOS PADRÕES DE FENÓLICOS NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

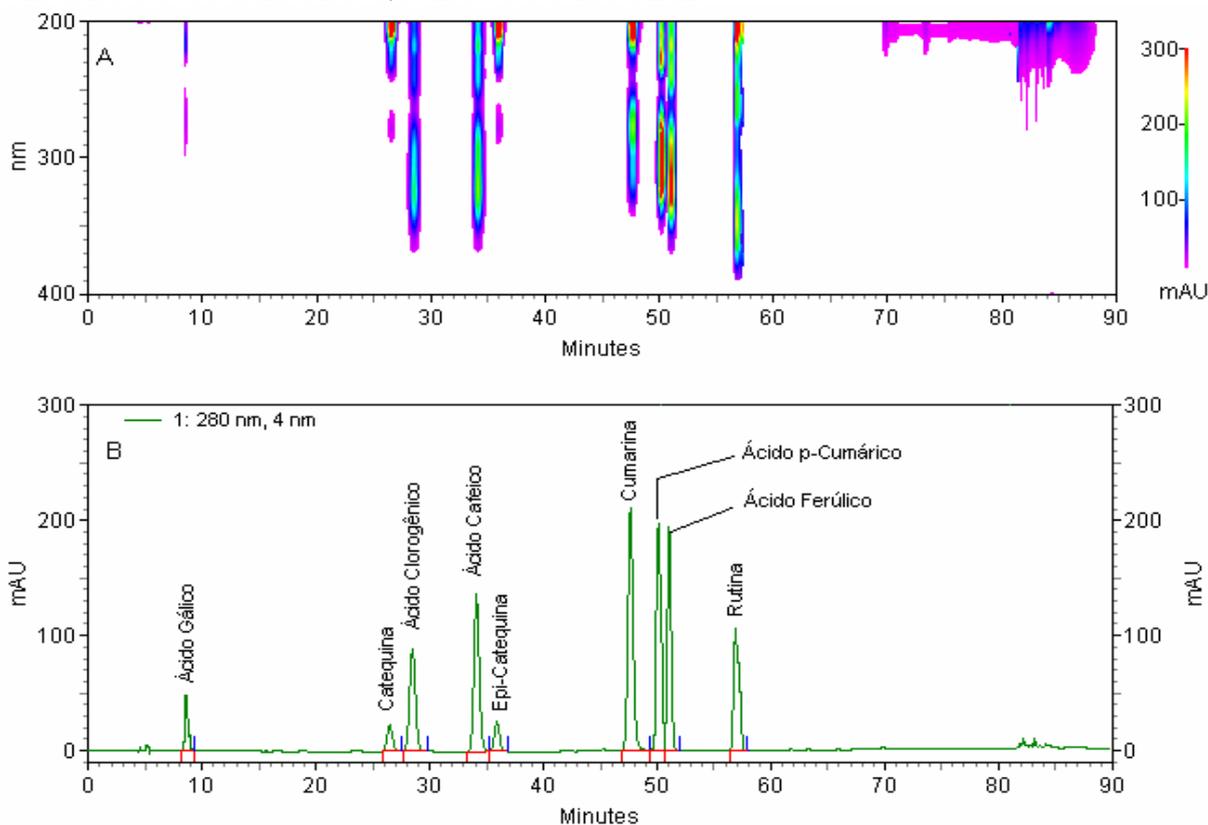


FIGURA 15 – ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO GÁLICO

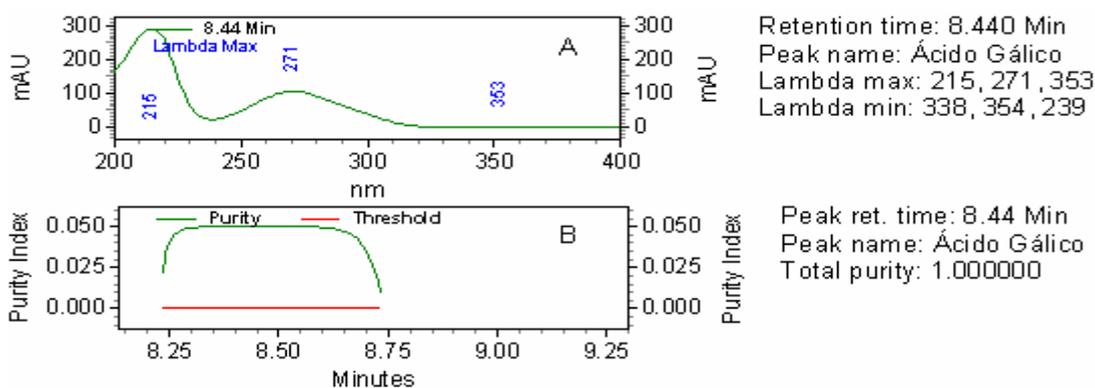


FIGURA 16– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA CATEQUINA

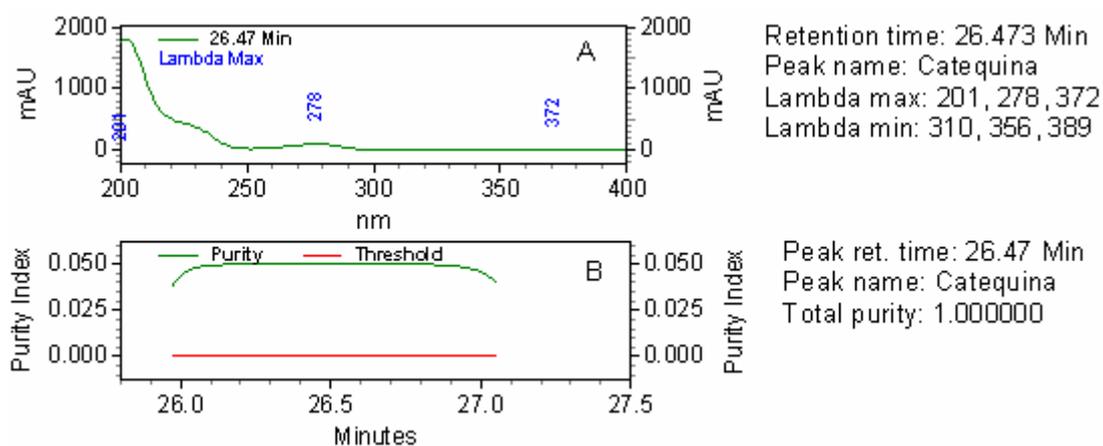


FIGURA 17– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CLOGRÊNICO

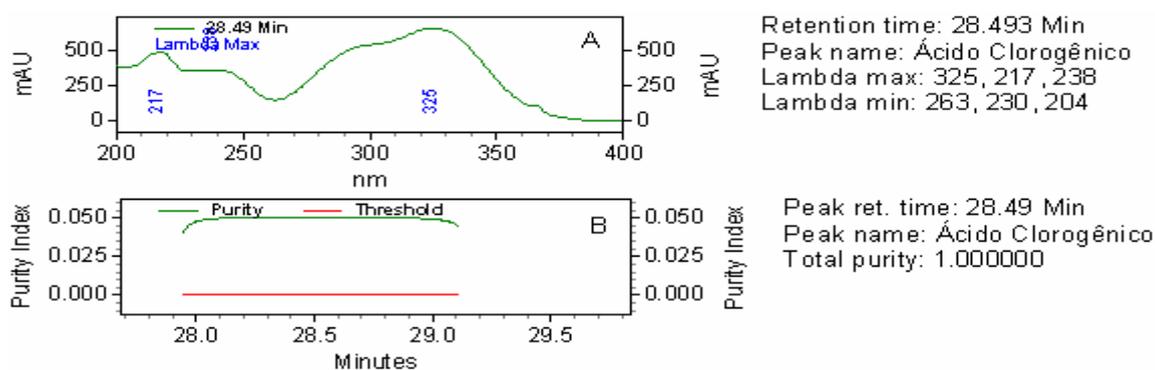


FIGURA 18– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CAFEICO

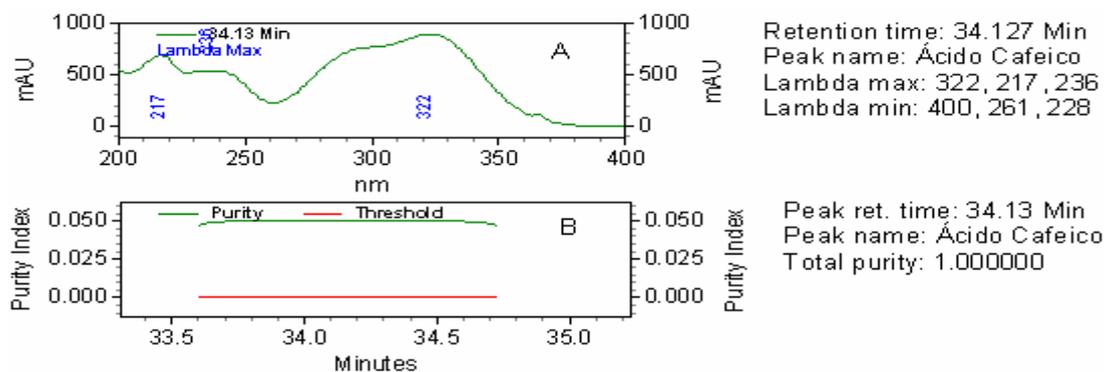


FIGURA 19– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA EPI-CATEQUINA

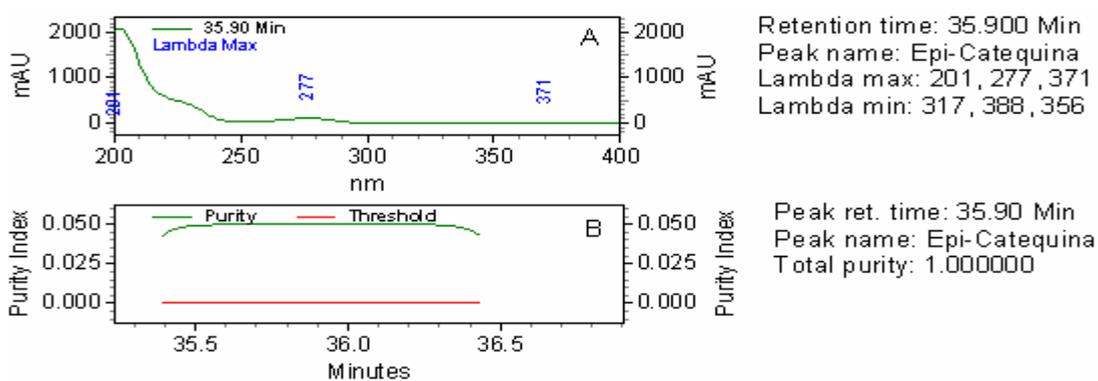


FIGURA 20– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA CUMARINA

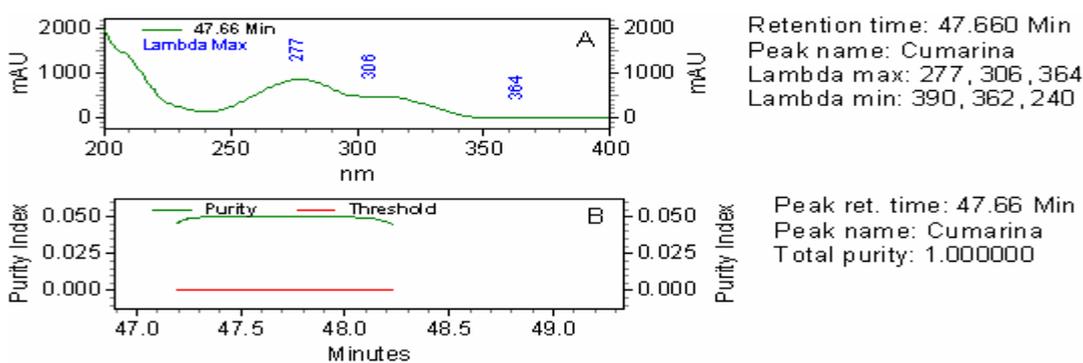


FIGURA 21– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO P-CUMÁRICO

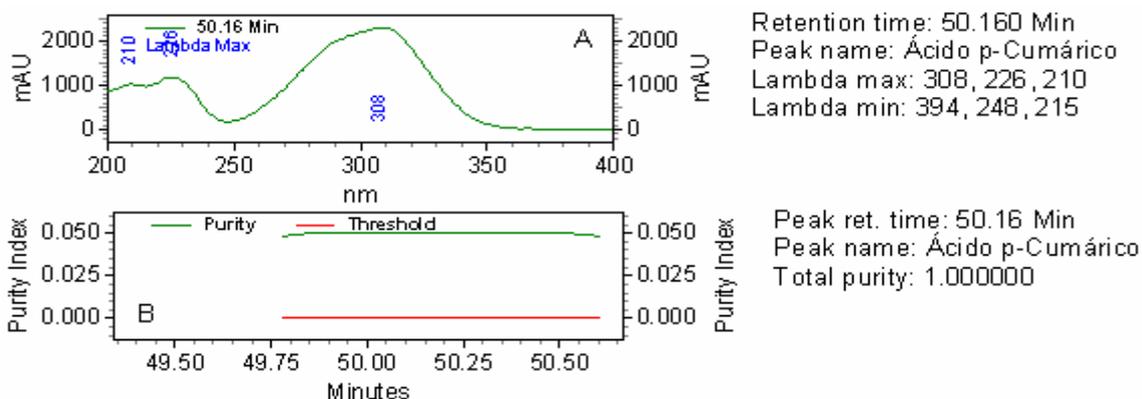


FIGURA 22– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO FERULICO

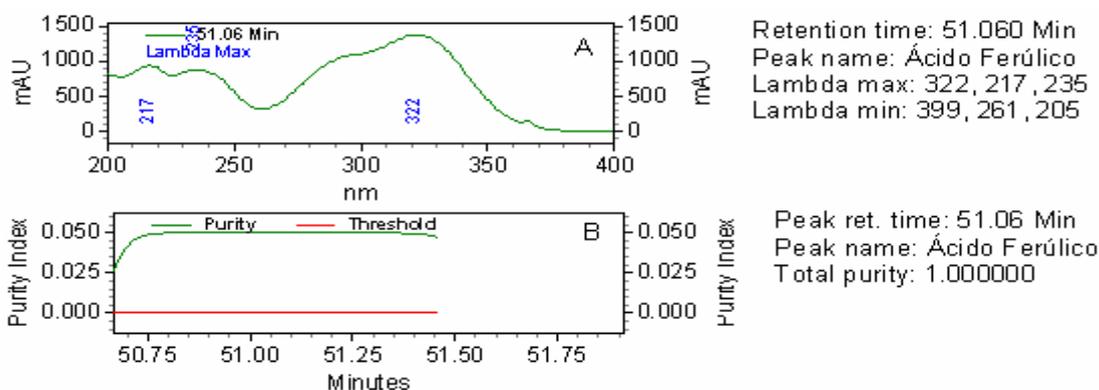
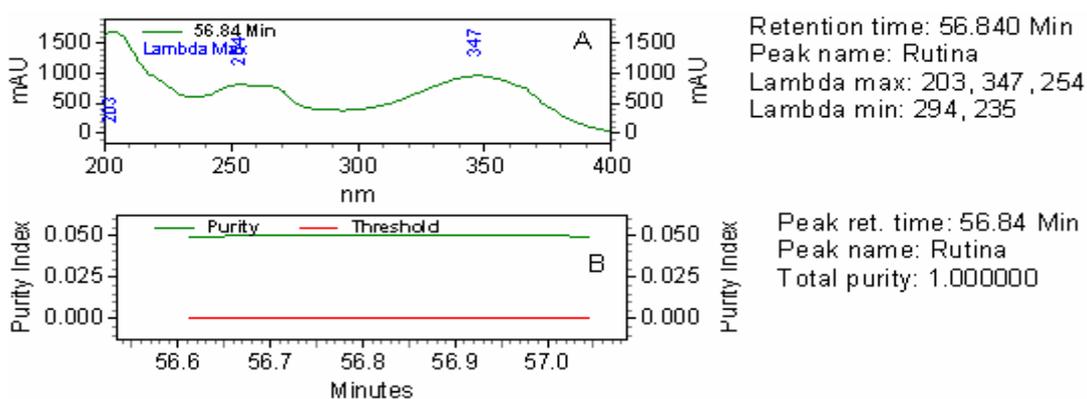


FIGURA 23– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA RUTINA



Utilizando estas mesmas condições cromatográficas foram injetados os extratos brutos das cascas e folhas na intenção da possível identificação de algum dos compostos fenólicos injetados. Obteve-se assim o perfil cromatográfico de

compostos fenólicos dos extratos brutos das cascas e folhas da espécie. Após as análises dos cromatogramas dos extratos brutos, verificou-se a coincidência de picos nos mesmos tempos de retenção da catequina, ácido clorogênico e epicatequina. Além do mesmo tempo de retenção estes picos também apresentaram espectros de UV idênticos aos dos padrões correspondentes. A presença de ácido clorogênico ainda não havia sido reportada na espécie. Os cromatogramas dos extratos brutos das cascas e folhas podem ser observados nas figuras 24 e 25.

FIGURA 24– ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

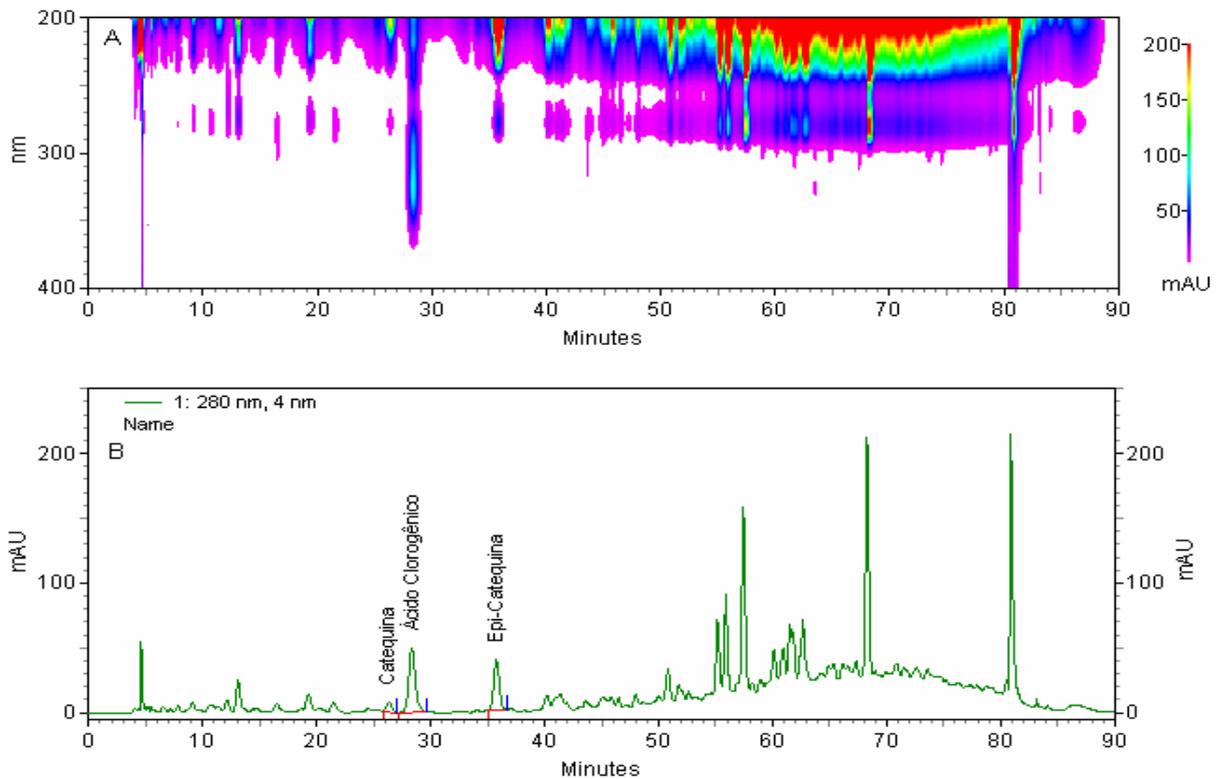
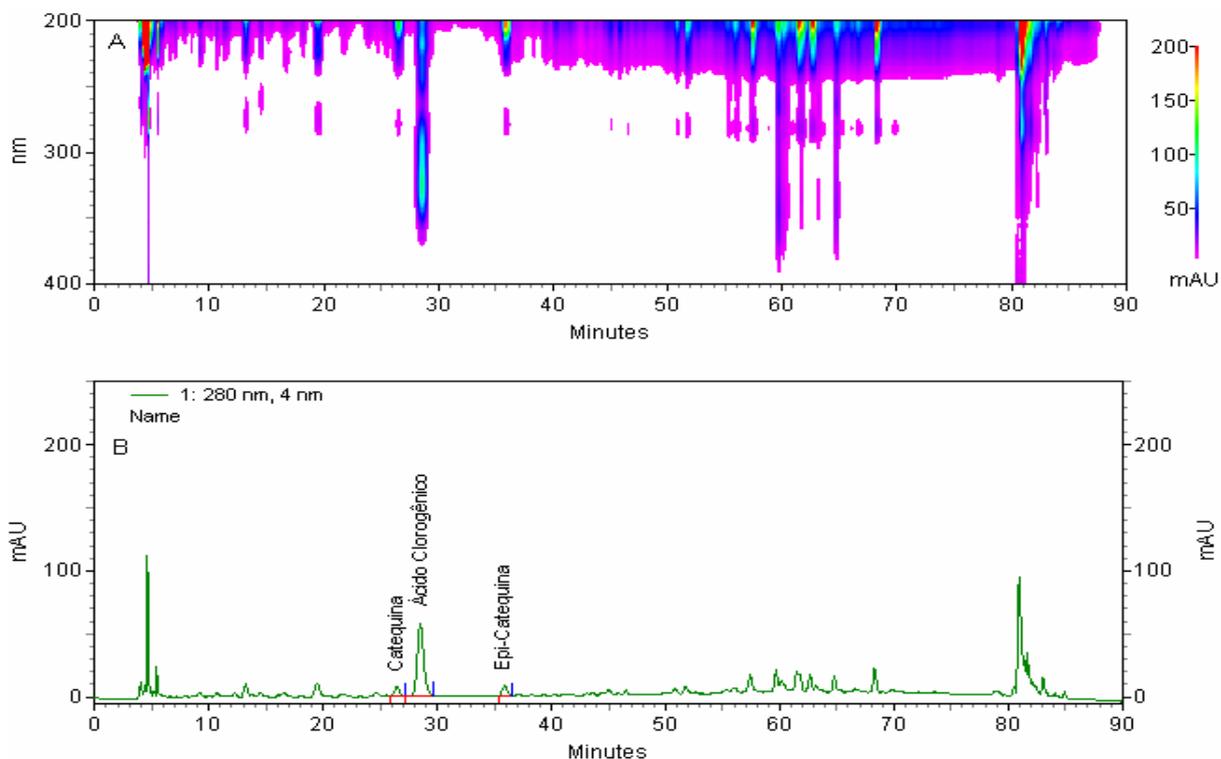


FIGURA 25– ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE



A presença de catequina, ácido clorogênico e epi-catequina nos extratos brutos foi confirmada pela adição destes padrões aos extratos. Os extratos adicionados dos padrões foram cromatografados e observou-se que a área dos picos correspondentes aumentou sem o aparecimento de novos picos no cromatograma. Este fato aliado à análise espectral dos picos pelo DAD demonstrou a presença dos mesmos nos extratos brutos. Os cromatogramas dessas análises podem ser observados nas figuras 26 a 33.

FIGURA 26– ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

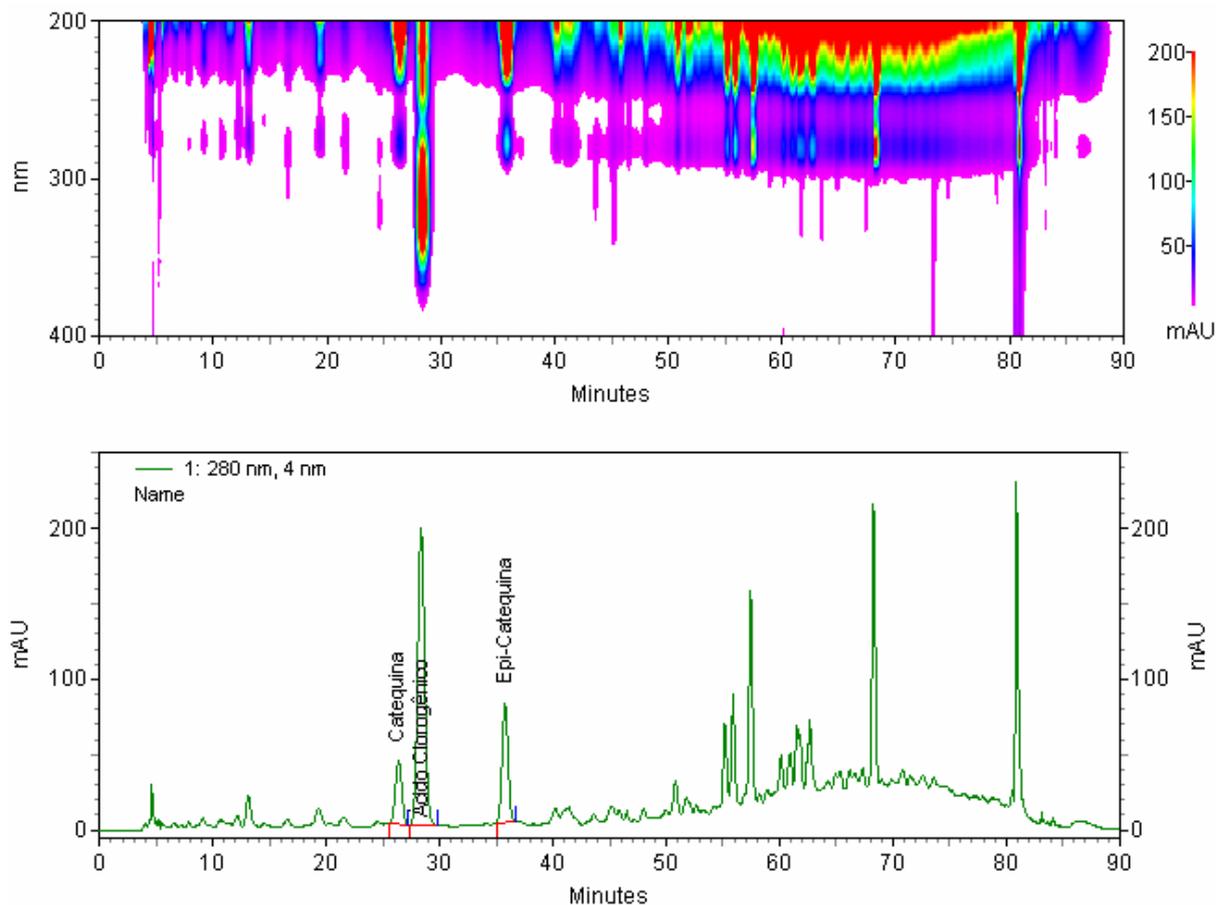


FIGURA 27– ESPECTRO UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA CATEQUINA APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

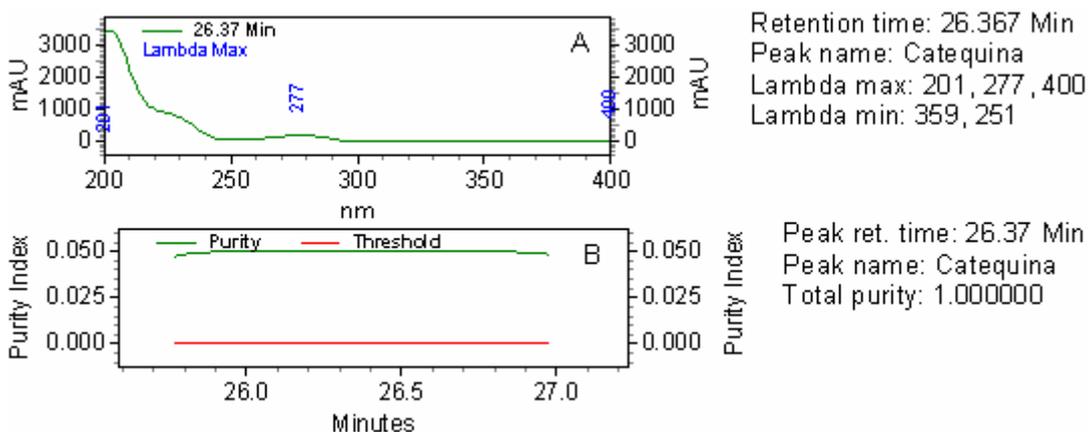


FIGURA 28– ESPECTRO UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

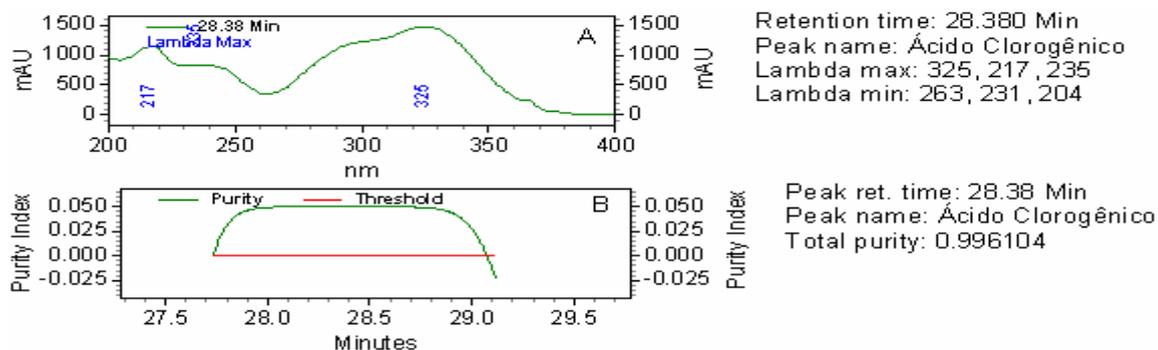


FIGURA 29– ESPECTRO UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA EPI CATEQUINA APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

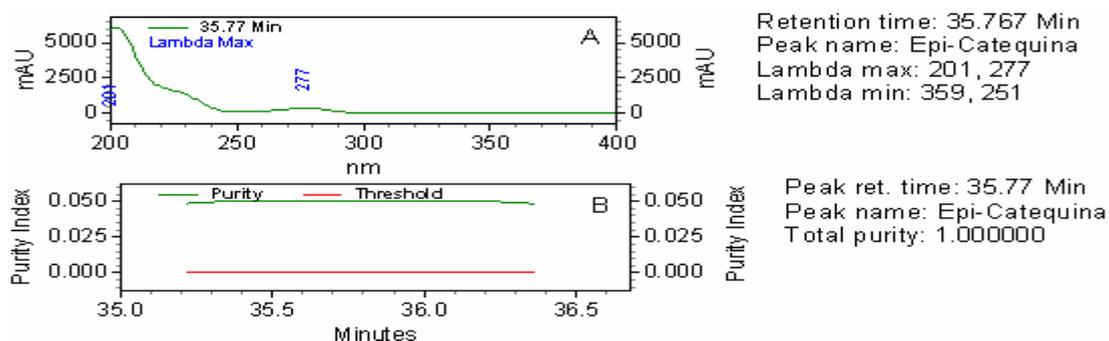


FIGURA 30– ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

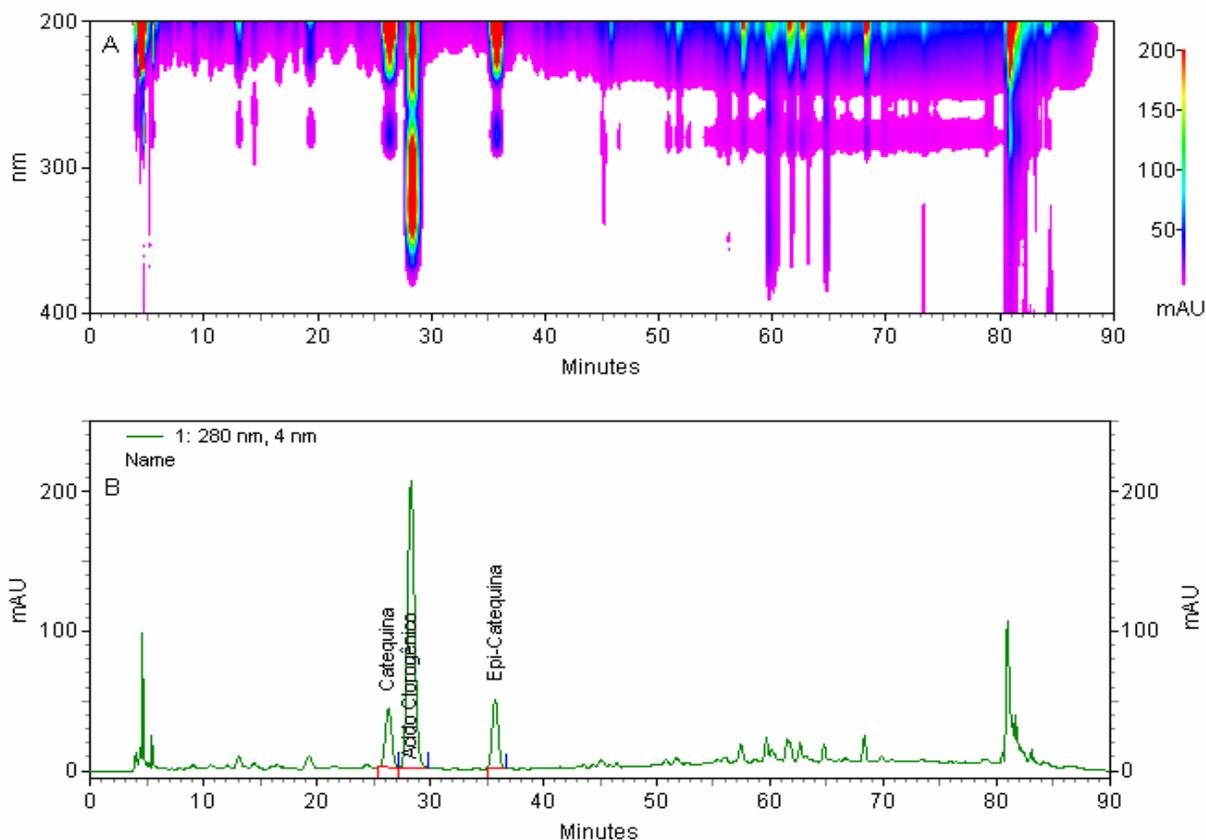


FIGURA 31– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA CATEQUINA APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

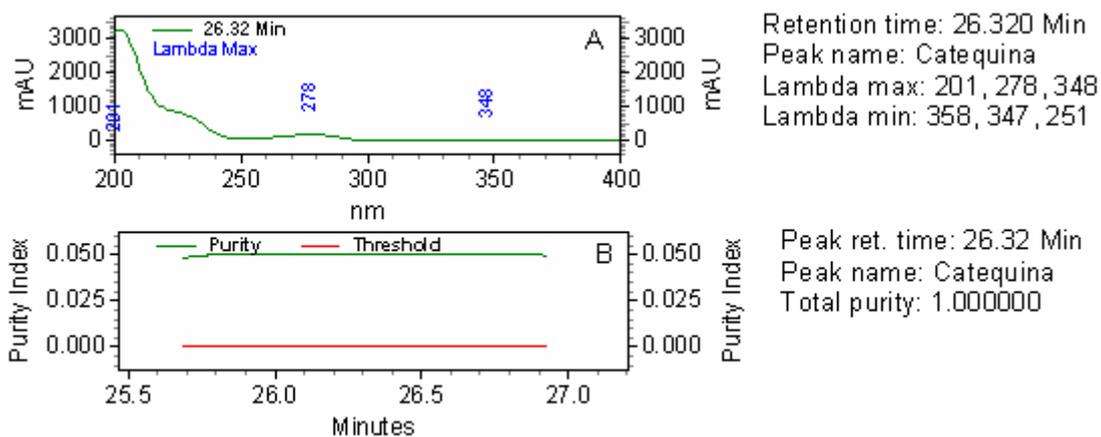


FIGURA 32– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE

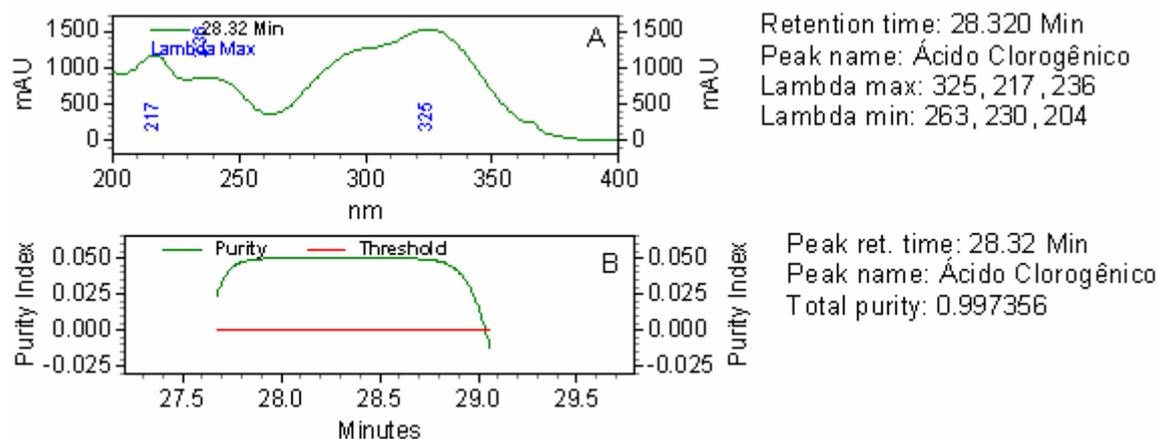
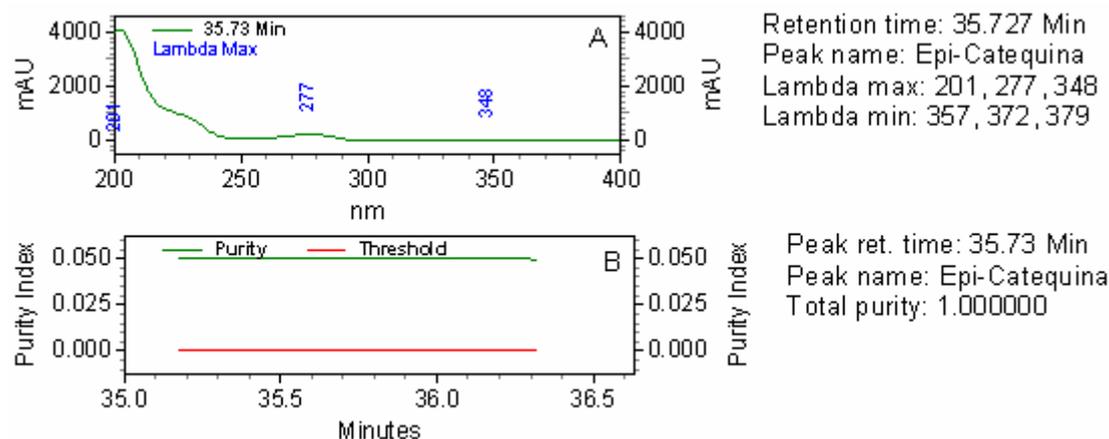
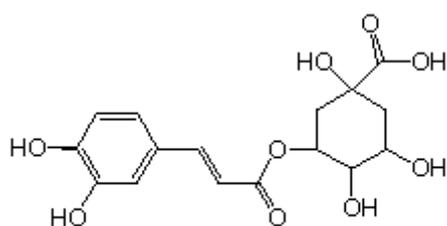


FIGURA 33– ESPECTRO DE UV (A) E ANÁLISE DE PUREZA (B) DA EPI CATEQUINA APÓS A ADIÇÃO DO PADRÃO NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CLAE



Uma grande classe de compostos fenólicos é a dos ácidos hidroxicinâmicos, os quais são encontrados em praticamente todas as plantas. O principal representante dos ácidos hidroxicinâmicos é o ácido cafêico, o qual é encontrado nas plantas principalmente como um éster com o ácido quínico chamado de ácido clorogênico (ácido 5-cafeoilquínico). A maior parte do ácido clorogênico ingerido chega ao cólon e parte deste entra na circulação sanguínea. O ácido clorogênico e o ácido cafêico são antioxidantes in vitro e eles podem inibir a formação dos compostos N-nitrosos mutagênicos e carcinogênicos, pois eles são inibidores da reação de N-nitrosação in vitro. Além disso, o ácido clorogênico pode inibir danos ao

DNA in vitro (TAPIERO et al, 2002). In vivo, o ácido clorogênico aumentou a tolerância à glicose, diminuiu alguns lipídeos do plasma e do fígado e melhorou a distribuição de minerais em ratos nas condições do estudo de SOTILLO et al, (2002). O ácido clorogênico também se demonstrou eficiente na prevenção in vivo de diversos tipos de cânceres, como o de fígado e cólon em hamsters (MORI et al, 1986), de cólon em ratos (MORISHITA et al, 1997) e de língua em ratos (TANAKA et al, 1993). Abaixo se observa a estrutura do ácido clorogênico.

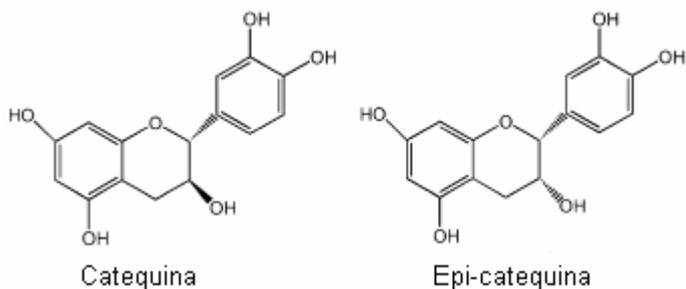


Ácido Clorogênico

Os flavonóides são os polifenóis mais abundantes da dieta humana e representam uma subclasse de polifenóis com estrutura C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>. Eles podem ser divididos em várias classes dependendo do grau de oxidação do oxigênio heterocíclico. As principais classes são flavonóis, isoflavonas, flavanonas, flavonas e flavanóis. As catequinas são os principais flavanóis e são encontrados no chá verde, vinho e chocolate (TAPIERO et al, 2002).

As catequinas do chá verde podem aliviar a inflamação pela inibição das enzimas COX 1 e COX 2 e diminuição da produção das prostaglandinas. A propriedade mais importante das catequinas é a sua habilidade antioxidativa para impedir radicais livres de danificar biomoléculas, quelar íons metálicos catalíticos da formação de radicais livres e impedir oxigênios singletes da ativação de moléculas orgânicas para formar peróxidos e radicais livres. Tais propriedades previnem danos ao DNA por espécies reativas do oxigênio. Catequinas são, portanto, antimutagênicas e anticarcinogênicas. As catequinas também se demonstraram úteis na proteção de neurônios e células hepáticas contra danos de radicais livres gerados durante isquemia, aumento da resistência de células vermelhas do sangue ao estresse oxidativo, retardo da progressão de cataratas, inibir o estresse oxidativo na pele causado por radiação ultravioleta e reduzir o nível de colesterol, por proteção da oxidação das lipoproteínas de baixa densidade (CHU et al, 2004).

Abaixo podem ser observadas as estruturas da catequina e da epi-catequina.



Após a análise mais criteriosa dos perfis cromatográficos obtidos com os extratos brutos das cascas e folhas, observou-se que os extratos possuem vários outros compostos com perfil espectral de UV parecido com os da catequina e epi-catequina. Este fato é devido à planta sintetizar outros compostos com os mesmos cromóforos da catequina e epi-catequina, provavelmente outras substâncias que possuem o núcleo fundamental flavan-3-ol na sua estrutura. A polimerização deste núcleo é a responsável pela formação dos taninos condensados, compostos que foram detectados no perfil fitoquímico. Estes compostos estão presentes em maior concentração nas cascas que nas folhas da planta. Além disso, PIZZOLATTI et al, (2002) já demonstraram a presença de compostos com este núcleo fundamental nas cascas da *Trichilia catigua*.

Observando a grande quantidade de compostos com núcleo flavan-3-ol nos extratos e a falta de destes padrões disponíveis comercialmente, optou-se em realizar a análise quantitativa apenas do ácido clorogênico nos extratos. O ácido clorogênico é um cafeoilquínico relativamente comum no reino vegetal, já considerado marcador químico de outras plantas medicinais como a alcachofra, além de estar disponível comercialmente e ser relativamente barato, fato imprescindível para rotinas de controle da qualidade.

Tendo isto em vista, otimizou-se o gradiente de eluição da CLAE visando a simplificação da análise quantitativa do ácido clorogênico. Desenvolveu-se um método capaz de separar convenientemente o ácido clorogênico dos outros compostos do extrato em 20 minutos, diminuindo significativamente o tempo da

análise e o custo operacional. Esta metodologia foi então validada para ser utilizada na quantificação do ácido clorogênico nos testes de eficiência extrativa. Os cromatogramas dos extratos brutos e suas análises espectrais de pureza podem ser observados nas figuras 34 a 37.

FIGURA 34– ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

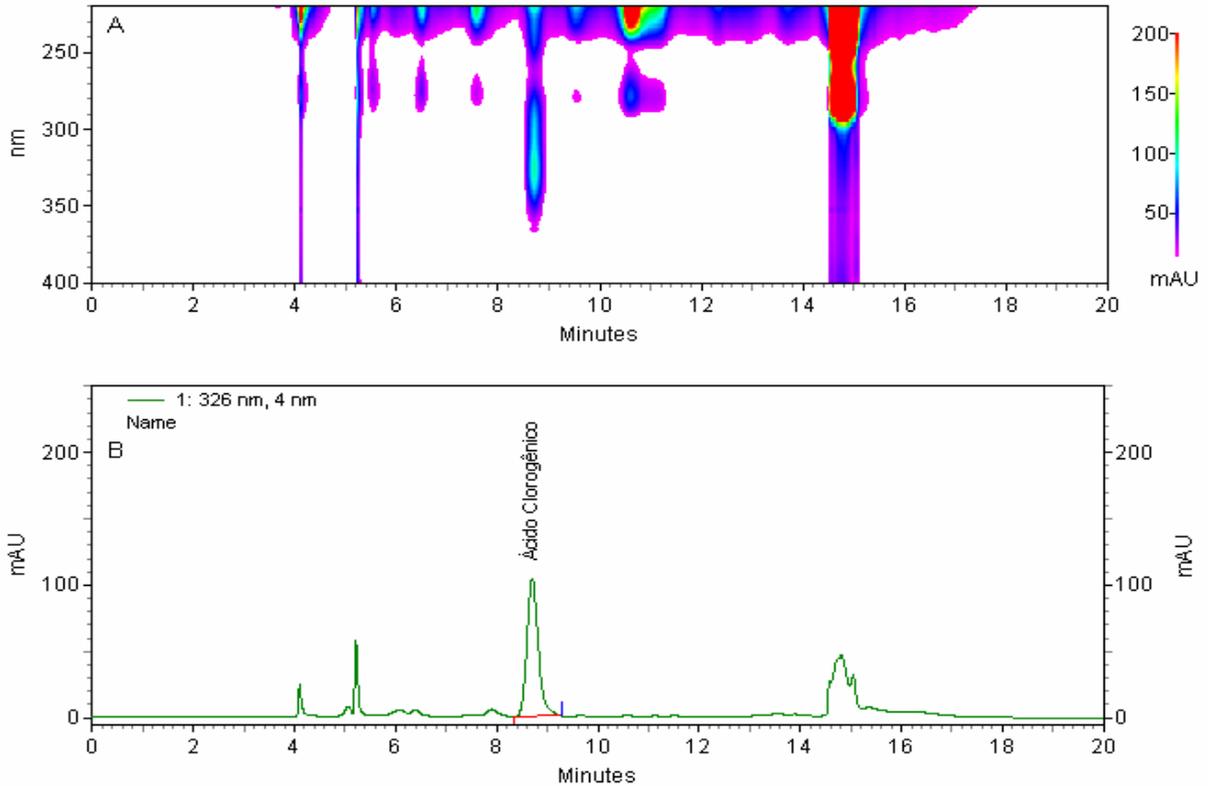


FIGURA 35– ESPECTRO DE UV (B) E ANÁLISE DE PUREZA (A) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO NO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

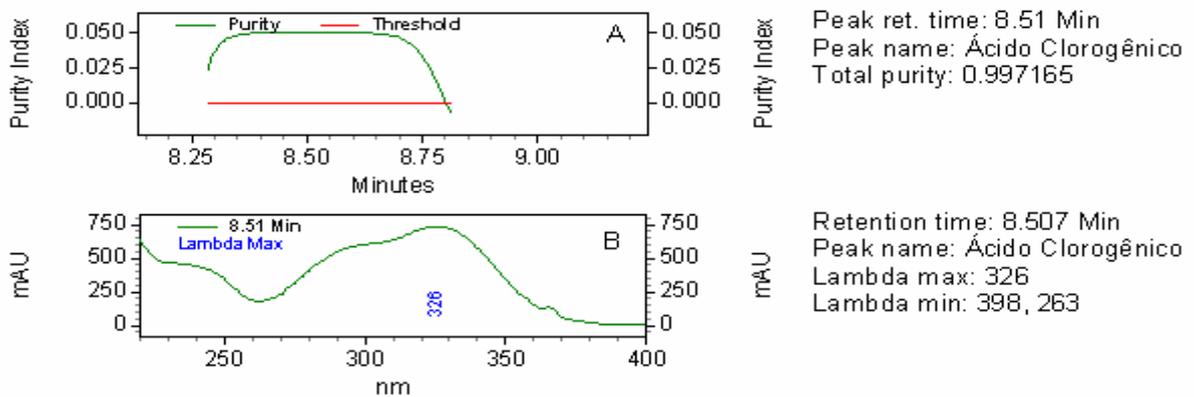


FIGURA 36– ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

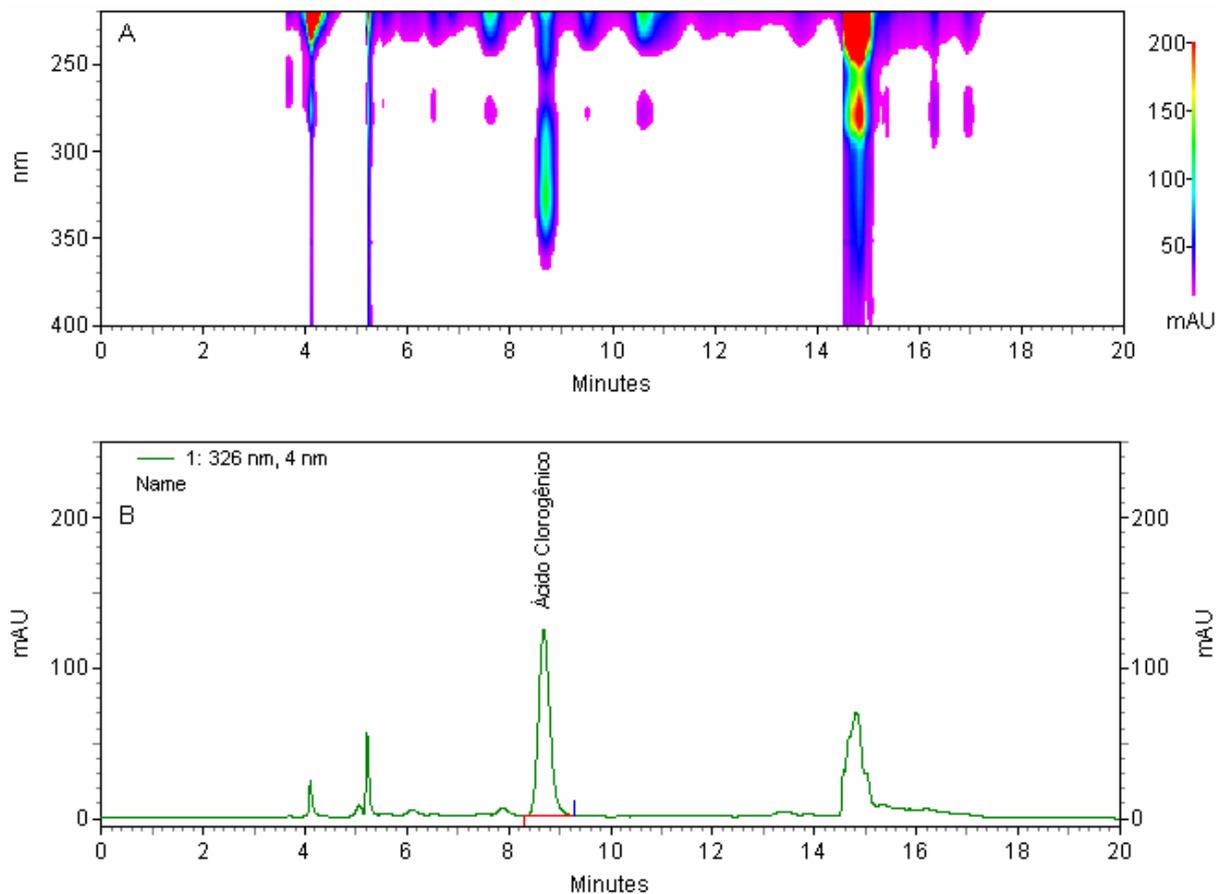
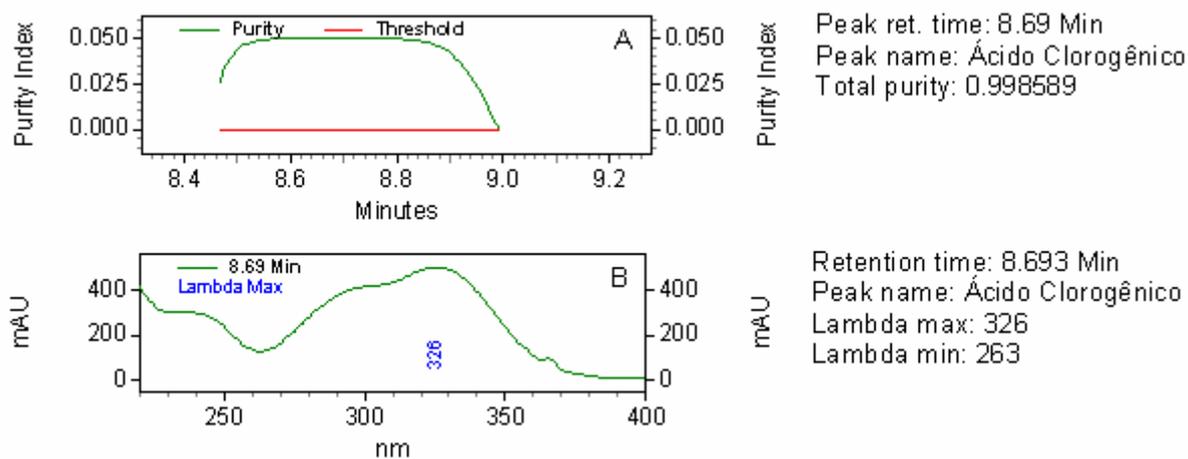


FIGURA 37– ESPECTRO DE UV (B) E ANÁLISE DE PUREZA (A) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO NO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE



### 5.2.2 Cromatografia Gasosa

A vantagem da cromatografia gasosa claramente está em sua alta sensibilidade para a detecção de quase todos os componentes químicos voláteis. Isto é especialmente verdadeiro para a detecção usual de ionização de chama (DIC). Além disso, a alta seletividade das colunas capilares proporciona a separação de muitos compostos voláteis simultaneamente em tempo relativamente curto. Assim, nas últimas décadas, CG tornou-se uma ferramenta analítica popular e útil no campo de pesquisa das plantas medicinais (LIANG 2004).

Entretanto, a mais séria desvantagem da CG é que ela não é conveniente para a análise de amostras que contenham compostos polares ou não voláteis. Por isso, é necessário trabalhar no preparo da amostra, onde pode incluir derivatização (LIANG 2004). Este fato foi levado em consideração no presente estudo, pois no preparo da amostra os extratos brutos foram extraídos com éter de petróleo, portanto somente os compostos apolares solúveis neste solvente foram injetados no CG.

Primeiramente utilizaram-se as condições cromatográficas descritas por CARVALHO (2002) para a análise de perfil de esteróides e triterpenos dos extratos e a possibilidade de identificação de marcadores químicos.

Esteróides são um grupo de substâncias que ocorrem naturalmente derivadas de isopentenóides hidroxilados policíclicos contendo a estrutura 1,2 ciclopentanofenantreno. Estes compostos contêm um total de 27 a 30 átomos de carbono (o número de átomos de carbono no precursor biosintético óxido de esqualeno) nos quais uma cadeia lateral com número de átomos de carbono maior ou igual a 7 ligada no carbono de posição 17. Suas estruturas estão intimamente relacionadas e variam dependendo da extensão das modificações do sistema anelar e modificações da cadeia lateral. Assim, o número e posições das duplas ligações em ambos sistemas policíclicos e cadeia lateral dos esteróides podem ser diferentes (ABIDI et al, 2001).

Os esteróides possuem um amplo espectro de atividades biológicas e propriedades físicas. Esteróides de plantas (por exemplo fitoesteróis), em particular

são importantes produtos agrícolas para indústrias farmacêuticas e alimentícias. Eles são emulsificantes úteis para a indústria de cosméticos e suprem a maior parte de intermediários esteroidais e precursores para a produção de hormônios farmacêuticos. Alguns esteróis de plantas com estruturas específicas inibem a deterioração oxidativa de óleos servindo como potentes agentes antipolimerizantes para óleos de fritura. Atividades hipocolesterolêmicas de alguns fitoesteróis (por exemplo, esteróides da soja, componentes de óleos vegetais e sitosterol) foram documentadas. Os análogos saturados dos fitoesteróis e seus ésteres foram sugeridos como agentes efetivos para baixar o nível de colesterol do sangue oferecendo benefícios cardiológicos (ABIDI et al, 2001). A mistura dos triterpenos alfa e beta amirina produziram atividade antinociceptiva periférica, espinhal e supraespinhal em roedores provavelmente por mecanismos que envolvem a inibição das vias metabólicas das proteínas quinase A e quinase C (OTUKI et al, 2005).

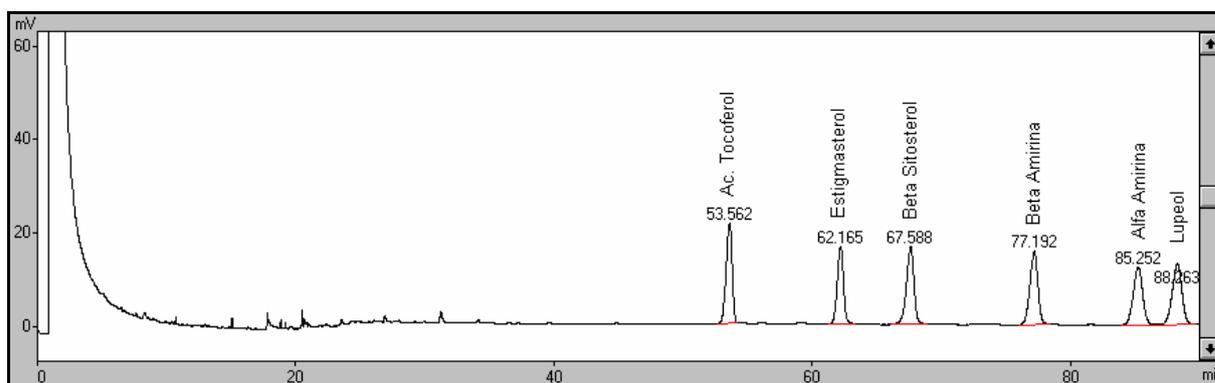
A avaliação de fitoesteróis misturados com uma diversidade de compostos não saponificáveis em lipídeos de plantas de matriz complexa é uma tarefa formidável e requer técnicas analíticas confiáveis para a extração, isolamento, separação, purificação, detecção de análises quantitativas. Dados da literatura revelam que a maioria dos pesquisadores prefere técnicas de CG capilar como métodos de escolha para a análise de esteróides e compostos relacionados. Em alguns casos a CG parece prover maior seletividade para certos isômeros que a CLAE (ABIDI, 2001).

Colunas capilares de sílica fundida contêm fases estacionárias quimicamente ligadas de diferentes polaridades. Quando colunas capilares de alta temperatura são utilizadas, análises de amostras com esteróis podem ser realizadas com alto grau de detecção, sensibilidade e resolução dos componentes. Em análises típicas, o detector de ionização de chama é utilizado para monitorar as análises. Outros detectores (por exemplo detectores de captura de elétrons ou de condutividade térmica) são menos utilizados porque o detector de ionização de chama tem melhores respostas em termos de sensibilidade, linearidade de resposta e generalidade de resposta (ABIDI, 2001).

O método utilizado para a detecção dos padrões de esteróides e triterpenos mostrou-se eficiente para a separação dos compostos estudados. Como estes

compostos possuem estruturas de polaridade semelhante foi preciso utilizar um método com tempo longo de análise e com um gradiente de temperatura brando. Obteve-se assim o cromatograma dos padrões dos esteróides estigmasterol e beta sitosterol, e dos triterpenos lupeol, alfa-amirina e beta-amirina. Este cromatograma pode ser observado na figura 38.

FIGURA 38– CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ESTERÓIDES DO MÉTODO QUALITATIVO DA CG.



Com a realização desta análise foi possível calcular os tempos de retenção relativa dos padrões de referência de esteróides e triterpenos em relação ao padrão interno de acetato de tocoferol. A retenção relativa (RR) é dada pela razão do tempo de retenção do padrão de referência pelo tempo de retenção do padrão interno. Estes dados são importantes para a identificação destes compostos nos extratos brutos, onde os tempos de retenção relativa devem ser muito parecidos com os do cromatograma padrão. A Tabela 13 mostra esses dados.

TABELA 13– RETENÇÃO RELATIVA DOS PADRÕES DE ESTERÓIDES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CG.

<b>Padrão</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>	<b>Retenção relativa</b>
Acetato de tocoferol	53,532	1,000
Estigmasterol	62,165	1,161
Beta sitosterol	67,588	1,263
Beta amirina	77,192	1,442
Alfa amirina	85,252	1,593
Lupeol	88,263	1,649

Utilizando estas mesmas condições cromatográficas foram injetados os extratos brutos das cascas e folhas na intenção da possível identificação de algum dos compostos injetados. Obteve-se assim o perfil cromatográfico de esteróides e triterpenos dos extratos brutos das cascas e folhas da espécie. Após as análises dos cromatogramas dos extratos brutos, verificou-se a coincidência de picos nos mesmos tempos de retenção do estigmasterol com RR = 1,163 nas cascas e RR = 1,165 nas folhas. Também se verificou a presença do beta sitosterol com RR = 1,262 nas cascas e RR = 1,268 nas folhas. Esta pequena variação na retenção relativa obtida com o cromatograma dos padrões e dos extratos brutos se deve ao fato das amostras dos extratos brutos possuírem número de compostos muito superior à amostra dos padrões, diminuindo o número de pratos teóricos da coluna, além do fato do equipamento não possuir injetor automático. A presença de esteróides e ausência de triterpenos havia sido observada na realização do perfil fitoquímico confirmando os resultados obtidos na CG. Os cromatogramas dos extratos brutos das cascas e folhas podem ser observados nas figuras 39 e 40.

FIGURA 39– CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DO MÉTODO QUALITATIVO DA CG

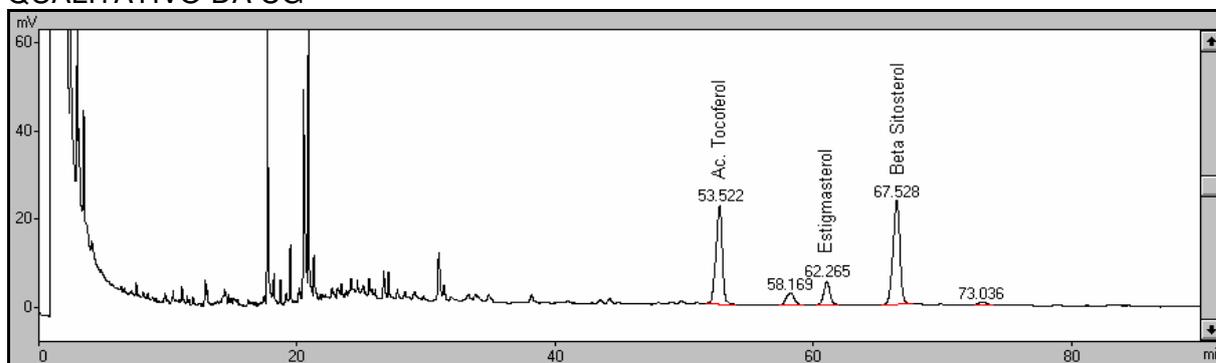
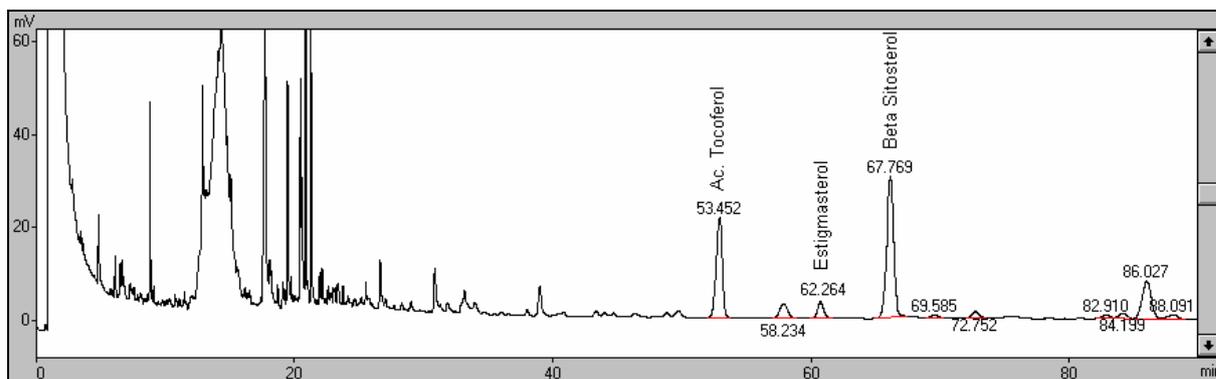


FIGURA 40– CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS DO MÉTODO QUALITATIVO DA CG



A presença de estigmasterol e beta sitosterol nos extratos brutos foi confirmada pela adição destes padrões aos extratos. Os extratos adicionados dos padrões foram cromatografados e observou-se que a área dos picos correspondentes aumentou sem o aparecimento de novos picos no cromatograma. Estes dados condizem com a pesquisa bibliográfica realizada, pois PIZZOLLATTI et al, (2004) também demonstraram a presença destes compostos nas cascas da *Trichilia catigua*. Os cromatogramas dessas análises podem ser observados nas figuras 41 e 42.

FIGURA 41– CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CG

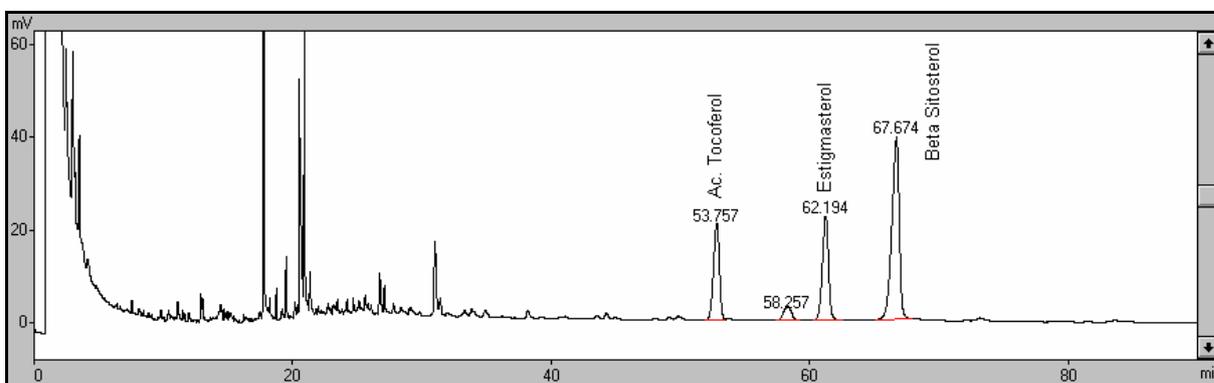
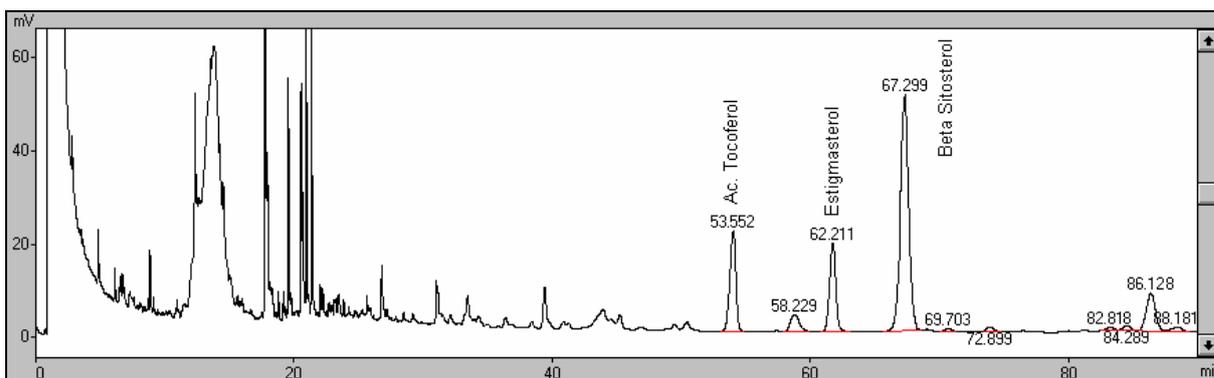


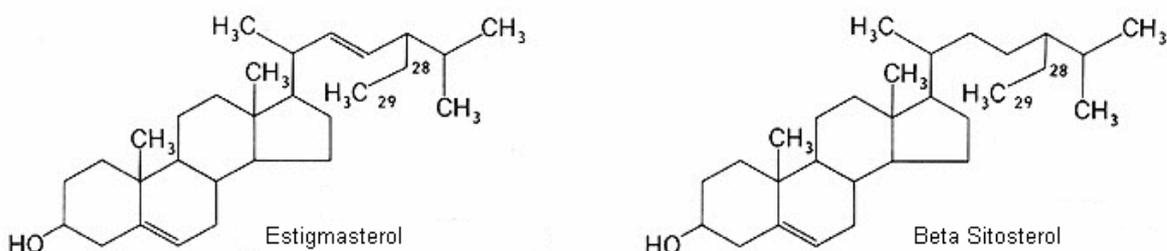
FIGURA 42– CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS ADICIONADO DOS PADRÕES NO MÉTODO QUALITATIVO DA CG



Observando os cromatogramas dos extratos brutos observa-se que o esteróide beta sitosterol é o composto presente em maior quantidade, portanto optou-se para a análise quantitativa apenas deste composto nos extratos. O beta

sitosterol é um esteróide comum no reino vegetal, já identificado em outras plantas medicinais, além de estar disponível comercialmente e ser relativamente barato, fato imprescindível para rotinas de controle da qualidade.

Estudos *in vitro* demonstraram a atividade preventiva de câncer do beta sitosterol em células de cólon (CHOI et al, 2003). Estudos *in vivo* em animais demonstraram que o beta sitosterol livre e glicosilado exibiram atividades antiinflamatória, antineoplásica, antipirética e imuno modulatória (BOUIC et al, 1999). Abaixo observam-se as estruturas do beta siosterol e do estigmasterol.



Portanto, resolveu-se desenvolver outro método visando a simplificação da análise do beta sitosterol. Utilizou-se para isto outra coluna cromatográfica mais polar (ZB-1), fato que permitiu separar convenientemente o beta sitosterol (RR = 1,159) dos outros compostos do extrato em 60 minutos, diminuindo significativamente o tempo da análise e o custo operacional. Apesar de separar bem o beta sitosterol dos outros padrões, esta coluna não teve resolução para a separação do lupeol da alfa amirina, os quais foram eluídos juntos da coluna cromatográfica resultando no último pico do cromatograma dos padrões com área maior que o dos outros padrões bem resolvidos. Como estes compostos não estão presentes nos extratos estudados este fato foi ignorado. Esta metodologia foi então validada para ser utilizada na quantificação do beta sitosterol nos testes de eficiência extrativa. Os cromatogramas dos padrões e dos extratos brutos no método quantitativo podem ser observados nas figuras 43 a 45.

FIGURA 43– CROMATOGRAMA DOS PADRÕES DE ESTERÓIDES E TRITERPENOS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG

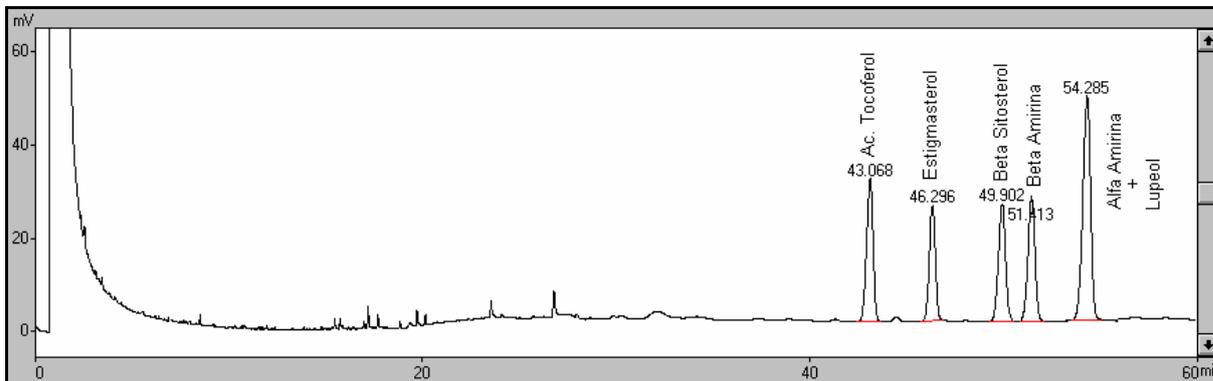


FIGURA 44– CROMATOGRAMA EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG

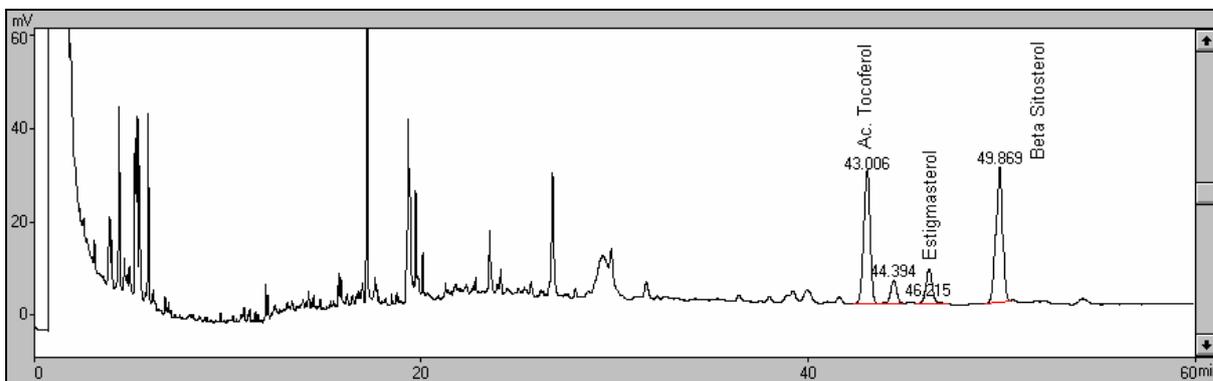
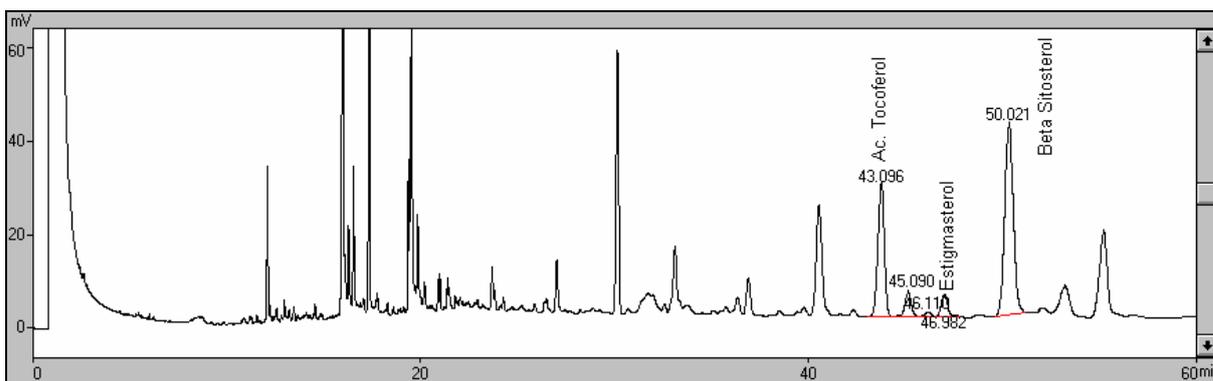


FIGURA 45– CROMATOGRAMA EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG



### 5.2.3 Cromatografia em Camada Delgada

CCD foi o método de escolha para a análise de plantas medicinais antes que os métodos cromatográficos de CG ou CLAE fossem estabelecidos. Hoje em dia a CCD é ainda freqüentemente utilizada para a análise de plantas medicinais, pois várias farmacopéias utilizam esta técnica para providenciar os primeiros perfis cromatográficos das plantas. Usualmente, a CCD é utilizada como um método fácil para a pesquisa inicial, com uma avaliação semiquantitativa aliada outra forma de cromatografia (LIANG et al, 2004).

A CCD tem a vantagem de inúmeras possibilidades de detecção na análise de plantas medicinais. Além disso, CCD é uma metodologia simples e pode ser empregada para a análise de múltiplas amostras. Para cada placa, mais de 30 pontos de amostras podem ser estudados simultaneamente. Por isso o uso da CCD é ainda muito popular na análise de plantas medicinais. Em suma, as vantagens da utilização da CCD para a construção de perfis cromatográficos de plantas medicinais são sua simplicidade, versatilidade, alta velocidade, sensibilidade específica e simples preparo da amostra. Assim, CCD é um método conveniente de determinação da qualidade e possível adulteração de plantas medicinais (LIANG et al, 2004).

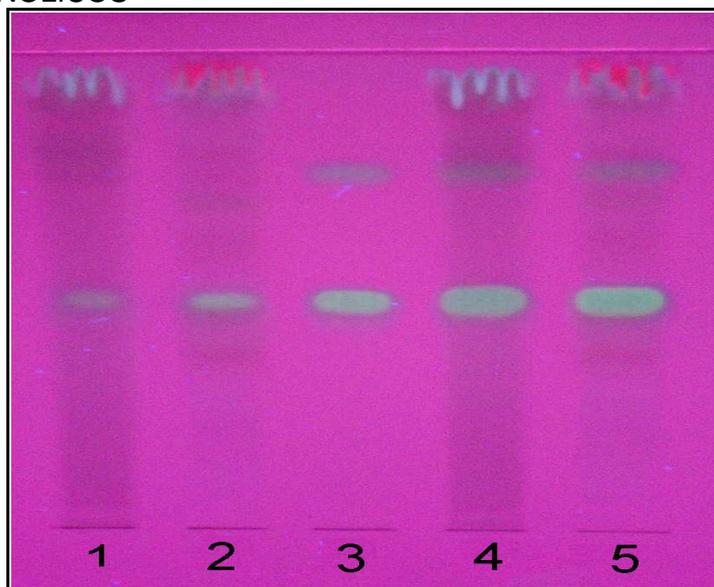
Foram efetuadas análises qualitativas por CCD com o propósito da avaliação da presença dos marcadores químicos identificados e do estabelecimento de perfis cromatográficos de compostos fenólicos e esteróides para a espécie.

O perfil cromatográfico obtido para a análise de fenólicos demonstrou-se muito parecido para as duas partes estudadas da planta. O ácido clorogênico foi convenientemente resolvido dos outros fenólicos da planta nas condições utilizadas apresentando fluorescência amarelada e Rf de 0,48.

Ambos os extratos brutos das cascas e das folhas demonstraram a presença do ácido clorogênico. Esta presença foi confirmada pela adição do padrão nas amostras, fato que provocou o aumento da fluorescência no Rf característico do ácido clorogênico, sem provocar o aparecimento de novas manchas no

cromatograma. Na figura 46 pode-se conferir o resultado do perfil cromatográfico da análise de CCD para a visualização de compostos fenólicos.

FIGURA 46- PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD PARA VISUALIZAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS



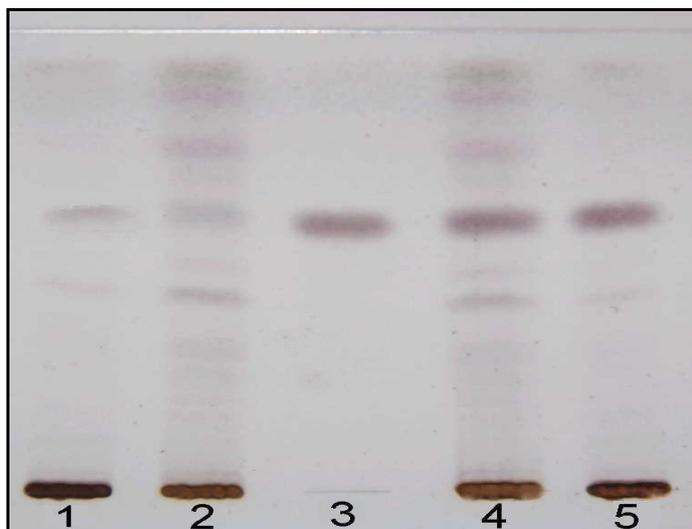
1- Extrato bruto das cascas, 2- Extrato bruto das folhas, 3- Padrão de ácido clorogênico, 4- Extrato bruto das cascas adicionado do padrão de ácido clorogênico e 5- Extrato bruto das folhas adicionado do padrão de ácido clorogênico.

Da mesma forma o perfil cromatográfico obtido para a análise de esteróides demonstrou-se muito parecido para as duas partes da planta estudadas. O beta sitosterol pode ser convenientemente resolvido dos outros esteróides da planta nas condições utilizadas apresentando coloração marrom e Rf de 0,57.

Ambos os extratos brutos das cascas e das folhas demonstraram a presença do beta sitosterol. Esta presença foi confirmada pela adição do padrão nas amostras, fato que provocou o aumento da intensidade de cor no Rf característico do beta-sitosterol, sem provocar o aparecimento de novas manchas no cromatograma.

Na figura 47 se confere o resultado do perfil cromatográfico da análise de CCD para a visualização de esteróides e triterpenos.

FIGURA 47- PERFIL CROMATOGRÁFICO EM CCD PARA VISUALIZAÇÃO DE ESTERÓIDES



1- Extrato bruto das cascas, 2- Extrato bruto das folhas, 3- Padrão de beta-sitosterol, 4- Extrato bruto das cascas adicionado do padrão de beta-sitosterol e 5- Extrato bruto das folhas adicionado do padrão de beta-sitosterol.

Ambas as análises de CCD desenvolvidas demonstraram-se satisfatórias para a detecção dos compostos estudados e podem ser utilizadas na identificação qualitativa destes compostos para o controle da qualidade desta planta.

#### 5.2.4 Validação dos Métodos Analíticos Quantitativos

Validar é estar com o objetivo voltado para a confiabilidade analítica do laboratório e do método desenvolvido para se obter o resultado desejado. Validação 100 % é utopia, sempre haverá um critério pessoal, ou seja, aceitar sempre gerará um conflito. É importante lembrar que não existe modelo pronto para sistemas de validação, portanto deve-se fazer adaptações, adequando as recomendações às suas necessidades (LEITE, 2002).

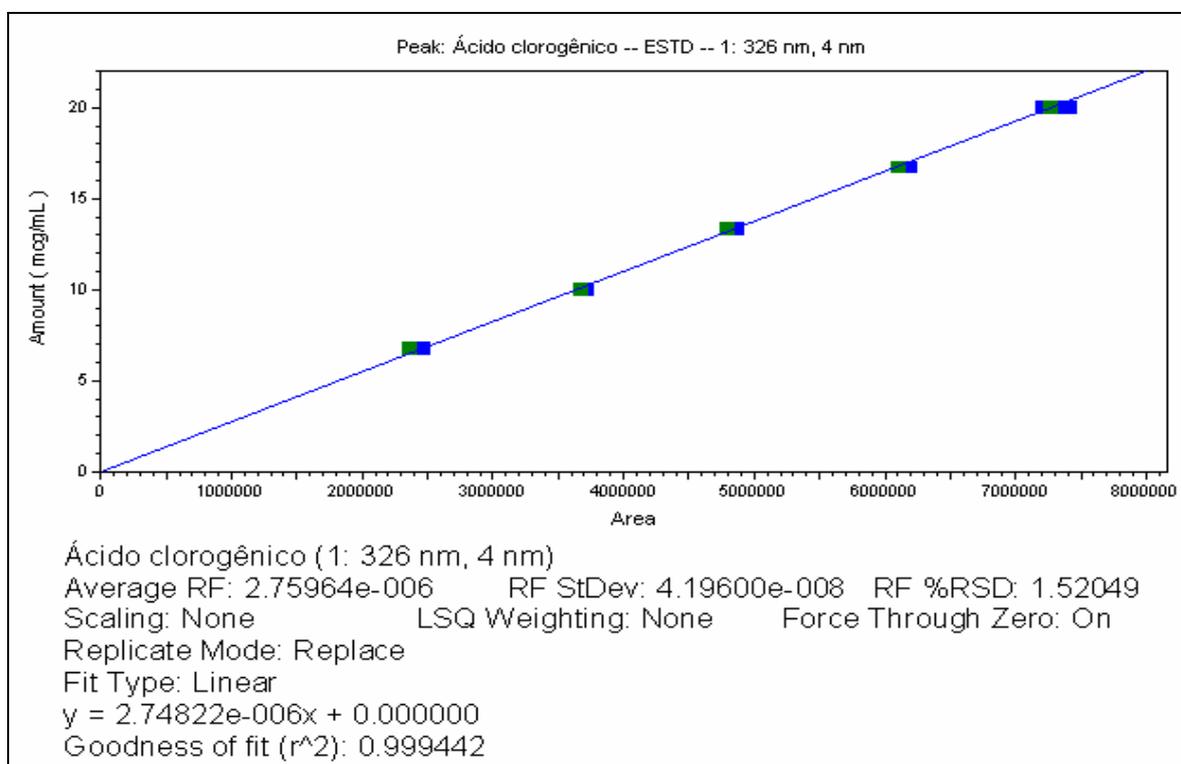
## 5.2.4.1 Validação do método de doseamento de ácido clorogênico por CLAE

### 5.2.4.1.1 Linearidade

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica demonstrar que os resultados analíticos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes. Estas concentrações devem seguir os limites do intervalo de trabalho (ANVISA, 2003).

De acordo com o coeficiente de correlação obtido para o ácido clorogênico, 0.999442, a curva de calibração mostra relação linear entre a concentração e a área integrada nos intervalos de concentrações analisados para o analito em pesquisa. A figura 48 mostra o resultado da análise de linearidade do ácido clorogênico.

FIGURA 48– CURVA DE LINEARIDADE DO ÁCIDO CLOROGÊNICO



#### 5.2.4.1.2 Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (ANVISA, 2003). A Tabela 14 demonstra os resultados da análise de exatidão realizada.

TABELA 14 – RESULTADO DO TESTE DE EXATIDÃO PARA ÁCIDO CLOROGÊNICO.

<i><b>Amostra</b></i>	<i><b>Concentração de ácido clorogênico adicionada (µg/mL)</b></i>	<i><b>Concentração de ácido clorogênico encontrada (µg/mL)</b></i>	<i><b>Recuperação (%)</b></i>
50 %.1		6,77	101,04
50 %.2	6,70	6,75	100,75
50 %.3		6,73	100,45
<b>Média</b>		<b>6,75</b>	<b>100,75</b>
DP		0,02	0,30
CV%		0,30	0,30
IC		6,75 ± 0,02	100,75 ± 0,34
100 %.1		13,20	99,25
100 %.2	13,30	13,38	100,60
100 %.3		13,39	100,68
<b>Média</b>		<b>13,32</b>	<b>100,18</b>
DP		0,11	0,80
CV%		0,80	0,80
IC		13,32 ± 0,12	100,18 ± 0,91
150 %.1		20,14	100,70
150 %.2	20,00	19,82	99,10
150 %.3		19,99	99,95
<b>Média</b>		<b>19,98</b>	<b>99,92</b>
DP		0,16	0,80
CV%		0,80	0,80
IC		19,98 ± 0,18	99,92 ± 0,91

Analisando os resultados, percebe-se que o método em análise apresenta exatidão, pois as porcentagens de recuperação 100,75 %, 100,18 % e 99,92 %,

respectivamente para as análises de 50 %, 100 % e 150 %, estão dentro do limite esperado, ou seja, entre 95 % e 105 %. Além disso, o intervalo de confiança (IC) indica que o valor verdadeiro encontrado está dentro da faixa de valores associados aos valores obtidos.

#### 5.2.4.1.3 Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Em métodos cromatográficos, deve-se tomar as precauções necessárias para garantir a pureza dos picos cromatográficos. A utilização de testes de pureza de pico (por exemplo, com auxílio de detector de arranjo de fotodiodos ou espectrometria de massas) são interessantes para demonstrar que o pico cromatográfico é atribuído a um só componente (ANVISA, 2003).

Demonstrou-se que o método proposto apresenta especificidade, pois o cromatograma do placebo das cascas e folhas indica a ausência de resposta do analito ao método, não havendo interferência da matriz nem do solvente extrator na análise quantitativa. Além disso, a análise espectral realizada pelo detector de DAD evidenciou que o pico correspondente ao ácido clorogênico no extrato bruto das cascas da catuaba está puro, com índice de pureza igual a 0,9972, ou seja, pureza 99,72 %. Da mesma forma o pico correspondente ao ácido clorogênico no extrato bruto das folhas também está puro, com índice de pureza igual a 0,9986, ou seja, pureza 99,86 %. Estes dados garantem a especificidade de quantificação do analito livre de outras impurezas do extrato. Os cromatogramas, espectrogramas e dados de pureza de pico da análise de especificidade podem ser observados nas figuras 49 a 56.

FIGURA 49- ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO PLACEBO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

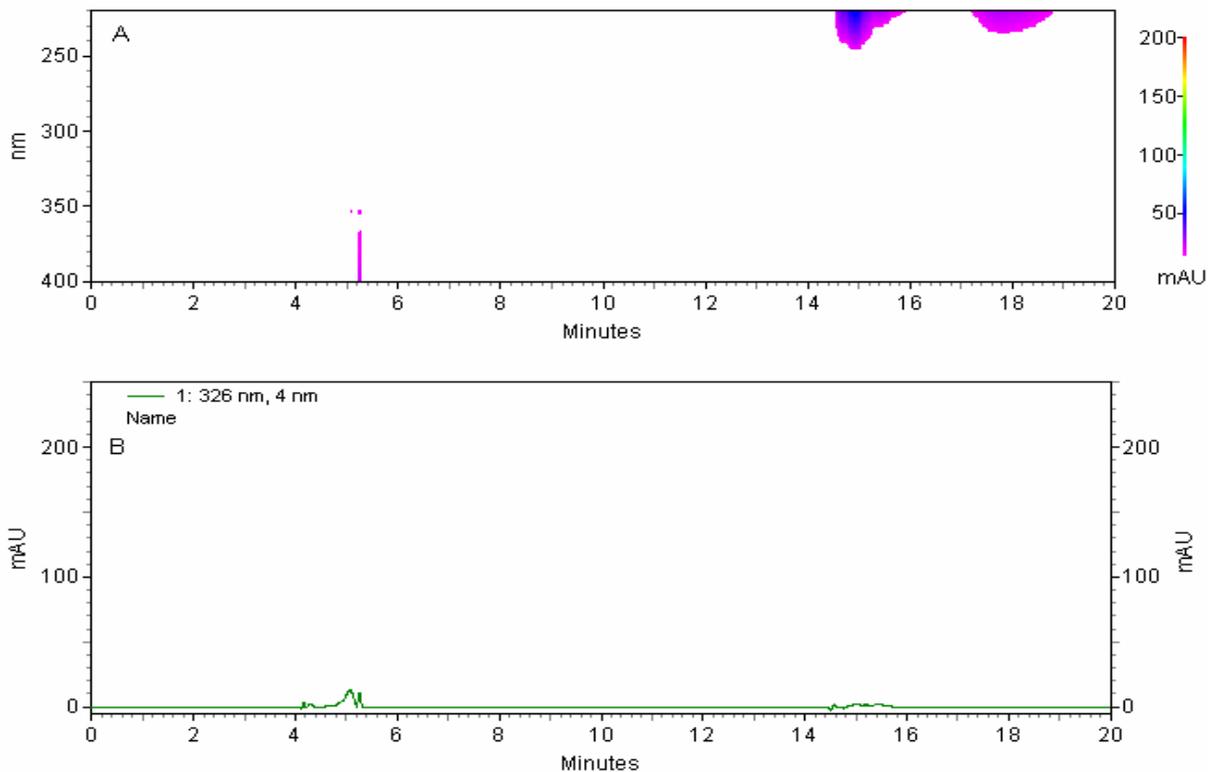


FIGURA 50- ESPECTROGRAMA E CROMATOGRAMA DO PLACEBO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

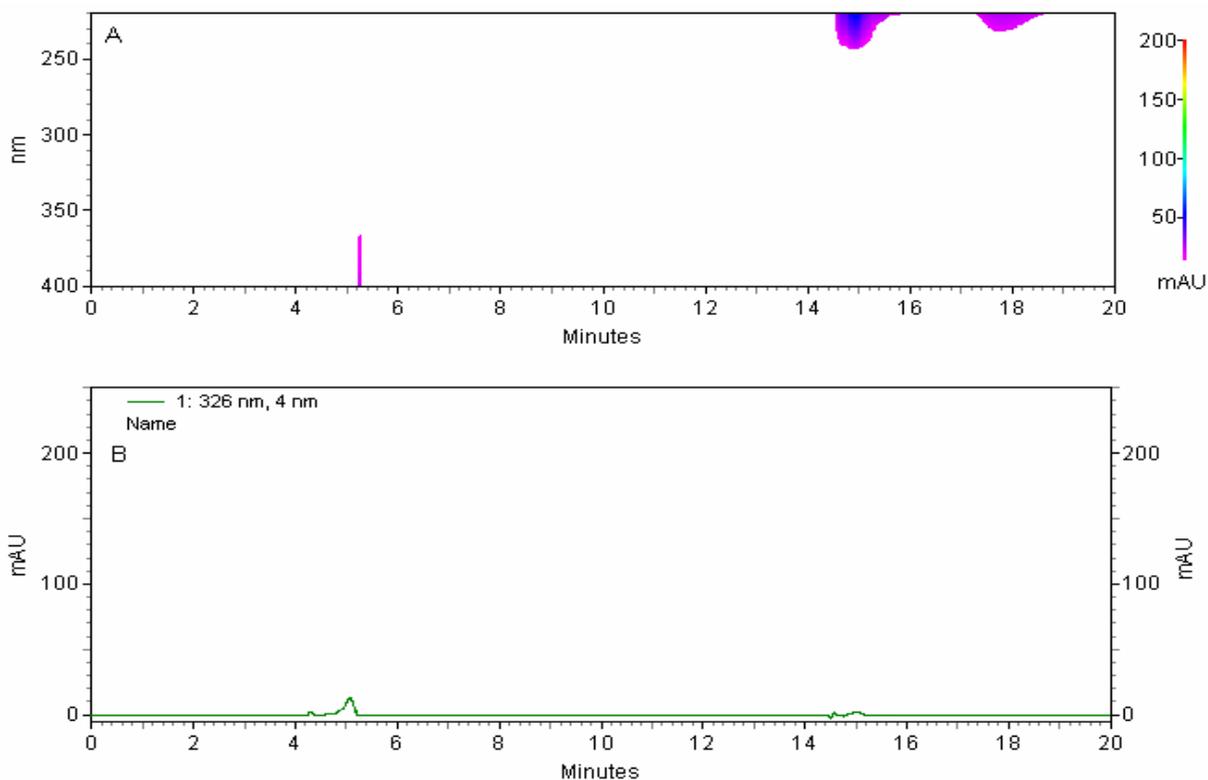


FIGURA 51- ESPECTROGRAMA E CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

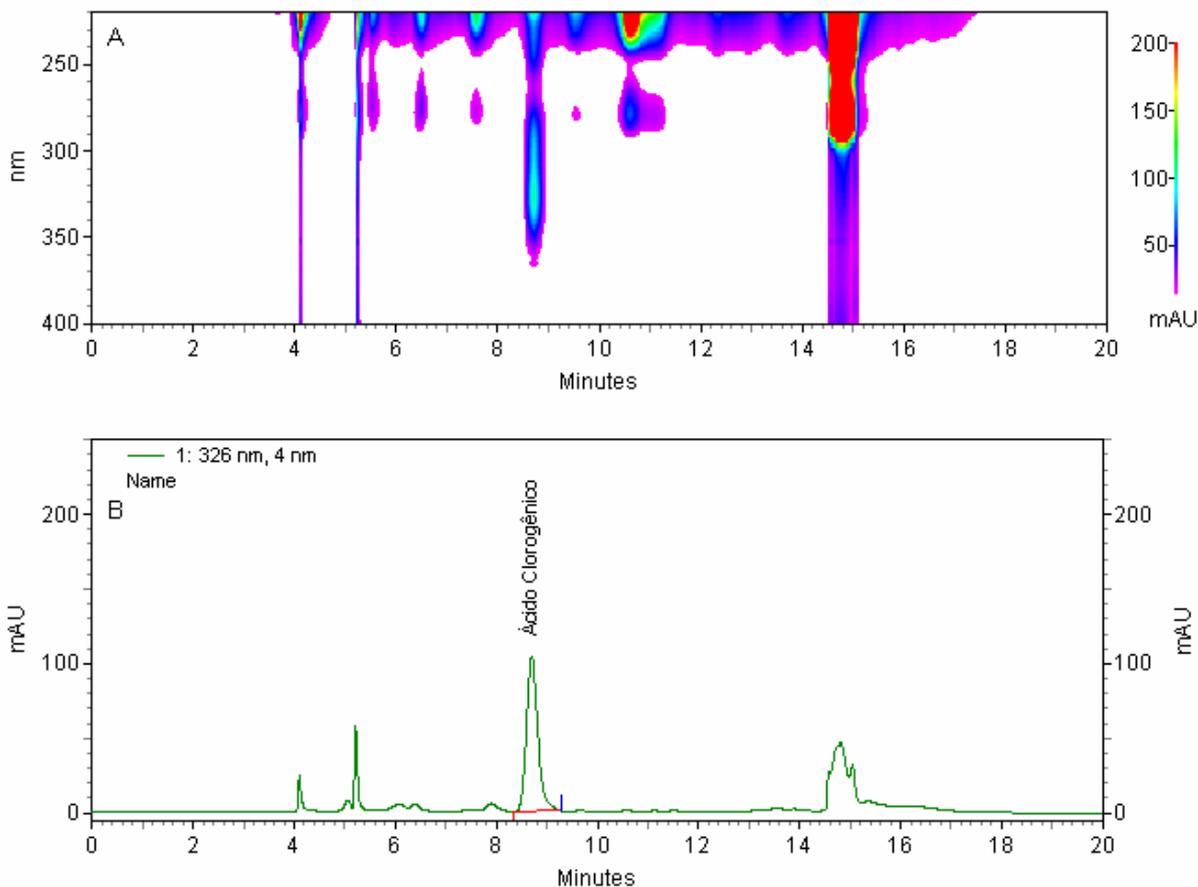


FIGURA 52- ANÁLISE DE PUREZA (A) E ESPECTRO DE UV (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO DO CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

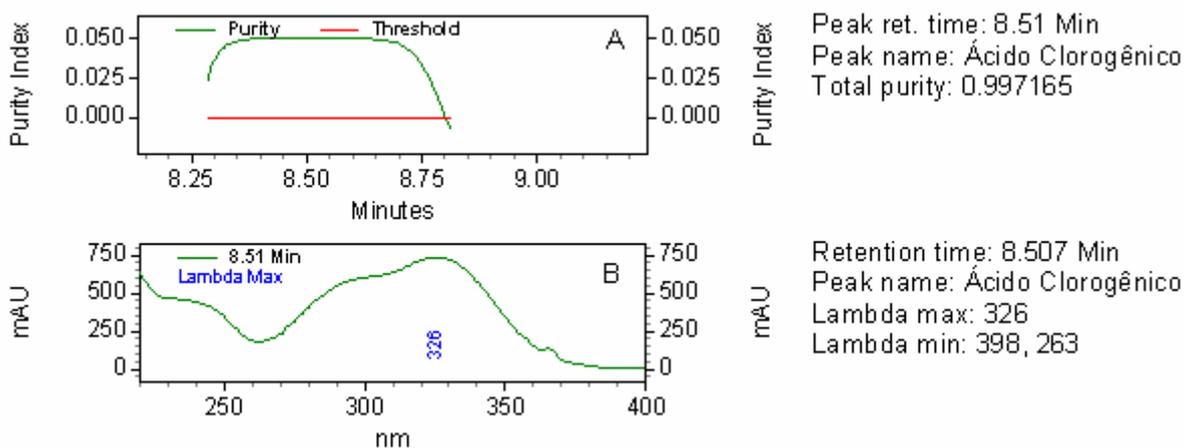


FIGURA 53- ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

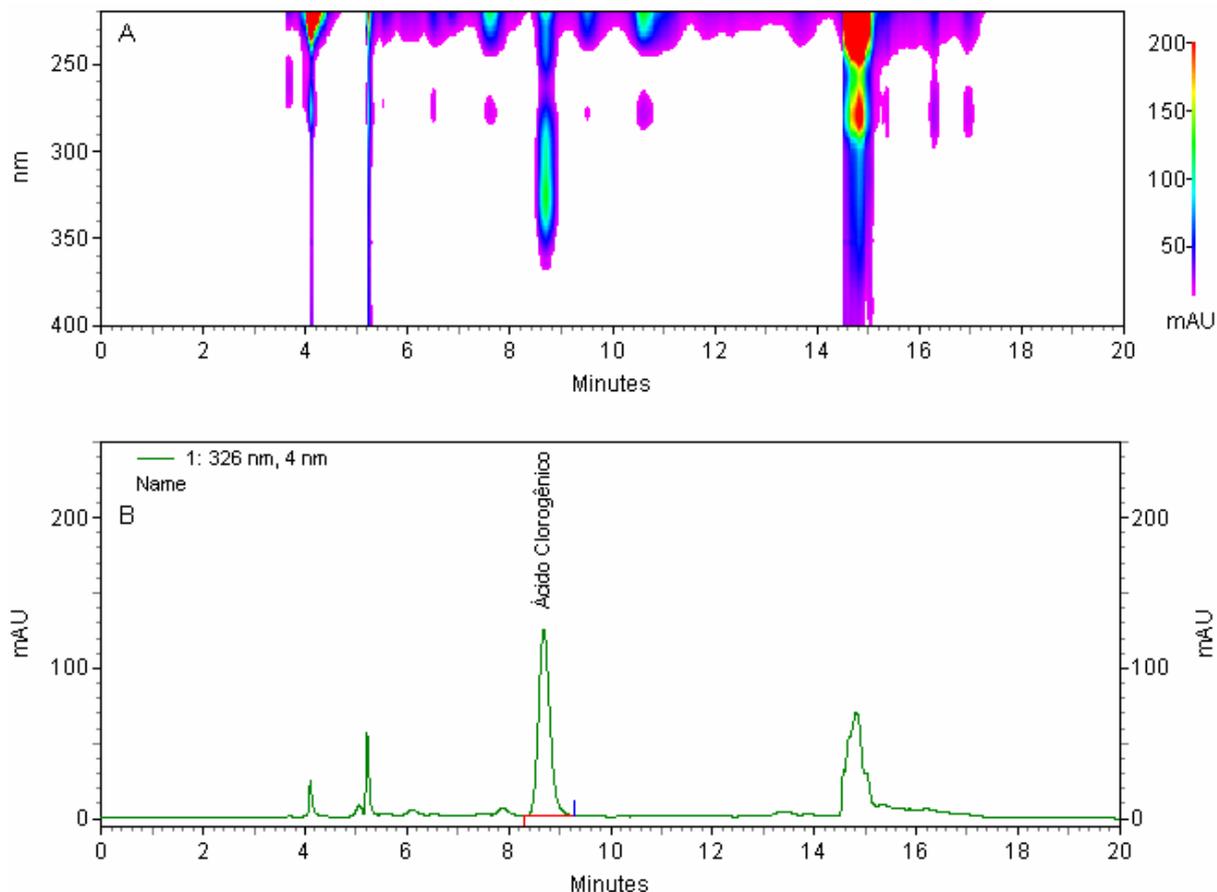


FIGURA 54- ANÁLISE DE PUREZA (A) E ESPECTRO DE UV (B) DO ÁCIDO CLOROGÊNICO DO CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

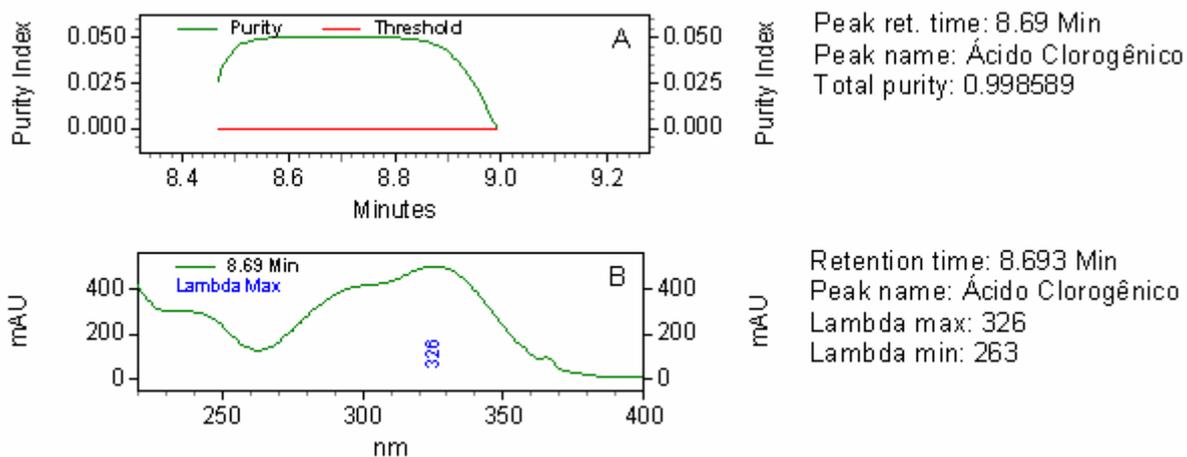


FIGURA 55- ESPECTROGRAMA (A) E CROMATOGRAMA (B) DO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE

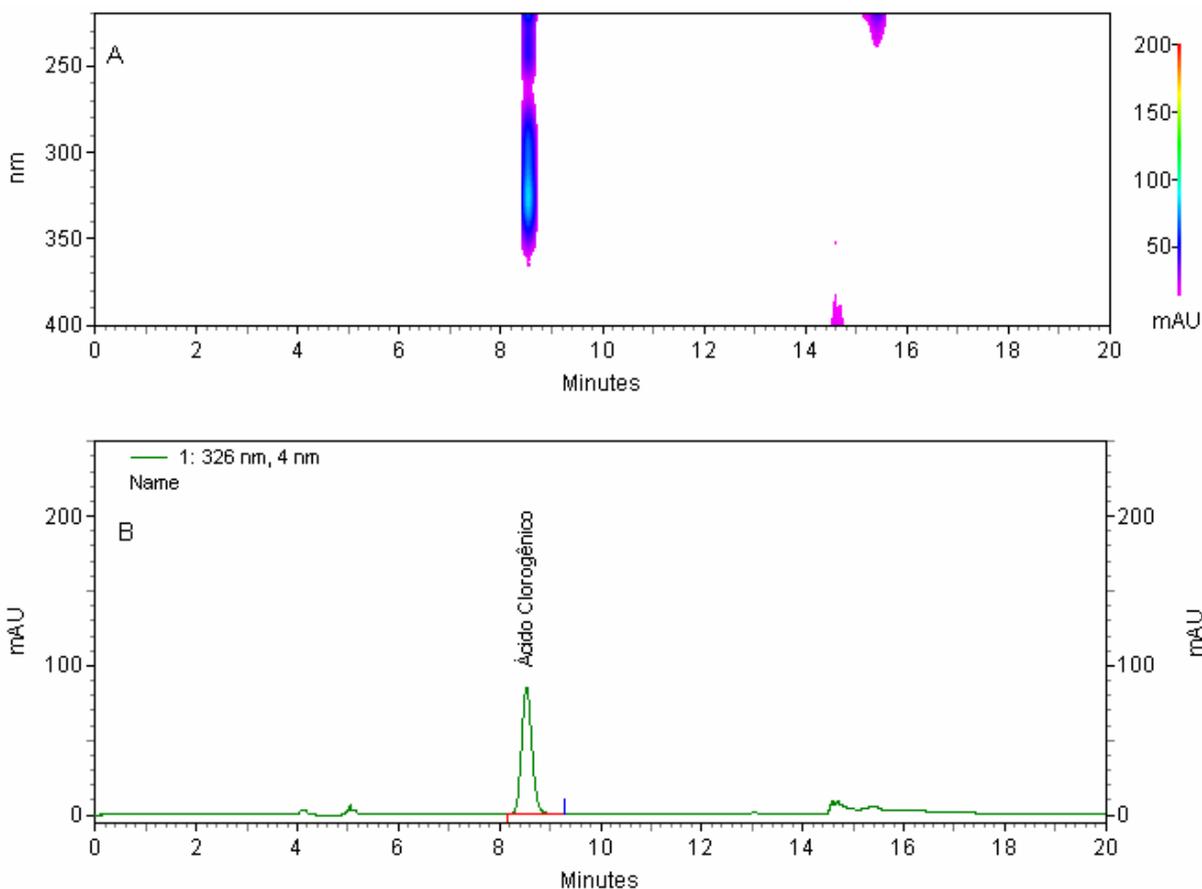
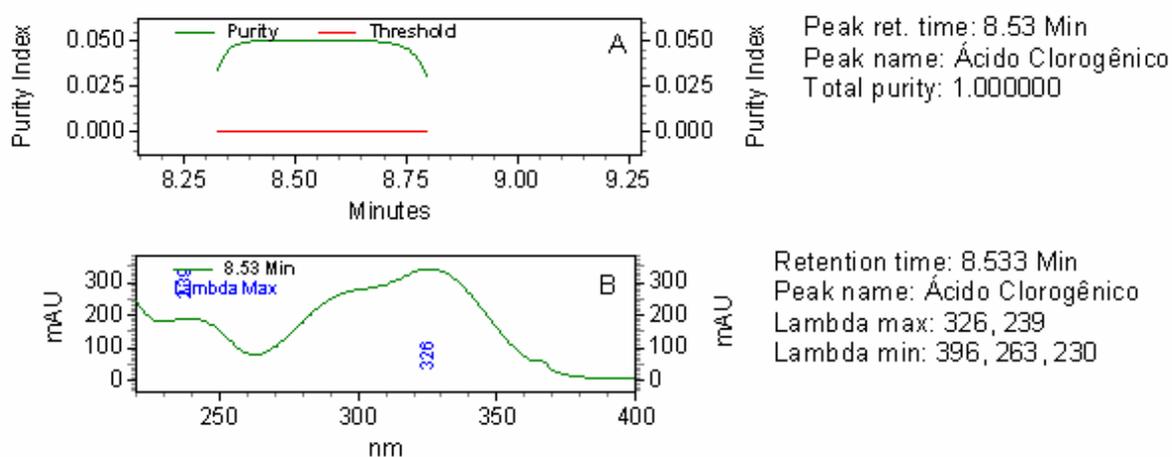


FIGURA 56- ANÁLISE DE PUREZA E ESPECTRO UV DO PADRÃO DE ÁCIDO CLOROGÊNICO NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CLAE



#### 5.2.4.1.4- Precisão por repetibilidade

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. A precisão por repetibilidade é a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (ANVISA, 2003). As Tabelas 15 e 16 demonstram os resultados desta análise.

TABELA 15- RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE

<b>Replicatas</b>	<b>Concentração de Ácido Clorogênico encontrada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>		
	<b>Primeira análise</b>	<b>Segunda análise</b>	<b>Terceira análise</b>
1	945,59	950,321	946,259
2	947,99	951,235	946,321
3	946,02	950,236	947,929
4	945,09	951,475	947,524
5	947,74	950,952	946,746
6	947,03	951,067	948,249
<b>Média</b>	<b>946,58</b>	<b>950,88</b>	<b>947,17</b>
DP	1,19	0,50	0,85
CV %	0,13	0,05	0,09

TABELA 16- AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO ÁCIDO CLOROGÊNICO

<b>Análise</b>	<b>Média da concentração de ácido clorogênico encontrada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
Primeira	946,58
Segunda	950,88
Terceira	947,17
<b>Média</b>	<b>948,21</b>
DP	2,33
CV %	0,25

O método proposto apresenta precisão por repetibilidade, pois os coeficientes de variação (CV %) encontrados entre as três determinações realizadas para este fim encontram-se dentro do limite esperado, isto é, menor ou igual a 5 %.

#### 5.2.4.1.5 Precisão intermediária

A precisão intermediária é a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes. Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes (ANVISA, 2003). As Tabelas 17 e 18 demonstram os resultados desta análise.

TABELA 17- RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA

<i>Replicatas</i>	<i>Concentração de Ácido Clorogênico encontrada (µg/g)</i>		
	<i>Primeiro analista</i>	<i>Segundo analista</i>	<i>Terceiro analista</i>
1	951,241	956,658	949,958
2	952,325	957,524	948,921
3	954,325	956,958	950,365
4	952,958	958,326	951,322
5	953,254	957,741	949,635
6	951,247	959,339	947,682
<b>Média</b>	<b>952,56</b>	<b>957,76</b>	<b>949,65</b>
DP	1,21	0,97	1,25
CV %	0,13	0,10	0,13

TABELA 18- AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO ÁCIDO CLOROGÊNICO

<b>Análise</b>	<b>Média da concentração de ácido clorogênico encontrada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
Primeiro analista	952,56
Segundo analista	957,76
Terceiro analista	949,65
<b>Média</b>	<b>953,32</b>
DP	4,11
CV %	0,43

O método proposto apresenta precisão intermediária, pois os coeficientes de variação (CV %) encontrados entre as três determinações realizadas neste teste estão dentro do limite esperado, isto é, menor ou igual a 5 %;

#### 5.2.4.1.6- Intervalo

O intervalo de aplicação do método foi considerado a concentração compreendida entre 6,7 e 20  $\mu\text{g/mL}$  de ácido clorogênico na solução amostra.

#### 5.2.4.1.7 Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal. Durante o desenvolvimento da metodologia, deve-se considerar a avaliação da robustez. Constatando-se a susceptibilidade do método à variações nas condições analíticas, estas deverão ser controladas e precauções devem ser incluídas no procedimento. Para a CLAE os fatores que podem ser

considerados na determinação da robustez do método analítico são: variação do pH da fase móvel, variação na composição da fase móvel, diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e fluxo da fase móvel (ANVISA, 2003). As Tabelas 19 e 20 demonstram os resultados desta análise.

TABELA 19 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO ÁCIDO CLOROGÊNICO

<i>Replicatas</i>	<i>Concentração de Ácido Clorogênico encontrada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</i>		
	<i>Troca de coluna cromatográfica</i>	<i>Alteração de pH da fase móvel</i>	<i>Alteração da temperatura do forno</i>
1	951,958	946,58	951,362
2	951,254	946,53	952,147
3	949,325	947,25	953,849
4	952,475	946,98	954,024
5	949,697	946,87	952,541
6	950,625	946,36	953,693
<b>Média</b>	<b>950,89</b>	<b>946,76</b>	<b>952,94</b>
Desvio	1,24	0,33	1,08
CV %	0,13	0,03	0,11

TABELA 20 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO ÁCIDO CLOROGÊNICO

<i>Análise</i>	<i>Média da concentração de ácido clorogênico encontrada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</i>
Troca de coluna cromatográfica	950,89
Alteração de pH da fase móvel	946,76
Alteração da temperatura do forno	952,94
<b>Média</b>	<b>950,20</b>
Desvio	3,15
CV %	0,33

As leituras do teor de ácido clorogênico com outra coluna analítica de lote diferente da usada para as análises anteriores demonstraram desvio padrão relativo (CV) de 0,13 % indicando assim a robustez do método para esta alteração. Da mesma forma a alteração do pH da fase móvel em menos 0,2 pontos (de 2,20 para

2,00) resultou em um CV de 0,03 % indicando que o método permanece estável para esta alteração. Finalmente, o aumento da temperatura do forno de colunas de 25 para 27 °C também não promoveu mudanças significativas no teor de ácido clorogênico dosado, demonstrando um CV de 0,11 %.

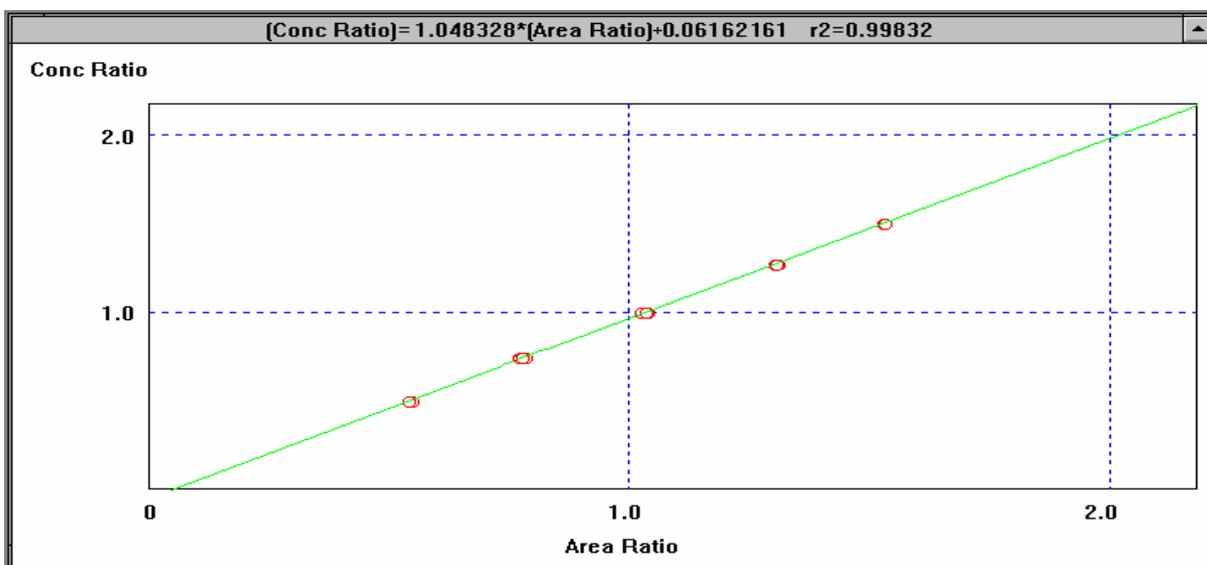
Com os resultados obtidos na série de análises realizadas de acordo com os parâmetros exigidos pela Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003 da Anvisa, conclui-se que o método utilizado para o doseamento de ácido clorogênico no extrato soxhlet de catuaba cascas e folhas por CLAE pode ser considerado validado.

#### 5.2.4.2 Validação do método de doseamento de beta sitosterol por CG

##### 5.2.4.2.1 Linearidade

De acordo com o coeficiente de correlação obtido para o beta sitosterol, 0.99832, a curva de calibração mostra relação linear entre a concentração e a área integrada nos intervalos de concentrações analisados para o analito em pesquisa. A figura 57 mostra o resultado da análise de linearidade do beta sitosterol.

FIGURA 57– CURVA DE LINEARIDADE DO BETA SITOSTEROL



#### 5.2.4.2.2 Exatidão

A Tabela 21 demonstra os resultados da análise de exatidão realizada.

TABELA 21 – RESULTADO DO TESTE DE EXATIDÃO PARA O BETA SITOSTEROL

<i><b>Amostra</b></i>	<i><b>Concentração de Beta sitosterol adicionada</b></i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i><b>Concentração de Beta sitosterol encontrada</b></i> ( $\mu\text{g/mL}$ )	<i><b>Recuperação</b></i> (%)
50 % - 1		49,52	99,04
50 % - 2	50,00	50,01	100,02
50 % - 3		49,97	99,94
<b>Média</b>		<b>49,83</b>	<b>99,67</b>
DP		0,27	0,54
CV%		0,55	0,55
IC		0,31	0,62
100 % - 1		100,15	100,15
100 % - 2	100,00	100,51	100,51
100 % - 3		100,04	100,04
<b>Média</b>		<b>100,23</b>	<b>100,23</b>
DP		0,25	0,25
CV%		0,25	0,25
IC		0,28	0,28
150 % - 1		150,28	100,19
150 % - 2	150,00	150,26	100,17
150 % - 3		149,93	99,95
<b>Média</b>		<b>150,16</b>	<b>100,10</b>
DP		0,20	0,13
CV%		0,13	0,13
IC		0,22	0,15

Analisando os resultados, percebe-se que o método em análise apresenta exatidão, pois as porcentagens de recuperação 100,10 %, 100,24 % e 100,08 %

respectivamente para as análises de 50 %, 100 % e 150 % estão dentro do limite esperado, ou seja, entre 95 % e 105 %. Além disso, o intervalo de confiança (IC) indica que o valor verdadeiro encontrado está dentro da faixa de valores associados com os valores obtidos.

#### 5.2.4.2.3 Especificidade

Demonstrou-se que o método proposto apresenta especificidade, pois os cromatogramas dos placebos das cascas e folhas indicam a ausência de resposta do analito ao método, não havendo interferência da matriz nem do solvente extrator na análise quantitativa. Os cromatogramas da análise de especificidade podem ser observados nas figuras 58 a 62.

FIGURA 58- CROMATOGRAMA DO PLACEBO DAS CASCAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.

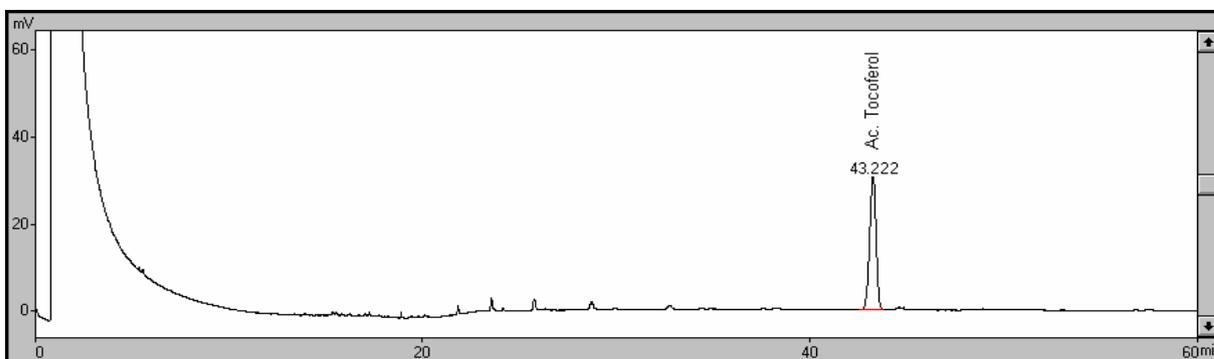


FIGURA 59- CROMATOGRAMA DO PLACEBO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG.

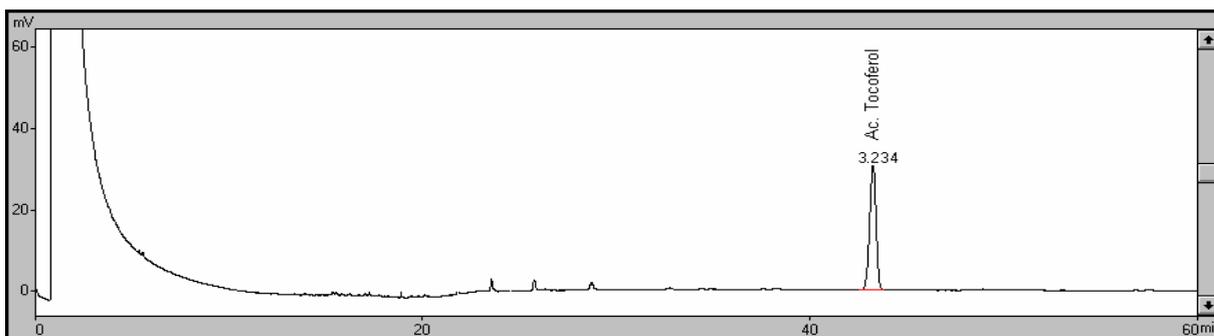


FIGURA 60- CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS CASCAS DA CATUABA NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG

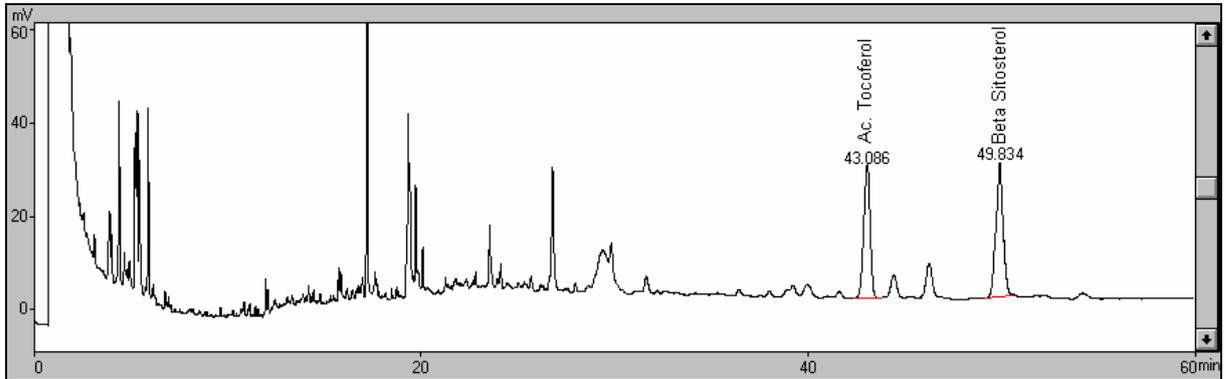


FIGURA 61- CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DAS FOLHAS NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG

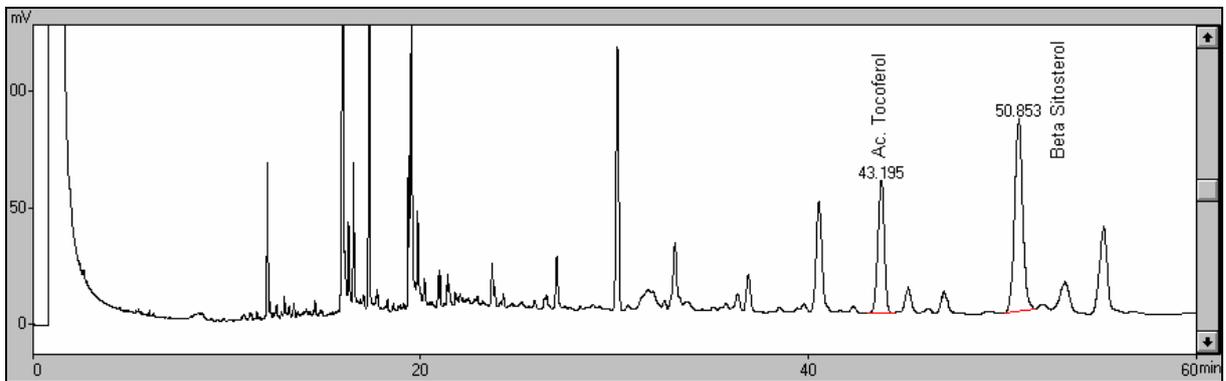
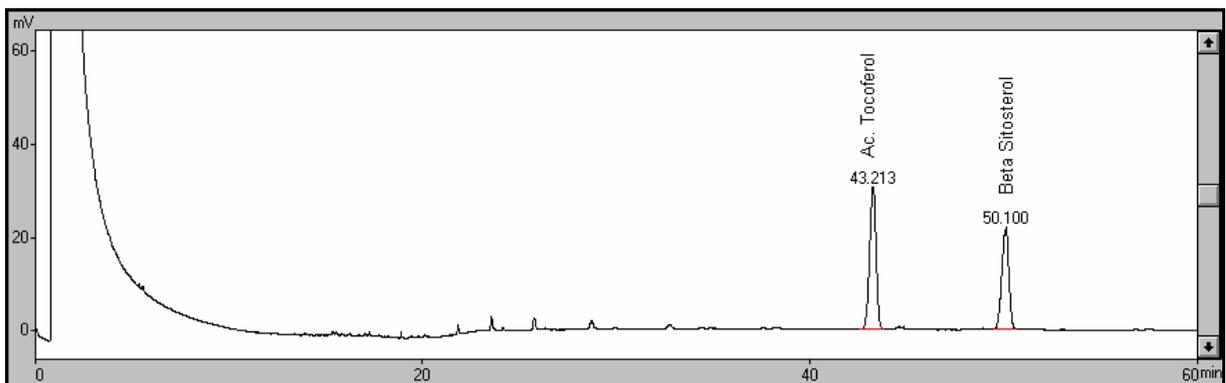


FIGURA 62- CROMATOGRAMA DO PADRÃO DE BETA SITOSTEROL NO MÉTODO QUANTITATIVO DA CG



#### 5.2.4.2.4 Precisão por Repetibilidade

As Tabelas 22 e 23 demonstram os resultados da precisão por repetibilidade.

TABELA 22 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO BETA SITOSTEROL

<i>Replicatas</i>	<i>Concentração de beta sitosterol encontrada (µg/g)</i>		
	<i>Primeira análise</i>	<i>Segunda análise</i>	<i>Terceira análise</i>
1	250,45	251,32	255,36
2	251,19	251,01	254,21
3	251,42	252,68	255,98
4	251,32	252,95	255,42
5	251,89	251,35	256,24
6	249,33	251,84	256,85
<b>Média</b>	<b>250,93</b>	<b>251,86</b>	<b>255,68</b>
DP	0,92	0,79	0,91
CV %	0,36	0,31	0,35

TABELA 23 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO POR REPETIBILIDADE DO BETA SITOSTEROL

<i>Análise</i>	<i>Média da concentração de beta sitosterol encontrada (µg/g)</i>
Primeira	250,93
Segunda	251,86
Terceira	255,68
<b>Média</b>	<b>252,82</b>
DP	2,52
CV %	1,00

O método proposto apresenta precisão por repetibilidade, pois os coeficientes de variação (CV %) encontrados entre as três determinações realizadas para este fim encontram-se dentro do limite esperado, isto é, menor ou igual a 5 %.

#### 5.2.4.2.5 Precisão Intermediária

As Tabelas 24 e 25 demonstram os resultados da precisão intermediária.

TABELA 24 - RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO BETA SITOSTEROL

<b>Replicatas</b>	<b>Concentração de beta sitosterol encontrada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>		
	<b>Primeira análise</b>	<b>Segunda análise</b>	<b>Terceira análise</b>
1	253,65	251,12	258,21
2	254,21	250,14	258,34
3	253,32	251,24	257,54
4	253,98	250,58	257,98
5	254,69	252,31	258,32
6	255,32	251,36	257,49
<b>Média</b>	<b>254,20</b>	<b>251,13</b>	<b>257,98</b>
DP	0,72	0,74	0,38
CV %	0,28	0,29	0,15

TABELA 25 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PRECISÃO INTERMEDIÁRIA DO BETA SITOSTEROL

<b>Análise</b>	<b>Média da concentração de beta sitosterol encontrada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
Primeira	254,20
Segunda	251,13
Terceira	257,98
<b>Média</b>	<b>254,44</b>
Desvio	3,43
CV %	1,35

O método proposto apresenta precisão intermediária, pois os coeficientes de variação (CV %) encontrados entre as três determinações realizadas neste teste estão dentro do limite esperado, isto é, menor ou igual a 5 %;

#### 5.2.4.2.6 Intervalo

O intervalo de aplicação do método foi considerado a concentração compreendida entre 50 e 150 µg/mL de beta sitosterol na solução amostra.

#### 5.2.4.2.7 Robustez

Para a CG os fatores que podem ser considerados na determinação da robustez do método analítico são: diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura e a velocidade do gás de arraste (ANVISA 2003). As Tabelas 26 e 27 demonstram os resultados desta análise.

TABELA 26 – RESULTADO DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO BETA SITOSTEROL

<i>Replicatas</i>	<i>Concentração de Beta sitosterol encontrada (µg/g)</i>		
	<i>Troca de coluna cromatográfica</i>	<i>Alteração da vazão do gás de arraste</i>	<i>Alteração da temperatura do forno</i>
1	251,64	252,38	255,21
2	250,69	253,62	255,47
3	251,74	252,14	255,28
4	251,31	252,59	256,39
5	250,84	252,18	254,37
6	250,39	251,39	255,51
<b>Média</b>	<b>251,10</b>	<b>252,38</b>	<b>255,37</b>
Desvio	0,54	0,73	0,65
CV %	0,22	0,29	0,25

TABELA 27 - AVALIAÇÃO DAS MÉDIAS DOS RESULTADOS DAS ANÁLISES DE ROBUSTEZ DO BETA SITOSTEROL

<b>Análise</b>	<b>Média da concentração de beta sitosterol encontrada (<math>\mu\text{g/g}</math>)</b>
Coluna	251,10
Vazão	252,38
Temperatura	255,37
<b>Média</b>	<b>252,95</b>
Desvio	2,19
CV %	0,87

As leituras do teor de beta sitosterol com outra coluna analítica de lote diferente da usada para as análises anteriores demonstraram coeficiente de variação (CV) de 0,22 % indicando assim a robustez do método para esta alteração. Da mesma forma a alteração da vazão do gás de arraste resultou em um CV de 0,29 % indicando que o método permanece estável para esta alteração. Finalmente, o aumento da temperatura do forno de colunas de 270 para 272 °C no patamar de temperatura em que é detectado o analito, também não promoveu mudanças significativas no teor de beta sitosterol dosado demonstrando CV de 0,25 %.

Com os resultados obtidos na série de análises realizadas de acordo com os parâmetros exigidos pela Resolução - RE n° 899, de 29 de maio de 2003, conclui-se que o método utilizado para o doseamento de beta sitosterol no extrato soxhlet de catuaba cascas por CG pode ser considerado validado.

### 5.3 ANÁLISES DE EFICIÊNCIA EXTRATIVA

#### 5.3.1 Quantificação do ácido clorogênico

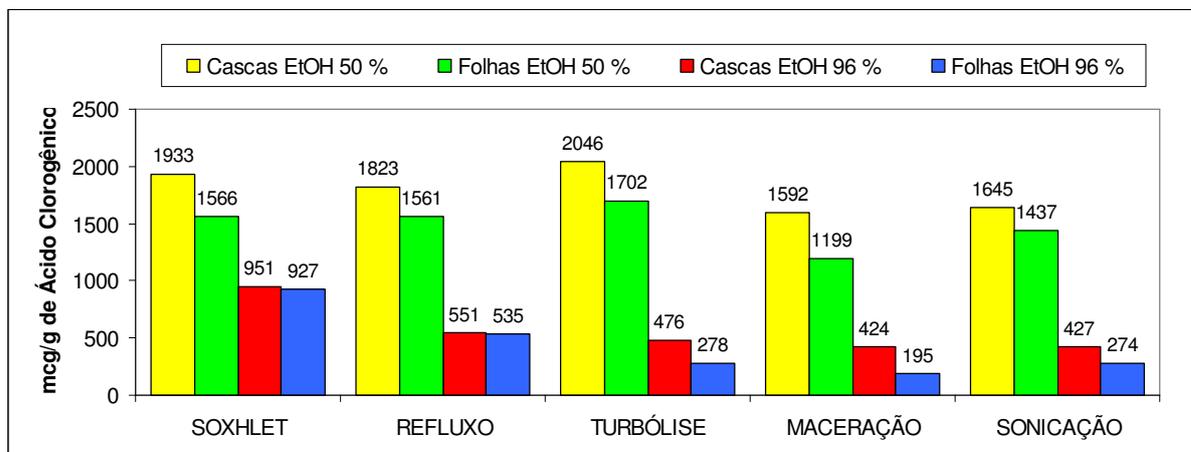
A extração de compostos fenólicos nas plantas é influenciada pela sua natureza química, método extrativo empregado, tamanho da partícula da amostra, tempo e condições de armazenamento, assim como a presença de substâncias

interferentes. A natureza química dos fenólicos das plantas varia de substâncias simples até altamente polimerizadas que incluem proporções variadas de ácidos fenólicos, fenilpropanóides, antocianinas e taninos, entre outros. Eles podem também existir como complexos com carboidratos, proteínas e outros componentes das plantas; alguns fenólicos de alto peso molecular e seus complexos podem ser muito insolúveis. Por isso, extratos fenólicos de plantas sempre são uma mistura de diferentes classes de fenólicos que são solúveis no sistema de solventes usado. Procedimentos adicionais podem ser necessários para a remoção de fenólicos indesejados e substâncias não fenólicas como ceras, gorduras, terpenos e clorofilas. Técnicas de extração em fase sólida e fracionamentos baseados na acidez são comumente utilizados para remover fenólicos indesejados e substâncias não fenólicas (NACZK et al, 2004).

A solubilidade de compostos fenólicos é governada pelo tipo de solvente (polaridade) utilizado, grau de polimerização dos fenólicos, assim como interação dos fenólicos com outros constituintes da planta e formação de complexos insolúveis. Por isso, não há procedimento uniforme ou completamente satisfatório que seja adequado para a extração de todos os fenólicos ou uma classe específica de compostos fenólicos nas plantas. Metanol, etanol, acetona, água, acetato de etila e, em menor extensão, propanol e dimetilformamida, e suas combinações são freqüentemente utilizadas para a extração de fenólicos (NACZK et al, 2004).

O doseamento de ácido clorogênico por CLAE nos extratos das cascas e folhas da *T. catigua* dos métodos de extração realizados podem ser verificados na figura 63.

FIGURA 63– TEORES DE ÁCIDO CLOROGÊNICO DOS MÉTODOS EXTRATIVOS REALIZADOS



De acordo com a figura 63 pode-se observar que o método de turbólise com etanol 50 % apresentou o maior rendimento de ácido clorogênico para a extração das cascas e folhas, com teores de 2046  $\mu\text{g/g}$  e 1702  $\mu\text{g/g}$  respectivamente. Já o método de maceração foi o menos eficiente na extração deste composto com rendimento de 1592  $\mu\text{g/g}$  e 1199  $\mu\text{g/g}$  das cascas e folhas respectivamente, cerca de 25 % menos que o método de turbólise.

Observa-se também que o segundo melhor método extrativo foi o soxhlet com etanol 50 %, então a renovação do solvente no processo extrativo ajuda a extração do ácido clorogênico, pois estas duas metodologias possuem renovação do solvente em seu processo extrativo. A pequena diferença, cerca de 6 % menor, da quantidade de ácido clorogênico extraída pelo processo de refluxo contínuo do soxhlet pode ter acontecido pela granulometria da droga. Este parâmetro não foi variado, mas futuras pesquisas podem esclarecer se a diminuição da granulometria aumentaria a quantidade de ácido clorogênico extraído. A eficiência superior da turbólise pode ser devida a pulverização das partículas da droga durante o processo extrativo, expondo assim a maior parte do conteúdo interno das células, facilitando a ação do solvente. A presença de água no solvente provoca o amolecimento dos tecidos da droga facilitando a extração do composto pelo etanol. A Tabela 28 demonstra a análise estatística das médias dos teores de ácido clorogênico nos métodos extrativos realizados.

TABELA 28 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEOR DE ÁCIDO CLOROGÊNICO DOS MÉTODOS EXTRATIVOS REALIZADOS.

<b>Método</b>	<b>Droga e Solvente</b>	<b>Média do teor de ácido clorogênico (µg/g)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Variância</b>
Soxhlet	Cascas EtOH 50%	1932,908 <sup>a</sup>	1,970	3,882
	Folhas EtOH 50%	1565,77 <sup>b</sup>	1,782	3,175
	Cascas EtOH 96%	951,24 <sup>c</sup>	2,061	4,248
	Folhas EtOH 96%	927,25 <sup>d</sup>	0,655	0,429
Refluxo	Cascas EtOH 50%	1823,40 <sup>e</sup>	3,593	12,912
	Folhas EtOH 50%	1560,92 <sup>b</sup>	2,203	4,851
	Cascas EtOH 96%	551,20 <sup>f</sup>	1,754	3,078
	Folhas EtOH 96%	534,70 <sup>g</sup>	2,324	5,399
Turbólise	Cascas EtOH 50%	2046,41 <sup>h</sup>	1,357	1,842
	Folhas EtOH 50%	1702,37 <sup>i</sup>	1,800	3,238
	Cascas EtOH 96%	475,87 <sup>j</sup>	0,514	0,264
	Folhas EtOH 96%	278,07 <sup>l</sup>	0,250	0,063
Maceração	Cascas EtOH 50%	1592,02 <sup>m</sup>	1,674	2,803
	Folhas EtOH 50%	1199,14 <sup>n</sup>	1,881	3,539
	Cascas EtOH 96%	424,07 <sup>o</sup>	1,344	1,807
	Folhas EtOH 96%	195,14 <sup>p</sup>	0,406	0,164
Sonicação	Cascas EtOH 50%	1645,22 <sup>q</sup>	2,561	6,558
	Folhas EtOH 50%	1436,60 <sup>r</sup>	0,878	0,771
	Cascas EtOH 96%	426,83 <sup>o</sup>	1,647	2,714
	Folhas EtOH 96%	274,16 <sup>l</sup>	0,774	0,600

\* Letras diferentes significam teores diferentes ao nível de 5 % de significância.

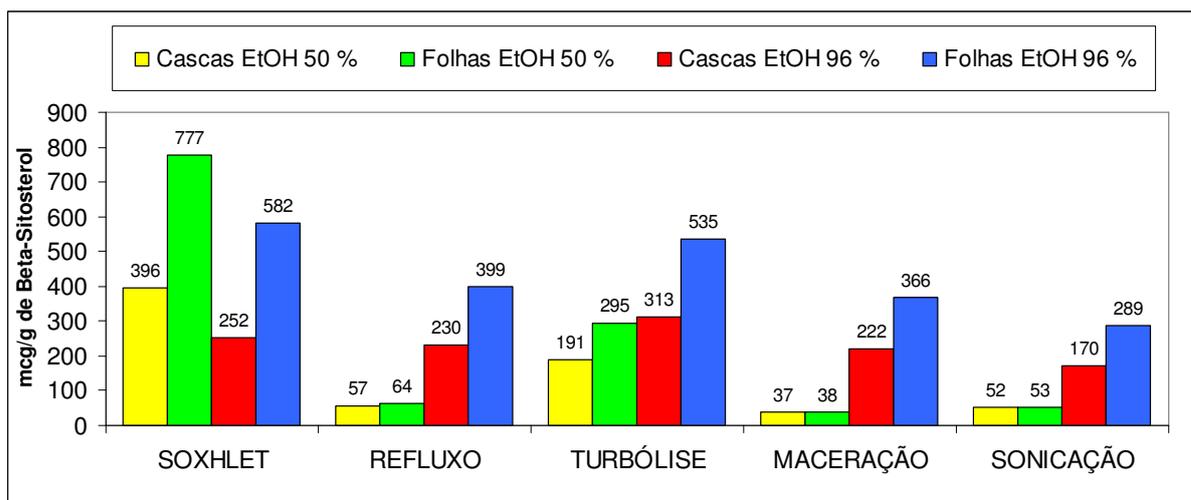
De acordo com as análises estatísticas realizadas, a maioria dos métodos de extração e concentrações de solvente foram diferentes a 5 % de significância, com exceção da extração das folhas com etanol 50 % por refluxo e soxhlet, extração das folhas com etanol 96 % por turbólise e sonicação e extração das cascas com etanol 96 % por maceração e sonicação.

As cascas apresentaram maior teor de ácido clorogênico que as folhas em todos os métodos extrativos testados.

### 5.3.2 Quantificação do beta sitosterol

O doseamento de beta sitosterol por CG nos extratos das cascas e folhas da *T. catigua* dos métodos de extração realizados podem ser verificados a figura 64.

FIGURA 64- TEORES DE BETA SITOSTEROL DOS MÉTODOS EXTRATIVOS REALIZADOS



De acordo com a figura 64 pode-se observar que o método de soxhlet com etanol 50 % apresentou o maior rendimento de beta sitosterol para a extração das cascas e folhas, com teores de 396  $\mu\text{g/g}$  e 777  $\mu\text{g/g}$  respectivamente. Já o método de maceração foi o menos eficiente na extração deste composto com rendimento de 37  $\mu\text{g/g}$  e 38  $\mu\text{g/g}$  das cascas e folhas respectivamente. Todos os outros métodos extrativos apresentaram maior rendimento com o etanol a 96 %.

Observa-se também que o segundo melhor método extrativo foi a turbólise com etanol 96 %, então a renovação do solvente no processo extrativo ajuda a extração do beta sitosterol, pois estas duas metodologias possuem renovação do solvente em seu processo extrativo. A temperatura influencia a extração de modo positivo, pois o método de soxhlet foi mais eficiente que de turbólise, mesmo com a exposição do conteúdo interno das células da droga por este método. O beta sitosterol é mais solúvel em etanol que em água, justificando seu maior rendimento em média nas extrações com etanol 96 % comparado às com etanol 50 %. Porém a extração em soxhlet com etanol 50 % foi maior que a com etanol 96 %. Este fato pode ser devido à presença de água no solvente provocar o amolecimento dos

tecidos da droga, facilitando a perfusão do etanol nos tecidos da droga. Este fato aliado ao aumento da temperatura facilitaram a extração do composto pelo etanol. Estes resultados estão de acordo com SHEN & SHAO (2005) que também demonstraram a eficiência superior da extração por soxhlet de terpenóides e esteróides nas folhas do tabaco pelo etanol. A Tabela 29 demonstra a análise estatística das médias dos teores de beta sitosterol nos métodos extrativos realizados.

TABELA 29 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DO TEOR DE BETA SITOSTEROL DOS MÉTODOS EXTRATIVOS REALIZADOS

<b>Método</b>	<b>Droga e Solvente</b>	<b>Média do teor de beta sitosterol (µg/g)</b>	<b>Desvio Padrão</b>	<b>Variância</b>
Soxhlet	Cascas EtOH 50%	396,31 <sup>a</sup>	4,803	23,066
	Folhas EtOH 50%	777,14 <sup>b</sup>	1,786	3,191
	Cascas EtOH 96%	252,33 <sup>c</sup>	3,940	15,526
Refluxo	Folhas EtOH 96%	581,65 <sup>d</sup>	1,320	1,743
	Cascas EtOH 50%	57,44 <sup>e</sup>	2,194	4,814
	Folhas EtOH 50%	64,17 <sup>ef</sup>	0,345	0,119
	Cascas EtOH 96%	230,49 <sup>g</sup>	1,980	3,920
	Folhas EtOH 96%	399,193 <sup>a</sup>	2,217	4,913
Turbólise	Cascas EtOH 50%	190,62 <sup>h</sup>	1,263	1,595
	Folhas EtOH 50%	294,7 <sup>i</sup>	4,081	16,654
	Cascas EtOH 96%	313,33 <sup>j</sup>	2,229	4,967
	Folhas EtOH 96%	534,03 <sup>l</sup>	3,846	14,788
Maceração	Cascas EtOH 50%	37,38 <sup>m</sup>	1,596	2,548
	Folhas EtOH 50%	28,29 <sup>n</sup>	1,955	3,821
	Cascas EtOH 96%	221,58 <sup>o</sup>	0,621	0,385
	Folhas EtOH 96%	366,11 <sup>p</sup>	4,699	22,084
Sonicação	Cascas EtOH 50%	51,92 <sup>e</sup>	0,542	0,294
	Folhas EtOH 50%	53,32 <sup>e</sup>	3,419	11,692
	Cascas EtOH 96%	170,34 <sup>s</sup>	0,613	0,376
	Folhas EtOH 96%	288,74 <sup>i</sup>	2,451	6,005

\* Letras diferentes significam teores diferentes ao nível de 5 % de significância.

De acordo com as análises estatísticas realizadas a maioria os métodos de extração e concentrações de solvente foram diferentes a 5 % de significância, com exceção da extração das cascas e folhas com etanol 50 % por refluxo e extração das folhas e cascas com etanol 50 % por sonicação e extração das cascas com etanol 96 % por refluxo.

As folhas apresentaram maior teor de beta sitosterol que as cascas em todos os métodos extrativos testados.

## 6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou-se útil para caracterização fitoquímica da espécie nativa *Trichilia catigua* A. Juss., Meliaceae. Em detrimento à enorme biodiversidade brasileira, ainda faltam estudos nacionais bem conduzidos que forneçam os subsídios necessários para o registro de fitoterápicos oriundos de plantas nativas. A atual legislação brasileira que trata do registro de fitoterápicos, a RDC 48 de março de 2003 da ANVISA – uma das mais rigorosas do mundo, dentre várias exigências determinou a obrigatoriedade da análise de marcadores químicos para o controle da qualidade de matérias primas vegetais. Os resultados deste estudo cumprem esta exigência, pois identificam possíveis marcadores químicos e demonstram alternativas viáveis para sua quantificação em ambas as partes da planta estudadas.

Os perfis cromatográficos desenvolvidos pelas tecnologias de CCD, CG e CLAE aliados ao estudo botânico anatômico fornecem os subsídios necessários para a caracterização da espécie. Esta é a primeira etapa do controle da qualidade de matérias-primas vegetais, pois garante a utilização da espécie correta, fato imprescindível para proporcionar a segurança e eficácia dos efeitos farmacológicos esperados do fitoterápico.

Análises cromatográficas mais específicas de CLAE puderam demonstrar pela primeira vez a presença dos compostos fenólicos ácido clorogênico, catequina e epi-catequina nas cascas e folhas da espécie. Já os ensaios de CG confirmaram a presença dos esteróides beta sitosterol e estigmasterol nas cascas da planta já citadas na literatura anteriormente (PIZZOLLATTI et al, 2004). Além disso,

demonstrou-se que as folhas além de também possuem estes compostos, os produzem em maior quantidade que as cascas.

Os métodos quantitativos desenvolvidos para a análise do ácido clorogênico por CLAE e beta sitosterol por CG demonstraram eficiência, sensibilidade e reprodutibilidade, caracterizando-se como propostas viáveis para rotinas de controle da qualidade das cascas e folhas da espécie.

Os testes de eficiência extrativa realizados para avaliação das melhores condições de extração dos marcadores químicos estudados. Avaliaram-se as técnicas de maceração, sonicação, turbólise, refluxo e soxhlet, todas com etanol 50 % e 96 % e foram doseados os marcadores químicos. Nas condições estudadas demonstrou-se que a melhor técnica para a extração do ácido clorogênico é a de turbólise com etanol 50 % e a melhor técnica para a extração do beta sitosterol é a de soxhlet com etanol a 50 %. Estas análises são de extrema valia para nortear futuros testes para o processo produtivo de extração em escala industrial da droga.

Os resultados das análises de eficiência extrativa demonstraram que as cascas possuem maior teor de compostos fenólicos e as folhas possuem maior teor de esteróides. Como a catuaba possui diversas ações farmacológicas já comprovadas, pode-se propor a utilização de extratos das folhas para ações farmacológicas características de esteróides e a utilização de extratos das cascas para ações farmacológicas características de compostos fenólicos.

Com a análise mais criteriosa dos dados apresentados neste estudo verificou-se que as cascas e folhas possuem composição química semelhantes, mas que diferem nas concentrações percentuais dos metabólicos secundários. Tendo isto em vista pode-se propor a formulação de um extrato das folhas com composição química próxima ao das cascas e submetê-lo a testes farmacológicos para as ações já comprovadas das cascas. Este fato poderia diminuir a chance de extinção da espécie, pois poderia-se substituir o uso das cascas pelas folhas. Assim poderia ser proposto o manejo do cultivo das árvores voltado para a produção de folhas, facilitando o processo de coleta da planta e tornando o processo ecologicamente correto.

## REFERÊNCIAS

ABIDI, S.L., Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. **Journal of Chromatography A**, v. 935, p. 173-201, 2001.

ANTUNES, E.; GORDO, W.M.; DE OLIVEIRA, J.F.; TEIXEIRA, C.E.; HYSLOP, S.; DE NUCCI, G., The relaxation of isolated rabbit corpus cavernosum by the herbal medicine Catuama® and its constituents. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 416-42, 2001.

ANVISA, Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. RE-899 de 29 de maio de 2003.

BARBOSA, N.R.; FISCHMANN, L.; TALIB, L.L.; GATTAZ, W.F. Inhibition of platelet phospholipase A2 activity by catuaba extract suggests anti-inflammatory properties. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 942-944, 2004.

BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros técnicos e científicos, 1976, v. 1, 305p.

BELTRAME, F. L.; CASS, Q. B.; FILHO, E. R.; BARROS, F.; CORTEZ, D.A.G.; Análisis de productos fitoterapéuticos comerciales de "catuaba" por LC-UV-MS. **Noticias Técnicas del Laboratorio**, v. 3, p. 14-16, 2004.

BELTRAME, F. L.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P.C.; FERREIRA, A.G.; TAVARES, L.A.; BERLYN, G. P.; MIKSCH, J. P. **Botanical microtechnique and cytochemistry**. Eames: Iowa State University, 1976, 326p.

BOUIC, P. J. D.; LAMPRECHT, J. H. Plant sterol and sterolins: A review of their immune-modulating properties. **Alternative Medicine Review**, v. 4 (3), p. 170-177, 1999.

CALIXTO, J.B., CABRINI, D.A. Herbal Catuaba induces endotheliumdependent and-independent vasorelaxation action on isolated vessels from rats, guinea-pigs and rabbits. **Phytotherapy Research**, v. 11, p. 32-38, 1997.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America - A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMPOS, M.M.; FERNANDES, E.S.; FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Antidepressant-like effects of *Trichilia catigua* (Catuaba) extract: evidence for dopaminergic-mediated mechanisms. **Psychopharmacology**, v. 182 (1), p. 45-53, 2005.

CARVALHO, J.L.S., **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Narstutium officinale* R. BR., Brassicaceae**. Curitiba, 2002. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

CHAMPAGNE, D. E.; KOUL, O.; ISMAN, M. B.; SCUDDER, G. G. E.; TOWERS, G. H. Biological activity of limonoids from the Rutales. **Pytichemistry**, Oxford, v.31 (2), p.377-394, 1992.

CHOI, Y. H.; KONG, K. R.; KIM, Y. A.; JUNG, K. O., KILL, J. H.; RHEE, S. H.; PARK, K. Y. Induction of Bax and activation of caspases during beta-sitosterol-mediated apoptosis in human colon cancer cells. **Int. J. of Oncology**, v. 23 (6), p.1657-1662, 2003.

CHU, K. O.; WANG, C. C.; CHU, C. Y.; ROGERS, M. S.; CHOY, K. W.; PANG, C. P. Determination of catechins and catechin gallates in tissues by liquid chromatography with coulometer array detection and selective solid phase extraction. **J. Of Chromatography**, v. 810, p.187-195, 2004.

CORREA JUNIOR, C; MING, L. C. Geographic distribution and associated environments characterization of Catuba (*Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae) in Parana state – Brazil. **Acta Horticulturae**, 2000.

CORTEZ, D. A. G. **Estudo fitoquímico de *Trichilia estipulada* e *Trichilia hirta* (Mliaceae)**. São Carlos: 1993. 254f. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 1993.

CORTEZ, D.A.G. Desenvolvimento de metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência para o controle de qualidade de amostras comerciais de catuabas. VI Jornada Paulista de Plantas Medicinais. **Anais...** São Pedro, out. 2003.

**Farmacopéia Brasileira IV Edição**. Ed. Atheneu. São Paulo, 1988.

KLEIN, R. M., **Flora Ilustrada Catarinense – Meliáceas**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, p. 55-60, 1984.

KLETTER, C.; GLASL, S.; PRESSER, A.; WERNER, I.; REZNICEK, G.; NARANTUYA, S.; CELLEK, S.; HASLINGER, E.; JURENITSCH, J. Morphological, chemical and functional analysis of catuaba preparations. **Planta Medica**, v. 70 (10), p. 993 -1000, 2004.

KRAUS, J. E.; ARDUIN, M. **Manual basico de método em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: Eder, 1997, 198p.

LEITE, F. **Validação em análise química**. 4 ed. Campinas: Átomo, 2002.

LIANG,Y.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, v. 812, p. 53 - 70, 2004.

MARQUES, L.C., Contribuição ao esclarecimento da identidade botânica da droga vegetal catuaba. **Revista Racine**, v. 43, p. 8 - 11, 1998.

MING, L. C.; CORREA JUNIOR, C. Geographic distribution and associated environments characterization of *Trichilia catigua* A. Juss. – Meliaceae in Santa Catarina state – Brazil. **Acta Horticulturae**, 2000.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática em análise fitoquímica. **Trib. Farm.**, vol. 47 (1), p. 3 -19, 1979.

MORI, H.; TANAKA, T.; SHIMA, H.; KUNIYASU, T.; TAKAHASHI, M. Inhibitory effect of chlorogenic acid on methylazoxymethanol acetate-induced carcinogenesis in large intestine and liver of hamsters. **Cancer Letters**, v. 30, p.49-54, 1986.

MORISHITA, Y.; YOSHIMI, N.; KAWABATA, K.; MATSUNAGA, K.; SUGIE, S.; TANAKA, T.; MORI, H. Regressive effects of various chemopreventive agents on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in the rat colon. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 88, p.815-820, 1997.

MOSQUETA, I. S. **Morfologia e desenvolvimento dos frutos, sementes e plântulas de *Cabralea canjerana* Vell. Mart., *Guarea kunthiana* A. Juss e *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae – Melioideae)**. Rio Claro, 1995. 160 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista.

MOURÃO, K.S.M.; PINTO, D.D.; SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S. Morfo-anatomia da plântula e do tirodendro de *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. e *T. pallida* Sw. (Meliaceae). **Acta Scientiarum**, v. 24, n. 2, p. 601-610, 2002.

NACZK, M., SHAHIDI, F., Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95 -111, 2004.

O'BRIEN, T. P.; FEDER, N.; MCCULLY, M. E. Polychromatic staining of plant cell walls by toluidine blue. **O. Protoplasma**, Vienna, v. 59 (2), p.368-373,1965.

OLIVEIRA, C.H.; MORAES, M.E.; MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.; ABIB, E.; DE NUCCI, G. Clinical toxicology study of an herbal medicinal extract of *Paullinia cupana*, *Trichilia catigua* *Ptychopetalum olacoides* and *Zingiber officinale* (Catuama) in healthy volunteers. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 54 - 57, 2005.

OLIVEIRA, K. P.; SILVA, A. B.; SOFIAT, F. T.; FERNANDES, M. A.; MARQUES, L. C. Estudo farmacológico das cascas da catuaba vermelha (*Trichilia catigua* Adr. Juss. – Meliaceae). In: VI Jornada Paulista de Plantas Mediciniais. **Anais...** São Pedro, out 2003.

OTUKI M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L. A.; CANI, G. S.; SANTOS, A. R. ; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J. Pharmacol Exp. Ther.**, v. 313 (1), p.310-318, abr 2005.

PIZZOLATTI, M.G.; VENSON, A.F.; SMÂNIA, A.J.; SMÂNIA, E.F.A.; FILHO, R.B. Two epimeric flavalignans from *Trichilia catigua* (Meliaceae) with antimicrobial activity. *Z. Naturforsch*, vol. 57 c, p. 483-488, 2002.

PIZZOLATTI, M.G.; VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.; MADUREIRA, L.A.; BRAZ FILHO, R. Minor gamma-lactones from *Trichilia catigua* (Meliaceae) and its precursors by GC-MS. *Natural Product Research*, v. 18 (5), p. 433 - 438, 2004.

PUPO, M.T.; ADORNO, M.A.T.; VIEIRA, P.C.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F.; PIRANI, J.R. Terpenoids and steroids from *Trichilia* species. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 13, n. 3, p. 382-388, 2002.

ROESER, K. R. Die Nadel der schwarzkiefer-massenprodukt und kunstwerk der natur. *Mikrokosmos*, Stuttgart, v.61 (2), p.33-36, 1962.

ROLIM, A.; MACIEL, C.P.; KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; SALGADO-SANTOS, I.M.; VELASCO, M.V. Validation assay for total flavonoids, as rutin equivalents, from *Trichilia catigua* Adr. Juss (Meliaceae) and *Ptychopetalum olacoides* Bentham (Olacaceae) commercial extract. *J. AOAC Int.*, v. 88 (4), p. 1015-1019, 2005.

SHEN, J., SHAO, X., A comparison of accelerated solvent extraction, soxhlet extraction and ultrasonic assisted extraction for analysis of terpenoids and sterols in tobacco. *Anal. Bioanal. Chem.*, v. 383 (6), p. 1003-1008, 2005.

SOTILLO, D. V. R.; HADLEY M. Chlorogenic acid modifies plasma and liver concentrations of: colesterol, triacyglycerol, and minerals in (*fa/fa*) Zucker rats. *J. Of Nutritional Biochemistry*, v. 13, p.717-726, 2002.

SOUZA, L. A.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; SILVÉRIO, A. Morphology and anatomy of the flowers of *Trichilia catigua* A. Juss., *T. elegans* A. Juss. and *T. pallida* Sw. (Meliaceae). *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 44, n. 4, p. 383 - 394, 2001.

TANAKA, T.; KOJIMA, T.; KAWAMORI, T.; WANG, A.; SUZUI, M.; OKAMOTO, K.; MORI, H. Inhibition of 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis by the naturally occurring plant phenolics caffeic, ellagic, chlorogenic and ferulic acids. *Carcinogenesis*, v. 14, p.1321-1325, 1993.

TAPIERO, H.; TEW, K.D.; NGUYEN, G.; MATHÉ, G. Polyphenols: do they play a role in the prevention of human pathologies? *Biomedical Pharmacotherapy*, v. 56, p. 200 - 207, 2002.

VAZ, R.V.; MATA, L.V.; CALIXTO, J.B. Analgesic effect of the herbal medicine Catuama in thermal and chemical models of nociception in mice. *Phytotherapy Research*, v. 11, p. 101-106, 1997.

WAGNER, H. BLADT, S., **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2 ed., New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996.